

БЕЛОРУССКИЙ РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ФОНД
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ



К 60-летию кафедры генетики

**ГЕНЕТИКА
И БИОТЕХНОЛОГИЯ
XXI ВЕКА.
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ**

МАТЕРИАЛЫ
Международной научной конференции
3–6 декабря 2008 г., Минск

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 575(063)+60(063)
ББК 28.04я43+30.16я43
Г34

Редакционная коллегия:

Н.П. Максимова (ответственный редактор);
В. В. Гринев, С. С. Жардецкий, Ю. И. Кожуро, А. В. Лагодич

Г34 **Генетика** и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты : материалы
Междунар. науч. конф., 3–6 дек. 2008 г., Минск \ редкол.: Н.П. Максимова (отв. ред.) [и др.]. —
Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 364 с.
ISBN 978-985-476-625-2.

В сборнике представлены материалы Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты» (3–6 декабря 2008 г., Минск, БГУ), посвященной 60-летию кафедры генетики биологического факультета БГУ. Тематика конференции охватывает актуальные вопросы и проблемы современной генетики и биотехнологии. В сборник включены материалы пленарных докладов, устных сообщений и постерной сессии.

Предусматривается широкая дискуссия о современном состоянии и перспективах развития генетики и биотехнологии, а также о методических аспектах преподавания предмета в высших учебных заведениях.

ISBN 978-985-476-625-2

УДК 575(063)+60(063)
ББК 28.04я43+30.16я43

© БГУ, 2008

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КЛЕВЕРА КРАСНОГО С ПОМОЩЬЮ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ *IN PLANTA* ТРАНСФОРМАЦИИ

И.В. Павлова¹, Т.И. Фоменко², В.В. Сикиржицкая³

¹ - Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси

² - ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Беларусь

³ – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

hakuroshya@yahoo.com

Технология трансформации растений стала незаменимым инструментом для изучения функций генов и для создания сортов культурных растений. Достоинства этой технологии были опробованы на клевере красном – ценном фуражном растении, в ходе работ по экспрессии гена GUS [1] и по ингибированию собственного гена красного клевера – полифенол оксидазы в результате посттранскрипционного сайленсинга [2]. Эти результаты показывают, что получение трансгенного красного клевера является перспективной технологией при создании улучшенных сортов этой культуры. В наших экспериментах в качестве модельного растения использовали клевер красный сорта Витебчанин (НПЦ по земледелию НАНБ). Сорт Витебчанин диплоидный ($2n=14$), среднеспелый, со средней устойчивостью к болезням, внесенный в Госреестр в 1995 году. Конструкция Т-ДНК, содержит гены *npt II* устойчивости к канамицину и *CelE*, кодирующий β -1,4-глюканазу (целлюлазу) [3]. Агробактериальную *in planta* трансформацию проводили на 7-ми дневных проростках клевера по методу, описанному для гречихи [4]. После инокуляции проростки выдерживали 48 часов во влажных условиях фитотрона (24 °С, естественном фотопериоде с подсветкой 5000 лк в течение 9 часов), после чего растения пикировали в контейнеры с искусственной почвой Биона (производства ИФОХ НАНБ) и выращивали до кущения при тех же условиях.

В таблице отражено количество полученных регенерантов клевера красного при *in planta* агробактериальной трансформации (июнь-август 2008 г.). Достоверных различий эффективностей получения регенерантов при контрольной (без инокуляции суспензией бактерий) и опытной (с инокуляцией раневой поверхности меристемы) обработками растений выявлено не было.

Получение регенерантов клевера красного через три недели после *in planta* агробактериальной трансформации, шт

Варианты опыта	Контроль	<i>CelE</i>
Обработано проростков*, шт	64	117
Получено регенерантов*, шт	40	91
Получено регенерантов, % от количества обработанных растений	61,8±3,56	80,5±17,49

*- в ходе выполнения трех экспериментов.

По внешнему виду проростки в контроле и в опыте не различались в ходе наблюдения в течение полутора месяцев. На рисунке показаны результаты опыта по влиянию селективного фактора (канамицин) на состояние листовой поверхности регенерантов клевера в эксперименте. Примененные концентрации канамицина составляли 50 мкг/мл, 100 мкг/мл и 10 000 мкг/мл. В эксперименте использовали листовые пластинки на 10-ти побегах контрольных растений. На вторые сутки после нанесения на листовую поверхность (на участок с удаленным эпидермисом размером 1×2 мм) капли водного раствора канамицина наблюдали увядание участков ткани в радиусе 2-4 мм вокруг места нанесения всех концентраций раствора канамицина у контрольных растений. На листьях 10 побегов опытных растений наблюдали различные типы реакции. Отрицательной реакцией было принято считать отсутствие увядания тканей вокруг места нанесения раствора канамицина на 2-3 сутки. Количество побегов опытных растений, листья которых давали положительную реакцию на канамицин, увеличивалось с увеличением его концентрации.

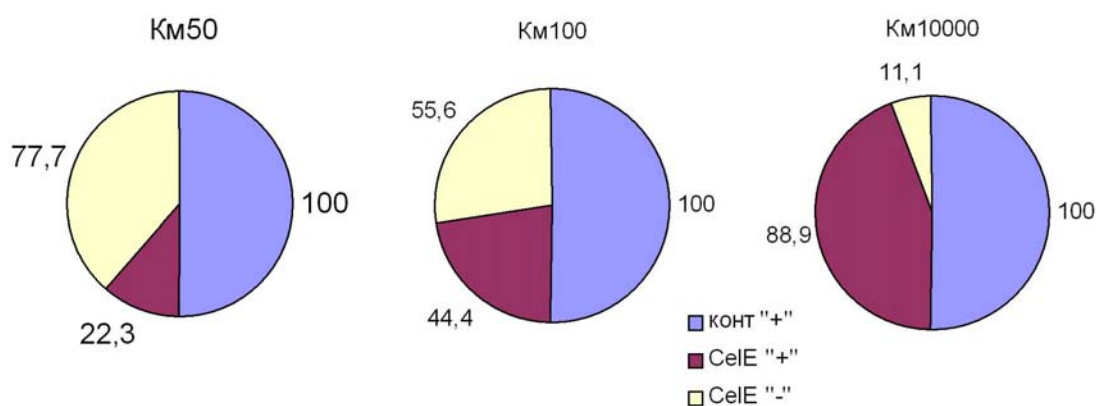


Рис. Реакция листовой ткани опытных (*CelE*) и контрольных растений клевера красного сорта Витебчанин на действие различных концентраций канамицина (мкг/мл), выраженная в процентах количества прореагировавших побегов от общего количества испытанных побегов (на каждом побеге канамицин наносился на одну из трех листовых поверхностей молодого, развернувшегося листа). «+» - увядание на 2-е сутки, «-» - отсутствие увядания.

Анализ геномной ДНК (выделена с использованием реактивов «ДНК-сорб-С» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Кат.№ К1-6-50) из побегов опытных растений клевера с помощью ПЦР с использованием праймеров к участку 35S промотора Т-ДНК (L-4: АСА АТС ССА СТА ТСС ТТС GC и L-5: GTC ACG ACG TTG TAA AAC GA), последующий электрофорез в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализация продуктов в UV-свете показали наличие Т-ДНК у 7-ми из 22-х проанализированных опытных побегов.

В результате *in planta* агробактериальной трансформации с использованием плазмиды p35SCelE получены регенеранты клевера красного диплоидного сорта Витебчанин. Регенеранты адаптированы к условиям культивирования *in vivo*. Выявлены побеги с различной восприимчивостью к действию селективного агента – канамицина и несущие использованную T-ДНК в составе геномной ДНК части побегов.

1. K.H. Quessenberry, D.S. Wofford, R.L. Smith, P.A. Krottje, F. Tcacenco. Production of red clover transgenic for neomycin phosphotransferase II using Agrobacterium // Crop Science.- 1996. – V. 36. – p. 1045-1048.
2. M.L. Sullivan, K.H. Quensenberry. Transformation of selected red clover genotypes. Methods in molecular biology. V. 343.- P. 369-382.
3. P.M. Абдеев, И.В. Голденкова, К.А. Мусийчук, Э.С. Пирузян. Изучение свойств термостабильной целлюлазы CelE Clostridium termocellum с целью экспрессии в растениях // Биохимия. 2001.- Т.66.- вып.7- с.39-42.
4. M. Kojima, Y. Arai, N. Iwase, K. Shirotori, H. Shioiri, M. Nozue. Development of a simple and efficient method for transformation of buckwheat plants (Fagopyrum esculentum) using Agrobacterium tumefaciens // Biosci. Biotechnol Biochem. 2000. - V. 64. – p. 845-847.