

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Известия ТСХА, выпуск 1, 2003 год

УДК 631.52:635.21

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ

М.Ю. ЧЕРЕДНИЧЕНКО

(Кафедра с.-х. биотехнологии)

Изучали регенерационные способности различных сортов картофеля, обладающих различной степенью устойчивости к патогенам, влияние условий проведения пре-культивации на эффективность последующей регенерации выбранных сортов культурного картофеля. Приводятся данные сравнения эффективности регенерации растений выбранных сортов при использовании различных векторных конструкций, несущих ген дефензина редьки.

Многие сорта картофеля, внесенные в реестр районированных, слабо или средне устойчивы к различным патогенам (табл. 1), или даже восприимчивые (Гатчинский — к нематоде, Десница — к вирусу X, Лорх — к раку, картофельной нематоде, ВСЛК, парше обыкновенной, Луговской — к нематоде и вирусам).

Несмотря на длительный срок, в течение которого картофель известен как культурное растение, коротких эффективных путей выведения новых сортов практически не существует. Это связано с особенностями генотипа, полиплоидией культурных видов и рядом дру-

гих их свойств. Поэтому большое значение приобретает использование достижений генетической инженерии и клеточной селекции.

Успешное развитие молекулярной биологии, разработка технологий получения рекомбинантных молекул ДНК, характеристика генов, ответственных за хозяйственно ценные признаки и прежде всего генов устойчивости, создание целого арсенала методов клеточной селекции и генетической инженерии растений открыли широкие возможности как для фундаментальных, так и для прикладных исследований [1, 3, 4].

Большинство известных до настоящего времени за-

Т а б л и ц а 1

**Устойчивость некоторых районированных сортов картофеля
к основным грибным заболеваниям (в баллах)**

Сорт	Фитофтороз		Парша	Ризоктониоз
	листья	клубни		
Альянс	3	4	4	4
Брянский ранний	1	7	6	5
Волжанин	5	7	3	7
Десница	4	5	5	-
Жуковский ранний	3	5	8	5
Ильинский	3	5	-	-
Лорх	6	5	3	5
Лукъяновский	5	7	6	6
Никулинский	8	8	6	5
Осень	6	6	6	6
Петербургский	5	4	7	-
Раменский	7	7	8	5
Эффект	7	6	7	6

щитных генов растений кодирует устойчивость лишь к ограниченному кругу патогенов и является неэффективными для других возбудителей болезней. В связи с этим представляет интерес относительно недавно охарактеризованная группа генов так называемых пептидных антибиотиков, обладающих широким спектром защитного действия.

Впервые эти антимикробные пептиды небольшого молекулярного веса были открыты у насекомых и млекопитающих, где они синтезируются в ответ на повреждение или инфекцию. К одной группе относятся цекропины и мангенины — основные пептиды, содержащие 20—40 аминокислотных остатков, способные внедряться в микроб-

ные мембранны, образуя при этом ионные каналы. Другой класс антимикробных пептидов, названных дефензинами, представлен цистеин-обогащенными пептидами, отличительной особенностью которых является стабилизированный цистеином трехмерный комплекс, включающий антипараллельные Р-цепи, и которые отличаются длиной, числом цистеиновых групп, и др. [6].

У насекомых дефензины (34-43 аминокислотных остатка, 3 дисульфидных мостика) образуются в ответ на заражение патогеном и выделяются в гемолимфу. Дефензины животных (29-34 аминокислотных остатка, 3 дисульфидных мостика) производятся различными спе-

анализированными клетками в теле животных. Они широко распространены в гранулах фагоцитов крови и вместе с другими антимикробными пептидами и активными соединениями кислорода участвуют в клеточном ответе на атаку внедрившихся микроорганизмов.

Исторически первыми из дефензинов растений были выделены у-тиоины из семян пшеницы и ячменя (1990 г.). В 1992 г. в лаборатории Broekaert из редкого *Raphanus sativus* и амаранта *Amaranthus caudatus* была выделена еще одна разновидность растительных дефензинов — короткие (30-50 аминокислотных остатков) пептиды, обладающие широким фунгицидным и бактерицидным действием [7].

Сравнение дефензинов, выделенных из различных видов растений, обнаруживает некоторые общие черты этой группы белков [6]: небольшой молекулярный вес (45-54 аминокислотных остатка), положительно заряженный каркас, наличие 8 цистеинов и 2 глицинов в позициях 13 и 34, серина в позиции 8, ароматического остатка в положении 11 и глутаминовой кислоты в положении 29.

По фунгицидному действию дефензины могут быть подразделены на две группы [6]. Так называемые «морфогенные дефензины» (выде-

ленные из семейств *Brassicaceae* и *Saxifragaceae*) вызывают замедление роста гиф, сопровождаемое усиленiem их ветвления. Дефензины из семейств *Asteraceae*, *Fabaceae* и *Hippocastanaceae* замедляют удлинение гиф, не вызывая ветвления. Эта группа получила название «неморфогенных» дефензинов.

Растительные дефензины сосредоточены, как правило, в семенах, где их присутствие наиболее актуально ввиду как большого числа почвенных патогенов при прорастании, так и высокой чувствительности проростков. Иммунохимический анализ показал преимущественное наличие дефензинов во внешней клеточной стенке эндосперма, семядолей и гипокотиля, а также в срединной пластинке клеток семени. Это подтверждается и наблюдаемым активным выделением антигрибковых белков из *Raphanus sativus* при замачивании семени в воде (до 30% общего выделяемого белка). Экспрессия дефензинов обнаруживается и в вегетативных тканях растения как конститутивно, так и при заражении патогеном [7].

Дефензины из семян редкого *Raphanus sativus* и георгин *Dahlia merckii* вызывают быстрое поглощение гифальными мембранами ионов кальция, выход наружу ионов кальция и защелачивание внеклеточного пространства около

гиф- Этот фактор, по-видимому, препятствует дальнейшему развитию патогена, хотя в случае дефензинов редки воздействие белка осуществляется скорее всего через определенный рецептор на поверхности грибных мембран, а не через возникновение пор. Имеются данные, что накопление эндогенного кальция вызывает прекращение роста пыльцевых трубок. Аналогичный механизм предполагается и для гиф грибов.

Представляет интерес получить трансгенные растения картофеля, несущие гены пептидных антибиотиков дефензинов. Помимо собственно трансформации проводились исследования, касающиеся методики трансформации. Введение новых генов является для растения безусловным стрессом. И в экспериментах по трансформации одним из наиболее «узких мест» является регенерация целых растений из тех растительных эксплантов, на которых проводилась трансформация. Поэтому перед собственно трансформацией по ряду методик проводят прекультивацию эксплантов на среде, содержащей регуляторы роста. Таким образом, именно прекультивация становится одним из наиболее важных этапов трансформации, поскольку обеспечивает растительным эксплантом определенный пул гормонов для пос-

ледующей регенерации. Поэтому проводились эксперименты с целью изучения влияния условий проведения прекультивации эксплантов на эффективность последующих этапов. Варьировались условия освещенности и продолжительность прекультивации.

Ранее было показано [2, 4], что существует зависимость эффективности трансформации от используемого вектора. Из Научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии мы получили два штамма *Agrobacterium tumefaciens*, несущие векторные конструкции, содержащие гены дефензинов: штамм GV3101 с конструкцией pPCV002rs и штамм LGV3850 с конструкцией pK22rs. Оценивалась эффективность регенерации у различных сортов картофеля после трансформации тем или иным штаммом агробактерии.

Методика

Для проведения трансформации нами были взяты сорта как районированные в России, так и новые селекционные формы: Альянс, Осень, Раменский, Лорх, Лукьяновский, Сотка, Десница, Сказка, Синецвет, Эффект, Жуковский ранний. Все растения были получены из Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства. Сорта и формы отличались

друг от друга устойчивостью к основным заболеваниям картофеля.

Базовой методикой трансформации являлась методика, разработанная в лаборатории генной и клеточной инженерии ВНИИКХ под руководством К.Б.Н. Л.М. Хромовой. Ранее было показано [2, 3, 5], что в качестве ткани для проведения трансформации агробактерией лучше использовать сегменты стеблей. В наших экспериментах использовались стеблевые экспланты пробирочных растений картофеля в возрасте 3~4 нед. Непосредственно перед трансформацией проводили прекультивацию стеблевых эксплантов на стандартной среде Мурасиге-Скуга с добавлением цитокининов (зетатин — 1 мг/л) и ауксинов (индолилуксусная кислота — 0,5 мг/л) в течение 2 сут. Собственно трансформацию проводили путем нанесения агробактериальной суспензии на растительные экспланты и кокультивации в течение 4-6 ч. После механической очистки от агробактерии экспланты помещали на среду, содержащую антибиотик клафоран (действие которого направлено избирательно против агробактерии) в концентрации 500 мг/л, где они культивировались в течение 48 ч. Затем экспланты переносили на регенерационную среду, в которой, помимо клафора-

на (250 мг/л), содержался селективный антибиотик канамицин в концентрации 25 мг/л. В дальнейшем концентрацию клафорана постепенно снижали.

На сортах Альянс, Осень, Раменский, Лорх и Лукьяновский исследовали влияние освещенности во время прекультивации на эффективность регенерации. Прекультивацию проводили в течение 2 сут. в темноте и параллельно на свету, инкубацию стеблевых эксплантов после прекультивации и трансформации (штамм GV3101 с конструкцией pPCV002rs и штамм LGV3850 с конструкцией pK22rs) — на свету.

На сортах Сотка, Альянс, Десница, Лорх, Сказка, Синецвет, Эффект, Жуковский ранний изучали влияние продолжительности прекультивации на эффективность регенерации: были выбраны два временных интервала прекультивации на свету — 2 и 5 сут. Инкубацию эксплантов после прекультивации и трансформации (штамм GV3101 с конструкцией pPCV002rs и штамм LGV3850 с конструкцией pK22rs) проводили в соответствии с базовой методикой. На этих же сортах исследовалось влияние векторной конструкции на эффективность регенерации. При этом прекультивация для всех сортов проходила на свету в течение 2 сут.

Состояние эксплантов и количество полученных регенерантов оценивали на регенерационной среде спустя 2 нед. после трансформации.

Результаты

Данные исследования влияния условий освещенности во время прекультивации на эффективность регенерации представлены в табл. 2. Так, экспланты сорта Альянс лучше сохраняли окраску при проведении прекультивации в темноте, сорта Осень, наоборот, — на свету. По другим сортам различий в реакции не наблюдалось или они были значительно меньше. Таким образом, сортовые различия в реакции на условия прекультивации могут свидетельствовать о целесообразности подбора световых условий при проведении трансформации.

При изучении влияния продолжительности прекультивирования на эффективность последующей регенерации получены следующие результаты: при продолжительности прекультивации 2 сут. было получено более 30 регенерантов (24% от исходного количества эксплантов, подвергшихся трансформации); при 5 сут. — более 45 регенерантов (43% от исходного количества эксплантов, подвергшихся трансформации). По результатам

Таблица 2
Влияние условий прекультивации на экспланты различных генотипов картофеля

Сорт	Доля зеленых эксплантов через 2 нед., %	
	прекультивация в темноте	прекультивация на свету
Альянс	100	17
Осень	73	100
Раменский	100*	100*
Лорх	50*	44
Лукъяновский	100*	100*

* — Светло-зеленые экспланты

эксперимента можно сделать предположение о необходимости дальнейшего изучения реакции сортов картофеля на изменения продолжительности прекультивации с целью подбора оптимальной длительности для повышения выхода трансформантов.

Ранее было показано [2, 4], что существует зависимость эффективности трансформации от используемого вектора. В наших опытах при использовании штамма *A. tumefaciens* GV 3101, несущего конструкцию pPCV002rs, было получено более 34 регенерантов (30% от исходного количества взятых для трансформации эксплантов); при штамме *A. tumefaciens* LGV 3850, несущем конст-

Таблица 3

Зависимость эффективности регенерации от использованной векторной конструкции

Сорт	GV3101/pPCV002rs		LGV3850/pK22rs	
	количество регенерантов	доля от общего кол-ва трансформантов, %	количество регенерантов	доля от общего кол-ва трансформантов, %
Сотка	6	100	—	—
Альянс	—	—	3	100
Десница	—	—	1	100
Лорх	9	82	2	18
Сказка	8	67	4	33
Синецвет	4	36	7	64
Эффект	3	50	3	50
Жуковский ранний	4	100	—	—

рукцию pK22rs, — 20 регенерантов (13% от исходного количества эксплантов, взятых для трансформации). Причем наблюдались различия по генотипам в эффективности регенерации после трансформации (табл. 3).

Так, у сортов Сотка и Жуковский ранний регенеранты были получены только после трансформации конструкцией GV3101/pPCV002rs, на сортах Альянс и Десница — только после трансформации конструкцией LGV3850/pK22rs, по остальным сортам — после трансформации как одной, так и другой конструкцией в различных соотношениях. Следовательно, можно предположить наличие зависимости эффективности регенерации после трансформации различными векторными конструкциями от генотипа вы-

бранного сорта. Подбор векторной конструкции для определенного сорта позволит повысить как эффективность регенерации, так и в конечном счете трансформации.

Выводы

1. Выбранные сорта картофеля, обладающие различной степенью устойчивости к патогенам, демонстрируют высокую регенерационную способность.

2. Увеличение продолжительности прекультивации положительно влияет на эффективность регенерации выбранных сортов картофеля; условия освещенности во время прекультивации оказывают различное влияние на этот показатель в зависимости от генотипа.

3. При использовании конструкции pPCV002rs в штам-

ме *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 на выбранных сортах картофеля наблюдается более высокая эффективность регенерации, чем при использовании конструкции pK22rs в штамме *A. tumefaciens* LGV3850.

Выражаем благодарность зав. лабораторией генной и клеточной инженерии ВНИИКХ Л.М. Хромовой за помошь при проведении начальных этапов исследования и доценту каф. с.-х. биотехнологии Е.З. Кочиевой за консультации при проведении основного объема исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриева С.А. Генетическая трансформация картофеля с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. Автореф. канд. дис. М., 1990. — 2. Картель Н.А., Курочкина С.Д., Забенъкова К.И. Эффективность агробактериальной трансформации у разных генотипов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) — Докл. АН

- Беларуси, 1994, т. 38, № 2, с. 67-71. — 3. Кравец О.А., Погребняк Н.Я. и др. Трансформация различных сортов картофеля и анализ полученных трансгенных растений. — Биополимеры и клетка, 1992, т. 8, № 6, с. 44-49. — 4. Курочкина С.Д. Получение трансгенных растений картофеля и их молекулярно-генетический анализ. Автореф. канд. дис. М., 1995. — 5. Левенко Б.А., Стехин И.Н. и др. Введение гена устойчивости к глифосату в растения картофеля и сахарной свеклы. — Физиол. и биохимия культур, растений, 1993, т. 25, № 2, с. 197-200. — 6. Osborn R.W., De Samblanx G.W. a. o. — Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. FEBS Letters 368 (1995), pp. 257-262. — 7. Terras F.R.G., Torrekens S. a. o. — A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. FEBS Letters, 1993, vol. 316, № 3, pp. 233-240.

Статья поступила
5 июля 2002 г.

SUMMARY

Regeneration ability of potato cultivars with initial different levels of phytopathogen resistance was studied. Also were studied the influence of precultivation stages on the effectiveness of the further regeneration of the chosen cultivars. The comparison of the regeneration ability of the particular potato genotype and the vector construction for the trans-formation were carried out.