

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

XV МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**«БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ,
ЖИВОТНОВОДСТВЕ И ВЕТЕРИНАРИИ»**

8 апреля 2015 г.

Москва – 2015

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

**XV МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

***«БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ,
ЖИВОТНОВОДСТВЕ И ВЕТЕРИНАРИИ»***

8 апреля 2015 г.

*Конференция посвящается памяти
академика РАСХН
Георгия Сергеевича
МУРОМЦЕВА*

Москва – 2015

СПОНСОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ



ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VITRO* И АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОЗИМОГО РАПСА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ РАСТЕНИЙ С ПОВЫШЕННОЙ ХОЛОДОСТОЙКОСТЬЮ

Леонтьева А.В., Чернобровкина М.А., Хватков П.А., Долгов С.В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д.42
E-mail: chernobrovkina@yandex.ru*

Рапс является ценной сельскохозяйственной универсальной культурой, продукты переработки которой используются в пищевой, металлургической, мыловаренной, кожевенной, текстильной и энергетической промышленности. Рапс представляет собой однолетнее (яровое) или двулетнее (озимое) растение. Урожайность озимого рапса выше, чем ярового. При благоприятных условиях возделывания озимый рапс является одной из самых конкурентоспособных сельскохозяйственных культур по отношению к сорной растительности.

Как правило, озимый рапс переносит морозы до -15 °С без снежного покрова. Однако озимый рапс, особенно в холодные зимы, подвержен вымерзанию. Кроме того, в начале вегетации озимый рапс может очень чувствительно реагировать на заморозки: в стеблях возникают трещины и разрывы, через которые проникают возбудители различных грибных заболеваний.

Рапс является одной из четырех основных сельскохозяйственных генно-модифицированных культур, трансгенные формы которых широко применяются в промышленном производстве. В настоящее время наиболее распространены сорта с интродуцированной устойчивостью к гербицидам и вредителям.

Целью данной работы являлось изучение регенерационной способности в условиях *in vitro* озимого рапса отечественной селекции сорта Северянин и получение первичных трансформантов рапса с повышенной холодоустойчивостью при использовании вектора pBI121-TsCSDP3, сконструированного в лаборатории стрессоустойчивости растений ФГБНУ ВНИИСБ. Данный вектор содержит гены растений *Thellungiella salsuginea*, кодирующие белки с доменом холодового шока (CSDP).

В экспериментах по индукции каллусогенеза использовали 6 вариантов состава питательных сред, различающихся по содержанию регуляторов роста (2,4-Д, бензиладенин, тидиазурон). Комбинации регуляторов роста были подобраны согласно литературным источникам. Во всех вариантах эффективность каллусогенеза была близка к 100%. Наиболее высокий процент регенерации (49,3%) был отмечен на среде с добавлением 1 мг/л 2,4-Д при последующем пассировании на среду, содержащую бензиладенин (3 мг/л). Для роста образовавшихся побегов использовали среду MS, содержащую регуляторы роста в пониженных концентрациях. Укоренение проводили на среде MS с добавлением 0,5 мг/л индолил-масляной кислоты.

Для генетической трансформации рапса использовали супервирулентный штамм природного фитопатогена (*Agrobacterium tumefaciens*) – AGL0, несущий бинарный вектор pBI121-TsCSDP3, содержащий селективный ген *nptII* и целевой ген *TsCSDP3*. Отбор регенерантов проводили методом негативной селекции с использованием концентраций селективного агента (канамицин) 50 и 100 мг/л.

Из листьев нетрансгенного контрольного растения и первичных трансформантов, устойчивых к канамицину, была выделена тотальная ДНК и проведен молекулярно-

биологический анализ на наличие вставки гетерологичных генов с использованием полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Для исключения ложно-положительных результатов был использован ПЦР-анализ на отсутствие в геноме растений агробактериального гена *vir C*. В результате проведенных исследований получены и отобраны 4 линии озимого рапса сорта Северянин, несущие гены *nptII* и *TsCSDP3*.

ДЕЙСТВИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА ПРОЦЕСС ВОССТАНОВЛЕНИЯ ВСХОЖЕСТИ СЕМЯН ГОРОХА ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

Сащенко М.Н.

*Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы
им. А.Л. Мазлумова», 396030 Воронежская область, Рамонский район, п.
ВНИИСС, 86
E-mail: samani84@mail.ru*

Одной из причин непрорастания покоящихся семян долгое время считали либо присутствие в них самих или околоплоднике веществ, ингибирующих рост, либо недостаток стимуляторов роста. В настоящее время установлено, что состояние покоя регулируется балансом веществ, стимулирующих и ингибирующих рост. Группой ученых под руководством М.Г. Николаевой (1977) было изучено и доказано, что прорастание семян регулируется фитогормонами. В зависимости от концентрации, места и условий действия тот или иной гормон может выступать то как стимулятор, то как ингибитор роста и прорастания.

Анализ литературных источников позволяет сделать вывод, что цитокинины играют в процессе прорастания семян «разрешающую» роль, поскольку преодолевают действие веществ, задерживающих прорастание. Так, цитокинины способны полностью инактивировать ингибирующее действие абсцизовой кислоты на семена и зародыши. Степень стимулирующего эффекта цитокининов варьирует в зависимости от вида семян. При набухании семян гороха происходит увеличение содержания свободных цитокининов. Результаты наших исследований показывают, что 6-БАП участвует в процессе нарушения как неглубокого, так и глубокого физиологического покоя. Положительный эффект данного гормона был отмечен на всех вариантах питательных сред.

Динамика содержания ауксинов меняется у видов при переходе к прорастанию, поэтому ученые рассматривают их в числе фитогормонов, участвующих в прорастании семян (Полякова, 1981; Nadi, 1976). Согласно литературным данным и нашим результатам попытки воздействовать на прорастание семян, добавляя ИУК в питательную среду, не дают положительного эффекта (Lang, 1965). В сухих семенах ауксины обнаружены не у всех видов. У бобовых суммарное содержание ауксинов при прорастании остается без изменения (Анисимовене, 1977).

Полученные результаты согласуются с литературными данными и свидетельствуют о том, что ауксины выступают как фактор торможения прорастания семян и нарушения нормального роста изолированных семян (Николаева и др., 1978). Однако в опытах Н.Г. Друшляк (2007) действие НУК (при замачивании семян) сказывалось положительно на росте и развитии проростков. Изменение длины побега проростков гороха под влиянием нафтилуксусной кислоты составил 0,5-1,8 см в зависимости от сорта гороха. Повидимому, разницу действия одного и того же фитогормона можно объяснить

генетическими особенностями испытываемых сортов гороха и длительностью хранения семян.

Согласно литературным источникам, гиббереллины (Гк) представляют собой фитогормоны, активно участвующие в процессах роста. Еще в 1956 г. выяснилось, что гибберелловая кислота стимулирует прорастание семян, находящихся в состоянии вынужденного и неглубокого покоя (Николаева, 1974). Научно доказано, что у двудольных растений в прорастании участвуют Гк, запасенные при созревании семени в осевых органах зародыша, а в мобилизации запасных веществ – Гк, запасенные в семядолях (Barton, 1956). Гиббереллин наиболее успешно стимулирует прорастание, если его дать только в начале набухания семян. Согласно результатам исследований на разных культурах, Гк способствует более раннему началу роста осевых органов, что и позволяет приписать данному гормону ведущую роль в прорастании. В наших опытах именно на питательной среде с добавлением гиббереллина наблюдалось повышение всхожести и увеличение роста клеток растяжением. Аналогичные данные были получены Н.Г. Друшляк (2009) при замачивании семян гороха разных сортов в растворе гиббереллина.

Таким образом, для дальнейших исследований нами была выбрана питательная среда, содержащая 6-БАП 0,5 мг/л и Гк 0,1 мг/л, на которой было отмечено положительное влияние гормонального состава питательной среды на рост и развитие проростков.

Горох характеризуется длительным сроком сохранения всхожести семян. При длительном хранении в семенах гороха происходит снижение энергии прорастания, лабораторной и полевой всхожести, содержания запасных веществ, активности ферментов (Друшляк, 2008). Условия выращивания и хранения семян существенно влияют на продолжительность сохранения ими всхожести и на другие биологические и биохимические свойства.

Решающее значение в длительности сохранения всхожести семян имеют видовая и сортовая специфика, агроэкологическими и погодные факторы и условия хранения (Друшляк, 2009). Сорта с мозговыми семенами теряют всхожесть в среднем через 4 – 6 лет хранения, сорта с округлыми светлоокрашенными семенами, имеющие довольно тонкую семенную кожуру – через 7 – 10 лет, сорта с темноокрашенными семенами (более плотная семенная кожура) – через 9 – 15 лет. Стоит отметить, что дикопрорастающие формы с толстой мелкозернистой семенной кожурой сохраняют всхожесть в течение 15 – 20 лет (Корсаков и др., 1960).

Проведенные нами попытки получения растений из длительно хранившихся семян гороха с помощью культуры *in vitro* показали, что восстановление селекционного материала возможно. В наших исследованиях были испытаны четыре варианта питательной среды: 6-БАП (0,5)+НУК (0,1); 6-БАП (0,5)+Гк (0,1); 6-БАП (0,5)+ИМК (0,1); 6-БАП (0,5)+ИУК (0,1). Влияние гормонального комплекса среды оценивалось показателем всхожести и морфологического развития проростков.

Так у 5 изучаемых селекционных номеров (Рамус, Зенит, Амур, Рамонский-77, № 1065) лабораторная всхожесть колебалась от 12 % до 82 % в зависимости от срока хранения.

В литературных источниках указано, что всхожесть значительно падает уже после 5 лет хранения. В наших исследованиях даже после 7 и 10 лет хранения семена гороха имеют всхожесть на уровне 79 % и 54 % соответственно. Образец семян сорта Рамонский-77, хранившийся 18 лет, имел показатели всхожести до 12 %. По-видимому, сохранение всхожести длительно хранившихся семян связано в большей степени с генотипическими особенностями и условиями произрастания растений.

Все проростки в условиях *in vitro* были нормально развиты. Средняя длина корешка достигала 3-6 см. Наблюдалось наличие многочисленных боковых корешков.

Проростки имели насыщенную зеленую окраску листьев и стебля. Высота растений достигала 5-6 см. Наличие уродливых или недоразвитых проростков отмечено не было.

Механизмы покоя и прорастания семян зависят от таких физиологических факторов, как условия освещения, температура и влажность хранения, наличие эндогенных ингибиторов и другие. Для прорастания семян в полевых условиях ведущая роль принадлежит гидротермическим условиям. В условиях культуры тканей прорастание семян наблюдалось в пределах 38 – 95 %. Данный показатель свидетельствует о том, что метод эмбриокультуры позволяет получать нормально развитые проростки из длительно хранившихся семян и повысить показатель всхожести практически в два раза. Это объясняется тем, что в условиях *in vitro* факторы температуры, влажности и освещенности искусственно регулируются и являются оптимальными. Кроме того, наличие экзогенного минерального и гормонального комплекса питательной среды также обеспечивают благоприятные условия для прорастания семян и нормального развития проростков.

AGROBACTERIUM-ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПШЕНИЦЫ *IN PLANTA* ГЕНАМИ МЕТАБОЛИЗМА ПРОЛИНА

Бавол А.В., Дубровная О.В., Гончарук А.Н., Воронова С.С.

***Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, отдел генетической инженерии, Киев, 03022
E-mail: bavoll@rambler.ru***

В последние два десятилетия наблюдается широкое использование различных подходов для генетической трансформации пшеницы. Основные способы получения генетически модифицированных растений с использованием метода *Agrobacterium*-опосредованной трансформации основаны на переносе T-ДНК в культивируемые *in vitro* растительные клетки с последующей регенерацией трансформированных побегов. Однако такой подход имеет ряд ограничений и недостатков: во-первых, требует стерильных условий; во-вторых, достаточно сложная и длительная методика; в-третьих, во время культивирования *in vitro* в растительных клетках довольно часто происходят соматические мутации или соматональные изменения; и, наконец, у некоторых генотипов может вообще не происходить регенерация побегов. Одним из нетрадиционных подходов для осуществления переноса агробактериальной T-ДНК в однодольные растения являются метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*, который позволяет избежать культивирования *in vitro* и соматональной изменчивости. Этот метод генетической трансформации в настоящее время успешно используются у различных сельскохозяйственных культур, в том числе и пшеницы.

Для генетического улучшения культурных растений рассматриваются возможности использования генов, которые контролируют уровень совместимых осмолитов, в частности метаболизм пролина. Для повышения уровня накопления пролина применяются две основные стратегии: 1 — дополнительное введение копий кДНК, ответственных за его синтез (*P5CS* или δ -OAT в смысловой ориентации трансгена); 2 — частичная супрессия эндогенных генов катаболизма пролина, например *ProDH*, контролирующих первый этап его гидролиза, используя фрагменты генов пролиндегидрогеназы в антисмысловой ориентации или в форме обращенного повтора.

Целью нашей работы было проведение *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* мягкой пшеницы с использованием генов метаболизма пролина. Объектом исследования служили растения мягкой пшеницы современного

высокоурожайного сорта Зимоярка (оригинатор Институт физиологии растений и генетики НАН Украины). Трансформацию проводили с использованием двух векторных конструкций. Первая конструкция содержит бинарный вектор pVi2E с целевым геном – двухцепочечным РНК-супрессором пролиндегидрогеназы, полученный на основе гена *Arabidopsis* (ds-RNA suppressor *ProDHI*), а также селективный ген неомифосфотрансферазы II (*nptII*) *E. coli*. Вторая конструкция содержит бинарный вектор pVi-OAT с целевым геном – орнитинаминотрансферазы *Medicago truncatula*, а также селективный ген неомифосфотрансферазы II (*nptII*) *E. coli*. Обе конструкции любезно предоставлены к.б.н. Кочетовим А.В. (Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск).

Нами проводилась *Agrobacterium*-опосредованная трансформация *in planta* в условиях вегетационного опыта во второй половине дня при различных температурных режимах: от 20 до 28 °С. По нашим наблюдениям между температурными вариантами не отмечалось достоверной разницы по показателю завязываемости семян. Однако по отбору на селективной среде с канамицином, семена, полученные в варианте с 20 -22 °С прорастали быстрее и, в целом, удалось получить большее количество канамицин-устойчивых проростков.

Всего при трансформации *in planta* векторной конструкцией pVi2E нами было получено 424 семени T₀, а при трансформации векторной конструкцией с pVi-OAT – 411 семян, которые по морфологическим показателям не отличались от контроля. Все полученные семена проращивали на селективной среде и отбирали канамицин-устойчивые формы. При использовании pVi2E получили 16 канамицин-устойчивых растений, а при трансформации pVi-OAT – 11 растений, устойчивых к канамицину. Устойчивые формы выращивали до полной спелости зерна и получения семян T₁. Все полученные семена T₁ анализировали с помощью ПЦР.

Среди 261 проанализированных семян T₁, с конструкцией pVi2E (ДНК выделяли из каждого проростка T₁ индивидуально) только у 37 подтверждено присутствие гена *nptII*. Дополнительно все образцы, в которых подтверждено наличие гена *nptII*, проверяли на присутствие гена *pdh* по наличию экзона 1. Результат анализа показал, что указанный ген присутствовал только у четырех растений. Таким образом, частота трансформации с полным встраиванием генетической конструкции составляет 1,53%.

Среди 129 семян T₁, полученных с использованием конструкции pVi-OAT (ДНК выделяли из каждого проростка T₁ индивидуально), у 46 подтверждено присутствие гена *nptII*. Все образцы, у которых подтверждено наличие гена *nptII*, проверяли на присутствие гена OAT. Результат анализа показал, что указанный ген присутствовал только у семи растений. Таким образом, частота трансформации с полным встраиванием генетической конструкции pVi-OAT составляет 5,43%. Анализ образцов на присутствие генов вирулентности позволил исключить бактериальную контаминацию растительного материала, поскольку присутствие последовательности гена *VirC* в исследуемых образцах не установлена. Анализ образцов на присутствие гена вирулентности (*VirC*) позволил исключить бактериальную контаминацию растительного материала.

Суммируя, следует отметить, что экспериментально доказана возможность генетической трансформации растений мягкой пшеницы с использованием штамма AGLO, содержащего плазмиду pVi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы или pVi-OAT с геном орнитинаминотрансферазы методом *Agrobacterium*-опосредованная трансформация *in planta*.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ *WOLFFIA ARRHIZA*, СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Шведова А.Н.¹, Хватков П.А.¹, Чернобровкина М.А.¹, Пушина А.С.^{1,2}, Фирсов А.П.^{1,2},
Шалойко Л.А.², Долгов С.В.^{1,2}

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»
(ВНИИСБ), 127550, Москва, Тимирязевская ул., 42*

Email: mntr2008@mail.ru

² *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Филиал института
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»,
142290, Московская обл., г. Пущино, Проспект Науки, 6*

Генетическая инженерия растений семейства *Lemnaceae* начала развиваться сравнительно недавно. Работы по биотехнологии ряски проводились преимущественно с представителями родов *Lemna* и *Spirodela*. На сегодняшний день их уже используют для получения рекомбинантных белков фармацевтического и ветеринарного назначения. Однако, в семействе *Lemnaceae* существует род растений *Wolffia*, среди представителей которого есть вид (*W. arrhiza*), являющийся наиболее подходящим растением-продуцентом для наработки рекомбинантных белков ввиду наличия таких преимуществ, как отсутствие корневой системы (возможность культивирования ее глубинным способом); высокая прогрессия размножения (удвоение биомассы популяции происходит за 1-6 суток); высокое содержание белков в сухой массе (до 45 %); нетребовательность к питательным субстратам (позволяет получать большое количество биомассы при относительно небольших затратах).

Ранее нами был разработан протокол трансформации вольфии, эффективность которого не превышала 0,1%, что обусловило необходимость проведения оптимизации условий агробактериальной трансформации. Оптимизацию трансформации проводили с использованием конструкций, содержащих целевые гены (дисульфатогирудина-1 и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека).

Гирудин является высокоспецифическим прямым ингибитором тромбина, обнаруженным в слюнных железах медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*). В настоящее время препараты гирудина используются при лечении широкого спектра заболеваний. На данный момент существуют два типа гирудина – природный из слюнных желез пиявки и рекомбинантный гирудин, синтезируемый в дрожжах. Однако способы их получения высокочрезвычайно затратные, кроме того, гирудин, синтезированный в дрожжах, обладает лишь 20–30% активности относительно природного. Это связано с недостаточной точностью процессинга молекул гирудина в дрожжах.

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) является гормоном, стимулирующим формирование колоний белых кровяных телец в костном мозге. Для получения рекомбинантного ГКСФ также существуют два источника – синтез в *E.coli* и в клетках трансгенных животных. Первый способ ограничен недостаточной точностью процессинга, а второй способ довольно дорог.

Для повышения эффективности трансформации вольфии мы провели ряд экспериментов по оптимизации условий инокуляции, кокультивации и культивирования эксплантов. При варьировании штаммами агробактерии, концентрациями инокулюма и временем кокультивации, было установлено, что для успешной трансформации вольфии предпочтительно использовать штамм агробактерии ЕНА105 при концентрации инокулюма 0,4-0,6 OD₆₀₀, а время кокультивации с агробактерией должно составлять 72 часа. В качестве критерия оценки результативности протокола трансформации

использовали эффективность транзientной экспрессии. Изменяя концентрации 2,4-Д совместно с ВА, мы установили, что наиболее высокая эффективность трансформации отмечается при культивировании эксплантов в течение первых 15 дней на средах с добавлением 2,4-Д 2,0 – 2,5 мг/л совместно с ВА 2,0 мг/л. В качестве критерия оценки использовали эффективность стабильной трансформации эксплантов. В этих вариантах эффективность трансформации составляла 0,25 и 0,27 % соответственно.

В ходе исследований получена 81 линия *W. arrhiza*, а именно 34 линии с интеграцией гена ГКСФ человека и 47 линий с интеграцией гена дисульфатогирудина-1. Наличие интеграции гетерологичной ДНК подтверждена молекулярно-биологическими анализами (ПЦР и Саузерн-блот гибридизация). Экспрессия гетерологичных белков была доказана методом вестерн блоттинга и ИФА.

ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА p30 ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Иматдинов И.Р., Дубровская О.А., Казакова А.С.

*Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Российской академии сельскохозяйственных наук, ул. Академика Бакулова, д. 1, пос. Вольгинский, Владимирская обл., 601125,
E-mail: VNIVViM@niiv.petush.elcom.ru, www.vniivvim.ru*

Африканская чума свиней (АЧС) - контагиозная, септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью, может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно. Поскольку вакцины против АЧС не разработаны, то для ликвидации и предупреждения распространения болезни в Российской Федерации (РФ) применяются жесткие карантинные мероприятия. Для постановки диагноза АЧС решающее значение имеют лабораторные исследования проб органов и сывороток крови свиней. Методы, основанные на обнаружении вирусных антигенов или ДНК, не всегда обеспечивают выявление хронически или бессимптомно инфицированных животных. В таких случаях информативными являются серологические методы, основанные на выявлении антител к вирусным белкам в пробах сывороток крови свиней и кабанов. Метод иммуноблоттинга рекомендован Международным эпизоотическим бюро для подтверждения результатов лабораторной диагностики АЧС непрямым твердофазным иммуноферментным анализом (ТФ ИФА) или реакцией непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), а также при нарушении условий хранения проб сывороток крови и для исключения ложноположительных результатов в случаях, когда антитела сывороток крови от привитых против других болезней животных реагируют с антигенами клеток, использованных при изготовлении вакцин.

Целью работы было сконструировать продуцент рекомбинантного белка p30 из актуального штамма вируса АЧС и на его основе разработать тест-систему для серодиагностики АЧС методом иммуноблоттинга.

На основании проведенного анализа компьютерного дизайна конструкции генов и с использованием молекулярно-биологических методов был приготовлен экспрессирующий плазмидный вектор, обеспечивающий синтез в клетках *E. coli* рекомбинантного белка, состоящего из фрагмента p30 вируса АЧС штамм Ставрополь 01/08, тиоредоксина (T_{rx}-Tag) и одного или двух полигистидиновых участков (6xHis). После трансформации клеток *E. coli* штамма KRX (Promega) плазмидой

pET32b(+)/ASFV/p30e2 и последующего скрининга рекомбинантов с высоким уровнем экспрессии гибридного белка p30e2_TgxA_6xHis, отобран штамм-продуцент *E. coli* pET32b/ASFV/p30e2/1. Экспрессия целевого белка в полученном штамме-продуценте осуществлялась при культивировании штамма-продуцента на селективных средах с добавлением индуктора L-рамнозы. После осаждения бактериальных клеток центрифугированием их разрушали замораживанием-оттаиванием и ультразвуковой обработкой. Далее вновь центрифугировали, детрит отделяли, а супернатант использовали для очистки рекомбинантного белка методом металлохелатной хроматографии на Ni²⁺-сефарозе. Конечный выход целевого белка составлял не менее 15-20 мг с 1 дм³ бактериальной культуры. Анализ электрофореграмм полученных препаратов в 10 % SDS-PAGE показал, что белок представлен единичной полосой в области ~ 36-37 кДа, что соответствует расчетным данным.

Основной компонент «Тест-системы для серодиагностики африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга» (далее, тест-система) - иммунострипы готовили следующим образом: после электрофореза очищенного рекомбинантного белка р30 в 10 % SDS-PAGE соответствующий ему полипептид переносили при постоянном токе на нитроцеллюлозные мембраны, которые затем разрезали на полосы шириной 3 мм, помещали в буфер с 0,1 % Твин-20 и 2 % обезжиренного молока для блокирования свободных сайтов сорбции, высушивали и хранили при 4 °С. Помимо иммунострипов разработанная тест-система включала положительную и отрицательную контрольные сыворотки, конъюгат протеина А с пероксидазой хрена, хромогенный субстрат 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид и необходимые для анализа растворы.

Используя аттенуированный вариант вируса АЧС Ставрополь 01/08 (33 пассаж в культуре клеток А₄С₂/9к) и штамм МК-200 удалось воспроизвести хроническую и бессимптомную формы инфекции у свиней и кабана. Результаты исследования сывороток показали, что методами иммуноблоттинга и РНИФ антитела к р30 в сыворотках крови удается выявить, начиная с 7 или 14 суток после инфицирования.

Вместе с тем, экспериментально установлено, что у свиней, которых инокулировали аттенуированным вариантом вируса АЧС Ставрополь 01/08 (33 пассаж в культуре клеток А₄С₂/9к) или аттенуированным штаммом КК-262/с, а затем заражали гомологичными вирулентными штаммами Ставрополь 01/08 или Конго-49, соответственно, ни в сыворотках крови, ни пробах органов на 7 сутки после заражения антитела выявить не удастся. Предположительно, это обусловлено образованием комплексов «антиген-антитело» в ходе репродукции в организме свиней вирулентного штамма вируса АЧС, что необходимо принимать во внимание при проведении мониторинговых исследований на АЧС.

Для определения чувствительности и специфичности тест-системы использовали пробы сывороток и органов, отобранные от кабанов и домашних свиней с 2010 по 2014 гг. из различных регионов РФ. Пробы параллельно исследовали в РНИФ (или непрямым ТФ ИФА) и методом иммуноблоттинга. Показатели специфичности и чувствительности разработанной тест-системы при исследовании полевых образцов 70 проб сывороток крови и 47 проб органов свиней и кабанов составили 97-100 %.

Иммобилизированные на нитроцеллюлозных мембранах полипептиды рекомбинантного белка р30 сохраняли антигенную активность в течение одного года. Наряду с высокой чувствительностью и специфичностью преимуществом метода иммуноблоттинга является то, что тест выполняется за 2-3 ч и не требуется специального дорогостоящего оборудования.

Выводы.

1. Для получения вирусспецифического антигена с целью исследования сывороток свиней и кабанов методом иммуноблоттинга получен экспрессирующий плазмидный вектор pET32b(+)/ASFV/p30e2, обеспечивающий синтез в клетках *Escherichia coli*

рекомбинантного белка, состоящего из фрагмента р30 вируса африканской чумы свиней, тиоредоксина и полигистидиновых участков (p30e2_TrxA_6xHis).

2. На основе очищенного рекомбинантного белка р30 разработана и испытана тест-система для серодиагностики и мониторинга африканской чумы свиней методом иммуноблоттинга.

Работа выполнена в ходе реализации Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» в рамках НИР «Создание тест-системы для серодиагностики африканской чумы свиней» (государственный контракт с Министерством образования и науки Российской Федерации № 14.М04.12.0010 от «27» июня 2014 г.).

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ *BRASSICA OLERACEA L. IN VITRO*

Киракосян Р.Н., Калашникова Е.А.

***Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева,
г. Москва, Россия,
E-mail: mia41291@mail.ru***

Овощи имеют огромное значение не только для поддержания жизненных сил человека, но и как действенные лечебные средства, признанные научной и народной медициной. Ценность и незаменимость овощей в питании человека заключается в том, то они являются источником витаминов, сахаров, кислот и других биологически активных веществ, от которых зависит вкус пищи и ее усвояемость организмом человека.

В последние годы возрастает интерес к капусте белокочанной, так как в ее листьях есть фитонциды, клетчатки, органические кислоты, минеральные вещества, сахара. Капуста белокочанная имеет одну отличительную особенность – в ней содержится витамин U, способный вылечивать язвенные колиты, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, частоты и др. болезни.

Селекционная работа с *Brassica oleracea L.*, в первую очередь, направлена на создание высокопродуктивных, скороспелых сортов и гибридов. Они должны быть устойчивы к фитопатогенам, пригодны к современным технологиям возделывания и соответствовать природно-климатическим условиям регионов выращивания.

В связи с этим необходимо усовершенствовать технологию быстрого получения исходного селекционного материала этой культуры для создания отечественных сортов и гибридов. Методы культуры пыльников и завязей являются перспективными биотехнологическими подходами для получения гомозиготных линий удвоенных гаплоидов и ускорения создания новых сортов капусты белокочанной. Они имеют ряд преимуществ по сравнению с методом отдалённой гибридизации, главными из которых являются отсутствие необходимости проведения трудоемкого процесса межвидовых скрещиваний, возможность создавать линии удвоенных гаплоидов за одно поколение, в том числе с новыми хозяйственно ценными признаками, получить которые обычным путем не удастся, с использованием селекции *in vitro*.

Целью исследований являлась разработка технологии получения растений-регенерантов капусты белокочанной в культуре пыльников и завязей, на основе оптимизации условий индукции морфогенеза на всех этапах биотехнологического процесса.

Объектом исследования служили изолированные пыльники и завязи сортов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) селекции ВНИИССОК: Зимовка 1474, Слава грибовская 231, а также селекционный материал (инбредные линии и селекционные формы капусты белокочанной разных групп спелости), полученные в лаборатории селекции и семеноводства капустных культур ВНИИССОК. Растения-доноры выращивали в пленочной не обогреваемой теплице, в камерах искусственного климата лаборатории и в полевых условиях открытого грунта ВНИИССОК.

В ходе эксперимента было установлено, что предварительная обработка бутонов капусты белокочанной 1 сутки без помещения соцветий в раствор БАВ и дальнейшее использование раствора Дропп (10 мг/л) в течение 2-х суток при температуре +4°C оказало положительное влияние на процессы эмбрио- и каллусогенеза в культуре изолированных пыльников и завязей.

На индукцию морфогенного развития изолированных органов большое влияние также оказывает и гормональный состав питательной среды. Исследования показали, что оптимальной средой для индукции прямого эмбриогенеза была среда МС без добавления фитогормонов, содержащая сахарозу 90 г и агар в концентрации 0,7 %.

В дальнейшем сформированные эмбриониды отделяли от первичного экспланта и переносили на среду, содержащую минеральные соли по прописи МС, а также гормоны ИУК – 2 мг/л, БАП – 1 мг/л, сахарозу – 3 %, агар - 7 г/л. В этих условиях формировались растения, которые проявили высокую способность к последующему размножению.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ СЕМЯН БЕЛОГО ЛЮПИНА (*LUPINUS ALBUS* L.)

Князева И.В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства»,
Москва, 115598*

E-mail: knyazewa.inna@yandex.ru

У белого люпина идентифицировано 28 групп сцепления и картировано 105 молекулярных маркеров на генетических картах этой культуры [1]. В то же время, гены, контролирующие качественные морфологические и биохимические признаки не отнесены к группам сцепления, и не картированы относительно друг друга и по отношению к данным молекулярным маркерам.

Для исследования использовался сорт белого люпина *Дега*, представляющий по запасным белкам семени самоопыляющуюся популяцию $F \rightarrow \infty$. Анализ отдельных семян по вариантам конглютина проводили методом электрофореза их экстрактов из предварительно обезжиренного размола части семядоли.

Встречаемость вариантов белков в сорте белого люпина *Дега* вели по Ч.Ли [2]. Для оценки сцепления использовали изложенный ранее подход [3, 4].

Электрофорез белков отдельных семян сорта *Дега* показал, что он гетерогенен по вариантам, обозначенным нами CON A и CON B. Учитывая, что белый люпин является самоопылителем, данный сорт представляет собой самоопыляющуюся популяцию $F \rightarrow \infty$. В этой популяции встречались четыре сочетания вариантов данных белков (CON: A1B1; A2B1; A1B2; A2B2), с частотой (10,67±3,56; 22,67±4,83; 58,66±5,69; 8,00±3,13), соответственно. Сочетание (CON A1B2) встречалось наиболее часто. Остальные имели существенно более низкую встречаемость. Такая диспропорция во встречаемости обнаруженных сочетаний вариантов белков может быть вызвана, с одной стороны,

сцеплением локусов, контролирующих их синтез, с другой – разным коэффициентом размножения выявленных генотипов. В связи с этим, проведена оценка частот аллелей, контролирующих варианты CON A1 и CON A2. Доля аллеля *Con A1* больше, чем альтернативного – *Con A2*. Подобная ситуация наблюдалась по частотам встречаемости аллелей другого локуса *Con B*. Преобладала частота встречаемости аллеля *Con B2*. Это привело к тому, что генотип, несущий генетические факторы *Con A1 Con B2* превалировал в исследуемой популяции сорта *Дега*.

Таким образом, установлено, что полиморфизм белков семени белого люпина и различия в частотах встречаемости обнаруженных у них вариантов сорта *Дега*, связаны с аллелями двух сцепленно наследуемых локусов. Преобладание генотипа, несущего аллели *Con A1 Con B2*, наиболее вероятно обусловлено более высоким коэффициентом размножения его в условиях естественного отбора по сравнению с другими генотипами, контролирующими синтез белков семени белого люпина.

Литература:

1. Phan H.T.T., Ellwood S.R., Adhikari K., Nelson M.N., Oliver R.P. The first genetic and comparative map of white lupin (*Lupinus albus* L.): Identification of QTLs for Anthracnose resistance and flowering time, and a locus for alkaloid content // DNA Research. 2007. V. 14(2). - P. 59-70.
2. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. - М.: Мир, 1978. - 555 с.
3. Netsvetaev V. P., Sozinov A.A. Location of a hordein G locus, Hrd G, on chromosome 5 of barley // Barley Genetics Newsletter. 1984. V. 14. - P. 4-6.
4. Нецветаев В.П. Руководство по генетическому анализу растений. - Белгород, 2008. - 34 с.

ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РАСТЕНИЯ МАЛИНЫ ПРИ ОЗДОРОВЛЕНИИ *IN VITRO*

Тихонова К.О.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства»,
Москва, 115598***

E-mail: kristina.tixonova.2014@mail.ru

Вирусные болезни вследствие высокой вредоносности и широкой распространенности являются фактором, снижающим продуктивность растений малины. В настоящее время описано около 30 вирусных болезней малины, которые переносятся с посадочным материалом, при выполнении агротехнических работ, с семенами, пылью, а некоторые не имеют известных векторов.

Исследования выполняли на базе отдела биотехнологии и защиты растений ФГБНУ ВСТИСП (в лаборатории вирусологии).

Ограничивающим широкое применение хемотерапии является фактор высокой гибели эксплантов при использовании противовирусных препаратов (АВП), а также слабое развитие эксплантов. Поэтому осуществляли оценку гибели эксплантов и определяли у них суммарную длину побегов в зависимости от химического препарата, его концентрации и МИО.

Параметры развития эксплантов малины сорта Арбат зависели от вида и концентрации АВП, а также проведения МИО.

Рибавирин приводил к высокой гибели эксплантов независимо от испытанной концентрации, проявляя более высокую токсичность по сравнению с арбидолом и кагоцелом. Магнитно-импульсная обработка снижала гибель эксплантов на среде с рибавирином в среднем по 3-м концентрациям на 9,2 % по сравнению с применением одного рибавирина. Наибольшая эффективность МИО в отношении снижения гибели эксплантов малины имела место при концентрации рибавирина 20 и 40 мг/л.

При использовании арбидола и кагоцела выход жизнеспособных эксплантов малины сорта Арбат под действием МИО повышался только в случае низкой концентрации препаратов (20 мг/л) соответственно на 19,6 и 21,9 % по сравнению с применением одних АВП. При повышении концентрации испытанных АВП, как правило, имелась тенденция к ухудшению ростовых параметров у эксплантов малины.

На малине сорта Брянское диво рибавирин в концентрациях 40 и 80 мг/л приводил к полной гибели эксплантов, в то время как на среде с кагоцелом выход жизнеспособных эксплантов составил 50–88 % .

В процессе оздоровления растений малины сорта Арбат от вируса кустистой карликовости установлена более высокая токсичность рибавирина по сравнению с кагоцелом и арбидолом. Высокие концентрации АВП ингибировали ростовые процессы у эксплантов малины. При концентрации АВП 20 мг/л МИО повышала выход жизнеспособных эксплантов на 10–22 %.

БИБЛИОТЕКА ГЕНОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АКАБАНЕ

Сухер М. М. , Сальников Н. И., Балашова Е.А.

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии
и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук, 601125,
Владимирская обл., Петушинский р-н., пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова,
стр.1*

E-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru

Болезнь Акабане – зоонозная, арбовирусная болезнь крупного и мелкого рогатого скота, характеризующаяся абортами, мертворождениями и различными пороками развития.

Первую вспышку болезни Акабане зарегистрировали в Японии, в селении Акабане в 1959 г. Этиологический агент – вирус болезни Акабане, являющийся представителем рода *Orthobunyavirus* семейства *Bunyaviridae* – впервые изолирован в Японии от *Aedes vexans* и *Culex triaeniorhynchus* в 1960 и 1964 гг., соответственно. О спорадических вспышках болезни Акабане сообщалось из Японии, Тайваня, Австралии и Израиля. В Корею первая вспышка болезни Акабане произошла в 1980 г. [2,3].

Во ВНИИВиМ для диагностики вируса болезни Акабане были предложены прямой метод флюоресцирующих антител и «Сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа, предназначенные для обнаружения антигена вируса болезни Акабане, а также непрямой метод флюоресцирующих антител и метод ингибирования твердофазного иммуноферментного анализа, предназначенные для выявления антител к вирусу болезни Акабане. [1]

Целью нашей работы является разработка тест-систем для выявления антител к вирусу болезни Акабане методом непрямого варианта ИФА с использованием

рекомбинантных белков. Первым этапом работы являлось клонирование фрагментов генов поверхностных гликопротеинов (G1, G2) вируса болезни Акабане.

Для выбора участков генов для клонирования пользовались программами: Bio Edit 7.0. с использованием протокола Hoop&Woods Scale Mean Hydrophilicity (поиск участков с наибольшим профилем гидрофильности), Unipro Ugene (анализ вторичной структуры белковых молекул), I-TASSER (моделирование пространственной структуры белковой молекулы). В результате в аминокислотных последовательностях обоих белков выбрано по 2 фрагмента длиной 220 а.о. и 290 а.о.; 130 а.о. и 114 а.о. Методом ОТ-ПЦР амплифицированы фрагменты генов G1 (5'...1775-2437...3' и 5'...3124-3997...3') и G2 (5'...131-523...3' и 5'...560-904...3') кодирующие выбранные участки соответствующих белков. Амплифицированные фрагменты выделены из геля с использованием набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США) и клонированы в составе плазмидного вектора pTZ57 R/T (Thermo Scientific, Inc) в клетках E.coli, шт. KRX (Promega, США). Трансформацию проводили с использованием метода теплового шока.

Клоны на наличие вставки проверяли методом ПЦР. Правильность последовательности вставки проверяли методом секвенирования.

Таким образом, нами получены рекомбинантные плазмиды, несущие фрагменты кДНК копий генов поверхностных гликопротеинов вируса болезни Акабане, которые дальнейшем могут быть использованы для переклонирования в экспрессирующие векторы с целью получения рекомбинантных белков.

Литература:

1. Балашова Е.А.. Разработка средств и методов лабораторной диагностики болезни Акабане. Канд. дис. Покров, 1993.
2. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М., 1989
3. Сюрин В.Н., Фомина Н.В., Самуленко А.Я., Соловьев Б.В. Вирусные болезни жвачных. М., 1989.

СОЗДАНИЕ ЧИСТЫХ ЛИНИЙ КУЛЬТУР РОДА *BRASSICA* В КУЛЬТУРЕ МИКРОСПОР

Безбожная А.В., Монахос С.Г.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева
Лаборатория генетики, селекции и биотехнологии овощных культур
Москва 127550, Пасечная ул., д.5
E-mail: luna-mars@bk.ru*

Создание чистых линий традиционными методами занимает 10 – 14 лет у видов *Brassica oleracea* L. и 5 – 7 лет – у *Brassica rapa*. Культура микроспор – быстрый и надежный способ сократить продолжительность получения чистых линий до 1-2 лет. При применении культуры микроспор получают гаплоидные растения и растения - удвоенные гаплоиды. При создании линий - удвоенных гаплоидов из селекционной схемы исключается этап трудоемкого гибридологического анализа самонесовместимости, что также облегчает селекционный процесс.

Цель работы получение чистых линий – удвоенных гаплоидов для селекции F1-гибридов. Задачи исследования: определение отзывчивости генотипов и разделение по группам отзывчивости, модификация технологии культуры микроспор с целью

повышение выхода эмбриоидов, определение регенерационной способности генотипов, определение плоидности растений-регенерантов и степени проявления самонесовместимости у полученных удвоенных гаплоидов, размножение растений - удвоенных гаплоидов.

В работе использовали протокол J.V.M. Custers (2003).

В качестве растений доноров использовали 24 генотипа белокочанной капусты различных сроков созревания, 2 генотипа капусты кольраби, 1 гибрид капусты брокколи. 10 из 24 (41,7 %) вводимых в культуру генотипов белокочанной капусты оказались неотзывчивыми к культуре микроспор. У слабоотзывчивых генотипов (<250 эмбриоидов на 100 бутонов) наблюдалась слабая регенерация. Генотипы Ак3хБю1, Мегатон, ДП2хАгр2-1 при получении небольшого числа эмбриоидов не регенерировали в растения. Среднеотзывчивые генотипы (250-500 эмбриоидов на 100 бутонов) за исключением F1 Марафон так же не отличались высокой регенерационной способностью. У высокоотзывчивых генотипов (количество эмбриоидов на 100 бут. >500) в среднем 15-25% эмбриоидов формировали проростки. Проблема прорастания эмбриоидов, регенерации растений стоит достаточно остро для увеличения выхода растений - удвоенных гаплоидов.

Для увеличения выхода эмбриоидов проводили серию экспериментов: культивирование микроспор на среде NLN-13 с разным уровнем pH (5,7; 6,1; 6,4); культивирование на среде NLN-13 с полной и половинной концентрацией макроэлементов; предварительная обработка соцветий холодом в течение 1 - 2 суток. Обработка дисперсионным анализом показала значимое увеличение выхода эмбриоидов на среде с pH 6,1 для отдельных генотипов. Для неотзывчивого генотипа Ак3хБю1 удалось получить эмбриоиды на среде с pH 6,4. Концентрация макроэлементов не повлияла на отзывчивость к эмбриогенезу. Предобработка соцветий холодом в течение суток не значительно уменьшало выход эмбриоидов и ухудшало их качество, а в течение двух суток снижало способность к эмбриогенезу до 0.

У полученных в 2013 году гаплоидов наблюдается высокий процент спонтанного удвоения от 50 до 90%. Оценка степени проявления самонесовместимости выявила, что от 75 до 100% линий, полученных от самонесовместимых гибридов Сюрприз, Этма, Парелл, Нозоми, Фарао, так же являются самонесовместимыми. При этом самосовместимые растения были найдены только среди линий - удвоенных гаплоидов из гибридов Сюрприз и Этма.

ПОЛУЧЕНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ МОРКОВИ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Чистова А.В., Монахос С.Г.

*ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева»
Лаборатория генетики, селекции и биотехнологии овощных культур
РГАУ – МСХА имени К.А.Тимирязева
127550, Москва, ул. Пасечная, д.5
E-mail: breedst@mail.ru*

Морковь является одной из важнейших овощных культур, однако ее биологические особенности усложняют ее гибридную селекцию. При этом в настоящее время существует острая проблема обеспечения овощеводческих хозяйств Российской Федерации семенами отечественных сортов и F₁-гибридов моркови. В связи с этим, для как можно более

быстрого получения F₁-гибридов моркови отечественной селекции, важной задачей является отработка методов ускоренного получения гомозиготных растений для использования их в качестве родительских линий. Одним из таких методов является получение удвоенных гаплоидов в результате *in vitro* культивирования гаплоидных клеток.

В мировой научной литературе описаны технологии получения удвоенных гаплоидов моркови в культуре пыльников, микроспор и семян. Культура изолированных микроспор потенциально является наиболее перспективной, так как вероятность получения растений из соматических тканей донорного растения минимизирована. Кроме того, культивирование микроспор может обеспечить получение большего количества растений-удвоенных гаплоидов при меньших затратах времени и труда. Однако для плодотворного практического применения данной технологии необходимы не только ее адаптация к условиям конкретной лаборатории, но и интеграция в селекционные и семеноводческие схемы.

Исходя из изложенного выше, целью данной работы было выявление возможности получения гомозиготных линий моркови в культуре изолированных микроспор для дальнейшего вовлечения их в селекционный процесс.

Для работы в качестве растительного материала использовали линии и гибридные комбинации из коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н.Тимофеева». По морфологическим признакам и с помощью цитологического анализа отбирали бутоны, пыльники которых содержали микроспоры преимущественно одноядерной стадии развития. Бутоны поверхностно стерилизовали и раздавливали в небольшом объеме питательной среды. Полученную суспензию фильтровали, центрифугировали, микроспоры дважды промывали свежей средой. Микроспоры культивировали на жидкой питательной среде NLN с добавлением активированного угля и регуляторов роста NAA и 2,4-D в темноте. После введения в культуру микроспоры подвергали высокотемпературной обработке в течение 2 суток, затем культивировали при температуре 24°C.

Через три месяца отметили формирование веретеновидных и шаровидных многоклеточных структур и эмбриоида в семядольной стадии развития, после чего микроспоры культивировали при бытовом освещении на шейкере (65 об/мин). На пятый месяц наблюдали формирование эмбриоидов у пяти из двенадцати генотипов. В зависимости от генотипа наблюдали образование от 0 до 3,5 эмбриоподобных структур, однако только 4 из 17 сформировавшихся структур достигли семядольной стадии развития. Сформировавшиеся эмбриоиды пересаживали на питательную среду B5 без добавления регуляторов роста и культивировали при 24°C и фотопериоде 16/8 часов. Прорастание происходило в течение двух-трех недель. Адаптацию к нестерильным условиям проводили в условиях теплицы.

В результате культивирования изолированных микроспор растения получили из 2 эмбриоидов. В процессе культивирования на шейкере и прорастания на твердой питательной среде наблюдали вторичный эмбриогенез, что позволило получить по несколько растений-клонов.

При наличии отработанной технологии массового получения удвоенных гаплоидов возможна интеграция метода культуры изолированных микроспор в селекционный и семеноводческий процесс. Гибридное семеноводство моркови ведут на основе цитоплазматической мужской стерильности. Свойственная моркови самонесовместимость в селекционной практике не используют, так как не известно способов ее временного преодоления. Использование технологии производства удвоенных гаплоидов позволяет исключить необходимость проведения самоопыления в ряду поколений и делает возможным получение самонесовместимых гомозиготных линий для дальнейшей оценки их комбинационной способности и семеноводства F₁-гибридов. Сохранение и репродукция этих линий также возможна в культуре *in vitro*.

Культура изолированных микроспор – перспективный способ получения удвоенных гаплоидов моркови. Оптимизация элементов этой технологии позволит реализовать генетико-селекционную схему создания F₁-гибридов моркови на основе самонесовместимости, что значительно сократит продолжительность селекционного процесса.

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ КЛЕВЕРА (*TRIFOLIUM REPENS* L.) УСТОЙЧИВЫХ К ВЫСОКИМ ДОЗАМ ИОНОВ МЕДИ МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ И ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ.

Шатунова С.А., Ермошин А.А.

*Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина, Россия, 620002, г.Екатеринбург, ул.Мира, д. 19
E-mail: shatunova.sa@gmail.com*

Активная антропогенная деятельность приводит к загрязнению окружающей среды тяжелыми металлами, в частности ионами меди. Особую актуальность эта проблема имеет для Урала, где традиционно добывают и перерабатывают медь.

В настоящее время интерес получает создание растений-гипераккумуляторов и исключителей, с целью возвращения загрязненных земель в хозяйственное использование.

Целью данной работы является получение устойчивых растений клевера ползучего к высоким дозам ионов меди.

Клевер был выбран нами как космополитное, ценное кормовое, медоносное и сидератное растение, которое может быть также использовано в качестве декоративного.

Для получения растений, устойчивых к высоким дозам ионов меди нами выбраны две стратегии: клеточная селекция и генная инженерия. Мы предположили, что введение в растение агробактериального гена *tmr1*, отвечающего за синтез цитокининов, может придать растениям устойчивость к действию многих стрессов, в том числе и к тяжелым металлам. Нами проведена агробактериальная трансформация, в ходе которой мы выяснили, что у клевера ползучего больше всего для этих целей подходят черешки, тогда как листовые экспланты быстро отмирают. После первого пассажа были жизнеспособны 53% листовых эксплантов и 71% черешков. После второй пересадки выжило 1% листовых эксплантов и 56% эксплантов черешка. Каллусогенез наблюдался у 31% выживших листовых эксплантов и у 91% эксплантов черешка.

Если говорить о клеточной селекции, то ранее нами была применена ступенчатая селекция, при которой каллус индуцировался на среде, не содержащей токсикант, а дальше пассивирование проходило на средах с возрастающей концентрацией ионов меди. При такой постановке эксперимента каллусы быстро теряли морфогенность. Мы опробовали иную схему опыта: проведение каллусогенеза сразу на среде с содержанием ионов меди. Для этого изначально были взяты две концентрации ионов меди: 75 мкМ и 125 мкМ, которые не были летальными для растений клевера, но показывали токсичный эффект. Через месяц жизнеспособные экспланты (33% на среде с содержанием 75 мкМ ионов меди и 17% на среде с содержанием 125 мкМ ионов меди) были перенесены на среду с повышенным содержанием ионов меди: 125 мкМ и 200 мкМ соответственно. Контроль показал 57% жизнеспособных эксплантов.

В дальнейшем нами планируется получить растения-регенеранты и исследовать морфофизиологические механизмы устойчивости растений клевера к высоким дозам ионов меди.

**ВЛИЯНИЕ СВЕТОДИОДНЫХ ЛАМП РАЗНОГО СВЕТА НА
МОРФОГЕНЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК *ASTRAGALUS
MONGHOLICUS* BGE. И *ASTRAGALUS ADSURGENS* PALL. В УСЛОВИЯХ
IN VITRO**

Энхтайван А.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
факультет агрономии и биотехнологии, кафедра генетики, биотехнологии, селекции
и семеноводства, 127550, Москва, Россия,
E-mail: altantsetseg_916@yahoo.com*

Процессы морфогенеза зависят от ряда взаимосвязанных факторов, таких как гормональный и минеральный состав питательной среды, а также факторов физической природы, среди которых выделяется свет – регулирующий не только процесс морфогенеза, но и синтез вторичных метаболитов.

В работе изучали влияние светодиодных ламп белого света, красного света, красного и синего света на морфогенетическую активность культивируемых микропобегов астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Bge.) и астрагала приподнимающегося (*Astragalus adsurgens* Pall.) в условиях *in vitro* на средах, содержащих разные гормоны (БАП, 2ip, Дропп, НУК), а также на безгормональной среде. В качестве контроля было взято освещение люминесцентными лампами.

Проведенные исследования позволили заключить, что для астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Bge.) применение в технологии клонального микроразмножения разных светодиодных ламп (белый, красный, красный и синий свет) не является эффективным. Это связано с тем, что данные лампы не оказывали существенного влияния на такой важный показатель как коэффициент размножения (количество побегов, образовавшихся на одном экспланте в течение одного пассажа). Наилучшие результаты для данного вида были получены при использовании стандартных условий культивирования – применение люминесцентных ламп. Однако полное отрицание применения светодиодных ламп при клональном микроразмножении астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Bge.) не совсем корректно, так как в условиях применения светодиодных ламп красного и синего света наблюдали формирование корневой системы у микропобегов, что не было характерно для стандартных условий культивирования.

Что касается астрагала приподнимающегося (*Astragalus adsurgens* Pall.), то полученные результаты свидетельствуют о том, что светодиодные лампы оказывают влияние на морфогенетический потенциал культивируемых тканей. Причем этот процесс коррелирует с гормональным составом питательной среды. Наилучшие показатели по индукции образованию адвентивных почек и росту микропобегов были получены при использовании светодиодных ламп красного и синего света. Причем эти учитываемые показатели не зависели от изучаемого состава питательной среды. Кроме того, в варианте освещения красным и синим светом наблюдалось формирование мощной, разветвленной корневой системы, что не было отмечено в других вариантах.

РАСТЕНИЯ *ARABODOPSIS THALIANA* С ИНТЕГРИРОВАННЫМ ГЕНОМ ФИТАЗЫ БАКТЕРИИ *PANTOEA AGGLOMERANS*

Трошагина Д.С., Валеева Л.Р., Нямсурэн Ч.

*Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования « Казанский (Приволжский) Федеральный Университет», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, ул. Кремлевская, 18, 420009
E-mail: dashunka@mail.ru*

Фосфор является ключевым компонентом различных биомолекул. Соединения этого элемента играют важную роль в контроле и регуляции множества ферментативных реакций и метаболических путей как на клеточном, так и организменном уровнях. Животные получают фосфор с пищей, растения и почвенные микроорганизмы непосредственно из почвы. Во многих типах почвы этот элемент находится в недоступной для растений форме в составе нерастворимых фитатов, что ограничивает урожайность растений. Поэтому задача оптимизации фосфорного питания культурных растений актуальна. Большую часть (30-50%) органического фосфора почвы составляет фитат (мио-инозитол гексакисфосфаты). Растительные организмы не могут самостоятельно расщеплять это соединение до легко усвояемых остатков фосфорной кислоты и мио-инозитола. Такой способностью обладают почвенные микроорганизмы, в частности, бактерии и микромицеты, которые синтезируют ферменты фитазы для гидролиза фитата и утилизации почвенного фосфора. Поэтому, одним из перспективных направлений для улучшения фосфорного питания растений является получение трансгенных растений, несущих ген фитазы бактериального происхождения.

Целью работы являлось получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, содержащих ген фитазы бактерии *Pantoea agglomerans* (*paPhyC*) под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты *CaMV 35S*.

Растения трансформировали рекомбинантными бактериями *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущими ген бактериальной фитазы *paPhyC*, ген устойчивости к селективному гербициду BASTA, сигнальную последовательность гена экстенсина *ex* (из корней растений), *His-Strep-tag* последовательности и вирусный промотор *CaMV 35S*. Нами получены линии растений с единичной копией гена, что было подтверждено с помощью ПЦР с использованием праймеров к гену бактериальной фитазы. Экспрессию модифицированного гена *paPhyC* на транскрипционном уровне подтвердили секвенированием продуктов амплификации кДНК. Методом иммуноблоттинга установили образование белка фитазы в тканях трансгенных растений. Молекулярный вес продукта соответствовал молекулярной массе бактериальной фитазы (42 кДа). Исследования направлены на выяснение влияния экспрессии гена фермента на растительный организм в различных условиях выращивания трансгенных растений на почвах с разным содержанием фосфора.

Создание конструкций, обеспечивающих секрецию микробного фермента в ризосферу, является важным этапом для решения проблемы фосфорного питания растений.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ И ПОТОМСТВ ОТ СРЕЩИВАНИЯ СОРТОТИПОВ СВЁКЛЫ РОДА *BETA*

Федулова Т.П., Федорин Д.Н.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», 396030, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, д.86
E-mail: biotechnologiya@mail.ru*

Исходный материал является основой любой селекционной программы. От степени его разнообразия, генетической изученности зависит успех селекционной работы. Внутривидовое генетическое разнообразие свёклы сравнительно невелико. Современные сорта и гибриды свёклы имеют узкую генетическую основу, так как в селекции используют в основном близкородственные источники ЦМС и высокопродуктивные сростноплодные опылители. В связи с этим необходима тщательная оценка исходного материала по комплексу молекулярно-генетических и хозяйственно-ценных признаков.

Цель исследований – выявление полиморфизма RAPD - и SSR – маркеров, характеризующих генетическую изменчивость селекционных материалов свёклы рода *Beta*.

В качестве материалов для исследований были использованы проростки следующих разновидностей корнеплодной свеклы: кормовой красной и белой свёклы; мужскостерильные образцы сахарной свёклы; гибридные комбинации с их участием; гибриды сахарной свёклы иностранной селекции Магикан и Рина (фирмы Сесвандерхаве), предоставленные лабораториями исходного материала и ЦМС.

Геномная ДНК была выделена из 0,2 г зеленых листьев растений свёклы с помощью гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформного метода с использованием СТАВ. Качество выделенной ДНК будет определено электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученная ДНК растворена в 10 мМ трис-НСI-буфер, рН 8,0, содержащим 0,1 мМ ЭДТА и использована для ПЦР-анализа. ПЦР-анализ проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация при 95⁰С в течение 10 минут, затем 30 циклов: 95⁰С-40с, 62⁰С-40с, 72⁰С-40с и финальный этап элонгации цепи 72⁰С- 5 мин. В качестве праймеров использовали умеренно повторяющиеся последовательности нуклеотидов PawS 5, PawS 6, PawS 16, к семейству ретротранспозонов (Rogovsky e.a., 1991) и праймеры к микросателлитным последовательностям (Smulders, 2010).

В результате ПЦР-анализа геномных ДНК растений родительских форм (МС-растений сахарной, кормовой свёклы) и гибридов с их участием с праймерами к микросателлитному локусу Bvv32 выявлен общий продукт амплификации длиной около 140 п.н., что указывает на некоторое сходство их генетического материала. Образец сахарной свёклы МС1090 имеет дополнительную копию данной сателлиты длиной около 400 п.н. Во всех исследованных генотипах свёклы по микросателлитному локусу Bvv53 ампликоны соответствуют теоретическим значениям – около 226 п.н. Дополнительные ПЦР - продукты одинаковой длины обнаружены в образцах МС 1090, Рика и МС 1431 предполагается, что данная сателлита имеет одинаковое положение на физической карте ДНК в геноме данных форм. Образцы МС 1102, МС 1090, ОП 1198, ОП 1203, F₁ 1195, F₁ 1199 имеют одинаковый профиль с генспецифическими праймерами для микросателлиты

Vvv43 длиной около 250 п.н. Сателлита Vvv43 имеет дополнительное, редуцированное по размеру, проявление в формах МС 1090 и многосемянном опылителе ОП 1198. Материнская форма МС 1090 характеризуется дублированной копией данной сателлиты, что свидетельствует о ее разнородном расположении на физической карте геномов разных форм свёклы.

В составе всех геномов исследованных материалов с праймерами Vvv21 обнаружен общий продукт амплификации длиной около 250 п.н. Не выявлено генетических отличий в продуктах амплификации с праймерами к микросателлитному локусу Vvv23, ампликоны соответствуют теоретическим значениям – около 110 п.н. Многосемянный опылитель ОП 1203 имеет дополнительные проявления сателлиты Vvv30 в своем геноме с длинами около 500 и 1000 п.н., что может быть генетическим маркером для его идентификации. При амплификации с праймерами для микросателлиты Vvv60 во всех исследуемых формах свеклы обнаруживается по три ПЦР-продукта с длинами 250, 450 и 700 п.н. Образцы МС 1102, МС 1090, ОП 1198, F₁ МС94 х кормовая красная р.19, F₁ МС94х кормовая красная р.9, МС94, Рина и МС1431 имеют дополнительную сателлиту в своем геноме с длиной 1000 п.н. Сходными по набору ПЦР-продуктов по микросателлите Vvv64 являются: МС 1102, ОП 1198, К-53, Магикан и Рина, что свидетельствует об их некоторой генетической близости. В исследуемых формах свёклы: МС 1090 и МС 94 обнаруживается по два ПЦР-продукта с длинами 400 и 800 п.н. Селекционные материалы ОП 1203 и МС 1431 характеризуются отличным набором ПЦР - продуктов от остальных образцов, с сохранением общего в 800 п.н. Гибриды F₁ 1199 и F₁ 1195 имеют всего по одной копии данной сателлиты, размер которой оставляет 200 п.н., что отличает их от других образцов по данному микросателлитному локусу.

Кроме молекулярно - генетической идентификации изученных образцов была проведена биоморфологическая их оценка. Полученные результаты свидетельствуют об отличии результирующего признака (масса корнеплода) от компонентных (длина и диаметр корнеплода) по характеру их наследования. По каждому из компонентных признаков амплитуда распределения гибридов F₁ не выходит за пределы совокупной изменчивости обеих родительских форм. Превышение этих пределов в виде гетерозиса и трансгрессии над материнской формой происходит только по результирующему признаку – массе корнеплода в среднем в 1,2 раза. Гетерозиготные гибриды F₁ от скрещивания МС – растений сахарной свёклы с узкоконической формой корнеплода с удлиненно-конической кормовой свёклой характеризовались гетерозисом, обусловленным неполным доминированием большей выраженности компонентного признака (диаметр корнеплода). Результаты наблюдений за окраской корнеплода показали, что у гибридов F₁ №1446 преобладала отцовская красная окраска корнеплодов, а у гибрида F₁ №1447 соотношение красно – и белоокрашенных корнеплодов составило примерно 1:1, что соответствует менделевскому типу наследования, т.е. доля потомков с доминантным типом экспрессии генов выше, чем рецессивных. По форме корнеплода в гибридном потомстве в основном преобладала материнская форма – удлиненно – коническая.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены экспериментальные данные по молекулярно-генетической структуре селекционных материалов свёклы рода *Beta* для создания трансгрессивных форм свёклы на основе ДНК-маркеров.

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ АСТРАГАЛА МОНГОЛЬСКОГО И БЕРЕСКЛЕТА КАРЛИКОВОГО

Кузьмина Е.А., Энхтайван А.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, факультет агрономии и биотехнологии, кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства, 127550, Москва, Россия
E-mail: elenka291090@mail.ru

В настоящее время наблюдается все больший интерес к лекарственным средствам на растительной основе. Из 250000-500000 видов высших сосудистых растений планеты около 80000 имеют лекарственное значение. Однако лишь 0.5% из них прошли скрининг на выявление лекарственных свойств. Использование лекарственных растений в будущем может быть существенно ограничено в связи с проблемой снижения их биоразнообразия, вследствие интенсивной, нерациональной, недостаточно контролируемой заготовки сырья. В этой связи особенно актуальным является поиск альтернативных источников лекарственного сырья. Перспективным подходом к получению такого сырья является выращивание лекарственных растений *in vitro*. Использование клеточной биомассы позволяет не только получать экологически чистое сырье, но и сохранять имеющийся генофонд лекарственных растений.

В настоящее время является актуальным поиск новых биологически активных соединений, получаемых из растительного сырья, обладающих противоопухолевыми свойствами. Ряд препаратов, полученных на основе вторичных метаболитов растений, широко используется в клинической практике при лечении различных типов рака на территории Российской Федерации (этопозид, винбластин, таксол и др.). Например, корень астрагала монгольского используется как в традиционной, так и в народной медицине, в том числе и как средство для лечения опухолей различного типа.

В нашей работе была изучена цитотоксичность растительных экстрактов, полученных из микропобегов астрагала монгольского и бересклета карликового, выращенных в культуре *in vitro*. В качестве тест-системы были использованы раковые клетки линии HeLa (рак шейки матки человека). Экстракты получали из микропобегов, культивируемых в разных условиях (гормональный состав питательной среды, условия освещения).

Исследования показали, что культивирование микропобегов астрагала монгольского и бересклета карликового на питательных средах в присутствии БАП или препарата Дропп существенно повышало цитотоксичность экстрактов, полученных из растительной биомассы двух изучаемых видов. Кроме того установлено, что светодиодные лампы красного и синего света существенно изменяли метаболизм растения, что проявлялось на усилении цитотоксичности экстрактов.

Таким образом, впервые для астрагала монгольского и бересклета карликового получены и изучены растительные экстракты и установлена их цитотоксичность на рост раковых клеток M-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, сублиния HeLa, клон M HeLa).

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ В СЕМЕНОВОДСТВЕ ОЗДОРОВЛЕННОГО КАРТОФЕЛЯ

Хабарова Л.Н., Полякова М.Н., Пастухов С.А., Чередниченко М.Ю.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
Москва 127550*

E-mail: lyudmila.khabarova48@gmail.com

Картофель – одна из основных культур, возделываемых в растениеводстве. В мировом производстве продукции растениеводства картофель занимает одно из первых мест наряду с рисом, пшеницей, кукурузой.

Важнейшим звеном современной индустрии картофеля является хорошо налаженная система семеноводства [1]. Биотехнологические методы, которые широко и успешно используются в картофелеводстве, позволяют решить одну из главнейших проблем семеноводства картофеля, а именно накопление и передачу вирусов в потомстве.

Согласно схеме последовательных этапов семеноводства картофеля, цепочка производства начинается с *in vitro* материала, и именно эти растения, выращенные в пробирках, должны закладывать уверенный старт для успешного прохождения остальных этапов семеноводства.

В связи с этим, хотелось бы отметить несколько весьма актуальных производственных проблем, связанных с пробирочными микрорастениями:

- 1) Высокие затраты на получение микроклубней (в пробирках или колбах);
- 2) Трудности получения крепких растений, готовых к клонированию или высадке в кассеты с торфом, в сравнительно короткий промежуток времени;
- 3) Обламывание стеблей микрорастений при высадке из пробирок в кассеты с торфом, что приводит к проблемам с приживаемостью растений

Для решения ряда этих проблем, необходимо улучшение и удешевление технологии получения микроклубней оздоровленного семенного картофеля путем получения исходных высококачественных материнских растений с высоким потенциалом роста в культуре *in vitro*.

Известно, что устойчивость всех организмов в той или иной степени зависит от устойчивости клеточных мембран. Кремний присутствует в волокнах механических тканей всех растений и придает прочность опорному скелету[2]. К тому же, увеличивает эффективность фотосинтеза - главного процесса жизнедеятельности растения. Кремний принимает участие в процессах обмена белков и углеводов, способствует активному росту, как корневой системы, так и вегетативной массы. Он увеличивает поглощение растениями фосфора, стимулирует лучшее усвоение азота растениями.

Широко используемые в биотехнологии агаризованные питательные среды для выращивания растений не содержат в своем составе источников кремния. Все вышесказанное создает перспективные предпосылки для использования кремния в технологии *in vitro*.

Можно ожидать, что добавление кремния в питательную среду поможет в решении проблемы пересадки растений, выращенных *in vitro*, как в тепличные условия, так и в полевые, за счет повышения устойчивости тканей к механическим воздействиям, простимулирует более быстрый рост пробирочных растений без ущерба к потреблению всех необходимых элементов.

На основании вышесказанного сформировалась цель работы: изучение влияния кремния в составе питательной среды Мурасиге и Скуга (MS) на микрорастения картофеля.

В задачи исследования входит:

- подбор оптимальных концентраций источников кремния;
- изучение влияния источников кремния на морфо-физиологические параметры пробирочных растений картофеля;
- изучение последствий источников кремния – оценка морфо-физиологических параметров, продуктивности растений картофеля в условиях закрытого грунта;
- оценка роста, развития и продуктивности растений в условиях открытого грунта.

Была проведена серия предварительных опытов по подбору концентраций и источников кремния на группе перспективных сортов картофеля. В результате не было выявлено ингибирующего воздействия тестируемых препаратов. В качестве источников кремния был выбран экспериментальный препарат – хелат кремния ЭДТА, любезно предоставленный ГК «Элитные Агросистемы» и силикат натрия, широко известный как «натриевое жидкое стекло». Хелат кремния ЭДТА и «натриевое жидкое стекло» содержат по 13 г/л SiO₂.

Для приготовления сред, содержащих данные источники кремния, оба препарата разводили дистиллированной водой в соотношении 1:10 (1 часть препарата на 10 частей дистиллированной воды). Материалом исследования служили растения-регенеранты раннего сорта Ред Скарлетт.

Для изучения воздействия различных источников кремния на рост и развитие в условиях *in vitro* закладывали лабораторный опыт по следующей схеме:

Варианты:

1. Контроль (MS); 2. MS + 3 мл/л хелат кремния (39 мг/л SiO₂); 3. MS + 3 мл/л силикат натрия (39 мг/л SiO₂); 4. MS + 30 мл/л хелат кремния (390 мг/л SiO₂).

Изучалось по 100 растений на каждый вариант. Растения были помещены в аналогичные условия. Оценка морфо-физиологических параметров проводили через 14 и 21 день после пассирования. Определяли высоту, количество узлов, длину корней (на 21-й день) микрорастений.

Экспериментальные данные, полученные в опыте, подвергали математической обработке методом дисперсионного анализа, оценка значимости действия изучаемого фактора проводилась по критерию Фишера.

В результате проведения статистической обработки опыта было выявлено, что есть существенные различия между вариантами, добавление кремния в питательную среду стимулирует рост и образование узлов у микрорастений картофеля в культуре *in vitro*.

Наибольший стимулирующий эффект дал вариант 3 мл/л хелат Si, это объясняется тем, что на 21-й день развития после пассирования растения имели максимальные высоту среди других вариантов, составляющую 80 мм, количество узлов – 5,5 шт., и длину корней – 56,81 мм. При этом в контрольном варианте высота растений составляла 71,73 мм, количество узлов – 4,84 шт., длина корней – 29,3 мм.

В дальнейшей работе планируется изучение последствий источников кремния в условиях закрытого грунта и оценка роста, развития и продуктивности растений в условиях открытого грунта.

Литература

1. Анисимов Б.В., Юрлова С.М., Семенова Л.Н. Организационные основы, современные методы и особенности оригинального, элитного и репродукционного семеноводства картофеля. - ВНИИКХ им. А.Г. Лорха.
2. Кремний для растений: прочность опорного скелета [Электронный ресурс]. - URL: <http://pharmacognosy.com.ua/index.php/makro-i-mikro-chudesa/kremniy-elasticnost-sosudov/kremniy-dlya-rasteniya-prochnost-opornogo-skeleta> (дата обращения: 20.02.2015).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ХРОМОСОМНОГО СОСТАВА ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ЧУЖЕРОДНЫМИ ХРОМОСОМАМИ

Чуманова Е.В., Ефремова Т.Т., Арбузова В.С., Трубачеева Н.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск 630090

E-mail: chumanova@bionet.nsc.ru

Хромосомы чужеродных видов злаков, обладающих ценными адаптивными признаками, могут быть интрогрессированы в мягкую пшеницу при получении замещенных или транслоцированных линий [1, 2]. Для этого были разработаны специальные методы, позволяющие замещать отдельные хромосомы пшеницы на гомологичные хромосомы других видов злаков. При работе с пшенично-чужеродными линиями важное значение приобретает выявление чужеродного генетического материала. В настоящее время в качестве основных методов идентификации чужеродных хромосом в геноме пшеницы широко используются геномная гибридизация *in situ*, дифференциальное окрашивание хромосом, молекулярно-генетическое маркирование, использование морфологических маркеров. ПЦР маркеры являются эффективным инструментом для выявления специфических последовательностей ДНК. Использование молекулярных маркеров позволяет получать информацию о признаке уже на ранних стадиях развития растения, не дожидаясь фенотипического проявления признака, упрощает тестирование устойчивости к различным заболеваниям, требующих кропотливой оценки традиционными методами исследования.

Ранее были получены линии с замещениями и транслокациями хромосом от ржи *Secale cereale* L. ($2n = 2x = 14$) и дикого вида ячменя *Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum* Hudson $4x$ ($2n = 4x = 28$) [3, 4]. Однако оценка хромосомного состава полученных линий не проводилась. Целью данной работы являлась идентификация хромосомного состава пшенично-ржаных и пшенично-ячменных линий с использованием геномной *in situ* гибридизации и молекулярных маркеров и изучение особенностей передачи хромосом ячменя и пшеницы через гаметы.

На основе цитологического анализа метафазы I мейоза (МКП) были выделены стабильные 42-хромосомные пшенично-ржаные линии. С использованием геномной *in situ* гибридизации (GISH) показано присутствие пары хромосом ржи у линий с 5R(5A) и 5R(5D) замещением хромосом по сортам Мироновская крупнозерная и Пиротрикс 28. У одной из линий с комплексной устойчивостью к грибным заболеваниям была идентифицирована целая хромосома ржи 5R и транслокация T1RS.1BL (5R(5D)+T1RS.1BL), у другой линии наряду с T1RS.1BL обнаружена новая Робертсоновская транслокация T5AS.5RL, возникшая путем объединения короткого плеча хромосомы 5A пшеницы и длинного плеча хромосомы 5R ржи (T5AS.5RL+T1RS.1BL). Для подтверждения цитологических данных были использованы рожь-специфичные маркеры. С использованием маркеров SCM9 и Sec1Gene [5, 6] идентифицировано присутствие короткого плеча хромосомы 1R у пшенично-ржаных линий. Кроме того, у линий, содержащих T1RS.1BL с помощью молекулярных маркеров показано присутствие генов *Lr19* (маркер SCS265) [7] и *Lr26* (iag95) [8], которые обеспечивают устойчивость к бурой ржавчине в условиях г. Новосибирска. Показано, что использование BAMR маркера к гену β -амилазы ржи, разработанного Leach and Dundas [9], позволяет быстро и надежно идентифицировать присутствие длинного плеча хромосомы 5R у пшенично-ржаных линий с замещениями и транслокациями.

Таким образом, совместное использование GISH-анализа и рожь-специфичных маркеров позволяет выявлять наличие замещений и транслокаций у изученных пшенично-ржаных линий.

Выделены цитологически стабильные 42-хромосомные дителосомные пшенично-ячменные замещенные линии (20^{2n+t}) по хромосомам седьмой гомеологической группы. С помощью GISH идентифицировано присутствие телоцентрической хромосомы ячменя. Изучены особенности передачи хромосом ячменя и пшеницы через гаметы в потомстве рецiproкных гибридов [$21^{2n} \times F1(20^{2n} + I'_w + t'_{7H})$] пшенично-ячменных дителосомных линий и показано, что чужеродная хромосома 7HL ячменя лучше передается через пыльцу. Выявлена относительно высокая конкурентная способность 21-хромосомной гаметы ($20+t_{7H}$).

Литература:

1. Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. et al. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // *Euphytica*. 1996. Vol. 91. P. 59 – 87.
2. Molnár-Láng M., Linc G., Szakács E. Wheat–barley hybridization: the last 40 years// *Euphytica*. 2014. Vol. 195. P. 315 – 329.
3. Efremova T.T., Maystrenko O.I., Arbuzova V.S. et al. Effect of alien 5R(5A) chromosome substitution on ear-emergence time and winter hardiness in wheat-rye substitution lines // *Euphytica*. 2006. Vol. 151. P. 145 – 153.
4. Efremova T., Arbuzova V., Trubacheeva N. et al. Substitution of *Hordeum marinum* ssp. *gussoneanum* chromosome 7HL into wheat homoeologous group-7// *Euphytica*. 2013. Vol. 192. P. 251 – 257.
5. Saal B., Wricke G. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.) // *Genome*. 1999. V. 42. P. 964 – 972.
6. Yamamoto, M., Mukai, Y. High-resolution physical mapping of the secalin-1 locus of rye on extended DNA fibers. *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 109. P. 79–82.
7. Prins R, Groenewald J.Z., Marais G.F., Snape J.W., Koebner R.M.D. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genet.* 2001. V. 103. P. 618–624.
8. Mago R., Spielmeyer W., Lawrence G.J. et al. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines // *Theor. Appl. Genet.* 2002. Vol.104. P. 1317 – 1324.
9. Leach R.C., Dundas I.S. Single nucleotide polymorphic marker enabling rapid and early screening for the homoeolocus of β -amylase-R1: a gene linked to copper efficiency on 5RL // *Theor. Appl. Genet.* 2006. Vol. 113. P. 301 – 307.

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ SSR МАРКЕРА XGDM35 ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНА LR41 У ОБРАЗЦОВ AEGILOPS CYLINDRICA HOST

Колесова М.А., Тырышкин Л.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства имени Н.И. Вавилова», отдел генетики, Санкт-Петербург-Пушкин, 196600
E-mail: markolesova@yandex.ru

В нашей стране листовая ржавчина пшеницы (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss.) встречается во всех регионах возделывания культуры. Лучшим способом борьбы с болезнью является выращивание устойчивых сортов. В настоящее время в генофонде *Triticum aestivum* L. количество ювенильных (а, вероятно и возрастных) эффективных

генов устойчивости к листовой ржавчине крайне ограничено. Вследствие этого расширение генетического разнообразия пшеницы по устойчивости к болезни является актуальной задачей. Одним из способов ее решения – интрогрессия генов от диких родичей *T. aestivum*, в том числе и от представителей рода *Aegilops* L.

Ранее при изучении 295 образцов *Ae. cylindrica* Host из Мировой коллекции Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова были выделены 62 устойчивые к листовой ржавчине формы (Михайлова, 2006). В нашем исследовании при переоценке практически полной коллекции данного вида (491 образец) выделены только 2 высокорезистентные в ювенильной стадии роста формы *Ae. cylindrica*: к-1214 (Армения) и к-3058 (Украина). По литературным данным у одного из устойчивых образцов этого вида присутствует ген *Lr41* (Singh et al., 2004), первоначально идентифицированный у интрогрессивной линии мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. tauschii* Coss. Ген *Lr41* локализован на коротком плече хромосомы 2D мягкой пшеницы и тесно сцеплен с микросателлитным локусом *Xgdm35* (Singh et al., 2004).

Цель настоящей работы – изучить возможность использования SSR маркера *Xgdm35* для идентификации гена устойчивости к листовой ржавчине пшеницы *Lr41* у образцов *Ae. cylindrica*.

Материалом исследования служили 53 образца *Ae. cylindrica* из коллекции ВИР.

Тотальную ДНК выделяли из листьев 10-дневных проростков микрометодом в пробирках типа Eppendorf по методике, предложенной К. Эдвардсом с соавторами (Edwards et al., 1991) с модификациями (Дорохов, Клоке, 1997). Концентрация ДНК в рабочем растворе составляла приблизительно 50 нг/мкл.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием праймеров к микросателлитному локусу *Xgdm35*: GDM35-L (5' - CCT GCT CTG CCC TAG ATA CG -3') и GDM35-R (5' - ATG TGA ATG TGA TGC ATG CA -3') (Pestsova et al., 2000) в амплификаторе фирмы Perkin Elmer по следующей программе: 4 мин. при температуре 94°C; 45 циклов (30 сек. – 94°C, 30 сек. – 55°C, 30 сек. – 72°C); финальная элонгация 5 мин. при 72°C (Chelkowski et al., 2003; Singh et al., 2004).

Аmplифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле. Гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,5 мг/л) и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. В качестве контроля использовали: образец мягкой пшеницы KS90WGRC10, имеющий данный ген резистентности и восприимчивый к болезни сорт Ленинградка.

Для идентификации гена *Lr41* у двух выделенных по устойчивости образцов *Ae. cylindrica* (к-1214 и к-3058) проводили фитопатологический тест: отрезки листьев 10-12 дневных проростков длиной 0,8-1 см помещали в кюветы на смоченную водой вату и инокулировали 2-мя клонами *P. triticina*, вирулентным к образцу мягкой пшеницы KS90WGRC10 (ген *Lr41*) (Тырышкин, 2006). Клоны с данным фенотипом встречаются в популяции патогена с крайне низкой частотой. После инокуляции кюветы оборачивали полиэтиленовой пленкой, накрывали стеклом и помещали в темное место на сутки, затем пленку снимали. Кюветы, накрытые стеклом, переносили на светустановку.

Учет типа реакции проводили на 7-й день после заражения по общепринятой шкале (Mains, Jackson, 1926).

Специфический продукт амплификации ДНК размером 190 п.о. (Singh et al., 2004) выявлен только у позитивного контроля – образца мягкой пшеницы KS90WGRC10.

Продукты амплификации с использованием праймеров к микросателлитному локусу *Xgdm35* отсутствовали у 2-х устойчивых к болезни образцов *Ae. cylindrica*. Однако оба этих образца были восприимчивы к клонам, вирулентным к гену *Lr41* (тип реакции 3); крайне низкая частота встречаемости таких клонов в популяции возбудителя ($< 1 \times 10^{-5}$) позволяет предполагать, что образцы, восприимчивые к клонам, защищены только

соответствующим геном устойчивости и не имеют дополнительных высокоэффективных генов.

Таким образом, микросателлитный маркер *Xgdm35* не может быть использован для идентификации гена *Lr41* у образцов *Ae. cylindrica*; для выявления данного гена у образцов эгилопсов предлагается использовать фитопатологический тест, либо гибридологический анализ.

ПОИСК И РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К СОСУДИСТОМУ БАКТЕРИОЗУ У КАПУСТЫ ПЕКИНСКОЙ

Елышко Н.В.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
Лаборатория генетики и биотехнологии овощных культур, Москва, ул. Пасечная д.5,
127550*

E-mail: elyshko@yandex.ru

В работе был проведен скрининг полиморфизма коллекции RAPD-маркеров на устойчивых и восприимчивых к сосудистому бактериозу линиях капусты пекинской, а также дифференциация растений расщепляющихся популяций по устойчивости/восприимчивости на искусственном инфекционном фоне. В результате были выделены потенциальные RAPD маркеры, обнаруживающие полиморфизм.

Сосудистый бактериоз - заболевание, вызываемое бактериями *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pamm.) Dow (Xcc), которые являются одними из наиболее вредоносных патогенов крестоцветных во всем мире. Наиболее эффективным методом борьбы с сосудистым бактериозом является использование устойчивых сортов и гибридов. Донорами устойчивости к разным расам сосудистого бактериоза являются *B.juncea*, *B.carinata*, *B.rapa*.

Использование молекулярных маркеров в селекции растений на устойчивость к патогену позволяет значительно ускорить и повысить эффективность отбора растений на устойчивость к различным популяциям патогена, в его отсутствии.

Цель данной работы – поиск и разработка молекулярного маркера гена устойчивости к сосудистому бактериозу у капусты пекинской.

Для дифференциации растений по устойчивости/восприимчивости на искусственном инфекционном фоне была проведена инокуляция *Xanthomonas campestris* Dows. pv. *campestris* (Pammel) Dowson расами 1 (штамм NZ 276), 3 (штамм NZ 306), 4 (штамм NZ 277). В результате оценки устойчивости/восприимчивости образцов капусты пекинской выявлена устойчивость растений линии КК и *B. carinata* Pi 199947; гибриды от реципрокного скрещивания F1 КК*20-3Ce2 и F1 20-3Ce2*КК, оказались восприимчивы к 1 расе патогена, но проявили устойчивость к 3 и 4 расам.

В популяции F2(КК*20-3Ce2)1 расщепление по устойчивости/восприимчивости 2 3 и 4 расам соответствует теоретически ожидаемому расщеплению моногенно-доминантной теории наследования 3:1. Расщепление в потомстве BC1S(КК*20-3Ce2)*20-3Ce2 также соответствует ожидаемому расщеплению 1:1 по устойчивости и восприимчивости к сосудистому бактериозу.

Для поиска молекулярного маркера сцепленного с геном устойчивости был проведен скрининг коллекции RAPD праймеров на устойчивых и восприимчивых к сосудистому бактериозу растениях родительских линий с использованием сегрегационного анализа BSA (bulk segregant analysis). В результате было выделено 20 праймеров, которые обнаруживают 29 полиморфных локуса (маркера), из них 17 у

устойчивой и 12 у восприимчивой линий соответственно. Каждый из выделенных полиморфных локусов является потенциальным маркером доминантного или рецессивного аллеля устойчивости.

ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ МЯТЫ БОЛОТНОЙ (*MENTHA PULEGIUM* L.)

Мубарак М.М.^{1,2}, Чередниченко М.Ю.¹

¹ *Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, 127550 Москва, Тимирязевская ул., 49*

² *Университет Даманхур, 22516 Даманхур, Египет, Элабадия-комплекс*
E-mail: drmaneea1981@hotmail.com, michael.tsch@gmail.com

Семейство Яснотковые (Lamiaceae), или Губоцветные (Labiatae), включающее такие лекарственные травы, как *Mentha*, *Thymus*, *Marjorana*, *Rosmarinus*, *Coleus* и *Ocimum*, является одним из самых важных семейств лекарственных растений, содержащих антиоксиданты [1, 2, 3]. В нашем исследовании изучались растения мяты (род *Mentha*). Род Мяты включает травянистые растения, многолетние, ароматические, обладающие благодаря эфирному маслу сильным запахом. Систематика рода затруднена его фенотипической пластичностью и генетической изменчивостью, так как многие виды способны образовывать спонтанные гибриды [4]. Мята болотная (*Mentha pulegium* L.) является экономически важным источником эфирного масла и природных антиоксидантов. Основным компонентом эфирного масла данного вида является пулегон (марокканское масло содержит до 96 % пулегона), который может быть предшественником при синтезе ментола и ментофурана. Эфирное масло *Mentha pulegium* L. используется в фармацевтической и косметологической промышленности.

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 соматического органогенеза у растений мяты болотной сортов Пеннироял и Соня.

По результатам экспериментов для стерилизации семян сорта Соня можно рекомендовать обработку 5 %-ным раствором гипохлорита 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 с добавлением ауксинов и цитокининов в различной концентрации и соотношении. У сорта Пеннироял при использовании в качестве экспланта сегментов листовой пластинки стеблевой органогенез был получен на одном варианте питательной среды с полным составом минеральных солей и витаминов МС + 1,5 мг/л БАП, и почти на всех вариантах сред с половинным содержанием базовых компонентов МС, однако и в этом случае эффективность была низкой. Аналогичную ситуацию наблюдали в случае использования в качестве экспланта черешка листа. Также невысокой была эффективность регенерации из сегмента междоузлия, при этом на среде с половинным содержанием компонентов МС регенерация проходила гораздо эффективнее, чем на среде с полным содержанием компонентов МС. Наилучшим типом экспланта для индукции стеблевого органогенеза у сорта Пеннироял оказался узел. На всех вариантах

сред была получена регенерация, при этом среда 0,5МС показала себя лучше: почти на всех вариантах гормонального состава эффективность составила 90 % и более. По сорту Соня также отмечены единичные случаи стеблевого органогенеза в случае листовых, стеблевых и черешковых эксплантов, при этом на половинной концентрации базовых компонентов МС большее число сред дало больший процент регенерации. Узловые сегменты дали регенерацию на всех гормональных вариантах сред, при этом существенных различий между вариантами минеральной основы в целом отмечено не было.

Для индукции корневого органогенеза можно рекомендовать среду с половинным содержанием минеральных солей по Мурасиге и Скугу с добавлением кинетина в качестве цитокининового компонента и НУК в качестве ауксинового компонента. Из исследованных типов эксплантов наибольшей способностью к морфогенезу обладают узловые экспланты, видимо, за счет содержащихся там меристематических тканей. В целом можно отметить положительное действие добавления кинетина в концентрациях 0,5...2 мг/л на все типы соматического органогенеза.

Литература:

1. Minnunni, M., U. Wolleb, O. Mueller, A. Pferfer, and H. U. Aeschbacher. Natural antioxidants as inhibitors of oxygen species induced mutagenicity // *Mut. Res.* 1992. 269:193-200.
2. Tawfik, A. Azza, Read E. Paul, and Cuppett, L. Sussan. Factors affecting proliferation, essential oil yield and monoterpenoid constituents of rosemary and sage cultured *in vitro*. 1992.
3. Duke, J.A. Hand Book of Medicinal Herbs. Boca Raton, FL: CRC Press. 2001. 677 pp.
4. Harley, R. M. Mentha. In *Flora Europaea*, Vol. III, Edit. Cambridge University 1972. Press: 183 – 186.

СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОГО ВЕКТОРА pHLZ1, НЕСУЩЕГО В СВОЕМ СОСТАВЕ ГЕНОМНУЮ КОПИЮ ГЕНА ЛИЗОЦИМА ЧЕЛОВЕКА И НАПРАВЛЕННОГО НА ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Кузнецова В.Н.

***Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр
Национальной академии наук Беларуси по животноводству»,
Жодино, 222160
E-mail: genlab2009@gmail.com***

Получение трансгенных сельскохозяйственных животных-продуцентов субстанций для фармацевтической промышленности, в т.ч. рекомбинантных белков с посттрансляционными модификациями, близкими к модификациям в нативных белках человека, является одним из приоритетных направлений биотехнологии. Благодаря достижениям генетической инженерии получены обнадеживающие результаты трансгенеза сельскохозяйственных животных с использованием векторов, несущих различные гены человека и специфические регуляторные элементы.

Для получения трансгенных животных-биореакторов, продуцирующих в молоко экономически важные рекомбинантные белки, используются генные конструкции, представляющие собой молекулы ДНК в линейной или кольцевой форме, которые содержат сегмент, кодирующий представляющий интерес полипептид, функционально

связанный с дополнительными сегментами, обеспечивающими транскрипцию целевого гена.

Была предпринята попытка создания генной конструкции, несущей в качестве целевого ген лизоцима человека LYZ, находящийся под контролем промоторной области гена β -казеина козы.

Лизоцим – положительно заряженный противомикробный белок, содержащийся в яичном белке и слюне, слезной жидкости, молоке млекопитающих. В отличие от лизоцима, выделенного из куриного белка, человеческий лизоцим (HLZ) не вызывает аллергических реакций. Получены данные о том, что лизоцим вместе с другим лекарственным белком, лактоферрином, способны усиливать действие антибиотиков в несколько раз. Содержание лизоцима в человеческом молоке в 1600-3000 раз превышает его содержание в молоке крупного и мелкого рогатого скота. Средняя концентрация лизоцима в человеческом грудном молоке – 400 мкг/мл, в коровьем и козьем молоке – 0,130-0,250 мкг/мл. Таким образом, рекомбинантный лизоцим человека в перспективе может быть использован для создания лекарственных средств нового поколения.

Синтез геномной копии гена лизоцима человека был проведен методом ПЦР на основе очищенной геномной ДНК человека, выделенной из лимфоцитарной фракции крови. Выбор в качестве основного элемента экспрессионного вектора между геномной последовательности гена LYZ и кДНК данного гена в пользу полногеномного варианта был обусловлен не очень большими размерами кодирующей последовательности ДНК, а также желанием сохранить потенциально важные регуляторные последовательности, локализованные в нетранслируемых областях гена. С целью использования в генной конструкции был амплифицирован участок ДНК человека, включающий геномную последовательность LYZ с I по IV экзона, а также часть 5'-нетранслируемой области гена лизоцима человека. Общая длина амплифицированного фрагмента составила 6834 п.н. В ходе оптимизация условий реакции амплификации для длинных фрагментов ДНК (Long Range PCR) было установлено, что введение в состав ПЦР-смеси бетаина натрия в концентрации 1.8-2.0 мМ и модифицированного ПЦР-буфера, содержащего эквимольные количества KCl и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ позволяют увеличить специфичность синтеза длинных последовательностей ДНК.

Фрагмент геномной копии ДНК гена LYZ вместе с 5'-UTR регионом и собственной сигнальной последовательностью был клонирован в плазмидный вектор pBluescript II SK (+). После завершения реакции лигирования в качестве целевого продукта была получена рекомбинантная кольцевая молекула ДНК размером 9833 п.н., обозначенная как pBluescript II-gLYZ-1. После наработки и концентрирования плазмиды pBluescript II-gLYZ-1 проводили второй раунд рестрикции-лигирования с использованием промежуточного вектора pTZ5R/T, несущего в своем составе промоторный фрагмент и два первых экзона гена β -казеина козы. После завершения реакции лигирования полученной плазмидой размером 13934 п.н., названной pHLZ1, в составе лигазной смеси трансформировали компетентную культуру штамма *E.coli* DH5 α .

После отбора целевых клонов-трансформантов, содержащих плазмидную ДНК pHLZ1, с целью подтверждения правильности ориентации вставки проводили ПЦР-анализ отобранных колоний. Колонии, которые давали прошедшие селективный отбор клоны, инокулировали в жидкую LB-среду с ампициллином (50 мкг/мл) и культивировали до достижения оптической плотности 1,8-2,0. Плазмидную ДНК выделяли из ночной культуры *E.coli* DH5 α с помощью набора реагентов Plasmid Maxi Prep (Qiagen, США) согласно методике, рекомендованной производителем набора.

Выделенную и очищенную плазмиду линеаризовали путем инкубации с рестриктазой XbaI (Neb, США) при температуре 37°C в общем объеме 10 мкл, при соотношении количества плазмидной ДНК к общему объему смеси 60 нг/мкл, с обработкой вектора 6 единицами рестриктазы на протяжении 6 часов. Разделение линеаризованной плазмиды и вырезанных прокариотических последовательностей

проводили методом препаративного электрофореза с использованием легкоплавкой агарозы Agarose LM GQT (Conda). После достижения максимального разрешения фрагментов проводили вырезание агарозных блоков, содержащих целевые фрагменты ДНК, с последующей экстракцией ДНК из агарозного геля с использованием коммерческого набора реагентов QIAquick gel extraction kit (Qiagen). После дополнительных этапов очистки (фракционирование в градиенте CsCl, переосаждение, диализ, концентрирование) получали препарат генной конструкции рHLZ1 размером 12785 п.н. в виде растворов линейной двухцепочечной ДНК в низкосолевым ТЕ-буфере.

Созданная генная конструкция рHLZ1, несущая геномную копию гена лизоцима человека, обладает всеми признаками экспрессионного вектора и используется для получения трансгенных по гену лизоцима лабораторных (мыши) и сельскохозяйственных (козы) животных методом микроинъекции ДНК в пронуклеусы оплодотворенных яйцеклеток.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ГЕНОВ *DREB1* У *TRITOPYRUM*, *DASYPYRUM* И *ELYMUS SPICATUS*

Почтовый А.А.^{1,2}, Дивашук М.Г.², Карлов Г.И.²

¹ *Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Москва 127550*

² *Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства, Москва 127550*
E-mail: a.pochtovyy@gmail.com

Абиотические факторы (такие как засуха, засоление, низкие температуры) наносят огромный ущерб сельскому хозяйству. Ежегодные потери сельскохозяйственной продукции связанные с опустыниванием и засухой составляет примерно 42 млрд. долларов США в год¹. В связи с этим, перед селекционерами стоит задача, создания новых, более засухо-, соле- и морозоустойчивых сортов для получения стабильных и высококачественных урожаев.

DREB (Dehydration-responsive element-binding) – транскрипционный фактор, регулирующий ответную реакцию растений на абиотические факторы. Транскрипционный фактор DREB оказывает влияние на 12 функциональных генов опираясь на DRE-цис-регулирующие в соответствии с неблагоприятными факторами (rd29, cor15, rd17 и др)².

Эффективность генов DREB1 была показана с помощью генной инженерии^{3,5}.

Несмотря на быстроту и эффективность получения новых сортов с помощью генной инженерии, использование данного метода и продуктов ГМ в некоторых странах законодательно запрещена.

В решении проблемы получения новых высокопродуктивных и устойчивых сортов по-прежнему актуальными остаются методы традиционной селекции.

В природе идет уменьшение генотипического разнообразия культурных растений, постепенное обеднение генофонда за счет использования в селекции ограниченного числа генов^{6,7,8}.

Одним из ценных источников многих генов устойчивости являются различные виды пырея^{9,10}. В результате отдаленной гибридизации пырея с пшеницей помимо получения засухо-, соле- и зимостойкости и других генов устойчивости мы увеличиваем генетическое разнообразие пшеницы, который в дальнейшем позволит раскрыть новый

потенциал данной культуры. Поэтому, на наш взгляд, актуальным является изучение генов DREB1 у различных видов пырея.

В данной работе были клонированы и секвенированы гены кодирующие транскрипционный фактор DREB1 у *Thinopyrum ponticum*(KM388517, KM388518), *Thinopyrum intermedium*(KM388519), *Thinopyrum bessarabicum*(KM388514, KM388515, KM388516), *Elymus spicatus*(KM388520), *Dasyphyrum villosum*(KM388521). Изучена структура гена, филогенетическое родство генов DREB у злаковых культур, проанализированы аминокислотные последовательности и структура белка.

Литература:

1. <http://www.un.org/ru/development/sustainable/desertification/>
2. Shinwari Z. K. et al. An Arabidopsis Gene Family Encoding DRE/CRT Binding Proteins Involved in Low-Temperature-Responsive Gene Expression //Biochemical and biophysical research communications. – 1998. – Т. 250. – №. 1. – С. 161-170.
3. Shen Y. G. et al. An EREBP/AP2-type protein in Triticumaestivum was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress //Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – Т. 106. – №. 5. – С. 923-930.
4. Kovalchuk N. et al. Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold - inducible promoters //Plant biotechnology journal. – 2013. – Т. 11. – №. 6. – С. 659-670.
5. Marshall D. R. The advantages and hazards of genetic homogeneity //Annals of the New York Academy of Sciences. – 1977. – Т. 287. – №. 1. – С. 1-20.
6. Дубинин Н.П. Генетика и сельское хозяйство. В кн. "Практические задачи генетики в сельском хозяйстве", М., "Наука", 1971, 9-45
7. Цицин Н.В. Пути создания новых видов и форм растений // Генетика и селекция отдаленных гибридов. М.: Наука, 1976. С. 5–18
8. Дивашук М. Г., Климушина М. В., Карлов Г. И. Секвенирование гаплотипов гена WX пырея среднего (*Thinopyrum intermedium*) //Вестник Башкирского университета. – 2013. – Т. 18. – №. 3. – С. 729.

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РАЗВИТИЯ ДЛЯ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Осокина Н.В., Калашникова Е.А.

***Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А.
Тимирязева, кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства,
г. Москва, 127550,
E-mail: natali5-13@mail.ru***

В наши дни для борьбы с грибными болезнями сельскохозяйственно значимых культур широко применяют химические препараты. Они вредны для здоровья человека и животных. В связи с этим проблема устойчивости растений к заражению грибами является актуальной и приобретает экономический, медико-токсикологический и экологический аспекты. По литературным данным, в определённых концентрациях регуляторы роста растений способны ингибировать развитие гриба, и, таким образом, могут являться альтернативным решением.

В работе приведен анализ влияния регуляторов роста на развитие фузариоза тритикале. Возбудители фузариоза – грибы рода *Fusarium*. Его проявление вызывает ухудшение урожайности и значительно влияет на качество продукции. В качестве объекта исследований были выбраны самые распространённые виды возбудителей фузариоза зерновых: *Fusarium culmorum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichoides*, *F. oxysporum*. Испытания проводились с регуляторами роста, имеющимися в свободном доступе для любого потребителя, которые различались между собой по направленности действия: «Иммуноцитифит», арахидоновая кислота на основе морских водорослей, арахидоновая кислота животного происхождения, «Оберег». Чистую культуру патогенов размножали на безгормональной агаризованной питательной среде Мурасига и Скуга. Выращивали грибы в чашках Петри в условиях световой комнаты при температуре 25⁰С, 16- часовом фотопериоде, при интенсивности света 3000 лк. Стерильный раствор препаратов добавляли в проавтоклавированную питательную среду. В ходе работы изучалось влияние регуляторов роста на развитие грибов рода *Fusarium* в пяти разных концентрациях: 150 мг/л., 75 мг/л., 30 мг/л., 15 мг/л, либо в соответствующих пропорциях действующего вещества.

Экспериментально было показано, что различные регуляторы роста, а также их концентрации оказывают различное действие на скорость роста и развитие гриба в условиях *in vitro*. Лучший результат наблюдался с препаратом «Иммуноцитифит». Так, если в контрольном образце на 7-е сутки грибной мицелий разрастался до 89 мм (*F. culmorum*), 74 мм (*F. oxysporum*), 58 мм (*Fusarium avenaceum*), 48 мм (*F. sporotrichoides*), то в вариантах с концентрацией препарата 75 мг/л препарат подавляет развитие всех штаммов грибов, средний диаметр мицелия грибов составляет 48 мм, 47 мм, 39 мм и 34 мм соответственно, что в 1,5-2 раза меньше контроля. Аналогичные результаты получены в эксперименте с арахидоновой кислотой на основе морских водорослей – в концентрации 1 мг/л данный регулятор роста ингибирует развитие всех штаммов грибов в 1,3-1,6 раз. В других вариантах концентраций препаратов результат не был постоянным и отклонялся в обе стороны относительно контроля. Препарат «Оберег» не оказал никакого действия ни на один из видов исследуемых патогенов, во всех вариантах гриб развивался на уровне контроля. Остальные препараты показали разрозненные результаты, какой-либо зависимости выявить не удалось.

Следующим этапом исследования стало изучение развития грибов в разных концентрациях препарата «Иммуноцитифит» (так как именно этот препарат показал наилучший результат в предыдущих экспериментах), в присутствии зерновки тритикале *in vitro*. Для исследования были подобраны сорта тритикале, различные между собой по степени восприимчивости к фузариозу: «укро» - устойчивый, «с95» - средняя поражаемость, «дублет» - восприимчивый к болезни.

По методике эксперимента вместе с грибом по периметру чашки Петри на питательную среду с регуляторами роста высаживались зерновки тритикале. На седьмые сутки после закладывания опыта проводился учёт биометрических показателей проростков и диаметра разрастания мицелия гриба. Оптимальной (оказывающей отрицательное действие на развитие патогенов), как и в предыдущих опытах с «Иммуноцитифитом», являлась концентрация 7,5 мг/л. Диаметр гриба в присутствии зерновки в данном варианте составил 42 мм (*F. culmorum*), 40 мм (*F. oxysporum*), 36 мм (*Fusarium avenaceum*), 34 мм (*F. sporotrichoides*). Биометрические показатели проростков во всех вариантах с регулятором роста превышают контроль.

Анализируя данные, полученные в ходе эксперимента, можно предположить, что зерновка является своего рода синергистом «Иммуноцитифита» (усиливает его действие) за счет синтеза вторичных метаболитов, выполняющих защитную функцию в интактных растениях. К таким веществам относятся фенольные соединения, синтез которых усиливается в ответ растений на стресс. Таким образом, возможно, регуляторы роста в определённых концентрациях в стрессовых для растения условиях активируют его

защитные механизмы, улучшая тем самым их невосприимчивость к болезням или инфекциям. Благодаря этому, появляется возможность частичной борьбы или предотвращения заражения растений фузариозом с помощью подобных препаратов.

ПОИСК ИСТОЧНИКОВ ВИРУСОУСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ПОМОЩИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Кузьминова О.А., Вологин С.Г., Сташевски З., Гимаева Е.А.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», ОСХБ, Республика Татарстан, 420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 48
E-mail: kuzminovaoa.ok@gmail.com*

Средний урожай картофеля в России в два раза ниже потенциальной продуктивности данной культуры. Одной из причин низкой урожайности являются вирусные заболевания, среди которых наиболее вредоносным является Y вирус картофеля (YVK). Вследствие вегетативного размножения культуры вирусные частицы хранятся в клубнях и передаются из маточного в дочерние клубни нового урожая. Растения, выросшие из больных клубней, служат источником инфекции. Урожайность картофеля, зараженного YVK, в 2-4 раза ниже, чем у растений, свободных от вируса. Также, снижается устойчивость растений к болезням и неблагоприятным условиям окружающей среды.

Эффективным способом защиты растений является селекция на устойчивость, но данный процесс занимает 10-12 лет и требует значительных материальных и трудовых ресурсов. Использование методов маркер-вспомогательной селекции (MAS) позволяет ускорить создание нового устойчивого сорта. MAS основана на выявлении маркерных фрагментов ДНК, связанных с R-генами растений, что значительно сокращает время, затрачиваемое на оценку вирусоустойчивости родительского и селекционного материала, так как анализ можно проводить в лабораторных условиях, на любой стадии развития растения. Кроме того, результаты молекулярно-генетического теста не подвержены влиянию агроклиматических условий выращивания образцов. Для применения MAS необходимо выявить источники вирусоустойчивости растений среди генофонда картофеля, используемого в селекции. В связи с этим целью данной работы являлся поиск источников устойчивости растений к YVK при помощи молекулярных маркеров.

В качестве объекта исследования было взято 70 сортов и 34 номера – источника хозяйственно-ценных признаков картофеля, и в том числе 14 источников, созданных в лаборатории селекции картофеля ФГБНУ ТатНИИСХ.

Для выявления генов $R_{y_{adg}}$ и $R_{y_{sto}}$ использовали молекулярные маркеры RYSC3 и GP122-406 соответственно [Valkonen et al., 2008; Kasai et al., 2000]. Условия ПЦР соответствовали указанным в литературных источниках. Оценка фенотипической устойчивости проводили методом ИФА на наличие скрытой заражённости у образцов, выращенных в условиях искусственного инфекционного фона. Данные о родословных сортов картофеля были взяты из базы данных Wageningen [www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree]

Молекулярно-генетический анализ исследуемого материала картофеля показал наличие маркерного фрагмента RYSC3 у сортов Бакша, Марфона, Сафия и Ягодный 19. Среди номеров данный маркер имели 6 образцов: 12-03-2, 43-03, 517-1, 517-2, 2-1-2, 2-9-1.

Маркер GP122-406, сцепленный с геном Ry_{sto} , выявлен у 10 сортов: Акроссия, Арника, Ароза, Ильинский, Лорх, Оксания, Роко, Стобрава, Фиоретта, Франзи. В родословной сортов Франзи, Ароза, Роко, Стобрава присутствует общий предок – дикий вид картофеля *Solanum stoloniferum* [www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree], из которого впервые был интрогрессирован ген Ry_{sto} . Сорта Ильинский и Арника также имеют в родословной общих предков – дикий вид *S. demissum* и культурный вид *S. tuberosum* subsp. *andigenum* [www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree], которые согласно литературным данным несут маркер GP122-406. [Рогозина и др., 2012] Среди номеров данным маркером обладали только два образца: 95-25-1, 8-7-2. Проведённый молекулярно-генетический анализ не выявил ни одного генотипа, обладавшего комбинацией использованных маркеров.

Среди исследованных сортов маркер RYSC3 встречался значительно реже (6% образцов), по сравнению с маркерным фрагментом GP122-406 (14% образцов). Среди изученных номеров наблюдалось обратное соотношение – маркер RYSC3 несли 18% образцов, в то время как маркер GP122-406 обнаружен только у 6% исследованных генотипов.

Оценка вирусоустойчивости картофеля показала, что все образцы, содержавшие маркеры, были свободными от патогена. Среди образцов, не обладавших маркерами, были выявлены вирусоустойчивые формы: Вектар, Горняк, Журавинка, Любава, Малиновка, Отрада, Русский сувенир, Спиридон, Тениз, Фелокс, Хозяюшка, Эскорт. Данный факт можно объяснить проявлением неспецифической устойчивости или другого алеля гена устойчивости. В настоящее время описано более 30 молекулярных маркеров, связанных с аллелями генов, определяющими устойчивость к YBK, которые были интрогрессированы из 5 видов картофеля *S. stoloniferum*, *S. demissum*, *S. tuberosum* subsp. *andigenum*, *S. chacoense*.

Литература:

1. Valkonen J., Wiegmann K., Marczewski W. et al. Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to Potato virus Y controlled by Ry_{sto} of *Solanum stoloniferum* derived from different sources [Text] / J.P.T. Valkonen, K. Wiegmann, J.H. Härmäläinen, W. Marczewski, K.N. Watanabe // Annals of applied Biology. - 2008. – V.152.- P. 121-130
2. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V. et al. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ry_{adg} based on a common feature of plant disease resistance genes [Text] / K. Kasai, Y. Morikawa, V. Sorri, J. P. Valkonen, C. Gebhardt, K. N Watanabe / Genome. – 2000. – V. 43. – P. 1-8.
3. Рогозина Е. В. Шувалов О.Ю.; Антонова О.Ю. и др. Межвидовое и внутривидовое разнообразие картофеля по устойчивости к Y - вирусу [Текст] / Е. В. Рогозина О.Ю. Шувалов; О.Ю. Антонова; Т.А. Гавриленко // Сельскохозяйственная биология. - 2012. - N 5. - С. 64-69.
4. WageningenUR Potato Pedigree Database [Официальный сайт]. URL: www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree/ (дата обращения: 22.03.2015).

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СПОНТАННЫХ ГИБРИДОВ БЕРЕЗЫ (*BETULA NANA* L. × *BETULA PENDULA* ROTH) И ИХ ВОСПРОИЗВОДСТВО В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

Константинов А.В., Емельянова О.В.

Государственное научное учреждение «Институт леса Национальной академии наук Беларуси», лаборатория генетики и биотехнологии, Гомель, 246001
E-mail: avkonstantinof@mail.ru

На территории Беларуси береза является одной из основных лесообразующих пород и представлена березой повислой и березой пушистой произрастающими повсеместно. В свою очередь береза приземистая и береза карликовая образуют локальные популяции на ограниченных площадях болотных массивов. Род *Betula* spp. сложен в систематическом отношении, для него характерен значительный внутривидовой полиморфизм морфологических признаков (Исаков, 2008), связанный с широким распространением спонтанной межвидовой гибридизации и интрогрессией при совместном произрастании в природных условиях. Отдельные виды березы имеют гибридное происхождение.

В работах (van Dinter & Birks, 2007; Thorsson et al., 2007) детально описаны процессы межвидовой гибридизации березы карликовой с другими представителями рода береза, показано, что морфологически гибриды обычно занимают промежуточное положение между родительскими видами, однако не всегда морфологически различимы в группе, наличие большого количества переходных форм значительно затрудняют их видовую идентификацию внутри популяции (Czernicka et al. 2014).

Не смотря на то, что для практического применения наиболее перспективна внутривидовая гибридизация березы из различных популяций, одним из направлений дающим возможность получить ценные формы для лесоразведения и декоративного озеленения, является изучение и использование межвидового скрещивания, включая спонтанную гибридизацию. В данном случае отдельные генотипы могут представлять интерес для селекционной работы, а применение современных биотехнологий для клеточной селекции и клонального микроразмножения материала позволяет значительно ускорить внедрение результатов в практику лесного хозяйства.

Таким образом, с учетом вышесказанного, целью нашей работы являлось изучение некоторых морфологических признаков растений гибридных генотипов *Betula nana* L. × *Betula pendula* Ehrh. и получение их асептических культур для дальнейшего тиражирования.

Свежий семенной материал собирали в ноябре 2014 года с березы карликовой, произрастающей на опытном участке Института леса НАН Беларуси. Семена высевали в увлажненную смесь торфа и песка (3:1) в лабораторных условиях. После трех недель сеянцы пикировали в кассеты по 35 ячеек, объемом 200 мл. Выращивание материала проводили в условиях световой комнаты при температуре $21 \pm 3^\circ\text{C}$, влажности около 60% под фитолампами «Fluora» («Osram», Германия) при освещенности интенсивностью 2-3 тыс. лк. и фотопериоде 16/8.

После трех месяцев культивирования измеряли высоту саженцев от поверхности почвы до апикальной почки (см), диаметр стволика у корневой шейки (мм), кроме того определяли морфометрические параметры второй развернутой листовой пластинки: длину (L), ширину (B) и вычисляли их соотношение (L/B).

Всего было получено 67 саженцев, которые по показателям высоты стволика можно разделить на три группы: до 10 см (15 шт., min 2,1 см, max 9,8 см; 22,4%), от 10 до 20 см (49 шт., min 10,0 см, max 19,8 см; 73,1%) и свыше 20 см (3 шт., min 21,3 см, max 25,8 см, %; 4,5%). Показатели среднего диаметра колебались в пределах $1,8 \pm 0,4$ - $2,3 \pm 0,5$ мм.

Нами было отмечено, что низкорослые сеянцы отличаются отсутствием опушенности и жесткостью листовой пластинки, а саженцы, характеризующиеся крупными размерами напротив, имеют листья со значительным опушением.

Анализ размеров и морфологических особенностей листовых пластинок показал, что их параметры длины и ширины варьируют в широких интервалах. Средняя длина листьев $23,4 \pm 4,8$ мм (максимальное значение 14 мм, минимальное – 47 мм), а средняя ширина листовых пластинок $26,6 \pm 6,7$ мм (максимум – 13 мм, минимум – 41 мм).

Важным показателем гетерогенности полученного семенного потомства является разнообразие форм листовых пластинок, определяемое отношением их длины к ширине и положением самых широких их участков. Расчеты показали, что по форме листьев полученные гибридные саженцы подразделяются на несколько групп. Округлые и округло-овальные листья, (всего 25,4% с отношением длины к ширине 0,91-1,04), были, как правило, характерны для растений с укороченными стволиками. В группу из 11,9% растений с вытянутыми продолговато-яйцевидными пластинками (отношение 1,20-1,44) входили в основном высокорослые саженцы. Форма листьев остальных растений варьировала от ромбическо-яйцевидной до треугольно-яйцевидной и не коррелировала с показателями высоты.

Для получения асептических культур гибридных генотипов отобранные побеги растений, принадлежащих к разным морфологическим группам, срезали, удаляли листья и 15 минут промывали в 0,4% растворе препарата «Хлороцид» (БелАсептика, Беларусь) с добавлением средства «AOS» (Нэфис Косметикс, РФ), после чего ополаскивали под проточной водой 5 минут. Далее проводили 2 минутную обработку 10% перекисью водорода и снова ополаскивали. В условиях ламинар-бокса материал обрабатывали 70% этиловым спиртом, 0,1% сулемой (1 минуту и 3 минуты соответственно) и трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой. Побеги разделяли на 4-9 шт. одно- и двухузловых фрагментов и помещали в биологические пробирки на культуральную среду, приготовленную по прописи MS (Murashige & Skoog, 1962) без внесения регуляторов роста. Всего было высажено 224 экспланта.

Выращивание растений *in vitro* проводили в условиях термостатированной культуральной комнаты (освещение интенсивностью 2,5-3,0 тыс. люкс лампами марки «Lisma» («Лисма», РФ), температура $23 \pm 2^\circ\text{C}$). После 3-4 недель культивирования в нулевом пассаже на эксплантах, изолированных от растений, характеризующихся высоким ростом, нами были получены стерильные регенеранты со средней длиной $42,7 \pm 8,2$ мм, которые можно было использовать для тиражирования (в среднем из каждого побега получали $5,1 \pm 0,7$ шт. эксплантов). Морфогенетический ответ эксплантов изолированных от низкорослых растений оказался значительно слабее, были получены лишь единичные побеги длиной $23,3 \pm 4,9$ мм, выход микрочеренков с которых составил $3,1 \pm 0,6$ шт. Черенкование *in vitro* проводили с использованием модифицированной среды WPM (Lloyd & McCown, 1980) путем деления растений на одноузловые экспланты. Продолжительность первого пассажа составляла 6 недель. В результате формировались укорененные микрорастения, пригодные как для депонирования в коллекции микрклональных культур, так и для высадки в почву с целью дальнейшего изучения особенностей роста.

Таким образом, нами изучены некоторые морфометрические показатели и морфологические признаки гибридного потомства от скрещивания *Betula nana* × *Betula pendula*, на основе чего выявлена значительная гетерогенность полученных форм.

В результате экспериментальных исследований *in vitro* были получены 14 клонов спонтанных межвидовых гибридов березы для последующего изучения морфо- и органогенеза в культуре тканей и для адаптации к почвенным условиям.

МЕТОД УСКОРЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДОВ *CLAVIBACTER* И *RATHAYIBACTER* НА УРОВНЕ «ВИД-ПОДВИД»

Стародумова И.П.^{1,2}, Присяжная Н.В.¹, Тарлачков С.В.^{1,3}, Арискина Е.В.¹,
Дорофеева Л.В.¹, Евтушенко Л.И.¹

¹*Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН*

E-mail: ykm@ibpm.pushchino.ru

²*Пуцинский государственный естественно-научный институт*

³*Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино (Россия)*

Около половины известных в настоящее время фитопатогенных актинобактерий входят в состав семейства *Microbacteriaceae* (относятся к родам *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Lefsonia* и *Rathayibacter*). Бактерии рода *Clavibacter*, включающего единственный вид *C. michiganensis* с шестью подвидами (*michiganensis*, *insidiosus*, *nebraskensis*, *phaseoli*, *sepedonicus*, *tessellarius*), известны как возбудители сосудистых заболеваний сельскохозяйственных культур (томата, люцерны, кукурузы, фасоли, картофеля, пшеницы). Подвиды *C. michiganensis* (*michiganensis*, *insidiosus*, *sepedonicus*) являются карантинными объектами во многих странах мира. Виды *Rathayibacter* (*rathayi*, *iranicus*, *tritici*, *toxicus*) могут быть причиной гуммоза и задержки роста злаковых растений. *R. toxicus* образует высокотоксичный гликолипид (коринетоксин), который вызывает неврологические заболевания и гибель травоядных животных.

Для диагностики фитопатогенных бактерий вышеупомянутых родов на уровне «вид-подвид» широко применяются молекулярно-биологические методы с использованием ДНК- и РНК-технологий, которые, однако, являются весьма трудоемкими. Кроме того, отсутствуют данные о последовательностях «housekeeping» генов для *Rathayibacter* (позволяющие точно определить видовую принадлежность штаммов) и праймерах для их амплификации и секвенирования.

Все более широкое применение для идентификации бактерий на уровне вида находит метод масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией – MALDI-TOF (МАЛДИ). В его основе лежит сравнение масс-спектров клеток бактерий в диапазоне масс 2000–20000 *m/z*. Достоинством метода является быстрота анализа (несколько минут) и малое количество материала (достаточной одной колонии). Вместе с тем, в доступных базах данных отсутствуют спектры типовых штаммов многих видов. Для родов *Clavibacter* и *Rathayibacter* имеются лишь спектры *C. michiganensis* ssp. *tessellarius* DSM 20741^T и *R. rathayi* DSM 7485^T (Bruker Daltonics).

Нами была изучена коллекция из 59 культур, включающая типовые штаммы подвидов *C. michiganensis* и видов *Rathayibacter*, а также штаммы, отнесенные к этим родам на основе анализа генов 16S рРНК. Для регистрации МАЛДИ масс-спектров («Autoflex Speed», Bruker Daltonics) препараты готовили, как описано (Присяжная и др., 2012). Спектры анализировали с помощью пакетов программ Flex analysis 3.3 и Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics). Результаты анализа показали (Рис. 1), что часть бактерий образует тесные кластеры вместе с типовыми штаммами известных видов (подвидов). Другие штаммы, в т.ч., выделенные из различных растений без выраженных признаков заболеваний, занимают в большей или меньшей степени обособленное положение.

С целью уточнения видовой принадлежности штаммов и оценки порогового значения уровня сходства МАЛДИ-спектров для представителей одного вида (подвида) были проанализированы «housekeeping» гены [β -субъединицы ДНК-гиразы (*gyrB*), рекомбиназы А (*recA*) и β -субъединицы РНК-полимеразы (*rpoB*)]. Для их амплификации и секвенирования использовали известные праймеры (*Clavibacter*; Jacques et al., 2012) и

разработанные нами (для *Rathayibacter*). По результатам анализа были определены максимальные уровни сходства между «housekeeping» генами типовых штаммов известных подвидов *Clavibacter* и видов *Rathayibacter*: 95% и 93.1% (*gyrB*), 95.5% и 95.2% (*recA*), 99% и 97% (*rpoB*). Основываясь на этих показателях, можно заключить, что в состав ряда МАЛДИ-кластеров входят штаммы известных подвидов *C. michiganensis* (обозначены *Cms*, *Cmn*, *Cmi*, *Cmm*; Рис. 1а) и видов *Rathayibacter* (Рис. 1б). Обособляющиеся штаммы (подчеркнуты) являются представителями новых таксонов (в их числе ICMP 9254, полученный как *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*).

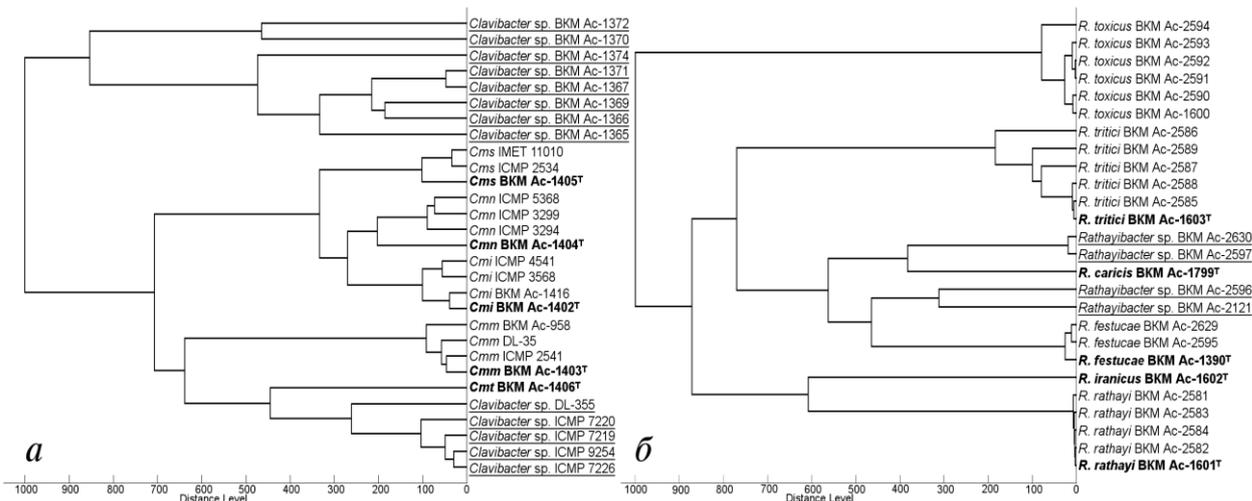


Рис. 1. Дендрограммы МАЛДИ масс-спектров штаммов родов *Clavibacter* (а) и *Rathayibacter* (б). Типовые штаммы видов (подвидов) указаны выделенным шрифтом. Подчеркнуты штаммы выявленных новых таксонов.

На основании полученных результатов предложен метод ускоренной диагностики фитопатогенных бактерий известных видов/подвидов родов *Clavibacter* и *Rathayibacter* и обнаружения потенциальных представителей новых таксонов – что актуально как для решения практических задач (фитосанитарный контроль, фитопатология и др.), так и фундаментальных исследований (оценка биологического разнообразия на планете, вопросы экологии, эволюции). Созданы референтные базы данных МАЛДИ масс-спектров штаммов *Clavibacter* и *Rathayibacter*. Предложен набор праймеров (известных и сконструированных *de novo*) для амплификации и секвенирования «housekeeping» генов бактерий – с целью уточнения таксономической принадлежности штаммов, для которых метод МАЛДИ масс-спектрометрии дает неоднозначные результаты. Выявлены компоненты МАЛДИ масс-спектров – новые хемотаксономические маркеры родов *Clavibacter* (3356, 4775, 5080, 6716, 9550 *m/z*) и *Rathayibacter* (3954, 4428 и 6458 *m/z*). Обнаружено несколько новых внутривидовых таксонов в составе изученных родов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-31825.

Литература:

1. Присяжная Н.В., Плотникова Е.Г., Буюева О.В., Корсакова Е.С., Дорофеева Л.В., Ильина Е.Н., Лебедев А.Т., Евтушенко Л.И. Использование метода МАЛДИ-ВП масс-спектрометрии для дифференциации близких видов филогенетической группы «*Arthrobacter crystallopoietes*» // Микробиология. 2012. Т. 81. № 6. С. 1–7.
2. Jacques M.A., Durand K., Orgeur G., Balidas S., Fricot C., Bonneau S., Quillevere A., Audusseau C., Olivier V., Grimault V., Mathis R. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds

reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. № 23. P. 8388–8402.

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА УВЕЛИЧИВАЕТ
СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ ЭКСТРЕМОФИТОВ *EUTREMA (THELLUNGIELLA)*
SALSUGINEA И *EUTREMA (THELLUNGIELLA) BOTSCHANTZEVII***

Шамустакимова А.О.¹, Леонова Т.Г.¹, Таранов В.В.¹, А.Н. de Voer², Бабаков А. В.¹

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», лаборатория стрессоустойчивости растений, Москва 127550

E-mail: biotech@iab.ac.ru

²*Department of Structural Biology, Faculty of Earth and Life Sciences, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands*

Проведено сравнительное исследование влияния холодого закаливания на повышение устойчивости растений *Arabidopsis thaliana*, *Eutrema (Thellungiella) salsuginea* и *Eutrema (Thellungiella) botschantzevii* к солевому стрессу, вызванному высокими концентрациями NaCl. После низкотемпературного закаливания 25 дневных растений (4°C, 6 дней) в почву вносили NaCl до конечной концентрации -300 mM для *A.thaliana*, -400 mM для *E. salsuginea* и 500mM для *E. botschantzevii*. Через семь дней определяли биомассу надземной части растений, накопление в ней ионов натрия и калия, а также измеряли экспрессию генов протонных насосов плазмалеммы и тонопласта VAB1, VAB2, VAB3, VHP, АНА3 и ионных антипортеров SOS1, НКТ1, NHX1, NHX2, NHX5. Показано, что в отличие от растений *A.thaliana* у растений *E. salsuginea* и *E. botschantzevi*, подвергнутых солевому стрессу после холодого закаливания по сравнению с контрольными растениями возрастала биомасса надземной части растений. Кроме этого, у этих же растений по сравнению с контрольными было снижено содержание ионов натрия, а содержание ионов калия изменилось незначительно. Под действием холодого закаливания в растениях *E. botschantzevii* значительно усиливалась экспрессия генов SOS1, VAB1, VAB3, NHX2 и NHX5, а у растений *E. salsuginea* наряду с этим наблюдалась повышенная экспрессия генов VHP и АНА3. У растений *A.thaliana* ни у одного из 10 выбранных генов после холодого закаливания экспрессия не менялась. Взятые вместе полученные результаты свидетельствует о существовании у растений экстремофитов *E. salsuginea* и *E. botschantzevi* кросс-адаптации при последовательном действии низких положительных температур и высоких концентраций NaCl. Они также показывают, что в основе наблюдаемого явления может лежать возрастание экспрессии генов ионных транспортеров в процессе холодого закаливания

СОЗДАНИЕ БЕЗМАРКЕРНЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА С ГЕНОМ СУПЕРСЛАДКОГО БЕЛКА

Тимербаев В. Р.^{1,2}, Окунева А. С.¹, Пушин А. С.², Долгов С. В.^{1,2}

¹ *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва, 127550*

Email: timerbaev@gmail.com

² *Филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Института биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН, Пущино, 142290*

Присутствие маркерных генов в ГМ растениях вызывает беспокойство в обществе из-за опасений, связанных с рисками для окружающей среды и здоровья человека. Создание трансгенных растений, не содержащих генетического материала бактериального и вирусного происхождения, во многом позволяет снизить напряжённость, а в будущем, вероятно, станет необходимым условием для коммерциализации ГМ культур. Современным и наиболее перспективным подходом получения растений без маркеров – использование генетических конструкций, которые после отбора растений на селективной среде позволяют элиминировать ненужную область ДНК.

В нашем исследовании для получения безмаркерных трансгенных растений томата мы использовали вектор pMF (Plant Research International, Wageningen), содержащий рекомбиназу R из дрожжей *Zygosaccharomyces rouxii* слитую с лиганд-связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора, а также бифункциональный селективный ген *CodA-nptII*, позволяющий проводить отбор растений после удаления из генома нежелательной области ДНК за счет негативной селекции на 5-флюороцитозине. В качестве смыслового был выбран ген суперсладкого белка тауматина II из тропического растения *Thaumatococcus daniellii* под контролем плодоспецифического промотора гена *ELIP* или *E8* томата и терминатора гена *rbcS* томата.

Для создания безмаркерных растений томата было применено две стратегии. Первая (ускоренная) заключалась в получении гомогенных устойчивых к канамицину каллусов, без доведения до трансгенных растений с последующей индукцией рекомбиназной активности дексаметазоном и селекции в присутствии 5-флюороцитозина. Из 155 независимых морфогенных каллусов удалось получить одно безмаркерное растение, что подтверждено Саузерн блоттингом и ПЦР. Вторая альтернативная (замедленная) стратегия предполагала получение трансгенных растений, активацию рекомбиназы в эксплантах и проведение вторичной регенерации с негативной селекцией. Более 170 независимых линий томата гибридной линии Ялф были проанализированы методом ПЦР на наличие всех генов из области T-ДНК и присутствие обоих сайтов рекомбинации. Из эксплантов 35 отобранных трансгенных линий, суммарно была получена 121 сублиния прошедшая негативную селекцию. По результатам ПЦР только одна трансгенная линия томата полностью свободная от маркеров была идентифицирована. Мы полагаем, что в остальных случаях имеет место неполное вырезание последовательности ДНК, а также хромосомные перестановки из-за присутствия множественных и/или абберрантных последовательностей T-ДНК. Экспрессия гена тауматина II в плодах первичных трансгенных линий, а также в плодах безмаркерных растений томата была показана методом ОТ-ПЦР, Вестерн блоттингом и органолептическим анализом.

Таким образом, с использованием двух различных стратегий селекции две полностью безмаркерные линии томата были получены. Эти результаты демонстрируют, что система pMF применима для культуры томата, однако возможно объективные

физиологические и молекулярно-биологические ограничения не позволяют достигать высокой эффективности.

ДНК-ПЛАВЯЩАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА РАСТЕНИЯ-ЭКСТРЕМОФИТА *THELLUNGIELLA SALSUGINEA*

Злобин Н. Е.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ВНИИСБ), 127550, Москва, Тимирязевская ул., 42
Email: mntr2008@mail.ru***

Термин «белки с доменом холодого шока» объединяет представителей небольших белковых семейств, присутствующих в различных про- и эукариотических организмах. Свое название белки получили благодаря наличию в их составе домена холодого шока (CSD), являющимся фактически прототипом бактериальных белков холодого шока (CSP). Ключевым свойством бактериальных белков является так называемая плавающая активность – способность приводить к расплетению вторичных структур в молекулах нуклеиновых кислот. Вторичные структуры, образуемые на протяженных одноцепочечных молекулах нуклеиновых кислот, могут затруднять их функционирование, особенно в условиях пониженной температуры. Белки холодого шока, расплетая вторичные структуры, способствуют восстановлению функциональной активности нуклеиновых кислот. Бактериальные CSP функционируют как антитерминаторы транскрипции и шапероны РНК, влияя на транскрипцию генов и трансляцию различных белков. Предполагается, что для функционирования белков с доменом холодого шока растений, состоящие из домена холодого шока в N-концевой части молекулы и глицин-богатого участка с несколькими мотивами «цинковый палец» ССНС-типа в С-концевой части молекулы, также может быть критичной плавающая активность в отношении нуклеиновых кислот.

Плавающая активность белков с доменом холодого шока EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3, а также их отдельных N-концевых и С-концевых частей исследовалась в системе *in vitro* путем плавления различных флуоресцентно меченых олигонуклеотидов – молекулярных зондов. Плавающую активность белков оценивалась путем измерения их влияния на параметр T_m , равный температуре, при которой половина зонда оказывается полностью денатурированной, а также на плавление зонда при 4⁰С. По мере роста концентрации белков в среде измерения наблюдалось уменьшение T_m , а затем плавление зондов при 4⁰С. В качестве контроля в экспериментах был использован главный белок холодого шока *E. coli* CspA, обладающий плавающей активностью в отношении нуклеиновых кислот. По эффективности уменьшения T_m белки расположились следующим образом EsCSDP3 \approx EsCSDP1 > EsCSDP2. Плавающую активность при 4⁰С показали главным образом EsCSDP3 и EsCSDP1. Ни один из отдельных доменов холодого шока не проявил ДНК-плавающей активности. Удаление одноцепочечных областей зонда практически полностью блокировало плавающую активность. Замена нуклеотидов в одноцепочечной части зонда на последовательность N.....N не повлияла существенно на уменьшение T_m , однако привела к резкому снижению эффективности плавления зонда белками EsCSDP1,3 при 4⁰С. На основании полученных экспериментальных данных было сделано предположение, что высокая плавающая активность белков EsCSDP1 и EsCSDP3 обусловлена одновременным взаимодействием с ДНК-зондом CSD и С- концевой домена. Из сравнения аминокислотных

последовательностей CSDP с различной ДНК-плавающей активностью следует, что плавающая активность вероятно зависит от жесткости цепи, соединяющего между собой CSD и С- концевой домен. Полученные результаты указывают на возможное вовлечение белков EsCSDP3 и EsCSDP1, а также гомологичных им белков из других растений в процессы, сопряженные с дестабилизацией структуры ДНК, такие как транскрипция, репарация и репликация.

НОВЫЙ РАСТИТЕЛЬНЫЙ ПРОМОТОР *pro-SmAMP1* ИЗ *STELLARIA MEDIA*

Ефремова Л.Н., Высоцкий Д.А.

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ВНИИСБ), 127550, Москва, Тимирязевская ул., 42
E-mail: efremova.larisa.nikolaevna@gmail.com**

Поиск и использование сильных промоторов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии трансгенов, сопоставимый с уровнем CaMV 35S, обладающих к тому же универсальностью по отношению к разным видам растений, является одной из важных задач генетической инженерии растений. Использование новых промоторов в биотехнологии растений предполагает их предварительный структурный и функциональный анализ.

Ранее лабораторией стрессоустойчивости растений ВНИИСБ в сорном растении *Stellaria media* были идентифицированы и охарактеризованы гены антимикробных пептидов SmAMP1 и SmAMP2. Установлено, что в *S. media* ген *SmAMP2* демонстрировал конститутивный и высокий уровень экспрессии, а экспрессия гена *SmAMP1*, не смотря на высокую степень гомологии, носила индуцибельный характер при действии фитопатогенов.

Для анализа особенностей первичной структуры промоторной области гена *SmAMP1* была установлена ее нуклеотидная последовательность длиной 2812 п.н. Поиск возможных регуляторных мотивов и cis-элементов *in silico* с помощью программ PlantCARE и PLACE выявил ряд мотивов, характерных для сильных эукариотических промоторов. На основе сравнительного анализа нуклеотидной последовательности данного промотора с клонированной ранее промоторной областью гена *SmAMP2* было выявлено, что *pro-SmAMP1* значительно отличается от *pro-SmAMP2* и содержит несколько уникальных фрагментов, вероятно вносящих определенный вклад в характер его экспрессии. Для выяснения их вклада в активность промотора были созданы восемь 5'-делеционных вариантов промотора. При этом самый короткий из них, обозначенный как -481, не содержит ни одного уникального фрагмента, -603 и -650 содержат один фрагмент длиной 72 п.н., -700, -1200 и -1469 содержат два уникальных фрагмента, а варианты -2557, -2812, содержат большую вставку длиной 900 п.н. Для оценки активности 5'-делеционные варианты *pro-SmAMP1* были использованы для создания генетических конструкций, в которых они контролируют экспрессию репортерного гена *gusA*.

На данном этапе с использованием генетических конструкций, в которых репортерный ген *gusA* находится под контролем делеционных вариантов промотора *pro-SmAMP1*, описанных выше, была проведена трансформация растений *Arabidopsis thaliana*. Полученные в результате трансформации трансгенные растения в данный момент используются для оценки активности различных делеционных вариантов промотора *pro-SmAMP1* по активности GUS. Также по активности GUS и по экспрессии кодирующего его гена проводится сопоставление идентифицированного нами промотора с промотором CaMV 35S.

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА С ГЕНАМИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ ПЕТУНИИ EOV I И EOV II ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ АРОМАТА ПЛОДОВ

Окунева А.С.¹, Тимербаев В.Р.^{1,2}, Долгов С.В.^{1,2}

¹*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»*

Email: playwithdna@gmail.com

²*Филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Института биоорганической химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН, Пущино, 142290*

Аромат плода томата представляет собой смесь различных летучих соединений, которые синтезируются во время созревания, и является неотъемлемым признаком качества и спелости плода. Органические вещества, образующие композицию аромата томата, являются продуктами различных метаболических путей растения, и их синтез обусловлен скоординированной работой огромного пула ферментов, в силу чего запах становится сложным объектом для изучения и модификации.

Летучие соединения, благодаря своей подвижности, способны передавать сигналы между органами и тканями растительного организма, а также обеспечивать его взаимодействие с окружающей средой. Для человека же аромат плодов, является не только признаком качества продукции, но и дополняет восприятие вкуса, поэтому потребитель часто обращает внимание на эту характеристику плодов. Немаловажным является и тот факт, что многие вторичные метаболиты, например ликопин, флавоноиды, а также различные летучие составляющие представляют собой полезные для человека вещества.

Целью нашей работы стало получение растений томата с измененным ароматом плодов и повышенной, таким образом, привлекательностью для потребителей.

Для генетической трансформации томатов нами были выбраны гены транскрипционных факторов EOV I и EOV II (Emission Of Benzenoids) недавно обнаруженные в петунии и охарактеризованные группой ученых под руководством профессора Вайнштейна А. Было показано, что EOV II напрямую влияет на уровень транскрипции некоторых генов, кодирующих ферменты фенилпропаноидного пути биосинтеза летучих органических соединений, а также генов шикиматного пути. Благодаря скоординированному влиянию на биосинтез летучих соединений цветков и при этом отсутствию влияния на продукцию антоцианов, высказано предположение о центральной регуляторной роли генов транскрипционных факторов EOV на биосинтез фенилпропаноидных летучих соединений (Spitzer-Rimon и др., 2010).

Для работы было создано две векторные конструкции, содержащих кодирующую область гена EOV I/EOV II под контролем сильного плодоспецифичного промотора гена томата E8. В качестве объекта исследований подобрано 5 различных по своим характеристикам сортов томатов, среди которых черри, желтоплодные и розовые томаты, а также томаты с повышенным содержанием ликопина.

В результате агробактериальной трансформации суммарно нами было получено более 250 трансгенных линий томата, вставка целевого гена была подтверждена методом ПЦР. Большая часть линий была использована для проведения тепличного эксперимента, в процессе которого был отобран материал для последующих анализов всех возможных вариантов вектор/сорт. В первую очередь была показана экспрессия генов транскрипционных факторов в плодах томата трансгенных линий с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Также нами был проведен органолептический анализ, продемонстрировавший изменения в запахе плодов в лучшую сторону –

большинство респондентов отдали свое предпочтение плодам трансгенных линий, нежели плодам контрольных растений. Участники теста отмечали наличие приятных фруктово-ягодных нот в аромате не совсем свойственных томату. Предварительный анализ методами газовой хроматографии и масс-спектрометрии подтвердил достоверные изменения в содержании некоторых ароматических веществ, в том числе и ряда фенилпропаноидов в плодах трансгенных растений томата.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют эффективность подхода с использованием гетерологичных генов транскрипционных факторов для модификации аромата плодов томата. Это позволяет развивать идею применения данной стратегии в дальнейшем для придания растениям новых свойств.

Литература:

Spitzer-Rimon B., Marhevka E., Barkai O., Marton I., Edelbaum O., Masci, T., Prathapani N., Shklarman E., Ovadis M. and Vainstein A. EOBII, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia // Plant Cell. – 2010. – V. 22. – P. 1961-1976.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ РЕГЕНЕРАЦИИ <i>IN VITRO</i> И АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОЗИМОГО РАПСА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ РАСТЕНИЙ С ПОВЫШЕННОЙ ХОЛОДОСТОЙКОСТЬЮ Леонтьева А.В., Чернобровкина М.А., Хватков П.А., Долгов С.В.	5
ДЕЙСТВИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА ПРОЦЕСС ВОССТАНОВЛЕНИЯ ВСХОЖЕСТИ СЕМЯН ГОРОХА ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ Сащенко М.Н.	6
<i>AGROBACTERIUM</i>-ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПШЕНИЦЫ <i>IN PLANTA</i> ГЕНАМИ МЕТАБОЛИЗМА ПРОЛИНА Бавол А.В., Дубровная О.В., Гончарук А.Н., Воронова С.С.	8
ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ <i>WOLFFIA ARRHIZA</i>, СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ Шведова А.Н., Хватков П.А., Чернобровкина М.А., Пушин А.С., Фирсов А.П., Шалойко Л.А., Долгов С.В.	10
ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Р30 ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Иматдинов И.Р., Дубровская О.А., Казакова А.С.	11
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ <i>BRASSICA OLERACEA L. IN VITRO</i> Киракосян Р.Н., Калашникова Е.А.	13
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ СЕМЯН БЕЛОГО ЛЮПИНА (<i>LUPINUS ALBUS L.</i>) Князева И.В.	14
ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РАСТЕНИЯ МАЛИНЫ ПРИ ОЗДОРОВЛЕНИИ <i>IN VITRO</i> Тихонова К.О.	15
БИБЛИОТЕКА ГЕНОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АКАБАНЕ Сухер М. М. , Сальников Н. И., Балашова Е.А.	16
СОЗДАНИЕ ЧИСТЫХ ЛИНИЙ КУЛЬТУР РОДА <i>BRASSICA</i> В КУЛЬТУРЕ МИКРОСПОР Безбожная А.В., Монахос С.Г.	17
ПОЛУЧЕНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ МОРКОВИ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ Чистова А.В., Монахос С.Г.	18

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ КЛЕВЕРА (<i>TRIFOLIUM REPENS</i> L.) УСТОЙЧИВЫХ К ВЫСОКИМ ДОЗАМ ИОНОВ МЕДИ МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ И ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ. Шатунова С.А., Ермошин А.А.	20
ВЛИЯНИЕ СВЕТОДИОДНЫХ ЛАМП РАЗНОГО СВЕТА НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК <i>ASTRAGALUS MONGHOLICUS</i> BGE. И <i>ASTRAGALUS ADSURGENS</i> PALL. В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> Энхтайван А.	21
РАСТЕНИЯ <i>ARABODOPSIS THALIANA</i> С ИНТЕГРИРОВАННЫМ ГЕНОМ ФИТАЗЫ БАКТЕРИИ <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i> Трошагина Д.С., Валеева Л.Р., Нямсурэн Ч.	22
ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ И ПОТОМСТВ ОТ СРЕЩИВАНИЯ СОРТОТИПОВ СВЕКЛЫ РОДА <i>BETA</i> Федулова Т.П., Федорин Д.Н.	23
ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ АСТРАГАЛА МОНГОЛЬСКОГО И БЕРЕСКЛЕТА КАРЛИКОВОГО Кузьмина Е.А., Энхтайван А.	25
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ В СЕМЕНОВОДСТВЕ ОЗДОРОВЛЕННОГО КАРТОФЕЛЯ Хабарова Л.Н., Полякова М.Н., Пастухов С.А., Чередниченко М.Ю.	26
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ХРОМОСОМНОГО СОСТАВА ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ЧУЖЕРОДНЫМИ ХРОМОСОМАМИ Чуманова Е.В., Ефремова Т.Т., Арбузова В.С., Трубачеева Н.В.	28
ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ SSR МАРКЕРА <i>XGDM35</i> ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНА <i>LR41</i> У ОБРАЗЦОВ <i>AEGILOPS CYLINDRICA HOST</i> Колесова М.А., Тырышкин Л.Г.	29
ПОИСК И РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К СОСУДИСТОМУ БАКТЕРИОЗУ У КАПУСТЫ ПЕКИНСКОЙ Ельшко Н.В.	31
ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА <i>IN VITRO</i> ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ МЯТЫ БОЛОТНОЙ (<i>MENTHA PULEGIUM</i> L.) Мубарак М.М., Чередниченко М.Ю.	32
СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОГО ВЕКТОРА <i>pHLZ1</i>, НЕСУЩЕГО В СВОЕМ СОСТАВЕ ГЕНОМНУЮ КОПИЮ ГЕНА ЛИЗОЦИМА ЧЕЛОВЕКА И НАПРАВЛЕННОГО НА ПОЛУЧЕНИЕ ТРАГСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ Кузнецова В.Н.	33

СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ГЕНОВ <i>DREB1</i> У <i>THINOPYRUM</i>, <i>DASYPYRUM</i> И <i>ELYMUS SPICATUS</i>	35
Почтовый А.А., Дивашук М.Г., Карлов Г.И.	
ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РАЗВИТИЯ ДЛЯ ГРИБОВ РОДА <i>FUSARIUM</i> В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	36
Осокина Н.В., Калашникова Е.А.	
ПОИСК ИСТОЧНИКОВ ВИРУСОУСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ПОМОЩИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ	38
Кузьмина О.А., Вологин С.Г., Сташевски З., Гимаева Е.А.	
ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СПОНТАННЫХ ГИБРИДОВ БЕРЕЗЫ (<i>BETULA NANA</i> L. × <i>BETULA PENDULA</i> ROTH) И ИХ ВОСПРОИЗВОДСТВО В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ	40
Константинов А.В., Емельянова О.В.	
МЕТОД УСКОРЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДОВ <i>CLAVIABACTER</i> И <i>RATHAUIBACTER</i> НА УРОВНЕ «ВИД-ПОДВИД»	42
Стародумова И.П., Присяжная Н.В., Тарлачков С.В., Арискина Е.В., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.	
ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА УВЕЛИЧИВАЕТ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ ЭКСТРЕМОФИТОВ <i>EUTREMA</i> (<i>THELLUNGIELLA</i>) <i>SALSUGINEA</i> И <i>EUTREMA</i> (<i>THELLUNGIELLA</i>) <i>BOTSCHANTZEVII</i>	44
Шамустакимова А.О., Леонова Т.Г., Таранов В.В., А. de Voer, Бабаков А. В.	
СОЗДАНИЕ БЕЗМАРКЕРНЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА С ГЕНОМ СУПЕРСЛАДКОГО БЕЛКА	45
Тимербаев В. Р., Окунева А. С., Пушин А. С., Долгов С. В.	
ДНК-ПЛАВЯЩАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА РАСТЕНИЯ-ЭКСТРЕМОФИТА <i>THELLUNGIELLA</i> <i>SALSUGINEA</i>	46
Злобин Н. Е.	
НОВЫЙ РАСТИТЕЛЬНЫЙ ПРОМОТОР <i>pro-SmAMP1</i> ИЗ <i>STELLARIA</i> <i>MEDIA</i>	47
Ефремова Л.Н., Высоцкий Д.А.	
ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА С ГЕНАМИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ ПЕТУНИИ <i>ЕОВ1</i> И <i>ЕОВ2</i> ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ АРОМАТА ПЛОДОВ	48
Окунева А.С, Тимербаев В.Р., Долгов С.В.	

