

7. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Лукичева Л.А., Смыков А.В., Сенин В.В., Литвинова Т.В. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91. – С. 111-120.
8. Митрофанова О.В., Михайлов А.П., Чехов А.В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 7-34.
9. Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 46 с.
10. Чирков С.Н., Приходько Ю.Н. Пиротест – новый метод диагностики вируса шарки сливы // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: Материалы междунар. научно-практической конф. – Москва, 2001. – С. 71-72.
11. Шевченко Т.П., Полищук В.П., Бойко А.Л. Віруси рослин: штамове різноманіття. – Київ: Фітосоціоцентр, 2002. – 78 с.
12. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses // J. Gen. Virol. – 1977. – V. 34, N 3. – P. 475-483.
13. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and deletion of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46, N 5. – P. 417-421.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.
15. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus // Acta Hort. – 1977. – Vol. 78. – P. 437-442.

Резюме

Представлены биотехнологические системы оздоровления косточковых плодовых культур и получения безвирусных растений персика, абрикоса, сливы, алычи и черешни как комплексный подход, состоящий из 6 блоков-методов.

Подано біотехнологічні системи оздоровлення кісточкових плодкових культур і одержання безвірусних рослин персика, абрикоса, сливи, аличі та черешні як комплексний підхід, що складається з 6 блоків-методів.

Biotechnological systems of stone fruits cleaning up and virus free peach, apricot, plum, cherry plum and sweet cherry obtaining as a complex approach completed on 6 blocks-methods have been presented.

НАМ И.Я., ЗАЯКИН В.В.

Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского,
Россия, 241036, Брянск, ул. Бежицкая, 14
e-mail: iya_nam@online.debryansk.ru

СОЗДАНИЕ НОВЫХ ФОРМ РЕМОНТАНТНОЙ МАЛИНЫ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Создание и оценка новых сортов культурных растений, характеризующихся высокой продуктивностью и устойчивостью к болезням, вредителям и стрессорным

факторам абиотической природы, наряду с традиционными методами генетики включает применение биотехнологических подходов (Шевелуха В.С., 2000). Современная селекция широко использует культивирование клеток, органов и тканей *in vitro*, генетическую инженерию, а также методы молекулярной генетики при анализе генетического родства и для паспортизации видов, сортов и полученных гибридных форм, при скрининге селекционного материала на наличие вирусов и других патогенов и для идентификации возбудителей заболевания.

Ремонтантная малина очень медленно размножается в полевых условиях: из-за раннего плодоношения - на побегах первого года, вегетативные почки на отрастающих побегах рано дифференцируются по цветочному типу (Козаков И.В., 1994). При этом ассимиляты в растениях ремонтантной малины преимущественно потребляются растущими побегами и плодоземлементами, что вызывает существенное уменьшение образования корневых отпрысков, замедление вегетативного размножения. Важнейшей проблемой для селекции и для создания производственных питомников этой культуры является массовое поражение растений вирусом кустистой карликовости малины (ВККМ), достигающее в некоторых случаях 100%.

Методы клонального микроразмножения и регенерации растений *in vitro* были ранее разработаны для ряда плодово-ягодных культур, в частности, для малины, ежевика, и др. (Высоцкий В.А., 2001;). Для размножения *in vitro* большинства культур на этапах индукции из эксплантов первичного побега и размножения растений различными авторами применялись цитокинины 6-БАП, кинетин и зеатин, и для ризогенеза - ауксины ИУК, ИМК или НУК (Fiola J.A. et al., 1990; Graham J. et al., 1997).

Настоящая работа проведена на ремонтантной малине и посвящена оптимизации методов клонального микроразмножения, регенерации и трансформации растений, разработке молекулярно-генетического анализа разных видов, сортов и генотипов малины с помощью ISSR-PCR, анализа ВККМ методом RT-PCR и созданию трансгенных растений малины, устойчивых к ВККМ.

Материалы и методы

Культивирование *in vitro* малины проводили на среде Мурасиге-Скуга с увеличенной в три раза концентрацией хелата железа. Приготовление питательных сред, стерилизация материала, выделение эксплантов осуществлялось с помощью стандартных приемов (Бутенко Р.Г., 1964). Экспланты для клонального микроразмножения (апексы и зачатки цветков размером 0.2 – 0.7 мм) выделяли из почек побегов замещения. Стерилизацию проводили с помощью 0.1% раствора сулемы.

На разных этапах клонального микроразмножения ремонтантной малины применяли среды, содержащие цитокинины 6-БАП (1-4 мг/л), TDZ (0.025-0.2 мг/л), 4-PU (0.1 – 0.4 мг/л) и ауксины ИУК или ИМК (0.5-1.5 мг/л). При кратковременной обработке побегов для ризогенеза использовали ИМК, 1 г/л. При регенерации растений в качестве источника эксплантов использовали листья и черешки, изолированные от укорененных *in vitro* растений малины. Отсутствие генетических изменений в полученных регенерантах также доказывали с помощью ISSR-PCR.

Молекулярно-генетический анализ разных видов, сортов и образцов малины проводили методом ISSR-PCR по модифицированной методике Prevost & Wilkinson (1999), праймеры были синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва).

Для генетической трансформации растений использовали штаммы *A. tumefaciens*, любезно предоставленные лабораторией генетической инженерии растений Института общей генетики: E35S-L-licB, E35S-licB, E-nptII (Мусийчук К.А., 2001). Наличие лихеназной активности в растениях - регенерантах определяли с помощью чашечного теста (Голденкова И.В., 2002). В опытах использовали также штамм *A. tumefaciens* GANE 7, содержащий ген b6, любезно предоставленный Институтом клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины. Ген b6

участвует в тонкой регуляции действия цитокининов в растениях и способен вызвать повышение регенерационной способности у табака (Кучук Н.В., 1997).

Результаты и обсуждение.

Для ускоренного размножения элитных селекционных образцов ремонтантной малины нами был оптимизирован метод клонального микроразмножения. Меристемы из вегетативных почек плохо развиваются в культуре на средах с 6-БАП, более половины их погибает. Экспланты из цветочных почек погибают на средах с 6-БАП полностью. Для образцов малины, погибавших *in vitro*, необходимо было найти регуляторы роста, более эффективные на этапе их введения в культуру. Нами были применены цитокинины ряда дифенилмочевины - N-(4-пиридил)-N-фенилмочевина (4-PU) и тидиазурон (TDZ), которые ранее использовались на плодовых культурах для регенерации растений из листовых дисков. На средах, содержащих 4-PU и TDZ, была достигнута высокая приживаемость меристем из вегетативных почек генотипов, ранее полностью погибавших на средах с 6-БАП (табл. 1).

Таблица 1

Влияние различных цитокининов на развитие меристем *in vitro*

Концентрация цитокинина (мг/л)	Количество меристем			
	6-БАП		4-PU	
	исходных	выживших (%)	исходных	выживших (%)
Генотип малины 22-15-1				
0.2	16	0	17	65
0.5	16	0	12	83
1.0	15	0	17	86
Генотип малины 6-х-ж				
0.2	15	0	16	69
0.5	17	0	16	94
1.0	16	0	17	100

Применение TDZ и 4-PU позволило индуцировать стеблевой морфогенез из цветочных почек и с эффективностью, близкой к 100%, вводить новые формы ремонтантной малины в культуру *in vitro* в течение всего года, независимо от регенерационного потенциала изучаемого генотипа и типа дифференциации почек. В настоящее время разработанный метод успешно применен для введения в культуру *in vitro* более 150 генотипов ремонтантной малины. Для поддержания коллекции разработаны условия длительного беспересадочного культивирования, при комнатной температуре растения оставались зелеными и жизнеспособными в течение 9 месяцев.

В целом, оптимизация метода клонального микроразмножения позволяет в сентябре ввести перспективные генотипы малины в культуру *in vitro* и через 9-10 месяцев, в мае-июне передать размноженный материал для селекционной оценки в полевых условиях. Это обеспечило сокращение на 4 – 5 лет сроков селекции от получения элитной формы до передачи сорта в систему сортоиспытания.

Для создания трансгенных форм ремонтантной малины, устойчивых к болезням, разработаны методы регенерации растений из листовых дисков с применением 4-PU и TDZ. Для большинства образцов оптимальной является концентрация TDZ 0.1 мг/л, для Геракла это – 0.2 мг/л. Стеблевой морфогенез наблюдается у всех исследованных форм - на уровне 3.3 - 96.0% в зависимости от генотипа, более трети изученных форм показали регенерацию на уровне 50% и более. Молодые листья имеют более высокий потенциал регенерации, на старых листьях морфогенез практически отсутствует. При использовании черешков верхних листьев регенеранты наблюдались у 62% эксплантов, у черешков нижних листьев регенерация отсутствовала.

Нами была разработана система генетической трансформации ремонтантной малины методом кокультивирования листовых дисков с *A. tumefaciens*. Эффективность

метода доказана с помощью PCR и тест-системы на наличие лихеназной активности. Для трансформации малины наиболее эффективны методы кокультивирования листовых дисков с агробактерией *A. tumefaciens* под каплей или на газоне ночной бактериальной культуры, при этом частота регенерации достаточна для успешной работы по трансгенезу. Селекция трансформантов проводится по двухэтапной схеме: на этапе регенерации используется минимальная концентрация канамицина, далее концентрация увеличивается в 3-5 раз, что увеличивает эффективность получения трансформантов в несколько раз. Методом ISSR-PCR показана генетическая однородность полученных регенерантов ремонтантной малины и их идентичность исходному образцу.

Таким образом, разработанные методы регенерации и генетической трансформации растений малины позволяют перейти на качественно новый уровень в селекции ремонтантной малины и создавать трансгенные формы с новыми, заранее заданными свойствами.

Для селекции важна оценка генетического родства используемых видов, сортов и генотипов, для чего был разработан молекулярно-генетический метод анализа малины на основе ISSR-PCR. Это позволило провести генетическую паспортизацию и построить дендрограммы генетического родства, отражающие взаимосвязь сортов с обычным типом плодоношения, а также 5 видов малины: *Rubus idaeus* L., *Rubus crataegifolius* Bunge, *Rubus odoratus* L., *Rubus occidentalis* L. и *Rubus arcticus sfellarcticus* G. Larsson ("Sofia" из коллекции ВИРа), и ремонтантных сортов, полученных методом межвидовой гибридизации. Показано, что ремонтантные сорта и генотипы малины характеризуются наличием полосы с молекулярной массой 270 п.н.

Из более 30 различных вирусов, поражающих малину, наиболее трудноконтролируемым и вредоносным является вирус кустистой карликовости малины (ВККМ). Для селекции на устойчивость и толерантность малины к ВККМ, и для контроля распространения вируса нами разработан чувствительный метод обнаружения ВККМ в растениях малины на основе RT-PCR. Показано, что максимальные концентрации вируса в полевом материале наблюдаются в сентябре-октябре. Скрининг лабораторного материала и посадок малины на наличие ВККМ позволяет проводить отбор и выбраковку инфицированных клонов. Проводится клонирование амплифицированных вирусспецифических фрагментов в бактериальные плазмиды для последующего секвенирования и агробактериальной трансформации малины.

Выводы

Оптимизирован метод клонального микроразмножения *in vitro* ремонтантной малины с применением цитокининов TDZ и 4-PU, что обеспечило ускоренное размножение образцов практически независимо от генотипа и резкое ускорение селекции. Разработанная система регенерации ремонтантной малины из листовых дисков и ее трансформации методом кокультивирования с *A. tum.* позволила перейти к работам по созданию трансгенных форм малины. Разработанный метод анализа ВККМ с помощью RT-PCR позволяет проводить массовый скрининг полевых и лабораторных растений на наличие вирусов. Проводится работа по созданию трансгенных форм малины, устойчивых к ВККМ.

Литература

1. *Высоцкий В.А., Алексеенко Л.В.* Чувствительность изолированных органов плодовых растений к *Agrobacterium rhizogenes* в культуре *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. – 2001. - Т.8, С. 154 – 157.
2. *Казаков И.В.* Малина и ежевика. - М. - 1994. – 114 с.
3. *Кучук Н.В.* Генетическая инженерия высших растений. - Киев.: Наукова думка. – 1997. - 152 с.

4. *Мусийчук К.А.* Бифункциональные репортерные системы для про- и эукариот на основе делеционного варианта термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum*. - Автореф. на соиск. ... канд б.н. – 2001. - 20 с.
5. *Нам И.Я., Заякин В.В., Вовк В.В., Казаков И.В.* Применение методов биотехнологии для ускорения селекции ремонтантной малины // Сельскохоз. биотехнология. Избранные работы под ред. Шевелухи В.С. - Том 1. - Москва. – 2000. - С.79 – 88.
6. *Приходько Ю.Н.* О видовом составе и распространенности вирусов малины в Европейской части России // Плодоводство и ягодоводство России.– Москва, 1997. - Т. 4.– С. 97-101.
7. *Шевелуха В.С.* Проблемы, приоритеты и масштабы сельскохозяйственной биотехнологии в XXI веке / Сельскохозяйственная биотехнология. - Под ред. Шевелухи В.С. – М.: Евразия+. - 2000. – С. 3 – 16.
8. *Fiola J.A., Swartz H.J., Hassan M.A., Bors R.H., Mc Nicol R.J.* Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves // Plant cell tissue organ cult. – 1990. - V. 20. - P. 223 – 228.
9. *Graham J.A., Iasi L., Millam S.* Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars // Plant cell org. Cult.. – 1997. - V.48. - P. 167-173.

Резюме

Для создания новых сортов ремонтантной малины оптимизирован метод клонального микроразмножения *in vitro* с применением цитокининов TDZ и 4-PU. Разработана система регенерации и трансформации, что позволило перейти к созданию устойчивых к ВККМ форм малины. Метод анализа ВККМ с помощью RT-PCR позволяет проводить скрининг полевых и лабораторных растений на наличие вирусов.

For the breeding of everbearer raspberry we have optimize method of clonal micropropagation *in vitro* using cytokinins of diphenylurea – TDZ and 4-PU. Worked out regeneration and transformation system allows to obtain transgenic raspberry forms. To control RBDV content and for breeding resistant cultivars, RT-PCR method of RBDV analyses was developed.

ПАРХОМЕНКО Ю.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ПИЛИПЧУК С.Ю., ЧЕХОВСКАЯ Л.И., СТЕПАНЕНКО С.П.

*Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины,
01601 Киев, ул. Леонтовича 9, uipark@biochem.kiev.ua*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТА МЕТОВИТАН ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ВОЗДЕЙСТВИЮ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ

Хроническое воздействие неблагоприятных факторов (как экзогенного, так и эндогенного происхождения) на организм человека и животных часто является причиной развития стабильного дисбаланса в клеточном метаболизме, что приводит к более серьезным последствиям для здоровья, в частности, к снижению именно статуса, обусловленному нарушениями на уровне биосинтеза белков. В связи с катастрофическим загрязнением окружающей среды на нашем континенте, такая ситуация становится довольно распространенной, и поиск способов коррекции клеточного метаболизма, направленных на повышение выживания организма в неблагоприятных условиях, не теряет актуальности. Один из таких подходов – использование поливитаминных препаратов, так как считается, что воздействие на организм неблагоприятных факторов часто сопровождается и нарушением его витаминного статуса. Однако результаты наших исследований свидетельствуют, что