

Сконструированы экспериментальные модели первичных трансформантов картофеля, экспрессирующие гибридный ген *cry3aM-licBM2*. Молекулярно-биологический анализ и биотесты экспериментальных моделей позволяют предложить новую систему экспрессию *cry* генов в растениях. Эта система основана на экспрессии гибридных генов, в состав которых входит последовательность репортерного гена лихеназы, и использовании в качестве регуляторного элемента светоиндуцибельного промотора, который обеспечивает преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растения (листьях) – органах-мишенях для насекомых-вредителей. Показано, что Cry3aM белок в составе гибридного Cry3a-LicBM2 белка сохраняет свою биологическую активность – инсектицидное действие на личинки колорадского жука.

Показано, что экспрессия гибридного гена *prqA-licBM3* в клетки *Synechocystis* обуславливала у них значимое повышение устойчивости к метилвиологену.

Использование термостабильной лихеназы как трансляционного репортера позволяет получать данные, которые трудно или невозможно получить с применением традиционных методов анализа экспрессии генов, что является важным при проведении фундаментальных и прикладных исследований. Основываясь на свойствах репортерного белка лихеназы, входящего в состав гибридных белков, представляется возможным использовать эту репортерную систему для мониторинга трансгенов в агроценозах, поскольку эта система является достаточно простой и точной, и не требует больших материальных и временных затрат.

Таким образом, показано, что использование современных методов генной инженерии и геномики позволяет разработать системы экспрессии с различными регуляторными элементами, создать оптимальные экспериментальные модели трансгенных растений, перспективные для биотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №08-04-90410_укр.

КУЛЬТУРА ТКАНИ *IN VITRO* ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* L.)

Т.И. Фоменко, М.К. Малюш

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Беларусь
fomenko_ti@mail.ru

Успех селекционного процесса, направленного на повышение урожайности и качества сельскохозяйственных культур, определяется в значительной степени достижениями современных биотехнологий. В селекции люпина наряду с широко применяемыми

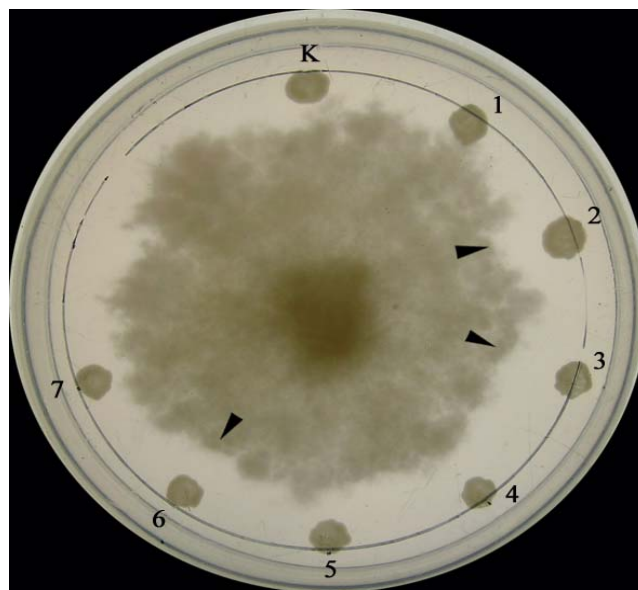


Рис. Чашечный тест на антимикробную активность против гриба *Fusarium culmorum*. Ингибирование роста гиф гриба *Fusarium culmorum* (на третий день). Дрожжевые трансформанты: К – pGal-pre, 1 – pGal-pre-licBM2, 2 – pGal-pre-sd2, 3 – pGal-pre-sd2-licBM2, 4 – pGal-pre-licBM2-sd2, 5 – pGal-pre-sdmod, 6 – pGal-pre-sdmod-licBM2, 7 – pGal-pre-licBM2-sdmod. Стрелками показаны места ингибирования роста колонии гриба *Fusarium culmorum*.

традиционными методами имеются пока немногочисленные примеры получения трансгенных растений с целенаправленно измененным геномом и новыми хозяйственно-ценными признаками [1, 2]. Эти достижения невозможны без разработки методов культуры ткани *in vitro*.

У представителей семейства Бобовые регенерация *in vitro* в значительной степени определяется генотипом, и сорта, способные к регенерации, встречаются не часто. Показано, что не только видовая, но и сортовая специфичность экспланта является одним из важных факторов индукции морфогенеза [3, 4]. Технологии, связанные с модификацией генома, требуют оценки морфогенной активности генотипов и выделения тех из них, которые, обладая наибольшим регенерационным потенциалом, можно с успехом использовать при проведении агробактериальной трансформации. Наличие видовых и сортовых особенностей морфогенных процессов у бобовых в культуре *in vitro* с одной стороны и необходимость использования генотипов с высоким морфогенным потенциалом, объясняет актуальность разработки метода регенерации растений [5].

Целью наших исследований явилась оценка процессов первичного и вторичного органоогенеза в культуре *in vitro* люпина узколистного. Проведенные нами сравнительные исследования инициации каллуса и скорости его пролиферации в культуре *in vitro* четырех видов люпина: многолистный (*Lupinus polyphyllus*), многолетний (*L. perennis*), узколистный (*L. angustifolius*) и желтый (*L. luteus*) с использованием сред, содержащих ИУК, 2,4-Д, БАП, α -НУК и кинетин в интервале концентраций гормонов 0,5-5 мг/л, на тканевых эксплантах листа, эпикотили, гипокотили и семядолей показали, что по способности к каллусообразованию на эксплантах листа и гипокотили при использовании среды, содержащей 1 мг/л α -НУК, 1 мг/л 2,4-Д, 1мг/л БАП, исследованные виды люпина можно расположить в следующий убывающий ряд: многолистный, узколистный, желтый, многолетний. Последующее пассирование каллуса на морфогенные среды показало, что вторичный органоогенез, который считается труднодостижимым для большинства видов семейства Бобовые, получен только для люпина многолистного. Люпин узколистный, как показали проведенные нами исследования, характеризуется менее выраженным морфогенным потенциалом, что подтверждает трудность получения для этого вида вторичного органоогенеза. Однако люпин узколистный представляет интерес с точки зрения селекции и возможности применения современных технологий, которые в свою очередь требуют углубленных исследований особенности проявления морфогенного потенциала этого вида.

Анализ имеющихся публикаций исследований показывает, что вторичный морфогенез в культуре ткани люпина является трудно достижимым и описан для люпина узколистного в единичной публикации [6]. На сортах люпина узколистного Митан и Першацвет нами предпринята попытка получения вторичного морфогенеза на ткани гипокотили по методике Stoga G.E. (1987) с использованием в среде инициации 2,4-Д и кинетина. Отмечен активный каллусогенез на ткани гипокотилей 4-х дневных проростков исследованных сортов при культивировании на среде инициации МС, содержащей 4 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л кинетина и 3 мг/л 2,4-Д, 0,3 мг/л кинетина. Развитие каллуса наблюдали как на свету, так и в темноте на обеих средах культивирования. На свету развивалась гранулированная ярко-зеленая каллусная ткань в отличие от бледно-желтого гомогенного рыхлого каллуса темного варианта. На среде, содержащей 4 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л кинетина, каллусогенез выражен активнее, чем на среде с более низким содержанием гормонов. Визуально каллус сорта Митан на двух исследованных средах отличался большей степенью грануляции по сравнению с сортом Першацвет, что является одним из внешних признаков возможного развития морфогенной реакции. Однако последующее развитие при пассировании на морфогенную среду в описанном эксперименте и при использовании иных, разработанных нами схем инициации каллусогенеза, не показало вторичного органоогенеза. Одной из

причин отсутствия морфогенной реакции могут быть сортовые особенности исследованных генотипов.

Непрямой органогенез, хотя и применим для агробактериальной трансформации, ограничен в использовании в силу сложности его получения у представителей семейства Бобовые. Более достижим прямой стеблевой органогенез, причем семядольные узлы наиболее отзывчивы к индукции множественных побегов через органогенез. Большинство эксплантов проявляют отзывчивость к цитокинину, особенно к БАП и тиазурону, использование которых в культуральных средах позволяет усилить морфогенные процессы [5]. Развитие прямого стеблевого морфогенеза в наших исследованиях получено на ткани гипокотили и семядольного узла сортов люпина узколистного сортов Миртан, Першацвет, Верас, Прывабны, Митан. Показано, что морфогенную реакцию в диапазоне концентраций 1-6 мг/л БАП проявили 100% эксплантов семядольных узлов. При культивировании гипокотилей получен первичный органогенез с частотой от 12 до 20 % и усилением морфогенной реакции при увеличении концентрации цитокинина. Для ткани семядолей показано активная пролиферация ткани без развития морфогенной реакции. Диапазон оптимальных концентраций БАП для получения морфогенеза у ткани гипокотилей и семядольных узлов лежит в области 2-4 мг/л. Увеличение концентрации до 6 мг/л приводит к усилению морфогенной реакции, но развитию аномально укороченных побегов.

Оценка возможности получения прямого органогенеза в культуре *in vitro* сортов люпина узколистного Миртан и Першацвет проведена нами также на ткани незрелых зародышей. Исследовали индукцию развития ткани незрелых зародышей на культуральных средах с различным содержанием и соотношением ауксинов и цитокининов в диапазоне концентраций 0,1 - 4 мг/л. Анализ развития эксплантов показал, что преобладание 2,4-Д в гормональном составе среды культивирования (1 или 2 мг/л 2,4-Д при концентрации БАП 0,2 мг/л) подавляет процесс первичного морфогенеза из меристематических тканей и направляет его по пути каллусообразования. Отмечено, что у сорта Першацвет эта тенденция выражена слабее, чем у сорта Миртан. Показано значение способа вычленения зародыша при подготовке экспланта. На зародышах без фрагментов семядолей наблюдали развитие каллуса, в то время как наличие семядолей приводит к разбуханию экспланта и ослаблению каллусогенеза. На морфогенных средах с содержанием БАП 4 мг/л на эксплантах незрелых зародышей с фрагментами семядолей наблюдали побегообразование из пазушных меристем. Степень выраженности этого процесса отличалась по сортам: 100 % эксплантов незрелых зародышей сорта Першацвет и 43 % эксплантов сорта Миртан проявили первичный морфогенез. Стеблевой органогенез, полученный из незрелых зародышей на среде инициации МС, содержащей 4 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК, поддерживали в течение года на средах с содержанием БАП в диапазоне концентраций 2-6 мг/л. Показано, что активность меристематических тканей незрелых зародышей в культуре *in vitro* позволяет получать активный стеблевой органогенез и длительно поддерживать морфогенные процессы при пассировании.

Представленные исследования показали активное развитие стеблевого морфогенеза на эксплантах семядольных узлов и более низкую частоту процесса у ткани гипокотилей. Показана возможность получения первичного морфогенеза на ткани незрелых зародышей. Отмечено отсутствие вторичного органогенеза на каллусной ткани исследованных сортов. Установлены сортовые отличия по степени выраженности морфогенных процессов различных тканей.

1. L. Molvig, L.M. Tabe, B.O. Eggum, A.E. Moore, S. Craig, D. Spencer, T.J.V. Higgins. Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 1997. - V. 94. - P.8393 - 8398.

2. A.P. Pigeaire, D. Abernethy, P.M. Smith, K. Simpson, N. Fletcher, C. Lu, C.A. Atkins, E. Cornish. Transformation of grain legume (*Lupinus angustifolius* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apices // Molecular Breeding.-1997.-V.-3.- P. 341-349.
3. E.S. Zgagacz., J.J. Rybczynski. Different *in vitro* responses of three species of lupin // J. of Applied genetics. 1996, V. 37A, P.133-135.
4. В.Н. Решетников, Т.И. Фоменко, М.К. Малюш. Каллусогенез люпина. Биохимическая характеристика.// Весці НАНБ.-1999.-N4.-С.5-11.
5. A. Chandra, D. Pental. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview // Current Science. - 2003. - V.84, №3.-P. -381-387.
6. G.E. Sroga. Plant regeneration of two *Lupinus* spp. From callus cultures via organogenesis // Plant Sci.- 1987.- V. 51- P. 245-249.

СЕЛЕКЦИЯ ЛЮПИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ЗАСУХЕ И ПОВЫШЕННЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ

А.С. Шик, В.В. Борсук

*Полесский агро-экологический институт НАН Беларуси, Брест, Беларусь
paeilab@tut.by*

Климатические условия в Республике Беларусь за последние 15-20 лет претерпели значительные изменения. Так, в западной части Белорусского Полесья из пяти лет во время вегетации 2-3 года наблюдаются весенне-летние засухи с повышенными температурами. В связи с этим перед селекционерами поставлена задача по созданию и внедрению в аграрное производство новых устойчивых к неблагоприятным условиям пластичных сортов и гибридов сельскохозяйственных культур.

Степень эффективности селекционной работы определяется наличием ценного исходного материала для создания форм, устойчивых к действию экологических стрессовых факторов. Наиболее эффективным и точным способом для оценки сортов на устойчивость к засухе и повышенным температурам является сооружение засушников и камер искусственного климата. Однако такие исследования требуют значительных затрат и не всегда достоверны.

Метеорологические условия 2005-2007 годов способствовали проверке селекционного материала желтого и узколистного люпина (изучению подвергались 24 сорта и образца) на реакцию растений к стрессовым ситуациям (таблица). Исследования проводились в ЧУАП «Озяты» Жабинковского района на мелиорированных низкобонитетных торфяно-глеевых, дерново-глееватых и дерново-подзолистых почвах, составляющих более 80 % сельскохозяйственных угодий Брестского Полесья.

Результаты исследований показали, что реакция узколистного люпина на повышенные температуры в большей степени существеннее по сравнению с желтым. С ростом температуры на 1 °С вегетационный период желтого люпина уменьшался на 6,7 дня, в то время как у узколистного – на 8,3 дня.

Длина вегетационного периода зависит от количества выпавших осадков. Их уменьшение на 50-70 мм в весенне-летний период при практически равных среднесуточных температур приводило к сокращению сроков созревания на 8-25 дней.

Следует отметить, что между сортами желтого люпина варьирование устойчивости к засухе почти не наблюдалось, тогда как у узколистных форм различия весьма существенны. Среди изученных сортов наиболее устойчивыми к дефициту влаги и повышенным температурам относятся БСХА 382, Мотив 389, «Кастрычник», Берестье, Пружанский (желтые люпины) и Вясковы, Прывабны, Гуливер, Эдельвейс, Сидерат 890 (узколистные люпины). Они отличались более поздним периодом созревания и мощно развитой корневой системой.