ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

XIV МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, ЖИВОТНОВОДСТВЕ И ВЕТЕРИНАРИИ»

16 апреля 2014 г.

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

XIV МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, ЖИВОТНОВОДСТВЕ И ВЕТЕРИНАРИИ»

16 апреля 2014 г.

Конференция посвящается памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича МУРОМЦЕВА

Москва – 2014

СПОНСОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ









ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ МАЛИНЫ С ПОМОЩЬЮ ИФА И МЕТОДЫ ЕЕ ОЗДОРОВЛЕНИЯ

Тихонова К.О., Упадышев М.Т., Донецких В.И.

ГНУ Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, Москва, 115598 E-mail: <u>virlabor@mail.ru</u>

В настоящее время во всем мире описано около 24 вирусных болезней малины, 8 из которых переносятся тлями, 7 — нематодами, 2 — пыльцой и 7 не имеют известных векторов. Вирусные болезни снижают урожайность малины и ухудшают качество посадочного материала.

Распространенность вирусов изучали в условиях Московской, Брянской и Рязанской областей. Исследования проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА).

В качестве образцов для ИФА использовали листья. Диагностику вирусов осуществляли с применением сэндвич-варианта твердофазного ИФА с использованием базовой методики по М.F. Clark и A.N. Adams (1977) и антисывороток фирмы Neogen (Великобритания). О зараженности образцов судили по отношению оптической плотности продукта ферментативной реакции тестируемых образцов (A_0) к показателям отрицательного контроля (A_k). При $A_0/A_k > 2,0$ образец считали зараженным вирусом, при $A_0/A_k = 1,6-1,9$ – вероятно зараженным с необходимостью повторной проверки, при $A_0/A_k < 1,6$ – свободным от вируса.

Метод ИФА удовлетворяет основным требованиям для диагностики вирусных болезней растений. Он высокочувствителен, специфичен, позволяет проводить не только качественную, но и количественную оценку содержания вируса, экономически выгоден и обеспечивает высокую производительность.

В течение 2012-2013 гг. методом ИФА протестировано 370 растений малины на 5 вирусов: кустистой карликовости малины (RBDV), кольцевой пятнистости малины (RpRSV), мозаики резухи (ArMV), черной кольцевой пятнистости томата (TBRV) и латентной кольцевой пятнистости земляники (SLRSV).

Установлено, что общая зараженность насаждений малины вирусами в условиях Московской области оказалась довольно высокой и составила 75 %. Наибольший процент заражения установлен для вируса кустистой карликовости малины (38 %), наименьший – для вируса мозаики резухи (12 %). Комплекс из 5 изученных вирусов обнаружен у 16 %, комплекс из 4 вирусов ArMV, RpRSV, TBRV, RBDV – у 50 % проверенных растений.

Оценка 19 сортов малины в условиях Брянской области показала также высокую зараженность вирусами. Общая зараженность составила около 76 %. В условиях Брянской области, в отличие от Московской, превалировал вирус кольцевой пятнистости малины (51 %). Частота встречаемости вируса RBDV составила 35 %. Вирусы ArMV и SLRSV встречались реже – соответственно у 14 % и 9 % тестированных растений.

Обследование насаждений 9 сортов малины в фермерском хозяйстве Рязанской области показало, что 63 % растений оказались зараженными, причем превалировал вирус кустистой карликовости малины (40 %).

Высокая зараженность многих сортов малины вирусами обусловливает необходимость их оздоровления в лабораторных условиях.

Оздоровление малины от вирусов выполняли с использованием метода магнитотерапии *in vitro* с помощью программируемого прибора для магнитной обработки нового поколения с изменяющейся во времени частотой СМИ-5, сконструированного в отделе механизации ГНУ ВСТИСП В.И. Донецких.

Полученные на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга зараженные вирусами микрорастения, разрезанные на микрочеренки длиной 10 мм, обрабатывали импульсами магнитной индукции посредством стимулятора СМИ-5.

Объектами испытаний служили микропобеги малины трех сортов: Арбат, Геракл и Малаховка, зараженные вирусами.

Проведенные испытания стимулятора СМИ-5 показали, что эффективность оздоровления малины в условиях культуры тканей от вируса кустистой карликовости малины зависела от режима магнитно-импульсной обработки (МИО) и сортовых особенностей.

На малине сорта Арбат применение МИО обеспечивало увеличение выхода здоровых растений на 17 %. На сорте Малаховка в оптимальном варианте отмечали увеличение выхода здоровых растений на 66,7 % и снижение индекса зараженности на 38 % в сравнении с контролем.

При оздоровлении малины сорта Геракл от вируса кольцевой пятнистости МИО обеспечила увеличение выхода здоровых растений до 50 % и снижение индекса зараженности на 12 % по сравнению с вариантом без обработки.

Ценность магнитотерапии как нового способа оздоровления растений от вирусов *in vitro* заключается в отсутствии фитотоксического эффекта в организме растения-хозяина в отличие от применения многих химических препаратов. К тому же использование МИО приводит к активизации ростовых процессов и повышению коэффициента размножения.

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МОРКОВИ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ХИМЕРНЫЙ БЕЛОК MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Новиковская А.А., Дейнеко Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Россия, Новосибирск 630090. E-mail: chimaura@mail.ru

В настоящее время, наряду с традиционными, интенсивно разрабатываются новые методы и подходы создания вакцин следующего поколения против опасных патогенов, основанные на идентификации и изолировании биологических макромолекул или их фрагментов, которые можно было бы использовать в качестве иммуногенных компонентов. Новые перспективы в получении рекомбинантных белков открываются с использованием генетически модифицированных растений, которые могли бы выступать в качестве съедобных вакцин. Растения, в тканях которых синтезируются и накапливаются рекомбинантные иммуногены, привлекательны для получения субстанций ветеринарного и медицинского назначения, в том числе и для получения субъединичных съедобных вакцин против туберкулеза. К настоящему времени известно несколько десятков фирм, использующих трансгенные растения в качестве биопродуцентов различных белков, в том числе для ветеринарии и медицины.

В лаборатории биоинженерии растений разработаны технологии создания трансгенных растений – продуцентов рекомбинантных белков медицинского назначения; созданы трансгенные растения моркови, в геном которых перенесен гибридный ген cfp10esat6-dIFN, включающий гены cfp10 и esat6 M.tuberculosis ген дельтаинтерферона человека. В корнеплодах полученных трансгенных растений моркови выявлены рекомбинантные белки-иммуногены, способные связываться co специфичными антителами. В экспериментах с лабораторными SPF-животными (мыши) показано, что CFP10-ESAT6-dIFN обладает рекомбинантный химерный белок способностью индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет при пероральном и инъекционном введении в организм лабораторных животных и представляет интерес в качестве кандидатной противотуберкулезной вакцины.

Дальнейшие работы направлены на усовершенствование генетической конструкции с рекомбинантным геном *cfp10-esat6-dIFN*. dIFN. Иммуногенность химерного белка предполагается усилить за счет его слияния с СТВ-антигеном. Защита целевого рекомбинантного белка от протеолитических ферментов клеток растений будет обеспечена за счет его локализации в люменах эндоплазматического ретикулума. Введение в генетическую конструкцию фрагментов ДНК, кодирующих аминокислотные последовательности, обеспечит связывание рекомбинантного химерного белка с поверхностями аффинных носителей.

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ WOLFFIA ARRHIZA

Шведова А.Н., Хватков П.А.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва 127550 E-mail: mntr2008@mail.ru

Для биотехнологической наработки белков целевого назначения используются разнообразные экспрессионные системы с применением различных организмов. Получение рекомбинатных белков на базе растительных систем имеет значительные преимущества по сравнению с бактериальными и дрожжевыми системами, такие как отсутствие общих с человеком и животными патогенов, поэтому наработка белков в растениях становится все более популярной отраслью биотехнологического производства. Подходы к производству целевых белковых веществ в растениях разнообразны, что обусловливает существование ряда различных растительных экспрессионных платформ, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки. Создание вакцин на основе трансгенных растений можно считать революционным направлением современной вакцинологии.

«Биофарминг» предъявляет к растениям-продуцентам определённые требования: высокая скорость роста, высокое содержание белка в тканях, наличие высокой регенерационной способности в условиях *in vitro*, а также наличие эффективного и воспроизводимого протокола генетической трансформации. Растения семейств *Fabaceae*, *Lemnaceae* и *Poaceae* в наибольшей степени соответствуют перечисленным критериям, однако только рясковые, благодаря высокой скорости размножения, сходной с таковой у микроорганизмов, способны к быстрой ротации в изолированных системах. В отличие от культур *Fabaceae* и *Poaceae*, сбор биомассы ряски возможно осуществлять ежемесячно.

В настоящее время компания «Biolex» занимает лидирующие позиции в области генетичекой инженерии *Lemnacea* и коммерциализации полученных результатов. На данный момент производственная линия состоит из α-2β-интерферона, инсулина, гормона роста человека, β-глюкоцереброзидазы, ретинобластомного белка, р53, ангиостатина, лептина, сывороточного альбумина, гемоглобина, коллагена, р450 оксидазы, моноклональных антител, Fab-фрагмента и одноцепочечных антител. Для наработки четырех из них – интерферона, ростового гормона человека, моноклонального антитела и одноцепочечного антитела – была использована генетическая конструкция, позволяющая белку накапливаться в эндоплазматическом ретикулуме и секретироваться в апопласт, что, ввиду особенностей растения, позволяло выводить получаемый белок в культуральную среду.

С начала 21 века были получены первые трансгенные растения рода Lemna, а с конца первого десятилетия 21 века и первые трансгенные растения рода Spirodella, экспрессирующие рекомбинантные терапевтические белки. Еще более перспективным объектом для биофарминга является вольфия бескорневая (Wolffia arrhiza), принадлежащая к семейству Lemnaceae. Основной отличительной особенностью данной культуры является отсутствие корневой системы, что предполагает возможность её глубинного культивирования в биореакторе. Однако, несмотря на возросший интерес к растениям семейства Lemnaceae как экспрессионной платформе для биофарминга и активную работу в этом направлении, в настоящий момент нет ни одного сообщения о стабильной трансформации растений рода Wolffia.

Для успешной трансформации, независимо от используемого способа, прежде всего необходимо наличие надежной и высокоэффективной системы регенерации целых растений в условиях *in vitro*. Нами разработана двухэтапная методика индукции каллусогенеза вольфии. На первом этапе индуцируют кластерные структуры в присутствии 2,4-D и ВА в течение 16 недель. На втором этапе на протяжении 4 недель в среде для индукции каллусогенеза ВА заменяют на РСL. Полученный каллус можно длительно поддерживать в культуре *in vitro* при относительно низкой концентрации РСL или регенерировать целые растения вольфии путем переноса его на среду SH, не содержащую гормонов.

В экспериментах по трансформации было задействовано 3 штамма агробактерии: AGL0, CBE21 и EHA105, в т-ДНК которых содержались как репортерные, так и целевые гены. В ходе проведения экспериментов установлено, что наиболее эффективные трансгеноз и селекция трансгенных линий происходит в присутствии гигромицина. Отмечено, что для успешной трансформации в среде для культивирования эксплантов необходимо присутствие 2,4-D совместно с ВА в течение 15 дней. В экспериментах было задействовано порядка 55000 эксплантов, в результате проведенных исследований получено 14 трансгенных линий вольфии. Интеграция гетерологичной ДНК подтверждена молекулярно-биологическими анализами.

ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ИЗ МОЛОКА ТРАНСГЕННЫХ ПО ГЕНУ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА КОЗ

Хвалько Г.В.

РУП "НПЦ НАН Беларуси по животноводству", лаборатория воспроизводства, трансплантации эмбрионов и трансгенеза животных, Жодино 222160 E-mail: <u>g.hvalko@gmail.com</u>

Лактоферрин — полифункциональный белок из семейства трансферринов, осуществляющий перенос железа в клетки и контролирующий уровень свободного железа в крови и во внешних секретах, является одним из компонентов иммунной системы организма, принимает участие в системе неспецифического гуморального иммунитета, регулирует функции иммунокомпетентных клеток и является белком острой фазы воспаления.

Немутантный тип лактоферрина человека представляет собой белок, состоящий из 692 аминокислотных остатков, молекулярной массой около 80 кДа. Лактоферрин относится к щелочным белкам, его изоэлектрическая точка составляет 8.7. Белок существует в двух формах – железонасыщенной (холо- $\Pi\Phi$) и железоненасыщенной (апо- $\Pi\Phi$). Лактоферрин, получаемый из молока трансгенных животных, идентичен лактоферрину грудного женского молока. Перспективы его применения затрагивают область медицины, пищевой промышленности, косметологии.

Очищаемый из козьего молока рекомбинантный лактоферрин человека был получен в РУП "НПЦ НАН Беларуси по животноводству" в результате экспериментов по доставке генной конструкции, содержащей последовательность гена лактоферрина человека (LTF) под регуляцией бета-казеинового промотора козы, в генетический аппарат коз методом пронуклеарной микроинъекции.

Поскольку рекомбинантный лактоферрин человека секретируется в молоко, возникает необходимость в обезжиривании молока и удалении казеина в виде нерастворимого осадка из молочной сыворотки при низких значениях рН. Ранее было лактоферрина целесообразно что хроматографию использованием слабых катионообменников. Кроме того, для более тщательной очистки рекомбинантного белка требуется негативная хроматография, позволяющая удалить отрицательно заряженные загрязняющие агенты, и отмывка связавшегося с сорбентом белка неионным детергентом. Рекомендована элюция лактоферрина в градиенте NaCl. В качестве наиболее быстрого и эффективного способа обессоливания содержащих рекомбинантный лактоферрин человека фракций была выбрана гель-фильтрация. После концентрирования раствор белка замораживался и лиофилизировался. полученного рекомбинантного лактоферрина человека определялась с использованием SDS-PAGE денситометрически.

ВИРУСОПОДОБНЫЕ НВС ЧАСТИЦЫ, НЕСУЩИЕ НЕСКОЛЬКО КОПИЙ М2Е ПЕПТИДА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ, КАК ОСНОВА КАНДИДАТНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Блохина Е.А., Куприянов В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение наук Центр «Биоинженерия» Российской академии наук, Москва 117312 E-mail: <u>Blohina-lena87@mail.ru</u>

Вирусы гриппа А вызывают заболевания не только человека, но и животных. В распространении и возникновении новых вирусных штаммов играют особую роль птицы, являющиеся природными хозяевами вируса гриппа, поскольку среди вирусов птиц обнаружены все встречающиеся в природе 16 субтипов гемагглютинина (НА) и 9 субтипов нейраминидазы (NA). Помимо экономического ущерба в результате гибели птиц существует риск передачи вируса от животных к человеку. Наиболее эффективным средством предотвращения распространения гриппа является вакцинация. Основными антигенными белками вируса гриппа являются НА и NA, однако, их высокая изменчивость не позволяет на их основе создавать вакцины эффективные сразу против многих вирусных штаммов. Использование внеклеточного домена М2 белка (М2е), высоко консервативного у большинства штаммов вируса гриппа, как человека, так и животных, позволяет создать «универсальную» рекомбинантную вакцину. Однако М2е пептид низкоиммуногенен и требует использования адъюванта-носителя.

В нашей работе в качестве антигена мы использовали М2е пептид вируса гриппа птиц A/Chicken/Kurgan/05/05, а в качестве носителя - нуклеокапсидный белок вируса гепатита В (НВс), способный самоорганизовываться в симметричные вирусоподобные частицы, придающие иммуногенность связанному с ними целевому пептиду. Три района НВс могут быть использованы для презентации чужеродных пептидов на поверхности частиц, — N и С концы белка и поверхностная «иммунодоминантная» петля (МІК), расположенная между 75 и 85 а.о. остатками НВс, вставки в которую обеспечивают наиболее сильный иммунный ответ против целевого пептида. Ранее были описаны рекомбинантные НВс белки, содержащие вставку лишь одной копии М2е в район МІК.

Однако, известно, что увеличение числа копий М2е с одной до трех на N-конце НВс усиливает иммунный ответ. Целью нашей работы было получение НВс частиц, содержащих множественные вставки M2e пептида в MIR (1, 2 или 4 копии), и определение зависимости иммуногенности и протективного действия от числа копий М2е. Мы получили гены химерных белков НВс, в район иммунодоминантной петли которых были введены 1, 2 и 4 копии М2е. Введение дополнительных глицин-богатых линкеров, фланкирующих вставку, обеспечило правильную сборку экспрессированного в Esherichia coli рекомбинантного белка и образование вирусоподобных частиц. Иммунизация очищенными препаратами вирусоподобных частиц обеспечила индукцию высоких титров специфических антител, причем наибольшие титры антител наблюдались в сыворотках мышей, иммунизированных НВс с 4 копиями 4М2е. Протективное действие оценивали в ФГБУ «НИИгриппа» Минздрава России на модели летальной гриппозной инфекции при заражении мышей вирусом гриппа штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в дозе 5LD₅₀. Установлено, что уровень защиты коррелирует с числом копий M2e пептида в рекомбинантном белке. Так, иммунизация мышей препаратом с 4-я копиями М2е обеспечивала 100% защиту, для препарата с 2-я копиями М2е выживаемость составила около 60%, а более слабую защиту (42%) наблюдали для препарата с одной копией М2е. Таким образом, включение 4-х копий М2е пептида в состав иммунодоминантной петли НВс антигена разработанным нами способом позволяет получить эффективную кандидатную вакцину против вируса гриппа птиц.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГИБРИДНОГО ПОТОМСТВА F₁ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ САХАРНОЙ И КОРМОВОЙ СВЁКЛЫ НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХМАРКЕРОВ

Федорин Д.Н., Федулова Т.П.

ГНУ Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова, Россия, п. Рамонь, Воронежская обл. 396030. E-mail: <u>biotechnologiya@mail.ru</u>

Одним из современных методов генетического анализа, рекомендуемых UPOV (Международный союз по охране новых сортов растений) для молекулярной идентификации является метод микросателлитного маркирования, позволяющий получить индивидуальную характеристику отдельного генотипа - его ДНК-профиль. Важной особенностью микросателлитных (или SSR- SimpleSeguenceRepeart) локусов, тандемно повторяющихся тетраи пентануклеотидов является большая ДИ-, три-, подверженность мутационной изменчивости по сравнению со структурными генами. Это связано с тем, что большинство SSR-локусов не несут информации о признаках и свойствах организма и не подвержены воздействию со стороны естественного отбора. Поэтому микросателлиты очень полиморфны. Высокий полиморфизм в сочетании с распространенным мультиаллелизмом делает их перспективными молекулярными маркерами (Schmidt, Heslop-Harrison, 1996; Свирщевская и др., 2012).

Во Всероссийском НИИ сахарной свёклы (ВНИИСС) молекулярные маркеры начали использовать с 2001 года: для идентификации и паспортизации исходных, селекционных материалов и гибридов сахарной свёклы, изучения генетической структуры родительских форм и подбора пар для скрещиваний; выявления интрогрессивных форм при проведении межвидовой гибридизации; тестирования генетически модифицированных растений (Федулова, 2009).

Цель работы заключалась в выявлении микросателлитных маркеров, характеризующих генетическую изменчивость гибридного потомства свёклы для использования в направленной селекции.

В качестве материала для SSR- анализа была использована тотальная ДНК 13 линий сахарной и кормовой свёклы и гибридов с их участием. Каждый номер был представлен 30 образцами индивидуальных растений. SSR- анализ проводили с использованием 6 пар праймеров к микросателлитным локусам, предложенных, как наиболее полиморфные, иностранными авторами (Schmuldersetal., 2010).

В результате ПЦР – амплификации с помощью 6 пар праймеров к микросателлитным локусам Bvv 15, 17, 23, 30, 32, 43 установлена генетическая неоднородность родительских линий сахарной и кормовой свёклы. Локусы Bvv15 и 23 мономорфными. Выявленный полиморфизм, определяемый встречаемости аллелей исследованных микросателлитных локусов, варьировал по праймерам: Bvv17 - 42,85 - 100%; Bvv 30 - 7,14; 14,28; 28,57%; Bvv 32 от 14,28 до 100%; Bvv43 - 5, 0; 21,42; 100%. Наибольшим полиморфизмом характеризовались праймеры для микросателлиты Bvv 30, которые выявили 5 ПЦР – продуктов с длинами 350, 500, 700, 1000 и более тысячи пар нуклеотидов. Это позволило определить генетические расстояния между МС – формами и опылителем – кормовой красной свёклой, которые составили для №№МС 14044 и кормовой красной р.4 (D=1.41); МС-94 и кормовой красной р.1 (D=2,45); MC-94 и кормовой красной р.2 (D=1,73); MC-94 и кормовой красной р.3 (D=2,00). Определено, что с увеличением генетических дистанций повышалась и продуктивность гибридных комбинаций от 112,5 до 145,0 т/га, соответственно.

В результате амплификации геномных ДНК растений родительских форм свёклы и гибридов с праймерами к микросателлитным последовательностям установлено, что при скрещивании сахарной и кормовой свёклы аллели обеих родительских форм кодоминантно сочетаются в генотипах гибридных образцов. В гибриде F_1 МС-94 \times кормовая красная р.3 кодоминантно сочетаются аллели родительских пар, содержащих микросателлитные последовательности Bvv 17 (900 п.н.) и Bvv 30 (350 п.н.).

По праймерам для локуса Bvv 32 обнаружена передача ДНК – ампликонов (250 и более 1000 п.н.) отцовской формы в гибридные растения.

По микросателлитному локусу Bvv 17 выявлен дополнительный ДНК – фрагмент длиной около 900 п.н. у МС – форм, гибридных комбинаций и гибрида иностранной селекции «Золеа». Данные образцы имеют слабо выраженный ПЦР – продукт по праймеру Bvv 23, что свидетельствует об отличии структуры их генетического материала от остальных номеров.

При амплификации с праймерами Bvv 32 только один образец F₁ MC-94 × кормовая красная р.3 имел дополнительный ампликон длиной 150 п.н., что связано, по–видимому, с происхождением MC – формы № 94, полученной на основе апомиктичной линии.

При использовании праймеров к сателлите Bvv 43 выявлена передача в гибридные формы от отцовского родителя (кормовой свёклы) одного из аллелей данного локуса (более 1000 п.н.). Данные гибриды характеризовались ширококонической формой корнеплода, как у кормовой свёклы, возможно, микросателлитный локус Bvv 43 находится в одной группе сцепления с генами, определяющими форму корнеплода. Индекс формы корнеплода в гибридных комбинациях наследовался по отцовскому или промежуточному типу.

В результате исследований выявлены микросателлитные локусы Bvv 17, 30, 32, 43, обладающие полиморфизмом в исследованных родительских формах сахарной и кормовой свёклы и характеризующие генетическую изменчивость гибридного потомства и установлена передача генетического материала от родительских пар в гибриды.

Сопоставление данных по продуктивности исследованных селекционных материалов с результатами кластерного анализа показало, что скрещивание линий, наиболее генетически отдалённых друг от друга, позволяет получать гетерозисные гибриды. Использование сортотипов кормовой свёклы в качестве исходного материала для скрещиваний будет способствовать увеличению генетического разнообразия и

вовлечению новых аллелей в селекционный процесс. Внедрение ДНК-маркирования в селекционную практику позволит более целенаправленно подбирать родительские пары для получения высокопродуктивных гибридов свёклы.

В дальнейшем планируется провести эксперименты по выявлению передачи генетического материала родительских форм сахарной и кормовой свёклы в гибриды с увеличением числа микросателлитных маркеров.

ПОЛИМОРФИЗМ IRAP-МАРКЕРОВ У САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (BETA VULGARIS L.)

Федорин Д.Н., ФедуловаТ.П.

Государственное научное учреждение «Всероссийский научно – исследовательский институт сахарной свёклы имени А.Л. Мазлумова» 396030, Воронежская область, Рамонский район, п.ВНИИСС E-mail:biotechnologiya@mail.ru

Источником генетического разнообразия растений является полиморфизм нуклеотидной последовательности молекул ДНК, который уникален для любого организма. Известно, что большая часть генома растений представлена некодирующими повторяющимися последовательностями, которые высоко полиморфны и рассеянны по всей длине хромосом, что позволяет использовать их в качестве маркеров для анализа генетического полиморфизма растений. В связи с этим представляет интерес новый класс молекулярно-генетических маркеров, основанный на изучении фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными терминальными участками ретротранспозона (IRAP-Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism). Используя один и тот же праймер для анализа ДНК разных биологических видов, можно получить уникальный для каждого вида спектр ДНК-фрагментов, который практически всегда почти идентичен у растений одного вида, за исключением нескольких фрагментов, присутствующих у одного индивидуума и отсутствующий у другого. Такой полиморфизм наследуется и может быть использован как новый класс генетических молекулярных маркеров (Потокина, Чесноков, 2005).

Для определения эффективности использования IRAP маркеров при исследовании генетического полиморфизма у различных генотипов сахарной свёклы нами были подобраны праймеры на концевые участки ретротранспозон-подобных элементов семейства R173 (Rogovskyetal., 1991). Ранее проведенные исследования показали, что праймеры, распознающие эти последовательности в геноме ржи, пригодны для анализа полиморфизма и генотипирования растений, принадлежащих к семействам Asteraceae, Brassicacea, Fabaceae, Rosaceae, Solanaceae (Забродина, Шаденков, Хавкин, 1998; Бирюкова и др., 2003).

Цель исследований заключалась в выявлении генетического полиморфизма селекционных материалов сахарной свёклы с использованием метода анализа рассеянных повторов.

Объектом исследований служили проростки селекционных материалов сахарной свёклы (МС-линии, линии закрепители стерильности Оуэн «О»—типа, многосемянные опылители, простые гибриды, апомиктичные у - линии).

При проведении ПЦР – анализа данных селекционных материалов сахарной свёклы нами было использовано пять олигонуклеотидных праймеров PawS5, PawS6, PawS11, PawS16, PawS17, а также их комбинации, синтезированные в ЗАО «Синтол» (г. Москва).

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее информативными оказались праймерыPawS5, PawS16 и PawS17. Полиморфизм,

выявленный данными праймерами, составил 75,2, 83 и 85 %, соответственно. Продукты ПЦР представляли фрагменты амплификации, которые варьировали от 100 до 1000 п.н. Выбранные праймеры выявляли полиморфизм не только между растениями различных образцов, но и показывали степень генетической выравненности среди растений каждого селекционного номера. При оценке однородности селекционного материала было выявлено, что самыми гетерогенными оказались растения многосемянных опылителей, у которых уровень полиморфизма составил 85 %. В то же время самый низкий уровень полиморфизма 10,7% был отмечен у апомиктичных у – линий. В ходе анализа спектров амплифицируемых RAPD – продуктов были выявлены локусы, которые присутствовали только в определенных генотипах сахарной свеклы. Так, локус 1000 п.н., выявленный праймером PawS17, отмечен только в растениях МС-линии (γ-МС-2113) и в гибридах с её участием. Можно предположить, что данный ПЦР-продукт может быть специфичным для данных селекционных материалов. Наряду с этим, ряд локусов PawS5, PawS6, PawS11, PawS16, PawS17 присутствовали во всех образцах и были представлены мажорными полосами в RAPD-спектрах. Выявлены олигонуклеотидные праймеры, которые могут использованы ДЛЯ изучения молекулярно-генетического полиморфизма идентификации различных селекционных форм и гибридов сахарной свеклы.

Таким образом, можно заключить, что выбранные нами RAPD-праймеры(PawS5, PawS6, PawS17)являются высокоинформативными, их целесообразно использовать для исследований генетической структуры близкородственных селекционных образцов и гибридов сахарной свёклы.

ГЕН ЭСТРОГЕННОГО РЕЦЕПТОРА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР МНОГОПЛОДИЯ У РАЗЛИЧНЫХ ПОРОД СВИНЕЙ

Друшляк Н.Г.

ФГБОУ ВПО Орловский государственный аграрный университет, Инновационный научно-исследовательский испытательный центр, Орел 302019 E-mail: natalisai@mail.ru

В настоящее время у свиней известен целый ряд генов-маркеров, представляющих интерес при селекции на повышение воспроизводительных, откормочных и мясных качеств. Перспективным генетическим маркером воспроизводительной продуктивности является ген рецептора эстрогена (ESR).

Ген ESR1 локализуется в хромосоме (SSC1) и кодирует специфический рецептор эстрогена, который является проводником гормонального сигнала эстрогенов. Эстрогены - стероидные гормоны, играющие центральную роль в регуляции процессов размножения. [Бублик Е. М., 2013]. Животные с генотипом ВВ имеют гиперфункцию выработки эстрогена, а с генотипом АА – гипофункцию.

Целью исследований послужило выявление гена эстрогенного рецептора у свиней трехпородного скрещивания ландрас \times йоркшир \times дюрок (Л \times Й \times Д), крупная белая, французский гибрид.

В качестве исходного материала использовали кровь 146 животных случайной выборки. ДНК выделяли с помощью набора DIAtomTM DNA Prep100 («БИОКОМ», Россия). Генотипирование осуществляли методом ПЦР-ПДРФ (полимеразной цепной реакции полиморфизма длин рестрикционных фрагментов), с использованием рестриктазы AvaI.

Данная мутация приводит к образованию дополнительного сайта рестрикции AvaI. Поэтому, как описано Kamiñski и Wojtasik [2002], присутствие мутантного аллеля А можно распознать по наличию трёх фрагментов длиной 76, 62, 47 п.н., при отсутствии

мутации (аллель B) в ходе рестриктного анализа образуется 2 фрагмента — 109 п.н. и 76 п.н. Так, образец с генотипом BB в геле имеет два фрагмента — 109 и 76 п.н., AB — образец гетерозиготный, носитель мутации (в геле — четыре фрагмента: 109, 76, 62 и 47 п.н.) и AA (в геле три фрагмента - 76, 62 и 47 п.н.) (рис. 1).



Рисунок 1. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена ESR свиней.

По гену ESR отмечено, что высокие показатели воспроизводительных качеств у животных связаны с наличием аллеля B, а аллель A улучшает откормочные показатели.

Проведенные исследования показали высокую частоту встречаемости аллеля В. Наибольшая частота встречаемости генотипа ВВ обнаружена у особей трехпородного скрещивания (82%), генотип АВ встречается реже: французский гибрид (33%), крупная белая (8%). Следует отметить, что генотип АА имеет низкую частоту встречаемости (2 - 17%), а у свиней породы французский гибрид не был выявлен.

Таким образом, использование селекционерами ДНК-диагностики свиней по гену ESR может существенно повысить откормочные и репродуктивные качества.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ГЕНОТИПА РАСТЕНИЯ НА ПРОЦЕСС МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ГОРОХА В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

Сащенко М.Н., Подвигина О.А., Амелина К.В.

Государственнон научное учреждение Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова Россельхозакадемии, 396030 Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 86 E-mail: samani84@mail.ru

Наряду с прочими важными факторами, влияющими на процесс микроклонального размножения, существенным остается генотип исходного растения, в наибольшей степени влияющий на могфогенетический потенциал экспланта в условиях in vitro. Известно, что способность к размножению in vitro, как и любой признак растительного организма, обусловлен и в сильной степени варьирует у различных видов и сортов.

Наши исследования были направлены на изучение влияния генотипа растений на условия культивирования гороха в культуре тканей. Исходным материалом для исследований служили сорта и линии гороха селекции ВНИИСС.

В экспериментах, проведенных нами на горохе, влияние генотипа в культуре тканей выразилось в различном морфологическом развитии микроклонов.

В условиях культуры тканей при микроразмножении у генотипов N = 1065 - 02, Амур, Зенит наблюдался активный рост растений, их высота варьировала от 2 до 6 см (табл. 1).

Таблица 1. – Влияние генотипа на рост и развитие микроклонов

Генотип	Высота, см	Количество побегов на 1 растение, шт.	Коэффициент размножения
Рамонский 77	3 – 7	1 – 2	2
377 – 02	2-5	2-6	5
Амур	2 – 6	2 - 5	4
Зенит	2-5	2 – 6	4
АМЗК	3 – 7	1 – 3	2
1065 - 02	2 - 5	2 - 3	3

Количество побегов на 1 растение находилось в пределах 2-6 шт. Растения характеризовались более высокой степенью развития, побеги были утолщенные, кустистые. Коэффициент размножения достигал 5 (рис. 1).

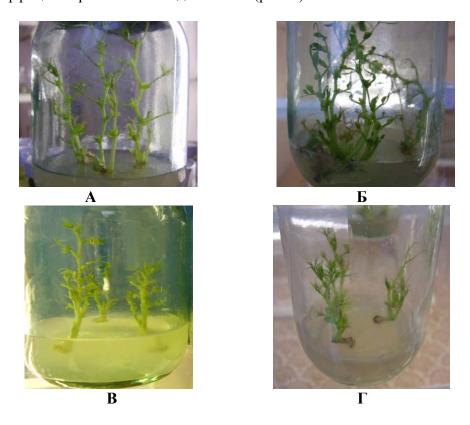


Рисунок 1. Внешний вид микроклонов изучаемых генотипов: A - Амур, Б - Зенит, B - № 377 – 02, Γ - № 1065 – 02.

В полевых условиях растения этих генотипов не превышают в высоту 70 см и относятся к короткостебельному (Амур, Зенит) и низкорослому ($N \ge 377 - 02$, $N \ge 1065 - 02$) морфотипу. Зенит и $N \ge 1065 - 02$ характеризуются безлисточковым, усатым типом. Селекционный номер 377 - 02 является узколистным. В условиях іп vitrо микроклоны данных генотипов соответствовали морфологическим характеристикам растений, выращенных в полевых условиях.

Сорта гороха Рамонский 77 и АМЗК – 99 высокорослые (до 90 см), имеют среднюю облиственность и относятся к детерминантному морфотипу. В условиях культуры тканей растения данных сортотипов активно росли в высоту. Их средняя высота

находилась в пределах от 3 до 7 см. Количество побегов на одно растение не превышало 1 – 3 шт., коэффициент размножения составлял 2 (рис. 2).

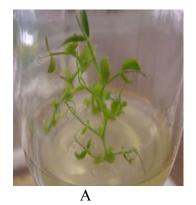




Рисунок 2. Внешний вид микроклонов сортов: A – Рамонский 77, Б – AM3K – 99.

Таким образом, при микроразмножении гороха четко прослеживается роль генотипа. Наиболее высокий выход хорошо развитых микроклонов с одного введенного растения обеспечивают низкорослые, усатые генотипы.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ СТЕРИЛИЗУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Сащенко М.Н., Подвигина О.А.

Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова Россельхозакадемии, 396030 Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 86 E-mail: samani84@mail.ru

Важной задачей традиционной селекции сахарной свёклы является создание сортов и гибридов, отвечающих современным требованиям промышленного возделывания и характеризующихся высокой продуктивностью, сахаристостью и устойчивостью к вредителям и болезням.

Для расширения пределов изменчивости при создании исходного материала и ускорения индукции новых устойчивых форм свёклы с ценными селекционными признаками перспективны методы биотехнологии, позволяющие культивировать органы и ткани.

Основным условием работы с органами, тканями и клетками растений является соблюдение строгой стерильности материала, вводимого в культуру *in vitro*. Первичный эксплант должен быть полностью освобожден от всех микроорганизмов, и его дальнейшее существование *in vitro* требует поддержания абсолютной асептики, так как грибная и бактериальная инфекции ингибируют рост клеток и приводят к их гибели. Для каждого объекта необходимо подобрать вид стерилизующего агента, его концентрацию и экспозицию, исходя из особенностей экспланта. Действие стерилизующего вещества должно основываться на наименьшем повреждении растительных тканей при достаточно высоком проценте неинфицированных и жизнеспособных эксплантов. Этап подготовки к введению свёклы в культуру во многом определяет результативность исследований.

Наши исследования были направлены на поиск оптимальных стерилизующих агентов для обеспечения высокого стерилизующего эффекта и сохранения жизнеспособности эксплантов при введении в культуру in vitro.

В работе использовали селекционный материал сахарной свёклы селекции ВНИИСС, питательные среды с минеральной основой Гамборга, содержащие витамины по Уайту, 100 мг/л мезоинозита, 30 г/л сахарозы, приготовленные по общепринятой методике. Введение в культуру тканей осуществляли незрелыми зародышами на 8, 12, 14 дни после опыления. Стерилизацию вводимого материала проводили растворами Анолита, Хлорамина Б, Ломаксхлора в различных концентрациях и времени экспозиции. После обработки стерилизующими агентами экспланты промывали трехкратно автоклавированной дистиллированной водой и вводили в культуру тканей на безгормональную питательную среду.

В результате исследований установлено, что успех введения в культуру тканей определяется эффективностью стерилизации. Сравнительный анализ действия различных стерилизующих агентов показал, что использование не всех имеющихся хлорсодержащих веществ обеспечивает достаточную стерильность материала.

При стерилизации вводимого материала раствором Анолита эффект стерильности был равен 43,2 %. При этом наблюдалась грибная и бактериальная инфекция около эксплантов на питательной среде (рис. 1 A, Б).

Раствор Хлорамина Б не обладал высокой дезинфицирующей способностью и не обеспечивал желаемого эффекта. Инфицированность проростков после недельного культивирования составляла 45,9 %.

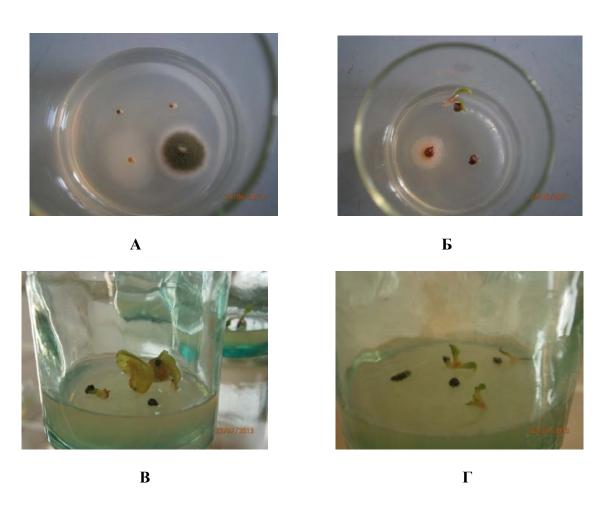


Рисунок 1. Внешний вид эксплантов сахарной свёклы после обработки: $A, \, B$ – Анолитом; B - Xлорамином $B; \, \Gamma$ – Ломаксхлором

После обработки эксплантов Хлорамином Б растения формировались недоразвитыми и уродливыми (рис. 1 В), обладали низкой жизнеспособностью, через 10 - 20 дней культивирования наблюдалось оводнение тканей регенерантов и в дальнейшем нарастание каллусной массы.

Применение раствора Ломаксхлора обеспечивало больший стерилизующий эффект материала – 89,3 % (рис. 1 Г). Количество инфицированных растений в условиях *in vitro* составляло 10,7 %. Жизнеспособность эксплантов была высокой. Аномалий в развитии проростков после обработки не наблюдалось.

В результате исследований установлено, что оптимальным стерилизующим агентом для обеспечения стерильности и сохранения высокой жизнеспособности вводимого материала в наших исследованиях является раствор Ломаксхлора в концентрации 0,05 % и времени экспозиции 60 минут.

ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА РИСА МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ ПЦР И ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»

Егорова М.С. ¹, Игнатов А.Н. ²

¹ФГБУ Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ ВНИИКР), Московская область, п. Быково,

²Российский университет дружбы народов, кафедра ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии, г. Москва 117198

E-mail: masha 0787@mail.ru

Одним из наиболее опасных и вредоносных заболеваний риса является бактериальный ожог, вызываемый бактерией Xanthomonas oryzae pv. oryzae (BLB) [4, 2]. Бактериальный ожог риса представляет серьезную угрозу для региона ЕОКЗР и Российской Федерации [1]. Патоген переносится семенами. Поэтому необходимость разработки и усовершенствования молекулярных методов диагностики данного бактериоза обуславливает актуальность данного исследования. Для работы были использованы 50 штаммов бактерий рода Xanthomonas, в том числе 8 типовых штаммов Xanthomonas oryzae pv. oryzae, полученных из коллекции NCPPB. Видоспецифичные праймеры и зонд были подобраны на основе последовательностей гена субъединицы Б фермента ДНК-гиразы (gyrB). Анализ последовательностей и выбор праймеров проводили с помощью программ «BioEdit» и «Primer 3». Праймеры X.o.F/ X.o.R и зонд X.or.-Р., содержащий флуоресцентную метку R6G на 5' конце и гаситель флуоресценции RTQ2на 3'конце, были специфичны только для *X.orvzae*. В результате проведенных исследований были определены оптимальные условия для проведения диагностики, которые делают метод более чувствительным и специфичным для выявления X. oryzae. Для постановки классической ПЦР использовали специфичные праймеры TXT/TXT-4R [3], которые амплифицируют продукт 954 п.о. региона IS1113 возбудителя бактериального ожога риса. При внесении ДНК Xanthomonas oryzae в реакционную смесь с данными праймерами были получены ампликоны соответствующего размера. Отрицательные результаты были зарегистрированы при использовании образцов ДНК патогенных и сапротрофных бактерий, а также других видов рода Xanthomonas.

Литература:

- 1. EPPO/CABI Quarantine Pests for Europe (Ed. by Smith I.M. et al.) CAB International, Wallingford, UK, 1997
- 2. OEPP/EPPO. Data sheets on quarantine organisms, *Xanthomonas oryzae* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. -1990. –V. 16. –P. 1-8.

- 3. Sakthivel N., Mortensen C., Mathur S. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques // Applied Microbiology and Biotechnology.-2001.-V. 56. P. 435–441.
- 4. Swings J. G., Van Den Mooter M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T.W. and Kersters K. Reclassification of the causal agents of bacterial blight *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzae* and bacterial leaf streak *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzicola* of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* new species Ex Ishiyama // Int. J. Syst. Bacteriol. -1990.-V. 40. P. 309–311.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ RAPD-AHAЛИЗОМ

Федорин Д.Н., Богачева Н. Н.

Государственное научное учреждение «Всероссийский научно – исследовательский институт сахарной свёклы имени А.Л. Мазлумова» 396030, Воронежская область, Рамонский район, п.ВНИИСС. E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Для интенсификации селекционного процесса, решения проблем семеноводства сахарной свеклы и защиты авторских прав необходима дифференциация селекционных материалов. Принципиально новые возможности для идентификации селекционных материалов открылись с появлением методов основанных на применении ДНК-маркеров, которые используют для точной и быстрой паспортизации различных видов и сортов растений, изучения филогенетического родства и т.д. (Ковеза, 2005).

Одним из методов исследования ДНК - гетерогенности селекционного материала является RAPD — метод (random amplified polymorphic DNA) полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием короткого случайного праймера (Сиволап, Календарь, 1995; Martin, 1997). Данный метод позволяет выявлять высокополиморфные «анонимные» последовательности ДНК, фланкированные инвертированными повторами декануклеотидов, в частности терминальными участками ретротранспозонов. Одно из достоинств этого метода — возможность генотипирования одновременно по многим локусам, локализованным в разных участках генома, что особенно важно (Созинова, 2008).

Молекулярный анализ 11 исходных родительских компонентов сахарной свеклы с использованием праймеров к умеренно повторяющимся последовательностям ДНК семейства R 173: PAWS 5, PAWS 6, PAWS 16, PAWS 17 (Rogowsky,1991) позволил выявить для каждого исследованного генотипа определенный набор ДНК-фрагментов, отличающий его от других селекционных материалов.

Анализ экспериментальных данных, полученных при использовании праймера PAWS 5 позволил амплифицировать наибольшее число фрагментов ДНК на генотип - до восьми, PAWS 17 — до четырех, PAWS 6 - до трех, праймер PAWS 16 - до двух ПЦР-продуктов различной длины на индивидуальный генотип, т.е. оказался наименее информативным.

Для исследуемых материалов с использованием праймера PAWS 5 получено 9 полиморфных фрагментов ДНК (100%), общее количество ампликонов, полученных с этим праймером — 80. Для праймера PAWS 6 полиморфными оказались 7 фрагментов ДНК (100%), общее количество ампликонов, полученных с данным праймером для всех генотипов составило 34, длина ДНК-фрагментов составила от 200 до 800 п.н. Для праймера PAWS 16 выявлено 3 (100%) полиморфных RAPD - фрагмента длиной 400, 500 и 800 п. н. Для всех генотипов в сумме получено 22 ПЦР-продукта. Для селекционных

материалов №№: 08011, 08010, 08003, 08008, 08016, 08005, 08197, 08180, 08077 и др. при амплификации праймером PAWS 16 обнаружены общие RAPD - фрагменты длиной 500 п.н. Это может свидетельствовать об относительной генетической близости данных селекционных материалов.

С использованием короткого одиночного праймера PAWS 17 выявлено 7 полиморфных фрагментов ДНК, длиной от 700 до 2000 п. н. Общее количество ампликонов, полученных с данным праймером – 36.

Диапазон длин полученных фрагментов ДНК при использовании четырех праймеров – от 250 до 2000 п.н.

На основе полученных данных составлены молекулярно-генетические формулы, которые отражают генетическую структуру индивидуальных материалов сахарной свеклы. Полученные данные молекулярно-генетической паспортизации могут быть использованы для быстрой (в течение 2-3 часов) идентификации исследованных селекционных материалов, защиты авторских прав селекционеров.

Исследование генетического полиморфизма селекционных материалов сахарной свеклы с использованием четырех одиночных RAPD-праймеров позволило выявить 172 полосы на электрофореграммах разделения ПЦР-продуктов для исходных селекционных материалов. Результаты экспериментов использованы для определения уровня дивергенции между исследованными линиями методом кластеризации, были рассчитаны генетические расстояния (евклидовы), которые варьировали от 1,0 до 3,87. Все материалы кластеризовались на две группы.

Наименьшие генетические расстояния выявлены для комбинаций скрещиваний (D= 1,0) МС И-08015 и ОП 15202. Наибольшие генетические расстояния установлены для родительских пар МС И-08001 \times ОП 08197 (D=3,87), МС И-08001 \times ОП 08001 (D= 3,74), МС И-08016 \times ОП 08008 (D=3,46), МС И-08015 \times ОП 08008 (D=3,74), МС 94 Ар \times ОП 08008 (D= 3,46), МС И-08016 \times ОП 08016 (D=3,74) и др. Данные пары могут быть рекомендованы для проведения скрещиваний. Взаимные генетические дистанции между мужскостерильными линиями варьировали от 1,41 до 3,87, между опылителями от 1,73 до 3,61.

Таким образом, в результате проведенных исследований осуществлена дифференциация исходных линий сахарной свеклы, полученные данные о генетической удаленности селекционных материалов могут быть использованы для более обоснованного подбора пар при гибридизации сахарной свеклы. Отобраны праймеры PAWS 5 и PAWS 17, как наиболее полиморфные для исследованных селекционных материалов и перспективные для генотипирования.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОМОТОРА SmAMP1 ИЗ STELLARIA MEDIA

Ефремова Л.Н., Шукуров Р.Р., Комахин Р.А., Бабаков А.В., Высоцкий Д.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Россия, Москва 127550 E-mail: efremova.larisa.nikolaevna@gmail.com

Ранее в лаборатории стрессоустойчивости растений Всероссийского научноисследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН из сорного растения *Stellaria media* были клонированы гены антимикробных пептидов SmAMP1 и SmAMP2 [1]. Установлено, что в *Stellaria media* ген *SmAMP2* демонстрирует конститутивный и высокий уровень экспрессии, а экспрессия гена *SmAMP1*, не смотря на высокую степень гомологии, носит индуцибельный характер при действии фитопатогенов.

Целью настоящей работы являлось выяснение особенностей первичной структуры промоторной области SmAMP1, обуславливающих уникальный характер экспрессии гена. В ходе работы была также установлена нуклеотидная последовательность промотора гена SmAMP1 длиной 1257 п.н. Был проведен поиск регуляторных элементов промоторной области с использованием программ PlantCARE и PLACE. Анализ выявил ряд мотивов, характерных для большинства эукариотических промоторов. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности промотора с клонированной ранее промоторной областью гена SmAMP2 [2] показал, что pro-SmAMP1 содержит в своем составе два уникальных мотива длиной 16 п.н. и 72 п.н. Для выяснения их вклада в активность промотора были созданы пять 5'-делеционных вариантов промотора. При этом самый короткий из них, обозначенный как -481, не содержит ни одного уникального мотива, -603 и -650 содержат один мотив длиной 72 п.н., а -700 и -1200 содержат оба уникальных мотива. Эти фрагменты промотора гена SmAMP1 были использованы для создания пяти генетических конструкций для трансформации растений и последующей оценки их активности по активности репортерного gusA, находящегося под их контролем.

С использованием данных генетических конструкций была проведена трансформация агробактерий штамма AGL0. Для дальнейшего анализа 5'-делеционных вариантов промотора *SmAMP1* была проведена трансформация растений *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana benthamiana*. В настоящее время ведется отбор трансгенных растений для последующей оценки активности репортерного гена.

Литература:

- 1. Shukurov R.R., Voblikova V.D., Nikonorova A.K., Komakhin R.A., Komakhina V.V., Egorov T.A., Grishin E.V., Babakov A.V. Transformation of tobacco and Arabidopsis plants with Stellaria media genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens // Transgenic research. 2012. № 2.
- 2. Стрельникова С.Р., Вобликова В.Д., Шукуров Р.Р., Бабаков А.В., Комахин Р.А. Изучение нового растительного промотора гена proSmAMP2 из Stellaria media методом агробактериальной инфильтрацией растений // Биотехнология, 2014 принята к печати

СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУЦЕНТОВ БЕЛКА rhBMP-2 И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ВЕТЕРИНАРИИ НА ЕГО ОСНОВЕ

Бартов М.С.¹, Карягина А.С.^{1,2}, Лунин В.Г.^{1,2}

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.
 Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва 123098
 Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Российской академии сельскохозяйственных наук, Москва 127550
 Е-mail: mike.bartov@gmail.com

В настоящее время наиболее перспективной стратегией лечения переломов в медицинской и ветеринарной ортопедии является применение трансплантатов с

остеоиндуктивными свойствами, которые достигаются за счет использования факторов роста и регенерации, мультипотентных стромальных клеток (МСК) и других компонентов, обеспечивающих направленное стимулирование остеогенеза. Наиболее эффективными из них являются рекомбинантные человеческие костные морфогенетические белки (rhBMPs).

В настоящее время на мировом рынке трансплантатов широко применяются «INFUSE Bone Graft» (Medtronic Sofamor Danek, США) на основе rhBMP-2 и «OP-1» (Stryker Biotech, США) на основе rhBMP-7. В РФ использование данных материалов лимитируется их высокой стоимостью (несколько тысяч евро за упаковку), поэтому создание доступных, относительно недорогих остеоиндуктивных rhBMP-содержащих материалов является актуальной задачей, решение которой позволило бы расширить их применение в российской клинической практике, а также начать использовать в ветеринарии сельскохозяйственных, домашних и спортивных животных.

Основным дорогостоящим компонентом BMP-содержащих остеопластических материалов является белок, получаемый в эукариотической экспрессионной системе СНО. Использование прокариотической системы синтеза белка позволит при небольших затратах получать rhBMP в больших количествах.

Целью нашей работы было создание новых эффективных микробиологических штаммов-продуцентов rhBMP-2, получение и проверка активности остеоиндуктивных материалов на его основе.

Для облегчения формирования в процессе фолдинга белка биологически активной димерной конформации rhBMP-2 нами была сделана генно-инженерная конструкция, несущая в своем составе димеризационный домен типа «лейцинового зиппера». Благодаря его наличию стало возможным образование димерных и олигомерных структур в клетках *Escherichia coli*.

Плазмида была трансформирована нами в штаммы $E.\ coli\ M15$ и BL21. Уровень продукции белка составил ~20% ($E.\ coli\ M15$) и ~30% ($E.\ coli\ BL21$) от клеточных белков штаммов. Методом иммуноблотинга с окраской специфическими антителами показано, что оба трансформированных штамма продуцируют как мономерную, так и димерную форму rhBMP-2.

Для увеличения выхода белка нами были оптимизированы условия культивирования штаммов-продуцентов в колбах и ферментере: время внесения и концентрация индуктора экспрессии rhBMP-2, компоненты среды выращивания и их соотношение, температурный и аэрационный режимы. За основу методики выделения и очистки белка из наработанной биомассы была взята отработанная ранее технология [7]. Оптимизация условий проводилась путем варьирования концентрации используемых при растворении телец включения реагентов, состава буферных растворов, сорбентов для хроматографии.

Подобранные условия культивирования с учетом стадии рефолдинга белка позволили обеспечить выход rhBMP-2 на уровне около 400 мг в пересчете на 1 г биомассы, что более чем в 4 раза превышает результаты исходной методики.

Биологическую активность rhBMP-2 оценивали *in vitro* по его способности индуцировать синтез щелочной фосфатазы (ЩФ) в культуре эукариотических клеток C2C12 и по его влиянию на пролиферацию и остеогенную дифференцировку МСК костного мозга и селезенки мышей [2].

В эксперименте на культуре клеток C2C12 при повышении концентрации rhBMP-2 наблюдалось дозозависимое увеличение его биологической активности. Удельная активность белков, синтезированных в обоих продуцентах *E. coli*, превышала активность rhBMP-2, полученного по исходной технологии на 20-25%. Наибольшей удельной активностью обладает rhBMP-2, наработанный в *E. coli* BL21.

Влияние на пролиферацию и остеогенную дифференцировку МСК костного мозга и селезенки мышей тестировали на rhBMP-2, выделенном из *E. coli* BL21. С повышением

содержания фактора роста в культурах клеток селезенки и костного мозга наблюдалось увеличение количества колоний и численности фибробластов в них, а также снижение в них количества макрофагов от 2,5 до 6,4 раз в зависимости от концентрации.

Для создания остеоиндуктивных материалов в качестве носителя использовали деминерализованный костный матрикс (ДКМ). Технология изготовления включала в себя несколько этапов: фрагментацию кости с последующей очисткой, обезжиривание, деминерализацию, отмывку и высушивание материала, придание ДКМ формы материала для конечного применения, иммобилизацию белка, радиационную стерилизацию полученных материалов [3, 5].

Экспериментальная оценка материалов *in vivo* проводилась на крысах по способности к индукции эктопического остеогенеза при внутримышечной имплантации (модель 1) и по способности к регенерации краниальных дефектов критического размера (модель 2), на кроликах по способности к регенерации дефектов трубчатых костей конечностей при применении в сочетании с пористыми титановыми имплантатами (модель 3).

По данным гистологического анализа на модели 1 показано, что применение ДКМ в виде крошки с rhBMP-2 способствовало наиболее интенсивному протеканию остеогенеза, о чем свидетельствует увеличенное количество остеоцитов и остеонов в образцах в зоне имплантации; также материал оказывал выраженный ангиогенный эффект.

При тестировании материалов в виде губчатых мембран на модели 2 с помощью методов гистоморфометрии, компьютерной томографии и использования остеотропных флуоресцентных меток продемонстрировано, что максимальными показателями регенерации костной ткани в зоне дефекта обладают материалы с иммобилизированным фактором роста.

Исследование активности малоинвазивных форм (МИФ) разработанных материалов с разным содержанием белка на модели 3 показало, что наилучшими остеоиндуктивными качествами обладали имплантаты, насыщенные МИФ с содержанием $65,5\pm2,5$ мкг rhBMP-2.

Материалы зарегистрированы в России как ИМН «Крошка костная деминерализованная лиофилизированная для заполнения костных дефектов «Гамалант-крошка» (регистрационное удостоверение № Φ CP 2012/13111) и прошли расширенные клинические испытания, в которых хорошо себя зарекомендовали [1, 4].

Приведенные данные свидетельствуют о перспективе применения разработанных материалов в российской клинической практике и в ветеринарии сельскохозяйственных, домашних и спортивных животных [6].

Литература:

- 1. Бартов, М.С. Остеопластические препараты нового поколения «Гамалант», содержащие факторы роста и регенерации костной ткани / М.С. Бартов, А.С. Карягина, А.В. Громов и др. // Кафедра травматологии и ортопедии. − 2012. − №2. − С.21–25.
- 2. Горская, Ю. Ф. Влияние ВМР-2 на численность и остеогенные свойства мультипотентных стромальных клеток и экспрессию генов цитокинов в первичных культурах клеток костного мозга и селезенки мышей СВА, иммунизированных бактериальными антигенами / Ю. Ф. Горская, Т. А. Данилова, М. В. Мезенцева, М.С. Бартов и др. // Бюллетень Экспериментальной Биологии И Медицины. − 2013. − Т.155. − №5. − С.602−606.
- 3. Громов, А. В. Разработка методики получения деминерализованного костного матрикса с максимальным остаточным содержанием нативных факторов роста костной ткани /А. В. Громов, К. Е. Никитин, Т. А. Карпова, М. С. Бартов и др. // Биотехнология. -2012. -№5. С. 66-75.

- 4. Донченко, С.В. Первый опыт применения остеопластических материалов нового поколения, содержащих рекомбинантные человеческие костные морфогенетические белки (rhBMPs), при дефектах и посттравматической патологии костной ткани / С. В. Донченко, А. С. Карягина, Д. В. Алексеев, В. Г. Лунин // Московский медицинский журнал. − 2012. №4. − С.16-21.
- 5. Лунин В.Г., Карягина-Жулина А.С., Шарапова Н.Е. и др. Способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки. Заявка на патент РФ №2011108938 от 10.03.2011 г. Патент РФ №2456003 от 20 июля 2012 года. Срок действия истекает 10 марта 2031 г. Опубликовано 20.07.2012, Бюл. №20.
- 6. Миргазизов М.З., Лунин В.Г., Миргазизов А.М. и др. Способ адресной доставки остеопластических материалов, содержащих факторы роста и регенерации костной ткани, в область дефекта альвеолярной кости. Заявка на патент РФ №2011121880 от 31.05.2011 г. Патент на изобретение №2469676. Дата публикации: 20 декабря, 2012. Бюлл. №35.
- 7. Шарапова, Н. Е. Получение рекомбинантного костного морфогенетического белка 2 человека в клетках *Escherichia coli* и тестирование его биологической активности in vitro и in vivo / Н. Е. Шарапова, А. П. Котнова, З. М. Галушкина и др. // Молекулярная биология. 2010. №44(5). С. 1036–1044.

АНАЛИЗ АНДРОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ГИБРИДОВ ГЕКСАПЛОИДНОГО ТРИТИКАЛЕ (× TRITICOSECALE WITTM.)

Зайцева О.И.1, Сокольчик Д.А.2

¹ ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, 220072 ²УО «Белорусский государственный университет», Минск, 220301 E-mail: O.Zaitseva@igc.bas-net.by

Культивирование пыльников *in vitro* относится к биотехнологическим методом, позволяющим получать за короткий срок стабильные гомозиготные линии, использование которых в селекционных программах ускоряет процесс создания новых сортов и гибридов с улучшенными характеристиками.

В настоящее время разработаны протоколы получения удвоенных гаплоидов для более 300 видов растений. Для многих культур на основании удвоенных гаплоидов получены сорта. Так, создано более 100 новых сортов ячменя, риса и рапса. Для тритикале методы андрогенеза *in vitro* не получили такого широкого практического применения, как для других злаков. В первую очередь это обусловлено невысокой отзывчивостью тритикале в культуре пыльников и значительной генотипической зависимостью основных параметров андрогенеза.

В связи с этим, целью нашей работы являлась оценка андрогенетического потенциала гибридов тритикале в культуре пыльников *in vitro* и получение на их основе удвоенных гаплоидов.

В культуру пыльников вводили 15 межсортовых и отделенных гибридов гексаплоидного ярового и озимого тритикале с мягкой пшеницей. Для каждого генотипа пыльники выделяли из 10-30 колосьев. После холодовой предобработки в течение 21 дня пыльники инокулировали для инициации эмбриогенеза на жидкую питательную среду С-17, содержащую кинетин (0,5 мг/л) и 2,4-Д (2 мг/л) и помещали в термостат на 7 дней при +31°C с последующим культивирование в темноте при температуре +26°C до образования эмбриогенных структур. Новообразования переносили на регенерационную среду Мурасиге-Скуга, содержащую ИУК (0,5 мг/л), кинетин (0,5 мг/л). В дальнейшем растениярегенеранты выращивались в климокамерах при длине светового дня 16 ч и

интенсивности освещения 1500-2000 Лк. Полученные растения высаживали для адаптации в субстрат «Биона» и затем в почву.

Формирование эмбриогенных структур начиналось на 30-40 сутки после инокуляции пыльников на индукционную среду. Образование новых каллусов и эмбриоидов происходило в течение длительного времени (3-4 месяца). Однако, согласно нашим наблюдениям, целесообразно переносить на среду для регенерации только новообразования, сформировавшиеся в течение первых 40-60 дней, так как регенерационный потенциал более поздних структур значительно снижается, либо происходит формирование исключительно альбиносных растений. В наших исследованиях формирование растений начиналось на 3-15 день после переноса новообразований на регенерационную среду. При этом наблюдалось регенерация зеленых и альбиносных растений, так и формирование зеленых и альбиносных растений из одного каллуса.

Все исследованные гибриды проявили способность к индукции новообразований и регенерации зеленых и альбиносных растений. Вариабельность по способности к новообразованию составила от 7 до 58 каллусов и эмбриоидов на 100 пыльников. Среднее значение по данному параметру — 23,84%.

По сравнению со способностью к новообразованию, способность к регенерации растений варьировала в меньшей степени. Средние значения по частоте формирования зеленых и альбиносных растений составили 6,46% и 8,89% растений-регенерантов, соответственно.

Важным признаком, определяющим эффективность практического использования метода культуры пыльников *in vitro*, является выход растений-регенерантов. В наших исследованиях он составил в среднем 3,66 растений на 100 инокулированных пыльников. Наибольшим выходом растений-регенерантов характеризовались гибриды Садко х Рубин (6,74%) и Д-8038 х Нагано (6,64%).

В результате введения в культуру пыльников гибридов тритикале создано 43 линии спонтанно удвоенных гаплоидов на основе 10 гибридных комбинаций. При этом максимальное количество линий получено для генотипов Лотос х Рубин (11 линий) и Садко х Рубин (8 линий).

Таким образом, проведена оценка отзывчивости в культуре пыльников *in vitro* 15 гибридных комбинаций гексаплоидного тритикале. Выделены гибриды (Лотос х Рубин и Садко х Рубин), характеризующиеся оптимальным сочетанием параметров пыльцевого андрогенеза для дальнейших экспериментов. Созданы 43 линии удвоенных гаплоидов для включения в селекционный процесс.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ЛОКУСОВ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ГЛЮТЕНИНОВ У ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ ТРИТИКАЛЕ И ПШЕНИЦЫ

Бондарченко М.В.¹, Антоненко Е.В.²

¹ УО «Белорусский государственный университет», Минск, 220301 ² ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск 220072 E-mail: <u>E.Antonenko@igc.bas-net.by</u>

В зонах умеренных широт с относительно холодным климатом и недостаточным плодородием почв, где ограничено возделывание пшеницы, успешно произрастает тритикале, представляющее собой гибрид пшеницы и ржи. Преимуществом данной культуры является наличие свойств, отсутствующих у исходных видов: высокий потенциал продуктивности, повышенное содержание белка и отдельных аминокислот,

высокие кормовые качества. Однако требуется улучшение существующих сортов для расширения сферы использования данной культуры в хлебопекарной и кондитерской промышленностях.

Известны три основные генетические системы, контролирующие хлебопекарное качество тритикале как сложный полигенный признак. Это локус Ha, детерминирующий консистенцию эндосперма, гены Gli, кодирующие спирторастворимые белки глиадины и гены Glu, определяющие компонентный состав высокомолекулярных (HMW) и низкомолекулярных (LMW) запасных белков глютенинов. Наибольший вклад в определение хлебопекарного качества вносят гены HMW-субъединиц глютенинов, а именно аллели Glu-Dld (кодирует субъединицы Dx5+Dy10), Glu-Ala (Ax1) и Glu-Alb (Ax2*), а также Glu-Blb (Bx7+By8) либо Glu-Bli (Bx17+By18), наличие которых может существенно повысить хлебопекарные качества муки.

Гексаплоидное тритикале (х *Triticosecale* Wittm., AABBRR) отличается от пшеницы (*Triticum aestivum* L., AABBDD) отсутствием D-генома. Поэтому ценные гены лучших сортов пшеницы, расположенные на хромосомах геномов A и B, могут быть внесены в геном тритикале путем получения отдаленных гибридов между тритикале и пшеницей с последующим беккроссированием этих гибридов тритикале. Гены D-генома пшеницы могут быть интрогрессированы в геном тритикале путем получения D/R, а также D/A и D/B замещенных линий.

Целью данной работы являлось определение аллельного состава локусов запасных белков глютенинов у отдаленных гибридов тритикале и пшеницы. В ходе работы использовались образцы ДНК 65-и гибридов тр. Лотос х пш. P-2 F_3/F_4 , тр. КСИ18/05 х пш. Ростань F_3/F_4 , тр. Лана х пш. P-19 F_4/F_5 , тр. КСИ18/05 х пш. Ростань F_4/F_5 , тр. Лотос х пш. Рассвет F_4/F_5 и их родительских форм (7 образцов). Для изучения аллельного состава исследуемых локусов использовались специфичные праймеры к аллелям $Glu-Ala\ (Ax1)$, $Glu-Alb\ (Ax2*)$, $Glu-Alc\ (AxNull)$, $Glu-Bla\ (Bx7)$, $Glu-Blb\ (Bx7+By8)$, $Glu-Blc\ (Bx7+By9)$, $Glu-Bld\ (Bx6+By8)$, $Glu-Bli\ (Bx17+By18)$, $Glu-Dla\ (Dx2+Dy12)$ и $Glu-Dld\ (Dx5+Dy10)$. Разделение продуктов амплификации проводили в 1 % агарозном геле.

Анализ полученных данных выявил, что оптимальным сочетанием аллелей для обеспечения хороших хлебопекарных качеств обладают генотипы гибридов КСИ18/05 х Ростань F_3/F_4 и КСИ18/05 х Ростань F_4/F_5 (данные гибриды наследовали от тритикале аллель Glu-A1b, от пшеницы — Glu-B1b и Glu-D1d), и, в меньшей степени, генотипы Лана х P-19 F_4/F_5 (имеют схожий аллельный состав, но от первых отличаются присутствием Glu-B1a вместо Glu-B1b). Гибриды Лотос х Рассвет F_4/F_5 не перспективны для дальнейших исследований в связи с отсутствием в их геноме аллелей Glu-B1b и Glu-D1d (несмотря на их наличие у родительских форм). Лотос х P-2 F_3/F_4 содержат аллель Glu-A1c, интрогрессированный от пшеницы P-2, который значительно снижает показатели качества муки.

Таким образом, для дальнейшего использования в селекционном процессе по признаку хлебопекарного качества выделено 46 отдаленных гибридов тритикале и пшеницы с комбинацией аллелей *Glu-A1b*, *Glu-B1b и Glu-D1d*, кодирующих субъединицы глютенинов, суммарно дающие высший балл по 10-бальной шкале, что является максимальной оценкой HMW-субъединиц у пшеницы.

ИНСЕРЦИЯ LIS-1 КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР ПОТЕНЦИАЛЬНО АДАПТИВНЫХ ГЕНОТИПОВ ЛЬНА (РОД *LINUM*)

Тимофеенко К.С., Гузенко Е.В.

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск 220072, Республика Беларусь

E-mail: ksenitim@gmail.com

Задача современной селекции льна-долгунца — выведение новых сортов, обладающих комплексом хозяйственно ценных признаков, а также устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды. Современные сорта льна-долгунца имеют сходное происхождение, поскольку до первой мировой войны в большинстве европейских стран высаживали лен-долгунец российской селекции, и дальнейший отбор шел на основе данных сортов. Сужение генетической основы сортового материала является реальным препятствием в работе по селекции данной культуры. Использование молекулярногенетических методов оценки генофонда льна может значительно повысить результативность работы по созданию перспективного исходного материала.

При адаптации к определенным стрессовым факторам окружающей среды в некоторых линиях льна-долгунца (генотрофы), а также сортах происходят наследуемые изменения генома, которые связаны с появлением вставки LIS-1 (Chen et al. 2005, 2009). LIS-1 — это последовательность нуклеотидов размером 5,7 kb, которая встраивается в единичной копии в определенный сайт генома льна. LIS-1 содержит несколько коротких участков, по которым находятся совпадения в базе данных Linum EST. В LIS-1 не найдено больших открытых рамок считывания и гомологии с транспозонами или другими мобильными элементами. Данные показывают, что LIS-1 является результатом сложного инсерционного события (Cory L. Bickel et al., 2012). Несмотря на то, что механизмы формирования и функции вставки LIS-1 в настоящее время малоизученны, эта последовательность является одним из наиболее эффективных молекулярных маркеров для выявления форм льна-долгунца с высокой пластичностью генома и адаптационной способностью.

В данной работе представлены результаты скрининга 28 сортов льна-долгунца белорусской селекции, 23 стародавних сортов (ландрасс), 4 диких форм льна, а также 4 линий растений «ложных трансформантов» (англ. "escapes"). "Escapes" – побочный эффект генетической трансформации (M.C.Jordan, A.McHughen, 1988). Это растения-регенеранты приспособившиеся к существованию на селективной среде, но не содержащие в своем геноме чужеродной ДНК.

Для проведения скрининга ДНК выделялась как из индивидуальных растений, так и из общей выборки растений одного сорта. LIS-1 обнаруживали амплификацией с праймерами: 5'-cataaattcagtcctatcgac-3' и 5'-tgtaacagctcggatctaggc-3', 5'-gggtttcagaactgtaacgaa-3' и 5'-gaggatggaagatgaagatgaagaagg-3'; отсутствие вставки выявлялось амплификацией с праймерами: 5'-gggtttcagaactgtaacgaa-3' и 5'-gcttggatttagacttggcaac-3'. Размеры амплифицируемых фрагментов 398 bp, 416 bp, 417 bp соответственно (Chen et al. 2009). Электрофоретическое разделение проводили в 1,8% агарозном геле.

В результате наших исследований вставка LIS-1 обнаружена в ДНК двух линий "escapes" (V-1, B-1), при этом она отсутствовала у исходных сортов, из которых данные линии были получены. Анализ трех поколений "escapes" установил стабильное наследование вставки. Таким образом, «ложные трансформанты», выжившие под влиянием многих стрессовых факторов, обладают повышенной физиологической

«подвижностью» и «пластичностью», расширяют спектр генетической изменчивости и могут быть полезны для создания форм с ценным сочетанием признаков.

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ARABIDOPSIS THALIANA С МИКРОБНЫМ ГЕНОМ ФИТАЗЫ BACILLUS GINSENGIHUMI

Нямсурэн Ч.¹, Валеева Л.Р.¹, Ахметова А.И.¹, Балабан Н.П.¹, Шакиров Е.В.², Шарипова М.Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008
² University of Texas at Austin, Section of Integrative Biology, Austin, TX, 78712 USA
E-mail: Chuka ch@mail.ru

Фосфор важным минеральным элементом, необходимым является ДЛЯ жизнедеятельности растений, и играет ключевую роль в фотосинтезе и процессах, связанных с восстановлением энергии. Недостаток фосфора сильно влияет на развитие растений. Поэтому важной проблемой для сельского хозяйства является возможность утилизации труднодоступных соединений почвы, обогащенных фосфором, таких как фитат. Растения самостоятельно не способны утилизировать фитаты до легко усваиваемых компонентов - остатков фосфорной кислоты и мио-инозитола. Ферменты фитазы микробного происхождения способны переводить фосфор из фитатов в доступные неорганические соединения. Поэтому поиск микроорганизмов, гены фитаз, которых будут использованы для создания трансгенных растений с улучшенными свойствами, является актуальным.

Целью работы явилось получение и анализ генетически модифицированных растений Arabidopsis thaliana, обладающих геномной вставкой на основе гена фитазы*Bacillus* ginsengihumi(phyCg). Нуклеотидную последовательность бактериальной фитазыphyCg предварительно оптимизировали для повышения уровня экспрессии в A. thaliana. Оптимизированный ген бациллярной фитазы клонировали в бинарный вектор *pCBK05* под контролем растительного промотора *Pht1;2*. Экспрессия промотора Pht1;2 происходит в эпителиальных клетках корней A. thaliana и индуцируется недостатком неорганического фосфора в ризосфере. Рекомбинантная конструкция также содержала последовательности, кодирующие сигнальный пептид растительного белка экстенсина AtExt3, необходимого для секреции фермента в ризосферу, и 3'-концевые His и Strep последовательности для эффективной детекции и очистки белка. Полученная конструкция была клонирована в вектор pCBK05 по сайтам рестрикцииPstI и SpeI и получены модифицированные агробактерии. Провели трансформацию A. Thaliana рекомбинантными бактериями Agrobacterium tumefaciens GV3101. трансформантов проводили на среде MS (Murashige-Skoog) с добавлением гербицида BASTA, в результате отобрали трансгенные растения первого, второго и третьего поколения и провели их генотипирование. В результате получены 5 независимых чистых линий трансгенных A. thaliana. Растения выращивали на среде без фосфора, чтобы определить экспрессию гена фитазы под контролем индуцируемого промотора *Pht1;2* в корнях растений. Так с помощью метода обратной транскрипции определили экспрессию гена бактериальной фитазы на уровне РНК в корнях растений. С помощью иммуноблоттинга установили наличие бактериальной фитазы в белковых экстрактах корней A. thaliana. Сделали заключение, что ген фитазы экспрессируется на уровне транскрипции и трансляции.

Таким образом, нами получены трансгенные растения, экспрессирующие микробные гены фитазы в корнях растений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ ХРИЗАНТЕМ WHITE SNOWDON К ВИРУСУ Б

Титова С.М.¹, Митюшкина Т.Ю.^{1,2}, Фирсов А.П.^{1,2}, Долгов С.В.^{1,2}

¹ ГНУ Всероссийский государственный научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Москва, 127550
² Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино 142290
E-mail: f0t0nchik@mail.ru

Одним из первых достижений в защите растений методами генетической инженерии явилось создание трансгенных растений, устойчивых к вирусам, путем переноса генов белков вирусной оболочки. В своей работе мы использовали 4 подхода, основанных на трансформации растений геном белка оболочки вируса в смысловой, двойной смысловой и антисмысловой ориентации, а также на основе РНКинтерференции. Цель нашей работы заключалась в исследовании эффективности молекулярно-биологических используемых подходов ДЛЯ создания хризантем, устойчивых к вирусу Б. В данной работе были исследованы клоны, содержащие целевой ген в прямой (pBSS) и обратной (pBAS) ориентации по отношению к 35S CaMVпромотору, клон, содержащий двойную копию гена в прямой ориентации (pBDS) и PHKинтерференционную конструкцию на основе фрагмента гена CP-CVB (pRNAiVB).

Методом прививки проводили искусственное заражение вирусом Б трансгенных растений хризантем и нетрансгенной неинфицированной линии, которая использовалась в качестве контроля. Для этого черенки с инфицированных вирусом Б растений хризантем прививали в приклад к стеблю исследуемого растения. В качестве исследуемого материала были взяты листья с привитого подвоя. Детекция вируса после заражения осуществлялась методом иммуноферментного анализа (ИФА). ИФА выполнялась с использованием антител к белку оболочки вируса Б хризантем производства компании «Loewe», Германия. Концентрацию общего белка в полученных препаратах определяли методом Bradford, затем препараты разводили до концентрации общего белка, равной 1 мг/мл. Для подтверждения результатов был дополнительно проведен вестерн-блот анализ.

В результате нашей работы было показано, что изученные трансгенные растения с полноразмерным геном белка оболочки Б-вируса хризантем в смысловой, двойной смысловой и антисмысловой последовательности, а также с конструкцией на основе РНК-интерференции с фрагментами вирусного гена белка оболочки показали различную степень устойчивости к вирусу Б.

RAPA1 КАК ПОСРЕДНИК В ПРИКРЕПЛЕНИИ РИЗОБИЙ К КОРНЯМ РАСТЕНИЙ

Нигматуллина Л.Р., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х.

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа 450054 E-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

Ризобии являются почвенными бактериями, которые устанавливают симбиотические взаимодействия с зернобобовыми культурами, образуя азотфиксирующие корневые узелки в условиях азотного голодания. Ризобии способны колонизировать разнообразные ниши, например, большую часть почвы, ризосферу. Специфическими молекулами прикрепления клеток ризобий к корням растений признаны адгезины.

Большинство из них агглютинины растительного или бактериального происхождения, и как считается, они действуют путем связывания с более или менее специфическими лигандами, либо на поверхности клеток своего партнера или же на клетках своего вида. Учитывая сложную природу ризобиальной адсорбции, определенные адгезины могут стать посредником определенного типа адсорбции, например, к поверхности корня, но не для другого типа, например, к инертным поверхностям. К таким адгезинам относятся белки адгезии (Rap), выделенные из $Rhizobium\ leguminosarum\ bv.\ trifolii$. У этих белков есть общий $rap\$ домен, и они известны как RapA, $RapB\$ and RapC. $RapA\$ имеет два $rap\$ домена и две изоформы этого белка называемые $RapA1\$ u RapA2, выделенные из R. $RapA1\$ 1 внеклеточный $RapA1\$ 2 выделенные из R. $RapA1\$ 3 выделенные из R. $RapA1\$ 4 вактериальной поверхности и способствует ризобиальной аутоагглютинации через клеточные полюса. Примечательно, что $RapA1\$ 6 связывается с клеточной поверхностью только на одном полюсе.

Целью работы было обнаружить и изучить бактериальный поверхностный белок RapA1, который является производным только небольшой группы ризобий: Rhizobium leguminosarum и Rhizobium etli. Для этой цели произвели подбор олигонуклеотидных праймеров к специфическим консервативным последовательностям гена RapA1. С помощью них был обнаружен этот ген у штаммов Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. Для его выделения использовали элюцию из агарозного геля и очистку ДНК при помощи набора фирмы Цитокин. Далее клонировали ген *RapA1* в промежуточный вектор pAL-TA, лигирование проводили с помощью Т4 ДНК-лигазы. Трансформировали ген *RapA1* в компетентные клетки *E.coli* XL1-Blue и выращивали их на среде LB с добавлением ампициллина. Наличие гена RapA1 у клонов проверяли с помощью ПЦР анализа. Результаты были положительными. Далее провели клонирование гена *RapA1* в плазмиду pJN105TurboGFP, порезанную по BamHI и HindIII, чтобы удалить ген флюоресцентного белка GFP и на его место поставить ген RapA1 под PT5 промотр. Электропорировали различные штаммы ризобий, получили положительные клоны, содержащие плазмиду pJN105TurboRapA1. Далее влияние белка *RapA1* на адгезию будет изучаться на бактериях и растениях.

Таким образом, были подобраны специфические олигонуклеотидные праймеры, подобраны оптимальные условия для ПЦР анализа. С помощью них был обнаружен ген соответствующий гену *RapA1* белка бактерий, он был клонирован в плазмиду pJN105TurboGFP для дальнейшего его изучения.

В дальнейшем предполагается получение растений, трансгенных по генам бактериальных адгезинов, исследование возможности и характера колонизации ризосферы трансгенных по генам агглютининов растений флуоресцентно мечеными штаммами клубеньковых бактерий.

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ЛЬНА-ДОЛГУНЦА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ.

Королев К.П.

Республиканское научное дочернее унитарное предприятие «Институт льна» лаборатория селекции льна-долгунца, Республика Беларусь, Витебская область, Оршанский р-н, аг. Устье 211003

E-mail: kst-2011@tut.by

Создание и внедрение в производство высокоурожайных сортов с хорошими показателями качества производимой продукции, является важнейшей задачей

селекционеров Республики Беларусь, однако использование традиционных методов селекции не позволяет в полном объеме решить поставленные задачи, что требует поиска новых приемов, одним из которых является применение биотехнологии.

Под биотехнологией следует рассматривать науку о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использование биотехнологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения [2, с. 304]. Клеточная инженерия в сочетании с микробиологическим синтезом и широким набором методов биоорганической химии и инженерии. является основой современной биотехнологии.

Последние годы XX века характеризовались развитием биотехнологии, основанной на современных достижениях молекулярной биологии и генетики. Благодаря разработке приемов выделения наследственного материала (ДНК), его изучения и создания новых комбинаций, осуществляемых вне клетки, перенесению этих генетических конструкций в живые организмы появилась возможность создавать сорта растений, обладающие высокой и стабильной урожайностью, с устойчивостью к вредным объектам и факторам абиотического стресса.

В основе селекционного процесса, находится, прежде всего, поиск оптимального сочетания в одном организме генов, полученных от разных родительских форм, с этой целью проводится гибридизация различных сортов или линий одного вида, обладающих различными ценными признаками. Чем выше генетическая изменчивость внутри вида, тем больше возрастает эффективность скрещивания.

В связи с этим в селекции получили распространение подходы, направленные на расширение генетического разнообразия вида c помошью различных биотехнологических методов: культуры in vitro и пыльников, соматической использованием гибридизации, также генетической инженерии экспериментального мутагенеза. При применении индуцированного мутагенеза растения подвергается воздействию факторов вызывающие различные изменения в структуре ДНК: радиационное облучение, использование различных химических веществ лучи лазера, обладающих мутагенной активностью. С его применением получены такие сорта льна долгунца как М-12 и Василек, селекции Института льна [3, c.71-731.

Одним из приоритетных направлений в селекции льна долгунца, являются методы, основанные на культивировании изолированных клеток и тканей растений, в том числе соматическая гибридизация путем слияния протопластов, культура пыльников и микроспор.

Разработка приемов культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений на искусственной питательной среде в регулируемых асептических условиях вне организма (культура in vitro), создает предпосылки для использования его в селекции льна-долгунца. Получение таких результатов является возможным благодаря способности растительных клеток формировать целое растение из единичной клетки в результате регенерации. Ткани различных органов растений являются объектами клеточной инженерии, которые служат для получения каллуса, суспензии клеток или протопластов.

Суспензии клеток льна широко применяют для биохимических исследований благодаря их гомогенной природе и скорости размножения, кроме того суспензионные клеточные культуры используют для изучения биосинтезов пектинов льна, а также активности ряда ферментов. Выращивание *in vitro* пыльников и микроспор у льна применяется для получения гаплоидного материала и гомозиготных линий.

По результатам проведенных исследований Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси [1,с.282], можно говорить об эффективности использования культуры in vitro, методов агробактериальной и биобаллистической

трансформации, которые необходимо использовать в различных селекционных программах

Эффективность генетической трансформации в большей степени имеет генотипическую обусловленность и способность к регенерации целого растения из различных органов и тканей, что необходимо учитывать в селекционном процессе.

Сочетание различных биотехнологических приемов, наряду с традиционными подходами в селекции, дает возможность не только получать новый исходный материал, обладающий комплексом хозяйственно-ценных признаков, но и значительно сократить период создания новых сортов льна-долгунца.

Литература:

- 1. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 2. Частная генетика растений / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева.- Мн.: Беларуская навука, 2010.-579 с.
- 2. Картель Н.А, Кильчевский А.В. Биотехнология в растениеводстве: учебник / Н.А. Картель, А.В. Кильчевский.- Мн.: Тэхналогия, 2005.- 310 с.
- 3. Лен Беларуси: монография / ред. И.А. Голуб.- Мн.: ЧУП Орех , 2003.-245 с.
 - 4. Поляков А.В. Биотехнология в селекции льна.- Тверь, 2000.- 180 с.
- 5. Титок В.В., Юренкова С.И., Леонтьев В.Н. Биотехнологические исследования льна культурного (Linum usitatissimum L.) // Тр. БГУ. Сер. физиол., биохим. И молек. Основы функц. Биосистем.- 2008 .- Т.3, ч.2 .- с. 158-173.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ

Мима К.А., Бурмакина Г.С., Титов И.А., Малоголовкин А.С.

ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, Владимирская область 601120, г. Покров E-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru

Африканская чума свиней (AЧС)- контагиозная, как правило, остро протекающая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью до 100%. Эффективных вакцин против АЧС не разработано.

На основе технологий рекомбинантных ДНК разработаны системы экспрессии вирусных генов в E.coli, бакуловирсах, растениях, дрожжах, позволяющие охарактеризовать функции и свойства возбудителя, а также изучить механизмы вирусклеточных взаимодействий. Наибольший интерес представляют поверхностные (мембранные) белки вируса АЧС, активно участвующие в формирование адаптивного иммунного ответа.

Целью данной работы являлось получение рекомбинантых гликопротеинов вируса АЧС и изучение их функций *invitro*.

По данным Chapmanetal, 2009 и Vlasovaetal,2011 ген E183L, кодирующий мембранный гликопротеин вируса р54 и ген EP402R, трансмембранный аналог фактора связывания лимфоцитов CD2v, являются наиболее вариабельными среди изолятов вируса АЧС. С целью получения полноразмерных копий выбранных генов (E183L, EP402R) были разработаны специфические олигонуклеотидные праймеры, несущие сайты рестрикции для клонирования в состав плазмидного вектора. ОРФ для белка р54 была соединена с репортерным геном EGFP под контролем цитомегаловирусного промотера. Для белка

CD2v во избежание возникновения структурных изменений была выбрана стратегия слияния с маркерным НА (YPYDVPDYA) участком на C-конце. Рекомбинатные плазмиды использовали для трансфекции клеточной линии HEK-293 и COS-1. Скрининг рекомбинантных клонов проводили с учетом репортерной флюореценции (для р54) и по результатам иммунофлюоресценции с анти-НА антителами для CD2v. Наличие рекомбинантных белков также подтверждали иммуноблотом со специфическими сыворотками к вирусу АЧС.

Согласно полученным результатам рекомбинантные белки р54 и CD2v вируса АЧС являются сильногликозилированными. Молекулярная масса белка р54 составила приблизительно 60 кДа (при расчетной 19 кДа), а для белка CD2v около 90 кДа (65 кДа предсказанная). Таким образом, углеводный компонент поверхностных гликопротеинов вируса АЧС составляет более 30 % от массы всего гликопротеина. Несмотря на высокую изменчивость гена E183L (р54), рекомбинантный гликопротеин взаимодействовал соспецифическими сыворотками вируса АЧС различных серогрупп. В связи с чем, дальнейшие исследования необходимы для изучения роли р54 в фенотипической изменчивости вируса АЧС. Интересно, что по данным иммуноблота белок CD2vпредставлен двумя формами (25 кДа и 90 кДа), что указывает на многоступенчатость процесса гликозилирования белка в клетке. Следующим этапом работ будет изучение уровня гликозилирования гликопротеина CD2v вируса АЧС и функций отдельных компонентов процессинга белка в формировании иммунного ответа.

ВЛИЯНИЕ ОСВЕЩЕНИЯ ЛАМПАМИ С ПОВЫШЕННОЙ ДОЛЕЙ КРАСНОГО СВЕТА В СВЕТОВОМ ПОТОКЕ НА ВОЗМОЖНОЕ ПОВЫШЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА РАЗМНОЖЕНИЯ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ И ГРУШИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Бъядовский И.А.

Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства Россельхозакадемии, Отдел биотехнологии и защиты растений, 115598 Россия, г. Москва ул. E-mail: vstisp@ystisp.org

ведущее место по Семечковые культуры занимают объему промышленного производства плодов в северном полушарии. Это обуславливает интерес к закладке и восстановлению садов современными и районированными сортами, с качественными характеристиками новыми И возможностями. Актуальным остается создание оздоровленных коллекций и закладка маточников подвоев плодовых культур, что может значительно повысить биологический культивируемых сортов. Остается проблематичным потенциал высококачественного однородного безвирусного материала в необходимых количествах для закладки маточников. Данную потребность может решить метод клонального микроразмножения растений за счет высокого коэффициента размножения, получения максимального числа растений с единицы площади, возможности длительного хранения. На этапе пролиферации получают необходимое количество микропобегов для последующего укоренения и адаптации к нестерильным условиям. Известно, что чем выше коэффициент размножения на этапе пролиферации, тем меньше время необходимое для получения нужного количества микропобегов и выше эффективность.

В работе были взяты следующие формы клоновых подвоев яблони: 62-396, 54-118, 57-490, М 26, ММ106, а также подвой груши Березка. На этапе пролиферации в культуре *in vitro* была изучена возможность повышения коэффициента размножения клоновых

подвоев яблони и груши при их освещении лампами с повышенным содержанием красного света в световом потоке. Исследования проводились в течение двух субкультивирований при следующих условиях: температура $20...24^{0}$ С, освещенность 2500-3500 лк (80-86 мМоль/м²*сек¹), которая создавалась лампами люминесцентными белого света – ЛД 40-2 (765) и лампами с повышенным содержанием красного света в световом потоке – Osram Fluora, ЛФ 40-4 и светильниками ОЛБ 05-180, при 15-ти часовом фотопериоде.

Применение ламп с повышенным содержанием красного света в световом потоке: Osram Fluora, ЛФ 40-4 и светильников ОЛБ 05-180 позволило повысить коэффициент размножения клоновых подвоев яблони и груши на этапе пролиферации в сравнении с освещением лампами белого света – ЛД 40-2. В процессе исследований отмечено, что микрорастений культивировавшихся при освещении люминесцентными с белым светом на освещение лампами с повышенным содержанием красного света в световом потоке, наблюдается тенденция к увеличению коэффициента размножения. Так при освещении лампами Osram Fluora, наблюдалось повышение коэффициента размножения в 1,1-1,3 раза, ЛФ 40-4 в 1,2-1,5 раза, светильниками ОЛБ 05-180 в 1,1-1,2 раза в сравнении с освещением лампами ЛД 40-2. Данное повышение коэффициента размножения носило достаточно не выровненный характер и отмечено не для всех клоновых подвоев. Вместе с тем в последующем, после пересадки и культивировании, при освещении теми же лампами, что и использовались ранее, отмечено существенное и достоверное повышение коэффициента размножения в сравнении с освещением лампами ЛД 40-2. Так при освещении лампами Osram Fluora отмечено повышение коэффициента размножения в 1,2-1,3 раза, ЛФ 40-4 в 1,2-1,4 раза, светильниками ОЛБ 05-180 в 1,2-1,5 раза в сравнении с освещением лампами ЛД 40-2. Данное повышение коэффициента размножения вероятно, связано с последействием использования на предыдущем пассаже освещения лампами с повышенным процентным содержанием красного света в световом потоке.

В целом анализируя влияние спектрального состава света на коэффициент размножения, можно предположить, что данное повышение возможно связано со снятием апикального доминирования при освещении микрорастений лампами с повышенным содержанием красного света в световом потоке, и как следствием увеличением образования числа боковых побегов. Также можно отметить, что у клоновых подвоев яблони наблюдается сортоспецифичность на этапе пролиферации и прослеживаются определенные тенденции по коэффициенту размножения для каждого из них, так одни клоновые подвои более сильно реагируют на изменение спектрального состава света по сравнению с другими.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОДВИДОВ ЧЕРЕМШИ ALLIUM URSINUM L.

Дзюбан О.В., Грушецкая З.Е., Тихомиров В.Н.

Белорусский Государственный Университет, Минск 220030 E-mail: olja-dz@mail.ru

Allium ursinum L., или черемша, иногда также называемая медвежьим луком, - многолетнее травянистое растение, принадлежащее к роду Allium семейства Луковые(Alliaceae). Распространён в Европе, в том числе на Украине, в Беларуси, на Кавказе. Черемша занесена в Красные книги Брянской, Курской, Ленинградской, Липецкой, Московской, Рязанской, Смоленской областей и Ставропольского края России, а также Беларуси, Латвии, Литвы, Украины. На территории Беларуси этот реликтовый, по

происхождению среднеевропейский вид находится на северо-восточной границе равнинной части ареала. Произрастает черемша по всей территории республики в тенистых широколиственных и широколиственно-еловых лесах, вблизи рек и ручьев, по окраинам болот. На территории Европы данный вид представлен двумя подвидами: *Allium ursinum* subsp. *ucrainicum* [3]. В Беларуси внутривидовая дифференциация черемши не изучалась, хотя по территории республики должна проходить граница распространения этих двух подвидов. Так, к примеру, на территории Украины распространен только subsp. *ucrainicum* [4], тогда как в Литве – только типовой подвид [5].

Несмотря на статус охраняемого, черемша — древнее лекарственное растение, известное ещё германцам, кельтам и римлянам. В растении много аскорбиновой кислоты (в листьях до 0,73%, в луковицах — до 0,10%). В состав эфирного масла черемши входят гликозид аллиин, винилсульфид, тиолы и альдегиды, что обеспечивает фитонцидное действие растения по отношению к возбудителям болезней различной этиологии. Показано, что медвежий лук повышает аппетит, увеличивает секрецию пищеварительных желез, усиливает моторную функцию кишечника. Кроме того, растение обладает противоглистным, бактерицидным, фунгицидным и противоцинготным действием, препятствует накоплению холестерина в крови, стимулирует сердечную деятельность, снижает кровяное давление и способствует нормализации обмена веществ.

Оценить генетический потенциал и его роль в формировании устойчивости современных популяций *Allium ursinum*, имеющих природоохранный статус, позволяет ISSR-анализ. Нами был выбран ISSR-анализ как один из наиболее доступных, быстрых, воспроизводимых и не требующих использования флюоресцентных меток [1]. Он находит применение в селекционной практике, в исследованиях по систематике и происхождению популяций, сортов, видов, при восстановлении исчезающих сортов и видов и сохранении их генетического разнообразия, в судебной экспертизе [2].

По результатам оценки морфологических признаков 89 образцов из различных популяций, вид *Allium ursinum* L. s. l. можно разделить на 2 подвида (subsp. *ursinum* и subsp. *ucrainicum*) по наличию/отсутствию и степени выраженности папилл на цветоножке. Образцы с голой цветоножкой принадлежат к подвиду *Allium ursinum* subsp. *ucrainicum* и распространены главным образом по югу и юго-востоку республики. Образцы, имеющие выраженные папиллы на цветоножках, относят к *Allium ursinum* subsp. *ursinum*; они обнаруживаются в основном по северу и северо-западу страны. На границе ареалов двух подвидов обнаружены промежуточные формы, что свидетельствует о гибридности их происхождения.

Для анализа использовали 7 декамерных ISSR-праймеров (ОДО «Праймтех»), которые давали максимальное число фрагментов амплификации, и индивидуальные растения из пятнадцати популяций. Выделение ДНК и ISSR-ПЦР проводили согласно общепринятым методикам. На основании анализа полиморфизма ПЦР-продуктов были определены генетические дистанции по Nei, и проведен кластерный анализ по алгоритму Neighbor-Joining с помощью программы Treecon. Результаты кластерного анализа представлены на рис. 1.

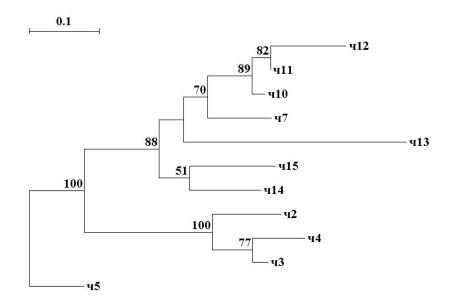


Рисунок 1. Кластерный анализ генотипов *A. ursinum*, принадлежащих разным популяциям. Длина ветвей соответсвует генетическим дистанциям по Nei, вероятность топологии дендрограммы подтверждена значениями bootstrap в узлах кластеров.

Как видно из рисунка 1, представители различных популяций образуют несколько кластеров, очевидными из которых являются кластер (ч5) - А. ursinum из Франции, Соттие Weinbourg; кластер (ч2, ч3, ч4) — морфологический подвид Allium ursinum subsp. ursinum; и большой кластер (ч12, ч11, ч10, ч7, ч13, ч15, ч14), разделяющийся впоследствии на два кластера, где образцы ч14 и ч15 относятся к морфологическому подвиду Allium ursinum subsp. ucrainicum, а остальные образцы имеют промежуточные признаки двух подвидов. Данные молекулярно-генетического анализа коррелируют с морфологическими данными, однако требуют дальнейшего анализа. Таким образом, показано, что ISSR-маркеры являются стабильными и четко воспроизводимыми и позволяют выявить высокий уровень полиморфизма, который может служить основой для идентификации генотипов A. ursinum L.

Работа по оценке молекулярно-генетического полиморфизма, а также по тестированию видовой обособленности неясных в систематическом отношении некоторых редких таксонов растений Беларуси с помощью ISSR-маркеров продолжается и поддержана грантом от БРФФИ N 13-124.

Литература:

- 1. Semagn K, Bjornstad, Ndjiondjop MN (2006). An overview of molecular markers for plants. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (25): 2540-2568.
- 2. Сулимова Г. Е., Столповский Ю. А. и др. Перспективы и проблемы использования межмикросателлитных ДНК-маркеров (ISSR-маркеров) в систематике и оценке генетического разнообразия доместицированных видов животных / Молекулярногенетические подходы в таксономии и экологии: тезисы докладов научной конференции /. Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. 128 с.
- 3. Stearn, W.T. Allium L. In: T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters, D.A. Webb (eds.), Flora Europaea 5. Cambridge, 1980. P. 49–69.
- 4. Червона книга України. Рослинний світ/ за ред. Я.П. Дідуха К.: Глобалконсалтинг, 2009. 900 с.
- 5. Karpavičienė, B. Distribution of Allium ursinum L. in Lithuania / B. Karpavičienė // Acta Biol. Univ. daugavp. 2006. Vol. 6, N 1-2. P.117 121.

СООТНЕСЕНИЕ ГРУПП СЦЕПЛЕНИЯ И ФИЗИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ ROSA WICHURANA С ПОМОЩЬЮ TYRAMIDE-FISH И HRM MAPKEPOB

Киров И.В.^{1,2}, Van Laere K.², De Riek J.², De Keyser E.², Хрусталева Л.И.¹

¹ Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Кафедра генетики и биотехнологии, Москва 127550

² Institute for Agricultural and Fisheries Research (ILVO), Plant Sciences Unit, Applied Genetics and Breeding, Caritasstraat 21, 9090 Melle, Belgium E-mail: kirovez@gmail.com

Генетическая карта является важным инструментом в поиске и создании новых маркеров для маркер-опосредованной селекции. Расстояние между маркерами в генетической карте выражены в Сантиморганах (сМ), процентах рекомбинации, и плохо соотносятся с физическим расстоянием на хромосоме, выраженном в парах нуклеотидов. Между тем, знания о физической локализации генов/маркеров на хромосоме относительно центромеры и теломер и о плотности рекомбинации между маркерами (сМ/п.н.) очень важны для более эффективного переноса полезных генов новым сортам культурных растений. Один из способов интегрирования физической и генетической карт состоит в прямой визуализации генов/маркеров, картированных на генетической карте, на физической хромосоме с помощью флуоресцентной in situ гибридизации (FISH). Однако. чувствительность FISH не позволяет рутинно картировать ДНК последовательности меньше 5000 п.н.. Одной из модификаций FISH является Tyramide-FISH, которая обладает большей чувствительностью и сочетает в себе достоинства ферментного флуоресцентного методов детекции сайта гибридизации.

Нами была проведена оптимизация Тугаmide-FISH для хромосом розы (R.wichurana). Оптимизированный протокол Тугаmide-FISH был успешно использован на мелких хромосомах розы для физического картирования фрагментов генов $(1.1-3\ \text{п.н.})$, вовлеченных в устойчивость растений к биотическим (мучнистая роса) и абиотическим (засуха) факторам, а также образовании запаха розы. На гены были разработаны маркеры, основанные на современной HRM (high resolution melting) технологии, позволяющей быстро и эффективно детектировать SNP в консервативной последовательности генов. Было проведено генетическое картирование данных генов и «заякоривание» групп сцепления на физических хромосомах. Сравнение физической локализации данных генов на хромосомах R.wichurana и псевдохромосомах Fragaria vesca выявили возможные реорганизации, возникшие в ходе дивергенции двух видов.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ДРЕЙФ СРЕДИ ВИДОВ РОДА *BRASSICA* L. ПО ГЕНАМ *FAE1*, КОНТРОЛИРУЮЩИМ СИНТЕЗ ЭРУКОВОЙ КИСЛОТЫ У РАПСА.

Щукин Д.В., Грушецкая З.Е.

Белорусский государственный университет, Минск 220030 E-mail: grushetskaya@gmail.com

Масличный рапс, являющийся одновременно культурой пищевого и технического назначения, вместе со второй важнейшей масличной культурой соей занимает 70% мирового производства. Рапс служит не только источником пищевого растительного масла, но и ценным сырьем для получения технических продуктов, а именно, для

производства метиловых и этиловых эфиров жирных кислот рапсового масла (биодизеля). Эруковая кислота является одной из основных жирных кислот рапса, концентрация которой в семенах определяет пригодность сорта на пищевые либо технические цели (I. Badawy et al, 1994). Селекция сортов рапса пищевого назначения направлена на снижение содержания эруковой кислоты в семенах, сорта рапса с высоким ее содержанием могут найти применение в химической промышленности для получения высокотемпературных смазочных материалов, нейлона, пластмассы, мыла, красок, поверхностно-активных веществ.

Генетический дрейф, то есть горизонтальный перенос генов между популяциями, может проходить в двух направлениях. В одном случае дикорастущие растения выступают как источники селекционно-ценных признаков для сельскохозяйственных культур. Однако имеет место и обратный процесс — перенос генов от культурных растений к дикорастущим сородичам, что может представлять опасность для биоценозов в случае, когда переносимые аллели созданы искусственно. Аллели генов, полученных в результате мутагенеза, не встречаются в естественном генофонде, поэтому могут служить маркерами генетического дрейфа. У естественного аллополиплоида рапса B.napus, возникшего в результате гибридизации капусты огородной ($Brassica\ oleracea$, C-геном) и сурепицы ($Brassica\ rapa$, A-геном), содержание эруковой кислоты в семенах контролируется аллелями двух генов FAE1(Fatty Acid Elongation 1) — FAE1.1 (геном A) и FAE1.2 (геном C) (Fourmann M. et al, 1998).

Авторами работы в лаборатории генетики и клеточной инженерии растений Института генетики и цитологии НАН Беларуси разработаны и запатентованы ПЦР-маркеры к А и С-геномам рапса, позволяющие идентифицировать все известные в настоящее время мутации генов *FAE1*, приводящие к нарушению синтеза эруковой кислоты (Грушецкая З.Е. и др., 2012). Поскольку аллели генов, определяющие низкий уровень синтеза эруковой кислоты, внесены в существующие сорта масличного рапса искусственно, они могут служить уникальными маркерами для оценки уровня перекрёстного опыления и спонтанной гибридизации сортов и гибридов рапса и дикорастущих видов рода *Brassica*.

Для анализа уровня спонтанной гибридизации рапса с видами рода Brassica являющимися естественными источниками генов FAE1 дикого типа, собрана коллекция индивидуальных растений рапса, растущих в естественных биоценозах возле мест прошлогоднего возделывания озимого рапса. Анализ аллельного состояния генов FAE1.1. и FAE1.2, отвечающих за синтез эруковой кислоты в рапсовом масле, показал, что 12 из 14 образцов (85%) являются гетерозиготами как минимум по одному из генов FAE1. На основании полученных данных было сделано заключение о спонтанной гибридизации безэруковых растений рапса с дикорастущими источниками аллелей дикого типа и возможности дрейфа генов, полученных путем химического мутагенеза, в естественные биоценозы.

Литература:

- 1. Biochemical and toxicological studies on the effect of high and low erucic acid rapeseed oil on rats / I. Badawy, B. Atta, W. Ahmed // Nahrung. 1994. V. 38. P. 402-411.
- 2. Fourmann M. et al. The two genes homologous to *Arabidopsis FAE1* cosegregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. // *Theor Appl Genet*. 1998. V.96. P.852-858.
- 3. Грушецкая З.Е., Лемеш В.А., Мозгова Г.В., Пилюк Я.Э., Бакановская А.В. "Способ идентификации генов FAE1.1, контролирующих содержание эруковой кислоты в масле семян рапса, с помощью dCAPS-маркеров", 2012. Патент РФ № 2486254.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА МОРФОГЕНЕЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ ГОРЧИЦЫ САРЕПТСКОЙ (BRASSICA JUNCEA)

Нгуен Тхань Хай¹, Калашникова² Е.А.

¹- Ханойский сельскохозяйственный университет, Вьетнам, г. Ханой E-mail: <u>thai1999@mail.ru</u>

²- Российский государственный аграрный университет - MCXA имени К.А. Тимирязева, Москва 127550, кафедра генетики и биотехнологии E-mail: kalash0407@mail.ru

Род *Brassica* включает несколько очень важных для сельского хозяйства видов. Один из них - *Brassica juncea* является одной из основных масличных сельскохозяйственных культур. Из ее семян получают высококачественное пищевое масло, которое широко используется в пищевых, медицинских и технических целях. Данную культуру широко возделывают не только в России, но и во многих областях Вьетнама, особенно в регионе Донь Ды. Однако для постоянно растущего населения Вьетнама необходимо иметь высококачественные семена улучшенных сортов. Поэтому во Вьетнаме постоянно проводится селекционная работа по создание сортов, обладающих устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды.

Одним из путей ускорения селекционного процесса является включение в процесс классической селекции методов клеточной биотехнологии. К таким методам относится метод андрогенеза - получение растения из микроспор в культуре изолированных пыльников и микроспор. Данный метод является наиболее распространенным методом для создания гомозиготных линий у многих видов *Brassica*. Однако этот процесс зависит от ряда взаимосвязанных факторов, каждый из которых оказывает свое влияние на морфогенетические процессы при культивировании изолированных пыльников и микроспор *in vitro*.

Объектом исследования служили пыльники горчицы (*Brassica juncea*), изолированные с растений выращенные в теплице кафедры биотехнологии Хайнойского сельскохозайственого университета.

В экспериментах исследовали влияние состава питательной среды по минеральному и гормональному составу на процесс эмбриогенеза *in vitro*. В качестве минеральной основы изучали соли по прописи Мурасига и Скуга (МС), Гамборга (B_5) и Нича (N_6). В качестве регуляторов роста в состав этих питательных сред входили НУК и кинетин в концентрациях 1мг/л, а так же сахароза и агар в концентрации 3% и 0,8%, соответственно. Было изучено влияние веществ цтокининового типа действия – БАП и кинетин (0,5-2 мг/л) в сочетании с ауксинами НУК, 2,4-Д (0,5-1,0 мг/л) на процессы морфогенеза.

В результате исследований установлено, что оптимальной средой для культивирования пыльников была среда, содержащая минеральные соли по прописи Гамбурга. В этих условиях микроспоры внутри пыльника сохраняли свою жизнеспособность на протяжении длительного их выращивания в условиях *in vitro*. Кроме того, было отмечено в 30,7% случаев формирование каллусной ткани и в 1,0% случаев – эмбриоидов. В других средах процесс эмбриогенеза нами не был отмечен, а процесс каллусогенеза составил не более 15%. Присутствие в составе питательной среды кинетина в концентрации 1,0 мг/л в сочетании с НУК 0,5 мг/л приводило к уменьшению процесса каллусогенеза, но при этом частота эмбриогенеза возрастала и составила 2,33 %.

ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА

Шайдуллин Р.Р., Ганиев А.С.

Казанский государственный аграрный университет, г. Казань 420011 E-mail:tppi-kgau@bk.ru

Для получения высоких результатов в молочном скотоводстве необходимо учитывать опыт передовых стран, который свидетельствует о важности селекции коров по белковомолочности, так как это во многом определяет пищевую ценность молока и его технологические свойства. В связи с возрастающими требованиями рынка к качеству молочной продукции, в частности к количеству и составу молочного белка, а также к сыродельным характеристикам молока, возникает насущная необходимость в выявлении и использовании в селекции генетических маркеров, связанных с качественными признаками молочной продуктивности.

Одним из таких маркеров считается тестирование животных по локусу гена каппаказеина. Во многих странах мира, например, Германии, Дании, Голландии, селекция на генотипы каппа-казеина включена в программы по разведению крупного рогатого скота.

Ген белка каппа-казеина является одним из немногих известных генов, однозначно связанных с признаками белковомолочности и технологических свойств молока. Структура каппа-казеина контролируется одним полиморфным геном, расположенным в 6 хромосоме генома крупного рогатого скота.

Генетические варианты A и B наиболее распространены. Они присутствуют у всех пород скота с различной частотой, а остальные аллели являются редкими. Варианты каппа-казеина A и B различаются двумя аминокислотными заменами (Thr $136 \rightarrow$ Iso и Asp $148 \rightarrow$ Ala) и вызваны соответствующими точковыми мутациями в позициях 5309 (C \rightarrow T) и 5345 (A \rightarrow C) в нуклеотидной последовательности гена.

Ген каппа-казеина имеет генотипы CSN3^{AA}, CSN3^{AB}, CSN3^{BB}. По данным различных исследователей, В-аллель гена каппа-казеина указывает на более высокое содержание белка в молоке, более высокий выход творога и сыра, а также лучшие коагуляционные свойства молока.

Молочные белки в большей степени являются породными и индивидуальногенетическими признаками крупного рогатого скота, поэтому выявление маркеров белковомолочности (каппа-казеина) в геноме животных существенно ускоряет ведение селекции и создание стада коров с высоким содержанием в молоке белков, важных при приготовлении сыров и творога.

Нами осуществлены исследования по поиску нуклеотидных последовательностей гена каппа-казеина (CSN3) по базам данных нуклеотидных последовательностей генов NCBI на сайте http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Анализ найденных нуклеотидных последовательностей гена каппа-казеина с целью определения специфичных пар праймеров к вышеуказанному гену произведен с помощью пакета программного обеспечения Vector NTI 9.0. В частности, с помощью данного программного пакета установлены нуклеотидный состав, особенности третичной структуры (наличие димеров, «шпилек» и палиндромов) и термодинамические свойства вышеуказанных праймеров.

В базах данных нуклеотидных последовательностей NCBI была найдена нуклеотидная последовательность гена каппа-казеина:

Bovine kappa-casein (B2 variant) mRNA, complete cds

GenBank: M36641.1

1 tggaaaggcc aactgaacct actgccaagc aagagctgac ggtcacaagg aaaggtgcaa

- 61 tgatgaagag ttttttccta gttgtgacta tcctagcatt aaccctgcca tttttgggtg
- 121 cccaagagca aaaccaagaa caaccaatac gctgtgagaa agatgaaaga ttcttcagtg
- 181 acaaaatagc caaatatatc ccaatccagt atgtgctgag taggtatcct agttatggac
- 241 tcaattacta ccaacagaaa ccagttgcac taattaataa tcaatttctg ccatacccat
- 301 attatgcaaa gccagctgca gttaggtcac ctgcccaaat tcttcaatgg caagttttgt
- 361 caaatactgt geetgeeaag teetgeeaag eecageeaac eaceatggea egteaceeac
- 421 acceacattt atcatttatg gccattccac caaagaaaaa tcaggataaa acagaaatcc
- 481 ctaccatcaa taccattgct agtggtgagc ctacaagtac acctaccatc gaagcagtag
- 541 agageactgt agetaeteta gaagettete eagaagttae tgagageeea eetgagatea
- 601 acacagteca agttaettea acegeggtet aaataeteta aggagacate aaagaagaca
- 661 acgcagattt agetgaaact aaatgactac ttcaaacttt cetttggeca gttgtetgec
- 721 tteagtgaac agagaatatg atttteacag ateeggetee tttetegtet eetettacat
- 781 tttactttta tgccagattt agttttttga ttcctgcata ataaagccaa tcaaatgc

На основании нуклеотидной последовательности гена CSN3 был выбран участок гена в 453 пар нуклеотидов. К нему с помощью пакета программного обеспечения Vector NTI 9.0 были подобраны специфичные прямой и обратный праймер:

- 1. прямой праймер 5□-TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG-3□;
- 2. обратный праймер 5□-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3□.

<u>Анализ прямого праймера к гену CSN3 с помощью программного пакета Vector NTI 9.0</u>

********* Oligo Analysis: Vector NTI******

Oligonucleotide (DNA): Length: 27

TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG

Анализ обратного праймера к гену CSN3 с помощью программного пакета Vector NTI 9.0

********** Oligo Analysis: Vector NTI******

Oligonucleotide (DNA): Length: 27

GCGTTGTCTTCTTTGATGTCTCCTTAG

Таким образом, исходя из выше изложенного, можно сделать следующий вывод, что для определения генетического потенциала наследуемости белковомолочности наиболее предпочтительным является изучение аллельного полиморфизма гена основного молочного белка каппа-казеина.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ЦИСТЕИНА НА ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ *LIGULARIA GLAUCA* (L.) J. HOFFM. И *L. SIBIRICA* (CASS.)

Дзвинчук М.Д., Шелифост А.Е.

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича Институт биологии, химии и биоресурсов, кафедра биохимии и биотехнологии, г. Черновцы. E-mail: <u>mariya.dzvinchuk@mail.ru</u>

Одним из современных методов культивирования растений является культура *in vitro*, особенность которой — выращивание растений в стерильных условиях на искусственно подобранных питательных средах. Данный метод приобрел особое значение при работе с редкими и исчезающими видами в связи с возможностью увеличения

численности их природных популяций. Однако перенесение растений в такие условия часто сопряжено с развитием стрессовой реакции, одним из проявлений которой является интенсификация окислительных процессов. Окисление тканей растений могут развиватся как на этапе их стерилизации, так и непосредственно на этапе культивирования.

Свободные радикалы, образующиеся в результате клеточной жизнедеятельности, являются метаболически активными веществами, нарушающими обмен веществ. В растениях, в связи с их существованием в условиях кислородной атмосферы, а также в связи с фотосинтетической активностью, связанной с продукцией активных форм кислорода, сформировалась сложная система антиоксидантной защиты, состоящая из ферментативных и неферментативных компонентов. В частности, ферментативные антиоксиданты представлены пероксидазой, полифенолоксидазой и каталазой.

Полифенолоксидаза — металлоэнзим, содержащий биядерные центры меди, которые используют молекулярный кислород для катализа окисления фенольных соединений в ходе одной или двух реакций. Так, при окислении о-дифенола, а также моно-, три- и полифенолов образуются соответствующие хиноны. Акцептором водорода в этих реакциях служит молекулярный кислород. Другим, не менее важным компонентом ферментативной цепи антиоксидантной защиты, является пероксидаза, проявляющая широкую субстратную специфичность и катализирующая окисление большого числа органических соединений за счет разрушения перекиси водорода. Одновременно с этими ферментами в клетке функционирует каталаза, разрушающая ту часть перекиси водорода, которую не в состоянии инактивировать пероксидаза.

Именно интенсивное окисление тканей эксплантов оказалось наиболее сложной преградой при введении в культуру *in vitro L. glauca* и *L. sibirica*. Кроме этого, существенно интенсифицировались окислительные процессы непосредственно на этапе микроклонального размножения эксплантов. Преодолеть их развитие удалось за счет использования на этапе стерилизации семян стерильных растворов аскорбиновой кислоты, а также введения в состав питательных сред цистеина.

При изучении ферментативной активности полифенолоксидазы, пероксидазы и каталазы эксплантов, культивируемых на средах, содержащих 60 мг/л цистеина и без него, было обнаружено, что наиболее сильно реагирует на изменение условий культивирования полифенолоксидаза. Причем выявленные изменения носили противоположный характер. Так, несмотря на близкие значения при культивировании в присутствии экзогенного цистеина (поскольку происходило эффективное размножение экспланов, условия приняты за нормальные), без него происходило десятикратное снижение полифенолоксидазной активности у *L. glauca* и повышение в 2,5 раза у *L. sibirica*.

В связи с тем, что особую роль в способности растений адаптироваться к условиям существования играет полиморфизм ферментов, целью наших исследований было изучить спектр изоформ полифенолоксидазы *L. glauca* и *L. sibirica*, культивируемых на средах, содержащих цистеин и без него. Электрофорез проводили в нативных условиях с использованием 4 % концентрирующего (С 3 %) и 12 % разделяющего (С 4 %) гелей, в качестве электродного буфера использовали трис-глициновый буфер рН 8,3. Для идентификации фермента гели инкубировали в 0,1 % L-ДОФА в натрий-фосфатном буфере рН 7,0.

При сопоставлении полученных электрофореграмм было обнаружено, что спектр изоформ полифенолоксидазы L. glauca представлен девятью компонентами. Семь из них характеры для обоих видов. Компонент с Rf 0.39 идентифицируется только при выращивании эксплантов на цистеине, тогда как на среде без него появляется компонент с Rf 0.35. Особого внимания заслуживает изоформа с Rf 0.25, поскольку наблюдается значительное увеличение интенсивности ее окрашивания на электрофореграмме белков эксплантов, культивируемых без антиоксиданта. Можно предположить, что это происходит за счет выхода из связанного состояния «скрытой формы» фермента, что свойственно видам, обладающим повышеной стойкостью к влиянию стрессовых

факторов.

Спектр полифенолоксидаз L. sibirica представлен шестью компонентами. Четыре из них (Rf 0.57, 0.78, 0.83, 0.90) обнаружены на электрофореграмме второго изучаемого вида. Эти компоненты присутствуют во всех исследуемых белковых препаратах. При отсутствии в среде роста экзогенного цистеина у L. sibirica также идентифицирован компонент с Rf 0.25, представленный, однако, слабовыраженной полосой. Он не выявляется в белковом препарате эксплантов, культивируемых в присутствии цистеина. В то же время на электрофореграмме идентифицируются компоненты с Rf 0.39 и 0.65, характерные L. glauca. Это позволяет предположить их особую участь в защите тканей эксплантов обоих исследуемых видов от окисления при выращивании in vitro.

На основании обобщения полученных нами результатов относительно изменений активностей полифенолоксидазы, пероксидазы и каталазы L. glauca и L. sibirica с результатами изучения электрофоретических спектров их полифенолоксидазы, можно утверждать, что L. sibirica обладает большим приспособительным потенциалом к влиянию стрессовых факторов условий существования, что может быть причиной существующей угрозы исчезновения L. glauca.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РОДА *LINUM*

Мельникова Н.В., Беленикин М.С., Кудрявцева А.В.

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва 119991. E-mail: mnv-4529264@yandex.ru

Род *Linum* включает более 180 видов, распространенных преимущественно в умеренных и субтропических зонах. Наибольшее значение для сельского хозяйства представляет вид *Linum usitatissimum* L. Лен — долгунец используется в текстильной промышленности, для производства полимеров и нетканых материалов. Масличный лен является источником пищевых растительных жиров, используется в медицине, а также для производства олифы и красок. Для сохранения биоразнообразия и его эффективного использования в селекции необходима оценка генетического полиморфизма культурного льна и его дикорастущих сородичей. Молекулярные маркеры являются мощным инструментом для изучения разнообразия и тенденций его изменения. Для генетических маркеров, основанных на использовании ретротранспозонов, характерна хорошая воспроизводимость результатов, высокий полиморфизм и меньшая трудоемкость анализа по сравнению с другими высокоинформативными маркерными системами Их многочисленные преимущества открывают широкие возможности для использования этих маркеров в исследованиях растений.

Впервые использован SSAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism) анализ (Waugh et al., 1997) для исследования 46 сортов льна преимущественно российской селекции, а также 48 видов рода Linum. Метод основан на амплификации ДНК между консервативным участком ретротранспозона и ближайшем сайтом рестрикции сайтспецифичной рестриктазы. Проведена оценка полиморфизма инсерций ретротранспозонов льна FL1a, FL1b, Cassandra, FL11, FL9. Показана высокая воспроизводимость SSAP анализа. Для ретротранспозонов FL1a, FL1b, Cassandra среди сортов не было выявлено высокого полиморфизма, однако эти транспозоны были эффективны при исследовании межвидового разнообразия.

При исследовании межсортового разнообразия L. *usitatissimum* была обнаружена 21 полиморфная инсерция для ретротранспозона FL9 и 23 - для FL11. Совместное использование двух праймеров для этих ретротранспозонов позволило выявить

достаточное число полиморфных SSAP маркеров для идентификации 46 сортов льна. Это свидетельствует о возможности применения SSAP для маркирования льна, идентификации образцов в коллекциях генетических банков и контроля семенной чистоты при размножении сортов. Также возможна оценка генетической близости отдельных сортов, что может найти применение при выборе родительских пар для скрещиваний, сделать селекционный процесс более обоснованным и помочь создавать сорта с высокими хозяйственными характеристиками.

Для исследования межвидового разнообразия 22 видов секций Linum, Adenolinum и Dasylinum использовались два праймера к ретротранспозонам FL1a, FL1b и Cassandra. Всего были обнаружены 223 полиморфные инсерции. SSAP спектры значительно различались у представителей разных секций, были найдены видоспецифичные SSAP маркеры. Выделились 9 групп образцов: 1 включала представителей секции Adenolinum; 2 - L. hirsutum, 3 - L. hirsutum pseudoanatolicum и L. hirsutum anatolicum; 4 - L. marginale, 5 - L. narbonense; 6 - L. decumbens, 7 - L. grandiflorum, 8 - L. angustifolium, L. biene, L crepitans и L usitatissimum; 9 - L. stelleroides. Таким образом метод SSAP может быть использован для филогенетических исследований рода Linum и для определения принадлежности образца к виду или секции.

Важным фактором формирования генетического полиморфизма растений является их адаптация к воздействиям окружающей среды. Одно из требований, предъявляемых к современным сортам льна-долгунца - повышение их адаптивного потенциала. Решение этой задачи невозможно без понимания механизмов, задействованных в ответных реакциях растений на стрессовые воздействия. МикроРНК (миРНК) играют важную роль в регуляции биологических процессов и представляют собой однонитевые РНК длиной около 21-24 нуклеотидов, которые негативно регулируют экспрессию генов путем специфического связывания с целевой мРНК и ее расщепления или ингибирования трансляции (Jones-Rhoades, 2006). Нами впервые секвенированы малые РНК льна, выращенного в оптимальных условия и в условиях недостаточного / избыточного питания. Всего идентифицировано 95 консервативных миРНК, принадлежащих к 22 различным семействам. Показана дифференциальная экспрессия lus-miR395a, lus-miR395e при выращивании льна в условиях избыточного питания по сравнению с нормой. Данные подтверждены методом количественной ПЦР в режиме реального времени на расширенной выборке образцов. miR395 играет важную роль в метаболизме сульфатов. В нашем исследовании при избыточном внесении удобрений, в том числе сульфатов, наблюдалось повышение уровня экспрессии miR395, мишенями которой являются гены сульфатредуктазы и аденилилтрансферазы, участвующие в метаболизме серы.

В условиях недостатка удобрений показана дифференциальная экспрессия lusmiR399h, lus-miR408a и lus-miR398d. miR398 участвует в поддержании гомеостаза питательных веществ у растений, включая регуляцию неорганического фосфата. Мы показали, что у льна при недостатке фосфата уровень экспрессии miR398 снижается. Также показано повышение экспрессии miR408 у льна при недостатке фосфата. Различные стрессовые воздействия, в том числе недостаток фосфатов, индуцируют повышение уровня экспрессии miR408. miR399 играет важную роль в гомеостазе фосфатов, недостаток которых приводит к повышению ее уровня экспрессии, что приводит к снижению экспрессии целевого гена, кодирующего ubiquitin-conjugating епzуте E2, одного из ключевых элементов реакции убиквитинирования. У льна, как и у других растений, наблюдали повышение уровня экспрессии miR399 при недостатке фосфатов.

Особый интерес представляют уникальные миРНК льна. Нами идентифицированы 156 уникальных потенциальных микроРНК льна. Для ряда из них показана дифференциальная экспрессия в зависимости от условий выращивания. У lus-miR-N1 (AGUAGGCAACGUUCUGGCUCC) уровень экспрессии снижался более чем в 3 раза при выращивании в условиях недостатка фосфатов. Мишенью этой миРНК является ген,

кодирующий ubiquitin-activating enzyme E1. Этот фермент катализирует первый этап реакции убиквитинирования и, таким образом, найденная миРНК может регулировать метаболизм фосфатов.

Мы идентифицировали консервативные и уникальные микроРНК льна и показали их дифференциальную экспрессию в зависимости от условий выращивания. Полученные данные позволят лучше понять процессы, происходящие в растениях при стрессовых воздействиях, и механизмы адаптации к неблагоприятным условиям. Такая информация может быть использована в селекции при создании сортов льна, адаптивных к стрессовым факторам, а также помочь более эффективно использовать существующее генетическое разнообразие. Идентификация новых миРНК льна может помочь в изучении роли малых РНК растений в регуляции биологических процессов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 12-04-01469-а и МК-6205.2012.4.

АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКАХ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ДИКОГО ТИПА И С ВВЕДЕННЫМ ГЕНОМ ИНВЕРТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Синькевич М.С.

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия, Москва 127276. E-mail: sinkevich m@mail.ru

Как известно, для теплолюбивых растений окислительный стресс при гипотермии – один из важных факторов повреждения, тогда как холодостойкие растения при тех же температурах не демонстрируют существенного повышения интенсивности окислительных процессов, что обычно объясняется более эффективной антиоксидантной системой. Предварительно нами было выявлено, что типичный представитель холодостойких растений – картофель (*Solanum tuberosum* L. cv. Désireé) с повышенным, вследствие трансформации геном инвертазы дрожжей, содержанием сахаров обладал большей устойчивостью к окислительному стрессу, чем аналогичные контрольные растения того же сорта. Растения выращивали в культуре in vitro до 42-дневного возраста и индуцировали окислительный стресс, помещая на различные промежутки времени в условия пониженной температуры (без образования льда).

Действие охлаждения продемонстрировало, что интенсивность перекисного окисления липидов у растений с введенным геном инвертазы дрожжей была ниже, чем у контрольных нетрансформированных растений. При этом, скорость образования активных форм кислорода была, наоборот, выше, что подтверждает предположение о более эффективной антиоксидантной системе модифицированных растений. В ходе экспериментов выявились различия в активностях многих ключевых ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидаз разных типов. Между трансформированными и контрольными растениями наблюдаются различия не только в уровне активностей таких ферментов как супероксиддисмутаза, но и в их изоферментном спектре, в котором доля активности устойчивых к стрессу изоформ очень важна.

Кроме изменения активностей ключевых антиоксидантных ферментов, в нашей работе учитывается, что сахара в условиях стресса полифункциональны, и среди их функций имеется антиоксидантная. Данный факт также сказывался на эффективности антиоксидантной системы обогащенных сахарами растений, поскольку возрастала общая антиоксидантная способность низкомолекулярной составляющей.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что комплексные сведения об активности антиоксидантных ферментов, а также о содержании сахаров, могут служить удобными маркерами селекции более устойчивых сортов растений и не менее удобными целями для генно-инженерных модификаций.

ИССЛЕДОВАНИЕ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И РНК-ШАПЕРОННОЙ АКТИВНОСТЕЙ БЕЛКОВ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА THELUNGIELLA SALSUGINEA

Злобин Н. Е, Таранов В. В.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии PACXH, Москва 127550

E-mail: orbbbb@yandex.com

В растении *Thellungiella salsuginea*, обладающем повышенной устойчивостью к абиотическому стрессу, нами обнаружено 4 гена, кодирующие белки с доменом холодового шока TsCSDP1-4. Основное отличие между белками заключается в разном количестве цинковых пальцев (ZnF) ССНС типа, локализованных в С-концевой части белка (6 ZnF – TsCSD1, 2 ZnF – TsCSDP2, 7-TsCSDP3). Существуют экспериментальные свидетельства, подтверждающие участие CSDP в стрессоустойчивости и развитии как *Thellungiella salsuginea*, так и ряда других растений. CSDP относятся к PHK-связывающим белкам и есть основания для предположения, что их PHK-шаперонная активность лежит в основе молекулярного механизма их действия. Показано в тесте по комлиментации роста мутантных бактерий ВХО4 при пониженной температуре, что PHK-шаперонная активность доменов холодового шока у идентифицированных нами белков обусловлена особенностями аминокислотной последовательности N-концевой части CSD.

Используя технологию Halo-Tag фирмы (Промега), получены рекомбинантные белки TsCSDP1-3 и их домены холодового шока. Исследованы PHK-связывающая и PHK-шаперонная способности рекомбинантных белков. PHK-связывающую активность оценивали путем измерения флуоресценции триптофана белков при взаимодействии с ними олигоРНК. PHK-шаперонную активность CSDP определяли путем измерения возрастания флуоресценции при плавлении шпилечной структуры олигоРНК. Показано, что PHK-шаперонная активность белков более чем на порядок выше аналогичной активности их доменов холодового шока, тогда как PHK-связывающая активность была приблизительно одинакова.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МЯСА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Минаев М.Ю.¹ Букина Е.Ю.²

¹ ГНУ ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии Москва,109316

E-mail: <u>mminaev@inbox.ru</u>

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва 127550 E-mail: biolenok@yandex.ru

В настоящее время особенно остро стоит вопрос о проверке качества мясной продукции как среди населения, так и для специалистов в области мясной промышленности. В связи с этим возросла необходимость увеличить достоверность методов определения видовой принадлежности и состава мясных фаршированных продуктов. Фальсификация мяса может привести к изменениям свойств готовых изделий а также создать опасность для здоровья потребителей. Наибольшее беспокойство у специалистов вызывает возможные замещения мясного сырья в продуктах мясом животных, которые заражены прионами или вирусами, создающими большой риск в эпидемиологическом отношении, а также мясом, импорт которого в нашу страну по каким-либо причинам запрещен.

Используемые в настоящее время для идентификации пищевых продуктов органолептические, химические и гистологические методы позволяют осуществлять контроль качества товара (включая также ветеринарно-санитарный контроль), однако они имеют существенные ограничения в случае идентификации видовой принадлежности мяса и мясных продуктов близкородственных видов. Большие трудности возникают при отсутствии морфологических критериев идентификации или после термической обработки (Гинцбург А.Л. 1999). Видовая детекция обработанных мясопродуктов может быть основана на термостабильных белках, сохранивших нативную конформацию, или отдельных тест-системах для денатурированных белков. Но с помощью данных методов нельзя решить не менее важную задачу, возникающую в практике определения качества мясной продукции - установление видовой принадлежности мясных и растительных ингредиентов. Многие белки-мишени являются ткане-специфичными, в то время как ДНК универсальна и присутствует во всех тканях организма. Так, например, в мясной продукции помимо мышечной ткани также широко используется и соединительная (коллаген содержащие белки).

Наиболее перспективными в плане определения видовой принадлежности являются методы ДНК-диагностики, позволяющие проводить анализ как сырья, так и продукции, подвергнутой термической обработке (Fairbrother K.S., Hopwood A.J., Lockley A.K., Bardsley R.G. 1998). Метод ПЦР в реальном времени зарекомендовал себя на мировом рынке как чувствительный и специфичный. Высокая специфичность данного метода обусловлена тем, что в исследуемом образце выявляется фрагмент ДНК, характерный только для определенного вида животного или растения. Специфичность данного метода задается точным подбором нуклеотидной последовательности праймеров, что исключает получение ложноположительных результатов.

В связи с вышеизложенной в данной работе применялся метод ПЦР с флуоресцентной детекцией материала в режиме реального времени. Целью исследования являлась разработка метода идентификации видовой принадлежности мяса на основе ПЦР в реальном времени.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- 1. Разработать полуколичественный метод на основе ПЦР в реальном времени для идентификации по ДНК биологического материала, принадлежащего КРС, свинье, сельскохозяйственной птице и лошади.
- 2. Подобрать праймеры и зонды с максимальной чувствительностью и специфичностью
- 3. Подобрать соответствующие стандартные образцы для исключения факта фальсификации и недостоверных результатов

В данном исследовании в качестве образцов для проверки специфичности праймеров и зондов были выбраны свиной животный белок, фарш из говядины 1 сорта, сличительный образец на основе куриного мяса. Сначала была выделена ДНК и поставлена серия реакций ПЦР для выявления наиболее специфичной комбинации праймеров и зондов. Детекция проводилась в режиме реального времени с помощью флуоресцентного красителя FAM. В результате были получены смеси праймеров и зондов (СПЗ) для определения видовой определения ДНК таких видов мяса как свинина, мясо крупного рогатого скота (КРС), птицы (курица и индейка), лошадь. На основе перечисленных СПЗ приготовлены соответствующие реакционный смеси, которые также проверены методом ПЦР в реальном времени.

Для получения калибровочных контрольных образцов с известным содержанием ДНК проведено клонирование продуктов ПЦР в плазмиду рGEM. Далее было проведено секвенирование полученного продукта для проверки последовательности. Полученные результаты подтвердили точность встраивания ДНК в плазмиду. Определение концентрации было проведено с помощью спектрофотометрического метода. Далее мы развели полученные плазмиды до концентрации, которая соответствовала 0,1% и 1% целевой ДНК. Эти калибраторы позволят дифференцировать фальсификацию исследуемой продукции от продукции, содержащей технически неустранимую примесь нерегламентированного составом сырья.

Таким образом, была получена полуколичественная тест-система для определения видовой принадлежности мяса методом ПЦР в режиме реального времени. Кроме основной реакции, которая визуально оценивается за счет флуоресцентной краски FAM, параллельно в системе проходит реакция внутреннего положительного контроля (ВПК). Внутренний положительный контроль позволяет исключить ложноотрицательные результаты, т.к. проходит независимо, и визуально оценивается за счет флуоресцентной краски R6G.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В ПШЕНИЦЕ QTL *GPC-B1*, ПЕРЕНЕСЕННОГО ОТ *T. DICOCCOIDES*

Степаненко А.И.¹, Моргун Б.В.¹, Рыбалка А.И.²

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 03680

²Селекционно-генетический институт НААН Украины, Одесса, 65036 E-mail: molgen@icbge.org.ua

Генетическое улучшение параметра содержания белка в зерне является современным перспективным направлением программ селекции пшеницы хлебомакаронного назначения принимая в расчет потенциальный экономический эффект от снижения необходимости внесения дорогостоящих азотных удобрений.

Содержание белка в зерне влияет на качество макаронных изделий и хлеба, а также является важным для питания человека. Потенциальный подход к увеличению этого

параметра в зерне пшеницы заключается в использовании GPC генов от ее диких сородичей. Дикая полба, $Triticum\ turgidum\ ssp.\ dicoccoides$, имеет более высокое содержание белка (170-223 г/кг), чем большинство сортов культурной хлебопекарской пшеницы (110-170 г/кг) и, следовательно, может быть перспективным источником GPC генов [Gerechter-Amitai and Grama, 1977; Avivi, 1978; Grama et al., 1983; Levy and Feldman, 1988; Nevo et al., 2002].

Замена полной хромосомы 6В пшеницы на хромосому *T. dicoccoides* способствовала повышению концентрации белка [*Joppa and Cantrell, 1990*]. Это изменение повысило качество макаронных изделий [*Joppa et al., 1991*] и не привела к значительному уменьшению урожайности или веса зерна [*Cantrell & Joppa, 1991*].

Целью работы был подбор маркерных систем для идентификации *Gpc-B1* от *T. dicoccoides* в ценных селекционных линиях, выращиваемых в Украине, и оценка возможности применения маркерного подхода для анализа гибридного материала.

Для определения локуса Gpc-B1 от T. dicoccoides применяли маркерную систему CAPS на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) к локусу XNor-B2 с использованием праймеров предложенных [$Khan\ et\ al,\ 2000$] с последующим гидролизом рестриктазой BamHI [$Khan\ et\ al,\ 2000$].

Для дополнительной проверки адекватности реакции использовали систему ASA маркеров предложенных [Khan et al, 2000]. На основе данной системы была разработана мультиплексная ПЦР с использованием праймеров к референтному гену актина пшеницы act (GenBank AB181991) [Himi et al, 2011]. Идентификация результатов проводилась с помощью горизонтального электрофореза в 0,8 % агарозном геле. Типичные результаты ПЦР с использованием системы CAPS маркеров приведены на рис. 1.

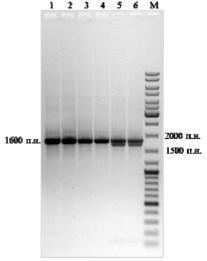


Рисунок 1. Электрофореграмма результатов ПЦР с системой CAPS маркеров к локусу XNor-B2

Дорожки 1-4 — сорта пшеницы, которые не несут Gpc-B1 от T. dicoccoides; 5 — образец пшеницы линии UC 1113, который несет Gpc-B1 от T. dicoccoides; 6 — образец пшеницы линии UC 1041, который несет Gpc-B1 от T. dicoccoides; M — маркер молекулярной массы $GeneRuler^{TM}$ DNA Ladder Mix

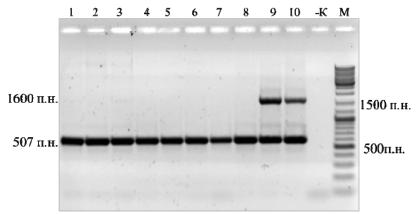


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов ПЦР з системою ASA маркеров к локусу XNor-B2

Дорожки 1-8 – сорта пшеницы, которые не несут *Gpc-B1* от *T. dicoccoides*; 9 – образец пшеницы линии UC 1113, который несет *Gpc-B1* от *T. dicoccoides*; 10 – образец пшеницы линии UC 1041, который несет *Gpc-B1* от *T. dicoccoides*; К – негативный контроль; М – маркер молекулярной массы GeneRulerTM DNA Ladder Mix

Исходя из полученных данных, обе системы позволяют идентифицировать QTL *Gpc-B1* от *T. dicoccoides* в линиях пшеницы. Однако, система ASA маркеров оказалась более простой в практическом использовании, поэтому была рекомендована для отбора нужных генотипов в селекционно-генетических работах по получению сортов с повышенным содержанием белка и микроэлементов. Единственным недостатком системы ASA является ее доминантность, и, соответственно, невозможность определения гетерозиготных растений-гибридов, что требует дополнительного поиска кодоминантных подходов оценки селекционного материала.

ОСОБЕННОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАБОТЫ С РОДОМ LILAEOPSIS E.L. GREENE

Сосина А.В., Чередниченко М.Ю.

Российский государственный аграрный университет — MCXA имени К.А. Тимирязева, Москва, 127550 E-mail: sosina 2012@mail.ru

В последнее время многие стараются обзавестись в домашних условиях «уголком природы». Одно из решений данной проблемы – аквариум, в котором растения являются неотъемлемой частью.

Среди почвопокровных культур важное место занимают представители рода Lilaeopsis E.L. Greene. Род включает 15 видов, но для содержания в аквариумах чаще используют L. brasiliensis, L. carolinensis, L. macloviana, L. mauritiana, L. novae-zelandiae. Объектом наших исследований является L. brasiliensis.

Lilaeopsis brasiliensis (Glaz.) Affolter. Это небольшое, ползучее, корневищное, цветковое растение, распространенное в Бразилии (юго-восток), Парагвае и Аргентине. Имеет ветвистый корень, на узлах которого находятся несколько листьев зелёного цвета. Листья прямостоячие, цельнокрайние, гладкие, в нижней части полые и эллиптические в поперечном сечении, в верхней части уплощенные, обычно длиной до 6 см, шириной 2-3 мм и с 6-10 поперечными жилками [1].

В целом $L.\ brasiliens is$ — непритязательное растение, внешний вид и состояние которого мало зависят от химических параметров воды и уровня освещенности

аквариума. Растет довольно медленно по сравнению с другими почвопокровными видами аквариумных растений, что и является его главным преимуществом. Страдает от обрастания водорослями. Разрастается всегда линейно, но от любого узла может пойти в любую сторону, поэтому быстро распространяется на все дно, образуя плотный ковер [3].

Задачей данного этапа исследований было введение в культуру *in vitro* растений L. brasiliensis. Изучены различные режимы стерилизации и дальнейшего культивирования в культуральных сосудах. В качестве опытных вариантов условий среды выступали минеральная основа, кислотность, концентрация фитогормонов и регуляторов роста. Перспективы исследований направлены на оптимизацию условий культивирования *in vitro L. brasiliensis*, а также на получение новых форм растений различными методами: 1) индукция мутагенеза, включая T-ДНК-мутагенез, 2) индукция образования самоклонов.

Литература:

- 1. Affolter J.M. A monograph of the genus Lilaeopsis (Umbelliferae) / Systematic botany monographs, 1985. Vol. 6. 140 p.
- 2. Bone T.S., Downie S.R., Affolter J.M., Spalik K. A Phylogenetic and Biogeographic Study of the Genus Lilaeopsis (Apiaceae Tribe Oenantheae) / Systematic Botany, 2011. Vol. 36 (3). 789-805 p.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ МЯТЫ БОЛОТНОЙ (MENTHA PULEGIUM L.)

Мубарак М.М., Чередниченко М.Ю.

Российский государственный аграрный университет — MCXA имени К.А. Тимирязева, Москва 127550 E-mail: drmaneea1981@hotmail.com

Лекарственные травы являются важным источником природных антиоксидантов. Семейство Яснотковые (Lamiaceae), или Губоцветные (Labiatae), включает такие лекарственные травы, как роды *Mentha, Thymus, Marjorana, Rosmarinus* и *Ocimum*. Например, мята болотная (*Mentha pulegium L*.) относится к растениям, которые являются экономически важным источником эфирного масла (которое используется в фармацевтической и косметологической промышленности), а также природных антиоксидантов. Основным компонентом эфирного масла данного вида является пулегон, который может быть предшественником при синтезе ментола и ментофурана.

Целью исследования является разработка технологии культивирования *in vitro* растений мяты болотной ($Mentha\ pulegium\ L$.) для получения эфирного масла. Методами исследования являются: стерилизация и введение в культуру *in vitro* семян различных сортов мяты болотной ($Mentha\ pulegium\ L$.), клональное микроразмножение растений мяты болотной, индукция морфогенеза у растений мяты болотной сортов Пеннироял и Соня.

По результатам экспериментов для стерилизации семян сорта Соня можно рекомендовать обработку гипохлоритом натрия в течение 15 минут, сорт Пеннироял достаточно стерилизовать в течение 10 минут.

Для индукции морфогенеза использовали питательные среды с минеральной основой по Мурасиге и Скугу (МС) с добавлением ауксинов и цитокининов в различной концентрации и различном соотношении. При использовании в качестве экспланта сегмента листовой пластинки у сорта Пеннироял стеблевой органогенез получен на одном варианте среды — половинная концентрация минеральных солей МС + 0,5 мг/л кинетин + 1 мг/л НУК — и составил 20 %. У сорта Соня стеблевой органогенез не получен ни на одном варианте среды. Черешки листа в качестве экспланта не дали стеблевой

органогенез ни на одном варианте среды. Узлы в качестве экспланта у сорта Пеннироял демонстрировали стеблевой органогенез на всех вариантах сред, его эффективность варьировала от 60 % до 100 %. У сорта Соня частота стеблевого органогенеза от 33 % до 100 % на большинстве вариантов сред. При использовании в качестве экспланта сегментов междоузлий у обоих сортов стеблевой органогенез был получен только на среде МС + 0,5 мг/л БАП + 1 мг/л НУК и составил 20 %. Таким образом, листовая пластинка и междоузлие в качестве экспланта дают низкую эффективность стеблевого органогенеза, а черешок листа непригоден в качестве экспланта для индукции стеблевого органогенеза.

Для индукции корневого органогенеза можно рекомендовать среду с половинным содержанием минеральных солей по Мурасиге и Скугу (½ МС) с добавлением кинетина в качестве цитокининового компонента и НУК в качестве ауксинового компонента. Регенеранты сорта Пеннироял развиваются визуально лучше, чем сорта Соня. При этом для сорта Пеннироял можно рекомендовать минеральную основу МС, а для сорта Соня – ½ МС.

ОЦЕНКА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА И ОСОБЕННОСТЕЙ УСТЬИЧНОГО И ЖЕЛЕЗИСТОГО АППАРАТОВ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ МЯТЫ ПЕРЕЧНОЙ (MENTHA X PIPERITA L.)

Парфёнова Д.А., Чередниченко М.Ю.

Российский государственный аграрный университет — MCXA имени К.А. Тимирязева, Москва 127550 E-mail: danyas89@mail.ru

Многолетнее травянистое растение *Mentha x piperita* L. служит источником получения веществ лекарственного и технического назначения. Мяту перечную применяют не только в народной медицине, современной косметологии и фармацевтике, но и в кулинарии. В фармацевтике лекарственное сырьё мяты перечной применяют в виде микстур, таблеток, порошков, мазей, капель, настоек или отваров. Мята обладает спазмолитическими, успокаивающими, и антисептическими свойствами, поэтому её применяют при нервных расстройствах, желудочных, зубных или болях в кишечнике, стенокардии, заболевании дыхательных путей.

На сегодняшний день культура *in vitro* является главной составляющей производства посадочного материала и современных биотехнологий клонирования в экономически развитых странах. С помощью культуры *in vitro* можно быстро размножить и оздоровить посадочный материал лекарственных растений.

В нашей работе использовались семена мяты перечной производства агрофирмы "СеДеК", торговой марки «Урожай уДачи®», Лёгкое дыхание "СеДеК", а также черенки растений сортов мяты перечной Кубанская 6, Лекарственная 4, Медичка, Болгарская, Лубенчанка, Симферопольская, Ароматная, Серебристая, Польская, Москвичка, Тунджа и Янтарная из коллекции ВИЛАР (зав. лабораторией Ф.М. Хазиева).

Целью работы была разработка системы получения и поддержания *in vitro* стерильных растений *Mentha piperita* L., а также оценка устьичного и железистого аппаратов различных сортов мяты перечной.

Исходя из поставленной цели, предстояло решить следующие задачи: (1) подобрать режим стерилизации семян и черенков; (2) подобрать состав питательных сред для индукции каллусогенеза и соматического органогенеза; (3) изучить особенности устьичного аппарата и определить плотность устьиц; (4) определить количество и размер

эфиромасличных желёзок; (5) определить размер длинных трихом разных сортов мяты перечной; (6) определить количество масла в разных сортах *M. х piperita* L.

Для стерилизации при введении в культуру *in vitro* семян и черенков мяты перечной использовали 30 %-ный раствор гипохлорита натрия (продолжительность обработки 10 и 15 минут) и 0,1 %-ный раствор хлорида ртути (II) (продолжительность обработки 5 и 10 минут). Для индукции морфогенеза использовали питательные среды с добавлением цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП) и ауксина α -нафтилуксусной кислоты (НУК): МС + 1 мг/л БАП, МС + 1 мг/л БАП + 1 мг/л НУК, ½ МС + 1 мг/л БАП, ½ МС + 1 мг/л БАП + 1 мг/л НУК.

В ходе проведенных исследований не было установлено зависимости эффективности морфогенеза от типа экспланта, гормонального состава среды или сорта. Средняя эффективность как каллусогенеза, так и соматического органогенеза составила ок. 40 %.

Микроскопические исследования проводились на временных препаратах эпидермы листьев мяты при помощи световых микроскопов Primo Star Carl Zeis и ЛОМО МИКМЕД-1 при увеличении 70х, 150х, 280х. Фотографировали камерой Canon Power Shot A 95. Размер кроющих волосков и эфирномасличных железок определяли при помощи окулярмикрометра 9х Ernst Leitz Wetzlar и объект-микрометра ОМ-П с длиной основной шкалы – 1 мм.

При сравнительном изучении 15 сортов M. x piperita установлено, что длина замыкающих клеток устьиц различалась и находилась в пределах 17,5-25,0 мкм. Устьичный аппарат диацитного типа. Наибольшая плотность расположения устьиц отмечалась у сортов Симферопольская, Польская и Москвичка ($235\pm1,7$ шт./мм², $228\pm1,5$ шт./мм² и $228\pm1,2$ шт./мм² соответственно). Проведенные исследования железистого аппарата 15 сортов M. piperita позволяют предположить, что наиболее перспективными с точки зрения накопления эфирного масла являются Кубанская 6 и Янтарная (из коллекции ВИЛАР), а также мята перечная производства агрофирмы «СеДеК».

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ НА ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ

Коршунова А.Д.¹, Дивашук М.Г.², Деабль И.А.М.А.¹, Карлов Г.И.², Соловьев А.А.¹

¹Кафедра генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550

²Центр молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550. E-mail: korshunova.ad88@gmail.com

Тритикале — зерновая культура, искусственно созданная человеком в результате межвидовой гибридизации пшеницы и ржи. Она занимает все больше посевных площадей благодаря таким качествам как высокая устойчивость к заболеваниям, неприхотливость к условиям выращивания, высокая урожайность. При неоспоримых достоинствах, у тритикале есть и ряд неблагоприятных качеств, ограничивающих ее широкое использование в производстве, одно из них — это высокорослость.

У пшеницы и ржи — родительских видов тритикале — проблему высокорослости решили путем введения генов короткостебельности. На сегодняшний день найдено 22 гена короткостебельности пшеницы. Наиболее распространенными являются гены Rht-B1b (Rht1), Rht-D1b (Rht2), Rht8, Rht-B1e (Rht11). Данные гены получили широкое распространение среди сортов мягкой пшеницы благодаря своему наиболее существенному благоприятному эффекту на хозяйственно-ценные признаки.

Яровая гексаплоидная тритикале объединяет в своем геноме три субгенома: А и В пшеницы и R геном ржи. Поэтому из вышеперечисленных генов короткостебельности, при нормальной геномной конституции, гексаплоидная тритикале может нести гены *Rht-B1b* и *Rht-B1e*. Гены, расположенные на хромосомах генома D также могут присутствовать в геноме гексаплоидной тритикале, но только в случае наличия замещений или транслокаций.

Помимо генов пшеницы генотипы тритикале могут нести и гены короткостебельности ржи. Самым распространенным геном среди сортов ржи является ген Hl~(Ddw1). Этот ген был обнаружен Кобылянским в 1972 году у естественного мутанта ржи EM-1. Наличие гена Hl укорачивает высоту растений до 40% у диплоидной и до 55% - у тетраплоидной ржи. Ген Hl, как и гены короткостебельности пшеницы, обладает широким плейотропным эффектом: увеличивает размер колоса, число цветков и зерен в колосе, мощность корневой системы, кустистость растений, площадь листовой поверхности.

Мы проверили коллекцию яровой тритикале, состоящую из 95 образцов, на наличие наиболее распространенных генов короткостебельности пшеницы и ржи. У 76 образцов, что составляет 87%, был обнаружен ген *Rht-B1b*. Важно отметить, что все сорта, имеющиеся в коллекции, несут этот ген. Другие гены, снижающие высоту, обнаружены не были. Также мы проверили коллекцию на наличие R/D замещений. У 16 образцов было обнаружено замещение 2R/2D. Ген короткостебельности *Rht8c*, расположенный на хромосоме 2D, среди этих образцов обнаружен не был.

Если все образцы разделить на две группы — без замещения и с замещением, - то ген RhtB1b отсутствовал у 37,5% образцов, несущих замещение, и лишь у 5% образцов без замещения. Таким образом, снижение высоты сортов яровой тритикале на данный момент осуществляется за счет наличия гена RhtB1b, отсутствие гена RhtB1b у селекционных образцов зачастую компенсируется наличием 2R/2D-замещения.

У пшеницы на сегодняшний день обнаружено большое разнообразие генов короткостебельности. Существуют сорта с различными их комбинациями и с так называемыми пирамидами генов, когда несколько генов, влияющих на один признак, расположены на разных хромосомах. Это обеспечивает надежный контроль высоты растения. В результате нашего исследования было выяснено, что у яровой тритикале на данный момент снижение высоты происходит только за счет одного гена - *Rht-B1b*. Мы предполагаем, что ведение других генов короткостебельности не только снизит высоту яровой тритикале, но и улучшит качество зерна.

Для переноса гена гена короткостебельности ржи Hl в яровую тритикале, а также для оценки влияния генов Hl и Rht-B1b на хозяйственно-ценные признаки, мы скрестили сорта Соловей харьковский и Dublet, несущими ген Rht-B1b, с сортами озимой тритикале Авангард, Мудрец, Хонгор и Валентин90, несущими ген Hl (Ddw1). У каждого растения оценивались следующие признаки: высота растения, количество междоузлий, длина каждого междоузлия, продуктивная кустистость, длина колоса, количество и масса зерен с колоса, количество колосков в колосе. Также у каждого растения определялось наличие генов Rht-B1b и Hl, а затем оценивалось влияние этих генов на каждый из признаков.

На данный момент существует только один ДНК маркер для определения наличия гена короткостебельности Hl. Он разработан на микросателлитную последовательность REMS1218, тесно сцепленную с геном. Но для его определения необходимо использование фрагментного анализа. Мы использовали его для скрининга коллекции, состоящей всего из 95 образцов, но для оценки популяции F_2 , которая состоит из 2200 растений, работа с этим маркером будет очень долгой и дорогой. Поэтому мы отсеквенировали последовательность REMS1218 и на основе различий в сиквенсах подобрали рестриктазу. Разработанный нами CAPS маркер является кодоминантным и его можно использовать для оценки наших популяций.

ОСОБЕННОСТИ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРОМЕТРИИ В ОЦЕНКЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК И ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ПЛОИДНОСТИ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ

Логинова М.Ю., Гораев Е.В., Федоров Р.А.

OOO «Эко-мед-с М» E-mail: mloginova@ecomeds.ru

Полиплоидия или кратное увеличение числа наборов хромосом, широко распространена среди цветковых растений. Явившаяся для покрытосеменных значимым фактором увеличения таксономического разнообразия, полиплоидизация играет важную роль в эволюции. Кроме этого, полиплоидность является благоприятным признаком и для большинства сельскохозяйственных культур: считается, что полиплоидные культуры наделены определёнными преимуществами, ассоциирующимися с более крупными размерами, тогда как новые межгенные взаимодействия приводят к появлению новых свойств и формированию новых урожайных сортов.

В настоящее время проточная цитофлуориметрия является одним из методов, используемых для оценки содержания ядерной ДНК и определения степени плоидности генома. Пробоподготовка заключается в экстракции интактных ядер из растительного материала и их окрашивания флуоресцентным красителем, связывающимся с ДНК. Прохождение водной суспензии окрашенных ядер через проточную ячейку цитофлуориметра приводит к возбуждению флуоресценции красителя ДНК лазером прибора, и последующим детектированием флуоресценции красителя от каждого ядра. Ядра классифицируют в соответствии с их интенсивностью флуоресценции, пропорциональной содержанию ДНК.

ДНК-цитометрия стала популярным методом анализа фаз клеточного цикла, оценки абсолютного содержания ДНК (размера генома), скрининга плоидности, определения анэуплоидии и миксоплоидии, различных полисоматий и выявления репродуктивного пути. Однако, несмотря на простоту подхода, для получения надежных результатов по оценке абсолютного содержания ДНК растений с помощью проточной цитометрии требуется тщательная разработка протокола пробоподготовки для каждого вида растений, учитывающая состав буферов, свежесть исходного материала, состав цитозольных компонентов, влияющих на количественное связывание с ДНК. И наконец, важную роль играет выбор калибровочных стандартов ДНК.

Все представленные в работе примеры анализов выполнены на проточных цитофлуориметрах Partec (Германия), моделях CyFlow или PAS.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ МАЛИНЫ С ПОМОЩЬЮ ИФА И МЕТОДЫ ЕЕ ОЗДОРОВЛЕНИЯ Тихонова К.О., Упадышев М.Т., Донецких В.И.	5
ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МОРКОВИ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ХИМЕРНЫЙ БЕЛОК МУСОВАСТЕКИМ TUBERCULOSIS Новиковская А.А., Дейнеко Е.В.	6
АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ WOLFFIA ARRHIZA Шведова А.Н., Хватков П.А.	7
ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ИЗ МОЛОКА ТРАНСГЕННЫХ ПО ГЕНУ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА КОЗ Хвалько Г.В.	8
ВИРУСОПОДОБНЫЕ НВС ЧАСТИЦЫ, НЕСУЩИЕ НЕСКОЛЬКО КОПИЙ М2Е ПЕПТИДА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ, КАК ОСНОВА КАНДИДАТНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ Блохина Е.А., Куприянов В.В.	9
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГИБРИДНОГО ПОТОМСТВА F ₁ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ САХАРНОЙ И КОРМОВОЙ СВЁКЛЫ НА ОСНОВЕМИКРОСАТЕЛЛИТНЫХМАРКЕРОВ Федорин Д.Н., Федулова Т.П.	10
ПОЛИМОРФИЗМ IRAP-МАРКЕРОВ У САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (BETA VULGARIS L.) Федорин Д.Н., ФедуловаТ.П.	12
ГЕН ЭСТРОГЕННОГО РЕЦЕПТОРА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР МНОГОПЛОДИЯ У РАЗЛИЧНЫХ ПОРОД СВИНЕЙ Друшляк Н.Г.	13
ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ГЕНОТИПА РАСТЕНИЯ НА ПРОЦЕСС МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ГОРОХА В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ Сащенко М.Н., Подвигина О.А., Амелина К.В.	14
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ СТЕРИЛИЗУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ Сащенко М.Н., Подвигина О.А.	16
ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА РИСА МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ ПЦР И ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» Егорова М.С., Игнатов А.Н.	18
ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ RAPD-AHAЛИЗОМ Фелорин Л.Н. Богачева Н. Н.	19

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОМОТОРА <i>SmAMP1</i> ИЗ <i>STELLARIA MEDIA</i> Ефремова Л.Н., Шукуров Р.Р., Комахин Р.А., Бабаков А.В., Высоцкий Д.А.	20
СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУЦЕНТОВ БЕЛКА rhBMP-2 И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ВЕТЕРИНАРИИ НА ЕГО ОСНОВЕ Бартов М.С., Карягина А.С., Лунин В.Г.	21
АНАЛИЗ АНДРОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ГИБРИДОВ ГЕКСАПЛОИДНОГО ТРИТИКАЛЕ (* <i>TRITICOSECALE</i> WITTM.) Зайцева О.И., Сокольчик Д.А.	24
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ЛОКУСОВ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ГЛЮТЕНИНОВ У ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ ТРИТИКАЛЕ И ПШЕНИЦЫ Бондарченко М.В., Антоненко Е.В.	25
ИНСЕРЦИЯ LIS-1 КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР ПОТЕНЦИАЛЬНО АДАПТИВНЫХ ГЕНОТИПОВ ЛЬНА (РОД <i>LINUM</i>) Тимофеенко К.С., Гузенко Е.В.	27
ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ARABIDOPSIS THALIANA С МИКРОБНЫМ ГЕНОМ ФИТАЗЫ BACILLUS GINSENGIHUMI Нямсурэн Ч., Валеева Л.Р., Ахметова А.И., Балабан Н.П., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р.	28
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ ХРИЗАНТЕМ WHITE SNOWDON К ВИРУСУ Б Титова С.М., Митюшкина Т.Ю., Фирсов А.П., Долгов С.В.	29
<i>RAPA1</i> КАК ПОСРЕДНИК В ПРИКРЕПЛЕНИИ РИЗОБИЙ К КОРНЯМ РАСТЕНИЙ Нигматуллина Л.Р., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х.	29
ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ЛЬНА-ДОЛГУНЦА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ. Королев К.П.	30
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ Мима К.А., Бурмакина Г.С., Титов И.А., Малоголовкин А.С.	32
ВЛИЯНИЕ ОСВЕЩЕНИЯ ЛАМПАМИ С ПОВЫШЕННОЙ ДОЛЕЙ КРАСНОГО СВЕТА В СВЕТОВОМ ПОТОКЕ НА ВОЗМОЖНОЕ ПОВЫШЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА РАЗМНОЖЕНИЯ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ И ГРУШИ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> Бъядовский И.А.	33

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОДВИДОВ ЧЕРЕМШИ <i>ALLIUM URSINUM</i> L. Дзюбан О.В., Грушецкая З.Е., Тихомиров В.Н.	34
СООТНЕСЕНИЕ ГРУПП СЦЕПЛЕНИЯ И ФИЗИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ ROSA WICHURANA С ПОМОЩЬЮ ТҮКАМІDE-FISH И HRM МАРКЕРОВ Киров И.В., Van Laere K., De Riek J., De Keyser E., Хрусталева Л.И.	37
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ДРЕЙФ СРЕДИ ВИДОВ РОДА <i>BRASSICA</i> L. ПО ГЕНАМ <i>FAE1</i> , КОНТРОЛИРУЮЩИМ СИНТЕЗ ЭРУКОВОЙ КИСЛОТЫ У РАПСА. Щукин Д.В., Грушецкая З.Е.	37
ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА МОРФОГЕНЕЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ ГОРЧИЦЫ САРЕПТСКОЙ (<i>BRASSICA JUNCEA</i>) Нгуен Тхань Хай, Калашникова Е.А.	39
ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА Шайдуллин Р.Р., Ганиев А.С.	40
ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ЦИСТЕИНА НА ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ <i>LIGULARIA GLAUCA</i> (L.) J. HOFFM. И <i>L. SIBIRICA</i> (CASS.) Дзвинчук М.Д., Шелифост А.Е.	41
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РОДА <i>LINUM</i> Мельникова Н.В., Беленикин М.С., Кудрявцева А.В.	43
АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКАХ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ДИКОГО ТИПА И С ВВЕДЕННЫМ ГЕНОМ ИНВЕРТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ ПРИ ГИПОТЕРМИИ Синькевич М.С.	45
ИССЛЕДОВАНИЕ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И РНК-ШАПЕРОННОЙ АКТИВНОСТЕЙ БЕЛКОВ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА <i>THELUNGIELLA SALSUGINEA</i> Злобин Н. Е, Таранов В. В.	46
РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МЯСА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ Минаев М.Ю. Букина Е.Ю.	47
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В ПШЕНИЦЕ QTL <i>GPC-B1</i> , ПЕРЕНЕСЕННОГО ОТ <i>T. DICOCCOIDES</i> Степаненко А.И., Моргун Б.В., Рыбалка А.И.	48

ОСОБЕННОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАБОТЫ С РОДОМ LILAEOPSIS E.L. GREENE Сосина А.В., Чередниченко М.Ю.	50
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ МЯТЫ БОЛОТНОЙ (<i>MENTHA PULEGIUM</i> L.) Мубарак М.М., Чередниченко М.Ю.	51
ОЦЕНКА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА И ОСОБЕННОСТЕЙ УСТЬИЧНОГО И ЖЕЛЕЗИСТОГО АППАРАТОВ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ МЯТЫ ПЕРЕЧНОЙ (<i>MENTHA X PIPERITA</i> L.) Парфёнова Д.А., Чередниченко М.Ю.	52
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ НА ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ Коршунова А.Д., Дивашук М.Г., Деабль И.А.М.А., Карлов Г.И., Соловьев А.А.	53
ОСОБЕННОСТИ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРОМЕТРИИ В ОЦЕНКЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК И ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ПЛОИДНОСТИ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ Логинова М.Ю., Гораев Е.В., Федоров Р.А.	55