

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

**XII МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

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

11 апреля 2012 г.

*Конференция посвящается памяти
академика РАСХН
Георгия Сергеевича
МУРОМЦЕВА*

Москва - 2012

ОТБОР ФОРМ ТОМАТА С ЗАДАННОЙ КОМБИНАЦИЕЙ ГЕНОВ ($nor/nor//og^c/og^c$ и $nor^+/nor^+//og^c/og^c$) СРЕДИ ГИБРИДОВ F₂ МЕТОДОМ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Аджиева В.Ф.¹, Некрашевич Н.А.¹, Бабак О.Г.¹, Мишин Л.А.²,
Кильчевский А.В.¹

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск 220072,
ул. Академическая, 27, Беларусь, E-mail: Adjieva-vika@mail.ru

²Институт овощеводства НАН Беларуси, Минский р-н, п. Самохваловичи

Важная задача селекции томата – повышение сохранности и качества плодов. Большой практический интерес для повышения эффективности использования генов, удлиняющих период сохранности плодов томата, представляет их комбинирование с генами, контролирующими содержание каротиноидов. Для этого в 2009 году нами был создан ряд гибридов, сочетающих гены, изменяющие содержание каротиноидов (B , og^c , t , $gf-3$) и лежкость плодов томата (nor , nor^A , rin). Среди растений поколения F₂ представляет интерес отбор форм, в которых будут одновременно сочетаться гены, детерминирующие длительность периода сохранности плодов и содержания каротиноидов в гомозиготном состоянии, а также форм, где ген лежкости будет представлен дикой аллелью наряду с гомозиготным состоянием гена, повышающего содержание каротиноидов. Данные генотипы являются готовыми родительскими линиями для семеноводства с целью получения гибридов с желаемой комбинацией генов.

В работе приведены результаты применения фрагментного анализа для идентификации форм с различной комбинацией генов nor ($non-ripening$) и og^c ($old-gold\ crimson$) среди гибридов F₂ (рисунок 1). Использование данного метода значительно сокращает сроки селекционного процесса.

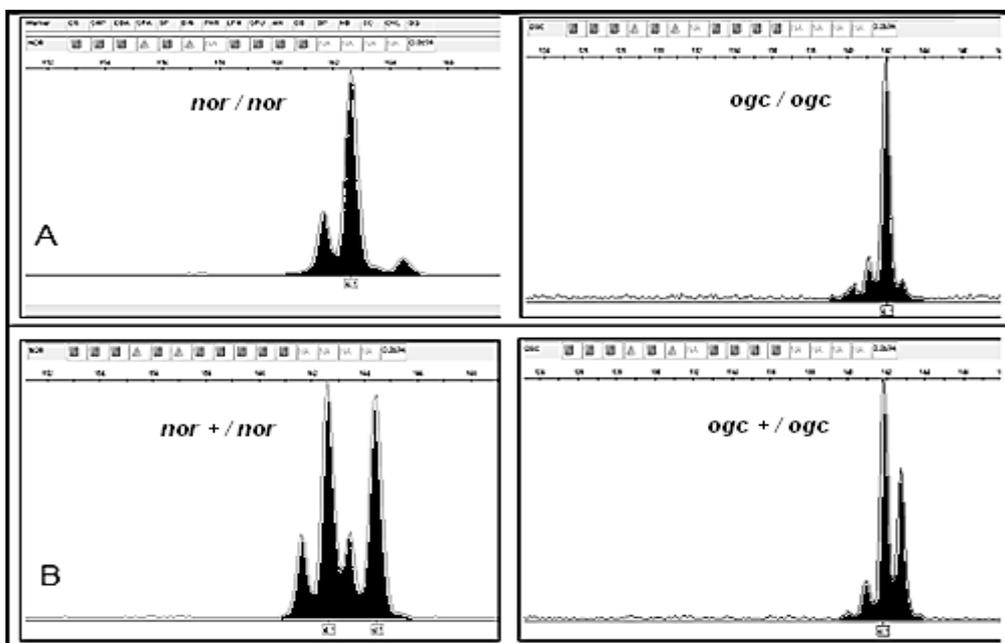


Рисунок 1 – Результаты фрагментного анализа растений F₂ Бония x Мо 948: А – растение №72 – двойная гомозигота $nor/nor//og^c/og^c$; В – растение №58 – гетерозигота $nor^+/nor^+//og^c/og^c$.

По результатам двухлетних исследований гибрид Бония (*og^c/og^c*) x Мо 948 (*nor/nor*) проявил себя, как лучший среди 24 гибридов F₁ с мутантными генами по признаку «период сохранности плодов томата». В 2010 году плоды данного гибрида хранились в нерегулируемых условиях среды (22-24 °С) на протяжении 39 дней, а в 2011 – 77 дней. А проведенный биохимический анализ свидетельствует о высокой практической ценности объединения генов *nor* и *og^c* в одном генотипе, при котором они взаимно дополняют друг друга, улучшая окраску плода и повышая содержание каротиноидов в гибридах до 10,5 мг/100 г. ликопина и 1,5 мг/100 г. β-каротина.

Из растений F₂ гибридной комбинации Бония x Мо 948 была выделена ДНК и проведен фрагментный анализ флуоресцентно-меченых ПЦР-фрагментов на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 (США). Полученные данные проанализированы с помощью пакета прикладных программ GeneMapper Software Version 4.1. Фрагментный анализ 64 гибридов F₂ позволил выявить 5 растений, сочетающих в генотипе мутантные аллели в гомозиготном состоянии *nor/nor//og^c/og^c* (рисунок 1 А), 19 растений *nor⁺/nor//og^c/og^c*, 4 растения *nor/nor//og^{c+}/og^c* и 36 растений *nor⁺/nor//og^{c+}/og^c*.

Характер расщепления в F₂ был проанализирован с использованием критерия χ^2 . Наблюдаемое распределение частот генов (36:4:19:5) несколько отличалось от теоретически ожидаемого (36:12:12:4), возможно, это связано с более слабой жизнеспособностью проростков гомозигот по мутантному гену *nor*, но при $\chi^2=0,01$ разница между полученным и ожидаемым числом форм каждого генотипа носила случайный характер (таблица 1).

Таблица 1 – Характер расщепления гибридов F₂, сочетающих в генотипе мутантные аллели генов *old-gold crimson (og^c)* и *non-ripening (nor)*

Фенотип родителей	Классы генотипов в F ₂				Всего учетных растений, шт.
	<i>og^{c+}₊nor₋</i>	<i>og^{c+}₋nor₊</i> (♂)	<i>og^c₋nor⁺₊</i> (♀)	<i>og^cog^cnor₋</i>	
Фактическое расщепление в F ₂	36	4	19	5	64
Теоретическое расщепление в F ₂	36	12	12	4	64
Ожидаемое соотношение	9	3	3	1	16
Критерий χ^2	9,63				

Примечание: $\chi^2_{0,01} (df=3) = 11,34$

Таким образом, отобранные формы с генотипом *nor/nor//og^c/og^c* и *nor⁺/nor⁺//og^c/og^c* могут быть использованы для получения гибридов с комбинацией генов *nor⁺/nor//og^c/og^c*. Данные гибриды будут характеризоваться благоприятным сочетанием эффектов двух мутантных генов, где *nor* в гетерозиготном состоянии будет способствовать удлинению периода сохранности плодов без отрицательного влияния на внешний вид и содержание каротиноидов. Применение молекулярных маркеров и методов фрагментного анализа позволяют значительно сократить и удешевить селекционный процесс, а отобранные генотипы *nor/nor//og^c/og^c* и *nor⁺/nor⁺//og^c/og^c* являются ценным константным материалом для дальнейшей селекции на качество плодов томата.

ДНК-МАРКИРОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ МНОГОПОЧАТКОВОЙ КУКУРУЗЫ

Айшаева З.М., Алоева Б.А., Паритов А.Ю., Керефова М.К.

Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, кафедра общей генетики, селекции и семеноводства, Нальчик 360000
E-mail: Aishaeva@mail.ru, bella.aloeva@mail.ru, Paritov@mail.ru

Одним из наиболее перспективных направлений селекционных работ является разработка технологий ДНК-маркирования хозяйственно-ценных признаков. Селекция при помощи маркеров – MAS (marker assistant selection) – позволяет вести селекцию на качественно новом уровне, в меньшей зависимости от модифицирующих фенотип влияний факторов окружающей среды. В MAS используются только природные комплексы генов, характерные для данного вида, присутствие этих комплексов в их геноме является естественным и безопасным как для самого растительного организма, так и для человека потребляющего продукцию от него.

Материалом для исследований служат линии кукурузы селекции кафедры общей генетики, селекции и семеноводства КБГУ. У данных линий отмечается высокая степень реализации их потенциальных возможностей в формировании многопочатковости. При отборе на многопочатковость, на основе Кабардинской белой зубовидной в Кабардино-Балкарской республике был выведен и районирован сорт-популяция Юбилейная-50. У Юбилейной-50 многопочатковость (в основном двухпочатковость) достигает 50 и более процентов при обеспечении растений необходимым питанием и влагой. С целью вовлечения в селекционный процесс по выведению двухпочатковых гибридов нового разнообразия исходного материала, были использованы химические мутагены. Растения с двумя-тремя и большим числом початков в последующие годы отбирали и самоопыляли. На данном этапе проводится молекулярно-генетический анализ полученных в результате линий кукурузы, которые имеют стабильные различия по ряду морфофизиологических признаков и изучены в системе диаллельных скрещиваний.

Целью дальнейших исследований является анализ полиморфизма генетического материала кукурузы RAPD-методом.

ДНК выделяли тризольным методом (процедура выделения занимает около 4 часов). Семена кукурузы проращивали в течение 3-4 суток. Перед проращиванием их предварительно обрабатывали 70%-ным этанолом для исключения экзогенной микрофлоры.

Для проведения амплификации геномной ДНК использовали короткие праймеры длиной 10 нуклеотидов. ПЦР проводилась в амплификаторе MyCycler (Bio-Rad, США) в течение 4 часов. Амплификацию проводили в следующем режиме: 3 мин при 94 °С; далее 35 циклов: 1 мин при 94 °С, по 1 мин при 54-72 °С, 2 мин при 72 °С; конечная элонгация в течение 2 мин при 72 °С. Для визуализации результатов амплификации использовали электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в 1,5% агарозном геле на TAE буфере. Окрашивали бромистым этидием с последующей детекцией в ультрафиолетовом свете.

Особый интерес вызвали результаты амплификации по праймеру ОРН13. Суммарный спектр продуктов амплификации (ампликонов) участков ДНК состоял из 10 фрагментов длиной от 200 до 1000 п.н. По праймеру ОРН 13 наблюдался высокий уровень полиморфизма у всех исследуемых образцов ВИР. Между тем как среди 6 образцов линий кукурузы селекции КБГУ амплификация прошла только у линии 30. В

спектрах продуктов амплификации образцов ВИР, линии 30 и гибрида ВИР×4 были обнаружены сходные ампликоны длиной 200 и 300 п.н.

RAPD-анализ, позволяет детектировать полиморфизм разных участков генома, который особенно важен для исследования полигенных признаков. Данные о локализации RAPD могут быть с успехом использованы для создания эффективных генетических маркеров для картирования локусов агрономически важных признаков. Эти данные послужат надежной основой для прогнозирования потенциальной продуктивности исследуемых линий и гибридов кукурузы.

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ТРИТИКАЛЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Акинина В.Н.

***ГНУ НИИСХ Юго-Востока Россельхозакадемии, 410010, Саратов, ул. Тулайкова,
д.7, E-mail: kostina_vichka@mail.ru***

Проблема сохранения уникальных генотипов является важной в селекционно-генетических исследованиях. Получение семян отдаленных гибридов и гаплоидов сопряжено с рядом трудностей и не всегда заканчивается успешно, в связи с чем важное значение имеет сохранение стерильных растений, их последующее размножение и дальнейшее использование в работе.

Микроразмножение *in vitro* является клональным, при этом получаемые клоны идентичны как материнскому растению, так и между собой. Кроме сохранения уникальных генотипов, эта клеточная биотехнология имеет и другое преимущество – высокий коэффициент размножения по сравнению с другими методами.

В наших исследованиях метод микроразмножения был применен для сохранения и размножения стерильных реципрокных гибридов тритикале х пшеница, а также неудоенных гаплоидов озимой гексаплоидной тритикале. Для этой цели был использован соматический эмбриогенез в каллусных культурах (неполовой путь развития зародышеподобных структур). Основными факторами, определяющими успех метода, являются тип экспланта, стадия развития и оптимально подобранный состав питательной среды (Schulze, 2007; Игнатова, 2011). Наиболее подходящими эксплантами, формирующими эмбриогенный активный каллус у злаков являются незрелые и зрелые зародыши, которые удобны для работы в течение всего года. Для микроразмножения стерильных растений, у которых зародыш отсутствует, необходимо подобрать подходящий эксплант и получить из него морфогенетически активный каллус.

Нами в качестве эксплантов для получения каллусных культур были использованы сегменты молодых колосьев, которые после стерилизации помещались на питательную среду МС, содержащую 2 мг/л 2,4-Д. Через месяц после культивирования было проведено пассирование каллусов, а из сформировавшихся зон морфогенеза были регенерированы растения.

Частота образования каллусов колебалась от 17,7 до 100%. Изученные генотипы достоверно отличались друг от друга по частоте формирования каллусов. При этом самая низкая частота была у гибрида №403, а самая высокая у гаплоида № 408. Выход растений – регенерантов варьировал от 8,3 до 100%. При этом интересно отметить, что гаплоид №408, отличающийся наиболее высокой частотой каллусообразования, имеет самый низкий выход растений. И наоборот, гибрид №403, при самой низкой частоте

каллусообразования, характеризовался самой высокой частотой регенерации растений. Всего в опыте было получено 116 растений (таблица).

Таблица. Эффективность микроклонального размножения тритикале.

Генотип	Кол-во эксплантов,			Получено каллусов за 1-2 пассаж	Получено растений	
	всего, шт.	из них с каллусом, шт.	%		шт.	%
399*	9	6	66,7	17	2	11,8
403*	17	3	17,7	49	49	100
404**	7	4	57,1	15	10	66,7
405,406**	22	20	90,9	52	10	19,2
408**	4	4	100	24	2	8,3
411,412,413**	17	14	82,4	43	20	46,5
414**	18	12	66,7	31	17	54,8
444**	8	5	62,5	18	4	22,2
Всего	102	78	76,5	249	116	41,2
F ₀₅			5,19			23,9
НСР ₀₅			33,5			20,0

Примечание: * - гибриды, ** - гаплоиды

Таким образом, разработана биотехнология микроклонального размножения стерильных растений тритикале (отдаленных гибридов и неудвоенных гаплоидов). Она включает использование фрагментов незрелых колосьев в качестве эксплантов (у стерильных растений отсутствует зародыш – эксплант, традиционно используемый для получения эмбрионного каллуса), их культивирование на питательной среде, содержащей 2,4-Д (2 мг/л) и сахарозу в качестве источника углеводов (2%), для получения эмбрионного каллуса и последующую регенерацию растений на питательной среде с ИУК (1 мг/л). Разработанная биотехнология позволяет сохранять и размножать в неограниченном количестве любой генотип.

Список литературы.

1. Игнатова С.А. Клеточные биотехнологии в растениеводстве, генетике и селекции растений: задачи, возможности разработки систем *in vitro*: [монография] / С.А. Игнатова. – Одесса: Астропринт, 2011. – 224с.
2. Schulze Ju. Improvement in cereal tissue culture by Thidiazuron: a review / Schulze Ju. // Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, 2007. –P.64-79.

РАЗРАБОТКА ОЛИГОНУКЕОТИДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТРАНСГЕННОГО МАТЕРИАЛА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Бакулина А.В.

*ГНУ Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого РАСХН, Киров, 610000, ул. Ленина 166А
E-mail: drugaeann1@rambler.ru*

Площади возделываемых трансгенных культур в 2010 году по данным Международной службы по мониторингу за применением агробиотехнологии (ISAAA) превысили 1 млрд. га [1]. Продукты питания и корма, содержащие компоненты, полученные из генетически модифицированных растений (ГМР), давно заполнили

российский рынок, но потенциальные риски их использования вызывают озабоченность потребителей и органов, контролирующих безопасность продуктов питания [2].

Наиболее распространенным методом для выявления ГМР и продуктов, полученных на их основе, является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий обнаружить непосредственно трансгенную ДНК. Так как большинство полученных трансгенных культур содержат в составе введенной генетической конструкции промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (35S CaMV) и терминатор гена нопалинсинтетазы (NOS) *Agrobacterium tumefaciens*, основная часть ПЦР тест-систем, предназначенных для идентификации трансгенного растительного материала, обнаруживает именно эти последовательности. Однако в недавнее время в Российской Федерации были зарегистрированы трансгенные линии (сахарная свекла Н7-1, соя MON89788), в геноме которых отсутствуют как промотор 35S CaMV, так и терминатор NOS, поэтому используемые сегодня тест-системы не способны выявить данные линии. К тому же необходимо отметить, что многие коммерческие тест-системы высоко специфичны и позволяют эффективно выявлять трансгенную ДНК определенных линий ГМР, но применение их для оценки пищевого материала в целом не всегда достоверно [3]. Специфичность ряда коммерческих тест-систем можно объяснить тем, что они содержат праймеры и зонды к участкам в составе трансгенных конструкций отдельных линий. Поэтому производителям тест-систем необходимо указывать для выявления каких линий ГМР они предназначены. А для разработки универсальных тест-систем следует использовать консервативные участки элементов.

Таким образом, актуальным направлением генно-молекулярных технологий является разработка универсальной тест-системы, дающей достоверные результаты анализа пищевых продуктов и кормов, представленных на российском рынке.

Цель исследования – подбор праймеров и зондов для постановки мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления всех линий ГМР, зарегистрированных на территории Российской Федерации.

Первый этап работы состоял в поиске и анализе информации о структуре генетических конструкций, встроенных в геномы 17 линий ГМР, разрешенных к использованию в России. В качестве мишеней для ПЦР были выбраны промоторы 35S CaMV, 34S FMV (промотор вируса мозаики норичника) и терминатор NOS.

Для подбора праймеров и зондов использовали следующий алгоритм:

1. Поиск нуклеотидных последовательностей ДНК-мишеней;
2. Множественное выравнивание кодирующих последовательностей ДНК-мишеней в составе трансгенных конструкций разных линий;
3. Выявление гомологичных участков нуклеотидных последовательностей ДНК-мишеней;
4. Подбор праймеров и зондов к гомологичным участкам ДНК-мишеней;
5. Анализ структуры и термодинамических свойств олигонуклеотидов.

Поиск нуклеотидных последовательностей промоторов 35S CaMV, 34S FMV и терминатора NOS в составе трансгенных конструкций различных линий растений осуществляли в базах данных GMDD (<http://gmdd.shgmo.org/>) и NCBI Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Выравнивание проводили с использованием программ MAFFT (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>) и AliBee (http://www.genebee.msu.ru/services/malign_reduced.html/). Термодинамические свойства олигонуклеотидов оценивали с помощью программы Real Time Design™ (<http://www.biosearchtech.com/>). Ниже приведены праймеры и зонды для выбранных нами мишеней:

трансформации растений на этапах отбора трансформантов и элиминации агробактерий из ткани растения. Наиболее часто с этой целью в генной инженерии зерновых культур используются антибиотики канамицин и цефотаксим [1,2].

Целью нашей работы явилось изучение реакции трёх генотипов ячменя на введение в культуральные среды селективных антибиотиков канамицина и цефотаксима в различных концентрациях для разработки протокола агробактериальной трансформации этих генотипов.

В качестве объектов исследования служили каллусная ткань и эмбриокультура ячменя, для получения которых были использованы сорт Белгородский 100 селекции ОАО НПФ «Белселект», гибриды 752-92 × Меркурий и Новичок × 999-93 селекции ГНУ НИИСХ Северо-Востока Россельхозакадемии.

Определяли частоту каллусогенеза и морфогенеза каллусной ткани, а также характер роста эмбриокультуры ячменя на средах с введением канамицина и цефотаксима в концентрациях 25, 50, 100 и 150, 200, 300 мкг/мл соответственно.

В качестве эксплантов для получения каллусной культуры ячменя использовали незрелые зародыши на третьей подстадии дифференциации (12,5–17,0 суток после опыления, длина зародыша 1,5–2,0 мм) [3], для эмбриокультуры - зрелые зародыши (22–25 суток после опыления, длина зародыша 2,3–2,6 мм).

Зерновки освобождали от покровных чешуй, стерилизовали 5% раствором хлорамина в течение 12 мин, затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Экспланты помещали на среду Мурасиге и Скуга [4]. Для получения каллусной культуры в среду добавляли 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4Д), для эмбриокультуры использовали безгормональную среду. Эксплантированные зародыши культивировали при следующем режиме: температура днем 20–22°C, ночью 16–18°C, фотопериод 16 час.

Через 20 суток после эксплантации регистрировали частоту каллусогенеза и морфологию образовавшихся каллусов: цвет, текстуру, величину и пр.

Через 2 недели эмбриокультуру и через 3 недели каллус пересаживали на среду, содержащую селективные антибиотики канамицин или цефотаксим в указанных концентрациях. В качестве контроля использовали линии на среде без введения антибиотиков.

Через 10, 20 и 30 суток культивирования каллуса на средах с канамицином и цефотаксимом оценивали выживаемость каллуса (процент от общего количества пассированного каллуса) и частоту морфогенеза (процент морфогенных от количества выживших линий). Для эмбриокультуры отмечали морфологические изменения («перехваты», побеление хлорофиллоносной ткани, задержку ризогенеза и т.д.), сравнивая развитие растений, культивированных на средах с канамицином и цефотаксимом, с контрольными растениями.

Во втором пассаже каллусных линий отмечали нормально сформировавшиеся растения (регенеранты), имеющие побеги и корневую систему, и отклоняющиеся формы (ризогенез, геммагенез). Эффективность регенерации рассчитывали как процент каллусов, давших нормально развитые растения-регенеранты от общего количества каллусных линий.

Сравнительный анализ частоты каллусогенеза показал, что частота каллусообразования в среднем для трёх генотипов ячменя составила $63,85 \pm 2,75\%$, изменяясь от 61,1% у сорта Белгородский 100 до 66,6% у гибрида Новичок × 999-93.

Добавление в среду канамицина в концентрациях 25, 50, 100 мкг/мл вызывало гибель каллуса через 30 дней культивирования. Среди трех исследованных генотипов только гибрид Новичок × 999-93 обеспечил выживаемость 20% каллуса на среде с концентрацией канамицина 25 мкг/мл. Выживаемость каллуса на среде с цефотаксимом

(150, 200, 300 мкг/мл) была выше, чем с канамицином и составила в среднем для гибрида 752-92 × Меркурий 14,3%, а для сорта Белгородский 100 - 45,5%.

Добавление канамицина в среду для выращивания эмбриокультуры ячменя сопровождалось полной ее гибелью к концу культивирования, независимо от концентрации антибиотика и исследуемого генотипа. В отличие от канамицина, добавление в среды для выращивания эмбриокультуры ячменя цефотаксима практически не вызвало гибели растений. Выживаемость растений на среде с цефотаксимом колебалась от 83,3% у сорта Белгородский 100 до 100% у гибрида 752-92 × Меркурий.

Таким образом, в ходе эксперимента было установлено, что исследованные генотипы ячменя практически не различаются по частоте каллусогенеза, которая варьировала около 64% в незначительных пределах; селективный антибиотик цефотаксим для культуры изолированной ткани ячменя менее токсичен, чем канамицин, как на уровне недифференцированной каллусной ткани, так и на органном уровне (в эмбриокультуре). В связи с этим, в работе по генетической трансформации ячменя для отбора трансформантов в культуральной среде достаточно 25 мкг/мл канамицина, а для элиминации агробактерий цефотаксим можно использовать в концентрациях до 300 мкг/мл.

Литература

Данилова С.А. Методы генетической трансформации зерновых культур // Физиология растений, 2007. Т. 54, № 5. С. 645–658.

Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // Физиология и биохимия культурных растений, 2009. Т.41, № 2. С. 124–131.

Майсурян А.Н., Овчинникова В.Н., Долгих Ю.И, Степанова А.Ю., Терешенок Д.В., Мартиросян Ю.Ц., Харченко П.Н. Агробактериальная трансформация ячменя // Биотехнология, 2006. № 3. С. 56–61.

Murashige Y., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol Plant*. 1962. № 3. P. 473–497.

ЭФФЕКТИВНЫЙ ОТБОР И АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

**Бердичевец И.Н., Шаяхметова Д.М., Шимшилашвили Х.Р., Шелудько Ю.В.¹,
Голденкова-Павлова И.В.**

ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва 19991

E-mail: i_berdichevets@hotmail.com

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Киев 03143*

В настоящее время генетическая инженерия стала удобным инструментом для изучения физиологической роли растительных генов, для придания растениям полезных признаков и свойств, для создания растений-продуцентов фармакологически важных белков и пептидов, а также для решения целого ряда других фундаментальных и прикладных задач.

Какую бы задачу не ставил перед собой исследователь, важным и достаточно трудоемким этапом в процессе создания трансгенных растений является эффективный

отбор из большого числа первичных трансформантов растений, содержащих в геноме вставку целевого гена, а также последующий анализ наследования трансгена в ряду поколений. Простым и экономичным методом для этого является полимеразная цепная реакция. Однако для того, чтобы проанализировать трансформанты необходимо решить ряд задач и провести несколько ПЦР, условия для каждой из которых необходимо подбирать индивидуально, что в конечном итоге занимает достаточно много времени. В связи с этим оптимизация условий ПЦР для эффективного отбора и анализа трансгенных растений является актуальной задачей.

Известно, что интеграция трансгена в геном растения-реципиента достаточно редкое событие. Поэтому для трансформации используются векторы с селективными генами, экспрессия которых обеспечивает толерантность трансформантов к селективному агенту. Присутствие селективного агента в среде культивирования повышает эффективность отбора предположительных трансформантов и значительно сокращает объем работы. Однако, поскольку для целого ряда видов растений селекционное давление негативно сказывается на процессах каллусо- и морфогенеза, зачастую приходится либо использовать меньшие концентрации селективного агента, либо вообще на ранних этапах не использовать селективный агент. Это может приводить к отбору ложных трансформантов, способных расти на селективных средах. ПЦР с праймерами, комплементарными последовательностям селективных генов, позволяет провести анализ растений-регенерантов и исключить ложные трансформанты из эксперимента уже на начальных стадиях их появления.

В настоящее время одним из наиболее часто используемых методов трансформации растений является перенос генов с помощью агробактерий. Известно, что агробактерии способны сохраняться в сосудистой системе растений в течение нескольких поколений. Присутствие агробактерий в растительных образцах может привести к ложноположительным результатам ПЦР – могут быть отобраны ложные трансформанты растений. Поэтому для того, чтобы доказать, что амплификация последовательностей исследуемых генов проходит с геномной ДНК растений, а не с экспрессионного вектора и/или геномной ДНК агробактерий, необходимо провести амплификацию образцов с праймерами, подобранных либо к хромосомным генам агробактерий, либо к генам, присутствующим в векторной конструкции вне области T-ДНК.

Известно, что на результат ПЦР может влиять качество препарата ДНК. Поэтому ряд авторов рекомендуют в качестве внутреннего контроля проводить амплификацию генов домашнего хозяйства (*house-keeping genes*) (Mannerlof et al., 1997). Это позволит исключить ложноотрицательные результаты, обусловленные плохим качеством препаратов геномной растительной ДНК.

В работах по созданию трансгенных растений часто используют репортерные гены. В частности в нашей лаборатории используется технология переноса в растения гибридных генов: в экспрессионном векторе целевой ген имеет транскрипционно-трансляционное слияние с репортерным геном (Piruzian et al., 2002). ПЦР с праймерами к репортерному гену позволяет провести анализ первичных трансформантов и с высокой степенью вероятности предполагать, что отобранные растения будут содержать и целевые гены. Поскольку известно, что в результате переноса T-ДНК при агробактериальной трансформации может проходить интеграция не полной последовательности T-ДНК, весьма важно оценивать не только наличие репортерного или селективного генов, но и последовательности целевого гена.

В связи со всем вышесказанным, целью наших исследований стала разработка метода мультиплексной ПЦР, который позволил бы за один цикл амплификации

определять в геномной ДНК растений последовательности нескольких генов и при этом исключать появление ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Для разработки метода мультиплексной ПЦР были выбраны следующие гены: селективный ген (*nptII*), гены домашнего хозяйства исследуемых видов растений (*NtGA2*, *Act*), гены вирулентности *Agrobacterium tumefaciens* (*virE*, *virD*), репортерный ген *licB*, кодирующий термостабильную β -1,3-1,4-глюканазу (лихеназу) *Clostridium thermocellum*, ряд других целевых генов и регуляторных элементов.

Праймеры к последовательностям исследуемых генов были подобраны таким образом, чтобы их температуры отжига были достаточно близки, а амплифицированные фрагменты генов можно было эффективно разделять в агарозном геле. Нам удалось подобрать одинаковые условия ПЦР для каждого исследуемого гена, при которых происходит амплификация только целевой последовательности. Далее, были подобраны оптимальные соотношения каждого из праймеров системы и условия мультиплексной ПЦР, при которых происходит амплификация всех целевых последовательностей с одинаковой эффективностью.

Предложенная система праймеров, их оптимальные соотношения и условия мультиплексной ПЦР успешно апробированы на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на трансформантах сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат, рапс).

Таким образом, разработанный и успешно апробированный нами метод мультиплексной ПЦР позволяет за одним раунд амплификации проводить скрининг первичных трансформантов и выявлять наличие последовательностей целевых генов, селективного и репортерного генов, а также оценивать качество препарата, выделенной геномной ДНК (по амплификации гена домашнего хозяйства), и отсутствие контаминации агробактериями первичных трансформантов растений (по амплификации последовательностей генов вирулентности агробактерии).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 11-04-90466-Укр_ф_а.

ОСОБЕННОСТИ ВАРИАБЕЛЬНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ СЕМЯДОЛЬНЫХ ЛИСТЬЕВ *LINUM USITATISSIMUM* ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ-В ОБЛУЧЕНИЯ

Берестяная А.Н.

***Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, отдел
биофизики и радиобиологии, Киев 03680, ул. акад. Заболотного, 148.***

E-mail: a.berestyanaya@yandex.ru

Исследование эпигеномных эффектов, вызванных действием УФ-В облучения на растительный организм остается на сегодня одной из актуальных проблем. Согласно оценкам экспертов, снижение озонового слоя и усиление коротковолновых излучений может привести к ослаблению сформированных в ходе эволюции защитных механизмов и нарушению биохимических и физиологических процессов. В связи с этим возникает необходимость исследования воздействия УФ-радиации на механизмы эпигенетической регуляции онтогенеза. Известно, что на онтогенез монокарпических растений осуществляет влияние УФ-радиация, которая в зависимости от доз, способов облучения, вида растения способствует как ускорению, так и замедлению темпов старения, что регистрируется по гидролитической активности. В основе каскада

реакций возрастной деградации лежат эпигенетические процессы, выражающиеся в изменении статуса метилирования функциональных последовательностей ДНК.

В процессе старения растений количество и спектр изменений эпигенома зависит от нескольких факторов: особенностей генотипа, условий выращивания, типа ткани и уровня специализации клеток, внутренних факторов и путей передачи сигналов, ведущих к необратимым нарушениям генетических программ. Следовательно, целесообразно исследовать объекты, в которых данные процессы протекают относительно быстро. Удобной моделью для изучения закономерностей и механизмов старения растений являются семядольные листья. Они представляют собой орган, предназначенный для запасаания питательных веществ, необходимых развивающемуся побегу. Как только побег достигает определенной стадии, потребность в ассимилятивном органе пропадает, семядольные листья начинают отмирать. Важно исследовать этап переключения эпигенома, на котором запускается программа старения и отмирания семядольных листьев. Целью работы было исследование изменений статуса метилирования отдельных последовательностей и генома в целом на разных стадиях онтогенеза семядольных листьев *Linum usitatissimum*, установление эпигенетических механизмов инициации старения и степени влияния разных доз УФ-В облучения на эти процессы.

В работе были использованы три дозы УФ-В облучения: 4,23 кДж/м², 8,46 кДж/м², 12,6 кДж/м². Облучение проводили на стадии 15-дневного проростка, когда были полностью сформированы ассимилятивные органы. Онтогенез семядольных листьев условно разделили на 4 стадии, период за который лист проходил этапы роста, развития, стабильности и деградации. Геномную ДНК облученных и необлученных проб выделяли СТАБ-методом на каждой стадии онтогенеза, проводили спектрофотометрический анализ концентрации препаратов. Эпигеномные эффекты исследовали путем анализа спектра метилирования ДНК. Для этого отобранные стандартизированные пробы геномной ДНК подвергали рестрикционному анализу с помощью рестриктаз, чувствительных к метилированию. Результаты рестрикции анализировали путем электрофореза в 1,7% агарозном геле. Исходя из того, что вариабельному метилированию генома в ходе старения подвергаются CpCpGpG – сайты, которые часто встречаются в повторяющихся последовательностях, мы анализировали уровень метилирования ITS (internal transcribed spacer) гена рибосомной РНК. Проводили полимеразную цепную реакцию с ITS-праймерами. Несмотря на высокую степень консервативности у зрелых последовательностей рРНК, нетранскрибирующиеся и транскрибирующиеся спейсерные последовательности обычно мало консервативны, обладают многокопийностью и, следовательно, пригодны в качестве последовательностей для определения метилирования. Ампликоны ITS подвергали рестрикционному анализу с помощью MspI и HpaII метилчувствительных рестриктаз. MspI разрезает все последовательности CCGG вне зависимости от наличия метилирования, а HpaII разрезает только неметилированные CCGG-тетрамеры.

В ходе работы были зафиксированы изменения. При изучении уровня метилирования остатков цитозина в CpCpGpG-мотивах ДНК, было показано, что оба остатка цитозина гидролизуются ферментами рестрикции MspI и HpaII. Наблюдались расхождения в электрофоретической подвижности ДНК разных возрастов, рестрицированной MspI и HpaII. По показателю подвижности, MspI-продукты гидролиза ДНК листьев разных возрастов отличались столь же незначительно, как от нативной ДНК. В то же время, HpaII по-иному гидролизовала ДНК семядольных листьев разных возрастов. ДНК старых листьев фактически не расщеплялась этим ферментом, однако ДНК молодых листьев интенсивно гидролизывалась HpaII, в результате чего образовались фрагменты разной молекулярной массы. Разная

электрофоретическая подвижность MspI и HpaII-продуктов гидролиза, может быть обусловлена наличием полуметилированных последовательностей 5mCpCpGr/CpCpGrG. Эти данные свидетельствуют о том, что преимущественное большинство остатков цитозина CpCpGrG-последовательностей ДНК ферментативно модифицированы в молодых семядольных листьях, в то время как в старых листьях, речь идет о метилировании внешних остатков цитозина в одной из нитей ДНК. Характер изменения статуса метилирования генома исследуемого растительного органа варьировал в зависимости от доз и стадий онтогенеза. Эпигенетический паттерн изменялся в процессе перехода к старению листа. Исследования геномной ДНК и отдельных сайтов показали сдвиг паттерна метилирования в ходе старения в сторону увеличения последовательностей отличающихся гипометилированием. Хотя на данном этапе мы не можем сделать однозначный вывод, результаты анализа свидетельствуют о том, что изменение состояния метилирования возможно участвует в инициации процессов возрастной деградации семядольных листьев.

СКРЫТЫЙ СЕЛЕКЦИОННЫЙ ИНБРИДИНГ КАК ПОСЛЕДСТВИЕ УЗКОНАПРАВЛЕННОГО ОТБОРА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Букин Д.Ю.¹, Ковалюк Н.В.², Сацук В.Ф.³, Хаблюк В.В.¹

¹*Кубанский государственный университет, Россия, 350000, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149*

²*Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства РАСХН, Россия, Краснодар, 350055, NVK1972@yandex.ru*

³*ООО Научно-производственное сельскохозяйственное предприятие «АСТЕР», Россия, г. Краснодар, 350055, aster-bulls@mail.ru*

Один из генов главного комплекса гистосовместимости - *BoLA-DRB3* характеризуется наличием высоко полиморфных областей, что позволяет использовать информацию о нём в популяционных исследованиях. Этот ген отвечает за уровень первичного иммунного ответа. Получены экспериментальные данные, подтверждающие взаимосвязь *BoLA-DRB3*-генотипа с уровнем молочной продуктивности крупного рогатого скота.

Породы молочного направления, такие, как голштинская, длительное время были подвержены узконаправленной селекции на один показатель – увеличение показателей удоя. Кроме того, применение метода искусственного осеменения привело к тому, что гетерогенность *BoLA-DRB3* аллелей была сведена к минимуму.

В ходе исследований с использованием молекулярно-биологических методов проанализировано 263 образца спермы быков – производителей голштинской породы, используемых в системе искусственного осеменения Краснодарского края (генотипировались быки ОАО «ГЦВ» и ОАО «Московское» по племенной работе) и 650 образцов крови коров и тёлочек голштинской породы (n = 650) ОАО «Агрообъединение «Кубань», Усть-Лабинский р-н (n=500), СПК Колхоз Племзавод «Россия», Красноармейский р-н (n=100), ЗАО КСП «Хуторок», Новокубанский р-н (n=50).

В выборке (n=650) суммарно 6-7 аллельных вариантов (из более чем 50 возможных RFLP типов), встречаются с частотой свыше 75%.

С использованием экспериментальных данных в группах крупного рогатого скота выявлено снижение показателей воспроизводства и продуктивных показателей,

которое является следствием «селекционного инбридинга». Для улучшения качества продукции путем повышения гетерогенности стад разработан метод с использованием генетического маркера BoLA DRB 3.

Резкое снижение гетерогенности групп крупного рогатого скота происходит вследствие ограниченности селекционного давления показателями продуктивности. Например, узконаправленная селекция в области повышения обильномолочности приводит к появлению скрытого селекционного инбридинга.

Как показал анализ результатов, по локусу BoLA DRB 3 существует природный механизм противодействия снижению уровня гетерозиготности. В подтверждение существования этих механизмов можно привести явление волнообразного изменения частот встречаемости отдельных аллелей. Установлено, что для этих аллелей характерны временные подъёмы и спады частот встречаемости. Так у быков 1994–1997 годов рождения преобладает BoLA-DRB3* 16 и *24 аллели, а частота встречаемости BoLA-DRB3* 8 и BoLA-DRB3*22 минимальна, а у быков 2002-2005 годов рождения (у сыновей и внуков быков 1994-1997 годов рождения) отмечается резкий спад встречаемости BoLA-DRB3* 24, и преобладание BoLA-DRB3* 8 и BoLA-DRB3*22.

В частоте встречаемости определенных аллелей наблюдаются некоторые пикового значения, сменяющиеся снижением. Здесь, по всей видимости проявляется эффект «насыщения», когда, при явной селекционной предпочтительности аллеля (например, *24 - у голштинов) эффект его присутствия нивелируется у дочерей высоким уровнем гомозиготности (появляется много животных с генотипом 24*24). Это негативно влияет на ряд показателей текущего поколения и приводит к снижению частоты встречаемости этого аллеля у потомства.

Выявленные закономерности позволили разработать новый метод подбора быков-производителей, позволяющий повышать гетерогенность стад.

Использование информации о локусе BoLA DRB 3 для ведения селекции при подборе быков-производителей к стадам требует учета соответствия генотипов у закрепляемых быков-производителей и отцов коров и тёлочек, добиваясь возможно большей разнородности однотипных аллелей. Исходя из этого закреплять быка-производителя Солянум 832430 с генотипом 24*24 следует на дочерей быков, не несущих в своём генотипе BoLA – DRB3 *24, например на дочерей:

Кличка, №	BoLA – DRB3 генотип	
Лаберо 831661, 49652611	10	11
Лэнд Юнге 465411, 03 48613276	16	23
Саладин 464523, 48222292	22	22

В случае такого подбора, согласно нашим исследованиям, молодые быки, несущие в своём генотипе аллели *8, *16, *22, *24 при оценке по качеству потомства имеют высокие шансы получить категорию А (улучшатели обильномолочности); молодые быки, несущие в своём генотипе *11, *27 – категорию Б (улучшатели жирномолочности); *26 и *16 - улучшить содержание белка в молоке дочерей. Быки – производители, несущие в своём генотипе аллели, ассоциированные с устойчивостью к инфекционным заболеваниям (*11, *23,*28) заслуживают особого внимания. Их можно использовать на «проблемных» стадах с целью повышения уровня генетически обусловленной резистентности.

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА КАК НОВАЯ КЛЕТОЧНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ВИРУСОЛОГИИ

Викторова Е.В., Шуляк А.Ф., Савченкова И.П.

ГНУ ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук, Москва 109428
E-mail: Viktorova-E.V@yandex.ru

Для проведение фундаментальных медико-биологических исследований, связанных с безопасностью как животных, так и человека, а также для производства вакцин, антигенов, диагностических препаратов, репродукции существующих и выделения новых штаммов вирусов, осуществления вирусологических и иммунологических диагностических исследований требуется культивирование вирусов *in vitro* в чувствительных биологических объектах. В связи с этим неизменно существует острая необходимость в разработке эффективных клеточных систем и изучении развития в них инфекционных процессов. Использование мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) в качестве клеточной модели особенно перспективно для проведения фундаментальных исследований в биотехнологии, в том числе связанных с изучением механизмов взаимодействия вируса и клетки-хозяина. Такие исследования являются ключевыми для понимания сложных процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровнях, и позволяют получить новые данные о роли факторов, рецепторов, генов, ответственных как за связывание, так и за блокирование этого взаимодействия. Появились первые работы в этом направлении [1; 2; 3].

Целью настоящего исследования являлась оценка ММСК, выделенных из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) крупного рогатого скота (КРС) для использования в вирусологии.

В экспериментах использовали ММСК выделенные из КМ и ЖТ КРС, по разработанной нами ранее методике [4]. Клетки обладали адгезией к культуральному пластику и высокой эффективностью образования колоний. ПЦР-РВ в этих клетках был выявлен продукт экспрессии гена коллагена 1-го типа. Клетки обладали потенциалом к направленной дифференцировке и при индукции формировали клетки костной и жировой тканей [5].

В работе использовали штаммы вирусов, хранившиеся в лиофилизированном состоянии в музее отдела вирусологии ВИЭВ им Я.Р. Коваленко: референтные штаммы «К-40» вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ) КРС, «Орегон» вируса диареи-болезни слизистых оболочек (ВД-БС), «Мовар» вируса герпеса крс типа 4, энцефаломиокардита мышей (ЕМС), производственные вакцинные штаммы «ВК-1» ВД-БС, «ПТК 45/86» вируса парагриппа-3 (ПГ-3), «СВ/69» вируса ринопневмонии лошадей (РПЛ) и штамм вируса ИРТ, выделенного из вакцины Bovilis IBR-marker «Интервет».

Инфекционную активность штаммов вирусов определяли титрованием в культурах ММСК КМ и ЖТ на уровне пятого пассажа. Титр определяли по стандартной методике: на 96-луночных планшетах, заражали клетки 10 кратным разведением вирусов, по 4 лунки каждой культуры на разведение. Контролем служили клетки, не зараженные вирусом. Для сравнения в эксперимент были включены зараженные и интактные культуры клеток: субкультура почки теленка (СПТ), клетки почки эмбриона свиньи (СПЭВ), клетки почки КРС (МДБК), эмбриональные

фибробласты человека (ФЭЧ), которые традиционно применяются для культивирования включенных в опыт вирусов. За титр принимали наибольшее разведение вируса, вызвавшее ЦПД, и выражали в ТЦД₅₀/мл.

Возможное использование этих клеток для постановки реакции нейтрализации (РН), с целью определения уровня специализированных АТ, использовали на модели вируса ИРТ.

В результате проведенных исследований было установлено, что вирусы ИРТ, РПЛ, герпеса КРС типа 4, ВД-БС, ЕМС репродуцировались в культуре ММСК, выделенной как из ЖТ, так и из КМ, с первого пассажа. В культурах наблюдали цитопатический эффект, который менялся в процессе пассирования вирусов. Учет ТЦД проводили, только в культурах, которые проявляли наиболее выраженное цитопатическое действие на уровне пятого пассажа. Инфекционный титр на уровне пятого пассажа в ММСК КМ для вируса РПЛ составлял 2×10^3 ТЦД₅₀/мл, для ММСК ЖТ 2×10^4 ТЦД₅₀/мл, и 1×10^6 ТЦД₅₀/мл в СПЭВ. Инфекционный титр на уровне пятого пассажа в ММСК КМ для вируса РПЛ составлял 2×10^3 ТЦД₅₀/мл, для ММСК ЖТ 2×10^4 ТЦД₅₀/мл, и 1×10^6 ТЦД₅₀/мл в СПЭВ. Репродукции вируса ПГ-3 в культуре ММСК не была выявлена. В эксперименте было установлено, что ММСК КМ и ЖТ является эффективной модельной системой для постановки РН: в этих культурах результат реакции был достоверно выше, чем на традиционно применяемой, перевиваемой культуре клеток МДБК.

Таким образом установлено, что ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, обеспечивают репродукцию как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов, относящихся к различным семействам и выделенным от разных видов животных. Эти культуры клеток могут также использоваться для исследований в серологической диагностики при ИРТ. В результате проведенных экспериментов было установлено, что в процессе пассирования повышается степень репродукции вируса ИРТ.

Литература.

1. Савченкова И.П. Перспективы использования стволовых клеток в ветеринарии / И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин // Ветеринария. – 2011. - № 7. - с.3-5.
2. Donofrio G. Susceptibility of bovine mesenchymal stem cells to bovine herpesvirus 4. / S. Colleoni, C. Galli, G. Lazzari, S. Cavirani, C.F. Flammini // J Virol Methods. – 2005. –V. 127. - N.2. – P. 168-170.
3. Donofrio G. Swine adipose stromal cells loaded with recombinant bovine herpesvirus 4 virions expressing a foreign antigen induce potent humoral immune responses in pigs / S. Taddei, V. Franceschi, A. Capocefalo, S. Cavirani, N. Martinelli, S. Ottonello, M. Ferrari // Vaccine. - 2011. - V. 29. - N.5.- P. 867-872.
4. Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков / И.П. Савченкова, Л.К. Эрнст, М.И. Гулюкин, Е.В. Викторова // М.: Спутник⁺ - 2010. – 23с. - ISBN 978-5-9973-0926-8.
5. Волкова И.М. Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота / И.М. Волкова, Е.В. Викторова, И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин //Сельскохозяйственная биология. - 2012.- № 2. – с. 32-37.

ТРАНСФОРМАЦИЯ ЯБЛОНИ ВЕКТОРОМ pMF1 С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ЦИСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Власова А.А.¹, Тимербаев В.Р.^{2,3}, Долгов С.В.^{2,3}

¹*Мичуринский государственный аграрный университет, 393760;*

E-mail: anutik.vlasowa@yandex.ru

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Филиал Института биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино 142290*

³*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва 127550*

В связи с возросшими требованиями по биобезопасности трансгенных коммерческих культур широкое распространение получило создание «цисгенных растений».

«Цисгенные» растения - это растения, в которых собственные гены заменены близкородственными растительными или просто переставлены под другие собственные регуляторные последовательности, что делает их практически неотличимыми от случайных мутаций, тысячелетиями используемых в селекционной практике. В геноме «цисгенных» растений не содержатся регуляторные элементы и гены других организмов, например генов – маркеров.

Наиболее современным и перспективным подходом получения растений без маркеров является применение генетических конструкций, которые после отбора растений на селективной среде позволяют элиминировать ненужный фрагмент ДНК. Эти векторы создаются с применением индуцибельных сайт-специфических рекомбиназ. После отбора трансформантов химическая активация рекомбиназы приводит к элиминации ненужной части Т-ДНК из растительного генома.

Цель данной работы - создание «цисгенных» растений яблони (*Malus domestica* L.), которая является основной плодовой культурой в умеренных широтах, где проживает большинство населения нашей планеты. Это самый популярный фрукт, занимаемый более трети нашего плодового рациона.

В нашей лаборатории созданы конструкции с использованием плодоспецифичных промоторов томата Elip и E8 в векторе pMF1, который обеспечивает удаление маркеров гена *prtII* для селекции на канамицине, путем индуцибельной сайт-специфической рекомбинации. На первом этапе нашей работы был получен стерильный растительный материал сорта «Мелба» в культуре *in vitro*. Проведены эксперименты по генетической трансформации листовых эксплантов с помощью метода агробактериальной трансформации. Проводится подбор оптимальных условий для эффективного переноса ДНК и регенерации эксплантов, включая анализ их физиологического состояния, подбор концентрации фитогормонов, а также разное время ауксинового шока.

НАПРАВЛЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, В КЛЕТКИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ *IN VITRO*

Волкова И.М.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук, Москва 109428
E-mail: akoulinairina@mail.ru

Съедобное мясо представлено в основном скелетной мышечной тканью. Идея выращивать скелетные мышцы с помощью методов тканевой инженерии была высказана более 70 лет назад. Однако серьезные попытки были предприняты только в последнее время благодаря успехам в исследовании стволовых клеток человека и животных. В настоящее время учёные в разных странах мира (США, Нидерланды, Япония, Австралия и др.) продолжают заниматься вопросами по созданию альтернативных источников продуктов питания, опираясь на достижения современной науки [1-3]. Подобные исследования проводятся и у нас в стране под руководством академика РАСХН И.А. Рогова [4].

Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК) представляют собой перспективный материал для создания новых пищевых композиций *in vitro*. Доступность биологического материала, жировая ткань (ЖТ) и костный мозг (КМ), из которых можно выделить клетки со свойствами и признаками ММСК, делает это направление особенно привлекательным. ММСК имеют ряд достоинств, одним из которых является возможность их культивирования в трехмерной структуре. Они могут заселять матрицу–носитель, дифференцироваться в заданном направлении и формировать трехмерные структуры, которые позволяют моделировать ту или иную ткань *in vitro*. Поэтому ММСК являются перспективным биологическим материалом для создания новых клеточных продуктов *in vitro* для пищевой биотехнологии.

Целью наших исследований было получить клетки мышечной ткани *in vitro*, используя для этого ММСК крупного рогатого скота (КРС). Для этого нами ранее из КМ и ЖТ КРС были выделены и получены клеточные популяции с фенотипом, подобным ММСК. Проведен сравнительный анализ свойств и признаков полученных популяций клеток. Установлено, что ММСК, выделенные как из КМ, так и из ЖТ КРС, способны формировать клетки жировой и костной тканей при культивировании в индукционных средах *in vitro* [5]. Эти культуры депонированы в Специализированную Коллекцию перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных при ГНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко (СХЖ РАСХН) под №№ 79 и 80 соответственно. Приоритеты на получение патентов в ФИПС № 2011149133/10 для ММСК КМ КРС и № 2011149132/10 для ММСК ЖТ КРС от 02.12.2011 г.

Для изучения потенций полученных нами клеточных популяций формировать *in vitro* клетки мышечной ткани при направленной дифференцировке нами проведён сравнительный анализ эффективности трёх индукторов. В качестве индукторов использовали: 5-азацитидин, 5-аза-2'-деоксицитидин и ретиноевую кислоту (Sigma, USA). Клетки на пятом пассаже высевали в 35-мм 6-луночные планшеты в концентрации 5×10^3 – 6×10^3 кл/луночку, через 24 часа воздействовали различными индукторными средами. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при концентрации CO₂ 5% и температуре 37°C. Первой средой для дифференцировки в клетки мышечной

ткани была DMEM с низким содержанием глюкозы (1 г/л) (DMEM-LG), дополненная 15% сыворотки плода коров (СПК), 5-азацитидином (10 μ M) и гидрокортизоном (50 μ M). Второй средой была DMEM-LG, дополненная 15% СПК, 5-аза-2'-деоксицитидином (0,3 μ M) и гидрокортизоном (50 μ M). Третьей средой была DMEM-LG, дополненная 10% СПК и ретиноевой кислотой (12 μ M). Культивирование в индукторных средах, дополненных 5-азацитидином и 5-аза-2'-деоксицитидином, длилось 24 часа, а в среде, дополненной ретиноевой кислотой, - 4 сут, при этом индукторную среду обновляли ежедневно. После этого индукторную среду меняли на питательную без добавления индуктора. Далее дифференцировку проводили в течение 35-40 сут, питательную среду меняли два раза в неделю. В качестве контроля мы использовали клетки, культивируемые в среде без индукторов. Дифференцировку ММСК в клетки мышечной ткани изучали в динамике. Через несколько дней после начала миодифференцировки мы наблюдали изменение морфологии клеток, увеличение их размеров и формирование плотных длинных многоядерных клеток. Изменения морфологии клеток наблюдали уже на 5 сут дифференцировки как у ММСК ЖТ КРС, так и у ММСК КМ КРС. Через 3-4 недели около 40 % клеток как ММСК КМ КРС, так и ММСК ЖТ КРС меняли свою форму (округлялись и уплотнялись) и формировали длинные многоядерные клетки. Кроме того, появились большие клетки с видимой исчерченностью цитоплазмы, а у некоторых клеток образовались липидные вакуоли, которые подтвердились окраской Oil Red O. Количество окрашенных липидных вакуолей было значительно больше у ММСК ЖТ КРС, подвергнутых миодифференцировке, чем у ММСК КМ КРС. Сравнительный анализ действия различных индукторов на ММСК продемонстрировал, что все три индуктора направляют ММСК к дифференцировке в клетки мышечной ткани. Визуально воздействие 5-азацитидина и 5-аза-2'-деоксицитидина стимулируют дифференцировку ММСК в направлении образования миозина, а воздействие ретиноевой кислоты в направлении актина. При воздействии 5-азацитидина и 5-аза-2'-деоксицитидина наблюдали дегенерацию и гибель около 5-10 % клеток, при аналогичном воздействии ретиноевой кислоты такого эффекта не было. Было установлено, что ретиноевая кислота является наиболее предпочтительным индуктором для этих целей. В настоящий момент мы проводим идентификацию полученных клеток мышечной ткани по продуктам мРНК генов-маркёров миогенеза: MyoD1 и миозин HC, - в реакции ПЦР-РВ.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, обладают потенциалом к дифференцировке в клетки мышечной ткани и могут рассматриваться как перспективный материал для создания мышечной ткани *in vitro* с целью наращивания клеточной биомассы в пищевой биотехнологии.

Список использованной литературы.

1. Method for producing tissue engineered meat for consumption: United States Patent No.: US 6,835,390 B1/ J. Vein. - 2004 Dec.
2. In vitro-cultured meat production/ P. D. Edelman, D. C. McFarland, V. A. Mironov and J. G. Matheny// Tissue engineering. – 2005. – Vol. 11 (5/6). – P. 659-662.
3. Haagsman, H. P. Production of animal proteins by cell systems/ H.P. Haagsman, K.J. Hellingwerf, V. A. J. Roelen. - Utrecht, October 2009.
4. Способ получения мясного продукта: пат. 2314719 Рос. Федерация: МПК7 C12N 5/06, А 23 L 1/31/ И.А.Рогов, А.Ф. Валихов, Н.Я. Демин, Н.Г. Кроха, А.Б. Лисицын, Г.В. Семенов, Е.И. Титов, В.А. Тутельян, С.И. Рогов, Л.К. Эрнст; заявитель и патентообладатель ФАО ГОУ ВПО Московский государственный университет

прикладной биотехнологии. - № 2006119540; заявл. 06.06.2006; опубл. 20.01.2008, Бюл. №2. – 6 с.

5. Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота/ И.М. Волкова, Е.В. Викторова, И.П. Савченкова, М.И. Гулюкин// Сельскохозяйственная биология. – 2012. - № 2. – С. 32-38.

ДИАГНОСТИКА ПАТОГЕНОВ ВИРУСНОГО И ВИРОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ РЕГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ МЕРИСТЕМНОЙ ТКАНИ

Вологин С.Г., Назмиева Р.Р., Сташевски З.

*ГНУ Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
Россельхозакадемии, отдел сельскохозяйственной биотехнологии, Казань, 420059,
e-mail: semen_vologin@mail.ru*

Современная биотехнология получения семенного картофеля основана на процессе вычленения неинфицированной вирусами апикальной меристемной ткани, регенерации из неё растений с их последующим микроклональным размножением на искусственных питательных средах. Применение биотехнологических методов возможно не только в семеноводстве коммерчески востребованных сортов картофеля, но и при проведении селекционной работы. После проведения процедуры регенерации растения, растущие в условиях *in vitro*, подвергаются полномасштабному исследованию на наличие различных инфекционных агентов. Для этих целей применяются высокочувствительные методы диагностики, к числу которых относится обратнотранскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Целью работы являлось изучение содержания внутриклеточных патогенов в растениях, прошедших процесс регенерации из меристемной ткани различных сортов и перспективных гибридов картофеля.

В 2005-2011 гг. было исследовано 175 меристемных линий, в том числе 103 линии, регенерированные из сортового материала российской и зарубежной селекции, а также 72 линии перспективных гибридов, полученных в лаборатории селекции картофеля ГНУ ТатНИИСХ. Регенерация растений из меристемных эксплантов проводилась без применения противовирусной терапии. С помощью метода ОТ-ПЦР диагностировалось наличие Y-, M-, X-вирусов картофеля (YVK, MBK, XVK), вируса скручивания листьев картофеля (ВСЛК), а также вириона веретеновидности клубней картофеля (ВВКК). Расчет достоверности выявленных различий проведен с использованием t-критерия Стьюдента для бинарных данных.

Проведенное изучение показало, что количество неинфицированных линий, полученных из перспективных гибридов картофеля ($37,5 \pm 5,7\%$), достоверно превосходило ($p < 0,05$) аналогичный показатель, обнаруженный у линий сортового происхождения ($23,3 \pm 4,2\%$). Кроме того, обнаружено различие в частоте выявления микст-инфицированных образцов. При получении растений-регенерантов из тканей гибридов количество линий пораженных смешанным типом инфекции ($6,9 \pm 3,0\%$) было достоверно ниже ($p < 0,05$), чем при регенерации растений из сортового материала ($18,4 \pm 3,8\%$). Более высокий выход безвирусных растений и более низкий уровень смешанного типа инфицирования в линиях гибридов, свидетельствует об эффективности процесса получения оздоровленных растений в период проведения селекционной работы.

Проведенное исследование также выявило существование достоверных различий ($p < 0,05$) в частотах встречаемости различных вирусов в образцах сортового и гибридного материала. В растениях, регенерированных из меристемной ткани сортов картофеля, были обнаружены четыре диагностируемых вируса: YVK ($37,9 \pm 4,8\%$), MBK ($26,2 \pm 4,3\%$), XVK ($9,7 \pm 2,9\%$) и ВСЛК ($2,9 \pm 1,7\%$). В линиях гибридов были диагностированы только два патогена, причем частота встречаемости MBK ($55,6 \pm 5,9\%$) значительно превосходила частоту, с которой выявлялся YVK ($15,3 \pm 4,2\%$).

В связи тем, что клубни сортов картофеля, служившие источником меристемных эксплантов, были отобраны с обширной территории (различные регионы России, страны ближнего и дальнего зарубежья) характеризующейся различными эколого-географическими условиями, то в растениях-регенерантах был обнаружен широкий спектр вирусных патогенов. Высокий уровень вирусной микст-инфекции в данных образцах свидетельствует о длительном возделывании доноров меристемной ткани в условиях высокого инфекционного фона. Клубни гибридов картофеля, использованные в данной работе, были получены от растений, выращенных из ботанических семян и возделывавшихся в открытом грунте на протяжении 4-5 вегетационных сезонов. Так как вирусы растений не передаются через ботанические семена, то результаты диагностического изучения могут отражать, с одной стороны уровень инфекционной нагрузки, существующей в регионе (Среднее Поволжье), в котором культивировались гибриды, а с другой стороны отображать эффективность элиминации вирусных патогенов.

Кроме возбудителей вирусных болезней серьезную угрозу для растений картофеля представляет патоген виroidного происхождения – ВВКК. На территории России распространение инфекционного агента оказалось тесно связанным с широкомасштабным внедрением работ по оздоровлению биоматериала культурой меристемы. В данной работе выявление ВВКК проводилось методом ОТ-ПЦР в растениях-регенерантах, полученных в отделе сельскохозяйственной биотехнологии ГНУ ТатНИИСХ ($n=175$), а также в меристемном материале, присланном для изучения из других научно-исследовательских и семеноводческих учреждений Поволжья, Урала и Западной Сибири ($n=243$).

В меристемных линиях перспективных гибридов ВВКК обнаружен не был, что свидетельствует об отсутствии данного патогена в селекционных питомниках ТатНИИСХ. Инфицирование ВВКК было выявлено исключительно в образцах, регенерированных из сортового материала: в линиях ТатНИИСХ частота встречаемости патогена составила $2,9\%$, в линиях других научно-исследовательских учреждений – $3,8\%$. Очевидно, что образцы сортов картофеля, вовлеченных в процесс оздоровления, являются чрезвычайно гетерогенным материалом по источнику своего эколого-географического происхождения и вероятность обнаружения внутриклеточных патогенов в них является достаточно высокой. Выявленная частота содержания такого опасного патогена как ВВКК в растениях растущих *in vitro*, с нашей точки зрения является весьма значительной и вероятность распространения возбудителя путем обмена меристемными линиями на территории страны по-прежнему остается высокой.

Следует отметить, что действующая в России нормативно-техническая документация предусматривает полное отсутствие ВВКК во всех классах семенного материала, однако она не требует при этом обязательного проведения лабораторно-диагностических исследований для его обнаружения в форме латентной инфекции. Полученные данные указывают на необходимость внедрения в практику процедуры обязательного тестирования семенного картофеля на наличие ВВКК.

СОЗДАНИЕ SCAR-МАРКЕРОВ ГЕНОМОВ *SOLANUM* СЕКЦИИ *PETOTA*

Волошина П.В., Дробязина П.Е.

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, 127550,
Москва, Тимирязевская ул., 42, E-mail: polyvol@yandex.ru

Традиционная систематика клубненосных видов *Solanum* секции *Petota* основана на сравнительном анализе морфологических и цитогенетических признаков, с учетом географического распространения этих видов в Северной и Южной Америке (Correl, 1962; Bukasov, 1978; Hawkes, 1990). Такая систематика секции *Petota* является довольно громоздкой и затрудняет понимание процессов эволюции внутри этого таксона. Большинство выделяемых при таком подходе видов *Solanum* sect. *Petota* не подтверждается при использовании методов молекулярной систематики, основанных на анализе полиморфизма анонимных последовательностей генома (RFLP, SSR и AFLP анализ) и последовательностей низкокопийных генов, например, набора генов COSII (conserved ortholog set) (Hosaka, 1984; Spooner, 2009; Jacobs, 2011).

Систематика *Solanum* секции *Petota*, основанная на различии геномов, открывает новые возможности для филогенетического анализа с использованием молекулярно-генетических методов. Такой подход ранее был успешно применен в нашей лаборатории для классификации растений рода *Brassica*. Особенно продуктивным является этот подход применительно к амфиплоидным видам, несущих два или три различных генома. Определение геномной конституции видов не призвано заменить собой традиционную классификацию на основе фенотипа и молекулярные данные о полиморфизме, но сильно ее проясняет и позволяет более определенно судить о происхождении видов.

В качестве примера такого подхода рассмотрим уже законченное исследование геномов *Solanum* серии *Petota* на основе высокополиморфной последовательности второго интрона гена *FLORICAULA/LEAFY* (*Flint2*). Первым шагом является создание надежной коллекции диких видов *Solanum* для подбора и верификации геном-специфичных маркеров, в которую входят формы, используемые в качестве положительного и отрицательного контроля.

Последовательность *Flint2* фланкируется достаточно консервативными участками экзонов 2 и 3, на которые были созданы универсальные праймеры. Эти праймеры позволили клонировать последовательности из видов *Solanum*, несущих, по общепринятым представлениям, геномы А, В и D. Выравнивание полученных таким образом последовательностей *Flint2* позволило выделить группы последовательностей, соответствующие геномам А, В и D и даже субгеномов А1-А3 подсерий *tuberosa1* – *tuberosa3*. На основе геном-специфичных последовательностей были, созданы SCAR (sequence characterised amplified region) маркеры геномов и субгеномов.

Верификация с использованием больших выборок видов позволила отбросить маркеры, недостаточно представительные или недостаточно специфичные по отношению к определяемым геномам. Они были заменены другими, более надежными SCAR маркерами. Далее эти маркеры были использованы для скрининга 26 видов, принадлежащих к шести сериям *Solanum* секции *Petota*, в результате чего были подтверждены ранее полученные данные о геномной конституции большинства видов *Solanum*, а для нескольких видов эта конституция была установлена впервые. Наши результаты также вносят свой вклад в понимание происхождения некоторых видов *Solanum*.

Известно, что попытки классификации растений на основе минимального числа универсальных праймеров (бар-кодинг) оказались неудачными (Spooner, 2009), поэтому представляется целесообразным типировать геномы *Solanum*, основываясь не на одном, пусть даже высокополиморфном фрагменте генома, а на нескольких таких участках. Предполагается, что для успешного решения этой задачи понадобятся маркеры, созданные на основе примерно 20 низкокопийных генов (Rocas, 2003).

Мы приступили к решению этой задачи с поиска полиморфных фрагментов геномов видов *Solanum* – перспективных ДНК-мишеней для амплификации. К настоящему времени отобрано некоторое количество геном-специфичных амликонов, полученных с помощью праймеров PawS (Rogowsky et al., 1992) и COSII (Wu et al., 2006; Rodrigues et al., 2009). В настоящее время проводится этап клонирования и секвенирования данных фрагментов.

СЕРИЯ МОДУЛЬНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С ЦЕЛЬЮ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОЙ И ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

**Вячеславова А.О., Шимшилашвили Х.Р., Бердичевец И.Н., Тюрин А.А.,
Мустафаев О., Голденкова-Павлова И.В.**

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии Наук, 119991, Россия, Москва, ул. Губкина, 3, e-mail: irengold58@gmail.com, alisavo@gmail.com

В современной науке изучение геномов растений занимает далеко не последнее место. К настоящему времени расшифрованы геномы многих растений, а также получены транскриптомные данные. Несмотря на это, генетические детерминанты геномов растения, которые обеспечивают эффективную экспрессию растительных генов на уровне транскрипции, трансляции и стабильности их белковых продуктов не ясны. Следует подчеркнуть, что эти знания важны как для фундаментальных исследований, так и для решения прикладных задач.

В связи с этим поиск и изучение ключевых генетических детерминант, обеспечивающих высокоэффективную экспрессию генов растений являются актуальными направлениями генетики. Следует отметить, что важную роль в создании трансгенных растений играют экспрессионные вектора, используемые для трансформации растений.

Для разработки и конструирования экспрессионных растительных векторов, первоначально был проведен поиск нуклеотидных последовательности, позитивно влияющих на уровень транскрипции, трансляции и стабильности целевых белков в растениях. Для этого в нашей группе была создана база данных FlowPlantGene, включающая данные секвенированных геномов растений и экспрессионные данные, а также разработано программное обеспечение, позволяющее формировать произвольные выборки нуклеотидных последовательностей генов с целью их дальнейшего анализа по различным параметрам. С использованием программного обеспечения FlowPlantGene, был выделен ряд факторов, обуславливающих эффективную экспрессию трансгена в растениях, а именно: регуляторные элементы, контролирующими его экспрессию; оптимальный состав области полиаденилирования; кодоновый состав трансгена; окружение иницирующего AUG кодона и другие.

Результаты биоинформационного анализа учитывали на следующем этапе работы по разработке и конструированию экспрессионных растительных векторов.

Нами разработаны и сконструированы две серии модульных векторов. В первой серии векторов, обозначенной нами как pPGG, учтены большинство факторов, обеспечивающих стабильную и эффективную экспрессию гетерологичных генов в растениях. Базовый вектор этой серии имеет небольшой размер и предназначен для клонирования целевых генов и регуляторных элементов, поскольку модульная структура вектора позволят легко проводить замену регуляторных элементов, контролирующих экспрессию гетерологичного гена в растениях. На основе базового вектора этой серии сконструированы модульные вектора серии pPGG, в которых клонированы последовательности разных репортерных генов, а также регуляторные элементы.

Вторая серия векторов, обозначенная нами pVIG, предназначена для клонирования экспрессионных модулей векторов серии pPGG и для изучения как стабильной (pVIG-S), так и транзientной (pVIG-T) экспрессии гетерологичных генов в растениях. Вектор серии pVIG-T несет ген p19, продукт которого супрессирует «замолкание» генов в растениях, под контролем конститутивного промотора. На основе базового вектора pVIG-T были сконструированы вектора для изучения исследуемых регуляторных элементов.

Для апробации полученных растительных экспрессионных векторов, была проведена агроинфильтрация растений табака растительными экспрессионными векторами серии pVIG-T, несущими бирепортерный ген GFP-LicBM3 под контролем исследуемых регуляторных элементов. Было продемонстрировано сохранение активности обоих репортерных генов, входящих в состав бирепортера, а также определен уровень экспрессии бирепортера в зависимости от использованных регуляторных элементов.

Таким образом, нами была разработана и сконструирована серия модульных векторов, в которых учтено большинство факторов, обеспечивающих стабильную и эффективную экспрессию гетерологичных генов в растениях. Эти вектора позволяют проводить поиск и анализ регуляторных элементов, а также исследовать экспрессию гетерологичных генов, кодирующих рекомбинантные белки, в растениях. Кроме того, сконструированные бифункциональные репортерные гены позволяют легко и экономично определять местонахождение целевого продукта, а также проводить количественную оценку целевого белка в растениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов: РФФИ № 11-04-90466-Укр_ф_а и Федерального агентства по науки и инновациям государственный контракт № 16.512.11.2268.

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТА БЕЛКА АНИОННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM*)

Гильмутдинов Р.А., Машков О.И., Максимов И.В.

***Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа 450054
E-mail: rudolf.gilmutdinov@mail.ru***

Использование биотехнологий для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур является весьма перспективным направлением. При этом особое место занимают исследования устойчивости растений к грибным

фитопатогенам. Несомненно, важную роль в этом процессе занимают пероксидазы растений – группа широко распространенных ферментов, характеризующихся разнообразием структуры и выполняемых ими функций.

Механизм защиты растений от грибных фитопатогенов с помощью пероксидазы заключается в концентрировании и многократной активации этого фермента и формировании вокруг инфекционной зоны лигнинового экрана. Литературные данные показывают, что активация защиты растения запускается через связывание анионных пероксидаз с углеводсодержащими молекулами, в частности с хитином.

При локализации полисахарид-связывающего участка на поверхности белковой глобулы анионной пероксидазы пшеницы были использованы данные сравнительного анализа известных аминокислотных последовательностей ряда анионных пероксидаз растений, в том числе арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), капусты (*Brassica oleracea*) и картофеля (*Solanum tuberosum*).

В связи с этим целью настоящей работы является доказательство наличия хитин-связывающего участка в домене анионной пероксидазы пшеницы.

При помощи специфичных праймеров был амплифицирован фрагмент гена анионной пероксидазы пшеницы, кодирующий белковый домен. В состав данного домена входит хитин-связывающий участок. Указанный фрагмент был включён в состав экспрессирующей векторной конструкции рЕТ-22b под контролем T7-промотора. Полученная плазмидная молекула рЕТ-22PO, содержащая вставку белкового домена с хитин-связывающим участком, клонирована в бактериальный штамм BL21(DE3)pLysE.

Полученная генно-инженерная конструкция рЕТ-22PO удовлетворяет всем требованиям экспрессии: рамка считывания клонированного участка сохранена, замен в аминокислотном ряду белкового домена при секвенировании нуклеотидной последовательности не обнаружено.

В дальнейшем планируется произвести наработку и выделение рекомбинантного домена анионной пероксидазы пшеницы, абсорбирование продукта экспрессии рЕТ-22PO на His-Tag-колонке, которое будет возможно за счёт наличия гистидинового «хвоста». После чего с помощью аффинной хроматографии будет проведен анализ сорбции данного рекомбинантного белка на хитиновом носителе и доказано таким образом наличие хитин-связывающего участка анионной пероксидазы пшеницы.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РЯСКИ МАЛОЙ (*LEMNA MINOR L.*)

Гиляшова Н.В.¹, Тарасенко И.В.², Фирсов А.П.², Митюшкина Т.Ю.², Долгов С.В.^{1,2}

¹*Пушинский Государственный Естественно-научный институт, 142290, Россия, г. Пушкино Московской области, проспект Науки, дом 3,*

E-mail: natashita-bios@yandex.ru

²*Филиал Института Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Россия, Московская обл. г. Пушкино, проспект Науки, дом 6*

Растительные системы синтеза различных пептидов и белков в последнее время активно используются наряду с микробными культурами и дорогостоящими культурами клеток млекопитающих. Представители семейства Рясковых (*Lemnaceae*) и Ряска малая (*Lemna minor L.*) в частности рассматриваются, как перспективные объекты для использования в биотехнологии и биофарминге. Этому способствует ряд

таких преимуществ Ряски малой, как преобладание вегетативного размножения, высокая скорость роста (время удвоения биомассы – от 36 часов) и высокое содержание белка (достигает 45%).

Целью данного исследования являлось проведение генетической трансформации Ряски малой вектором, содержащим ген пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1 A/chicken/Kurgan/5/2005. Ранее был получен экспрессионный растительный вектор pBI121, содержащий 5'-концевой фрагмент гена M2 с оптимизированным для ряски кодонным составом, кодирующий пептид размером 30 а.о. Была показана экспрессия клонированного гена в растениях Ряски малой.

Далее на основе бинарного экспрессионного вектора pBI121 в трансляционном слиянии были клонированы последовательности генов M130 и субъединицы В рицина из клещевины (*Ricinus communis*), служащего адъювантом при создании оральных вакцин. К 5'-концу слитого гена была добавлена последовательность сигнального пептида PR1 белка табака, определяющего транспорт рекомбинантного белка в апопласт, а к 3'-концу был добавлен фрагмент CBD, кодирующий хитинсвязывающий домен хитиназы А, который позволит использовать хитинсодержащие носители для оптимизации количества антигена в растительном экстракте. Плаزمид, обозначенная как pBIspRM130CBD, была использована для агробактериальной трансформации растений Ряски малой.

В настоящее время получены линии ряски, которые активно пролиферируют на селективной среде. С помощью ПЦР-анализа было показано присутствие слитого гена M130-субъединица В рицина в 22 линиях растений. Методом Western-blot анализа в 5 линиях трансгенных растений показан синтез рекомбинантного белка. В дальнейшем планируется количественное определение содержания слитого белка в полученных растениях.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИИ РИСА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ

Дубина Е.В., Коркина Н.Н., Трофимова И.А., Солонина Т.В.

***Всероссийский научно-исследовательский институт риса, п. Белозерный,
Краснодар, 350921, E-mail: lenakrug1@rambler.ru***

Одной из важных и актуальных проблем в селекции растений является получение селекционного материала с заданными свойствами. Создание такого материала до сих пор остается сложной и в отдельных случаях трудновыполнимой задачей. Традиционные методы селекции на устойчивость к патогенам требуют наличие инфекционных фонов и трудоемкую оценку каждого образца.

На современном этапе развития молекулярной биологии стали широко распространены технологии так называемой маркерной селекции (MAS), которая незаменима в тех случаях, когда оценка селекционного материала по изучаемому признаку на уровне фенотипа затруднительна. Например, отдельные гены устойчивости риса к пирикуляриозу (возбудитель - несовершенный гриб *Pyricularia oryzae* Cav.) могут быть выделены только на основе устойчивости к соответствующим авирулентным штаммам возбудителя. Затрудняет идентификацию этих генов широкое распространение множества генов авирулентности в отдельных полевых штаммах паразита [Дьяков, 20011]. Использование ДНК-маркеров позволяет проводить отбор

без фенотипической оценки на ранних стадиях, независимо от наличия факторов биотического стресса.

Гены риса *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33* детерминируют устойчивость широкого спектра к пирикулярриозу. Они – важный генетический ресурс для селекции [Дьяков, 20011]. При этом идентифицированы микросателлитные маркеры, тесно сцепленные с данными генами.

Гены устойчивости к пирикулярриозу *Pi-b*, *Pi-z* являются эффективными для зоны Краснодарского края [Дьяков, 20011].

Цель работы – создание селекционного материала риса, устойчивого к пирикулярриозу, с помощью методов молекулярного маркирования. Для этого выполняли интрогрессию генов устойчивости к патогену *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z* в генотипы отечественных сортов риса методом возвратных скрещиваний с контролем донорных аллелей ДНК-маркерами.

Материалы и методы исследований. Донорами генов устойчивости к пирикулярриозу послужили линии и сорта риса C104-LAC, C101-A-51, C101-LAC, IR-36, BL-1, Maratelli несущие гены *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z*, соответственно. В качестве реципиентных родительских форм использовали сорта российской селекции: Флагман и Боярин.

При гибридизации растений использовали пневмокастрацию материнских форм и опыление «ТВЕЛЛ»-методом [Лось, 1987].

Донорные аллели визуализировали тесно сцепленными с ними микросателлитными маркерами: для гена *Pi-2* использовали Rm 527, SSR 140; для *Pi-1* - Rm 224; для гена *Pi-33* - Rm 72, Rm 310 (сиквенс праймерных пар доступен на сайте <http://www.gramene.com>); для генов *Pi-ta* и *Pi-b* – внутригенные молекулярные маркеры.

Аmplификацию осуществляли в ДНК-амплификаторе «Терцик». При электрофорезе использовали 8%-ный акриламидный гель. После электрофореза гелевые пластины помещали на 20-30 минут в раствор бромистого этидия и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты исследований. Для создания линий риса, несущих гены устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta*, *Pi-z*, *Pi-b*, выполнена программа по введению указанных генов в отечественную генплазму, адаптированную к местным условиям среды. Донорные линии риса C101A51 (*Pi-2*), C104-Lac (*Pi-1*), C101-Lac (*Pi-1+Pi-33*) скрестили с сортами Флагман и Боярин; донорные линии Maratelli, BL-1 скрестили с отечественным высокопродуктивным сортом Флагман. В результате гибридизации каждой комбинации получено F₁ поколение, которое использовали в возвратных скрещиваниях с рекуррентными родительскими формами.

Из гибридных растений ВС-популяций были выделены образцы ДНК (экстракцию проводили методом СТАВ), которые оценили на наличие переносимых аллелей методом ПЦР с помощью внутригенного молекулярного маркера, сцепленного с геном *Pi-b* и микросателлитными маркерами, тесно сцепленными с генами *Pi-z*, *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*.

Серия проведенных скрещиваний позволила получить линии риса на основе сорта Боярин с пирамидированными генами *Pi-1*, *Pi-2* и *Pi-33* в гомозиготном состоянии. Проведенный фитопатологический тест на устойчивость полученных линий с пирамидированными генами резистентности к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2+Pi-33* к краснодарской популяции патогена на вегетационной площадке ВНИИ риса показал, что: исходный сорт Боярин (рекуррентная родительская форма) поразили на 56,6% грибом *Pyricularia oryzae* Cav.; созданные линии 5, 6 и 9 с пирамидированными генами *Pi-1+Pi-2+Pi-33* поразились на 23,3%, 12% и 10%, соответственно, что по шкале учета симптомов заболевания, соответствует устойчивости к патогену.

На основе сорта Флагман получены линии ВС₁-популяции с генами *Pi-z+Pi-1+Pi-33* и *Pi-b+Pi-1+Pi-33*; получены линии риса ВС₂-популяции с генами *Pi-1+Pi33*, которые по данным ПЦР-анализа находятся в гомозиготном состоянии.

В течение всех циклов возвратных скрещиваний перенос доминантных аллелей каждого такого гена в потомство контролировался тесно сцепленными молекулярными маркерами. Растения, в генотипе которых аллели устойчивости не обнаружены, выбраковываются.

Таким образом, в проведенном исследовании молекулярное маркирование генов позволило в значительной степени сократить продолжительности селекционного процесса создания материала, устойчивого к пирикулярнозу. Работа продолжается.

Литература.

1. Дьяков Ю.Т. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общество фитопатологов, 2001.
2. Лось Г.Д. Перспективный способ гибридизации риса// Сельхозбиология. 1987. № 12.

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЗЦОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПО НАЛИЧИЮ ЛОКУСА *Fhb1* И УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ КОЛОСА

Дудников М.В.¹, Шанин М.С.¹, Васильев А.В.², Дивашук М.Г.¹

¹Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, ул. Тимирязевская, 49, 127550, E-mail: max.dudnikov.07@gmail.com

²ГНУ Краснодарский НИИСХ им. П.П.Лукияненко Россельхозакадемии, отдел селекции и семеноводства пшеницы и тритикале, Краснодар-12, 350012

Озимая пшеница – культура, обеспечивающая стабильность мирового рынка зерна, однако одним из факторов, снижающих валовые сборы и качество урожая, является поражение фузариозом колоса (*Fusarium head blight*). Один из путей решения данной проблемы – создание устойчивых сортов (Аблова И.Б., 2008).

Устойчивость к фузариозу колоса является комплексным признаком, детерминируемым множеством генетических факторов, проявление которых в значительной степени подвержено влиянию абиотических условий (Snijders, С.Н.А., 1990). Скрининг зерновых для оценки реакции на фузариоз колоса (FHB) происходит по всему миру и включает разнообразные методы. Относительно недавно к исторически сложившемуся отбору на устойчивость к FHB, основанному на фенотипических оценках добавился также анализ количественных локусов устойчивости (QTL) с помощью молекулярно-генетических маркеров (MAS) (Agostinelli et al, 2008). В качестве основных доноров устойчивости к FHB в мире используются сорта Sumai 3 и его производные, Nobeokabozu komugi, Frontana, Ringo Star, Arina (Аблова И.Б., 2008). В ходе наших исследований с помощью молекулярного маркера WMS 493, были проанализированы 19 линий 5-7 поколений гибридов полученных в Краснодарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства имени П.П.Лукияненко с участием образца Sumai 3, несущего локус устойчивости к фузариозу *QTLfhs.3BS (Fhb1)* (Anderson et al, 2001).

Таблица 1. Устойчивость гибридов озимой пшеницы к фузариозу колоса (*Fusarium head blight*)

№пп	Линия, сорт	Комбинация скрещивания	Наличие <i>Fhb1</i>	Степень поражения		
				по колосу, балл	по зерну	
					балл	%
1	2	3	4	5	6	7
1	Sumai 3 aut	-	+	1	3	2,6
2	Sumai 3	-	-	1	3	2,6
3	Sumai 3	-	+	1	3	2,6
4	13-04 f 10	Дея9/Sumai 3	+	1	3	5,9
5	13-04 f 9	Дея9/Sumai 3	-	1	2	1,1
6	170 f 12	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	+	1	3	2,9
7	170 f 11	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	-	1	4	16
8	170 f 7	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	-	1	4	14,2

Таблица 1 (продолжение).

1	2	3	4	5	6	7
9	170 f 6	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	-	1	3	4,5
10	170 f 5	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	-	1-2	3	2,3
11	170 f 4	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	+	1-2	3	4,3
12	170 f 3	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	+	1-3	3	6,5
13	13-04 f 8	Дея9/Sumai 3	-	5-9	3	9,6
14	13 -04 f 6	Дея9/Sumai 3	-	1-2	3	3,9
15	13 – 04 f 1	Дея9/Sumai 3	-	1	3	6,4
16	170 f 2	Дельта/Sumai 3 aut// Дельта	-	1-2	1	0
17	170 f 1	Дельта/Sumai 3 aut// Дельта	-	1	3	4,4
18	Л.2498 h 15-05-1	Sumai 3 aut/ Леукурум 21	+	9	8	VS
19	Л.2496 h 100	Sumai 3 aut/ Карат	-	9	8	VS
20	Л.2496 h73-08-63	Sumai 3 aut/ Карат	-	8	6	VS
21	Л.2498 h45-08-48	Sumai3 aut/Леукурум21	-	7	7	S
22	Л.2733 h 47	Sumai 3 aut/DF-104 – 85// Леукурум 21	-	7	7	S

Четкой корреляции устойчивости с присутствием локуса *Fhb1* не обнаружено. Одним из объяснений этого может заключаться в том, что сорта Дельта и Дея обладают неспецифической устойчивостью к фузариозу колоса. Линии (№ 4-17 в табл. 1) были созданы с участием этих сортов в лаборатории иммунитета Краснодарского НИИСХ им. П.П.Лукьяненко путем отбора на фоне искусственного заражения. Слабое поражение может объясняться специфической устойчивостью от Sumai 3 или неспецифической от сортов Дельта и Дея. Анализ на наличие локуса *Fhb1* показал, что 4 линии (170 f 12, 170 f 4, 170 f 3, 13-04 f 10) из этого набора могут сочетать в себе оба типа устойчивости, и их использование в селекции на создание устойчивых к фузариозу сортов более перспективно.

Вторая группа сортообразцов (№18-22 в табл. 1) – сорта твердой пшеницы, полученные от скрещивания Sumai 3 с сортами Карат и Леукурум 21. Они все поражаются в сильной степени, несмотря на присутствие в одной из линий локуса *Fhb1*. По-видимому, его присутствие никак не влияет на устойчивость этих линий. Возможно, это связано с тем, что данный локус у Sumai 3 обеспечивает лишь небольшую часть вариации устойчивости, поэтому необходим анализ и других известных локусы, в частности на 6BS (*Fhb2*).

В результате работы выделены 4 линии, устойчивые к фузариозу колоса (поражение колоса не превышает 3-х баллов, зерна – 4-х) 170 f 12, 170 f 4, 170 f 3, 13-04 f 10 с локусом *Fhb1*, унаследованном от донора устойчивости Sumai 3.

РОЛЬ АУКСИНОВ И ИЗОПРЕННОИДОВ В РАЗВИТИИ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

**Ермошин А.А.¹, Кондратков П.В.¹, Алексеева В.В.², Рукавцова Е.Б.²,
Бурьянов Я.И.²**

¹*Государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования Уральский федеральный университет им. первого президента России Б.Н. Ельцина, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, ermosh@e1.ru,*

²*Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 142290 Московская обл. г. Пушино, проспект Науки, 6, lera@fibkh.serpukhov.su*

Большинство наземных растений образуют арбускулярную микоризу.. Важная роль в начальном контакте двух симбионтов принадлежит сигнальным молекулам, содержащимся в корневых выделениях. Среди них указывают фенольные соединения и стригалактоны. Однако данных о роли изопреноидов в сигналинге недостаточно. О роли фитогормонов в начальных этапах формирования микоризы известно ещё меньше.

Трансгенные растения – удобная модель для изучения роли вторичных метаболитов во взаимоотношении между растениями и микоризными грибами. Нами получены трансгенные растения табака с геном *hmg1* в прямой и обратной ориентации относительно промотора 35 SS CaMV. Данный ген отвечает за синтез мевалоната, который лимитирует скорость синтеза изопреноидов в цитозоле. Таким образом, получены растения с усиленным и с подавленным синтезом изопреноидов (с использованием стратегии антисмысловых РНК). Так же получены растения с

гиперпродукцией ауксинов (с агробактериальным геном *tms1*). Полемиразной цепной реакцией доказано стабильное наследование трансгенов.

У растений определена частота встречаемости микоризы, а также частота встречаемости арбускул и везикул. Первые отвечают за диалог симбионтов между собой, вторые отражают зрелость микоризы – запасание веществ и размножение.

В группе контрольных растений микориза встречалась в 5,8 % полей зрения микроскопа. При этом арбускулы встречались в 1,1 % полей зрения, везикулы – в 4 %. Группа растений с подавленной активностью гена *hmg1* по этим показателям достоверно от контроля не отличалась. Это может быть связано с тем, что стратегия антисмысловых РНК не позволяет полностью блокировать экспрессию гена. В группе растений с усиленным синтезом мевалоната микориза встречалась в 23,3 % полей зрения, арбускулы – в 7,8 %, везикулы – в 15,8 %. Большее развитие микоризы наблюдалось и в группе растений-продуцентов ауксинов: микориза встречалась в 19,5 % полей зрения, арбускулы – в 9,2 %, везикулы – в 12,1%. Таким образом, развитие микоризы в группе растений-продуцентов ИУК и изопреноидов в 2 раза выше, чем в группе контрольных растений. Из этого можно сделать вывод, что изопреноиды и ауксины способствуют развитию микоризы.

Полученные данные проясняют механизмы установления взаимоотношений растений и микоризных грибов. Данные результаты могут быть полезны в практике сельского хозяйства.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы УМНИК (проект № 16784).

РАЗРАБОТКА МЕТОДА РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ФОРМОСПЕЦИФИЧНОСТИ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR*)

**Карпеченко Н.А., Землянухина О.А., Карпеченко И.Ю., Вепринцев В.Н.,
Кондратьева А.М.**

***ФГУП Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции, Россия,
394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, E-mail: nikitakarpechenko@rambler.ru***

Установлено, что лесосеменные плантации дуба черешчатого создаются либо посадкой желудей, полученных от плюсовых деревьев (улучшенный посадочный материал), либо с помощью прививок на специально выращенные подвои. Во втором случае часто наблюдается отторжение подвоя от привоя, причем этот процесс наблюдается даже у деревьев, достигнувших возраста плодоношения. Многолетними исследованиями НИИЛГиС показана высокая эффективность прививок колоновидного дуба на подвои основной формы дуба черешчатого. Установлено, что в потомстве колоновидной формы выщепляется до 30% особей с признаком «колоновидности» и, что особенно важно, различия между формами начинают наблюдаться только спустя 4-5 лет роста дуба. Поэтому выявление данной формы дуба на стадии сеянцев представляется важной задачей в практике селекции и создания подвоев на генетически совместимые привои.

Целью работы было разработать метод, позволяющий уже на ранних этапах развития выявлять формоспецифичность дуба черешчатого (*Quercus robur*).

В качестве объектов исследования были выбраны случайные деревья дуба черешчатого и дуба черешчатого формы колоновидной в возрасте 20 лет, а также

проростки желудей (сеянцы) дуба черешчатого формы колоновидной в возрасте 2 месяцев.

Первым этапом исследования было получение препаратов ДНК высокого качества. Для этого использовали методику выделения с применением в качестве детергента ЦТАБ. Стоит отметить, что стандартный протокол экстракции нуклеиновых кислот из дуба оказался малоэффективным и требовал оптимизации. Для достижения положительного результата нами была проведена модификация стандартной методики выделения, которая позволила получить ДНК без признаков деградации и примесей.

Затем полученные нуклеиновые кислоты использовали для амплификации, с целью выявления схожих участков в нуклеотидной последовательности в образцах. Для достижения данной цели нами использовалась ПЦР с праймерами к умеренно повторяющимся инвертированным повторам. В работе нами использовались следующие RAPD-праймеры: PawS 5, PawS 16, PawS 6, PawS 17, PawS 11, Oligo 1, Oligo 2, Oligo 3, Oligo 4, Oligo 5, Oligo 6, Oligo 12, Oligo 16, Oligo 17, Oligo 19, Oligo 23, Oligo 24, Oligo 25, Oligo 28, Oligo 29, Oligo 31, Oligo 32, Oligo 33, Oligo 35, Oligo 41, Oligo 42, Oligo 99, Oligo 100, Oligo 101, Oligo 102. На следующем этапе выполняли электрофоретическое разделение продуктов амплификации в агарозном геле с 1X TAE-буфером.

После оптимизации условий проведения ПЦР и анализа спектра полученных ампликонов, для дальнейшего исследования нами были выбраны 9 из выше приведённых праймеров (Oligo 1, Oligo 2, Oligo 3, Oligo 4, Oligo 5, Oligo 6, Oligo 12, Oligo 19, Oligo 29) как наиболее информативные.

На первом этапе был проведён анализ образцов дуба черешчатого колоновидной и обычной формой кроны семенного происхождения от одного клона пирамидальной формы, произрастающих в Семилукском питомнике. Для всех образцов дуба была поставлена ПЦР с каждым из 9 праймеров и проведён детальный анализ полученных данных.

Проанализировав спектр ампликонов по всем праймерам для каждой группы дубов, для дальнейшего анализа нами был отобран один праймер (Oligo 5), который показывал явные отличия образцов между колоновидной и обыкновенной форм кроны в ряде ампликонов. В случае ПЦР образцов дуба с колоновидной формой кроны с данным праймером наблюдалась полоса на электрофореграмме в области 300 пн. Если в качестве матрицы использовалась ДНК из дуба с обычной формой кроны, данная полоса отсутствовала (рис. 1).

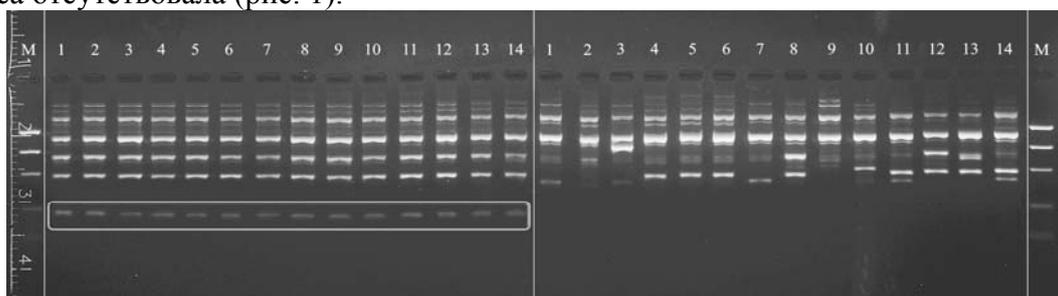


Рис. 1 - Электрофореграмма продуктов ПЦР дуба черешчатого формы пирамидальной (слева) и с обычной формой кроны (справа), произрастающих в Семилукском питомнике, в агарозном геле с использованием праймера Oligo 5. М-маркеры молекулярных масс (100, 300, 500, 700, 800, 1000 пн.); 1-14 – номер образца

Получив результат, подтверждающий, что формоспецифичность у дуба черешчатого ассоциирована с наличием полосы в области 300 пн. на электрофореграмме при проведении ПЦР с праймером Oligo 5, нами была поставлена ПЦР с данным праймером, где в качестве матрицы использовалась ДНК, выделенная из

сеянцев дуба черешчатого колоновидной формы в возрасте 4-х месяцев, для диагностирования формоспецифичности проростков (рис. 2).

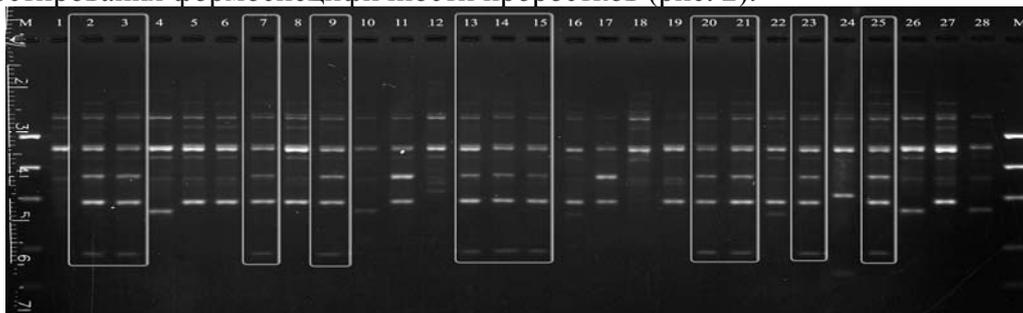


Рис. 2 - Электрофореграмма продуктов ПЦР сеянцев от дуба черешчатого формы пирамидальной в агарозном геле с использованием праймера Oligo 5. М-маркеры молекулярных масс (100, 300, 500, 700, 800, 1000 пн.); 1-28 – номер образца. В прямоугольник выделены предполагаемые кандидаты в деревья с колоновидной формой кроны

Из полученных результатов видно, что у некоторых из образцов дуба наблюдается ампликон, который, по нашему мнению, ассоциирован с колоновидной формой у дуба черешчатого. Обобщив все данные, мы можем сделать предположение, что образцы, в которых наблюдается проявление данного ампликона, в дальнейшем будут иметь колоновидную форму кроны.

РАСТЕНИЯ ЦИКОРИЯ И ЭНДИВИЯ КАК БИОФАБРИКИ ДЛЯ СИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНА

Кваско Е. Ю., Матвеева Н. А., Шаховский А. М.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, ул. Заболотного, 148, Киев, e-mail: kvasko.olena@gmail.com*

Актуальным направлением современной биотехнологии является создание растений-биофабрик, продуцирующих фармацевтически ценные соединения. Разрабатываются системы для получения антител, фрагментов антител, антигенов, ферментов, гормонов, нейропептидов и различных биологически активных соединений. Одним из фармацевтических белков с иммуномодулирующими свойствами является интерферон. Этот противовирусный цитокин способствует лизису инфицированных клеток, повышает фагоцитарную активность макрофагов и функцию цитотоксических Т-лимфоцитов, а также угнетает пролиферацию клеток, потенциально являясь противоопухолевым средством.

Растения *Cichorium intybus L.* и *C. endivia L.* - растения с широким спектром биологически активных соединений. Они обладают гепатопротекторными, антидиабетическими, кардиотоническими свойствами, имеют высокое содержание антиоксидантов, витаминов, сесквитерпеновых лактонов и гликозидов. Кроме того, эти растения характеризуются высокой способностью к регенерации в культуре *in vitro*, быстро накапливают вегетативную массу, что делает их привлекательными для биотехнологии.

Одним из способов получения растений с новыми свойствами является генетическая трансформация, в том числе с помощью бактерий рода *Agrobacterium*. Так, получены растения разных видов, устойчивые к гербицидам, грибным и вирусным

патогенам, растения с измененным биохимическим составом, растения, синтезирующие белки медицинского назначения и т. п.

Целью данной работы была *Agrobacterium*-опосредованная трансформация растений цикория и эндивия векторными конструкциями с геном интерферона- $\alpha 2b$ человека.

Для трансформации использовали семядольные экспланты асептических растений *C. intybus* L var *foliosum* Hegi и *C. endivia* L var *latifolium* Lam, полученных путем поверхностной стерилизации семян. Экспланты с предварительно сделанными насечками кокультивировали с суспензией *A. tumefaciens* (штамм GV3101) с векторными конструкциями pCB124 (гены интерферона- $\alpha 2b$ *inf- $\alpha 2b$* и неомицинфосотрансферазы II *npt II*) и pCB125 (ген *inf- $\alpha 2b$* и ген устойчивости к биалафоссодержащим гербицидам *bar*) в течение 30 мин. После этого экспланты на 2 суток переносили на среды Мурасиге и Скуга (МС) с 0,5 мг/л кинетина и 0,05 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) (цикорий) или МС с 2,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л НУК (эндивий) без антибиотиков для регенерации растений. Далее экспланты культивировали на тех же средах, дополненных 600 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерии. Затем экспланты цикория, трансформированные вектором pCB124, через 7 суток переносили на среду того же состава, но с добавлением 25 мг/л селективного антибиотика канамицина. Экспланты эндивия, трансформированные вектором pCB124, культивировали 14 суток без селекции, после этого – на среде для регенерации с добавлением 10 мг/л канамицина. При трансформации вектором pCB125 экспланты цикория и эндивия культивировали в течение 14 суток без добавления селективного гербицида Баста, затем экспланты цикория переносили на среду с 1 мг/л гербицида и отбирали устойчивые к Баста растения. Экспланты эндивия культивировали без селекции в течение 15 суток, после чего в среду добавляли 2 мг/л Баста. Поскольку регенерации побегов не наблюдалось, зеленые участки калусной ткани переносили на среду без гербицида до появления побегов. Полученные растения культивировали уже на среде с селективным агентом, отбирая устойчивые к гербициду. Частоту трансформации определяли как отношение количества эксплантов, на которых наблюдалась регенерация зеленых побегов на селективной среде, к общему количеству эксплантов в процентах. Эффективность трансформации подсчитывали как количество зеленых растений на эксплант. Геномную ДНК отобранных на селективной среде растений выделяли ЦТАБ-методом. Присутствие генов определяли с помощью ПЦР.

При использовании вектора pCB124 (селективный ген *nptII*) для трансформации цикория начало регенерации зеленых побегов на селективной среде наблюдали через 7 суток после трансформации. Частота трансформации составила 26,9 %, эффективность – 12 растений на эксплант.

При использовании селективного гена *bar* (вектор pCB125) получение трансгенных растений цикория оказалось менее эффективным, поскольку растения оказались очень чувствительны к гербициду Баста. На начальном этапе экспланты культивировали на среде без селекции. При таких условиях регенерация побегов начиналась через 12 суток после трансформации. Еще через 2 суток после начала регенерации экспланты переносили на среду с 1 мг/л Баста. При этом устойчивые к гербициду растения оставались зелеными, неустойчивые погибали. Использование таких условий трансформации позволило получить зеленые растения цикория на селективной среде с частотой 15%, и эффективностью 8 растений на эксплант.

Трансформация растений эндивия векторами с геном интерферона показала, что использование гена *nptII* как селективного является нецелесообразным для этого вида растения при данных условиях трансформации. После перенесения на селективную среду эксплантов после трансформации вектором pCB 124 наблюдалась 100% гибель

эксплантов. Вероятно, это связано с высокой чувствительностью эндивия к канамицину.

Использование селективного гена *bar* (вектор pCB125) дало возможность получить растения эндивия с геном интерферона- $\alpha 2b$. Экспланты эндивия сначала культивировали без добавления селективного агента. На эксплантах в местах среза через 5 суток после трансформации начала формироваться калусная ткань. После добавления 2 мг/л гербицида и культивирования на селективной среде в течение 14 суток регенерации побегов не наблюдалось. Поэтому экспланты были перенесены на среду того же состава, но без Баста. Через 56 суток наблюдалась регенерация зеленых побегов, которые далее культивировали на селективной среде. Частота трансформации эндивия вектором pCB125 составила 20 %, а эффективность 5 растений на эксплант.

Присутствие как целевого гена интерферона- $\alpha 2b$, так и селективных генов *bar* и *nptII*, было показано во всех отобранных на селективной среде зеленых растениях цикория и эндивия. Это свидетельствует о том, что условия трансформации и отбора трансгенных растений являются эффективными.

Таким образом, получены трансгенные растения цикория с геном интерферона- $\alpha 2b$ человека с использованием селективных генов *bar* и *nptII*. Более эффективным является использование гена *nptII* для отбора трансформированных растений. Частота (26,9 %) и эффективность (12 растений на эксплант) трансформации цикория вектором pCB124 оказалась выше в 1,79 и 1,5 раза соответственно по сравнению с частотой и эффективностью трансформации вектором pCB125. Получить трансгенные растения эндивия при использовании вектора с селективным геном *nptII* не удалось. Трансгенные растения с геном *bar* получены при условии предварительного культивирования эксплантов на среде без селективного давления до начала регенерации. Частота трансформации при этом составила 20 %, а эффективность 5 растений на эксплант.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОВ *Wx* НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ *TRINOPYRUM*, *DASYPYRUM* И *PSEUDOROEGNERIA*

Климушина М.В., Дивашук М.Г., Карлов Г.И.

*Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Москва 127550,
E-mail: mklimushina@gmail.com*

Крахмал, содержание которого в зерновке пшенице составляет 65-75 % на сухую массу, широко используется в пищевой и непивной промышленности. Физические и химические свойства крахмала зависят от отношения содержания амилозы и амилопектина. GBSSI или Waxy белок отвечает за синтез амилозы в запасующих тканях зерновых. У мягкой пшеницы присутствуют три изоформы белка Waxy, молекулярный вес которых 59-70 kDa. Они кодируются тремя генами: *Wx-A1* (2,781 bp), *Wx-B1* (2,794 bp) и *Wx-D1* (2,862 bp) каждый из которых состоит из 11 экзонов и 10 интронов. С помощью одномерного и двумерного электрофореза белков и полимеразной цепной реакции было выявлено несколько аллелей генов *Wx* пшеницы: активный аллель (*a*), кодирующий синтез белка GBSSI; неактивный (*v* – нуль-аллель), блокирующий синтез белка GBSSI; и функциональные аллели, отличающиеся от аллеля дикого типа. Кроме того гранул-связанная синтаза крахмала (GBSSI) является одно-

копийным геном во всех злаковых и успешно использовалась для исследования эволюции различных злаков.

Дикорастущие сородичи пшеницы являются ценными источниками генетического материала для ее улучшения. Исследование структуры и функции генов *Wx* у дикорастущих сородичей пшеницы имеет значение для изучения эволюции этих хозяйственно-ценных генов и видов в целом, а так же для изучения потенциальной ценности этих генов дикарей и перспектив их интрогрессии в геном пшеницы различными методами.

Целью нашей работы было секвенирование генов *Wx* у видов *Thinopyrum intermedium*, *Th. ponticum*, *Th. bessarabicum*, *Th. elongatum*, *Dasypyrum villosum* и *Pseudoroegneria stipifolia*.

До настоящего времени полноразмерные последовательности генов *Wx* дикорастущих сородичей пшеницы отсутствовали. Для получения полных последовательностей данных генов мы условно поделили ген на три части, каждая примерно по 1000 п.н, и амплифицировали, клонировали и секвенировали каждую часть гена по отдельности у всех исследуемых видов. Нами по литературным данным были отобраны несколько комбинаций праймеров, которые ранее использовали для получения полноразмерных последовательностей генов *Wx* у различных видов пшеницы – твердой, мягкой, спельты.

В результате проведенной работы нами было получены полноразмерные нуклеотидные последовательности гена *Wx* для изучаемых видов следующих размеров: *Thinopyrum intermedium* – 2685 п.н., *Th. ponticum* – 2716 п.н., *Th. bessarabicum* – 2671 п.н., *Th. elongatum* – 2093 п.н., *Dasypyrum villosum* – 2106 п.н. и *Pseudoroegneria stipifolia* -2685 п.н. У *Th. elongatum* и *Dasypyrum villosum* последовательности для первых трех экзонов. получить не удалось. Размер полученных последовательностей для этих видов составил 2093 п.н. и 2106 п.н. соответственно.

После проведения филогенетического анализа было выявлено, что наиболее близким из генов *Wx* мягкой пшеницы к генам изучаемых нами видов был ген субгенома А (*Wx-A1*). Между собой, полученные последовательности показали разную степень родства. Гены видов *Th. ponticum* и *Th. bessarabicum* образовали один кластер, гены видов *Th. intermedium*, *Th. elongatum* и *Ps. stipifolia* относились к другому кластеру, а ген *Wx Dasypirum villosum* кластеризовался отдельно от всех остальных генов. Принято считать, что виды *Th. elongatum* и *Ps. stipifolia* являются донорами субгеномов *Th. intermedium*. Однако в работе Mahelka et al., 2011 выдвигалась гипотеза о том, что одним из доноров субгеномов является *Dasypirum villosum*. Но полученные нами результаты скорее свидетельствуют о правильности классической гипотезы происхождения *Th. intermedium*.

На основе полученных нуклеотидных последовательностей, нами были разработаны молекулярные маркеры позволяющие, отличить гены *Wx Th. ponticum* и *Th. intermedium* от генов *Wx* мягкой пшеницы. На образцах ППГ показана возможность идентификации генов *Wx* пырея в геноме пшенично-пырейных гибридов. Благодаря этому стало возможным оценить влияние данных генов на формирования крахмала. В случае выявления положительного эффекта пырейных генов на крахмал пшеницы, их достаточно легко можно будет интрогрессировать в коммерческие сорта с использованием разработанных нами молекулярных маркеров и системы *ph*-мутации.

СОЗДАНИЕ УСТОЙЧИВЫХ К БОЛЕЗНЯМ ИСХОДНЫХ ФОРМ ТОМАТА (*Lycopersicon esculentum*) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Ковбасенко Р.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ, Украина 03143,
Киев-143, ул. акад. Заболотного, 148, E-mail: kovbasenko@yandex.ru*

Многие продуктивные сорта и гибриды томата, зарегистрированные в России и Украине для открытого грунта, существенно поражаются возбудителями грибных и бактериальных болезней. Для снижения потерь урожая необходимы новые сорта с повышенной болезнестойкостью. Традиционный селекционный процесс, включающий цикл гибридных скрещиваний и отборов, остается основным. Но получить новый устойчивый сорт удается не всегда, поскольку зачастую доминируют отрицательные признаки. Вместе с тем использование биотехнологических методов при создании исходных форм пасленовых культур открывает ценные перспективы для селекционно-генетической работы. Клональное микроразмножение путем получения растений-регенерантов из каллусных тканей дает возможность широко использовать различные селективные агенты для индукции соматоклональной вариабельности и последующего отбора и размножения линий с хозяйственно-ценными признаками.

Цель нашей работы состояла в изучении способности различных индукторов индуцировать соматоклональную вариабельность у растений томата с последующим отбором болезнестойчивых форм. Объектом исследований были промышленные сорта томата, внесенные в реестр сортов Украины: Лагидный и Хорив. Работу с растениями в культуре *in vitro* проводили по известным методикам [1-2]. Полученные пробирочные растения выращивали в тепличных и полевых условиях по рекомендованным для лесостепной агроклиматической зоны технологиям [3].

Для индукции каллусогенеза и стабилизации процессов регенерации из первичных каллусов (сегменты гипокотилия и меристематические ткани) нами были апробированы и модифицированы агаризированные питательные среды по прописи МС с добавлением по 4 мг/л ИУК и кинетина. Для дальнейшей работы отбирали наиболее морфогенные каллусы.

В качестве селективных агентов были использованы два индуктора устойчивости растений - салициловая кислота (СК) и крезацин. СК, как известно, способна индуцировать болезнестойкость растений, а также выступает в качестве сигнальной молекулы и регулятора их роста [4]. Крезацин стабилизирует состояние мембран, повышает содержание в них витаминов А и Е, тормозящих перекисное окисление липидов при низких температурах. Он проявляет многофункциональное действие – ускоряет прорастание семян, стимулирует рост растений, повышает устойчивость растений к действию абиотических стрессов [5]. Ранее при добавлении в питательную среду крезацина, нитрата серебра и абсцизовой кислоты нами были получены *in vitro* растения томата, из которых в дальнейшем создан новый раннеспелый сорт Боровской [6], который имеет официальную государственную регистрацию в Украине.

С целью получения исходных относительно устойчивых к заболеваниям растений томата в питательную среду добавляли в разных вариантах крезацин в диапазоне концентраций 0,08–0,10–0,12 мг/л или салициловую кислоту – в диапазоне 1,15–1,20– 1,25–1,30–1,35 мг/л. Во всех 12-ти исследованных комбинациях вариантов регистрировали формирование стандартных морфогенных каллусов. Из них в дальнейшем были получены нормальные жизнеспособные растения, которые

выращивали в теплице и в полевых условиях. Фитопатологический анализ с целью выявления более устойчивых к заболеваниям растений показал, что в варианте с добавлением 0,10 мг/л крезацина и 1,25 мг/л салициловой кислоты оказалось больше растений, толерантных к возбудителю ранней сухой пятнистости, а в варианте с добавлением 0,10 мг/л крезацина и 1,20 мг/л салициловой кислоты растения – менее поражаемых возбудителем фитофтороза. Последующий индивидуальный отбор элитных семян у этих растений и выращивание из растений в условиях вегетационных опытов в полевых условиях на естественном умеренном инфекционном фоне (развитие болезни до 20%) подтвердили индуцирование их устойчивости к биотическому стрессу.

В результате последующих целенаправленных отборов на опытных делянках нами получены две новые исходные формы томата КУ-1 и КУ-2, которые отличаются повышенной устойчивости к ранней сухой пятнистости. Степень развития болезни была на 5,2-8,1% ниже, чем у стандартного сорта (контроль), у которого этот показатель составлял 18,3%.

Таким образом, использование селективных агентов при выращивании каллусов томатов (*Lycopersicon esculentum*) в культуре *in vitro* позволяет индуцировать соматическую вариабельность. В качестве таких агентов можно использовать индукторы устойчивости растений СК (1,20-1,25 мг/л) и крезацин (0,10 мг/л), добавляя их к модифицированной агаризированной МС-среде, и проводить последующий отбор устойчивых растений-регенерантов при выращивании их на естественном инфекционном фоне.

Литература.

1. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – 344 с.
2. Внучкова В.А. Методические указания по культуре тканей томатов. – М., 1985. – 16 с.
3. Довідник по овочівництву і баштанництву. К.: Урожай, 1981. – 293 с.
4. Лапа О.М., Ковбасенко Р.В., Ковбасенко В.М., Дмитрієв О.П. Саліцилова кислота в рослинництві. К.: Колобіг, 2011. – 75 с.
5. Ковбасенко Р.В., Дяченко А.І. Регулятори росту – індуктори соматичної варіабельності рослин томату (*Lycopersicon esculentum* L.) // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. К.: Логос, 2009. – Т. 2. – С. 594-597.
6. Ковбасенко Р.В., Ковбасенко В.М. Индукция раннеспелости у томата// Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы. Материалы 1 Междун. науч-практич. конф. М. ВНИИССОК, 2008. – С. 302-304.

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ СРЕДИ КОЛЛЕКЦИИ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ

Колупаева А.Д., Дивашук М.Г., Карлов Г.И., Соловьев А.А.

*Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Центр Молекулярной Биотехнологии, Москва 127550,
E-mail: akolupaeva88@gmail.com*

Тритикале – это аллополиплоид, полученный в результате скрещивания пшеницы и ржи и последующего удвоения хромосом. В 2009 году посевные площади, занятые под тритикале, составляли около 4,3 млн. га (FAOSTAT). Основной район культивирования – Восточная и Центральная Европа. В Государственный реестр селекционных достижений РФ включены 53 сорта озимой и 6 сортов яровой тритикале. Эту культуру ценят за ряд положительных качеств, которыми она обладает: морозоустойчивость, засухоустойчивость, высокая урожайность.

Высота – важный хозяйственно-ценный признак. Она влияет на длину вегетационного периода, устойчивость к заболеваниям, озерненность, массу зерновки, содержание белка и другие признаки. Одна из основных проблем тритикале – высокорослость и, как следствие, полегание. В результате полегания снижается урожайность, а также ухудшается качество зерна и семян. Потери зерна от полегания в различных регионах составляют от 20 до 50%, а в отдельные годы доходят до 80%.

Решением данной проблемы является создание короткостебельных сортов. К настоящему времени достигнуты определенные успехи в селекции короткостебельных продуктивных сортов озимой тритикале; что касается яровых форм, как российских, так и зарубежных, то большинство возделываемых современных сортов характеризуются высокой соломиной, что нередко приводит к полеганию.

При создании короткостебельных сортов необходимо учитывать особенности генотипов тритикале и ее родительских форм. У гексаплоидной тритикале гены короткостебельности могут наследоваться как от рода *Triticum L.*, так и от рода *Secale L.* В ней могут находиться все гены из субгеномов А, В и R, а гены из субгенома D – только в случае R/D замещений. Наиболее распространенным является 2R/2D замещение. Доказано, что образцы, имеющие 2R/2D замещение, имеют более короткую соломину, чем образцы, содержащие полный набор хромосом ржи. У пшеницы наиболее изученными и часто используемыми являются гены *Rht*. Наиболее распространенными среди современных сортов мягкой пшеницы являются гены *Rht-B1b (Rht1)*, *Rht-D1b (Rht2)*, *Rht8*, на которые разработаны молекулярные маркеры. Эти гены короткостебельности имеют плейотропный эффект (влияют на озерненность, массу зерновки, продуктивную кустистость, содержание белка и др.). К настоящему времени, распространение генов *Rht* среди сортов и линий пшеницы было изучено на множестве коллекций. Однако данные по встречаемости этих генов у тритикале практически отсутствуют.

Целью данного исследования было изучения распределения генов короткостебельности *Rht-B1b* и *Rht8c* среди 88 сортов и образцов яровой гексаплоидной тритикале.

При генотипировании коллекции яровой тритикале по гену *RhtB1b* он был обнаружен в 76 образцах (87%). Идентификацию 2R/2D-замещения проводили с помощью STS-маркеров: *Sec-2*, локализованного в коротком плече хромосомы 2R, *Xgwm111*, *Xgwm349* и *Xgwm484*, локализованных в хромосоме 2D. В результате было выявлено 16 образцов с замещением. Ген *RhtB1b* был обнаружен у 10 из этих образцов.

Если сравнить образцы, несущие замещение 2R/2D, и образцы без замещения, то ген *RhtB1b* отсутствовал у 37,5% образцов, несущих замещение, и лишь у 5% образцов без замещения. Таким образом, отсутствие гена *RhtB1b* зачастую компенсируется наличием 2R/2D-замещения.

У пшеницы аллель короткостебельности *Rht8c* тесно сцеплен с аллелем 192 п.н. микросателлитного локуса *Xgwm261*, расположенного на хромосоме 2DS. Фрагментный анализ показал, что во всех образцах кроме одного, содержащих замещение 2R/2D, был обнаружен аллель в 165 п.н. Только в образце 131/7 был обнаружен аллель 174 п.н. Таким образом, несмотря на наличие 2R/2D-замещения, ни в одном из образцов с замещением не было аллеля короткостебельности *Rht8c*. Поэтому в случае снижения высоты, этот эффект будет обусловлен именно наличием замещения. Возможно, получение яровой тритикале с 2R/2D-замещением и аллелем *Rht8c* улучшит ее качество.

АДАПТАЦИЯ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОМОВ ПЫРЕЯ ПОНТИЙСКОГО И ДАЗИПИРУМА МОХНАТОГО

Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И.

*Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Москва 127550,
E-mail: kroupin@yandex.ru*

Пырей понтийский *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Z.-W. Liu & R.-C. Wang, syn. *Agropyron elongatum* (Host) P. Beauv. ($2n = 10x = 70$) имеет гаплоидную геномную конституцию вида JsJsJJJ (Chen et al. 1998). Данный вид широко использовался как источник устойчивости в программах селекции пшеницы (Friebe et al. 1996; Jauhar and Chibbar 1999, Oliver et al. 2006). В Китае были получены высококачественные сорта путем скрещивания *Th. ponticum* с мягкой пшеницей, например, Xiaoyan 6 (Zhou et al., 1995), а также ряд линий путем соматической гибридизации (Xia et al., 2003). Дазипирум мохнатый *Dasyopyrum villosum* (syn. *Haynaldia villosa*, геном V, $2n=14$) также обладает генами устойчивости к широкому спектру болезней и вредителей (Gradzielewska, 2006), и кроме того может быть использован в улучшении хлебопекарных качеств пшеницы (Zhao et al., 2010). Таким образом, пырей понтийский и дазипирум мохнатый являются носителями ценных генов, которые можно использовать в улучшении пшеницы. Для их направленного переноса в геном пшеницы используются молекулярные маркеры. Так как разработка молекулярных маркеров *de novo* является затратной, наиболее часто у злаков используются микросателлитные, или SSR-маркеры, отличительным свойством которых является возможность их адаптации для анализа близкородственных видов. Цель исследования состояла в адаптации микросателлитных маркеров пшеницы для изучения геномов пырея понтийского и дазипирума мохнатого.

Объектом исследования послужили образцы *Th. ponticum* (PI 547312) и *D. villosum* (W6 7313). Полимеразную цепную реакцию проводили на ДНК данных видов с использованием праймеров на микросателлитные локусы мягкой пшеницы. В результате анализа литературы и баз данных было отобрано 44 микросателлитных маркера, разработанных на мягкой пшенице. Продукты амплификации исследовали с помощью фрагментного анализа. Нами был использован метод Schuelke (2000), при котором для амплификации используются три праймера определенного микросателлитного локуса:

локус-специфичный прямой праймер с M13 (-21)-хвостом на своём 5'-конце, локус-специфичный обратный праймер и универсальный флуоресцентно-меченный праймер M13 (-21).

Анализ показал возможность использования 39 маркеров из 44 (88,6%) для анализа генома пырея понтийского, для анализа генома дазипирума – 35 из 44 (79,5%). 34 SSR маркера из 44 могут быть использованы как для анализа генома пырея понтийского, так и дазипирума (78%), при этом 5 – только пырея понтийский (11%), 1 – только дазипирума (2%). Таким образом, наибольшее число маркеров эффективно амплифицировалось при использовании ДНК генома пырея понтийского, что может объясняться его полигеномной природой и, следовательно, большей вероятностью переноса SSR-маркеров.

Три SSR-маркера (Xgwm325, Xgwm71 и Xwmc 221) на пырее понтийском и два SSR-маркера (Xgwm382 и Xgwm144) на дазипируме мохнatom давали фрагменты, близкие по размеру к маркерам пшеницы. Следовательно, при мониторинге интрогрессии генетического материала данных видов на генетическом фоне мягкой пшеницы данные маркеры использовать не рекомендуется, так как фрагменты, получаемые с интрогрессий и с генома мягкой пшеницы, могут быть близки по размеру, что может привести к ложноотрицательному выводу об отсутствии чужеродной интрогрессии.

Среди адаптированных SSR-маркеров у пырея понтийского 14 (36%) SSR-маркеров на одном генотипе дают только один фрагмент (монолокусные маркеры), 21 маркер (64%) – несколько (полилокусный). У дазипирума, напротив, преобладают монолокусные маркеры (20 маркеров, или 57%), полилокусных – 15 маркеров (43%). Такое распределение можно объяснить тем, что пырей понтийский является сегментальным полиплоидом. В процессе эволюции происходило расхождение внутренних субгеномов за счёт накопления мутаций. Можно предположить, что в итоге одни и те же микросателлиты, локализованные на разных субгеномах, пережили дивергенцию, которая затронула внутренние регионы SSR-локусов и не затронула фланкирующие области отжига праймеров. Результатом этого является наблюдаемая множественная амплификация микросателлитных фрагментов с одной пары праймеров. Дазипирум мохнатый, в свою очередь, является диплоидным видом, что и объясняет преимущественную амплификацию монолокусных маркеров. Наличие полилокусов может объясняться древними транслокациями или мягкими условиями отжига праймеров, что приводит к неспецифичной амплификации.

Перенесенные SSR-маркеры могут быть ассоциированы с QTL или генами устойчивости к вредителям, болезням или запасных белков дазипирума мохнатого или пырея понтийского. Их использование в селекционном процессе позволит проводить детекцию и мониторинг чужеродного хроматина, несущего полезные гены, на генетическом фоне пшеницы.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009 – 2013 годы» (ГК № П1048 от 31 мая 2010).

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА КОЛЛАГЕНЕ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕАКТОРЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Макарова Е.Л., Ковалева Т.А., Петракова И.

*Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006 Университетская
пл. 1, E-mail: makarova7809@mail.ru*

Глюкоамилаза (α -1,4:1,6 глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) присутствует во всех биологических объектах: в организме человека и животных, высших и низших растений, в культурах микроскопических грибов, бактериях, катализирует реакцию гидролиза крахмала до глюкозы, атакуя только внешние нередуцирующие концы цепей полисахаридов, и широко используется в разработке новых прогрессивных технологий.

При создании гетерогенных препаратов глюкоамилазы ведущим критерием должен выступать не процент сохранения активности, а степень прочности комплекса фермент-носитель. Применение природных биополимеров полностью утилизируемых организмом, то есть перевариваемых и замещаемых собственными тканями, исключает опасность накопления матрицы носителя в организме человека. Среди других белков коллаген обладает наименьшей иммуногенностью и его уникальные физико-химические свойства удовлетворяют многочисленным требованиям, предъявляемым к носителям при создании новых лекарственных препаратов.

Поэтому нами была проведена сорбционная иммобилизация глюкоамилазы (α -1,4:1,6 глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) на коллагене, выделенном из соединительной ткани крупного рогатого скота.

Объектом исследования послужил фермент глюкоамилаза из *Aspergillus awamori*, препарат Г20Х производства Ладыжинского завода ферментных препаратов, подвергнутый специальным методом очистки.

Для определения активности глюкоамилазы использовали глюкозооксидазный метод. Принцип метода заключается в том, что глюкоза окисляется кислородом воздуха при каталитическом действии глюкозооксидазы с образованием перекиси водорода и глюконата. Возникшую перекись водорода определяли по реакции окислительного азосочетания с замещенным фенолом и 4-аминоантипирином, которая катализируется пероксидазой.

Расчет каталитической активности производили по формуле:

$$A = \frac{a}{b \times 180 \times t},$$

где a - количество глюкозы, образовавшейся в 1 мл гидролизата, мкг;

b - количество фермента в 1 мл гидролизата, мг/мл;

t - время гидролиза, мин;

180 - молекулярная масса глюкозы.

В качестве субстрата использовали растворимый картофельный крахмал

Для сорбционной иммобилизации фермента использовали коллаген, выделенный ферментативным методом из соединительной ткани крупного рогатого скота на кафедре технологии мяса и мясопродуктов Воронежской государственной технологической академии.

Для осуществления сорбционной иммобилизации 5 г коллагена оставляли на ночь при комнатной температуре в 25,6 мл ацетатного буфера (рН 4,5). 5 мл раствора фермента (10^{-5} моль/л) добавляли к суспензии носителя и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 1,5 часа при температуре 25°C.

Центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин, осадок промывали ацетатным буфером (рН 4,5), затем дистиллированной водой до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на СФ-26 при $\lambda=280$ нм). Содержание белка в иммобилизованном ферменте определяли модифицированным методом Лоури, а каталитическую активность – глюкозооксидазным методом, причем инкубацию иммобилизованного фермента с субстратом осуществляли при перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 30 минут.

В связи с тем, что иммобилизация должна обеспечивать достаточно высокую стойкость энзима и определять пролонгацию воздействия препарата при применении в качестве лекарственных средств, а также легкость отделения продуктов в чистом виде была изучена возможность многократного применения глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене в реакторе периодического действия.

Показано, что комплекс глюкоамилаза-коллаген обладает достаточной прочностью и не разрушался при гидролизе крахмала, при 10-кратном применении в качестве гетерогенного катализатора реакции гидролиза крахмала. Установлено, что при многократном применении иммобилизованного ферментного препарата Экспериментальные данные показывают, что при десятикратном применении каталитическая активность глюкоамилазы, иммобилизованной на коллагене не изменяется.

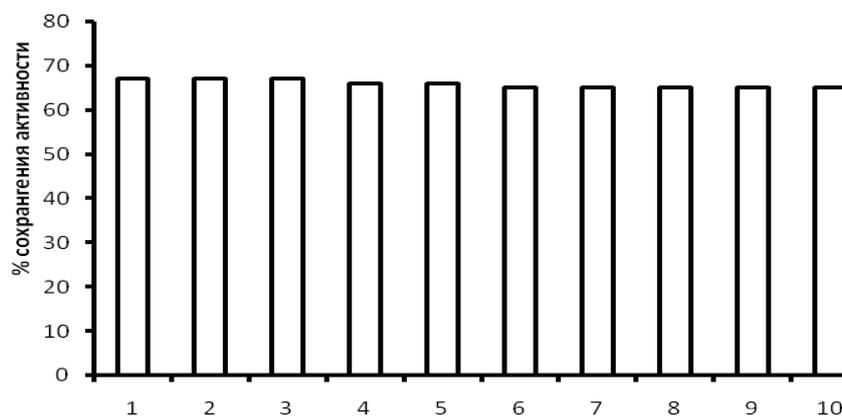


Рис. 1. Многократность применения иммобилизованной на коллагене глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*

- 1- Иммобилизованный фермент после первого применения
- 2- -//- после второго применения
- 3- -//- после третьего применения

Установлено, что каталитическая активность фермента и содержание белка в иммобилизованном на коллагене препарате, который хранился в лабораторных условиях, не изменялись в течение 2 лет. Очевидно, фермент достаточно прочно связывается с матрицей носителя, существенно не изменяя при этом каталитически активной конформации, что позволяет рекомендовать коллаген в качестве носителя и протектора низко- и высокомолекулярных веществ.

ИЗУЧЕНИЕ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ α -ГАРПИНИНОВ – НОВОГО СЕМЕЙСТВА ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ

Опарин П.Б., Василевский А.А., Беркут А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва 117997, E-mail: spud-13@mail.ru

В последние годы из ряда растительных источников были выделены защитные пептиды, среди них ингибиторы сериновых протеаз и антимикробные пептиды (АМП), объединенные в новое семейство α -гарпининов на основании ряда общих свойств. Так, несмотря на функциональное разнообразие, очевидно, что и АМП, и ингибиторы протеаз участвуют в защите растений от биотического стресса, в частности, фитопатогенных микроорганизмов, травоядных животных и паразитов. Кроме того, существует набор структурных аспектов, говорящих в пользу родства α -гарпининов. Их характерной особенностью является присутствие в первичной структуре двух мотивов СХХХС, где Х – любой аминокислотный остаток. Пространственная укладка α -гарпининов представлена двумя антипараллельными α -спиралями (α -спиральной шпилькой), стабилизированными за счет двух внутримолекулярных дисульфидных связей.

Для всестороннего изучения нового семейства защитных пептидов были получены рекомбинантные α -гарпинины с различными функциями – ингибитор трипсина BWI-2с из гречихи культурной (*Fagopyrum esculentum*) и несколько АМП: Sm-AMP-C4 из звездчатки средней (*Stellaria media*), Тк-AMP-X2 из пшеницы (*Triticum kiharae*) и Ec-AMP-1 из ежовника обыкновенного (*Echinochloa crus-galli*). Для BWI-2с была исследована пространственная структура в растворе с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса, проведено тестирование активности в отношении различных протеаз, локализован функционально важный остаток P₁, определена константа ингибирования трипсина. Для АМП было проведено тестирование активности в отношении ряда фитопатогенных грибов, обнаружена хитинсвязывающая активность, исследовано сродство к фосфолипидным мембранам. Реализация различных функций у пептидов с единым типом пространственной укладки является крайне интересной особенностью α -гарпининов. Эти пептиды могут быть использованы для инженерии устойчивости культурных растений к заболеваниям и вредителям.

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИПЛОИДНЫХ ФОРМ САДОВЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

Папихин Р.В.

ФГБОУ ВПО Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, Интернациональная 101, 393760, E-mail: parom10@mail.ru

Сочетание отдаленной гибридизации с полиплоидией - одно из наиболее перспективных направлений в селекции многих плодовых и ягодных растений. Получение аллополиплоидов позволяет более успешно решать проблемы преодоления несовместимости при скрещивании различных видов и родов. Применение методов

экспериментального мутагенеза дает возможность расширить эпигенетическую изменчивость видов и, в том числе, получить новые формы, превосходящие исходные аналоги по целому ряду хозяйственно-ценных признаков. Например, полиплоидные формы яблони и груши характеризуются регулярным плодоношением, крупноплодием, высоким качеством плодов, их транспортабельностью, лежкостью, устойчивостью к болезням.

Важнейшим направлением в селекции на полиплоидном уровне является создание аллополиплоидных видов заменой одного из хромосомных наборов диплоидного вида на геном близкого вида с более ценным сочетанием генетического материала. Такой подход широко используют в селекции важнейших сельскохозяйственных культур - пшеницы, риса, картофеля. Наличие отдаленных гибридов у таких полиплоидных видов, как слива домашняя, вишня, земляника ананасная, ежевика, делает перспективным селекцию такого плана и для плодово-ягодных культур.

Кроме того, полиплоидные аналоги различных сортов сельскохозяйственных культур, представляют собой удобные модельные объекты для генетических исследований в фундаментальных областях науки.

Работа по подбору способов перевода растений на полиплоидный уровень в условиях *in vitro* проведена на рябино-грушевом гибриде №136 селекции М.А. Курьянова, гибридной форме №14/4 (груша Памяти Яковлева х яблоня Дискавери) матроклинного типа и сортах клематиса (Ekstra, Pagoda, Lilactime). Исследования проводили в ГНУ ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина и ФГБОУ ВПО МичГАУ.

Использовали две схемы получения полиплоидных форм. В первом протоколе верхушки размноженных *in vitro* побегов (0,3-0,5 см) высаживали на среды размножения: для гибридов семечковых культур среда QL (Quoirin, Leroivre, 1977), содержащая 6-БАП-2 мг/л, ГК-0,5 мг/л, ИМК-0,2 мг/л, комплекс витаминов; для клематисов среда MS (Murashige, Skoog, 1962), содержащая 6-БАП-1 мг/л, ИУК-0,2 мг/л, витамины по прописи MS. В состав среды добавляли колхицин в количестве 0,001; 0,005 и 0,01%. А так же аценафтен в вариантах 0,001; 0,005; 0,01; 0,1 и 0,2%. Аценафтен предварительно растворяли в касторовом масле. Высаженные экспланты для синхронизации деления и увеличения количества делящихся клеток помещали на 96 часов в темноту при температуре +4⁰С. После чего их переносили в условия культуральной комнаты. Растения культивировали при t=24±2⁰С и 16-часовом световом дне на опытных средах в течение 3–6 недель, после чего их пересадили на среду размножения аналогичного состава, но не содержащую амитотиков. Каждый побег, образовавшийся на первичном экспланте на средах с аценафтенем и колхицином, рассматривали как независимую генетическую линию. Побег, достигший длины 1,5 см, укореняли.

При другой схеме опыта верхушки побегов клематиса (0,3-0,5 см), после предварительного выдерживания в темноте при температуре +4⁰С, помещали в колбы, каждая с 10 мл жидкой среды MS с добавлением регуляторов роста 6-БАП-1 мг/л, ГК – 1 мг/л, ИУК-0,2 мг/л и витаминов по прописи MS. В состав питательного раствора включили колхицин в количестве 0,25; 0,5; 0,75% и 1%. Колбы с эксплантами поставили на качалку на 3,5 суток при комнатной температуре. После чего верхушки побегов высадили на агаризованную среду размножения MS с 6-БАП-1 мг/л и ИУК-0,2 мг/л не содержащую колхицин и перенесли в условия культуральной комнаты.

После синхронизации деления в темновой фазе и предварительной обработки парадихлорбензолом (3 часа) меристемные участки корешков растений использовали для подсчёта хромосом по методике Л.А Фроловой и др. (2002).

Культивирование эксплантов на питательных средах, содержащих амитотики, показало, что при одинаковых концентрациях аценафтен обладает меньшей

цитотоксичностью для растительных тканей по сравнению с колхицином. Присутствие в среде аценафтена вызывало стимуляционный эффект во всех вариантах кроме концентрации 0,2%, который выражался в повышении коэффициента размножения и силе роста микропобегов побегов как клематиса, так и плодовых растений.

Влияние колхицина намного существенней. При концентрации колхицина в среде 0,01% в 30-40% случаев происходила полная или частичная гибель меристем с образованием каллуса вместо побегов, резко снижалось образование новых пазушных побегов, и замедлялся их рост.

При культивировании микрочеренков клематиса в условиях жидкой питательной среды в условиях улучшенного газообмена установлено, что гибель соматических тканей в значительной степени снижается даже при летальных дозах колхицина (0,5-1,0%) и достаточно длительном воздействии (84 часа). Интересен тот факт, что достоверно угнетающее действие на растительные ткани оказало инкубирование эксплантов в растворе с самой низкой концентрацией колхицина.

Для предварительного отбора потенциальных полиплоидных генотипов проводили исследование устьичного аппарата листьев опытных растений, как с различными фенотипическими изменениями (укороченными и утолщенными побегами, с необычно рассеченными листьями, с более крупными, толстыми или гофрированными листовыми пластинками, измененным цветом и т.д.), так и без какого-либо проявления внешних изменений.

В результате цитологического анализа гибридов семечковых культур выявлены формы с измененной структурой листовых пластинок, формой и размерами замыкающих клеток устьиц, с недоразвитыми устьицами и в том числе, с одной замыкающей клеткой, с другим числом и размерами устьиц, по отношению к контрольным растениям.

Подсчёт числа хромосом в точках роста корешков подтвердил изменение пloidности в ряде изученных генетических линий. Установлено, что многие формы, полученные на средах с амитотиками, являются миксоплоидами, в клетках которых примерно в 80% случаев имеются анеуплоидные наборы хромосом. Например, у формы 14/4 K₁-25 больше половины клеток (57,1%) имеют в соматических тканях 26 хромосом. Кроме того, в меристемных тканях этой формы обнаружены клетки с 34, 38 и 51 хромосомами.

Для предварительного отбора форм клематиса с изменённым уровнем пloidности использовали зависимость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц от количества хромосом в ядрах соматических клеток. В результате анализа выделены формы, достоверно отличающиеся по этому показателю от контрольных растений.

Наибольший процент изменённых растений клематиса из числа выживших (до 80%) получен при культивировании на жидких средах, содержащих колхицин в концентрации 0,75% и 0,1%. Кроме тетраплоидных генотипов получены октоплоидные и анеуплоидные формы.

На агаризованных питательных средах лучшие результаты по всем культурам (до 32% измененных генотипов) получены также при использовании колхицина в концентрации 0,001% и 0,005%. Увеличение концентрации амитотика в среде до 0,01% приводило к некрозу растительных тканей. Применение аценафтена в качестве полиплоидизирующего агента оказалось эффективно лишь при концентрации 0,01% в питательной среде. Выход форм с изменённым уровнем пloidности не превышал 7,1%.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

Пикунова А.В., Князев С.Д., Павловская Н.Е.

Орловский Государственный Аграрный Университет, Орёл, 302019

E-mail: pikuanna84@mail.ru

Ягодные культуры занимают особое место в полноценном питании человека, являясь источником необходимых биологически активных веществ.

Важной задачей селекции ягодных культур является создание адаптированных, устойчивых, экологически безопасных сортов с заданными параметрами в максимально короткие сроки. Этому могут способствовать новые методы биотехнологии, в т.ч. использование ДНК-маркеров. Принцип маркер-опосредованной селекции заключается в отборе генотипов, несущих целевой ген на основании данных о присутствии ДНК-маркеров, тесно сцепленных с ним. Важным инструментом поиска ДНК-маркеров является молекулярно-генетическое картирование, позволяющее совместить фенотипические данные и данные о полиморфизме молекулы ДНК. Легче идентифицировать ДНК-маркеры относительно простых признаков, контролируемых небольшим числом генов. Важной задачей в селекции смородины черной (*Ribes nigrum* L.) является создание сортов устойчивых к почковому клещу (*Cecidophyopsis ribis*), а в селекции земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch.) - выведение сортов, устойчивых к фитофторозному увяданию (*Phytophthora fragariae* Hick. subsp. *fragariae*).

Картирование и маркирование *Rpfl* гена - одного из главных генов устойчивости земляники садовой к фитофторозному увяданию было проведено в ходе научной стажировки в WUR, Королевство Нидерландов совместно с научно-исследовательской группой Эрика ван де Вега.

Гибридная популяция (64 семян), полученная от скрещивания двух сортов земляники садовой Ялова-4 и Зенга Зенгана была использована для картирования вместе с полиморфными микросателлитными маркерами. Анализ аллелей осуществляли с помощью программ Genotyper 4.0, GeneMapper 4.0, Microsoft Office Excel. Картирование осуществляли в программе JoinMap 3.0, значение LOD выше 3. Наиболее перспективные маркеры были протестированы на более чем 150 сортах и формах земляники садовой различного происхождения, для которых (как и для гибридных семян) присутствие *Rpfl* было установлено по результатам рассоспецифичного теста на устойчивость.

В данной работе *Rpfl* ген был картирован и обнаружены ДНК-маркеры фланкирующие его. Ряд картированных маркёров был протестирован на сортах, различных по генетическому происхождению. Данные лишь одного из маркеров полностью совпадали с данными теста на устойчивость у всех проанализированных генотипов (рис.1).

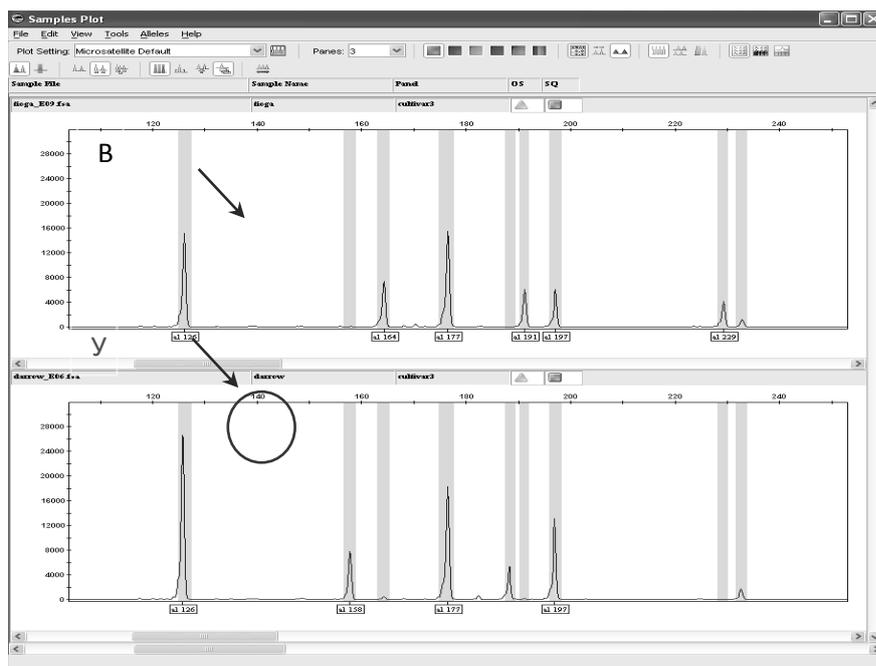


Рис. 1. Продукты амплификации ДНК устойчивого (Y) и восприимчивого (B) сортов с парой праймеров локуса Rh50 в программе Genotyper после анализа на ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (фрагмент, присутствующий у устойчивых генотипов обведен в круг).

Предложены фланкирующие маркеры, которые могут быть использованы для отбора генотипов несущих *Rpf1* ген, а так же отличия гомозиготной формы гена от гетерозиготной.

Маркирование гена *Ce* устойчивости смородины чёрной к почковому клещу. Протестировано 37 сортообразцов из коллекции ВНИИСПК, включая сорта смородины чёрной, смородину кроваво-красную, крыжовник и смородинно-крыжовниковые гибриды. Анализ присутствия SCAR маркера проводили ПЦР методом с визуализацией в агарозном геле как описано у Бреннана с соавторами (Brennan et al., 2009) с модификациями.

При амплификации на ДНК сортообразцов крыжовника, смородинно-крыжовниковых гибридов и смородины (Кипиана, Грация, В1613/17, 1448-14-24), имеющих ген *Ce* по данным анализа родословных и селекционных наблюдений за поражаемостью почковым клещом, был получен фрагмент ожидаемого размера (130 п.н.), что свидетельствует о наличии SCAR маркера (рис.2).

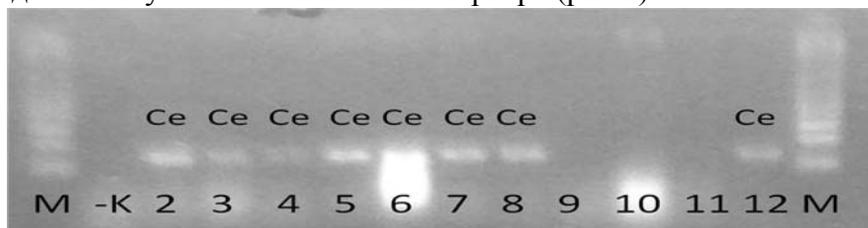


Рис. 2. Продукты амплификации на 2% агарозном геле (верхняя линия – указывает присутствие или отсутствие гена *Ce* в данном образце, М – маркер молекулярного веса, - К – минус контроль, цифры указывают номер образца: 2 – 4 – сортообразцы крыжовника, 5-6 – смородинно-крыжовниковые гибриды, 7 -В1613/17, 8 – Кипиана, 9 – Монисто, 10 – Искусшение, 11 – Чудное мгновение, 12 - Грация).

У сортов устойчивых к поражению почковым клещом, благодаря наличию гена *P*, а так же устойчивой к почковому клещу смородины кроваво-красной SCAR маркер не выявлен.

Маркер, использованный в нашей работе, был разработан в Шотландском НИИ Сельскохозяйственных культур на основе AFLP маркера. Данный AFLP маркер был картирован на расстоянии 4 сМ от гена *Se* (в популяции из 125 семян), и, соответственно, не находится внутри гена, но рядом с ним, что допускает вероятность рекомбинации. Таким образом, генотипы, несущие ген *Se*, но не несущие маркер (или наоборот), будут интересны для более детального картирования гена *Se* и поиска маркеров, ближе расположенных к гену. Среди протестированных нами сортов таких генотипов не обнаружено. SCAR маркер, амплифицируемый парой праймеров GMresa, сцеплен с геном *Se* в протестированных сортах различного происхождения и может быть использован для маркер-вспомогательного отбора генотипов устойчивых к почковому клещу.

Использование молекулярных маркеров является перспективной, быстро развивающейся областью исследований, способной эффективно решать многие селекционные задачи.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В ОБРАБОТАННЫХ ЭЛИСИТОРАМИ РАСТЕНИЯХ *Allium cepa* В ОТВЕТ НА ИНФИЦИРОВАНИЕ НЕКРОТРОФНЫМИ ГРИБАМИ

Поляковский С.А.

***Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, 03680,
Киев-143, ул. Заболотного, 148, e-mail: polykovskiy@yandex.ru***

В растительных клетках в процессе метаболизма образуются активные формы кислорода (АФК), уровень которых зависит от многих факторов, в том числе от фазы онтогенеза и стрессов [1]. Пероксид водорода является одной из форм АФК, способной одновременно активировать процессы окислительной защиты растительных клеток. Концентрация H_2O_2 меняется в ответ на действие биотических и абиотических стрессов. Его внутриклеточное содержание регулируют антиоксидантные ферменты, в том числе каталаза.

Каталаза – фермент класса оксидоредуктаз, обнаруженный почти во всех эукариотических организмах, в том числе в растительных клетках. Он локализуется в пероксисомах и цитозоле. При нормальных физиологических условиях каталаза регулирует содержание перекиси водорода в организме, противодействуя ее токсическому влиянию, а также играет важную роль в процессах старения растения [1].

Разработка современных, биотехнологических методов защиты растений базируется на поиске экологически безопасных веществ, способных эффективно индуцировать устойчивость растений. Такими являются ряд синтетических и природных соединений-индукторов. К их числу относят 2,6-дихлоризоникотиновую кислоту и бензо-(1,2,3)-тиодиазол, которые индуцируют такой же спектр устойчивости, как и в случае системной индуцированной устойчивости (СИУ). Показано, что β -аминобутириловая кислота (ВАВА), а также ряд карбоновых кислот индуцируют устойчивость к широкому спектру заболеваний у разных видов растений [2, 4]. Следует отметить, что в последнем случае индуцированная устойчивость не связана с непосредственно с активацией защитных реакций, а основана на более быстрой и

интенсивной активации индуцибельных защитных механизмов в условиях стресса. Такое сенсibilизирование защитных механизмов называют «праймингом» (от англ. “prime” – активация существующей установки) [3]. Недавно было показано, что прайминг защитных реакций у растений приводит к увеличению их устойчивости, не оказывая негативного влияния на рост или урожайность [3]. Поэтому исследование молекулярных механизмов прайминга может служить основой для создания новых эффективных биотехнологий защиты растений от биотического стресса.

Цель работы состояла в изучении активности каталазы у обработанных элиситорами растениях *Allium cepa* в ответ на инфицирование некротрофными грибами рода *Botrytis*.

В качестве объекта использовали луковицы трех сортов: Сквирского, красного Ялтинского и Стерлинг. Луковицы хранили при 4°C в темноте и перед экспериментами выдерживали 12 час при комнатной температуре. Изоляты грибов *B. allii* (15972) и *B. cinerea* (15702) были получены из коллекции Института микробиологии и вирусологии им Д.К. Заболотного НАН Украины. Элиситоры использовали в подобранных нами ранее оптимальных концентрациях – ВАВА (0,3 мМ), салициловая кислота (СК) (1 мМ) и гексановая кислота (ГК) (0,6 мМ).

Активность каталазы измеряли с помощью модифицированной методики, основанной на образовании комплекса между перекисью водорода и молибдатом аммония [5].

Полученные результаты свидетельствуют, что салициловая кислота в концентрации 1 мМ ингибирует действие каталазы, а это, в свою очередь, позволяет накапливать пероксид водорода и формировать индуцированную устойчивость (Рис 1).

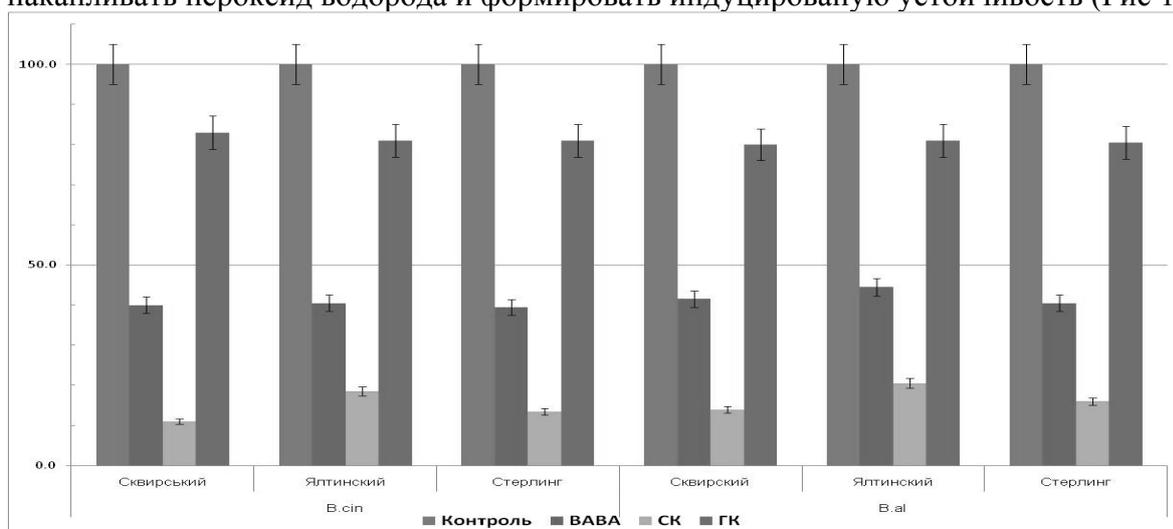


Рис. 1. Динамика активности каталазы (%) в обработанных раными элиситорами клетках *Allium cepa* в ответ на инфицирование спорами грибов *Botrytis cinerea* и *Botrytis allii*.

Как видно на Рис. 1 обработка растений ВАВА снижала активность каталазы по сравнению с контролем, но в отличие от СК менее интенсивно. Снижение активности каталазы, безусловно, позитивно влияет на устойчивость растения к биотическому стрессу, так как увеличивает продолжительность действия пероксида водорода на проникающий патоген. В результате обработки растений *Allium cepa* ГК было установлено незначительное изменение в активности каталазы. Результаты экспериментов показали, что влияние ГК на активность каталазы пролонгировано во времени. Последнее, по-видимому, связано с иным типом взаимодействия молекул ГК с плазматической мембраной, что отличает ее действие на иммунный ответ клеток *A. cepa* по сравнению с другими использованными нами элиситорами.

Список литературы.

1. Luna C.M., Pastori G.M., Driscoll S. et al. Drought control on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat // J. Exp. Bot. – 2005. – 56, N 411. – P. 417-423.
2. Zimmerli L., Mettraux J.-P., Mauch-Mani B. β -aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* // Plant Physiol. – 2001. – 126. – P. 517-523.
3. Conrath U., Beckers G., Flors V., Garcia-Agustin P., Jakab G., Mauch F., Newman M., Pieterse C., Poinssot B., Pozo M., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B. Priming: Getting ready for battle // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2006. – 19. – P. 1062-1071.
4. Поляковский С.А. Кравчук Ж.Н. Дмитриев А.П. Механизм действия индуктора устойчивости β -аминобутириловой кислоты у *Allium cepa* // Цитология и генетика. – 6. – 2008. – С. 41-46.
5. I.M. Долиба, P.A. Волков, I.I. Панчук, Метод визначення каталазної активності у рослинному матеріалі // Физиология и биохимия культурных растений. 2010. Том 42. №6. С. 497 – 503.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА СЛАДКОГО БЕЛКА ТАУМАТИНА II ИЗ *THAUMATOCOCCUS DANIELLII* В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

Пушин А.С.^{1,2}, Фирсов А.П.^{1,2}, Долгов С.В.^{1,2}

¹ Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Станция искусственного климата «Биотрон», Пущино, проспект Науки 6, 142290

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Лаборатория генной инженерии растений, Москва, ул. Тимирязевская 42, 127550, E-mail: aspushin@rambler.ru

В настоящее время генетически модифицированные растения начинают использоваться для получения разнообразных белков и пептидов для медицинской и биотехнологической отраслей промышленности. Для успешного использования растений в качестве биофабрик необходимо глубокое понимание механизмов синтеза, процессинга и клеточного сортирования целевых белков.

В данной работе объектом исследования выбран ген, кодирующий предшественник сверхсладкого белка тауматина II. Тауматин впервые выделен из ариллуса плодов западноафриканского растения *Thaumatococcus daniellii* Benth. Белок обладает сладким вкусом (в 3000 раз более сладкий, чем сахароза в пересчете на массу). Благодаря свойству сладости этот белок имеет важную практическую ценность. Результаты проведенных ранее исследований показали безопасность тауматина для человека, и с 1984 года он является разрешенной к применению в странах ЕС биологической добавкой (E 957). Нуклеотидная последовательность тауматина II, определенная путем клонирования кДНК, показала, что тауматин II транслируется в виде предшественника (препротаумтина). Молекула содержит N-концевой гидрофобный сигнальный пептид, состоящий из 22 а.к. остатков и C-концевой пептид, состоящий из 6 а.к. остатков.

Целью наших исследований было изучить влияние удаления N- и C- сигнальных последовательностей препротауматина на характер экспрессии тауматина в трансгенных растениях табака.

С помощью ПЦР синтезировали несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих разные формы тауматина: форму с удаленным C-концевым сигнальным пептидом; форму с удаленными N- и C-сигнальными пептидами; форму с удаленным N-концевым сигнальным пептидом. Матрицей для ПЦР служила плаزمида pUR528, с клонированной в ней последовательностью кДНК гена тауматина II. Все нуклеотидные последовательности клонировали в бинарный вектор pBI121 вместо гена *uidA*, под контроль промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты и терминатора гена нопалинсинтазы. Этот вектор в T-ДНК содержит селективный маркер *nptII*, обеспечивающий устойчивость трансгенной ткани к канамицину. В качестве контроля использовали вектор pBIT_{hau35}, сконструированный на основе вектора pBI121 ранее, и содержащий кДНК тауматина II под контролем 35S промотора. Все векторы переносили в супервирулентный обезоруженный агробактериальный штамм CBE21, который использовали для трансформации растений табака сорта Petite Havana SR. В результате трансформации было отобрано от 8 до 12 устойчивых к канамицину линий табака для каждой конструкции. Линии табака, в которых определялся ген тауматина и синтез его мРНК с помощью ПЦР и ОТ-ПЦР, использовали далее для анализа. Анализ экспрессии гена тауматина при помощи иммуноблотинга с применением поликлональных антител, специфичных к тауматину, показал следующие результаты. При наличии N- и C-сигнальных последовательностей тауматин накапливался внутриклеточно (предположительно в вакуолях). Продукт немодифицированного гена соответствовал по подвижности зрелому белку, что свидетельствует о прохождении процессинга. Удаление C-концевого гексапептида, приводит к секреции тауматина в межклеточное пространство (апопласт), при этом процессинг проходит корректно. Органолептический анализ показал, что синтезированный тауматин обладал сладким вкусом. Это свидетельствует о сохранении нативной конформации тауматина при накоплении как внутриклеточно, так и в апопласте. Удаление обоих сигнальных пептидов или только N-концевого существенно снижает уровень накопления тауматина. Количественный иммуноферментный анализ показал, что уровень накопления тауматина в листьях трансгенного табака варьировал между линиями. В растениях содержащих форму тауматина с N- и C- сигналами количество тауматина доходило до 0,57% от общего растворимого белка. В растениях, у которых тауматин был с удаленным C-концевым сигналом, количество доходило до 0,43%. Напротив, в растениях содержащих формы тауматина с удаленным N-концевым сигналом, тауматин практически не определялся (менее 0,0001%).

Полученные данные могут быть использованы при создании растительной экспрессионной системы для наработки рекомбинантного тауматина.

ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ СТЕРЛЯДИ (*Acipenser ruthenus* L.)

Резникова-Галашевич И.С.¹, Шелев В.В.¹, Спиридонов В.Г.¹, Андриющенко А.И.²

¹*Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК, отдел молекулярно-диагностических исследований, Киев, 03041,*

E-mail: iren.reznikova@gmail.com

²*Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, кафедра аквакультуры, Киев, 03041*

Осетровые, воспроизводимые в контролируемых условиях, характеризуются более быстрыми темпами роста и достижения половой зрелости, чем в естественных условиях. Применение инновационных технологий в рыбоводном процессе позволяет увеличить воспроизводство осетровых видов в рыбоводных хозяйствах. Рыбоводные фермы и племенные хозяйства, воспроизводящие ремонтно-маточные стада осетровых должны контролировать генетическое разнообразие этих рыб. Знания о генетической структуре маточных стад даст возможность сохранить генетическое разнообразие воспроизводимых видов осетровых рыб. Одним из наиболее надежных методов изучения генетического разнообразия является применение микросателлитных маркеров ДНК. Микросателлиты представляют собой генетические маркеры, применяемые во многих областях генетики и селекции рыб. Они применяются для изучения генетического разнообразия популяций, видовой идентификации и контроля достоверности происхождения рыб.

С помощью анализа трех микросателлитных локусов ДНК (Ls19, Ls68, Aox45) исследован генетический полиморфизм популяции стерляди ОАО «Донрыбкомбинат» (Донецкая обл.). В исследованной выборке количество аллелей варьировало от 5 (Ls19) до 13 (Ls68, Aox45) на локус. Фактическая гетерозиготность составила в среднем 0,769, а ожидаемая 0,792. Проведенный анализ показал отклонение от ожидаемого распределения по Харди-Вайнбергу по локусам Ls19 ($p < 0,01$) и Aox45 ($p < 0,001$). По локусу Ls19 популяция проявляет тенденцию к гомозиготизации, а по локусу Aox45 - к гетерозиготизации. Согласно значению фиксационного индекса в исследуемой популяции по локусу Ls19 наблюдался избыток гетерозигот на уровне 50,9%, а также избыток гомозигот по локусам Ls68 и Aox45 на 11,2 и 35,3% соответственно. Что касается средних значений индекса фиксации, то в данной популяции он находился на уровне -0,015, что указывает на то, что данная популяция находится в состоянии близком к состоянию генетического равновесия. В результате рассчитанных значений индексов полиморфизма установлено, что данная популяция характеризуется высокой степенью полиморфизма по всем исследованным микросателлитным локусам ($PI > 0,550$). При анализе информативности выбранной панели микросателлитных маркеров установлено, что комбинированная вероятность исключения случайного совпадения аллелей составила 99,998% (0,99998).

Исходя из результатов исследований, можно заключить, что выбранные нами микросателлитные локусы ДНК является высокоинформативными маркерами, и что их целесообразно использовать для исследований генетической структуры популяции стерляди.

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА КУНЬИХ (*MUSTELIDAE*) МЕТОДОМ ЧАСТИЧНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ИЗ ОБРАЗЦОВ ЭКСКРЕМЕНТОВ

Сенина Д.А.², Колобова О.С.¹, Поддубная Н.Я.², Малюченко О.П.¹, Монахова Ю.А.¹

¹ГНУ Всероссийский НИИ Сельскохозяйственные биотехнологии, Москва 127550

²Череповецкий Государственный Университет, Череповец 162600,

E-mail: samuma@mail.ru

Молекулярно-генетические методы давно с успехом используются в зоологии для изучения эволюции таксонов, исследования филогении животных, изучения изменчивости популяций, пищевого поведения, заболеваний и других задач. В последние годы активно ведется поиск маркеров для видовой идентификации, позволяющих исследовать видовое разнообразие и экологию отдельных видов диких животных, в том числе с использованием неинвазивных методов сбора материала. В этой связи, многими исследователями было предложено использовать экскременты, как источник ДНК для дальнейшего изучения, что особенно актуально для хищных животных, ведущих скрытый образ жизни (Рожнов, 2008, 2009; McElwee, 2008 и др.). В нашей работе ставилась цель изучения видового разнообразия животных семейства куньих (*Mustelidae*) встречающихся на данной территории, а так же поиск редкого вида – европейская норка, занесенного в международную Красную книгу, по анализу ДНК, выделенной из экскрементов.

Семейство куньи включает в себя более 50 видов, которые объединены в 19 родов. В фауне России представлено 18 видов, из которых на Северо-Западе обитает 8 видов. Исследуемые животные, как и большинство ночных хищников, ведут одиночный образ жизни и отличаются большой осторожностью. Все это затрудняет исследования ареала обитания, учета численности и распределения данных видов в дикой природе. В то же время большинство видов куньих, являясь ценными объектами пушного промысла, сегодня либо занесены в международную Красную Книгу (The IUCN Red) (европейская норка, выдра, россомаха), либо в Красную Книгу России (перевязка, солонгой), либо стали регионально редкими (лесная куница, соболь). Это делает чрезвычайно актуальным осуществление мониторинга их популяций. Между тем традиционные методы изучения распространения этих животных в природе посредством учетов по следам, отловов в специальные ловушки и костным остаткам очень трудоемкие и часто не обеспечивают необходимой точности идентификации близких видов. Ранее сообщалось о попытках применения метода идентификации куньих по анализу ДНК, как на основе анализа специфических STR маркеров (Peltier, 2003), так и на основе ПЦР (Fernandes, 2008) и частичного секвенирования митохондриальной ДНК (Murakami, 2001; Рожнов, 2008; Kurose, 2008; Shimatany, 2010).

В ходе предварительных исследований нами был выбран и усовершенствован метод идентификации на основе ПЦР и секвенирования контрольного участка региона D-петли митохондриальной ДНК. На основе имеющихся в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) последовательностей был проведен сравнительный анализ контрольных участков митохондриальной ДНК интересующих видов куньих, обитающих на территории Северо-Западного региона РФ. Анализ включал последовательности европейской норки, американской норки, хорька, лесной куницы, обыкновенной ласки, соболя, горноста, выдры. В результате были выбраны

праймеры на консервативные для всех видов участки, ограничивающие переменный участок 409 н.п., позволяющий провести видовую идентификацию.

Была проведена предварительная апробация праймеров на ДНК, выделенной из мышц и образцов шкурки интересующих видов. В результате были получены контрольные последовательности, позволяющие провести идентификацию с высоким уровнем достоверности – 99%. Далее была проведена идентификация экскрементов, собранных во время полевой практики летом 2011 с территории Вологодской области, респ. Коми, а так же была взята контрольная группа экскрементов животных (европейской норки) из Ильменского заповедника. Использовались различные методы консервации, такие как замораживание и фиксация спиртом. ДНК выделялась методом нуклеосорбции, обеспечивающего наибольшее удаление ингибиторов ПЦР, присутствующих в образцах экскрементов в большом количестве. Далее проводили амплификацию с флуоресцентной детекцией накопления ПЦР-продуктов с интеркалирующим красителем EvaGreen и последующим плавлением. Положительные образцы брались для проведения секвенирования и последующей идентификацией методом сравнения с известными контрольными последовательностями.

Всего было исследовано 27 образцов экскрементов, из которых успешно были идентифицированы 14: 1 принадлежит лесной кунице (*Martes martes*), 3 (11.1%) американской норке (*Mustelida vision*) и 10 (37%) образцов принадлежит выдре (*Lutra lutra*).

В результате нашего исследования достигнут высокий уровень идентификации образцов (52%). Выбранные праймеры позволяют эффективно амплифицировать ДНК интересующих видов, исключая ДНК пищи куньих и человека. Секвенирование выбранных последовательностей позволяет устанавливать видовую принадлежность с высоким уровнем достоверности, что позволяет с уверенностью применять данный метод для изучения обитания видов куньих, совместно встречающихся на данной территории.

ДНК-МАРКИРОВАНИЕ ЛОКУСОВ НЕКОТОРЫХ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ СЪЕДОБНОГО КУЛЬТИВИРУЕМОГО ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS* (FR.) KUMM.

Сиволапова А.Б.^{1,2}, Шнырева А.В.², Сонненберг А.³, Барс И.³

¹*ГНУ Центр Экспериментальной Эмбриологии и Репродуктивных Биотехнологий РАСХН, отдел молекулярных биотехнологий, Москва, 127422, e-mail: asivolapova@yahoo.com*

²*Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микологии и альгологии, Москва, 119991*

³*Университет Вагенингена, Вагенинген, 6708 РВ, Нидерланды*

Грибы рода *Pleurotus*, или вешенки, являются одними из самых широко культивируемых грибов во всем мире, уступая в объеме производства лишь шампиньону. Кроме того, эти грибы довольно перспективны для использования в медицине и фармакологии. Так, было показано, что грибы вида вешенка обыкновенная, *P. ostreatus*, обладают противоопухолевой активностью, основанной на усилении иммунных ответов, а также гиполипидемической активностью, то есть способностью снижать содержание холестерина в крови [1,2].

К тому же, в последнее время все чаще предлагается использовать грибы рода вешенка в процессах биологической переработки отходов бумажного и текстильного производств [3-6], в силу того, что эти грибы обладают комплексом лигнинолитических ферментов. В связи с интенсивными темпами развития этой отрасли, необходимы эффективные селекционные программы, направленные на поиск новых штаммов *P. ostreatus*. Основными признаками, по которым отбираются штаммы для культивирования в пищевых целях, являются интенсивность плодоношения, скорость обрастания субстрата мицелием, а также, для некоторых потребительских рынков, цвет плодовых тел.

В связи с этим, целью данной работы было исследование и картирование перечисленных выше количественных признаков (QTL, quantitative trait loci) и поиск молекулярных маркеров, которые можно было бы использовать при выполнении селекционных программ.

В работе использовали несколько монокариотических (гаплоидных) штаммов вешенки - P001-15, EP-57, EP25, G24 и P24. Штаммы P001-15 и EP25 являются гаплоидными протоклонами, т. е. полученными из протопластов дикариотического (функционально диплоидного) мицелия коллекционного штамма ATCC58937 (American Type Culture Collection). Путем скрещивания штаммов P001-15 и EP-57 был получен дикариотический штамм ВКК0, из спорового отпечатка которого путем проращивания гаплоидных базидиоспор было получено 200 моноспоровых гаплоидных культур ВКК1-ВКК200. Данную популяцию монокарионов использовали в экспериментах по определению скорости роста мицелия, цвета шляпки и интенсивности плодоношения.

Кроме того, геномы штаммов EP57 и P001-15 были полностью секвенированы, а также были найдены около 1500 SNP-маркеров в пределах геномов этих двух штаммов (данные были получены при сотрудничестве с Объединенным Институтом Генома, Joint Genome Institute, Калифорния). Из них были выбраны и проанализированы 347 маркеров, на основании которых была построена генетическая карта *Pleurotus ostreatus*.

В общей сложности нами были найдены и проанализированы 12 генных локусов, ответственных за скорость мицелиального роста вешенки, и 6 областей, отвечающих за интенсивность окраски шляпки плодовых тел. Все найденные нами QTL были отмечены на генетической карте вешенки. Полученная карта может быть использована для дальнейших исследований, которые помогут при выполнении селекционных программ, направленных на улучшение хозяйственно-полезных свойств вешенки обыкновенной.

Список литературы.

1. *Wasser S.P., Weis A.L.* Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review) // Intern. Journal of Medicinal Mushrooms. 1999. Vol. 1. P. 31-62.
2. *Краснопольская Л. М.* Грибы класса Basidiomycetes – источники лекарственных веществ // Сборник трудов международной конференции, посвященной 80-летию каф. микологии и альгологии МГУ и 90-летию со дня рождения М.В. Горленко «Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии». 1998. С. 230-232.
3. *Ragunathan R., Swaminathan K.* Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Pleurotus* spp. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2004. Vol. 20. № 4. P. 389-393.
4. *Kalmi E., Sargin S.* Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water // International Biodeterioration & Biodegradation. 2004. Vol. 53(1). P. 43-47.

5. *Dellamatrice P. M., Monteiro R. T. R., Kamida H. M., Nogueira N. L., Rossi M. L., Blaise C.* Decolourization of municipal effluent and sludge by *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 21. № 8-9. P. 1363-1369.

6. *Pant D., Reddy U., Adholeya A.* Cultivation of oyster mushrooms on wheat straw and bagasse substrate amended with distillery effluent // World J. Microbiol. Biotechnol.. 2006. Vol. 22. № 3. P. 267-275.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ОЗДОРОВЛЕНИЯ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Слободян Е.А., Олейник Т.Н., Слободян С.О.

*Институт картофелеводства национальной академии аграрных наук Украины ул.
Чкалова, 22, пгт. Немешаево, Бородянский р-н, Киевская обл., Украина 07853
E-mail: upri@visti.com*

На Украине в первичном семеноводстве картофеля уже более 30 лет используют безвирусный материал, полученный с помощью культуры меристем. Открытый в 50-х годах прошлого века этот метод дал возможность получить ряд сортов свободных от вирусных инфекций. Наряду с большими достижениями этот метод имеет свои недостатки. Использование только культуры меристем с целью освободить растение-хозяина от вирусной инфекции не всегда эффективно. Многое зависит от ряда факторов таких как сортовая и видовая особенность растения-хозяина и вируса, первоначальная зараженность клубней картофеля и размер меристемных изолятов.

Оздоровления сортов картофеля Калынивська и Глазурная проводили с помощью культуры меристем в сочетании с химиотерапией. Материал для исследований был отобран в рассаднике испытания клонов. Инфекционность картофеля вирусами устанавливали методом иммуноферментного анализа (ИФА). Результаты анализов показали зараженность сортов Калынивська и Глазурная Х, S, А-вирусами картофеля на 25% и М, У-вирусами картофеля на 50%.

В качестве антивирусных препаратов использовали ацикловир и амимксин в терапевтических концентрациях. Препараты добавляли в искусственную питательную среду на втором пассаже культивирования меристем после автоклавирования. Размножение растений-регенерантов проводили на среде Мурасиге-Скуга в нашей модификации.

Выход оздоровленных линий сорта Глазурная при использовании препаратов в сравнении с культурой меристем не имел существенной разницы. Так при использовании амимксина мы получили 48% оздоровленных линий, ацикловира – 38%, а культуры меристем – 45%. Применение амимксина при оздоровлении сорта Калынивська способствует повышению оздоровления на 40% в сравнении с культурой меристем, а ацикловира на 28%. В целом было получено 57 оздоровленных линий сортов Калынивська и Глазурная.

Для выяснения повторного заражения вирусными болезнями оздоровленный картофель высаживали в теплице. При тестировании растений картофеля методом ИФА оздоровленные линии сортов Калынивська и Глазурная были повторно заражены М-вирусом картофеля на 56%. Этот результат говорит о том что М-вирус картофеля играет доминирующую роль при повторном вирусном заражении исследуемых сортов.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ТВЕРДОЙ И МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Соколов Р.Н.¹, Мирошниченко Д.Н.², Долгов С.В.²

¹*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва 127550, E-mail: quiproduct@mail.ru*

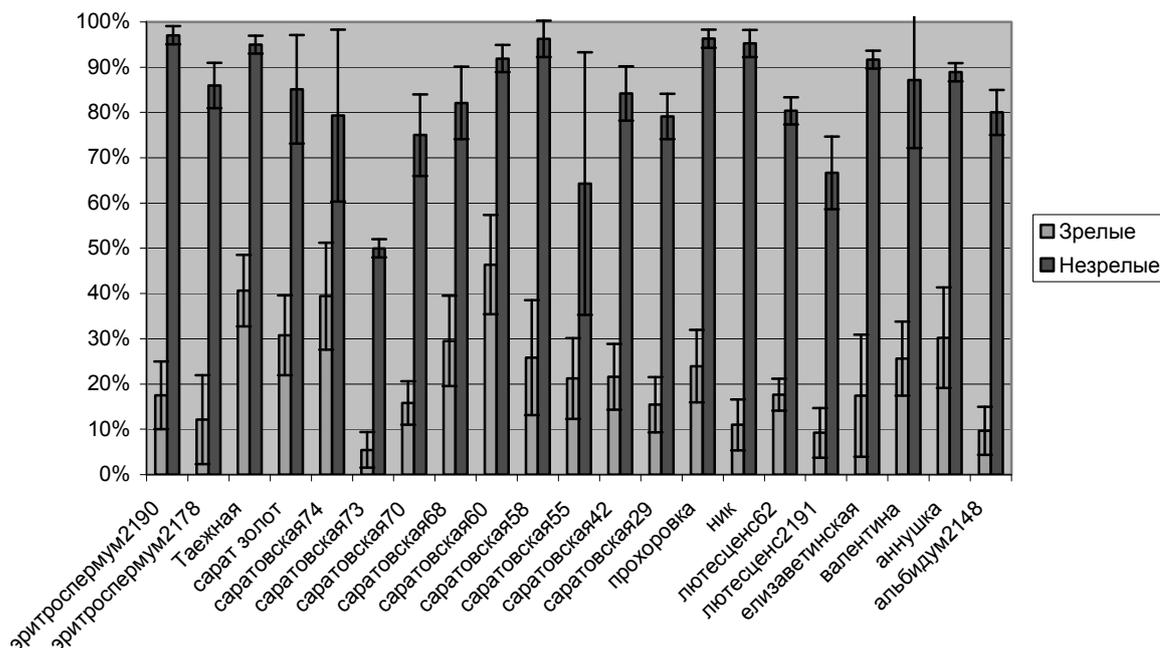
²*Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Россия, Пущино, 142290*

Большинство исследовательских работ по регенерации и трансформации пшеницы выполнены с использованием сортов западно-европейской и американской селекции. Для этого чаще всего инициируют соматический эмбриогенез из тканей незрелых эмбрионов. также в качестве эксплантов можно использовать ткани зрелых зерновок пшеницы (Filiprov et al., 2006). Цель нашей работы - анализ регенерационного потенциала отечественных сортов твердой и мягкой пшеницы и поиск коммерческого генотипа с высокими показателями регенерации. Исследовали 15 сортов яровой мягкой и 5 сортов яровой твердой пшеницы, предоставленных НИИ Сельского Хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии. В качестве контрольного использовали сорт Таежная, который проявлял высокие показатели в предыдущих экспериментах (Filiprov et al., 2006). Для индукции каллусогенеза из тканей зрелых зерновок использовали среду MS с добавлением 12 мг/л Dicamba и 2 мг/л ИУК в течение 28 дней. Для незрелых тканей использовали среду MS с добавлением 2 мг/л 2,4-D. Для развития побегов каллусы, образовавшие эмбриогенные кластеры, переносили на безгормональную среду MS и культивировали при 16-ти часовом фотопериоде в течение 28 дней. Анализировали следующие показатели: частоту образования эмбриогенного каллуса, долю регенерировавших каллусов от общего числа эмбриогенных каллусов, число образовавшихся побегов на один регенерировавший эмбриогенный каллус. В исследованиях проанализировали более 4000 эксплантов.

Большинство исследованных сортов, например Эритроспермум 2178 (12,1%±7,5%), Саратовская 73 (5,5%±3,9%), Саратовская 29 (15,4%±6,1%), Лютеценс 2191 (9,2%±3,5%), Альбидум 2148 (9,7%±5,3%), Ник (11,0%±5,6%), Елизаветинская (17,4±13,5%) проявили крайне низкую способность к морфо- и эмбриогенезу, что говорит об их бесперспективности в отношении дальнейших опытов по генетической трансформации. Другие сорта, например Саратовская 58 (25,8%±12,7%), Саратовская 68 (29,5%±10,0%), Саратовская 42 (21,6%±7,3%), Саратовская 55 (21,2%±8,9%), Саратовская Золотистая (30,8%±8,8%), Аннушка (30,2%±11,1%) показали среднюю способность к эмбриогенезу, и только два сорта, Саратовская 74 (39,42%±11,8%) и Саратовская 60 (46,39%±11,0%) оказались сравнимы по проценту эмбриогенных каллусов с контрольным сортом Таежная (40,6%±7,9%). Исследованные сорта твердой пшеницы менее склонны к регенерации, чем сорта мягкой при использовании обоих протоколов регенерации. Как мы и ожидали, результаты проведенного эксперимента показали, что эмбриогенез у незрелых зародышей происходит заметно эффективнее, чем у зрелых. Предполагалось, что незрелые эмбрионы могут показать сортовую зависимость, соответствующую зрелым, однако, как оказалось, эта зависимость отсутствует. Четкая корреляция между значениями показателей эмбриогенеза у разных типов эксплантов не наблюдается. Например, сорт Эритроспермум 2190 показал очень хорошие результаты при использовании незрелых зерновок (97,1 %) и, в то же время, в ходе опытов со зрелыми семенами эмбриогенез из каллусов этого сорта не был достаточно эффективным(17,5%).

Процент эмбрионных каллусов от общего числа каллусов

Эффективность формирования эмбрионных каллусов при использовании зрелых и незрелых эмбрионов в качестве эксплантов



По результатам проведенных экспериментов сорта Саратовская 60 и Саратовская 74 могут быть рекомендованы для дальнейших экспериментов по генетической трансформации пшеницы.

Список литературы.

Filippov M., Miroshnichenko D., Vernikovskaya D., Dolgov S. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat // Plant Cell, Tissue and Organ Culture – 2006. – V.84. – P.213 – 222.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ В ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКАХ ДНК ПОД ВЛИЯНИЕМ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО УФ-С ОБЛУЧЕНИЯ

Соколова Д.О.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина, E-mail: darina.sokolova2010@yandex.ru

Исследование реакции организмов в ответ на влияние повторяющихся факторов находится в центре внимания многих биологических и медицинских дисциплин. В радиобиологии этот вопрос широко исследуется при изучении эффектов фракционированного излучения и адаптивного ответа. В современной науке имеются данные про конститутивные и индуцибельные механизмы защит и восстановления биологических систем от радиационного влияния. Один из возможных подходов к оценке включения индуцибельных механизмов связан с исследованием изменения профиля метилирования транскрибируемой части ДНК.

Известно, что метилирование, как единственная форма ковалентной модификации ДНК без изменения её нуклеотидной последовательности, является одним из основных эпигенетических механизмов контроля генной экспрессии. Вместе с тем, метилирование – полифункциональный процесс, который играет значительную роль и в стабилизации структуры ДНК.

Данное сообщение касается результатов, полученных при исследовании связи изменения профиля метилирования в функционально различных частях ДНК и выхода хромосомных aberrаций при фракционированном УФ-С облучении в дозах 6,2 – 9 кДж/м².

Использовано объединение рестрикционного анализа с рестриктазами HpaII, MspI, MboI и ПЦР с праймерами internal transcribed space – ITS1 (19b) ITS4 (20b), и inter simple sequence repeat – ISSR (14b). В качестве показателя радиационного влияния использовались изменения уровня выхода хромосомных aberrаций. Полученные результаты свидетельствуют об изменениях в профиле метилирования сателлитной и транскрипционно активной частей ДНК при облучении в режиме фракционирования и зависимости от временного интервала между фракциями.

СКРИНИНГ СЕЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ ПШЕНИЦЫ НА НАЛИЧИЕ АЛЛЕЛЯ A1 ЛОКУСА GLU-B1

Степаненко А.И.¹, Моргун Б.В.¹, Починок В.М.²

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
ул. Академика Заболотного, 148, Киев, 03680, Украина, E-mail: bmorgun@icbge.org.ua*

²*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина*

Пшеница – одна из важнейших продовольственных зерновых культур в Украине и мире, которая занимает первое место по посевным площадям. Продукты переработки зерна пшеницы составляют основу пищевого рациона населения многих стран, в том числе и Украины. Одной из глобальных проблем современности является вопрос улучшения качества зерна пшеницы. По современным представлениям значительный вклад в решение проблемы качества зерна должны внести исследование генетических систем контроля данного признака с использованием молекулярно-генетических маркеров.

В последние годы были разработаны методики, позволяющие с помощью молекулярных методов выявлять гены, влияющие на признаки хлебопекарного качества, что чрезвычайно важно для полной оценки сорта. Проявление таких генов не зависит от условий окружающей среды при наличии тесного сцепления с генами хозяйственно важных признаков. В частности, определенную связь с качеством обнаружено для локусов высокомолекулярных глютеинов. Интересным для изучения влияния высокомолекулярных глютеинов на признаки хлебопекарного качества является аллель Glu-B1a1, продуктом экспрессии которого являются две субъединицы Vx7OE + Vy8*.

Четкая идентификация аллеля Glu-B1a1 сделает возможным широкое применение его в отечественных селекционных программах и позволит вывести сорта озимой мягкой пшеницы с высоким качеством зерна. Получение высококачественной муки в свою очередь будет способствовать увеличению экспорта зерна отечественными производителями.

Одной из особенностей этого аллеля является то, что его почти невозможно обнаружить с помощью обычного электрофореза в ДСН ПААГ. Этот аллель можно идентифицировать с помощью ПЦР-анализа по inserции длиной 43 п.н. в регионе MAR. Поэтому, нами была разработана четкая методология детекции аллеля Glu-B1a1 пшеницы методом ПЦР и осуществлен анализ по данному локусу 123 образцов.

Для ПЦР использовали праймеры MARF и MARR (Butow, 2004), 30 нг общей очищенной ДНК из шрота, 1 ед. DreamTaq™ полимеразы (Fermentas). Программа амплификации была следующей: начальная денатурация 94 °С - 3 мин, 40 циклов 94 °С - денатурация 30 с, 59 °С - отжиг 30 с, 72 °С - элонгация 1 мин, заключительная элонгация 72 °С - 5 мин. Продукты амплификации визуализировали после их электрофоретического разделения в 1,6%-м агарозном геле в ультрафиолетовом свете с использованием бромистого этидия, как красящего реагента.

В результате исследования нами было выявлено 52 образца, в которых присутствует аллель Glu-B1a1.

Полученные результаты исключительно важны для селекционной работы по получению сортов пшеницы с ценными хлебопекарными свойствами.

ГАПЛОПРОДУКЦИЯ В СИСТЕМЕ КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ КАРТОФЕЛЯ

Тимошенко И.П.¹, Олейник Т.Н.¹, Игнатова С.А.²

¹ *Институт картофелеводства НААН Украины ул. Чкалова 22, пгм. Немешаево Бородянский р-н, Киевская обл., Украина 07853, E-mail: upri@visti.com*

² *Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины, Одесса, 65058*

В данное время благодаря интенсивному развитию методов культивирования клеток, тканей и органов *in vitro*, биотехнология расширила свое влияние в растениеводческой практике. Возможность манипулировать клетками растений в разных модельных системах и усовершенствование способов реализации их тотипотентности привело к разработке новых биотехнологий, направленных на выполнение селекционно-генетических программ по улучшению экономически важных культур.

Культурный картофель *S. tuberosum* - генетически сложный вид, аутотетраплоид. В тетраплоидов расщепление в поколениях значительно сложнее, чем дигаметоидов, поэтому практически невозможно получить гомозиготные формы, которые характеризовались бы доминантными генами. Лишь перевод картофеля на диплоидный уровень $2n=24$ поможет достичь высокой степени гомозиготности в короткий срок.

Культура пыльников и микроспор привлекает внимание исследователей относительной простотой выполнения и позволяет получать в течение одного поколения генетически однородный и стабильный селекционный материал.

В основе биотехнологии получения дигаметоидов картофеля лежит процесс андрогенеза *in vitro*, основанный на формировании растений-регенерантов из новообразований, которые развиваются из морфогенных микроспор на искусственной питательной среде в условиях *in vitro*.

При этом особенное значение приобретает поиск путей повышения уровня регенерации и получения дигаметоидов в достаточном количестве для создания исходного материала с хозяйственно-ценными показателями.

Целью наших исследований было определить влияние предобработки пыльников картофеля, как исходного материала на морфогенез и регенерацию растений в культуре *in vitro* и оптимальную стадию развития микроспор пыльников для эффективного андрогенеза.

В исследованиях в качестве исходного материала использовали: культурный диплоидный вид картофеля *Solanum phureja*; 90.35с 297 и 81.386с 65 беккросы межвидовых гибридов, которые созданы при участии диких видов *S. acaule* (устойчивость к А и Y вирусам картофеля, фитофторозу, колорадскому жуку, картофельной моли и других насекомых), *S. bulbocastanum* (устойчивость к фитофторозу), *S. demissum* (устойчивость к L и Y вирусам картофеля, фитофторозу, патотипам рака и двух видов *Globodera*); сорт Щедрик селекции института.

Необходимым условием для индукции андрогенеза является подготовка исходного материала. Предобработка бутонов низкой (+4°C) температурой способствует блокировке процесса микроспорогенеза, который приводит к перепрограммированию микроспоры на более стойкую спорофитную программу.

В наших исследованиях бутоны картофеля выдерживали при температуре +4°C в течение 12, 24, 48 и 72 часов. При этом 48 часовая обработка стимулировала процесс образования калусов в культуре пыльников.

Действие фактора в течение 12, 24, 72 часов не показало положительных результатов. Предобработка в течение 48 часов была наиболее эффективной.

Успех в культивировании *in vitro* пыльников зависит от многих факторов, в первую очередь от стадии онтогенеза на которой проводилась эксплантация, состава питательных сред и условий культивирования. Пыльники срезали из растений в фазе бутонизации в период раскрытия первого цветка кисти.

Во время микроскопирования 80% микроспор были одноядерными. Для уменьшения инфекционной нагрузки при культивировании пыльников модифицировали питательную среду Нич: Н(1) - с добавлением 0,75мг/л 2,4-Д + 0,1 г/л амиксина, получено 24 калуса. Н(2) – с добавлением 1мг/л 2,4-Д + 10 мл/л AgNO₃, получено 62 калуса.

При культивировании пыльников картофеля изолированных на стадии одноядерных микроспор, в одних случаях проявляется способность репродуктивных клеток к эмбриогенезу, в других – репродуктивные клетки дедифференцируются, делятся, образуют калусную ткань, из которой формируется растение. В наших исследованиях во всех образцах было отмечено образование калусных тканей, лишь в двух случаях при культивировании пыльников беккроса межвидового гибриду 90.35с 297 получили эмбриогенез.

Культивировали пыльники при температуре 30°C в течение трех дней в темноте. После трех дней культивирования пыльники переносили в светловую климатическую комнату с температурой 24± 1°C при относительной влажности 80-85% и 16-часовом фотопериоде с освещением 3000лк. Калусную культуру культивировали при температуре 26± 1°C с постепенным понижением к 22± 1°C.

Через пять месяцев культивирования получено регенерацию растений.

В результате исследований нами определенно стадию развития микроспор пыльников; модифицированы питательные среды для морфогенеза и регенерации, получено морфогенные калусы и растения-регенеранты всех задействованных в работу образцов.

Исследованиями предусмотрено проведения цитологического, молекулярно генетического анализа регенерантов и испытания в полевых условиях.

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА В ХРИЗАНТЕМ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

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

¹ ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Россия, 127550,
Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, E-mail: f0t0nchik@mail.ru

² Филиал Института биоорганической химии РАН, Россия, 142290, Московская
обл. г. Пущино, проспект Науки, д. 6

Хризантема является одной из важнейших цветочных культур во всем мире, в том числе и в России. Для потребителя предлагаются как срезочные, так и горшечные, садовые и тепличные растения. По объему продаж в России хризантемы уступают только розам. Вегетативное размножение хризантем связано с существенным накоплением в их искусственных популяциях различных заболеваний. Основным урон цветочной продукции наносят вирусные заболевания, которые не поддаются химическому контролю. Наибольшее распространение в растениях хризантем получил В вирус хризантем (ВВХ), который приводит к снижению качества товарной продукции и привлекательности для покупателя. Вирус В хризантем ухудшает их внешний вид, снижает ценность и декоративный эффект и может привести к гибели растения. Вирус В хризантем распространен в хризантемах, выращиваемых во всем мире. ВВХ передается с помощью инокулированного сока или несколькими видами тлей непersistентным образом. Хризантемы, инфицированные ВВХ имеют различные симптомы от умеренной крапчатости листа или осветления жилок до выраженной мозаики или уродств цветка, но иногда они не проявляют симптомов.

Целью нашего исследования было изучение распространения ВВХ среди коммерческих сортов Краснодарского края. Сорта хризантем были любезно предоставлены ГНУ Всероссийским научно-исследовательским институтом цветоводства и субтропических культур РАСХН (ВНИИЦиСК Россельхозакадемии). Для обнаружения вируса В хризантем использовали метод DAS-ELISA (набор Loewe, Germany). В качестве исследуемого материала были использованы инфицированные листья растений хризантем. Образцы были приготовлены соответственно инструкции фирмы-производителя набора. Концентрацию общего белка в полученных препаратах определяли методом Dc Protein Assay (BioRad, USA), затем препараты разводили до концентрации общего белка, равной 1 мг/мл. DAS-ELISA выполнялась соответственно инструкции фирмы-производителя. В качестве контрольных были использованы оздоровленные растения хризантем сорта White Snowdon, полученные ранее на станции искусственного климата «Биотрон». Результаты были прочитаны с помощью планшетного ридера Biotrak II Reader (Amersham, USA) и обработаны в программе Excell. Оценка степени зараженности образцов проводилась путем сравнения полученных значений оптической плотности (ОП) с ОП образцов контрольных растений.

Среди 7 изученных сортов только два были свободны от вирусного заражения, в остальных сортах вирус детектировался. Содержание вирусного белка среди зараженных сортов варьировало в широких пределах. Так, если в сортах 5.3. и 5.6. наблюдалось незначительное, но достоверное, превышение значений ОП образцов относительно контрольных, то в сортах 5.2. и 5.4. такое превышение было многократным. Сорт 5.5. характеризовался очень сильной степенью инфицированности. Необходимо отметить, что заражение большинства сортов было бессимптомным, только сорт 5.5 продемонстрировал заметные симптомы. Различия в

степени инфицированности изученных сортов могут быть связаны с различными уровнями их устойчивости к вирусу, а также различиями в условиях культивирования растений.

Таким образом, показано широкое распространение вируса В хризантем среди сортов, культивирующихся в Краснодарском крае, что подразумевает необходимость дальнейших исследований по созданию сортов, устойчивых к этому патогену.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОКУСОВ FRIGIDA В ГЕНОМАХ BRASSICA A И C

Фадина О.А., Панкин А.А.

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, 127550, Москва, Тимирязевская ул., 42, email: fadinaokcaha@gmail.com

Ключевой в жизни растения переход от вегетативного к репродуктивному развитию проходит под жестким генетическим контролем. В ответ на эндогенные сигналы и факторы внешней среды растения развили сложную генетическую систему управления цветением. Одним из факторов, запускающих процессы формирования меристемы соцветия у растений умеренных широт, является продолжительное холодное воздействие, или вернализация (яровизация). Изучение генетических механизмов вернализации у культурных растений позволяет регулировать такой важный признак, как время зацветания, что важно для продвижения экономически важных культур в новые для них регионы. К настоящему времени наиболее подробно исследованы две альтернативные модели генетической регуляции процесса вернализации, представленные пшеницей и арабидопсисом (Greenup et al., 2009).

На примере видов *Arabidopsis* (семейство Brassicaceae) установлено, что время зацветания ранне- и позднецветущих экотипов связано с аллельным полиморфизмом гена *FLOWERING LOCUS C*, репрессирующего переход к цветению, и его положительного регулятора гена *FRIGIDA (FRI)*. Несмотря на огромное экономическое значение культурных видов *Brassica*, строение и функции гомологов гена *FRI* практически не исследованы у этих видов.

Мы создали ген-специфичные праймеры для клонирования фрагментов и полноразмерных последовательностей *FRI* и обнаружили, что у *B. rapa* и *B. oleracea* этот ген представлен двумя локусами - *FRIa* и *FRIb*. Сходным образом, два локуса *FRI* были недавно описаны у *B. oleracea* (Irwin et al., 2012). Сравнительный анализ этих локусов показал, что различия при сравнении каждого локуса у геномов А и С (соответственно, *B. rapa* и *B. oleracea*) были незначительными (95-99%) по сравнению с заметными различиями между двумя локусами внутри каждого генома (87-94%). Это позволяет сделать предположение, что расхождение локусов *FRI* произошло еще до выделения этих видов *Brassica*.

По экзон-интронной структуре (три экзона и два интрона, рис. 1) ген *FRIa B. rapa* сходен с *FRI* из *A. thaliana* и кодирует белок длиной ~576 а.о.



Рис.1. Строение гена *FRIa* и белка FRIGIDAa.

Транслированные аминокислотные последовательности FRI оказались немного короче (555-596 а.о.), чем у гена-прототипа *A. thaliana* экотип Н51 (609 а.о.). Для всех последовательностей был определен консервативный центральный домен Frigida (286-308 а.о.), характерный для суперсемейства белков FRIGIDA и FRIGIDA-LIKE (Risk et al., 2010). Присутствие в N-концевой части белка у клонированных нами последовательностей участка KSIDELAAFSVAVETFKRQFDDLQKHIESIENAIDSK длиной в 37 аминокислотных остатков (см. рис. 2) позволяет определенно отнести гены *FRIa* и *FRIb* к классу I FRIGIDA. Белок FRIGIDA *A. thaliana* содержит coiled-coil домены в двух позициях, на N-конце и С-конце. Среди гомологов FRIGIDA из растений *Brassica* мы обнаружили биспиральную структуру в N-концевой части белка только у части гомологов из *B. oleracea*, при этом эта структура предсказывается с меньшей вероятностью (0.76), чем у белка-прототипа (0.90). На С-концевом участке белка образование coiled-coil домена у всех исследованных к настоящему времени белков FRIGIDAa и FRIGIDAb предсказано с значительной вероятностью (0.90).

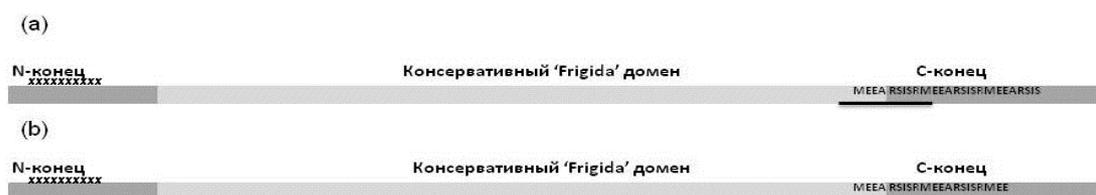


Рис. 2 Схема белка FRIGIDA. (a) FRIGIDAa *V.rapa*; (b) FRIGIDAa *B.oleracea* и *A.thaliana*. Белок имеет центральный консервативный домен 'Frigida', на N- и С-концах предсказано образование coiled-coil доменов (сплошной черная линией) и участок, содержащий 37 а. о., позволяющий отнести гены *FRIa* к классу I FRIGIDA (отмечено звездочками).

Множественное выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей гомологов *FRI* из диплоидов *B. rapa* (геном А) и *B. oleracea* (геном С) и тетраплоида *B. napus* (геном АС) позволило нам связать принадлежность последовательности *B. napus*, охарактеризованные Wang et al. (2011), со специфичными геномами и локусами. Нуклеотидные и белковые последовательности *FRIa* и *FRIb*, соответствующие субгеномам А и С у *B. napus*, были на 96-99% идентичны своим аналогам в геномах А и С диплоидных видов *Brassica*.

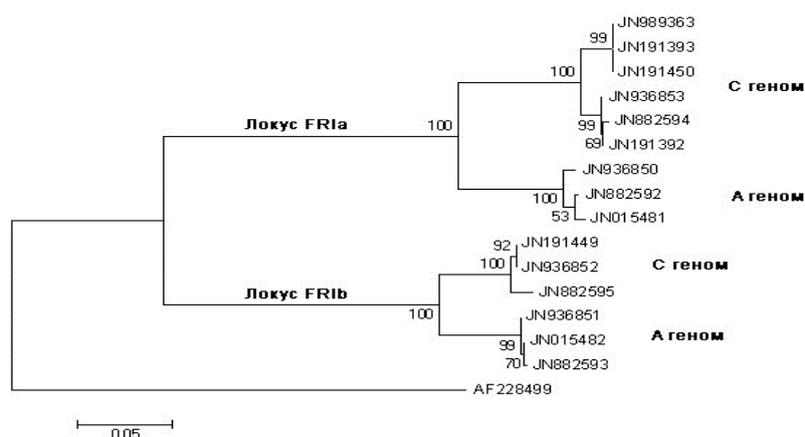


Рис. 3 Филогенетическое дерево гомологов гена *FRI* у *B. oleracea*, *B. rapa* и *B. napus*. Дендрограмма построена с использованием метода Maximum Likelihood (Stamatakis et al., 2008). Генетическое расстояние указано по оси абсцисс. В узлах дерева указаны bootstrap значения (1000 повторов). Дерево укоренено по отношению к последовательности гена прототипа *FRI A. thaliana* H51 (AF228499). JN989363,

JN191393, JN191450, JN882594, JN191392, JN191449, JN882595 – *B. oleracea*, JN882592, JN015481, JN936851, JN882592 – *B. rapa*; JN936853, JN936850, JN936852, JN936851 – *B. napus*.

На основании множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей *FRI*, полученных в трех лабораториях, было построено филогенетическое дерево гомологов этого гена у *B. oleracea*, *B. rapa* и *B. napus*, которое наглядно иллюстрирует наши представления о существовании двух локусов этого гена и геном-специфичных вариантов этих локусов (рис. 3). По крайней мере, некоторые из этих вариантов представлены несколькими аллельными формами.

ДНК-МАРКЕРЫ ГЕНОМА СОРТОТИПОВ СВЁКЛЫ КОРНЕПЛОДНОЙ

Федорин Д.Н., Федулова Т.П.

ГНУ Всероссийский НИИ сахарной свёклы им. А.Л. Мазлумова, Воронежская обл., Рамонь, 396030, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

Идентификацию и систематизацию коллекционных образцов традиционно проводят по морфологическим признакам. Однако такой подход не всегда позволяет точно дифференцировать близкие виды. В настоящее время для классификации и описания коллекций растений все чаще применяют комплекс характеристик, полученных с помощью, как морфобиологических методов, так и метод молекулярного анализа ДНК.

В частности, RAPD и SSR – методы успешно используются для исследования молекулярно - генетического внутривидового и межвидового полиморфизма у растений.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании методом RAPD и SSR – анализа молекулярно – генетического полиморфизма сортотипов корнеплодной свёклы, представленных в коллекции селекцентра ВНИИСС.

Объектом исследования служили 30 образцов сортотипов сахарной, кормовой и столовой свёклы. С помощью произвольных праймеров к умеренно повторяющимся последовательностям были получены индивидуальные RAPD – спектры геномов исследуемых образцов. Всего исследовано 68 RAPD – локуса. Процент выявляемого полиморфизма зависел от используемого праймера.

Проведенный ПЦР-анализ геномной ДНК с праймерами к умеренно повторяющимся последовательностям показал высокий генетический полиморфизм исследуемых образцов (МС-форм, гибридов сахарной свёклы, кормовой и столовой свёклы) по локусам RawS 6 и RawS 16. Продукты амплификации были получены у всех образцов. При анализе сортотипов свёклы с использованием олигонуклеотидов RawS 6 амплифицировалось 47 ДНК-фрагментов, полиморфными оказались 6. Внутривидовой полиморфизм свёклы корнеплодной составил в данном случае 12,7%.

В результате амплификации геномных ДНК растений с праймерами RawS 6 выявлено, что в составе генома всех исследованных организмов обнаруживается общий ампликон с длиной около 700 п.н. При этом в растениях кормовой свёклы, гибрида F₁ ЛБС-16хКБ (кормовая белая) и МС – формы сахарной свёклы - ЛБС-16 - это единственный ПЦР-продукт, что указывает на сходство их генетического материала. Наибольшее число сайтов амплификации обнаружено у гибрида сахарной свёклы «Витязь», которые обеспечивают образование продуктов с длинами 250, 400, 700, 800 и 900 п.н.

Сравнительный анализ комбинативных пар образцов растений показал, что у образцов №2 (МС-форма сахарная свёкла) и №18 (кормовая красная) имеется как сходный продукт амплификации (700 п.н.), так и дополнительный в образце №18 с длиной 400 п.н., что свидетельствует о неоднородности их генетического материала. По праймеру RawS 16 для гибридной комбинации F₁ ЛБС-16 (сахарная свёкла)хБордо (столовая свёкла) обнаружено наследование ампликонов отцовского родителя 800 п.н.

В результате скрещиваний МС растений сахарной свёклы с растениями кормовой белой свёклы по локусу RawS 16 у гибридов F₁ выявлено в основном присутствие ДНК-фрагментов материнского типа (700 п.н.). Форма корнеплодов у данных гибридов F₁ также наследуется по материнскому типу. По локусу RawS 16 у гибрида F₁ ЛБС-16хКБ 9(кормовая белая), как и у материнской формы не обнаружено продуктов амплификации с данными праймерами, тогда как у отцовского родителя выявлены ДНК-фрагменты длиной 550 и 800 п.н. Установлено, что ДНК-фрагмент длиной 900 п.н. является специфичным для образцов столовой свёклы и отсутствует у растений кормовой и сахарной свёклы. Сходство состава ампликонов обнаружено в образцах кормовой свёклы и у гибрида сахарной свёклы иностранной селекции «Золеа» 800 п.н. Это свидетельствует о том, что данный гибрид создан, по-видимому, с использованием кормовой свёклы. По результатам ПЦР - амплификации геномной ДНК с праймерами RawS 16 установлено, что всего амплифицировалось до 21 фрагмента, полиморфных оказалось 6. Полученное значение внутривидового полиморфизма свёклы корнеплодной составило 28,5%.

В результате ПЦР-анализа геномной ДНК со специфическими праймерами к микросателлиту Bvv48 и последующего электрофореза продуктов реакции в 1% агарозном геле установлено наличие полиморфизма данного локуса у представленных образцов.

Всего амплифицировалось 24 ДНК – фрагмента, из которых полиморфными оказались 5. Полиморфизм при использовании данных олигонуклеотидов составил 20,8%. Максимальное количество ПЦР-продуктов наблюдалось у МС – растений сахарной свёклы, кормовой свёклы, столовой свёклы, гибрида сахарной свёклы иностранной селекции «Золеа» с длинами 250, 500 и 800 п.н. Полученные результаты свидетельствуют о родстве их генетического материала. Кроме того, использование сателлиты Bvv48 показало сходство ДНК между образцами МС-линий №1 и №7, где проявляется только один продукт с длиной 250 п.н., что свидетельствует об их высокой степени гомозиготности. Данный продукт полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами является универсальным, поскольку проявляется у всех представленных образцов. Отличительные черты организации генома выявлены у образцов №4 (кормовая красная свёкла) и №10 гибрид сахарной свёклы «Золеа, где исследуемая сателлита имеет двойное проявление.

В результате амплификации геномных ДНК растений, со специфическими праймерами к микросателлиту Bvv48, было установлено, что искомая сателлитная ДНК присутствует во всех образцах, но в разной степени выраженности. С остальными праймерами к микросателлитам Bvv 51, Bvv 53, Bvv 54 у данных селекционных образцов полиморфизма не выявлено.

Таким образом, проведенный ПЦР-анализ геномной ДНК сортоформ свёклы корнеплодной с полученными специфическими праймерами показал неоднородность генетического материала исследуемых образцов при использовании маркеров PAWS 6, PAWS 16 и Bvv48. Применение данных праймеров при проведении ПЦР-анализа позволило установить сходство и отличие в генетическом материале образцов свёклы и провести скрининг гибридов. Результаты показали высокий уровень полиморфизма в

исследованных локусах и пригодность использованных праймеров для генотипирования сортоформ свёклы корнеплодной.

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* *WOLFFIA ARRHIZA* КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБЪЕКТА ДЛЯ БИОФАРМИНГА

Хватков П.А., Чернобровкина М.А., Кочелабов Р.А., Окунева А.С., Долгов С.В.

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Россия, 127550, Москва, Тимирязевская д. 42

Одним из приоритетных направлений развития биотехнологии является создание трансгенных растений-продуцентов биологически активных соединений и использование их в качестве биофабрик по производству белков, в частности, фармацевтического и ветеринарного назначения («биофарминг»). Преимуществом использования растительных систем являются отсутствие общих с человеком и животными патогенов, относительная простота культивирования, наличие эукариотических систем посттрансляционного модифицирования. Одним из перспективных направлений является культивирование в биореакторах представителей семейства *Lemnaceae*, обладающих высокой скоростью размножения при малых размерах самих растений и достаточно высоким содержанием белков в сухой массе. В настоящее время отдельные представители семейства (*Lemna minor* и *Spirodela oligorhiza*) используются в качестве источника рекомбинантных терапевтических белков коммерческими предприятиями ряда зарубежных стран. Генетическая трансформация данных растений оказалась возможной в основном благодаря тщательно разработанной системе индукции морфогенеза и регенерации. С этой же целью проводятся разработки с видами подсемейства вольфиевых. Однако сообщения об успешных работах на сегодняшний день отсутствуют.

Вольфия бескорневая, принадлежащая к семейству *Lemnaceae*, является самым маленьким цветковым растением в мире; водным, свободноплавающим; размножающимся преимущественно вегетативным способом. Культивирование вольфии как продуцента целевых белков в биореакторе имеет ряд преимуществ по сравнению с другими объектами, используемыми для этих же целей: 1) малый размер; 2) отсутствие корней; 3) большая прогрессия размножения; 4) возможность глубинного культивирования; 5) высокое содержание белков в сухой массе.

При любом методе трансформации целевые ткани подвержены целому ряду стрессов. В связи с этим, прежде чем начинать исследования в сфере трансформации, необходимо провести ряд экспериментов, направленных на разработку протокола эффективной и стабильной регенерации целых растений с частотой не менее 80-90 %. При проведении исследований в первую очередь был осуществлен поиск оптимального сочетания типа экспланта и гормона, добавляемого в среду. Также изучению подвергся фактор углеводного питания эксплантов как один из наиболее значимых для индукции морфогенеза растений семейства *Lemnaceae*. Однако даже после столь тщательного подбора параметров процент выхода истинного каллуса не превышал 2-3%. В связи с этим было принято решение о необходимости дальнейшей оптимизации условий индукции морфогенеза. С целью экономии времени и повышения эффективности исследований подбор условий для второго этапа индукции изучали с использованием метода Монте-Карло, который представляет собой по существу статистический метод исследования выборочных распределений. Это позволило полностью рассчитать

необходимые условия для индукции каллусогенеза вольфии с помощью математической модели, а также автоматически максимально полно учесть область возможных изменений, с последующим вычислением искомых величин на основе ограниченной выборки наблюдений.

Наиболее распространенными методами трансформации широкого круга растений (как однодольных, так и двудольных) являются агробактериальная и биолиственная системы интеграции гетерологичной ДНК в целевые ткани экспланта. В экспериментах по трансформации использовали векторную конструкцию pCambia35SGFP. В ее состав входят гены *hpt*, *gfp* и *bar*. Перенос гетерологичной ДНК осуществляли в активно делящиеся клетки. Далее производили анализ эффективности трансформации согласно результатам детекции транзientной экспрессии. Далее экспланты переносились на среду с селективным агентом (гигромицином).

Наиболее перспективной технологией производства растений-продуцентов рекомбинатных белков является глубинное культивирование их в закрытых системах. Биореактор «Biostat PBR 2S» («Sartorius», Germany) является гидродинамическим ферментером и разработан специально для культивирования низкоорганизованных фотосинтезирующих организмов. В ходе его эксплуатации был выявлен ряд проблем, обусловленных специфическими особенностями объекта исследований (травмирование растений при контакте с рабочими органами насоса и капельно-подающимся титрантом), которые удалось устранить путем модернизации отдельных сегментов рабочих органов ферментера.

Среди множества факторов внешней и внутренней среды, влияющих на рост и развитие растений, минеральное питание является наиболее доступным для регулирования и оптимизации потребности растений в тех или иных элементах питания. Для изучения влияния разных сред и концентраций минеральных веществ на увеличение численности популяции вольфии в условиях *in vitro* были использованы среды Хогланда-Арнона, Кнопа, Гамборга и Шенка-Хильдебрандта в различных концентрациях. Растения помещали на агаризированные питательные среды в количестве 10 растений на одну чашку Петри в пятикратной повторности для каждого варианта. Через каждые 3 дня производили учет численности популяции. Учетный период составлял 1 месяц со дня посадки. Наиболее сбалансированной по минеральному составу питательной средой для культивирования вольфии оказалась среда Хогланда с содержанием минеральных элементов согласно авторской прописи. В следующей серии опытов изучали действие отдельных элементов минерального питания и органических компонентов, в результате чего были получены данные для разработки сбалансированной среды, обеспечивающей максимальный прирост биомассы вольфии.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ КАК СУБСТРАТОВ ДЛЯ ГЕТЕРОГЕННОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛИНАЗЫ

Холявка М.Г., Ковалева Т.А., Волкова С.А., Хрупина Е.А., Артюхов В.Г.

**ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж 364006
E-mail: holyavka@rambler.ru**

Исследования в области получения высокостабильных гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов приобретают все большую

актуальность. При промышленном масштабировании каталитических процессов гетерогенный режим их проведения является экономически более выгодным по сравнению с гомогенными технологиями, так как при этом значительно упрощается и удешевляется весь производственный цикл. Особое значение в настоящее время имеют исследования по иммобилизации инулиназы (КФ 3.2.1.7), которая может применяться в производстве углеводных продуктов диетического назначения. Исследования иммобилизованной инулиназы в ближайшие годы, возможно, помогут расширить наши представления о процессе ферментативного гидролиза полисахаридов и усовершенствовать существующие технологические пути получения фруктозы.

Цель нашего исследования заключалась в получении гетерогенного ферментного препарата на основе иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus*, предназначенного для получения углеводов диетического назначения из экстрактов инулинсодержащих растений. Для решения поставленной задачи нам было необходимо осуществить поиск наиболее перспективного носителя для иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus*, изучить физико-химические и кинетические свойства гетерогенных препаратов инулиназы, определить более перспективные растения для получения из их экстрактов фруктозы в промышленных условиях.

Объектами исследования были фракции белка, выделенные из клубней *Helianthus tuberosus*, проявляющие инулиназную активность. В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP biomedical. Содержание белка в пробах определяли методом Лоури, каталитическую активность фермента измеряли спектрофотометрически резорциновым методом [1]. Подготовку ионитов к иммобилизации осуществляли путем 4-кратной кислотнo-щелочной обработки, иммобилизацию фермента проводили по стандартной методике [2].

Нами был предложен адсорбционный способ иммобилизации инулиназы на ряде синтетических катионитов и анионитов, позволяющий сохранить до 80,4 % (при связывании с матрицей КУ-2) активности нативного фермента. Показано, что ряд ионообменных смол (АВ-17-2П, КУ-2, КУ-2-8чС, АВ-16-ГС, АМ 21А, ЭДЭ-10П, АН-12П, ИМАС-НР, PUROLITE) и волокон (ВИОН КН-1, ВИОН АН-1 и КОПАН-90) может применяться в качестве носителей для адсорбции инулиназы.

В ходе проведенных исследований нами были подобраны оптимальные условия функционирования гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы из *Helianthus tuberosus*, иммобилизованной на синтетических ионообменных смолах КУ-2, КУ-2-8чС и АВ-17-2П, исследованы их физико-химические свойства и кинетические аспекты реакции гидролиза инулина. Установлено, что перспективными условиями для промышленного применения фермента, иммобилизованного на всех исследуемых носителях, являются температура 60-70 °С и рН от 5 до 7. Показано, что высокое сродство к субстрату проявляет фермент, адсорбированный на катионите КУ-2. Продемонстрировано, что при 10-кратном использовании гетерогенных образцов на основе КУ-2, КУ-2-8чС и АВ-17-2П их активность не изменялась.

Новые технологии комплексной переработки экстрактов растений могут дать мощный импульс развитию различных областей биотехнологии, поэтому мы проанализировали ряд методик получения инулина из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Экстракцию инулина проводили в интервале температур от 50 до 100 °С в периодическом и непрерывном режиме модельного технологического процесса. При 90 °С и выше происходил температурный гидролиз инулина, что в наших исследованиях было нежелательно. Использование противоточного метода оказалось слишком трудоемким и нецелесообразным, так как к заметному повышению активности иммобилизованной инулиназы это не приводило. Рассмотрев данные других авторов

[3-5] и учитывая результаты, полученные в нашей лаборатории, мы выбрали для работы изложенную ниже методику.

Предварительно высушенный растительный материал тщательно промывали и измельчали, затем добавляли дистиллированную воду в соотношении 1 часть растительной биомассы и 9 частей воды. Далее препарат инкубировали при 70 °С в течение 45 мин, затем его фильтровали для удаления балластных веществ. Эту схему мы применяли для получения экстрактов из топинамбура (*Helianthus tuberosus*), цикория (*Cichorium intybus*), девясила (*Inula helenium*), лопуха (*Arctium lappa*), чеснока (*Allium sativum*), одуванчика (*Taraxacum officinale*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), лука (*Allium cepa*). Эти растения характеризуются высоким содержанием сахаров, локализованных в нижней части стебля, корнях, клубнях или луковицах.

Полученные нами результаты показывают, что иммобилизованный на КУ-2 препарат инулиназы проявляет максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов клубней топинамбура, корней цикория и девясила, которые, по этой причине, являются перспективными для промышленного использования с целью получения фруктозы ферментативным путем.

Интересно, что активность гетерогенного биокатализатора по отношению к экстрактам из клубней топинамбура и корней девясила и цикория была примерно в 2 раза выше, чем в реакции с чистым инулином. Растительные материалы, в частности, топинамбур, георгин, цикорий, сауссурия и спаржа уже описывались в литературе как перспективное сырье для производства сиропа с высоким содержанием фруктозы. В ряде работ показано, что накопление редуцирующих сахаров идет интенсивнее при ферментативном гидролизе экстрактов топинамбура и спаржи, чем при расщеплении чистого инулина. Это явление связано с тем фактом, что в растениях вместе с инулином всегда встречаются родственные углеводы: псевдоинулин, инуленин, леулин, гелиантенин, синистрин, иризин, которые, очевидно, гидролизуются инулиназой с большей скоростью. Опубликованы результаты исследования активности препарата инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* YS-1 при гидролизе чистого инулина и экстракта *Asparagus racemosus* в реакторе периодического действия [6].

Литература.

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. 429 с.
2. Горбунов Н.В., Полянский Н.Г. // Журнал физической химии. 1978. Т. 52, № 5. С. 1259–1262.
3. Абелян В.А., Манукян Л.С., Африкян Э.Г. // Прикладная биохимия и микробиология. 1998. Т. 34, № 5. С. 544–548.
4. Вагабов М.В., Керимова З.М., Мальцева Т.В., Корнеева О.С. // Биотехнология. 2005. № 1. С. 34–36.
5. Чепурной И.П. // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: сб. науч. тр. Москва, Изд-во РАЕН-МААНОИ, 2001. Вып. 5. С. 88–93.
6. Singh R.S., Dhaliwal R., Puri M. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 34, № 10. P. 649–655.

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПЕРСИКА

Худякова Т.И.¹, Тимербаев В.Р.^{2,3}, Долгов С.В.^{1,2,3}

¹Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, 142290

E-mail: tatya38@yandex.ru

²ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, 142290

³ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва, 127550

Персик (*Prunus persica* L. Batsch) является одной из наиболее важных коммерческих косточковых культур и занимает первое место в производстве плодов в мире. Однако в настоящее время наблюдается снижение урожайности персика в связи с распространением ряда опасных вирусных и грибных заболеваний. Среди вирусных заболеваний наиболее опасным является вирус оспы сливы (Plum Pox Virus, PPV), возбудитель болезни Шарки. PPV поражает все части растения: листья, кору дерева, плоды и косточки, вызывает преждевременное опадение плодов. Современные методы генной инженерии дают возможность значительно ускорить процессы создания устойчивых высокопродуктивных сортов персика. Более того в настоящее время с помощью методов генной инженерии можно получать генетически модифицированные растения, которые не содержат нежелательные чужеродные последовательности ДНК (например, гены селективных и репортерных маркеров). Для косточковых культур это очень важно, поскольку они потребляются в свежем виде и используются в производстве сухофруктов, консервов, джемов, сиропов, соков.

Основным препятствием для получения безмаркерных трансгенных растений персика является отсутствие эффективного протокола регенерации из соматических тканей и метода генетической трансформации. В нашей лаборатории на основе векторной системы рMF2 (PRI, Нидерланды) созданы векторные конструкции с репортерным геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) и агробактериальными генами синтеза цитокининов (*ipt*) для повышения регенерационной способности трансформированных тканей. Векторная система рMF2 также обеспечивает удаление маркерных генов путем сайт-специфической рекомбинации.

Проведены эксперименты по подбору оптимальных условий регенерации листовых эксплантов персика сорта “Nemaguard” (состав питательной среды, тип и концентрации фитогормонов). Провели агробактериальную трансформацию листовых эксплантов персика векторными конструкциями на основе рMF2. Отбор трансгенной ткани проводили в течение 6-8 недель путем прижизненной детекции экспрессии гена *gfp* на селективной среде, содержащей гигромицин в концентрации 3 мг/л. В настоящее время получены каллусные ткани успешно пролиферирующие на безгормональных средах. В настоящее время работа в направлении разработки эффективных протоколов регенерации и трансформации из листовых эксплантов персика продолжается.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РЕЛИКТОВОГО ЭНДЕМИКА *LIGULARIA GLAUCA* (L.) J. HOFFM

Чебан Л.Н., Григор М.В., Шелифост А.Е.

*Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича,
кафедра биохимии и биотехнологии, Черновцы 58012, E-mail: larisa.cheban@mail.ru*

Растение представляет собой сложный организм, способный синтезировать целый комплекс органических веществ различной химической природы. Одни из них проявляют сильное фармакологическое действие, другие – не проявляют выраженного лечебного действия, но, тем не менее, имеют важное значение для лечебного процесса, поскольку дополняют, а иногда и усиливают влияние основного действующего вещества. В то же время природные запасы растительного сырья различных видов существенно различаются. Исходя из проведенного учеными Королевского ботанического сада в Кью совместно с Музеем естественной истории в Лондоне и Международным союзом охраны природы глобального анализа, каждое пятое уникальное растение может навсегда исчезнуть с лица Земли. Это может привести к безвозвратной потере уникальных генов.

Для размножения редких и исчезающих видов растений, произрастающих в естественных фитоценозах, в последнее время стали широко использоваться методы клонирования *in vitro*. Данная техника позволяет не только нарабатывать достаточное количество растительного сырья с целью последующей переработки, но и получать растительный материал для осуществления последующей реинтродукции в природную среду обитания. Эти методы являются сегодня также важной составляющей при разработке эффективных способов сохранения генофонда дикорастущих и культурных растений путем создания коллекции пересадочных культур и криобанков.

В официальной и народной медицине широко используются представители семейства *Asteraceae*. В основе этого лежит способность растений синтезировать и накапливать в достаточно больших количествах разнообразные биологически активные вещества. На сегодня установлено, что по аналогии с их разнообразием уже изученных видов, можно предвидеть способность накапливать близкие по химическому составу соединения и у других, еще не изученных, представителей этого же рода.

Достаточно разнообразным спектром важных вторичных метаболитов характеризуются растения рода *Ligularia* Cass., среди которых особого внимания заслуживают алкалоиды, монотерпены, сесквитерпеноиды и различные полифенолы. Именно их присутствием, прежде всего, объясняется использование представителей данного рода в народной медицине. В то же время далеко не все его виды на сегодня детально изучены. Так, особого внимания заслуживает *L. glauca* (L.) J. Hoffm – реликтовый эндемик, характеризующийся критической численностью популяций, в связи с чем существует необходимость поиска новых популяций и ренатурализации вида. Данные по его размножению и разведению в условиях *in vitro* отсутствуют. Учитывая критическое состояние вида, химический состав его растительного сырья практически не изучен. В то же время в народной медицине с лечебной целью используются стебли, листья и цветы, то есть глубокое изучение данного растения является перспективным для фармакологии, что стало возможным благодаря использованию биотехнологических подходов. В связи с этим целью наших исследований является разработка метода микроклонального размножения реликтового эндемика *L. glauca*.

Одним из критических этапов клонального микроразмножения является этап введения в культуру. Часто его исход зависит от выбора материала, используемого в качестве первичного экспланта, а также непосредственно от условий стерилизации. С этой целью нами были использованы семена, собранные в естественных местах обитания. Перед стерилизацией их обрабатывали раствором детергента, промывали проточной водой, после чего замачивали в течение час в дистиллированной воде. Стерилизацию семян осуществляли в два этапа. Прежде всего, материал обрабатывали в течение 2 мин 96% этанолом, содержащим Tween 80, после этого их на 15 мин помещали в раствор гипохлорида натрия, обогащенного активным хлором (промышленный препарат «Белизна», ТУУ6–05743160.001–93) в разведении 1:4. В дальнейшем проводили трехкратную отмывку от стерилизующих агентов. В связи с тем, что при такой обработке происходило сильное окисление семян, отмывание от стерилизующих агентов осуществляли 0,025% раствором аскорбиновой кислоты.

Для получения первичных эксплантов стерильный материал высаживали на безгормональную среду Мурасиге-Скуга. Было установлено, что период прорастания семян *L. glauca* составляет в среднем сорок дней. При использовании описанной схемы стерилизации удалось достичь прорастания 80% семян. Следует отметить, что из-за сильного окисления их тканей, вызываемого стерилизацией, питательная среда была дополнена цистеином в концентрации 60 мг/л.

Культивирование проводили в климатической комнате (21±1 °С, относительной влажности воздуха 70 %, интенсивности освещения 2000–3000 лк и 16-часовым фотопериодом). Длительность пассажа составляла 28 дней.

В результате проведенных работ нами были разработаны условия введения исчезающего вида *L. glauca* в культуру *in vitro*. В дальнейшем полученные проростки переносили на питательную среду, содержащую ИУК и БАП, которая индуцировала в течение одного пассажа формирование конгломерата микропобегов.

АНАЛИЗ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ *IN SITU* ПРИГОДНОСТИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ТУ1-СОРІА ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО И ХМЕЛЯ ЯПОНСКОГО ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Яковин Н.А., Александров О.С., Карлов Г.И.

*Центр молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Москва,
ул. Тимирязевская, 49, E-mail: daiske3@gmail.com*

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L.) и хмель японский (*Humulus japonicus* Siebold & Zucc.) семейства *Cannabaceae* – близкородственные двудомные растения, имеющие, несмотря на это, различные системы половых хромосом, в связи с чем они являются интересными объектами для изучения генетики и эволюции пола у растений. Молекулярное маркирование этих видов является важной задачей как для поиска маркеров, локализованных на половых хромосомах, так и для поиска маркеров сцепленных с генами, участвующими в развитии пола и, в случае хмеля обыкновенного – селекционно важными признаками. Одним из перспективных типов ДНК маркеров, позволяющих охватывать весь геном, является применение маркеров, основанных на последовательностях ретротранспозонов. Наиболее распространенной методикой является SSAP (sequence-specific amplification polymorphism) – метод близкий к AFLP, позволяющий показать наличие сайтов интеграции отдельных транспозонов на

электрофоретическом профиле. Также применяется ряд методов, основанных на полимеразной цепной реакции, как, например, RBIP (retrotransposon-based insertion polymorphism), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism). Необходимым условием успешного создания системы ДНК маркеров на основе ретротранспозонов является равномерный охват этими транспозонами всего генома. Это легко проверить методом флуоресцентной гибридизации *in situ*.

В качестве растительного материала в работе использовали мужские и женские растения хмеля обыкновенного из коллекции ЦМБ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева и хмеля японского сорта «Самурай» (фирма «Гавриш»). ДНК выделяли из молодых листьев растений согласно методике Bernatsky and Tanksley (1986) с некоторыми модификациями. Для амплификации пула фрагментов гена обратной транскриптазы *Ty1-copia*-подобных ретротранспозонов размером около 260 п.н. применяли полимеразную цепную реакцию с использованием вырожденных праймеров: PR1 5'-ACNGCNTTYTNCAYGG-3' и PR2 5'-CARATGGARGTNAARAC-3'. FISH осуществляли по методике Karlov G.I. et al. (1999). Визуализацию сигнала осуществляли с использованием флуоресцентного микроскопа AxioZeiss Imager M1.

После проведения ПЦР на ДНК хмеля японского с вырожденными праймерами на фрагмент гена обратной транскриптазы *Ty1-copia*-подобных ретротранспозонов были получены продукты размером около 260 п.н. Анализ FISH сигнала на метафазных пластинках мужских растений показал, что зонды *Ty1-copia*-подобных ретротранспозонов относительно равномерно гибридизуются со всеми хромосомами как мужских, так и женских растений обоих видов хмеля. Подобное распределение говорит о пригодности суперсемейства ретротранспозонов *Ty1-copia* для создания на их основе систем ДНК маркеров, охватывающих весь геном.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, государственный контракт П1164.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТБОР ФОРМ ТОМАТА С ЗАДАННОЙ КОМБИНАЦИЕЙ ГЕНОВ (<i>nor/nor//og^c/og^c</i> и <i>nor⁺/nor⁺//og^c/og^c</i>) СРЕДИ ГИБРИДОВ F₂ МЕТОДОМ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА	5
Аджиева В.Ф., Некрашевич Н.А., Бабак О.Г., Мишин Л.А., Кильчевский А.В.	
ДНК-МАРКИРОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ МНОГОПОЧАТКОВОЙ КУКУРУЗЫ	7
Айшаева З.М., Алоева Б.А., Паритов А.Ю., Керефова М.К.	
МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ТРИТИКАЛЕ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	8
Акинина В.Н.	
РАЗРАБОТКА ОЛИГОНУКЕОТИДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТРАНСГЕННОГО МАТЕРИАЛА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ	9
Бакулина А.В.	
ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЯЧМЕНЯ НА СРЕДАХ С КАНАМИЦИНОМ И ЦЕФОТАКСИМОМ	11
Бакулина А.В., Широких И.Г.	
ЭФФЕКТИВНЫЙ ОТБОР И АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР	13
Бердичевец И.Н., Шаяхметова Д.М., Шимшилашвили Х.Р., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В.	
ОСОБЕННОСТИ ВАРИАБЕЛЬНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ СЕМЯДОЛЬНЫХ ЛИСТЬЕВ <i>LINUM USITATISSIMUM</i> ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ-В ОБЛУЧЕНИЯ	15
Берестяная А.Н.	
СКРЫТЫЙ СЕЛЕКЦИОННЫЙ ИНБРИДИНГ КАК ПОСЛЕДСТВИЕ УЗКОНАПРАВЛЕННОГО ОТБОРА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА	17
Букин Д.Ю., Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф., Хаблюк В.В.	
МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА КАК НОВАЯ КЛЕТОЧНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ВИРУСОЛОГИИ	19
Викторова Е.В., Шуляк А.Ф., Савченкова И.П.	
ТРАНСФОРМАЦИЯ ЯБЛОНИ ВЕКТОРОМ pMF1 С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ЦИСТЕННЫХ РАСТЕНИЙ	21
Власова А.А., Тимербаев В.Р., Долгов С.В.	
НАПРАВЛЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, В КЛЕТКИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ <i>IN VITRO</i>	22
Волкова И.М.	
ДИАГНОСТИКА ПАТОГЕНОВ ВИРУСНОГО И ВИРОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ РЕГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ МЕРИСТЕМНОЙ ТКАНИ	24
Вологин С.Г., Назмиева Р.Р., Сташевски З.	

СОЗДАНИЕ SCAR-МАРКЕРОВ ГЕНОМОВ <i>SOLANUM</i> СЕКЦИИ <i>PETOTA</i> Волошина П.В., Дробязина П.Е.	26
СЕРИЯ МОДУЛЬНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С ЦЕЛЬЮ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОЙ И ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ Вячеславова А.О., Шимшилашвили Х.Р., Бердичевец И.Н., Тюрин А.А., Мустафаев О., Голденкова-Павлова И.В.	27
КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТА БЕЛКА АНИОННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ ПШЕНИЦЫ (<i>TRITICUM AESTIVUM</i>) Гильмутдинов Р.А., Машков О.И., Максимов И.В.	28
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РЯСКИ МАЛОЙ (<i>LEMNA MINOR L.</i>) Гиляшова Н.В., Тарасенко И.В., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В.	29
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ В СЕЛЕКЦИИ РИСА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ Дубина Е.В., Коркина Н.Н., Трофимова И.А., Солонина Т.В.	30
ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЗЦОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПО НАЛИЧИЮ ЛОКУСА <i>FHB1</i> И УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ КОЛОСА Дудников М.В., Шанин М.С., Васильев А.В., Дивашук М.Г.	32
РОЛЬ АУКСИНОВ И ИЗОПРЕННОИДОВ В РАЗВИТИИ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА Ермошин А.А., Кондратков П.В., Алексеева В.В., Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И.	34
РАЗРАБОТКА МЕТОДА РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ФОРМОСПЕЦИФИЧНОСТИ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (<i>QUERCUS ROBUR</i>) Карпеченко Н.А., Землянухина О.А., Карпеченко И.Ю., Вепринцев В.Н., Кондратьева А.М.	35
РАСТЕНИЯ ЦИКОРИЯ И ЭНДИВИЯ КАК БИОФАБРИКИ ДЛЯ СИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНА Кваско Е. Ю., Матвеева Н. А., Шаховский А. М.	37
СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОВ <i>ИХ</i> НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ <i>THINOPYRUM</i>, <i>DASYPYRUM</i> И <i>PSEUDOROEGNERIA</i> Климушина М.В., Дивашук М.Г., Карлов Г.И.	39
СОЗДАНИЕ УСТОЙЧИВЫХ К БОЛЕЗНЯМ ИСХОДНЫХ ФОРМ ТОМАТА (<i>Lycopersicon esculentum</i>) В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> Ковбасенко Р.В.	41
ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ СРЕДИ КОЛЛЕКЦИИ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ Колупаева А.Д., Дивашук М.Г., Карлов Г.И., Соловьев А.А.	43
АДАПТАЦИЯ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОМОВ ПЫРЕЯ ПОНТИЙСКОГО И ДАЗИПИРУМА МОХНАТОГО Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И.	44

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА КОЛЛАГЕНЕ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕАКТОРЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ Макарова Е.Л., Ковалева Т.А., Петракова И.	46
ИЗУЧЕНИЕ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ α -ГАРПИНИНОВ – НОВОГО СЕМЕЙСТВА ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ Опарин П.Б., Василевский А.А., Беркут А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А.	48
ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИПЛОИДНЫХ ФОРМ САДОВЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ Папихин Р.В.	48
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР Пикунова А.В., Князев С.Д., Павловская Н.Е.	51
ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В ОБРАБОТАННЫХ ЭЛИСИТОРАМИ РАСТЕНИЯХ <i>Allium cepa</i> В ОТВЕТ НА ИНФИЦИРОВАНИЕ НЕКРОТРОФНЫМИ ГРИБАМИ Поляковский С.А.	53
АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА СЛАДКОГО БЕЛКА ТАУМАТИНА II ИЗ <i>THAUMATOCOCCLUS DANIELLII</i> В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА Пушин А.С., Фирсов А.П., Долгов С.В.	55
ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ СТЕРЛЯДИ (<i>Acipenser ruthenus</i> L.) Резникова-Галашевич И.С., Шелев В.В., Спиридонов В.Г., Андриющенко А.И.	57
ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА КУНЬИХ (<i>MUSTELIDAE</i>) МЕТОДОМ ЧАСТИЧНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ИЗ ОБРАЗЦОВ ЭКСКРЕМЕНТОВ Сенина Д.А., Колобова О.С., Поддубная Н.Я., Малюченко О.П., Монахова Ю.А.	58
ДНК-МАРКИРОВАНИЕ ЛОКУСОВ НЕКОТОРЫХ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ СЪЕДОБНОГО КУЛЬТИВИРУЕМОГО ГРИБА <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> (FR.) KUMM. Сиволапова А.Б., Шнырева А.В., Сонненберг А., Барс И.	59
ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ОЗДОРОВЛЕНИЯ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ Слободян Е.А., Олейник Т.Н., Слободян С.О.	61
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ТВЕРДОЙ И МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ Соколов Р.Н., Мирошниченко Д.Н., Долгов С.В.	62
ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ В ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКАХ ДНК ПОД ВЛИЯНИЕМ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО УФ-С ОБЛУЧЕНИЯ Соколова Д.О.	63

СКРИНИНГ СЕЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ ПШЕНИЦЫ НА НАЛИЧИЕ АЛЛЕЛЯ A1 ЛОКУСА GLU-B1	64
Степаненко А.И., Моргун Б.В., Починок В.М.	
ГАПЛОПРОДУКЦИЯ В СИСТЕМЕ КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ КАРТОФЕЛЯ	65
Тимошенко И.П., Олейник Т.Н., Игнатова С.А.	
АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА В ХРИЗАНТЕМ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ	67
Титова С.М., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В.	
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОКУСОВ FRIGIDA В ГЕНОМАХ BRASSICA A И С	68
Фадина О.А., Панкин А.А.	
ДНК-МАРКЕРЫ ГЕНОМА СОРТОТИПОВ СВЕКЛЫ КОРНЕПЛОДНОЙ	70
Федорин Д.Н., Федулова Т.П.	
ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>IN VITRO WOLFFIA ARRHIZA</i> КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБЪЕКТА ДЛЯ БИОФАРМИНГА	72
Хватков П.А., Чернобровкина М.А., Кочелабов Р.А., Окунева А.С., Долгов С.В.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ КАК СУБСТРАТОВ ДЛЯ ГЕТЕРОГЕННОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛИНАЗЫ	73
Холявка М.Г., Ковалева Т.А., Волкова С.А., Хрупина Е.А., Артюхов В.Г.	
РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПЕРСИКА	76
Худякова Т.И., Тимербаев В.Р., Долгов С.В.	
ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i> РЕЛИКТОВОГО ЭНДЕМИКА <i>LIGULARIA GLAUCA</i> (L.) J. HOFFM	77
Чебан Л.Н., Григор М.В., Шелифост А.Е.	
АНАЛИЗ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ <i>IN SITU</i> ПРИГОДНОСТИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ТУ1-SOPIA ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО И ХМЕЛЯ ЯПОНСКОГО ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ	78
Яковин Н.А., Александров О.С., Карлов Г.И.	

Отпечатано в печатном салоне «Сервис Принт».
г. Москва, ул. Прянишникова, д. 31А.
Тираж 100 экз.