

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
НАУК**

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

ХIII МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

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

10 апреля 2013 г.

Москва - 2013

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
НАУК**

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

**XIII МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

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

10 апреля 2013 г.

***Конференция посвящается памяти
академика РАСХН
Георгия Сергеевича
МУРОМЦЕВА***

Москва - 2013

КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ ТРИТИКАЛЕ *IN VITRO* ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА В СЕЛЕКЦИИ

Акинина В.Н.

*ГНУ НИИСХ Юго-Востока Россельхозакадемии, Саратов-10, 410010,
e-mail: kostina_vichka@mail.ru*

Одним из узких методов традиционной селекции растений является необходимость выращивания большого числа гибридных поколений для получения гомозиготных форм, поиск и отбор среди них элитных растений для будущих сортов. Использование гаплоидов приводит к сокращению сроков селекционного процесса (в среднем на 4-5 лет) и повышает его эффективность. Массовое получение гаплоидных растений стало возможным благодаря развитию различных методов культуры тканей *in vitro*. Одним из методов массового получения гаплоидов является культура пыльников *in vitro*. Особую роль этот метод играет у отдаленных гибридов в связи с длительностью формообразовательного процесса.

В нашей работе мы пользовались методом культуры пыльников. В качестве исходного материала для получения гаплоидов служили растения F₃ двух гибридных комбинаций: (линия 39, озимая мягкая пшеница х АД1) х Корнет (гибрид 1) и (линия 39, озимая мягкая пшеница х АД1) х Кентавр (гибрид 2). При этом АД1 является амфидиплоидом от скрещивания озимой твердой пшеницы Леукурум 1701h389 с рожью Саратовская 6. Донорные растения выращивали в поле.

Донорные растения срезали на стадии поздней вакуолизированной микроспоры. Пыльники инокулировали на индукционной питательной среде С17 с добавлением сахарозы в концентрации 9%, 2,4-Д 2 мг/л и кинетина 0,5 мг/л. Для регенерации растений полученные новообразования пересаживали на питательной среде Р-8 с сахарозой 3%, ИУК (1 мг/л) и кинетином (0,5 мг/л).

Эффективность гаплопродукции оценивали по следующим показателям: выход эмбриогенных пыльников и новообразований, общая регенерация растений и соотношение зеленых и альбиносных растений.

Статистически достоверные различия обнаружены на этапе формирования эмбриогенных пыльников и новообразований. Гибрид 2 достоверно превышал гибрид 1 как по первому показателю (21,6% и 13,4%), так и второму показателю (42% и 20,9% соответственно). На этапе регенерации растений статистически достоверных различий не обнаружено.

Было проанализировано соотношение зеленых и альбиносных растений, полученных в опыте (таблица 2). У гибрида 1 выход зеленых растений был достоверно выше (33,6%), чем у гибрида 2 (18,9%). Всего в опыте было получено 312 растений, из которых 77 зеленые и 235 альбиносных. Наши результаты подтверждают установленные ранее факты о том, что высокий процент альбинизма в культуре пыльников тритикале является одним из наиболее узких мест этой гаплоидной биотехнологии.

Исходя из полученных данных можно заключить, что основным сдерживающим фактором в культуре пыльников тритикале является альбинизм значительной части регенерантов. Соотношение зеленых и альбиносных растений составляет 1:3.

В наших исследованиях метод микроклонального размножения был применен для сохранения и размножения стерильных рецiproкных 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. Наиболее подходящими эксплантами, формирующими эмбриогенный активный каллус у злаков являются незрелые и зрелые зародыши, которые удобны для работы в течение всего года. Для микроклонального размножения 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. Наши результаты согласуются с данными других исследователей, которые установили, что индукция каллуса и регенерация зеленых растений имеют разный генетический контроль. Всего в опыте было получено 116 растений (таблица). Следует отметить, что при наличии существенных отличий между генотипами по отдельным этапам микроклонального размножения, каждый из них удалось размножить в культуре.

Таблица. Эффективность микроклонального размножения тритикале в культуре *in vitro* сегментов молодых колосьев

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*
HCP ₀₅			33,5			20,0

Примечание: * - гибриды: 399 – Прикумчанка/Красноколоска, 403 – Гелиос/Красноколоска, ** - гаплоиды: ПТГ озимая мягкая пшеница Л15/Белоцерковская 51//Л15/Мионовская 25 х АД гекса (Леукурум 1701h389/Саратовская 6).

Использования методы клеточной биотехнологии за 1 год получены гомозиготные линии в культуре пыльников межродового гибрида тритикале х мягкая

пшеница. Разработана технология микрклонального размножение, позволяющая сохранить и размножить уникальные генотипы.

**ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА X ВИРУСА ШАЛОТА (РОД *Alexivirus*),
ПЕРСИСТИРУЮЩЕГО В ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАЕМЫХ РАСТЕНИЯХ
Allium cepa L. var. *aggregatum* G. Don. В УСЛОВИЯХ МОНОИНФЕКЦИИ**

Архипов А.В.

***ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Россия,
127550, Москва ул. Тимирязевская, д.42, e-mail: batler51@yandex.ru***

“Русский” изолят X вируса шалота (ХВШ) был выделен из растений *Allium cepa* L. var. *aggregatum* G. Don. (селекционный образец N803, ВНИИССОК), инокулированных экстрактом растений шалота монгольского сорта Тагар, инфицированных потивирусом желтой карликовости лука (ВЖКЛ) в комплексе с неидентифицированным на тот момент вирусом. Методами иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга и иммуноэлектронной микроскопии было доказано, что гибкие вирусные частицы, накапливающиеся в значительных количествах в растениях шалота N803, не принадлежат ВЖКЛ, а представляют собой вирионы нового, неизвестного ранее вируса, получившего название X вирус шалота и ставшего прототипом нового рода фитовирусов - *Alexivirus*. В дальнейшем ХВШ поддерживали в вегетативно размножаемых растениях N803, резистентных к ВЖКЛ и не инфицированных карлавирусами, т.е. в условиях моноинфекции. Полная нуклеотидная последовательность геномной РНК ХВШ была определена в нашей Лаборатории около двадцати лет назад, и задачей настоящей работы был анализ тех изменений, которые произошли в вирусном геноме в процессе длительной адаптации к условиям репродукции в новом хозяине. С этой целью было проведено повторное полное секвенирование геномной РНК ХВШ и осуществлен сравнительный компьютерный анализ первоначальной и новой последовательностей.

Проведенное с помощью программы ClustalW2 сравнение двух последовательностей показало, что они идентичны на 92,6%. Для анализа распределения выявленных замен в последовательности генома ХВШ была использована программа PLOTCON, с помощью которой был построен график сходства, основанный на выравнивании новой и ранее опубликованной последовательностей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что различные районы генома ХВШ проявляют разную степень сходства нуклеотидных последовательностей родительского и дочернего изолятов ХВШ.

Эти данные указывают на то, что большая часть наблюдаемых различий между геномными последовательностями родительского и дочернего изолятов ХВШ представляет собой результат изменений, произошедших в период персистенции вируса в вегетативно размножаемых растениях шалота N803.

Результаты попарного сравнения аминокислотных последовательностей кодируемых белков позволили оценить величину эволюционной дистанции между родительским и дочерним изолятами русского штамма ХВШ.

В частности, уровень сходства аминокислотных последовательностей капсидных белков двух изолятов составляет менее 97%, что сравнимо с уровнем сходства между капсидными белками различных штаммов ХВШ.

Что могло привести к фиксации столь значительных изменений? В природных условиях аллелюксивирусы часто существуют в форме сложных гетерологических комплексов с поти- и карлавирусами, и компоненты подобных комплексов могут взаимно комплементировать такие вирусные функции как межклеточный транспорт или подавление защитного ответа растения-хозяина. В условиях моновирусной инфекции необходимость оптимизации этих функций могла стать причиной повышения уровня компенсирующих изменений в геноме ХВШ.

ДЕТЕКЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННО ВАЖНЫХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (ПЛАТФОРМА 454)

**Беленикин М.С.¹, Криницына А.А.², Шмыгля И.В.³, Дарий М.В.¹, Дмитриев А.А.¹,
Кудрявцева А.В.¹, Мельникова Н.В.¹, Сперанская А.С.²**

¹*ФГБУН ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

²*МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия*

³*ГНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха Россельхозакадемии, Московская область, Россия*

E-mail: molecular.modeler@gmail.com

Гены защитных белков растений определяют устойчивость растений к патогенам и абиотическому стрессу. Исследование полиморфизма этих генов имеет большое практическое значение, поскольку позволяет идентифицировать новые гены, способные придать растениям повышенную устойчивость к патогенам и абиотическому стрессу посредством создания генно-модифицированных растений либо повышения уровня экспрессии собственных генов с идентифицированными требуемыми свойствами.

Однако многие защитные гены растений являются множественными и этот факт, наряду с тем, что культурные растения, как правило, высокоплоидны, приводит к значительным сложностям в изучении их полиморфизма, поскольку определить последовательности всех генов, относящихся к какому-либо семейству, в геноме изучаемого растения традиционными способами, включающими в себя ПЦР, клонирование либо создание ВАС-клонов с последующим секвенированием по Сэнгеру, в короткие сроки достаточно сложно и дорого.

Современные методы высокопроизводительного секвенирования позволяют идентифицировать полиморфизмы быстрее и дешевле. Это приводит к значительному увеличению исследований по выявлению полиморфизмов в различных организмах с помощью пиросеквенирования на платформе 454, что хорошо видно по увеличению числа публикаций (см. базу данных NCBI). Исследование полиморфизмов ведется с помощью протокола 454 GS Junior для ампликонов. Однако существующие протоколы платформы 454 GS Junior (Roche) и предоставляемое данной компанией сопутствующее биоинформатическое программное обеспечение оптимизированы для работы с ампликонами длиной от 200 до 600 п.н., что недостаточно при работе с множественными генами, длина которых превышает 600 п.н. и создает значительные трудности при обработке результатов секвенирования.

Целью настоящей работы являлась разработка способа секвенирования множественных генов растений длиной 650-800 п.н. с помощью протокола 454 GS Junior для секвенирования ампликонов.

В качестве модельного объекта нами были использованы растения семейства пасленовых, к которому относится ряд активно культивируемых видов, таких как картофель, томаты, табак, перец и другие. К тому же семейству относится ряд видов, используемых в медицине, а также некоторые виды-космополиты, такие как *Solanum nigrum*.

В качестве модельных генов нами были выбраны множественные гены, кодирующие белки, относящиеся к семействам ингибиторов протеиназ типа Кунитца (KPI) и картофельного ингибитора II (PI-II). Гены *KPI* не содержат интронов, размер их кодирующей области около 650 п.н. Гены *PI-II*, найденные в пасленовых, различаются между собой как числом составляющих их доменов, так и по наличию/отсутствию интронов.

Была собрана коллекция 170 образцов ДНК из 18 видов рода *Solanum*, 3 видов рода *Nicotiana*, 2 видов рода *Datura*, 1 вида *Hyoscyamus*, 2 видов рода *Physalis*, при этом 33 образца представляли собой сорта культурного картофеля различающихся по устойчивости к фитофторозу. Коллекция была протестирована на возможность получения ПЦР-продукта с использованием праймеров, комплементарных областям, кодирующим N- и C-концевые последовательности генов *KPI-A* [D17331], *KPI-B* [AF492358] и *PI-II* [X03778.1]. Было отобрано по 26 давших при тестировании положительный результат образцов. Пробоподготовка образцов проводилась с помощью двустадийной ПЦР. Секвенирование осуществлялось на приборе GS Junior (1/3 запуска, средняя длина прочтения 500 п.н.). Максимальное количество полученных ридов на образец составило 450.

Нами был разработан способ биоинформатического анализа полученных данных. В результате проведенного анализа нами были установлены последовательности ряда новых генов для исследованных образцов, что показало применимость технологии секвенирования на GS Junior для анализа полиморфизма множественных генов длиной более 700 п.н.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований Президиума Российской академии наук «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», подпрограмма "Динамика и сохранение генофондов", 2012 г.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ *atSPO11-1* И *scSPO11*

Белоцерковская Е.П., Милюкова Н.А., Комахина В.В.

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Россия,

127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42

Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А.

Тимирязева, Россия, 127550, Москва

E-mail: recombination@iab.ac.ru

Современная селекция предполагает использование в гибридизации различных форм и видов растений, являющихся донорами новых хозяйственно-ценных генов. Источником новых комбинаций генов в потомстве гибридов является мейотическая рекомбинация, включающая, в том числе, обмены между гомологичными и гомеологичными хромосомами. Однако кроссинговер между хромосомами разных видов является генетически детерминированным процессом, в нормальных условиях

ограничивающим множественные обмены между ними. Поэтому актуальными являются исследования, направленные на изучение и использование в селекции растений с изменёнными параметрами мейотической рекомбинации. Такими свойствами могут обладать растения, экспрессирующие эукариотические гены *SPO11*, продукты которых в мейозе у различных организмов вызывают двухцепочечные разрывы ДНК и запускают процесс мейотической рекомбинации.

В исследовании использованы трансгенные гибриды томата F_1 -scSPO11 и F_1 -atSPO11-1 F_1 , созданные в 2010 г. от скрещивания первичных трансформантов, экспрессирующих гены *scSPO11* или *atSPO11-1*, с маркерной формой томата Мо938. Предварительно из гибридов F_1 -scSPO11 и F_1 -atSPO11-1 F_1 были отобраны растения, имеющие в геноме одну копию целевого гена *scSPO11* или *atSPO11-1*, а также нетрансгенные растения, возникшие в результате расщепления, обозначенные как контроль. Были получены семена F_2 от самоопыления трансгенных и контрольных гибридов.

Цель данной работы состояла в том, чтобы провести сравнительный анализ частоты мейотической рекомбинации у трансгенных гибридов томата, экспрессирующих ген *SPO11-1* из *Arabidopsis thaliana* (*atSPO11-1*) или ген *SPO11* из *Saccharomyces cerevisiae* (*scSPO11*).

Ранее для изучения кроссинговера у гибридов культурного томата были использованы популяции F_2 со всхожестью семян более 80 %, что позволило исключить влияние различий всхожести на наследование маркерных генов и кроссинговер между ними (Комахин и др., 2012). Поэтому первая задача данного исследования состояла в том, чтобы для изучения наследования в поколениях трансгенов *scSPO11* и *atSPO11-1*, маркерных генов второй хромосомы (*Wv-wv*, *D-d* и *Aw-aw*) и оценки частоты рекомбинации между ними, отобрать популяции F_2 со всхожестью более 80 % семян. Для этого семена F_2 проращивали в течение двух недель при температуре 27-28 °С. В результате было изучено более 60 независимых популяций F_2 общей численностью около 11 тысяч растений, полученных от самоопыления девяти трансгенных гибридов F_1 -scSPO11 и восьми трансгенных гибридов F_1 -atSPO11-1, а также шести контрольных гибридов F_1 . Было установлено, что 14 % популяций F_2 , полученных как от трансгенных гибридов томата F_1 -atSPO11-1, так и от контрольных растений F_1 , имели всхожесть менее 80 % семян. Среди популяций F_2 , полученных от трансгенных гибридов F_1 -scSPO11, около 20 % имели пониженную всхожесть семян, главным образом за счет потомства гибридов F_1 -scSPO11 № 11-10 и № 16-3, среди которого не было обнаружено ни одной популяции F_2 со всхожестью более 80 % семян. Низкая всхожесть семян в этих популяциях была обусловлена, либо соматональной изменчивостью у первичных трансформантов томата, на основе которых были получены гибриды F_1 -scSPO11 № 11-10 и № 16-3, либо инсерцией Т-ДНК в функционально значимые участки их генома. В потомстве других гибридов F_1 -scSPO11 всхожесть семян F_2 достоверно не отличалась от контроля. Потомство с низкой всхожестью семян F_2 было исключено из дальнейших экспериментов.

Все популяции F_2 с высокой всхожестью были высажены в почву и проанализированы по проявлению маркерных признаков. В настоящее время проводится сравнительный анализ наследования маркерных генов и определение частоты рекомбинации между ними.

ДИНАМИКА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА *Linum usitatissimum* НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ

Берестяная А.Н.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии, г. Киев, ул. Заболотного 148, E-mail: a.berestyanyaya@yandex.ru

Ионизирующее излучение воздействует на развитие живых систем, влияет на темпы онтогенеза, в частности, определяет момент инициации старения у монокарпических растений. Происходит это за счет активации процессов эпигеномной изменчивости. В условиях действия стрессового фактора изменяется функциональная активность генов растений, запускаются процессы эпигенетического молчания тех или иных элементов генома, и активации ранее молчащих генов. Целью нашего исследования было определение изменений паттерна метилирования генома вегетативных органов монокарпического растения *Linum usitatissimum* в зависимости от доз ионизирующего облучения и стадий онтогенеза.

Семена *Linum usitatissimum* облучали в широком диапазоне доз острого рентгеновского облучения. Растения выращивали в условиях вегетационного опыта. Объектом исследования служила ДНК, выделенная из корней проростков, а также из семядольных листьев на разных стадиях их онтогенеза и настоящих листьев нижнего яруса позднего вегетационного и раннего генеративного периода. Эпигеном исследовали методом рестрикционного анализа суммарной ДНК метилзависимыми рестриктазами HpaII, MspI. Каждый из образцов ДНК в количестве 1 мкг подвергали гидролизу в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 ед. акт. метилзависимой рестриктазы в реакционном буфере, рекомендованном производителем, при температуре 37⁰С в течение 2 ч. Продукты рестрикции анализировали в 1,7% агарозном геле.

Было установлено, что в корнях проростков *Linum usitatissimum* самый высокий уровень метилирования по сайтам узнавания рестриктазы HpaII. В побегах того же возраста идентифицировано меньше модифицированных сайтов. Аналогичный уровень модификации присущ семядольным листьям. Но в ходе их онтогенеза в стареющих семядольных листьях происходит снижение числа модифицированных HpaII-сайтов. В настоящих листьях нижнего яруса в конце вегетационной фазы уровень метилирования выше, чем в семядольных листьях. В процессе старения листьев нижнего яруса происходит снижение метилирования, запускается другой эпигеном.

Увеличение числа метилированных HpaII-сайтов в корнях и листьях начальной стадии онтогенеза наблюдался в образцах, выращенных из облученных семян. Как показывают наши предыдущие опыты, транскрибируемая часть генома более чувствительна, чем сателлитная, к действию радиации. По мере старения вегетативных органов растения происходило снижение метилирования HpaII-сайтов в облученных пробах за счет механизмов возрастного гипометилирования.

Экспериментальные данные свидетельствуют о различии профилей метилирования ДНК разных вегетативных органов *Linum usitatissimum* в процессе онтогенеза. Облучение семян дозами острого рентгеновского облучения вызвало процессы дополнительного метилирования в корнях проростков и семядольных листьев на начальных стадиях онтогенеза. Повышение числа сайтов узнавания метилчувствительных рестриктаз носило временный характер и нивелировалось на более поздних стадиях развития растений, что объяснимо процессами гипометилирования, происходящими в геноме стареющих клеток. Это свидетельствует

о способности эпигенома изменяться под действием повреждающих факторов внешней среды и внутренних деградиционных процессов. Хотя особенности изменения эпигенома в процессе старения тканей и органов *Linum usitatissimum* еще не выяснены полностью, анализ дифференциального метилирования ДНК на разных стадиях онтогенеза растения под влиянием такого стрессового фактора, как радиация, может привести к более точному пониманию механизмов регуляции старения и поможет ответить на вопрос о том, какая из компонент, средовая или генетическая вносит больший вклад в процессы возрастной деградации.

Список использованной литературы

1. Benhattar J., Clement G. Methylation-sensitive. Single-strand conformation analysis: a rapid method to screen for and analyze DNA methylation. *Methods // Mol. Biol.* – 2004. – 287. – P. 181-193.
2. Guo W.L., Wu R., Zhang Y.F., et.al. Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. // *Plant Cell Rep.* - 2007. – 26, N8. - P. 1297-1307.
3. Кузнецова Е.Б., Стрельников В.В. Методы анализа метилирования ДНК // *Медицинская генетика.* - 2006. - 11. - С. 3-11.
4. Берестяная А.Н. Влияние УФ-В облучения на изменение статуса метилирования ДНК стареющих семядольных листьев *Linum usitatissimum* // *Теоретические и практические аспекты развития современной науки.* – 2012. – 3. – С. 48-53.
5. Viswanathan C., Zhu J. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants // *Sci China Ser C: Life Sci.* – 2009. – 52, N4. – P. 331-343.
6. Kalisz S., Purugganan M. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution // *Trends in Ecology and Evolution.* – 2004. – 19. – P. 309–314.
7. Kapazoglou A., Tsiftaris A. Epigenetic Chromatin Regulators as Mediators of Abiotic Stress Responses in Cereals // *Agricultural and Biological Sciences.* – 2011. – 428.p
8. Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA Methylation in Plants. - Nova Biomedical Books, Nova Science Publishers, New York. – 2011. – 152 p.

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОМА ВИРУСА МИКСОМЫ КРОЛИКОВ

Бурмакина Г.С., Цыбанов С.Ж., Луницин А.В.

**Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук, г. Покров 601120
E-mail: lila5757@yandex.ru**

Миксоматоз – остропротекающая, высококонтагиозная вирусная болезнь кроликов, которая характеризуется воспалением слизистых оболочек и появлением студенистых отеков в области головы, ануса, гениталий и кожи. Летальность может достигать 70-80 %. Возбудителем заболевания является вирус семейства *Poxviridae*, рода *Leporipoxvirus*, геном которого представлен линейной двухцепочечной ДНК.

Несмотря на наличие эффективных вакцин, в России ежегодно регистрируют вспышки данного заболевания. Диагностика миксоматоза в нашей стране основана на выявлении характерных клинических признаков болезни и гистологическим исследованиям пораженных участков. Отсутствие в России доступных средств

выявления возбудителя обуславливает необходимость разработки новых методов, позволяющих идентифицировать вирус миксомы кроликов.

В настоящее время при вспышках миксоматоза зачастую отмечают снижение летальности до 20-30 % и отсутствие клинических признаков. Такое течение болезни осложняет проведение диагностических исследований и приводит к широкому распространению инфекции.

Целью данной работы является создание ПЦР тест-системы для идентификации генома вируса миксомы кроликов, позволяющей выявлять возбудителя болезни в пробах патологического материала и дифференцировать его от близкородственных вирусов.

Материалом для исследований служили пробы органов и кровь, отобранные на разные сроки после экспериментального заражения животных вирусом миксомы кроликов (штаммы МР, изолят Хабаровск-09). В работе также использовали полевой материал, со вспышек миксоматоза в России с 2009 по 2012 гг. (Хабаровский край, Смоленская, Ивановская и Московская области), аттенуированные вакцинные штаммы (В-82, Лепориовак) и близкородственный вирус фибромы Шоупа.

В качестве гетерологичных образцов использовали патологический материал, содержащий вирус ГБК (шт. Белгородский-03, Воронежский-87, Манихино-09) и вирус осповакцины.

Для ПЦР в режиме реального времени была выбрана технология гибридационных зондов TaqMan. Согласно данным литературы различные представители рода *Leporipoxvirus* отличаются высокой степенью гомологии генетических характеристик. Учитывая результаты анализа нуклеотидной последовательности штаммов вируса миксомы кроликов и других близкородственных вирусов, для подбора специфических олигонуклеотидов был участок гена Serp2. Данный участок консервативен как для вирулентных, так и для авирулентных штаммов вируса миксомы кроликов, и при этом он значительно отличается у других поксвирусов.

Для определения диагностической специфичности и чувствительности тест-системы использовали патологический материал, содержащий штаммы и изоляты вируса миксомы кроликов с различными биологическими свойствами, и гетерологичные вирусы. Результаты ПЦР в режиме реального времени сопоставляли с результатами ПЦР с электрофоретической детекцией и выделения вируса на культурах клеток и на восприимчивых животных.

В результате исследований установлено, что разработанная тест-система позволяет выявлять геном вируса в пробах различных органов и тканей естественно и экспериментально инфицированных животных. Кроме того, с использованием предложенной тест-системы удалось дифференцировать вирус миксомы кроликов от близкородственного вируса фибромы Шоупа.

Значения диагностической специфичности и чувствительности системы подтверждены в ходе комиссионных испытаний и составили 100 %. Рассчитанное значение аналитической чувствительности тест-системы составило 0,1 TCID₅₀/см³.

Результаты проведенных исследований позволили сделать заключение о том, что предложенная тест-система на основе ПЦР в режиме реального времени обладает высокой специфичностью и чувствительностью и может быть использована для проведения диагностических исследований на наличие генома вируса миксомы кроликов. Кроме того в России впервые предложена методика позволяющая дифференцировать вирус миксомы кроликов от вируса фибромы Шоупа.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА КОЭФФИЦИЕНТ РАЗМНОЖЕНИЯ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ И ГРУШИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Бьядовский И.А.

Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства Россельхозакадемии, Центр защиты и биотехнологии растений, 115598 Россия, г. Москва ул. Загорьевская 4, vstisp@vstisp.org

В современных условиях объем мирового промышленного производства плодов семечковых культур значителен, и он занимает первое место по сравнению с другими породами, особенно в северном полушарии. Актуальным остается создание оздоровленных коллекций и закладка маточников подвоев плодовых культур, что может значительно повысить биологический потенциал культивируемых сортов. Вместе с тем остается проблематичным получение высококачественного безвирусного материала в необходимых количествах для закладки маточников. Данную потребность может решить метод клонального микроразмножения растений за счет высокого коэффициента размножения, получения максимального числа растений с единицы площади, возможности длительного хранения. На этапе пролиферации получают необходимое количество микропобегов для последующего укоренения и адаптации к нестерильным условиям. Известно, что чем выше коэффициент размножения на этапе пролиферации, тем меньше время необходимое для получения нужного количества микропобегов и выше эффективность.

В работе были взяты следующие формы клонных подвоев яблони: 62-396, 54-118, 57-490, 69-6-217, М 26, ММ106, а также груша Березка. На этапе размножения в культуре *in vitro* была изучена возможность повышения коэффициента размножения клонных подвоев яблони и груши при культивировании их на различных концентрациях 6-БАП и ТДЗ в среде. На среде содержащей TDZ 0,2 мг/л наблюдалась значительная гибель микрорастений, от 18,3% у формы 62-396 до 100% у формы 69-6-217, кроме того у выживших микрорастения отмечалось образование витрифицированных микропобегов. У микрорастений которые культивировались на среде с ТДЗ (0,1 и 0,15 мг/л) установлено существенное увеличение коэффициента размножения за пассаж в сравнении с 6-БАП (за исключением клонового подвоя яблони 62-396, где разница между ТДЗ 0,1 мг/л и 6-БАП 1,5 и 2,0 мг/л была не достоверной). У подвоев яблони 62-396 и ММ 106 при увеличении концентрации 6-БАП в среде отмечено некоторое повышение коэффициента размножения за пассаж.

В последующем данные исследования по влиянию различных концентрациях 6-БАП и ТДЗ в среде на этапе пролиферации в культуре *in vitro* были проведены повторно. При культивировании микрорастений на среде с ТДЗ установлено существенное увеличение коэффициента размножения за пассаж в сравнении с 6-БАП (за исключением клонового подвоя яблони 62-396, где разница между ТДЗ 0,15 мг/л и 6-БАП 1,5 и 2,0 мг/л была не достоверной). У клонных подвоев яблони и груши отмечено повышение коэффициента размножения за пассаж при увеличении концентрации 6-БАП в среде с 1,0 мг/л до 1,5 и 2,0 мг/л (у подвоя яблони 57-490 и груши Березка повышение коэффициента размножения отмечено только при сравнении 6-БАП в среде 1,0 мг/л и 2,0 мг/л).

При проведении исследований у клонных подвоев яблони и груши установлено повышение коэффициента размножения за пассаж (за исключением подвоя яблони 69-

6-217) на средах с концентрацией 6-БАП в среде 1,5 и 2,0 мг/л в 1,2-2,8 раза (в среднем 1,3-1,5 раза) в сравнении с 6-БАП 1,0 мг/л. При культивировании на средах с ТДЗ (0,1 мг/л, 0,15 мг/л, 0,2 мг/л) отмечено значительное повышение коэффициента размножения в 1,5-14,3 раза (в среднем 2,9-4,3 раза) в сравнении с 6-БАП 1,0 мг/л. Вместе с тем необходимо отметить, что у микрорастений которые культивировались на средах с ТДЗ высота микропобегов не превышала 1 см, а при культивировании на средах с 6-БАП она достигала 4-5 см. При культивировании на среде с ТДЗ 0,2 мг/л наблюдалось образование витрифицированных микропобегов, а также гибель микрорастений, вследствие чего использование данной концентрации регулятора роста не целесообразно.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У МЕЖВИДОВЫХ ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *recA* *Escherichia coli*

Виноградова Д.А., Милюкова Н.А., Комахина В.В.

***ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Россия,
127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42
Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А.
Тимирязева, Россия, 127550, Москва
E-mail: recombination@iab.ac.ru***

Рекомбинация – процесс перераспределения генетического материала, присущий клеткам про- и эукариот. На использовании процесса мейотической рекомбинации основана современная селекция большинства культур, в том числе и томата. Механизм мейотической рекомбинации не позволяет в полной мере использовать генетический потенциал видов и форм, вовлекаемых в скрещивание. С этой точки зрения актуальными являются исследования, направленные на создание трансгенных растений, экспрессирующих гены, участвующие в процессе рекомбинации (кроссинговере) у различных организмов. Одним из таких генов является *recA* *Escherichia coli*. Известно, что у табака и томата при внутривидовых скрещиваниях ген *recA* *E. coli* увеличивает количество хроматидных обменов и долю рекомбинантных генотипов в потомстве (Комахин и др., 2012; Комахин и др., 2012).

Ранее для получения межвидовых гибридов томата в расщепляющемся потомстве трансгенных гибридов культурного томата F₁RecA были отобраны растения, экспрессирующие ген *recA* *E. coli*, и их нетрансгенные аналоги, содержащие во второй хромосоме в гомозиготном состоянии маркерные рецессивные гены *wv*, *d* и *aw*. Эти растения опылялись пылью дикорастущих видов томатов *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и *S. cheesmaniae*, имеющих близкую степень филогенетического родства с культурным томатом. Филогенетическая близость *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и *S. cheesmaniae* к культурному томату позволяла получать фертильные и самосовместимые межвидовые гибриды и оценивать кроссинговер между тождественными участками хромосом разных видов на основе анализа потомства, полученного от их самоопыления. Такой экспериментальный подход давал возможность в будущем провести сравнение кроссинговера между тождественными участками хромосом у межвидовых и межсортовых гибридов томатов, в том числе изученных ранее (Комахин и др., 2012). В результате гибридизации были получены межвидовые гибриды, которые по маркерным генам проявляли фенотип дикорастущего вида-опылителя (*Wv- Aw- D-*),

который гарантировал их гибридность. Кроме того, в аналогичной комбинации скрещивания были получены нетрансгенные гибриды культурного томата, которые использовались в качестве дополнительного сравнительного контроля. Молекулярно-биологический анализ ДНК всех межвидовых гибридов, полученных на основе трансгенных растений культурного томата, показал наличие в их геноме последовательности целевого гена *recA E. coli*. Анализ экспрессии у трансгенных межвидовых гибридов подтвердил наличие мРНК гена *recA E. coli* в их клетках. Межвидовые гибриды томатов, экспрессирующие ген *recA E. coli*, были обозначены как F₁RecA *S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и F₁RecA *S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*. Эти растения, а также нетрансгенные гибриды F₁ *S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и F₁ *S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*, обозначенные как король, были выращены в теплице и с них были получены семена от самоопыления.

Целью настоящего исследования является сравнительный анализ частоты мейотической рекомбинации у межвидовых трансгенных гибридов томата, экспрессирующих *recA*, и их нетрансгенных аналогов.

Ранее для изучения кроссинговера у гибридов культурного томата были использованы популяции F₂ со всхожестью семян более 80 %, что позволило исключить влияние различий всхожести семян на наследование маркерных генов и кроссинговер между ними (Комахин и др., 2012). При проведении аналогичного отбора среди популяций трансгенных и контрольных межвидовых гибридов F₁ *S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и F₁ *S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae* из 114 плодов для изучения были взяты 93 общей численностью более 10000 растений. Среди этих популяций F₂ существенных отличий по всхожести семян, между трансгенными и контрольными гибридами, обнаружено не было. В целом у гибридов F₁ *S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* она составила около 94 %, а у F₁ *S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae* около 90 %.

В настоящее время все растения F₂ высажены в почву и проводится их анализ по наследованию маркерных генов и определение частоты кроссинговера между ними. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, позволят сделать вывод о возможности вовлечения в селекционный процесс форм томатов, экспрессирующих ген *recA*.

Список литературы

1. Комахин Р.А., Комахина В.В., Милюкова Н.А., Голденкова-Павлова И.В., Фаина О.А., Жученко А.А. Трансгенные растения томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3*, как модель для изучения мейотической рекомбинации // *Генетика*. 2010. Т. 46, №12. С. 1635-1644.
2. Комахин Р.А., Комахина В.В., Милюкова Н.А., Жученко А.А. Анализ частоты мейотической рекомбинации у трансгенных гибридов томата, экспрессирующих гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* // *Генетика*. 2012. Т.48, №1. с.30-39.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* *LIGULARIA GLAUCA* (L.) J. HOFFM.

Герасимова Ю.А., Шелифост А.Е.

*Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича, факультет
биологии, экологии и биотехнологии, Черновцы 58019, Украина
E-mail: antonina_shel@mail.ru*

Одним из наиболее распространенных методов современной биотехнологии сегодня является метод микроклонального размножения в условиях *in vitro*. Он используется с разнообразной целью. Это и наращивание каллусной массы, и выращивание отдельных тканей либо органов растений, как для проведения фундаментальных исследований, так и с чисто прикладной целью. В этой связи особого значения приобретает микроклональное размножение в условиях *in vitro* видов растений, находящихся под угрозой исчезновения. Использование данного метода при работе с краснокнижными видами позволяет решить как минимум две проблемы. Прежде всего – это возможность непосредственно увеличить численность природных популяций и создание новых природных ареалов произрастания данных видов за счет их интродукции в природную среду. Кроме этого, интенсивное наращивание растений в условиях *in vitro* позволит получить достаточное количество растительного сырья как минимум для проведения его глубокого биохимического анализа, а также, в особых случаях, решить проблему его сырьевой базы для получения биологически активных веществ.

Наши исследования касаются исчезающего вида *Ligularia glauca* (L.) J. Hoffm. Данное растение очень редко встречается на Украине на территории Приднестровья и Покутья. Существует информация касательно Черновицкой, Львовской и Закарпатской областей, однако она не подтверждена гербарными сборами. Встречающиеся в природе популяции характеризуются низкой численностью и нарушенной структурой. За последние тридцать лет численность вида снизилась на 50-60 %.

Как исходный материал при введении в культуру были использованы семена, собранные в с. Чортовец Ивано-Франковской области и любезно представленные нам заведующим кафедрой ботаники и охраны природы факультета биологии, экологии и биотехнологии ЧНУ, профессором И.И. Чорнеем. За основу для приготовления питательной среды использовали среду Мурасиге-Скуга. Из витаминов в состав среды входили В₁ в количестве 30 мг/л, В₆ – 10 мг/л, а также витамин РР – 10 мг/л.

Прежде всего, нами было обнаружено, что для сохранения жизнеспособности проростков и поддержания ее в дальнейшем в состав среды необходимо обязательно включать антиоксиданты. В противном случае уже на этапе прорастания семян наблюдается окисление тканей, приводящее в последующем к их гибели. С этой целью мы применили цистеин. При апробации различных концентраций было установлено, что достичь наиболее оптимальных условий для развития удастся, используя питательные среды, содержащие его 120 мг/л.

При культивировании *in vitro* различных растений особое внимание всегда уделяется содержанию в питательной среде фитогормонов. При проращивании нами была использована безгормональная питательная среда, которая на более поздних этапах культивирования была обогащена фитогормонами, в частности ИУК и БАП.

На первом этапе культивирования проростков было использовано традиционное соотношение данных фитогормонов, которое обычно используется при микроклональном размножении различных травянистых растений (1 мг/л БАП и 0,1

мг/л ИУК). Коэффициент размножения эксплантатов на такой среде был достаточно низкий (3-4), причем последующее пассирование на такой же питательной среде не приводит к его увеличению. При более длительном культивировании было обнаружено, что данная среда совершенно не подходит для микроклонального размножения *L. glauca*, поскольку, кроме невысокого коэффициента размножения, у эксплантатов наблюдалось формирование достаточно большого участка каллуса, на котором формировались мощные корни. Как первое, так и второе абсолютно нежелательно на данном этапе культивирования, поэтому был проведен поиск соотношения фитогормонов, при котором удалось бы повысить коэффициент размножения, избежав при этом формирования каллусных масс и корней. Наиболее оптимальной оказалась питательная среда, содержащая 1 мг/л БАП и 0,025 мг/л ИУК, а также 120 мг/л цистеина. Придерживаясь указанных условий культивирования удалось значительно повысить коэффициент размножения эксплантатов *L. glauca* в условиях *in vitro*. Особо важным был тот факт, что при таких условиях культивирования не только происходило формирование мощных конгломератов побегов, было также достигнуто практически их синхронное развитие, благодаря чему при последующем пассировании исходным материалом служили почти одинаковые побеги.

Таким образом, для микроклонального размножения в условиях *in vitro* исчезающего вида *L. glauca* в состав питательной среды необходимо вводить в качестве антиоксиданта цистеин (120 мг/л), а для достижения эффективного размножения эксплантатов – фитогормоны (1 мг/л БАП и 0,025 мг/л ИУК).

ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Гизатуллина А.Т., Сташевски З.

***ГНУ Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
Россельхозакадемии, Казань, Оренбургский тракт 48, 420059
E-mail: gizatyllina.a@mail.ru***

Картофель — одна из важнейших сельскохозяйственных культур, используемая для продовольственных и кормовых целей, а также для перерабатывающей промышленности. Это четвертая по распространенности продовольственная культура после кукурузы, пшеницы и риса.

Производство миниклубней из микрорастений на основе рассадной технологии имеют определенные преимущества, но также является дорогостоящим, что ограничивает возможность его использования в процессе оригинального семеноводства. Увеличение количества оздоровленного материала возможно за счет размножения микрорастений *in vitro*, повышения продуктивности пробирочных растений в условиях *in vivo*, а также за счет совершенствования приемов возделывания миниклубней.

Основной целью наших исследований являлся подбор универсального состава питательной среды и условий культивирования, позволяющие индуцировать образование миниклубней из генетически разнородного селекционного материала картофеля в условиях *in vitro*.

Объектом исследования служили гибридные семена и микрорастения комбинации 50-03 x Виктория и Бакша x 50-03 полученных в лаборатории селекции

картофеля ГНУ ТатНИИСХ г. Казань. Получение микрорастений из гибридных семян были изучены в предыдущих работах.

Индукцию микроклубней на гибридных микрорастениях картофеля изучали на 6 видах питательных сред и при 2 режимах освещения: полное отсутствие освещения и 8/16 ч световой фотопериод (2000 люкс). Температура культивирования + 18-20°C. Эксперимент включал следующие варианты состава питательных сред MS: кинетин (KS1 2,5 мг/л и KS2 4 мг/л), ВАР (BS1 5 мг/л и BS210 мг/л), ССС (CS1 150 мг/л и CS2 200 мг/л) с высоким содержанием сахарозы (80 г/л). Во время эксперимента оценивались сроки формирования, количество и вес микроклубней.

Интенсивное микроклубнеобразование началось с 6-7 недели культивирования растений, как в условиях темноты, так и при 8/16 – часовом фотопериоде. По вариантам опыта наименьший срок начала индукции клубнеобразования показан при инкубации микрорастений картофеля на питательной среде BS1, KS1, CS1 в условиях отсутствия освещения и BS, KS2, CS2 в условиях 8/16 ч. фотопериода (7-21 дней).

При инкубации микрорастений в системе *in vitro* в условиях 8/16 ч. фотопериода получены лучшие результаты по сравнению с инкубацией в темноте. Средняя масса микроклубней в условиях темноты и 8/16 ч. фотопериода составила: у гибридных комбинаций 50-03 х Виктория 0,06 и 0,06 г., Бакша х 50-03 0,07 и 0,11 г. соответственно. В темноте растения формировали микроклубни примерно одинаковой массы. В условиях 8/16 ч фотопериода масса полученных микроклубней в значительной степени варьировала в зависимости от генотипа. На кинетин и ВАР содержащих питательных средах в условиях 8/16 ч. освещения сформировались более крупные микроклубни.

У комбинации Бакша х 50-03 четко наблюдали влияние фотопериода на массу микроклубней. Доля продуктивных растений, сформировавших микроклубни, по отношению к общему числу высаженных микрорастений в условиях темноты и 8/16 ч. фотопериода составила 52 и 46% соответственно. Микроклубни в условиях темноты были мелкими и соответственно уступали по массе микроклубням индуцируемые в условиях 8/16 ч. освещения. Лучшие результаты по комбинации 50-03 х Виктория были достигнуты на питательной среде KS1 в условиях 8/16 ч. фотопериода.

Подавляющее большинство микрорастений сформировали по одному микроклубню. Среднее количество микроклубней на растение по комбинациям в условиях отсутствия освещения и 8/16 ч. фотопериода составило у Бакша х 50-03 (0,67 ±0,2 и 0,63 ±0,2), у 50-03 х Виктория (0,3 ±0,1 и 0,2 ±0,1), соответственно.

Учитывая данный факт и показатель количества микрорастений, сформировавших микроклубни по отношению к общему количеству высаженных растений можно рекомендовать кинетин и ВАР содержащие питательные среды для получения микроклубней картофеля в асептических условиях.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ ТРАНСГЕНННОГО МАТЕРИАЛА В РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТАХ, ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И КОРМАХ НА ОСНОВЕ ПЦР-АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОЧИПОВОГО АМПЛИФИКАТОРА «АРИАДНА»

Григорьева М.В., Сляднев М.Н., Мушников Н.В., Наволоцкий Д.В.

*ООО «Люмэкс-маркетинг», Медико-биологическое отделение, Санкт-Петербург
192029, пр. Обуховской обороны, д. 70/2, E-mail: GrigorevaMV@lumex.ru*

В настоящее время для получения нового трансгенного организма с заданными свойствами всё чаще используют метод генной инженерии, суть которого заключается в получении необходимого изолированного гена и его введении в организм с помощью вектора. Одним из примеров генной инженерии является получение генетически модифицированных сортов культурных растений, обладающих новыми полезными свойствами, такими как устойчивость к пестицидам, вирусам и насекомым-вредителям. Производство и оборот такой трансгенной продукции увеличивается в мире год от года и на сегодняшний день определенная часть находящихся в обороте продуктов и кормов содержат компоненты из генетически модифицированных источников (ГМИ). На территории Российской Федерации создание, производство и применение продукции с использованием ГМИ подлежит государственному регулированию. Содержание трансгенных конструкций в продуктах и кормах в соответствии с указаниями Роспотребнадзора и Россельхознадзора должно быть продекларировано.

В связи с вышеизложенным, актуальным является разработка тест-системы для определения генетически модифицированных ингредиентов в продуктах и кормах. Несмотря на достигнутые в этом направлении значительные успехи, важным представляется совершенствование методов в плане экспрессивности и автоматизации. В системе лабораторного контроля трансгенных продуктов можно выделить три направления: химический (выявление химического состава), иммуноферментный (выявление модифицированного белка) и ДНК-диагностика (выявление регуляторных участков ДНК векторных конструкций). Стоит отметить, что первые две методики технически сложны и недостоверны. ДНК-диагностику проводят методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), что позволяет обнаружить непосредственно чужеродный ген. А за счет высокой чувствительности выявить наличие рекомбинантной ДНК можно в очень низких концентрациях и практически любом пищевом материале.

Для качественного определения ГМО в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья нами были разработаны «Комплект реагентов для выделения ДНК из продуктов питания и пищевого сырья растительного происхождения», и тест-система «Набор микрочипов для выявления ГМО методом ПЦР в режиме «реального времени» с использованием микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот «АриаДНА»».

Набор для выделения предназначен для пробоподготовки растительной ДНК. Метод основан на сорбции нуклеиновых кислот на магнитных частицах. Комплект реагентов позволяет быстро выделить и очистить генетический материал из небольшого количества любых растительных субстратов (жидких, сыпучих и материалов твердой консистенции).

Тест-система «АриаДНА-ГМО» предназначена для одновременного выявления универсальных маркеров генетически модифицированной ДНК: регуляторные последовательности промотора 35S вируса мозаики цветной капусты, терминатора

NOS (tNOS) из *Agrobacterium tumefaciens* и последовательность гена неомидин трансферазы II (npt II). А также для идентификации ДНК растений сои (*Glycine max*) и кукурузы (*Zea mays*) используются последовательности генов, кодирующих белки лектин (Lec) и зеин (Zein), соответственно. Кроме того, для идентификации растительной ДНК применяется ген 18S.

Микрочип представляет собой кремниевую пластину, в микрореакторах которой иммобилизованы все компоненты ПЦР-смеси. Для проведения амплификации необходимо добавить в соответствующие ячейки образцы выделенной ДНК и запустить программное обеспечение на амплификаторе нуклеиновых кислот в режиме «реального времени» «АриаДНА». Помимо того, что микрочиповый метод позволяет минимизировать ошибки оператора, существует ряд других преимуществ по сравнению с постановкой ПЦР в пробирках: малый объем реактивов, экспрессный синтез ампликонов, высокая скорость термоциклирования, значительное снижение трудозатрат, равномерное нагревание всех образцов. Одновременно на все маркеры можно идентифицировать ДНК в 6 пробах (рис. 1).

35S tNOS	35S tNOS	35S tNOS	35S tNOS	35S tNOS	35S tNOS
18S nptII	18S nptII	18S nptII	18S nptII	18S nptII	18S nptII
Lec	Lec	Lec	Lec	Lec	Lec
Zein	Zeinn	Zein	Zein	Zein	Zein
35S +	tNOS +	18S +	nptII +	Lec +	Zein +

Рис. 1. Расположение проб в микрореакторах чипа.

Интерпретацию результатов проводят с помощью программного обеспечения микрочипового амплификатора «АриаДНА», анализируя кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналам FAM и ROX (рис 2.).

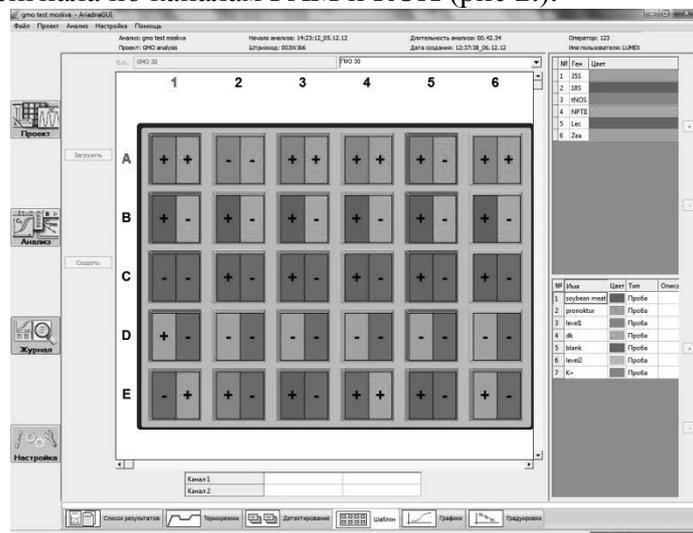


Рис. 2. Результаты качественного ПЦР анализа: столбец 1 – Корм для собак, 2 – соевое мясо, 3 – ERM Roundup Ready Soya (level 1), 4 – ERM Roundup Ready Soya (dK), 5 – ERM Roundup Ready Soya (blank), 6 – ERM Roundup Ready Soya (level 2).

Таким образом, нами была решена задача быстрого, высокоэффективного и автоматизированного выявления ГМИ в различных субстратах растительного происхождения. Предельные концентрации ГМО, которые дают положительный результат — 0,1%. Длительность анализа 40 минут. На данный момент идет к

завершению разработка тест-системы для количественного определения ГМО. Метод позволит не только идентифицировать трансгенные компоненты, но и определить процентное содержание чужеродной ДНК относительно геномной ДНК растений.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РИАНОДИНОВОГО РЕЦЕПТОРА У СВИНЕЙ ТРЕХПОРОДНОГО СКРЕЩИВАНИЯ

Шалимова О.А., Крюков В.И., Друшляк Н.Г., Радченко М.В.

***ФГБОУ ВПО Орловский государственный аграрный университет,
Инновационный научно-исследовательский испытательный центр,
302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, д. 69, E-mail: iniic@mail.ru***

Одним из основных видов сырья для производства мясных продуктов является свинина. По долгосрочным прогнозам ученых разных стран, спрос на свинину будет оставаться достаточно высоким. Увеличение ее производства обусловлено такими факторами, как многоплодие и скороспелость животных, высокий выход продуктов убоя, пищевые и вкусовые достоинства. Объемы производства свинины увеличиваются за счет повышения мясной продуктивности животных [Татулов Ю.В., Косачева Т.В. и др., 2009].

Однако установлено, что у свиней с увеличением доли нежирного мяса в туше возрастает и доля его качественных недостатков, в частности происходит появление специфического порока, получившего название PSE (pale – бледный, soft – мягкий, exudative – экссудативный) [Зиновьева Н. А., Кленовицкий П.М. и др., 2008].

Fujii J. с соавт. (1991) выявили точковую мутацию в рианодин-рецепторном гене возникающую в результате замены цитозина на тимин в позиции 1843 нуклеотидной последовательности, что приводит к синтезу в 615 позиции полипептидной цепи рианодин-рецепторного белка аргинина вместо цистеина. Это является предполагаемой причиной возникновения стрессчувствительности, крайним проявлением которой является гипертермический синдром. [Fujii J., Kinya O. и др., 1991]. Животные, имеющие генотип NN, являются устойчивыми к стрессам, генотип nn – стрессчувствительными, гетерозиготы с генотипом Nn являются носителем гена стрессчувствительности.

Цель настоящей работы состоит в генотипировании свиней трехпородного скрещивания ландрас × йоркшир × дюрок (Л×Й×Д), выращенных на свинокомплексе ОАО «Агрофирма «Ливенское мясо» по гену рианодинового рецептора.

В качестве исходного материала использовали кровь 130 животных случайной выборки. ДНК выделяли с помощью набора D1Atom™ DNA Prep100 («БИОКОМ», Россия). Генотипирование осуществляли методом ПЦР-ПДРФ (полимеразно-цепной реакции полиморфизма длин рестрикционных фрагментов) в соответствии с ранее описанными методиками [Крюков В.И., Пикунова А.В. и др., 2011].

Методом ПЦР-ПДРФ нами получен специфический фрагмент RYR1-гена свиней, представляющий собой доминантные алели, либо аллель, в котором возможна искомая рецессивная мутация. Полученные амплификаты подвергли рестрикции эндонуклеазой HindI. При помощи маркера были определены длины фрагментов рестрикции: два фрагмента 149 и 123 п.н. представляют генотип NN, три фрагмента в 272 п.н., 149 и 123 п.н. соответствуют гетерозиготному генотипу Nn (рис.). Рецессивных гомозиготных генотипов nn (один фрагмент рестрикции 272 п.н.) не обнаружили.

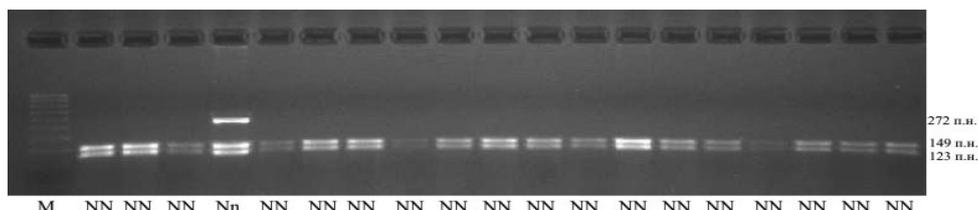


Рис. Электрофореграммы ПЦР-ПДРФ генотипирования по локусу RYR1 (M – маркер молекулярного веса)

Проведенными исследованиями установлено, что у трехпородных гибридов Л×Й×Д не был выявлен стрессчувствительный генотип – nn гена RYR1, гетерозиготная форма генотипа Nn встречалась с частотой 1,54%, а гомозиготный генотип доминантной формы обнаружен у 98,46% животных.

Небольшое количество гетерозиготных и отсутствие рецессивных гомозиготных носителей является следствием гетерозиса, поскольку свиньи породы дюрок обладают высокой устойчивостью к стрессам. Полученные нами данные, согласуются с результатами исследований Siczowska H. и соавт. (2009), установившими отсутствие гетерозиготных и рецессивных гомозиготных генотипов в популяции трехпородных гибридов Л×Й×Д датской селекции [Siczowska H., Koćwin-Podsiadła M., 2009].

Согласно правилам наследования половина потомков, полученных от скрещивания гетерозиготных животных по гену RYR1 с нормальными гомозиготными животными, будут иметь гетерозиготный генотип. При скрещивании гетерозиготных хряков с гетерозиготными свиньями наряду с гомозиготным доминантными и гетерозиготными потомками будут появляться гомозиготные рецессивные особи nn примерно в соотношении 1:2:1. Все это будет способствовать сохранению и увеличению уровня встречаемости мутантного аллеля гена RYR1 в следующих поколениях животных. При этом в условиях производства, в отличие от племенных хозяйств, целесообразно использовать животных не только с генотипом NN, но и с генотипом Nn, что будет способствовать получению мяса с высокими качественными и органолептическими показателями.

Проведенные генетические исследования свиней трехпородного скрещивания Л×Й×Д выращенных на свином комплексе ОАО «Агрофирма «Ливенское мясо» позволили выявить высокий генетический потенциал стрессустойчивости, оцененный по маркеру RYR1, так у 98,46% протестированных животных идентифицировали гомозиготный генотип доминантной формы. Проведенные исследования свидетельствуют о необходимости использования в селекции свиней ДНК-диагностики по гену RYR1 с целью дальнейшего повышения качества мяса.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АДВЕНТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОБЕГОВ ПЕРСИКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Егорова В.С.^{1,3}, Худякова Т.И.^{1,3}, Сидорова Т.Н.¹, Долгов С.В.^{1,2}

¹ *Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, 142 290, Россия, г. Пушкино, просп. Науки, д.6*

² *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, РАСХН, г. Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 42.*

³ *Пушинский государственный естественно-научный институт, 142 290, Россия, г. Пушкино, просп. Науки, д.3.
E-mail: vika243@gmail.com*

Персик – является самой ценной и широкоиспользуемой из косточковых культур. Его плоды потребляются в свежем виде, а также для производства сухофруктов, консервов, джемов, сиропов, соков. В настоящее время наблюдается снижение урожайности персика вследствие влияния различных неблагоприятных факторов, среди которых особое место занимают грибные и вирусные заболевания. Наиболее опасным и быстро распространяемым заболеванием косточковых культур является вирус оспы сливы (Plum Pox Virus, PPV). Получение новых устойчивых сортов традиционными методами селекции недостаточно эффективно, а порой и невозможно, из-за отсутствия растений-доноров персика с необходимыми признаками.

Генетическая инженерия является одним из способов преодоления данной проблемы. До последнего времени главной проблемой была невозможность получения морфогенного каллуса и отсутствие органогенеза у растений персика. Но и сейчас отсутствие надежных методик способных обеспечить высокую частоту регенерации побегов из соматических тканей коммерческих сортов персика является главным препятствием при создании трансгенных растений.

Целью нашей работы являлся подбор условий культивирования для индукции морфогенного каллуса и последующей регенерации подвоев персика Bailey и Nemaguard. Каллус индуцировали в два этапа на питательной среде MS содержащей различные концентрации 6-БАП и ИМК. Изучали влияние длительности индуцирования каллуса (один, два месяца) на эффективность морфогенеза.

У обоих подвоев наблюдали стабильную индукцию и рост морфогенного каллуса с дальнейшей регенерацией побегов. Частота регенерации у подвоя Bailey составила 44 -48%, у подвоя Nemaguard - 39-45%.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ TUMV И СОЗДАНИЕ ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ BRASSICA – ДОНОРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К НЕМУ

Зубарева И.А., Игнатов А.Н.

*Центр «Биоинженерия» РАН, Москва 117312
E-mail: i_a_zubareva@rambler.ru*

Вирусы получили исключительно широкое распространение в природе, к настоящему времени известно достаточно много видов вирусов, вызывающих инфекционные болезни у растений. Вирус мозаики турнепса – единственный

представитель *Potyvirus*, способный поражать растения рода *Brassica*. По распространенности и вредности в мире TuMV находится на втором месте, уступая лишь вирусу мозаики огурца, а в определенных странах, он является самым опасным возбудителем заболеваний многих сельскохозяйственных культур. Потери урожая от поражения TuMV составляют от 3,5 до 100%. Наиболее перспективным и экологически безопасным методом борьбы с вирусом является использование защитных свойств самих растений и культивирование устойчивых сортов. Поэтому необходимость изучения генетического разнообразия вируса и создание линий-доноров устойчивости к вирусу представляется крайне актуальной задачей.

Нами была проведена диагностика 87 образцов капустных культур с симптомами TuMV. На основании характера поражений индикаторных растений и по результатам ИФА были выделены 6 изолятов TuMV. Инокуляция коллекции растений семейства *Brassicaceae* (136 образцов) показала, что изоляты вируса отличаются между собой по вирулентности и типу наблюдаемых симптомов. Сравнение нуклеотидных последовательностей участков трех генов (*NIb*, *CP*, *PI*) выявило, что изучаемые изоляты отличаются не только от всех известных штаммов TuMV, но и между собой. При построении филогенетических деревьев с использованием последовательностей наиболее близких штаммов было показано, что изоляты вируса I2, I3a и I3b, поражающие растения капусты, рапса и турнепса в защищенном грунте, и изоляты I7, I8 и I10, поражающие растения пекинской капусты в полевых условиях, принадлежат к двум разным генетическим группам и имеют различное независимое происхождение.

При дальнейшем изучении изолятов TuMV было выявлено, что TuMV I2 передается семенами растений рода *Brassica* с частотой передачи до 40%. Впервые показано присутствие вируса в зародыше семени. С помощью ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени вирус обнаруживается на всех стадиях развития растений, полученных из инфицированных семян. ИФА детектирует TuMV во взрослых растениях, а в зародышах и целых семенах - только при достижении высокой концентрации вирусных частиц. При анализе последовательности полного генома изолята I2 TuMV выявлено 5 уникальных аминокислотных замен, которые, вероятно, способствуют его передаче через семена.

По результатам оценки коллекции растений рода *Brassica* на устойчивость к вирусу нами было выделено 13 устойчивых ко всем 6 изолятам TuMV образцов, которые использовали для получения удвоенных гаплоидных линий – доноров устойчивости к TuMV через культуру микроспор. Для каждого образца были подобраны условия теплового шока. Удвоенные гаплоидные линии использовались для анализа полиморфизма локусов инициации трансляции у представителей рода *Brassica*. Выравнивание аминокислотных последовательностей локуса *BraA.eIF4E.a* выявило аминокислотную замену 40Thr → Ile у всех устойчивых к TuMV образцов, которая вероятно и придает устойчивость к TuMV.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПРИЦЕНТРОМЕРНОЙ ОБЛАСТИ ХРОМОСОМ *Allium cepa* И *A. fistulosum*

Киселева А.В., Киров И.В., Будылин М.В., Романов Д.В., Хрусталева Л.И.

Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49, E-mail: sanyutabe@gmail.com

Центромера является важным структурным элементом хромосомы, обеспечивающим правильное распределение хроматид между дочерними клетками во время митоза и мейоза. Несмотря на очевидную функциональную консервативность, ДНК последовательности центромеры различаются не только у близких видов, но остаются могут различаться и между отдельными парами хромосом внутри кариотипа одного вида (Nagaki, 2012; Gong, 2012). Центромеры большинства видов растений до сих пор остаются не изученными (Eichler, 1999, 2004; Rudd, 2004; Alkan, 2011). На сегодня известно, что в ДНК центромеры входят tandemные повторы, длиной в несколько сотен п.н., и/или центромер-специфичные ретротранспозоны (ЦР). ЦР относятся к семейству хромовирусов *Tu3-gypsy* ретротранспозонов. Они встречаются между центромерными сателлитными повторами (Cheng, 2002; Shelby, 2000), но могут быть и основным компонент центромеры (Li et al., 2013). Центромерные повторы, участвующие в сборке кинетохора и расхождении хроматид/хромосом, представляют огромный интерес для создания минихромосом растений (Carlson et al., 2007). Кроме этого хромосом-специфичные центромерные повторы являются цитогенетическими маркерами для распознавания индивидуальных хромосом.

К видам с неизвестными центромерной и прицентромерной областями относятся виды рода *Allium*. Такие представители этого рода, как лук репчатый (*A. cepa*) и лук батун (*A. fistulosum*), являются важными сельскохозяйственными овощными культурами. Геномы этих и других видов луков до сих пор слабо изучены из-за целого ряда причин, в числе которых: большой размер генома, высокая частота дупликаций и повышенная гетерозиготность.

Целью нашей работы является поиск ДНК последовательностей прицентромерной области хромосом *Allium cepa* и *Allium fistulosum* и сравнительный анализ их хромосомной организации у изучаемых видов.

Для поиска ДНК последовательностей прицентромерного региона использовались разные подходы, включающие современные молекулярно-генетические технологии и биоинформатический анализ. Впервые была создана ВАС библиотека (bacterial artificial chromosome) геномной ДНК *A. fistulosum*, при выборочном FISH (fluorescent *in situ* hybridization) анализе которой был выявлен ВАС клон 5.10.7 с четкими сигналами в прицентромерной области на двух парах гомологичных хромосом 5 и 6 *A. fistulosum*. При гибридизации ВАС клона 5.10.7 на хромосомы *A. cepa* флуоресцирующих сигналов не было выявлено. Таким образом, нами была установлена не только центромер-специфичная, но и геном-специфичная локализация FISH сигналов.

Для поиска центромер-специфичных ретротранспозонов нами был проведен биоинформационный поиск данных ретротранспозонов среди всех ДНК последовательностей лука доступных в базе данных NCBI. Были выделены сиквенсы, являющиеся частью *Tu3* ретротранспозонов *A. cepa*. Множественное выравнивание выделенных последовательностей позволило выявить сиквенсы *Tu3* ретротранспозонов с возможной прицентромерной локализацией. FISH на хромосомах лука репчатого с

продуктом ПЦР, полученным с праймерами на одну из выделенных Ту3 последовательностей и геномной ДНК *A. sepa*, выявил сигналы в прицентромерной области хромосом *A. sepa*. А FISH на хромосомах лука батун с ПЦР продуктом, полученным с теми же праймерами и геномной ДНК *A. fistulosum*, показала иную картину гибридизации с более выраженной субтеломерной локализацией. Полученные результаты могут свидетельствовать о различной локализации Ту3 ретротранспозона линии хромовирусов у двух исследуемых видов.

Другим этапом наших исследований стало изучение недавно открытого центромерного повтора лука батун Afi11 (Nagaki, 2012). К ДНК сиквенсу данного повтора нами были подобраны праймеры, получен ПЦР продукт с геномной ДНК *A. fistulosum* и проведен FISH анализ на хромосомах *A. fistulosum* и *A. sepa*. Интересным было то, что на метафазах *A. sepa* сигналы были выявлены только на 4х парах хромосом. Таким образом, Afi11 является общим повтором для изучаемых видов. Однако картина его эволюции различна между двух геномов.

Дальнейшее исследование прицентромерного региона лука репчатого и лука батун поможет в изучении структуры и организации этого важного элемента хромосом. А открытые нами последовательности могут быть использованы в качестве цитогенетических маркеров для идентификации индивидуальных хромосом *A. sepa* и *A. fistulosum*.

Список литературы:

1. Alkan C, Cardone MF, Catacchio CR, Antonacci F, O'brien SJ, Ryder OA, Purgato S, Della Zoli M, Valle G, Eichler EE, et al. Genome-wide characterization of centromeric satellites from multiple mammalian genomes. *Genome Res* 2011, 21(1):137–145.
2. Carlson SR, Rudgers GW, Zieler H, Mach JM, Luo S, Grunden E, Krol C, Copenhaver GP, Preuss D. Meiotic transmission of an in vitro-assembled autonomous maize minichromosome. *PLoS Genet*. 2007 Oct;3(10):1965-74.
3. Cheng ZK. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. *Plant Cell* 2002, 14: 1691–1704.
4. Eichler EE. Repetitive conundrums of centromere structure and function. *Hum Mol Genet* 1999, 8(2):151–155.
5. Eichler EE, Clark RA, She X. An assessment of the sequence gaps: unfinished business in a finished human genome. *Nat Rev Genet* 2004, 5(5):345–354.
6. Gong Z, Wu Y, Kobli'zkova' A, Torres G, Wang K, et al. Repeatless and Repeat-Based Centromeres in Potato: Implications for Centromere Evolution. *The Plant Cell* 2012, Epub.
7. Li B, Choulet F, Heng Y, Hao W, Paux E, Liu Z, Yue W, Jin W, Feuillet C, Zhang X. Wheat centromeric retrotransposons: the new ones take a major role in centromeric structure. *Plant J*. 2013 Mar;73(6):952-65
8. Nagaki K, Shibata F, Kanatani A, Kashihara K, Murata M. Isolation of centromeric-tandem repetitive DNA sequences by chromatin affinity purification using a HaloTag7-fused centromere-specific histone H3 in tobacco. *Plant Cell Reports* 2012.
9. Rudd MK, Willard HF. Analysis of the centromeric regions of the human genome assembly. *Trends Genet* 2004, 20(11):529–533.
10. Shelby RD. Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication // *J. Cell Biol* 2000, 115: 1113–1118.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ТОМАТА К ФИТОФТОРОЗУ

Ковбасенко Р.В., Дмитриев А.П.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ, Киев, Украина
E-mail: kovbasenko@yandex.ru

Фитофтороз томата, возбудителем которого является грибок *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – одно из наиболее вредоносных заболеваний этой культуры во многих странах мира. Болезнь очень широко распространена практически во всех агроклиматических зонах нашего государства. В годы с обильными осадками и повышенной относительной влажностью воздуха при оптимальных температурах воздуха создаются условия для эпифитотийного развития болезни и урожай плодов быстро погибает практически полностью. Одним из наиболее экологически безопасных и дешевых способов борьбы с подавлением паразитизма патогенна является выращивание устойчивых сортов и гибридов. Поиск новых подходов для селекции растений, устойчивых к болезням, является одним из главных направлений в области физиологии растений, биотехнологии и генетике. Поскольку генетических источников резистентности к фитопатогену идентифицировано пока недостаточно, целесообразно использовать методы клеточной селекции для ускоренного получения толерантных форм культуры. Из культуры клеток можно регенерировать целые растения, обладающие определенным уровнем устойчивости к фитофторозу и их можно использовать в качестве исходного материала в селекционном процессе.

Целью нашей работы было определение возможностей различных селективных факторов индуцировать соматоклональную вариабельность у растений томата с последующим отбором необходимых устойчивых форм. Исследования в культуре *in vitro* были проведены на сорте томата Лагидный и гибриде F₁ КДС-5, полученными в Институте овощеводства и бахчеводства НААН Украины. В качестве селективных факторов использовали культуральный фильтрат гриба *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, который был получен после водного смыва мицелия, выращенного на живых ломтиках картофеля в эксикаторе и стерилизован путем пропускания через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, и глюкан с 1-3 и 1-6- β- связями. Глюкан в растворе получали по методике, предложенной Васюковой [1] с некоторой нашей модификацией. Получение первичной каллусной ткани проводили по стандартизированным методикам [2]. В качестве эксплантов использовали изолированные сегменты гипокотилей и стеблей, выращенных на агаризированной питательной среде за прописью Murashige, Scoog [3] в нашей модификации [4].

На первом этапе работы осуществляли оптимизацию концентрации селективных факторов. В качестве общего контроля использовали стандартную среду без их добавления. Необходимо отметить, что наличие даже минимальной концентрации селективных факторов в питательной среде несколько угнетало рост каллусов и снижало их массу, вызывало появление многих мелких некротических пятен в большей степени бурой окраски. Процент выживших каллусов на средах с культуральным фильтратом составил на 10% - 16, 20% - 3, 30% - 0, а на средах с глюканом – 10% - 45, 20% - 26, 30% - 16, 40% - 7, 50% - 2, 60% - 0. Показатели выживших каллусов из сорта и гибрида были почти одинаковыми. Морфогенез оставшихся каллусов проходил очень слабо. Поэтому возникла идея использовать в качестве индуктора экзогенную салициловую кислоту. Общеизвестно [5, 6], что она является сигнальной молекулой, которая включает защитные механизмы растений в

ответ на патогенную инфекцию, регулируя реакции с ионами кальция и перекисью водорода. Озерецковская и др. [7], исследуя механизмы формирования индуцированной фитопфтороустойчивости и восприимчивости клубней картофеля к патогену *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary при помощи элиситора хитозана и иммуносупрессора ламинарина, установили, что в процессе обработки дисков из клубней картофеля хитозаном происходит накопление салициловой кислоты в результате чего значительно возрастает активность бензоат-2-гидроксилазы та гидролиз конъюгированных форм салициловой кислоты. Кроме этого, в своих исследованиях уфимские ученые Максимов и др. [8] обнаружили, что супергипертрофированный рост каллусов, вызванный патогенами пшеницы из родов *Septoria* і *Drechslera* , подавлялся под влиянием салициловой кислоты и хитоолигосахаридов, которые также изменяли морфологию грибного мицелия и индуцировали защитный ответ клеток, связанный с продукцией перекиси водорода.

На втором этапе работы осуществляли отборы каллусов и индуцировали их морфогенез. Нами было экспериментально установлено, что для получения морфогенных каллусов наиболее оптимальной является агаризированная питательная среда за прописью Murashige, Scoog с добавлением 0,5 мг/л 1,3-β-1,6-β-глюкана и 1,0 мг/л салициловой кислоты, независимо от того был это сорт или гибрид. При этой концентрации селективных факторов процент каллусообразования составил около 10% и происходит небольшой прирост каллусных тканей, что позволяет в дальнейшем сформировать морфогенные структуры и получить растения-регенеранты. Выделенные нами линии пересаживали на регенерационную питательную среду для получения растений и проверки их устойчивости к фитопфторозу на естественном и искусственном инфекционных фонах. В результате клеточной селекции были регенерированы 7 растений и получены семена из них.

Литература

1. Васюкова Н.И. Биохимические механизмы специализации возбудителя фитопфтороза к картофелю // Автореферет дисс. ... докт. биол. наук. М., 1990. – 44 с.
2. Внучкова В.А. Методические указания по культуре тканей томатов. – М., 1985. – 16 с.
3. Murashige T., Scoog F.A. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Plant Physiol. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
4. Ковбасенко Р.В., Олійник Т.М., Дульнев П.Г., Дмитрієв О.П. Оптимізація живильних сумішей для інтродукції пасльонових культур *in vitro* із застосуванням наночастинок// Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: Логос. – 2012. – Т. 4. – С. 509-513.
5. Лана О.М., Ковбасенко Р.В., Ковбасенко В.М., Дмитрієв О.П. Саліцилова кислота в рослинництві. – К.: Колобiг, 2011. – 75 с.
6. Тютєрев С.Л. Научные основы индуцированной болезнестойчивости растений. С.-П(б).:ООО«ИЦЗР» ВИЗР. 2002. 328 с.
7. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Панина Я.С., Чаленко Г.И. Действие иммуномодуляторов на устойчивость и восприимчивость картофеля к *Phytophthora infestans*.// Физиология растений. – 2006. – Т. 53, №4. – С. 546-553.
8. Максимов И.В., Трошина Н.Б., Сурина О.Б. Салициловая кислота и хитоолигосахариды усиливают устойчивость растительных клеток к патогенам в совместной культуре каллусов с возбудителями твердой и пыльной головни// Биология растений *in vitro* и биотехнология. М. – 2008. – С. 238.

ДНК МАРКИРОВАНИЕ ГЕНА СКРИНИНГ *VIVIPAROUS-1* ПЫРЕЙНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И АНАЛИЗ КОЛЛЕКЦИИ ПШЕНИЧНО-ПЫРЕЙНЫХ ГИБРИДОВ

Кочешкова А.А.¹, Дивашук М.Г.¹, Крупин П.Ю.¹, Белов В.И.², Упелник В.П.², Карлов Г.И.¹

¹*Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А.Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Россия, Москва 127550*
e-mail: alina.kocheshkova@gmail.com

²*Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина Российской академии наук*

В зонах с достаточным увлажнением такие факторы, как обильные дожди и росы во время уборки урожая провоцируют предуборочное прорастание зерна в колосе пшеницы и других злаковых культур. Начало прорастания семени происходит после завершения покоя, который связан с активностью гена *Vp1* (*Viviparous-1*). Ген *Vp1* является одним из важных регуляторов позднего эмбриогенеза у мягкой пшеницы. Существуют предпосылки для повышения устойчивости к прорастанию на корню у мягкой пшеницы за счет отдаленной гибридизации. Большим потенциалом в этой области обладают октоплоидные пшенично-пырейные гибриды (ППГ). Они являются как удобным модельным объектом для изучения проявления генов пырея в присутствии полного генома пшеницы, так и селекционным мостиком для непосредственной интрогрессии генов пырея.

Целью нашей работы было создание молекулярного маркера для определения наличия гена *Vp1* пырейного происхождения в геномном окружении пшеницы и анализ коллекции ППГ с помощью данного маркера.

На ген *Vp1* пырейного происхождения нами был разработан CAPS маркер на основе нуклеотидных последовательностей полученных на предыдущих этапах исследования. Данный маркер позволяет выявить два варианта гена *Vp1* пырея (*Thy1* и *Thy2*) в присутствии всех трех субгеномов мягкой пшеницы.

При помощи ПЦР с последующей рестрикцией проанализирована коллекция ППГ из 92 образцов. У 8 образцов ППГ (548, 12, 1670, 70с, 1744, 1754зел, 1867, М3202) было выявлено присутствие гена *Thy1*. Ген *Thy2* был найден у 5 образцов (116, 237, 33, 209, 116trs). У 9 образцов (1779, 80, 186, 1754кр, 1416, 5542, 4056, 197trs, 77) наблюдалось расщепление по наличию отсутствию данных генов. Один образец показал расщепление по генам *Thy1* и *Thy2*. Основываясь на полученные данные планируется провести анализ влияния генов *Vp1* пырейного происхождения на устойчивость к прорастанию на корню у ППГ. В случае проявления существенного положительного эффекта данных генов провести их направленную интрогрессию в геном мягкой пшеницы с помощью разработанного нами молекулярного маркера.

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ КАЛИЯ НА РОСТ ПРОРОСТКОВ *Arabidopsis thaliana*

Кучоро Ф., Знаменский А.И.

ФГБОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет - МСХА
имени К.А. Тимирязева», E-Mail: kfaoussa@yahoo.fr, znart3@gmail.com

Калий наряду с азотом и фосфором относится к главным элементам питания растений. Наличие ионов калия (K^+) необходимо для нормального осуществления многих физиологических функций в растении, включая фотосинтез, накопление углеводов, устойчивость к стрессам. Недостаток калия приводит к нарушению обмена веществ, и в частности углеводного и белкового обмена. Участие калия во многих процессах предопределяет интерес к изучению генетических механизмов регуляции его транспорта. Показано большое количество генов, участвующих в регуляции транспорта ионов калия в растениях, в зависимости от которых меняется эффективность транспорта ионов [1].

Целью исследования является характеристика генотипов арабидопсиса по реакции на низкие концентрации ионов калия в среде. В качестве объекта использовали набор инбредных линий *Arabidopsis thaliana* [2]. Растения выращивали в чашках Петри на питательных средах с разными концентрациями ионов калия. Анализ проростков проводили на восемнадцатый день. Анализировали длину корня, длину гипокотили, диаметр розетки и число листьев.

На первом этапе были подобраны пороговые концентрации калия, позволяющие получить начальный отклик роста на содержание калия. Установлена концентрация ионов калия в среде, позволяющая дифференцировать генотипы арабидопсиса по реакции на содержание ионов K^+ . Разные линии показали различную реакцию на добавление калия в среду. Однако у всех изученных отмечено увеличение длины корня в сравнении с контролем (средой содержащей только следы ионов калия). Наибольшее увеличение показателей всех изучаемых признаков отмечено у генотипов HR-5 и Alc-0 опытные растения, которого имели увеличение всех показателей на 34-49%. У растений линий Wt-5, Mt-0 C-24 и Ts-1 отмечено увеличение длины корня, длины гипокотили, в то время как другие показатели статистически не отличались от контроля.

В ходе работы подобрана концентрация ионов калия, позволяющая дифференцировать линии *Arabidopsis thaliana*. Добавление в питательную среду ионов калия приводит к увеличению длины корня у всех изученных генотипов. В то же время изменение других показателей при добавлении калия специфично для каждого генотипа. Выделены линии с минимальной и максимальной реакциями на добавление в среду ионов калия.

Список литературы

1. Elumalai R.P., Nagpal P., Reed J.W. A Mutation in the Arabidopsis *KT2/KUP2* Potassium Transporter Gene Affects Shoot Cell Expansion // *The Plant Cell*, 2002, vol. 14, 119–131.
2. Atwell S., Huang Y. S., Vilhjalmsson B. J., Willems G., Horton M., Li Y. et al. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines // *Nature*, 2010, vol. 465, 627–631.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ЭКСТРАКЦИИ НИЗКО- И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРУКТАНОВ ИЗ КОРНЕЙ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Мазник К.С., Елисеева Ю.В., Матвеева Н.А.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 148, г. Киев, Украина, 03680
E-mail: solieri@ukr.net*

Генетическая трансформация растений является стрессовым фактором и может вызывать целый ряд изменений биохимических процессов в трансгенных растениях. Одним из таких изменений есть повышение уровня синтеза и накопления запасных соединений, в том числе и фруктанов разной степени полимеризации.

Фруктаны низкой степени полимеризации (НМФ) могут быть использованы в качестве заменителей сахара для людей, страдающих диабетом, излишним весом, нарушениями углеводного обмена. Фруктаны высокой степени полимеризации (ВМФ) сегодня используют в качестве пребиотиков, для лечения ранних стадий диабета и сердечно-сосудистых заболеваний.

Трансгенные корни, так же как и природное сырье, могут быть источником получения НМФ и ВМФ, а использование биотехнологических методов позволяет повышать содержание этих соединений. Поэтому разработка методики эффективного выделения и фракционирования фруктанов, определение их содержания в трансгенных корнях, культивируемых *in vitro*, есть актуальным направлением научных разработок.

Существующие методики извлечения различных фракций фруктанов из растительного сырья могут быть разделены на 2 основные группы:

- 1) извлечение с последующим разделением фракций на основании различий в температурах их кристаллизации;
- 2) извлечение фракций, основанное на различии растворимости в этаноле.

Было установлено, что существующие методики имеют ряд недостатков (экстракция в присутствии кислоты, что приводит к гидролизу ВМФ, использование дорогостоящих реактивов и оборудования, использование этанола низких концентраций, что приводит к высоким потерям ВМФ).

В ходе наших экспериментов была исследована зависимость эффективности экстрагирования фруктанов от времени предварительного замачивания, температуры и времени экстракции. Для исследования использовали высушенные и измельченные трансгенные корни цикория *C. intybus* сорта Пала росса и «бородатые» корни салата *Lactuca sativa* L., полученные путем трансформации *Agrobacterium rhizogenes* с вектором pSV161.

На основании экспериментальных данных была построена математическая модель процесса экстракции фруктанов, проверена ее адекватность с помощью критерия Фишера и коэффициента детерминации, найдены оптимальные параметры процесса экстракции с использованием методов линейного программирования. Экстракция в течение 30 минут при 90°C без предварительного замачивания определена как наиболее технологичная и позволяет экстрагировать основную массу фруктанов из трансгенных корней (около 150 мг из 1г высушенных корней).

Следующим этапом исследования был выбор оптимальной методики фракционирования фруктанов. Фракционирование путем вымораживания при +4 °С позволило отделить фракцию ВМФ в количестве 3% от общего количества фруктанов; подобное вымораживание, но с использованием активированного угля для увеличения

количества центров кристаллизации повысило выход ВМФ до 14% от общего количества фруктанов.

В результате двухступенчатой экстракции фруктанов из трансгенных корней (первый этап – экстракция 95% этанолом для отделения НМФ, второй этап – экстракция горячей водой для отделения ВМФ) была выделена фракция ВМФ в количестве 18% от общего содержания фруктанов.

Следовательно, наиболее эффективным режимом извлечения различных фракций фруктанов из трансгенных корней есть двухступенчатая экстракция (сначала этанолом, потом водой) при длительности каждого этапа в 30 минут при 90°C.

Данная методика была опробована и на другом биологическом объекте - трансгенных корнях салата *Lactuca sativa* L. сортов Одесский Кучерявец и Грин Коралл, трансформированные с помощью *Agrobacterium rhizogenes* с вектором pCB161.

Через 30 дней культивирования на агаризованной среде 1/2 МС содержание фруктанов в „бородатых” корнях трансгенного салата варовало от 60,3±0,3 до 117,3±0,8 мг/г высушенного корня.

Таким образом, была разработана оптимальная методика выделения фруктанов из культивируемых *in vitro* «бородатых» корней и продемонстрирована ее эффективность на двух видах растений – *C. intybus* и *L. Sativa*. Эта методика позволяет выделять фруктаны в количестве до 15% от сухой массы, а также разделять низко- и высокомолекулярные фруктаны.

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СПОСОБОВ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ

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

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

Выяснение механизмов функционирования и регуляции активности ферментов, совершенствование развития методов для изучения структуры белков, открыли путь к направленной модификации энзимов и привели к рождению инженерной энзимологии. Имобилизованные ферменты, обладающие высокой стабильностью, становятся мощным инструментом для осуществления каталитических реакций в различных отраслях промышленности. Биотехнологический процесс включает ряд этапов: подготовку объекта, его культивирование, выделение, очистку, модификацию и использование продуктов.

Для удовлетворения пищевых потребностей необходимо увеличить эффективность растениеводства и животноводства. Биотехнология предлагает как источник кормового (возможно, и пищевого) белка клеточную массу бактерий, грибов и водорослей, а также может резко ограничить масштабы загрязнения нашей планеты промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми отходами.

Широко развивающимся в настоящее время, направлением использования коллагенсодержащих отходов является применение материалов, полученных из них, в медицине и ветеринарии. Применение коллагеновых препаратов в медицинской и ветеринарной практике основано на их биологической совместимости к тканям животного организма. Коллаген – перспективное, эффективное, вспомогательное вещество в технологии лекарственных форм, обладающее рядом ценных свойств (пролонгатор, стимулятор регенерации тканей).

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. В промышленном биокатализе используют глюкоамилазы, продуцируемые микроскопическими грибами. рода *Aspergillus*: *A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori* и некоторыми другими, например, *Rhizopus delamari* и *Rhizopus niveus*.

В связи с выше изложенным в нашей работе в качестве носителя фармацевтических препаратов был использован коллаген, выделенный из соединительной ткани крупного рогатого скота.

Нами была осуществлена иммобилизация глюкоамилазы из *Aspergillus awamori*, препарат Г20Х производства Ладыжинского завода ферментных препаратов, подвергнутом специальным методам очистки, на коллагене, выделенном из соединительной ткани крупного рогатого скота.

Для определения каталитической 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:

$$A = \frac{a}{b \times 180 \times 10},$$

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

б- 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.

Осуществлена иммобилизация глюкоамилазы на коллагене. Показано, что фермент-носитель сохраняет 67% каталитической активности свободного энзима.

Обнаружено что, глюкоамилаза, иммобилизованная на коллагене, по сравнению с нативной формой более стабильна к воздействию внешних факторов.

Исследованы физико-химические свойства глюкоамилазы, адсорбционно связанной с коллагеном. Установлено, что иммобилизованный фермент проявляет

максимальную каталитическую активность при температуре 55⁰С, что на 5⁰С выше, чем для свободного энзима

При иммобилизации глюкоамилазы на коллагене наблюдается расширение диапазона значений рН, при которых имеет место максимальная каталитическая активность.

Применение коллагена в качестве носителя ферментативных препаратов является перспективным для дальнейших исследований с целью разработки оптимальных условий получения высокоактивных препаратов пролонгированного действия.

РАЗЛИЧИЕ ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ КОНСЕРВАТИВНЫХ И УНИКАЛЬНЫХ микроРНК ЛЬНА (*Linum usitatissimum* L.), ВЫРАЩЕННОГО В ОПТИМАЛЬНЫХ И СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Мельникова Н.В.¹, Беленикин М.С.¹, Большева Н.Л.¹, Сперанская А.С.^{1,2}, Дмитриев А.А.¹, Лакунина В.А.^{1,2}, Рачинская О.А.¹, Дарий М.В.¹, Юркевич О.Ю.¹, Криницына А.А.², Кишлян Н.В.³, Рожмина Т.А.³, Муравенко О.В.¹, Кудрявцева А.В.¹, Зеленин А.В.¹

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук*
e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

²*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет*

³*Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт льна Российской академии сельскохозяйственных наук*

Изучение механизмов, участвующих в ответных реакциях на действие стрессовых факторов, а также адаптации организмов к неблагоприятным воздействиям необходимо для понимания механизмов эволюции видов и формирования генетического полиморфизма. Подобная информация позволяет более эффективно использовать существующее разнообразие, а также осуществлять направленную селекцию при создании растений, адаптивных к стрессовым воздействиям.

Лен (*Linum usitatissimum* L.) – традиционная сельскохозяйственная культура, являющаяся важнейшим источником растительного сырья для производства волокон и масла. При этом геном льна обладает уникально высокой пластичностью генома, что делает его удобным объектом для исследования регуляторных механизмов адаптации растений к стрессовым факторам внешней среды, а также эволюции геномов растений и формирования генетического разнообразия.

Показано, что при адаптации к определенным стрессовым факторам окружающей среды (недостаточное или избыточное питание, засуха, высокая температура) в некоторых линиях льна-долгунца происходят наследуемые генетические изменения. Растения, унаследовавшие такие изменения, были названы генотрофами. Однако механизмы подобной генетической изменчивости мало изучены.

Показано, что у генотрофов изменяется высота растений, экспрессия генов, количество генов рибосомальной ДНК, появляется инсерция LIS-1 (*Linum insertion sequence 1*) в определенном сайте генома льна. Возможными причинами формирования генотрофов могут быть количественные изменения фракции повторяющейся ДНК,

метилование, активация транспозонов, генные изменения, ацетилование гистонов, факторы транскрипции, а также микроРНК.

Малые некодирующие РНК растений представляют собой класс регуляторных РНК, которые контролируют различные физиологические процессы, такие как рост и развитие, а также регулируют ответные реакции растения на различные стрессовые условия.

Для выделения РНК использовали проростки сорта *Stormont cirrus* трех экспериментальных групп: контрольные условия, избыточное и недостаточное питание (в случае недостаточного питания использовали проростки, у которых методом ПЦР идентифицирована вставка LIS-1, а в случае контрольных условий и избыточного питания - проростки, у которых инсерция LIS-1 отсутствует). Ранее другими исследователями было показано, что условия недостаточного и избыточного питания приводят к формированию генотрофов льна.

Качество выделенной РНК оценивали на приборе Agilent 2100, для дальнейшей подготовки библиотек микроРНК использовали только высококачественную РНК с показателем RIN не менее 8. С использованием наборов для пробоподготовки Illumina TruSeq Small RNASample Prep kit согласно протоколам фирмы-производителя были подготовлены библиотеки микроРНК для секвенирования. Секвенирование проводили на геномном секвенаторе Illumina GAIIx.

В результате секвенирования малых РНК растений льна, выращенных в нормальных условиях, было получено 7.2 млн. прочтений, выращенных в условиях недостаточного питания - 11.6 млн. и выращенных в условиях избыточного питания - 7.6 млн. Большинство малых РНК имели длину 21-24 нуклеотида, причем наиболее многочисленными были малые РНК длиной 21 нуклеотид (25%) и 24 нуклеотида (23%).

Всего было идентифицировано 95 консервативных микроРНК, принадлежащих к 22-м различным семействам, большинство из которых выявлены у льна впервые. Таким образом, использование секвенирования позволило идентифицировать в несколько раз больше консервативных микроРНК, по сравнению с компьютерным поиском в геноме и EST льна, выполненном ранее другими исследователями.

В наибольшей степени экспрессировалось семейство miR166, количественно превосходя другие семейства консервативных микроРНК более чем в 50 раз. Кроме того, семейство miR166 было самым многочисленным и включало 20 представителей. Уровень экспрессии miR160, miR162, miR168, miR319, miR393, miR395, miR396, miR398, miR399, miR408 различался между образцами льна, выращенными в контрольных и стрессовых условиях.

Были идентифицированы 50 уникальных потенциальных микроРНК для льна, выращенного в условиях недостаточного питания, 25 – для нормальных условий и 42 - для условий избыточного питания. Было проведено сравнение профилей экспрессии малых РНК растений льна сорта Stormont Cirrus, выращенных в условиях нормального, недостаточного и избыточного питания и показано наличие дифференциальной экспрессии уникальных микроРНК льна в зависимости от условий выращивания.

Таким образом, мы идентифицировали консервативные и уникальные микроРНК льна, а также провели сравнение профилей экспрессии микроРНК при различных условиях выращивания, что может помочь в лучшем понимании механизмов адаптации льна в ответ на стрессовые воздействия и процесса формирования генотрофов.

Работа поддержана грантами МК-6205.2012.4, РФФИ 12-04-01469 и РФФИ 13-04-01770

РАЗРАБОТКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Минакова Н.Ю.², Долинская Е.В.¹, Колобова О.С.^{1,2}, Копина М.Б.³, Мазурин Е.С.³

¹ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42., E-mail: iab@iab.ac.ru

²ЗАО «Синтол», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42., E-mail: syntol@syntol.ru

³ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», 140150, Московская область, Раменский район, п. Быково, ул. Пограничная, д. 32, E-mail: office@vniikr.ru

Карантинные болезни растений относят к наиболее вредоносным из-за больших потерь урожая, уничтожения посадок и вывода земель из использования. Карантинные организмы подразделяют на отсутствующие и ограниченно распространенные на территории РФ, поэтому необходим постоянный мониторинг посадочного и семенного материала на предмет их заражения и контроль завоза карантинных патогенов из-за рубежа.

Разработка тест-систем на основе полимеразной цепной реакции в «реальном времени» (ПЦР-РВ) позволяет выявлять инфекцию на разных стадиях ее развития, определять наличие бактерий или вирусов в любом, даже малом, количестве анализируемого материала.

Нами были разработаны 4 набора реагентов для диагностики бактериальных и вирусных болезней картофеля, сахарной свеклы и косточковых культур:

- «RALSTONIA SOLANACEARUM-РВ» для идентификации возбудителя бурой гнили картофеля *Ralstonia solanacearum*, биовар 2 раса 3;
- «Clavibacter michiganensis-РВ» для идентификации возбудителя кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*;
- «РИЗОМАНИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ - РВ» для идентификации возбудителя некротического пожелтения жилок свеклы *Beet necrotic yellow vein virus*;
- «ВИРУС ШАРКИ (ОСПЫ) СЛИВЫ - РВ» для идентификации возбудителя шарки сливы *Plum pox virus*.

Для разработки наборов реагентов использовались уникальные и рекомендованные праймеры «Европейской и средиземноморской организацией по карантину и защите растений» (ЕРРО), а также реактивы производства компании «Синтол». Для выявления РНК вируса шарки сливы нами были подобраны праймеры и зонд к последовательности гена, кодирующего белок оболочки и позволяющие выявить все штаммы возбудителя этого заболевания (W, D, M, C и CR).

ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 (Синтол/ИАП РАН, Россия) по программе (для возбудителей бурой и кольцевой бактериальных гнилей): 95°C-300 сек., (60°C-40 сек., 95°C-15 сек.) 45 циклов. Для обнаружения в исследуемом образце РНК вирусов шарки сливы и ризомании сахарной свеклы проводили реакцию обратной транскрипции, совмещенную в одной пробирке с ПЦР-РВ (ОТ-ПЦР-РВ). Программа амплификации: 60°C-900 сек., 95°C-300 сек., (60°C-40 сек., 95°C-15 сек.) 45 циклов.

Для контроля прохождения реакции ОТ-ПЦР-РВ и ПЦР-РВ в каждой пробирке одновременно с реакцией обнаружения РНК или ДНК возбудителя проходит реакция обнаружения РНК или ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК) – синтетического РНК транскрипта (для ОТ-ПЦР-РВ) или плазмидной ДНК (для ПЦР-РВ). Данная реакция позволяет исключить ложноотрицательные результаты исследования, так как отсутствие сигнала флуоресценции на канале детекции

красителя, соответствующего зонду, комплементарному фрагменту ВПК, свидетельствует об ингибировании реакции.

В ходе лабораторных испытаний были получены данные по аналитической чувствительности, аналитической специфичности, повторяемости и воспроизводимости наборов реагентов.

Для испытания аналитической специфичности набора реагентов «RALSTONIA SOLANACEARUM-PB» использовалась ДНК возбудителей, встречающихся на данном растении-хозяине – 7 штаммов вида *Ralstonia solanacearum* раса 3 биовар 2; 2 штамма вида *Ralstonia solanacearum* I филотип, раса 1; 5 штаммов *Dickeya* sp., 3 штамма *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, а также ДНК нецелевых микроорганизмов – 2 штамма *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) и 6 штаммов возбудителей бактериальных болезней других родов (*Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Pantoea dispersa*, *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, *Xanthomonas fragariae*).

Для испытания аналитической специфичности набора реагентов «CLAVIBACTER MICHIGANENSIS-PB» использовалась ДНК возбудителей, встречающихся на данном растении-хозяине – 3 штамма вида *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*; 5 штаммов вида *Ralstonia solanacearum* раса 3 биовар 2; 5 штаммов *Dickeya* sp, а также ДНК нецелевых микроорганизмов – 4 штамма *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* и 6 штаммов возбудителей бактериальных болезней других родов (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* - Pss1, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* , *Pantoea dispersa*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas fragariae*).

При испытании аналитической специфичности набора «Вирус шарки (оспы) сливы - PB» использовалась РНК 11-ти изолятов PPV (штаммы W, D, M, C и CR) и 8 нецелевых видов вирусов (*Plum Pox virus*, *Prunus Necrotic Ringspot Virus*, *Apple mosaic ilarvirus*, *Potato Virus Y*, *Potato Virus A*, *Apple Mosaic Virus*, *Tomato ringspot virus*, *Raspberry Ringspot Virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*) в средней концентрации.

При испытании аналитической специфичности набора «РИЗОМАНИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ - PB» использовались изоляты BNYVV, положительные контроли для ИФА к BNYVV, изоляты нецелевых объектов - вируса Q свеклы (BVQ) и почвенного вируса свеклы (BSBV)

Аналитическая чувствительность испытуемых наборов реагентов составила не менее $3 \cdot 10^3$ КОЕ/мл для «CLAVIBACTER MICHIGANENSIS-PB» и $5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл для «RALSTONIA SOLANACEARUM-PB». Для наборов реагентов на выявление РНК вирусов ризомании сахарной свеклы и шарки сливы аналитическая чувствительность находилась в пределах 5-ого и 6-ого разведения РНК объекта в средней концентрации.

Аналитическая воспроизводимость результатов исследования для каждого набора реагентов составила 100%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанные наборы реагентов позволяют достоверно диагностировать возбудителей бурой и кольцевой бактериальных гнилей, ризомании сахарной свеклы и шарки сливы и могут использоваться для диагностики этих возбудителей.

**ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana*,
СЕКРЕТИРУЮЩИХ МИКРОБНУЮ ФИТАЗУ *PhyCg Bacillus ginsengihumi***

**Нямсүрэн Ч.¹, Валеева Л.Р.¹, Ахметова А.И.¹, Сулейманова А.Д.¹, Балабан Н.П.¹,
Шакиров Е.В.², Шарипова М.Р.¹**

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт
фундаментальной медицины и биологии, Казань 420008*

Chuka_ch@mail.ru

²*Department of Biology, Texas A&M University, College Station, TX 77843-3155, USA*

Одним из главных ограничивающих факторов роста сельскохозяйственных культур является недостаточное содержание неорганического фосфора в почве. Для увеличения урожайности растений широко применяются фосфорные удобрения, однако только 10-20% из них усваиваются растениями, в то время как остальная часть становится недоступной для растений вследствие соединения с почвенными органическими и неорганическими веществами. Перспективным направлением развития сельского хозяйства является возможность утилизации органических фосфорсодержащих соединений почвы, таких как фитат. Большинство растений не обладают способностью секретировать в ризосферу ферменты фитазы, способные расщеплять фитаты до легко усваиваемых остатков фосфорной кислоты и миоинозитола. В настоящее время существует возможность использования фитаз микробного происхождения, но их широкое применение в сельском хозяйстве осложняется необходимостью регулярного внесения бактерий-продуцентов в почву, что не выгодно с экономической точки зрения. Таким образом, создание генетически модифицированных растений, несущих гены секретлируемых фитаз бактериального происхождения, представляется наиболее перспективным направлением биотехнологии растений, направленной на улучшение роста растений в обедненных фосфором почвах.

Целью работы явилось получение и предварительный анализ генетически модифицированных растений *Arabidopsis thaliana*, обладающих геномной вставкой на основе гена фитазы *Bacillus ginsengihumi* (*phyCg*). Нуклеотидная последовательность гена бактериальной *phyCg* была предварительно оптимизирована с помощью программы CodonAdaptationTool (<http://www.jcat.de/>) для повышения уровня экспрессии трансгенной фитазы в *A. thaliana*. Оптимизированный ген бациллярной фитазы был клонирован в бинарный вектор *pCBK05* под контролем промотора *Pht1;2*. Экспрессия промотора *Pht1;2* происходит только в эпителиальных клетках корней *A. thaliana* и индуцируется недостатком неорганического фосфора в ризосфере. Полученная конструкция также содержит последовательности, кодирующие сигнальный пептид белка экстенсина *AtExt3*, необходимого для секреции фермента в ризосферу, и 3'-концевые *His* и *Strep* последовательности для последующей эффективной детекции и очистки белка. Полученная конструкция была клонирована по сайтам рестрикции в бинарный вектор *pCBK05*. Трансформация *A. thaliana* была проведена методом макания цветков в суспензию клеток *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Селекция трансформантов проводилась на среде MS с добавлением селективного гербицида BASTA. По результатам трансформации были получены трансгенные растения первого и второго поколения. Наличие трансгенной вставки в геноме растений было подтверждено методом ПЦР с использованием праймеров к гену фитазы и последовательности экстенсина. Таким образом, нами была сконструирована гетерологичная система экспрессии бактериального гена фитазы в растениях,

включающая в себя сигнальный пептид экстенсина AtExt3 и ген фитазы *B. ginsengihumi* (*phyCg*) под контролем индуцируемого промотора *Pht1;2*.

Предлагаемая нами биотехнология как методика целевой экспрессии гена бациллярной фитазы в корнях растений с последующей секрецией фермента в ризосферу обладает значительным потенциалом и способна помочь решить многие актуальные проблемы, стоящие сегодня на пути улучшения роста и урожайности сельскохозяйственных растений, выращиваемых на обедненных фосфором почвах.

Данный проект поддержан грантом ФЦП Соглашение № 14.А18.21.0849.

ДИАГНОСТИКА ПОЛИПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОРЯДКА *Burkholderiales*

Кунда М.С.¹, Аксенова Е.И.¹, Орлова А.А.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва 123098

²МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, каф. генетики, Москва 119234

E-mail: annaf-orlova@yandex.ru

Буркхолдерии – микроорганизмы, широко распространенные в окружающей среде: почве и грунтовых водах. Впервые они были обнаружены в 1940-х годах Вальтером Буркхолдером в мацерированных луковичах *Allium cepa*. К полипатогенным относится 19 близкородственных видов буркхолдерий, объединенных в *Burkholderia ceracia* complex (Всс).

Другой представитель порядка *Burkholderiales* - *Achromobacter sp.*, обитающий в водной среде, менее опасен для растений, однако вызывает осложнения у больных со сниженным иммунным статусом.

Дифференциация *Achromobacter sp.* и Всс – сложный процесс, поскольку *Achromobacter sp.* способен расти на селективной среде для буркхолдерий (BCSA), и практически не отличается от Всс по фенотипическим признакам. Поэтому разработка схемы идентификации *Achromobacter sp.* и Всс - актуальная задача, решение которой позволит отличить более опасные полипатогенные бактерии – Всс, от *Achromobacter sp.*

Для различения *Achromobacter sp.* и Всс нами разработана методика экспресс-анализа на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ). Методика включает выделение ДНК из биологического материала с помощью набора DNA-Extra-Sorb, амплификацию фрагмента гена *gltB* (большая субъединица глутамат синтазы) с праймерами Spilker T. et al. в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I и последующий анализ кривых плавления. Для снижения температуры плавления GC-богатых матриц, к которым относятся ДНК Всс и *Achromobacter spp.*, в реакционную смесь добавляли DMSO (Dimethyl sulfoxide) и (D+)-трегалозу. В этих условиях происходило образование специфического продукта с Tm около 90⁰С только для ДНК Всс, что было подтверждено анализом ДНК штаммов 5 наиболее распространенных видов буркхолдерий (*B. multivorans*, *B. cenoseracia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. contaminans*). Для ДНК *Achromobacter sp.*, а также *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, взятых для контроля, амплификация специфического продукта не наблюдалась. Предложенная методика позволяет

проводить быстрый предварительный скрининг биологического материала на наличие Всс.

Для дифференциации видов и генотипов Всс на основе анализа ДНК, выделенной непосредственно из биологического материала, предложена методика амплификации и секвенирования 3-х мишеней: *recA* (рекомбиназа А), *gltB*, *gyrB* (субъединица В ДНК гиразы). Методика основана на схеме MLST (Multilocus Sequence Typing) Spilker T. et al., включающей 7 мишеней, и данных базы аллельных профилей штаммов Всс, циркулирующих в РФ, созданной в НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи.

Анализ генов *recA* и *gltB* позволяет подтвердить различия Всс и *Achromobacter sp.* и установить вид Всс. На основе последовательности гена *gyrB* можно дифференцировать близкородственные генотипы *B. cenoseptica*. Кроме того, секвенирование фрагмента гена *gltB*, синтез которого возможен в отсутствие SYBR Green I для *Achromobacter sp.*, позволяет определить вид *Achromobacter* и аллельные варианты внутри вида.

Дополнительная мишень - *16S rDNA*, необходима для идентификации микроорганизмов, доминирующих в биологическом материале, но не относящихся к Всс и *Achromobacter sp.*

Таким образом, разработанные методические подходы позволяют быстро и эффективно обнаружить и дифференцировать *Achromobacter sp.* и Всс в биологическом материале различного происхождения и определить генотип Всс, сократив временные и финансовые затраты по сравнению со стандартным методом анализа, включающим культивирование микроорганизмов.

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО РАПСА МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Боровская С.В.^{1,2}, Варламов Д.А.^{1,2}, Колобова О.С.^{1,2}, Пашкевич О.И.²

¹*ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42., E-mail: iab@iab.ac.ru*

²*ЗАО «Синтол», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42., E-mail: syntol@syntol.ru*

Рапс является ценной масличной культурой с содержанием масла в семенах 40-48%, а рапсовое масло является одним из наиболее потребляемых растительных масел в мире.

Современная агротехника рапса требует обязательного применения гербицидов, поэтому ведется постоянная работа над повышением устойчивости к ним культуры. Наиболее впечатляющие результаты в этой области были достигнуты методами генной инженерии, когда были созданы линии генетически модифицированного (ГМ) рапса, несущие различные бактериальные гены и регуляторные элементы, придающие ему устойчивость к гербицидам.

В Российской Федерации нет официально разрешенных к применению и выращиванию линий ГМ рапса. С учетом роста экспорта и импорта семян рапса в последнее время и необходимостью предотвращения несанкционированного использования генетически модифицированных организмов возникла потребность в создании набора реагентов для обнаружения ГМ рапса.

На сегодняшний день лучшим рутинным методом для обнаружения генетически модифицированных организмов является полимеразная цепная реакция в реальном

времени (ПЦР-РВ). Она позволяет получить результат за несколько часов и использовать практически любой материал для анализа, за исключением подвергнувшегося глубокой термической переработке или очистке. Кроме того, возможно проводить мультиплексный анализ, т. е. независимо определять до 4-5 ДНК-мишеней одновременно. При этом стоимость анализа остается низкой.

Для основных коммерчески выращиваемых линий рапса можно выделить набор генов и регуляторных элементов, позволяющих определить факт генетической модификации рапса. К ним относятся: гены устойчивости к гербицидам *cp4 epsps* и *pat* и терминатор *nos*. Для амплификации эндогенного контроля, позволяющего оценить наличие ДНК рапса и качество ее выделения, был использован ген рапса *hmg I/Y*.

Для амплификации каждого из вышеупомянутых генетических элементов подбирали, согласно сиквенсам из GenBank, и синтезировали праймеры и зонды. Всего набор реагентов содержит пять комбинаций праймеров и зонда: по одному для детекции генов *pat*, *hmg I/Y* и терминатора *nos* и две для детекции двух различных модификаций гена *cp4 epsps*.

Для постановки ПЦР использовали готовую 2,5-х кратную реакционную смесь с Taq-ДНК полимеразой с горячим стартом (Синтол, Россия). В нее добавляли по 5 пмоль каждого праймера и зонда, 5 мкл исследуемой ДНК и стерильной бидистиллированной воды до конечного объема 25 мкл. ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 (Синтол/ИАП РАН, Россия) по программе: 95°C-180 сек., (60°C-40 сек., 95°C-15 сек.) 45 циклов.

Для испытания набора реагентов были использованы стандартные образцы, содержащие 1% ДНК линий рапса MS8xRf3, GS40/90, GT73 и Оху235 (Sigma-Aldrich, США), ДНК, выделенное из семян рапса, с содержанием ГМ-рапса линии GT73 в количестве <0,5% (АОСС, США), семян 5 сортов не ГМ рапса (предоставленных ГНУ ВНИИ рапса Россельхозакадемии), листьев растений не ГМ рапса, а также стандартных образцов линий ГМ кукурузы, сои и риса, несущих аналогичные генетические модификации, и различных пищевых продуктов.

Определение эффективности работы мультиплексной системы проводили на ДНК линий ГМ рапса и не ГМ рапса. Эффективность ПЦР-РВ для разработанного набора составила более 90%. Коэффициент корреляции при исследовании серии четырех десятикратных разведений R^2 составил 0,99.

Специфичность работы праймеров и зондов определяли на ДНК линий ГМ рапса и не ГМ рапса, линиях ГМ кукурузы, сои и риса, пищевых продуктов. Полученные результаты демонстрируют полную специфичность выбранных праймеров. Набор специфично определяет наличие гена *hmg I/Y* в образцах линий ГМ рапса и не ГМ рапса. Терминатор *nos*, гены *pat* и *cp4 epsps* специфично детектируются как в образцах линий ГМ рапса, так и в образцах других содержащих данные элементы ГМ растений.

Всего набор был апробирован на образцах 4 линии ГМ рапса, 6 сортах не ГМ рапса, 4 линиях ГМ сои, 10 линиях ГМ кукурузы, 1 линии ГМ риса и 5 видах не ГМ растений, наиболее часто встречающихся в продуктах питания (соя, кукуруза, рис, картофель, пшеница). Специфичность определения составила 100%, аналитическая чувствительность составила 10 геном-эквивалентов в реакции.

Таким образом, разработанный набор можно использовать для анализа семян и зеленых растений рапса для скрининга ДНК ГМ рапса. Его можно рекомендовать заинтересованным организациям для оценки качества зерна и продуктов его переработки и проверки качества семян.

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИИ МЕТАНОЛА КАК СИГНАЛА МОБИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СООБЩЕСТВА В ОТВЕТ НА ТРАВМУ И ВТОРЖЕНИЕ ПАТОГЕНА

Петруня И.В.¹, Комарова Т.В.², Дорохов Ю.Л.²

¹*РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия, e-mail: petrunyaiv@gmail.com*

²*Институт Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия*

Растение в своей жизни подвергается воздействию широкого спектра биотических и абиотических факторов. Через любое повреждение растения может происходить проникновение бактерий или вирусов. Растения в ответ на вторжение вируса и бактерий синтезируют макромолекулы (РНК и белки), транспортируемые в различные клетки и органы растений и включающих повышенную транскрипцию некодирующих и кодирующих участков генома, вовлеченных в адаптивные реакции растений. Существует три уровня движения макромолекул по растению: (а) ядерно-цитоплазматический транспорт; (б) межклеточное перемещение (ближний транспорт); (в) дальний транспорт по сосудистой системе растения. Вирусы растений, активно используют ближний и дальний транспорт для переноса генетического материала по растению. Бактерии, как внеклеточные патогены, при колонизации используют ядерно-цитоплазматический транспорт, вводя белковые факторы вирулентности в хозяйское ядро для его «переформатирования».

В интактном растении табака только маленькие верхние быстрорастущие листья, являющиеся акцепторами (*sink*) фотоассимилятов, характеризуются наличием «открытых» плазмодесм и интенсивным межклеточным транспортом. Эти листья, однако, не представляют собой природных «ворот» инфекции и малопригодны для экспериментального заражения. С другой стороны, зрелые крупные листья табака, являющиеся донорами (*source*) фотоассимилята и содержат плазмодесмы, которые «закрываются» для крупных макромолекул. Пропускная способность плазмодесм *source*-листьев увеличивается при вирусной инфекции, например, за счет транспортного белка вируса. Оптимальной экспериментальной системой могли бы быть растения, у которых плазмодесмы *source*-листьев «открываются» при воздействии газообразного вещества, не повреждающего листья и не вносящего в систему фактор травмы.

Летучие органические вещества, которые могут играть роль коммуникативных сигналов между растениями, известны достаточно давно. Среди них идентифицирован метанол, который образуется в реакции деметилирования пектина ферментом клеточной стенки табака, пектинметилэстеразой (ПМЭ). Использование такой экспериментальной системы контролируемого межклеточного транспорта позволит изучить молекулярные механизмы участия ПМЭ и его продукта метанола не только в качестве участников процесса межклеточного транспорта макромолекул, но и факторов мобилизации растительного сообщества в ответ на травму и вторжение вирусного или бактериального патогена.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ЯБЛОНИ, МАЛИНЫ И ЧЁРНОЙ СМОРОДИНЫ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВНИИСПК, ОРЕЛ

Пикунова А.В., Князев С.Д., Седов Е.Н., Богомолова Н.И.

ГНУ ВНИИ селекции плодовых культур Россельхозакадемии, Орловская область, Орловский район, п/о Жилина, 302530, pikuanna84@mail.ru

Плодово-ягодные культуры занимают особое место в питании человека благодаря содержанию целого ряда витаминов, антиоксидантов, сахаров, важных минеральных веществ, а так же присущим им лечебным свойствам. Улучшение сортимента сортов будет способствовать повышению урожайности и потребления фруктов.

Успех селекционных исследований во многом зависит от изучения, подбора и систематизации исходного материала [1]. В приложении к вегетативно-размножаемым высоко гетерозиготным плодово-ягодным культурам метод ДНК-генотипирования по микросателлитным локусам является весьма перспективным и широко используется в зарубежных исследованиях. Востребованность микросателлитных маркеров в целях идентификации и паспортизации сортов связана с их кодоминантной мультиаллельной природой и высокой воспроизводимостью результатов анализов [2].

В данной работе проведено генотипирование микросателлитных локусов чёрной смородины, малины и яблони из коллекции ВНИИСПК, Орел.

ДНК выделяли из молодых листьев СТАВ методом в лаборатории биохимической генетики, ВНИИСПК. Анализ полиморфизма ранее опубликованных микросателлитных локусов [3,4,5] проводили методом разделения в 6% денатурирующем ПААГ с последующим окрашиванием нитратом серебра [6] на базе лаборатории генетики растений, ИОГЕН им. Н.И. Вавилова РАН, Москва. Размеры фрагментов определяли путём сравнения с маркером молекулярного веса 10 bp DNA Ladder (Invitrogen™, США).

Проведено генотипирование 12 сортообразцов малины по 9 микросателлитным локусам; 27 сортообразцов чёрной смородины (из них 16 сортов селекции ВНИИСПК) по 13 микросателлитным локусам; 19 сортообразцов яблони (из них 17 селекции ВНИИСПК) по пяти микросателлитным локусам. Для каждой культуры выявлены редкие и уникальные аллели, наиболее полиморфные и информативные локусы, оценен межсортовой полиморфизм, а также возможность использования полиморфизма микросателлитных локусов для идентификации сортов. В результате генотипирования малины и чёрной смородины был получен уникальный для каждого протестированного сортообразца мультилокусный профиль. Минимальный набор из двух локусов позволяет различить все протестированные сортообразцы малины друг от друга. Минимальный набор из четырёх локусов позволяет различить все протестированные сортообразцы чёрной смородины друг от друга. Однако при генотипировании сортов яблони пяти протестированных локусов оказалось недостаточно для различения всех генотипов. Аллельный полиморфизм в двух из этих локусов (CH02b10, рис., COL) позволяет различить друг от друга 17 из 19 протестированных сортообразцов яблони.

У сортообразцов чёрной смородины была проведена проверка данных родословных на основании распределения микросателлитных аллелей. Так сорт Лентяй и сорта, полученные от него в первом поколении (Ажурная, Орловский Вальс, Сладстена), как и ожидалось, имеют хотя бы одну общую аллель во всех 13-ти протестированных локусах. Такая же ситуация наблюдалась с сортом Минай Шмырёв и сортами, полученными от него в первом поколении (Зуша, Лентяй, Орловская

Серенада), а так же с Экзотикой и потомками этого сорта в первом поколении – сортами Кипиана, Гамма, Грация. Однако, у сорта Очарование, для которого по родословной Экзотика является отцовской формой - в трёх локусах нет общих аллелей. Возможно, что в действительности произошло опыление другой пыльцой, нельзя так же исключить возможности ошибки при размножении черенков. Сорта Оджебин и Бинар (Оджебин x Нарядная) не имеют общих аллелей в двух микросателлитных локусах.

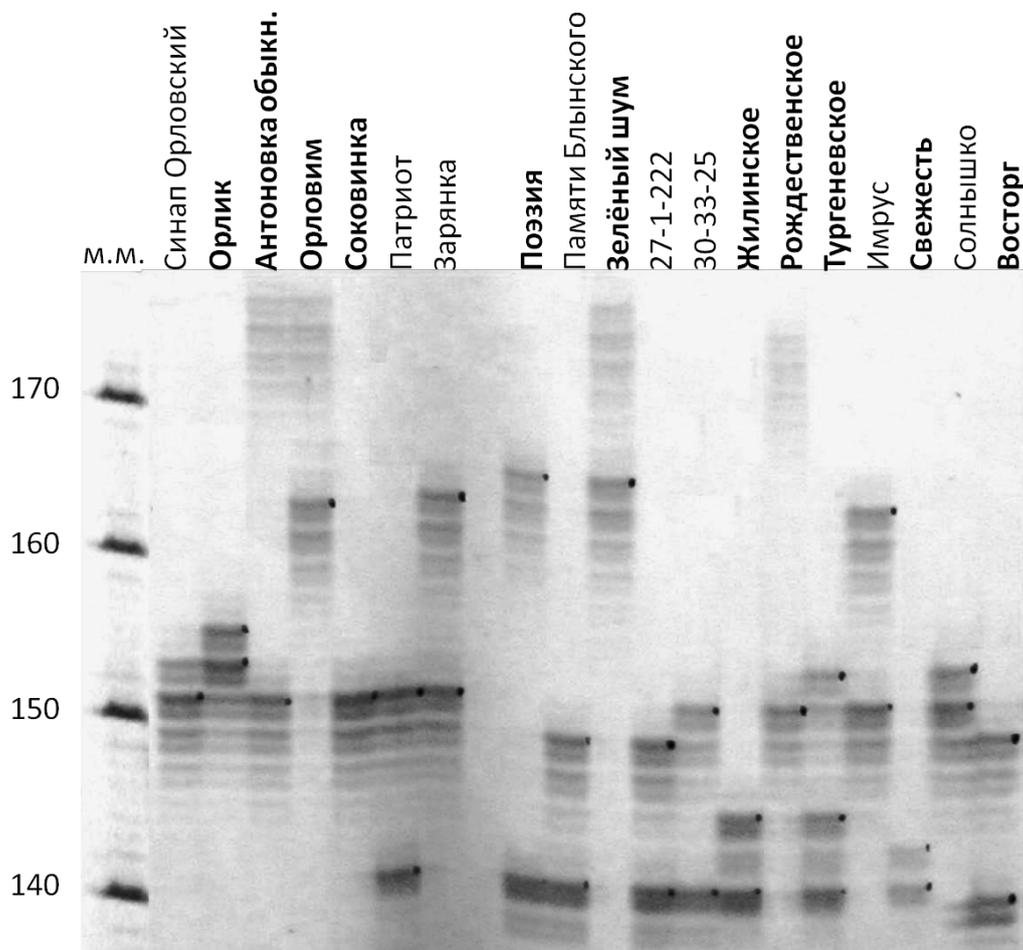


Рис. Электрофореграмма ПЦР продуктов локуса SN02b10 амплифицированного на ДНК яблони (слева указаны размеры фрагментов маркера молекулярного веса (м.м.), п.н., вверху – названия сортообразцов, жирным выделены сортообразцы имеющие уникальный профиль в этом локусе).

При генотипировании сортообразцов яблони по локусу SN-Vf1, различные аллельные варианты которого сцеплены с генами устойчивости к парше *Vf* (*Rvi6*) и *Val* (*Rvi17*) [7], у 10 сортообразцов был обнаружен аллель сцепленный с геном *Vf*, у 7 сортообразцов - аллель сцепленный с геном *Va*.

Таким образом, нами впервые в России проведено генотипирование микросателлитных локусов для оценки генетического полиморфизма отечественных коллекций малины и чёрной смородины. Большинство протестированных сортообразцов яблони ранее не анализировалось с помощью микросателлитных маркеров. Полученные данные могут быть использованы для разработки системы молекулярной идентификации и паспортизации данных культур.

Список использованной литературы

1. Вавилов, Н.И. Теоретические основы селекции. / Н. И. Вавилов.- М.: Наука, 1987. -511 с.
2. Урбанович, О.Ю. Молекулярные методы паспортизации сортов груши / О.Ю. Урбанович, А.А. Хацкевич, З.А. Козловская, Н.А. Картель// Молекулярная и прикладная генетика. сборник науч. трудов, том 9, Минск-2009. - С.160-166.
3. Brennan R, Jorgensen L, Woodhead M, Russell J. 2002. Development and characterization of SSR markers in Ribes species. Mol. Ecol. Notes 2(3): 327-330.
4. Liebhard, R. Gianfranceschi, L. Koller, B. Ryder, C. D. Tarchini, R. Weg, E. van de Gessler, C. (2002) Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). Molecular Breeding 10(4): 217-241.
5. Woodhead, M., Smith, K., Williamson, S., Cardle, L., Mazzitelli, L., Graham, J. (2008) Identification, characterisation and mapping of simple sequence repeat (SSR) markers from raspberry root and bud ESTs. Mol. Breed. 22:555–563.
6. Маниатис, 1984 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984, 479 с.
7. Bus, V., Rikkerink, E., Aldwinckle, H.S., Caffier ... and van de Weg, W.E. 2009. A proposal for the nomenclature of *Venturia inaequalis* races. Acta Hort. 814:739-746.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ КАРИОТИПИРОВАНИЯ ХРОМОСОМ *CANNABIS SATIVA* L.

Разумова О.В., Александров О.С., Дивашук М.Г., Киров И.В., Карлов Г.И.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.
Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Москва 127550
E-mail: razumovao@gmail.com*

Конопля посевная - (*Cannabis sativa* L.) – старейшая сельскохозяйственная культура. Возделываемая человеком уже около 10000 лет [1], она нашла самое широкое применение в различных отраслях народного хозяйства. Помимо этого, конопля является интересным объектом для цитогенетических исследований.

Конопля – одно из первых двудомных растений, у которого был обнаружен балансовый механизм определения пола с системой половых хромосом XX/XY [2, 3, 4]. Однако, до настоящего времени нет четкого понимания особенностей определения пола у *Cannabis*. Возникновение моноцидных форм, образование спектра половых типов, отсутствие однозначного представления о вкладе Y-хромосомы в процессы половой детерминации делают исследования хромосом конопли весьма актуальными.

Целью данной работы было молекулярно-цитогенетическое маркирование хромосом *Cannabis sativa*. Диплоидный набор хромосом *Cannabis sativa* $2n=20$, хромосомы среднего размера, метацентрические, морфологически трудно различимы при монохромном окрашивании. Однако, современные методы молекулярной цитогенетики, в частности, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), позволяют надежно маркировать даже сходные по морфологическим признакам хромосомы.

В данной работе было проведено маркирование хромосом *C. sativa* с использованием сателлитных повторов ДНК, 45S и 5S рДНК. Поиск сателлитных последовательностей ДНК был выполнен с помощью программы «Tandem repeat finder». В результате был обнаружен тандемный повтор, длиной 375 п.н. (CS375), который на препаратах митотических хромосом локализуется в субтеломерном районе.

Было отмечено, что на одной паре хромосом как женских, так и мужских растений субтеломерный повтор присутствует только в дистальном районе короткого плеча. Y-хромосома также несет сигнал только на коротком плече, однако ее можно легко отличить по размеру (самая крупная хромосома) и яркому, богатому гетерохроматином, длинному плечу. Помимо субтеломерного повтора, был выявлен сателлитный повтор длиной 237 п.н. (CS237), который колокализуется на спутничных хромосомах с 45S на коротком плече, в области вторичной перетяжки, а также на сателлитах. Помимо этого сигнал CS237 присутствует на одной из пар аутосом, в середине короткого плеча. Последовательность 5S рДНК также локализуется в середине короткого плеча одной из пар хромосом. Совместная FISH-локализация 5S и CS237 на одних и тех же метафазных пластинках показала, что сигналы этих повторов находятся на разных парах хромосом.

Таким образом, в данной работе была осуществлена идентификация четырех пар аутосом и Y-хромосомы *Cannabis sativa*.

Работы выполнены при поддержке Министерства образования и науки РФ, Соглашение № 8588.

Список литературы

1. Merlin, M.D., Archaeological evidence for the tradition of psychoactive plant use in the old world. // *Economic Botany* – 2003. – 57 – p. 295–323
2. Schaffner J.H. Heredity and sex. // *Ohio Journal of Science*. – 1929. – V. 29(1) – pp. 289–300.
3. Schaffner J.H. The fluctuation curve of sex reversal in staminate hemp plants induced by photoperiodicity. // *American Journal of Botany*. – 1931. – V. 18(6) – pp. 424–430.
4. Hirata K. Sex reversal in hemp. // *Journal of the Society of Agriculture and Forestry*. – 1924. – V. 16 – pp. 145–168

ЗАВИСИМОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЭКСПЛАНТА ОТ ЕГО РАСПОЛОЖЕНИЯ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

Сащенко М.Н.

ГНУ Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова Россельхозакадемии, 396030 Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 86, 8(47340) 5-33-27, samani84@mail.ru

Одним из наиболее динамично развивающихся направлений, ориентированных на создание нового исходного материала для селекции, является использование биотехнологических методов. За последнее десятилетие биотехнология значительно расширила свои границы благодаря развитию и совершенствованию методов культивирования растительных клеток *in vitro* и углублению знаний о генетических процессах, происходящих на уровне клеток и тканей. Основное преимущество метода микроклонального размножения по сравнению с другими классическими методами – в значительно более высоком коэффициенте размножения. Если обычным способом (черенками, луковичками, корневищами и т.д.) от одного растения можно получить 10 – 100 растений в год, то методом микроклонального размножения их число в зависимости от вида можно увеличить от 50 тысяч до миллиона. Таким образом, для обеспечения необходимого объема растений какой – либо селекционной программы могут быть использованы единичные и суперэлитные растения. В этом и заключается высокая экономичность метода.

Наши исследования были направлены на поиск оптимальных условий культивирования регенерантов гороха в культуре тканей.

Исходным материалом для исследований служили сорта и линии гороха селекции ВНИИСС.

Анализ литературных источников показал, что для проведения биотехнологических исследований на горохе в качестве эксплантов для получения регенерантов использовали верхушки стеблей, междоузлия, корни и листовые пластинки (Юркова, 1977; Внучкова, 1984; Ежова и др., 1985; Уразбахтина, 1990; Соболева, 2005). Для этого в опытах были исследованы питательные среды с большим содержанием гормонов (БАП, НУК, Кн, 2,4 - Д).

Однако использование в качестве эксплантов различных частей асептических проростков гороха – апикальная часть стебля, часть стебля с пазушной почкой, и их расположение на питательной среде (вертикальное или горизонтальное) позволило получить интересные данные.

В ходе исследований было отмечено, что при культивировании верхушечных частей растения в горизонтальном положении на питательных средах с умеренным гормональным фоном (БАП 0,5 + ИМК / ИУК 0,1) коэффициент размножения равнялся 2 (рис. 1).

Изучение повышенных концентраций гормонов положительных результатов не дало. Вертикальное расположение проростков (частичное погружение) на питательной среде с БАП 0,5 + ИМК 0,1 дало возможность повысить выход микроклонов до 3 штук с одного введенного экспланта и до 4 штук при повышенной гормональной нагрузке среды (БАП 5,0 + НУК 0,2).

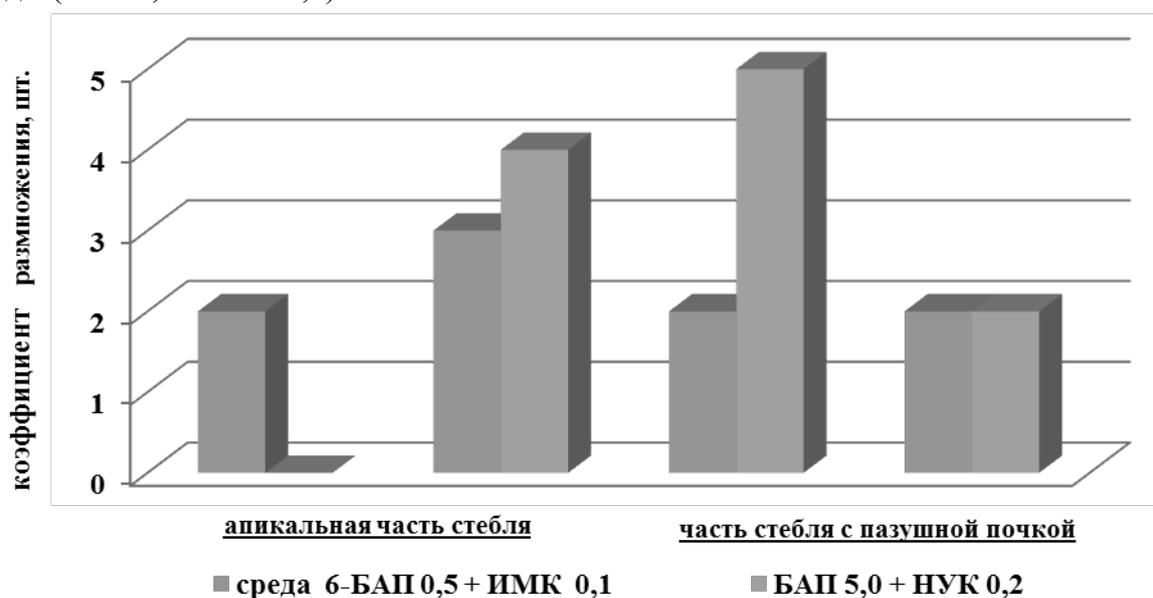
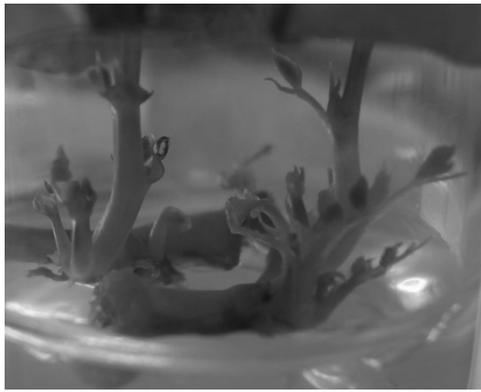


Рис. 1. Регенерационная способность эксплантов.

Активный рост и развитие эксплантов был замечен на стебле с пазушной почкой, помещенных горизонтально на поверхность питательной среды (БАП 5,0 + НУК 0,2). Коэффициент размножения на данном варианте среды равнялся 5, в то время как на среде с БАП 0,5 + ИМК 0,1 не превышал 2 (рис.2).



А



Б

Рис. 2. Способность к микроразмножению при горизонтальном положении на питательной среде: А – БАП 5,0 + НУК 0,2; Б – БАП 0,5 + ИМК 0,1.

Культивирование частей стебля с пазушной почкой вертикально на среде не привело к повышению коэффициента размножения. На средах с повышенной гормональной нагрузкой отмечалось оводнение тканей, но гибели экспланта не наблюдалось. Коэффициент размножения был на уровне 2 регенерантов с одного введенного.

Таким образом, микроразмножение гороха можно вести на средах с различной гормональной нагрузкой, при этом необходимо учитывать положение эксплантов на среде. Для повышенных концентраций (БАП 5,0 + НУК 0,2) оптимальным является горизонтальное положение, для умеренной (БАП 0,5 + ИМК 0,1) – вертикальное.

О ФУНКЦИЯХ БЕЛКОВ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА В РАСТЕНИЯХ

Таранов В.В.

**ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, тел.: (499)9770938, факс: (499)9770947
E-mail: y.taranov1@gmail.com**

В близком к *Arabidopsis thaliana* растении-экстремофите *Thellungiella salsuginea* (новой модели для изучения стресс-устойчивости) идентифицированы четыре гена, кодирующие белки с доменом холодного шока (CSDP). Белки *T. salsuginea*, обозначенные TsCSDP1–TsCSDP4, имеют почти идентичные CSD, но различаются числом следующих за ними мотивов “цинковый палец”, разделенных богатыми глицином участками. В соответствии с количеством мотивов “цинковый палец” CSDP можно разделить на 2 класса: короткие, содержащие 2 мотива “цинковых палец” и длинные, с 6–7 мотивами “цинковый палец”. Для исследования их функций выбрано по представителю от каждого класса: короткий *TsCSDP2* и длинный *TsCSDP3*. В растении *Arabidopsis thaliana* осуществлена сверхэкспрессия этих генов. Кроме этого, была проведена сверхэкспрессия фрагмента гена *TsCSDP2*, кодирующего домен холодного шока (*CSD2*). Для всех трех вариантов получены трансгенные растения поколения T3 и была исследована их морозоустойчивость и скорость перехода к цветению. Морозоустойчивость растений оценивали путем измерения утечки электролитов и выживаемости закаленных и не закаленных растений, подвергнутых действию отрицательных температур в диапазоне от -3°C до -12°C . Оказалось, что существенное повышение морозоустойчивости (на несколько градусов) показали только закаленные

трансгенные растения, экспрессирующие ген *TsCSDP3*. Также оказалось, что одна из линий трансгенных растений, экспрессирующая *CSD2*, показала более ранний переход к цветению относительно растений дикого типа на 1-2 недели. Полученные результаты свидетельствуют о мультифункциональности белков с доменом холодового шока в растениях. Белки с 6-7 мотивами “цинковый палец” по-видимому, принимают участие в закаливании растений, тогда как белки с двумя мотивами “цинковый палец” - в регуляции перехода их к цветению.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОГРУППЫ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ HRM-АНАЛИЗА

Титов И.А., Малоголовкин А.С., Цыбанов С.Ж.

ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук, (49243) 6-21-25, 6-10-82; 601120, Владимирская область, г. Покров, Titoffia@yandex.ru

Классическая чума свиней – наиболее распространённая пестивирусная инфекция, поражающая домашних свиней и диких кабанов. Возбудителем заболевания является вирус, принадлежащий к семейству *Flaviviridae*, роду *Pestivirus*. Геном вируса представлен одноцепочечной инфекционной РНК с положительной полярностью.

Несмотря на все усилия по контролю за распространением вируса, полностью предотвратить появление новых вспышек пока не удалось. Наиболее актуальной в настоящее время стала проблема идентификации полевых изолятов, заносимых в хозяйства, и дифференциации их от широко применяемых живых вакцин против КЧС.

Данная работа приобретает особую актуальность в связи с широкомасштабной вакцинацией домашних свиней и диких кабанов против КЧС. Все применяемые на территории Российской Федерации вакцинные штаммы относятся к геногруппам 1.1 и 1.2, в то время, как почти все вирулентные изоляты, выделенные за последние 3 года относятся к геногруппам 2.1 и 2.3. С помощью разрабатываемого метода возможно будет дифференцировать полевые изоляты от вакцинных штаммов в результате одной реакции.

В России эпизоотическая ситуация по КЧС в последние годы остаётся напряжённой. Так вспышки болезни были отмечены в популяциях диких кабанов и домашних свиней в 14 регионах Российской Федерации (2006 -2012гг). В настоящее время неблагополучными по КЧС являются Смоленская, Владимирская и Волгоградская области, где вирус КЧС циркулирует с 2010 года. Последние вспышки зафиксированы в Псковской области и Приморском крае.

С целью изучения возможности генотипирования различных изолятов вируса КЧС, циркулирующих на территории РФ, методом HRM-анализа и дифференциации их от вакцинных штаммов, было проведено генотипирование методом HRM гена E2, кодирующего наружный капсидный белок вируса. Последовательность гена E2 является наиболее вариабельной в геноме вируса КЧС и именно этот участок генома рекомендуется для проведения генотипирования различных штаммов (Paton D.J., McGoldrick A., Greiser-Wilke I. 2000).

Для проведения данной работы были отобраны вакцинные и вирулентные штаммы и изоляты вируса КЧС, принадлежащие разным геногруппам: Ши-Мынь (1.1), ЛК-К (1.1), ЛК-ВНИИВВиМ (1.2), Приморьеот 14.08.12 (2.1), Волгоград от 2008г. (2.3). Образцами для исследований служили культуральные вирусосодержащие

материалы и образцы цельной крови, стабилизированной ЭДТА от экспериментально заражённых животных. Амплификацию участка гена E2 проводили по модифицированной методике Paton D.J. (2000).

Для постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени использовали коммерческий набор 2xHRMPCRMasterMix (Qiagen, США). ОТ-ПЦР с последующим анализом кривых плавления проводили на амплификаторе RotorGene 6000 (2plexHRM) (Corbette Research, Австралия) по следующему протоколу: 95°C – 5 мин.; 95°C – 10 сек., 55°C – 30 сек., 72°C – 10 сек. – 40 повторов. Детекцию флуоресцентного сигнала осуществляли по каналу Green на шаге элонгации. Плавление продукта реакции проводили в диапазоне от 65°C - 95°C при увеличении температуры на 0,1°C в течении 2 сек. на каждом шаге. Каждую реакцию проводили в трёх параллелях. Анализ графиков плавления флуоресцентных кривых был проведён с использованием программно обеспечения RotorGene 6000 (2plexHRM) (Corbette Research, Австралия).

В результате проведения ОТ-ПЦР во всех образцах детектировали положительный флуоресцентный сигнал. Анализ кривых плавления референтных штаммов вируса КЧС показал наличие одного пика для каждого образца, что свидетельствует о наличии специфичного продукта реакции. Отклонение температурных пиков для образцов различных геногрупп не превышает 0,35°C. Более того, удалось проследить зависимость температуры плавления ПЦР-продуктов от принадлежности к определённой геногруппе. Средняя температура образования пика флуоресценции для геногруппы 1.1 составила 85,28°C, 1.2 – 85,94°C, 2.1 – 84,22°C, 2.3 – 86,34°C. Данный факт позволяет сделать вывод о генетической гетерогенности данных штаммов. Различные значения температурных пиков для образцов, принадлежащих к разным геногруппам, подтверждают структурные различия в составе ПЦР-продуктов, тем самым обуславливая их филогенетические отношения.

Таким образом, полученные данные говорят о возможности применения HRM – анализа для генотипирования различных геногрупп КЧС. Использование технологии HRM позволяет выявлять наличие или отсутствие нуклеотидных изменений в составе отдельных областей геномов микроорганизмов, что даёт возможность проводить предварительную оценку молекулярно-биологических свойств новых изолятов с целью дальнейшего генотипирования и определения их генетических характеристик.

Дальнейшая работа будет направлена на оптимизацию условий постановки ОТ-ПЦР и проведения HRM, что позволит увеличить точность генотипирования. Кроме того, очевидна необходимость добавления ряда референтных стандартов к уже имеющимся.

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА В ХРИЗАНТЕМ

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*

Одним из наиболее вредоносных вирусов хризантем является вирус В хризантемы (*chrysanthemum virus B* (CVB), род *Carlavirus*). Растения хризантем, инфицированные CVB, демонстрируют различные симптомы – от умеренной крапчатости листа до тяжелой мозаики, хлороза, гофрированности листовой пластинки,

недоразвитие и деформацию соцветий, что часто ведет к полной потере урожая. Вирус В хризантем зачастую вызывает латентную инфекцию, растение-хозяин при этом представляет собой скрытый источник инфекции. Отсутствие радикальных мер борьбы с вирусными болезнями делает актуальным создание трансгенных хризантем, устойчивых к вирусу В.

Иммуноферментный анализ является одним из наиболее эффективных методов детекции вирусов, однако в ряде случаев он может давать как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. В связи с этим целью наших исследований была адаптация метода иммуноферментного анализа (ИФА) CVB к особенностям изучаемого сорта. Объектом нашего исследования являлись растения хризантемы сорта White Snowdon. Для обнаружения вируса В хризантем использовали метод DAS-ELISA (набор Loewe, Germany) и Western blot.

Методом DAS-ELISA был получен сигнал как в зараженных, так и в незараженных растениях примерно одинаковой интенсивности, что указывает на ложноположительную реакцию. В связи с этим был проведен Western blot анализ, который выявил наличие неспецифических полос как в зараженных, так и в незараженных растениях. В инфицированных растениях наблюдалась как полоса, соответствующая белку оболочки CVB (~37 кДа), так и более лёгкие полосы (28-30 кДа), а в неинфицированных – только лёгкие полосы. Эти полосы по видимому соответствуют какому-либо белку хризантемы, либо наблюдается перекрестная реакция с другими карлавирусами. Поэтому наблюдалось наличие сигнала в DAS-ELISA во всех образцах.

Из выше сказанного следует, что для надежной детекции Chrysanthemum B Virus необходимо использовать сочетание нескольких методов анализа: DAS-ELISA, Western blot и ОТ-ПЦР. В дальнейшем планируется провести сравнительный анализ эффективности различных молекулярно-биологических подходов для получения вирусоустойчивых растений.

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕНОВ РАСТЕНИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

**Тюрин А.А.², Мустафаев О.¹, Бердицев И.Н.¹, Шимшилашвили Х.Р.¹,
Вячеславова А.О.², Голденкова-Павлова И.В.^{1,2}**

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва,
E-mail: irengold58@gmail.com*

²*Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, E-mail: alexjofar@gmail.com*

В настоящее время трансгенные растения широко используются в качестве моделей как для фундаментальных исследований для изучения физиологической роли генов, так и для решения прикладных задач по созданию устойчивых форм сельскохозяйственных культур и продукции рекомбинантных белков в растениях. Успех в этом направлении, прежде всего, связан с эффективностью экспрессии перенесенного гена (трансгена) в растениях, которая контролируется на разных этапах: транскрипции, процессинга и сплайсинга РНК, трансляции и стабильности белкового продукта. В связи с этим биоинформационный анализ структурных и функциональных

характеристик генов растений и последующая экспериментальная верификация выявленных закономерностей являются весьма актуальными.

Нами создана база данных о секвенированных геномах растений, включающая в себя и экспрессионные данные, а также разработано программное обеспечение, позволяющее формировать произвольные выборки нуклеотидных последовательностей генов с целью их дальнейшего анализа по различным параметрам. Структурно-функциональный анализ последовательностей генов растений позволил выявить ряд генетических детерминант, которые потенциально могут влиять на эффективность экспрессии гетерологичных генов. Полученные данные биоинформационного анализа использованы для конструирования серии модульных векторов, в которых учтено большинство факторов, обеспечивающих стабильную и эффективную экспрессию трансгенов в растениях.

Экспериментальная верификация функциональной значимости генетических детерминант, потенциально влияющих на уровень экспрессии гетерологичных генов была проведена с использованием транзientной экспрессии и сконструированных модульных векторов.

Показано, что оптимальное окружение иницирующего кодона, размер и состав 5'-нетранслируемой области, а также кодоновый состав гетерологичного гена вносят значимый вклад в увеличение эффективности экспрессии гетерологичных генов в растениях.

Таким образом, нами продемонстрировано, что разработанное программное обеспечение позволяет выявлять фундаментальные закономерности, влияющих на профиль экспрессии гена, на основе данных анализа их последовательности с последовательностями генов, имеющих сходные функции, а экспериментальная верификация с использованием модульных векторов и транзientной экспрессии оценить эффективность экспрессии гетерологичного гена.

ГЕН *FRIGIDA* У ТЕТРАПЛОИДНЫХ ВИДОВ ВИДОВ *BRASSICA*

Фадина О.А., Хавкин Э.Е.

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

В умеренных широтах важную роль в переходе к цветению играет продолжительное воздействие низкими положительными температурами (вернализация, или яровизация). На примере *Arabidopsis thaliana* показано, что ключевыми генами, отвечающими за переход к цветению при вернализации, являются *FLOWERING LOCUS C (FLC)* и *FRIGIDA (FRI)*, усиливающий экспрессию *FLC*. Культурные виды *Brassica* включают яровые и озимые однолетние и двулетние жизненные формы, сильно различающиеся по времени зацветания, однако, несмотря на их огромное экономическое значение, строение и функции гомологов гена *FRI* у этих видов исследованы недостаточно.

Мы исследовали последовательности *FRI* из геномов диплоидных видов *B. rapa* (геном AA), *B. nigra* (BB) и *B. oleracea* (CC) и тетраплоидных видов *B. carinata* (BBCC), *B. juncea* (AABB) и *B. napus* (AACC). В отличие от арабидопсиса, в геномах А и С *Brassica* ген *FRI* представлен двумя локусами - *FRIa* и *FRIb*, локализованными на разных хромосомах. В пределах одного локуса и одного генома нуклеотидные последовательности *FRI* были сходны на 95-99%, внутри каждого локуса при

сравнении геномов А и С - на 87-94%, а сходство последовательностей, принадлежащих двум разным локусам, в пределах одного генома не превышало 80%. По своему строению ген *FRIa Brassica* не отличается от *FRI A. thaliana*. Как и у арабидопсиса, белок FRIGIDA принадлежит к функциональному классу I, однако у *Brassica* характерная для FRIGIDA арабидопсиса биспиральная структура всегда встречается только в С-концевой части белка и отсутствует в N-концевой части белка у большинства гомологов FRIGIDAa.

Последовательности *FRI* из диплоидных видов *B. rapa* и *B. oleracea* сохраняются в субгеномах А и С тетраплоидных видов *B. carinata*, *B. juncea* и *B. napus* (96-99% сходства). Различие между последовательностями *FRI* геномов А/С и В составляет в среднем около 16%.

При филогенетическом анализе наиболее консервативного центрального участка *FRI* отчетливо различаются два кластера, соответствующие линиям I (Camelineae) и II (Brassicaceae), а внутри последнего - последовательности, принадлежащие линиям *Brassica* А/С и В. Появление двух локусов *FRI* предшествовало видообразованию в роде *Brassica*, а возможно, и выделению этого рода.

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

Федорин Д.Н., Федулова Т.П.

ГНУ ВНИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова, 396030, п. Рамонь, Воронежская обл., E-mail: biotechnologiya@mail.ru

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

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

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

В качестве материала для SSR- анализа была использована тотальная ДНК 13 линий сахарной и кормовой свёклы и гибридов с их участием. Каждый номер был

представлен 30 образцами индивидуальных растений. SSR- анализ проводили с использованием 6 пар праймеров к микросателлитным локусам, предложенных, как наиболее полиморфные, иностранными авторами (Schmuldersetal., 2010).

В результате ПЦР – амплификации с помощью 6 пар праймеров к микросателлитным локусам Bvv 15, 17, 23, 30, 32, 43 установлена генетическая неоднородность родительских линий сахарной и кормовой свёклы. Локусы Bvv15 и 23 оказались мономорфными. Выявленный полиморфизм, определяемый частотой встречаемости аллелей исследованных микросателлитных локусов, варьировал по праймерам: Bvv17 - 42,85 – 100%; Bvv 30 - 7,14 ; 14,28; 28,57%; Bvv 32 от 14,28 до 100%; Bvv43 – 5, 0; 21,42; 100%. Наибольшим полиморфизмом характеризовались праймеры для микросателлиты Bvv 30, которые выявили 5 ПЦР – продуктов с длинами 350, 500, 700, 1000 и более тысячи пар нуклеотидов. Это позволило определить генетические расстояния между MC – формами и опылителем – кормовой красной свёклой, которые составили для №№MC 14044 и кормовой красной р.4 (D=1,41); MC-94 и кормовой красной р.1 (D=2,45); MC-94 и кормовой красной р.2 (D=1,73); MC-94 и кормовой красной р.3 (D=2,00). Определено, что с увеличением генетических дистанций повышалась и продуктивность гибридных комбинаций от 112,5 до 145,0 т/га, соответственно.

В результате амплификации геномных ДНК растений родительских форм свёклы и гибридов с праймерами к микросателлитным последовательностям установлено, что при скрещивании сахарной и кормовой свёклы аллели обеих родительских форм кодоминантно сочетаются в генотипах гибридных образцов. В гибриде F₁ MC-94 × кормовая красная р.3 кодоминантно сочетаются аллели родительских пар, содержащих

микросателлитные последовательности Bvv 17 (900 п.н.) и Bvv 30 (350 п.н.).

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

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

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

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

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

Сопоставление данных по продуктивности исследованных селекционных материалов с результатами кластерного анализа показало, что скрещивание линий,

наиболее генетически отдалённых друг от друга, позволяет получать гетерозисные гибриды. Использование сортотипов кормовой свёклы в качестве исходного материала для скрещиваний будет способствовать увеличению генетического разнообразия и вовлечению новых аллелей в селекционный процесс. Внедрение ДНК-маркирования в селекционную практику позволит более целенаправленно подбирать родительские пары для получения высокопродуктивных гибридов свёклы.

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

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Хасанов В.Т.¹, Алексеев Я.И.², Абишева З.Т.¹, Бейсембина Б.¹, Фида М.А.¹

¹АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллин», Научно-образовательный инновационный центр, агробиологических исследований, Астана, 010000, E-mail: vadim_kazgatu@mail.ru

²ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Москва, 127550

Вирусные заболевания являются основной причиной снижения продуктивности и ухудшения товарных качеств клубней картофеля. Ущерб, приносимый вирусной инфекцией, колеблется в зависимости от вируса в диапазоне от 15 до 95%. Инфицирование растений картофеля опасными фитопатогенными вирусами, такими как Y-вирус приводит к потерям до 90% урожая. При сильном поражении M-вирусом потери урожая могут достигать от 15 до 70%. Скручивание листьев картофеля вызываемое L-вирусом приводит к снижению урожая на 30-80%, содержания крахмала в клубнях – на 2-5%. Поражение растений вирусом PVS совместно с другими вирусами: A+S (складчатая мозаика), X+S (крапчатая мозаика) существенно увеличивает потери урожая картофеля.

На сегодняшний день наиболее высокочувствительным и серийным методом для выявления вирусной инфекции является иммуноферментный анализ (ИФА). Метод ИФА позволяет обнаружить в тестируемом образце белковую оболочку вирусов.

В настоящее время с целью обнаружения вирусных заболеваний сельскохозяйственных растений, особенно на ранних стадиях, весьма успешно, применяется метод ПЦР. Данный метод существенно повышает надежность контроля, поскольку с его помощью ведется анализ непосредственно генома вируса.

Целью настоящей научно-исследовательской работы являлась сравнительная оценка вирусных заболеваний картофеля методами иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции.

Настоящие исследования являлись начальным этапом выполнения проекта: «Разработка экспресс-теста для диагностики вирусных заболеваний картофеля», выполняемого в рамках бюджетной программы 055 МОН РК.

Объектами исследований послужили 14 сортообразцов картофеля из коллекции Научно-образовательного инновационного центра агробиологических исследований АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина»: Cherie (Ch), Blue Sweden (BS №1, BS №3), Bora Valley (BV №3, BV №4, BV №6), Ditta (D №1, D №2, D №3, D №2.2), Cry Vallei (CV), Адретта (ATM-11, ATM-2), Blue Congo (сортообразец BC

№7). Данные сортообразцы картофеля анализировались на наличие вирусов картофеля PVX, PVY, PVS, PVM, PLRV, PVA методами ИФА и ПЦР.

ИФА. В исследованиях применялся метод двойного наложения антител («сэндвич-вариант» ИФА) и диагностические наборы ИФА для определения вирусов картофеля ГНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха РАСХН (п. Коренево). Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (ASYS Expert 96, Австрия) при длине волны 490 нм.

ПЦР-РВ. Сортообразцы растений картофеля были проанализированы методом ПЦР в реальном времени на наличие вирусов PVX, PVY, PVS, PVM, PLRV, PVA по стандартной методике. РНК из образцов была выделена с помощью набора «Проба НК» (Агродиагностика) согласно инструкции производителя. Для проведения анализа на содержание возбудителей использовали прототипы наборов реагентов для ПЦР в реальном времени, производства ГНУ ВНИИСБ и ЗАО «Синтол».

На первом этапе проводимых исследований сортообразцы картофеля оценивались на наличие 6 вирусов картофеля методом ИФА. Полученные результаты ИФА свидетельствовали о том, что все сортообразцы, за исключением ВС №7, были в той или иной степени поражены вирусами PVX, PLRV, PVM, PVS, PVY, PVA как в отдельности, так и их комплексами. Однако большинство сортообразцов картофеля показали положительную реакцию на вирус PVY. Следует отметить, что согласно результатам ИФА, лишь один сортообразец картофеля CV был свободным от вирусной инфекции.

Далее, исследуемые сортообразцы картофеля тестировали методом ПЦР-РВ. Согласно результатам ПЦР-анализа, вирусов PLRV, PVX, PVA в изучаемых сортообразцах обнаружено не было, однако установлено содержание комплекса вирусов PVY+PVM у большинства сортообразцов картофеля. Вирус PVS был найден лишь у одного сортообразца - АТМ-11 в комплексе с вирусом PVM.

Согласно результатам ИФА, вирусом PVX оказалось заражено 3 образца (21,4%), ПЦР - 0 (0%); PLRV: ИФА – 2 образца (14,3%), ПЦР - 0; (0%); PVM:

ИФА – 4 образца (28,6%), ПЦР – 8 (57,1%), PVS: ИФА – 2 образца (14,3%), ПЦР – 1 (7,1%); PVY: ИФА – 9 образцов (64,3), ПЦР-10 (71,4%), PVA: ИФА – 2 образца (14,3%), ПЦР – 0 (0%).

Также согласно результатам ИФА и ПЦР было найдено несколько сортообразцов со следующими комплексами вирусов: Y+M; X+Y+M+A; Y+L; Y+S+M; X+Y+S+A+L. Необходимо отметить, что сортообразец CV по результатам ИФА ранее признанный безвирусным, показал положительную реакцию на Y-вирус картофеля в ПЦР-РВ. В проводимом эксперименте согласно идентичным результатам ИФА и ПЦР-РВ лишь 1 сортообразец картофеля был свободен от вирусной инфекции, 2 из исследуемых сортообразцов: D№3 и АТМ-2 были поражены моновирусами: PVY и PVM соответственно.

Совпадение положительных результатов ИФА и ПЦР выявлено в 11 случаях из 84 (13,1%). Совпадение отрицательных результатов в 54 случаях из 84 (64,3%), расхождение результатов в 20 случаях из 84 (23,8%). Количество случаев положительного результата ПЦР, но отрицательного результата ИФА - 8 (9,5%).

Следует отметить, что метод ИФА достаточно чувствителен, однако менее специфичен. Из-за перекрестных реакций возможны ложноположительные результаты. Проведенные исследования подтверждают необходимость получения моноклональных антител при производстве диагностических тестов с целью устранения перекрестных реакций, которые неизбежно ведут к ложноположительным результатам при использовании применяемых в настоящее время в диагностике поликлональных антител.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* *CRATAEGUS NIGRA* WALDST. ET KIT

Чебан Л.Н.

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

Преимущества использования в фармакологии растительного сырья обусловлены сбалансированным комплексом биологически активных веществ в определенных соотношениях, которые сформировались в процессе эволюции и обеспечивают высокую биодоступность препаратов, а также большее физиологическое родство к тест-объектам. Поэтому, перспективным представляется исследование не только новых растений и их фармакологически активных веществ, но и всестороннее изучение лекарственных растений, которые традиционно используются в медицине. Так, для препаратов на основе растительного сырья боярышников установлено антиоксидантное, противовоспалительное и кардиостатическое действие. Их активность обусловлена наличием в сырье полифенольных комплексов, наиболее эффективными составляющими которых являются гидроксикоричные кислоты и флавоноиды. *Crataegus nigra* waldst. et Kit (*Rosaceae* Juss) европейский вид рода *Crataegus*, листья и цветы которого представлены в ГФУ и содержат не менее 1,5 % флавоноидов в пересчете на гиперозид.

В природных условиях представители рода *Crataegus* размножаются семенами, а в условиях культуры ботанических садов – также вегетативным способом. Однако выделенные из созревших плодов семена имеют твердую оболочку, длительный период покоя, и, даже при хорошем стечении обстоятельств, прорастают через 2-3 года. А вегетативное размножение не всегда дает положительные результаты. Поэтому, актуальным остается поиск методов, которые позволят получить значительные объемы ценного растительного сырья, не прибегая к традиционным способам размножения.

Одним из приоритетных направлений в настоящее время является разработка биотехнологических основ получения клеточных культур лекарственных растений, которые служат в качестве сырья, содержащего фармакологически ценные вторичные метаболиты. Благодаря отработанным технологиям культуры *in vitro* возможно быстро и в необходимых количествах получить посадочный материал, который будет генетически идентичный к исходным растениям.

В связи с этим целью наших исследований является разработка метода микроклонального размножения фармакопейного вида *C. nigra*.

Одним из критических этапов клонального микроразмножения есть этап введения в культуру *in vitro*. Часто его исход зависит от выбора материала, используемого в качестве первичного экспланта, а также непосредственно от условий стерилизации.

Материалом для исследования служили почки 3-5 годичных растений *C. nigra*, которые культивируются в условиях ботанического сада Черновицкого национального университета имени Юрия Федьковича.

С целью получения асептических эксплантов проводили ступенчатую стерилизацию почек с использованием различных стерилизующих агентов, концентрацию которых, а также экспозицию действия подбирали эмпирически.

Известно, что культура изолированных меристем широко используется для оздоровления растительного материала от вирусных инфекций и микроклонального размножения. Собственно апикальную меристему сложно извлечь без повреждения и

индуцировать ее рост. Поэтому, часто выделяют меристему и один или два листовые примордии.

Перед стерилизацией почки обрабатывали раствором детергента, после чего длительно промывали проточной и дистиллированной водой. Далее очищали почки от покровных листьев и чешуек. Стерилизацию почек осуществляли в два этапа. Прежде всего, материал обрабатывали в течение 2 мин 96% этанолом, содержащим Tween 80, после этого их на 12 мин помещали в раствор гипохлорида натрия, обогащенного активным хлором (промышленный препарат «Белизна», ТУУ6–05743160.001–93) в разведении 1:4. В дальнейшем проводили трикратную отмывку от стерилизующих агентов. В связи с тем, что при такой обработке происходило сильное окисление материала, отмывание от стерилизующих агентов осуществляли 0,025% раствором аскорбиновой кислоты. Далее, стерильным пинцетом переносили эксплант в стерильную чашку Петри, установленную на столике бинокулярного микроскопа, предварительного обработанного УФ-лучами в ламинар-боксе. В этих условиях выделяли меристемы с одним - двумя листовыми примордиями и субапикальной тканью. Полученные стерильные экспланты высаживали на питательные среды на основе среды Мурасиге-Скуга. Через 5-10 суток проверяли стерильность растительного материала и определяли оптимальную схему стерилизации для данного вида.

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.

Было установлено, что период прорастания почек *S. nigra* составляет в среднем двадцать дней. После 4-5 недель культивирования, первичные экспланты переносили на свежие питательные среды, содержащие различные концентрации ИУК и БАП, для изучения формирования конгломерата микропобегов. Следует отметить, что из-за сильного окисления растительных тканей, вызываемого стерилизацией, все питательные среды были дополнены цистеином в концентрации 60 мг/л.

В результате проведенных экспериментов нами были разработаны оптимальные условия введения фармакопейного вида *S. nigra* в культуру *in vitro*, которая позволяет достичь 100 % выхода асептического материала, для 80 % которого наблюдался интенсивный морфогенез на тестируемых средах.

ПОЛУЧЕНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ МОРКОВИ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ

Чистова А.В., Монахос С.Г.

***РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Лаборатория генетики, селекции и биотехнологии овощных культур, 127550, Москва, ул. Пасечная, д.5,
E-mail: breedst@mail.ru***

Метод культуры пыльников – один из биотехнологических приемов, позволяющий сократить срок получения гомозиготных линий, необходимых для производства гетерозисных F₁ гибридов моркови.

Целью работы является получение удвоенных гаплоидов моркови столовой для ускоренного создания чистых линий. Для ее решения поставлены следующие задачи: определить размеры бутона, содержащие микроспоры в стадии развития от тетрад до поздней одноядерной, определить состав среды для эмбриогенеза и

каллусообразования и для регенерации растений, получить растения, адаптированные к нестерильным условиям.

В качестве исходного материала использовали растения сорта Тайфун. Стадию развития микроспор определяли цитологическим анализом пыльников бутонов размером от 0,4 до 1,7 мм. Корреляции между размером бутонов и стадией развития микроспор не обнаружено. Выявлено, что пыльники, содержащие тетрады и одноядерные микроспоры, находятся в крайних бутонках двух внешних рядов зонтичков соцветий, у которых крайние зонтики выдвигаются в стороны.

Поверхностную стерилизацию бутонов осуществляли с использованием этанола и 2%-ого гипохлорита натрия. Пыльники культивировали на питательных средах, рекомендованных Kai Lin Hu (1993г.), Gorecka (2009г.), Kowalska (2008г.), Тюкавиным (2010г.). Образование эмбриоидов и каллуса наблюдали на всех средах. Процент пыльников, продуцирующих эмбриоиды или каллус, в зависимости от генотипа и среды составил от 0 % до 22,5 %.

При инкубировании эмбриоидов стадии торпедо на питательных средах для регенерации наблюдали быстрое увеличение их размеров и появление зеленой окраски верхнего полюса и удлинение нижнего полюса. Каллус, высаженный на среды для регенерации, образовывал гроздь эмбриоидов, из которых затем развивались регенеранты. Дорастивание сформировавшихся растений осуществляли на среде, рекомендованной Gorecka (2009г.), при этом часто наблюдали вторичный эмбриогенез.

В результате работы получено и адаптировано к нестерильным условиям 184 растения, плоидность и гомозиготность которых предстоит проанализировать.

Список литературы

1. Тюкавин Г.Б. Основы биотехнологии моркови: Монография / ВНИИССОК. М., 2007 – 480 с;
2. Gorecka K., Krzyżanowska D., Kiszczak W., Kowalska U., Gorecki R. Carrot Doubled Haploids. – 2009;
3. Hu, Matsubara, Muracami Haploid Plant Production by Anther Culture in Carrot. – 1993; Kowalska U., Rybaczel D. Cytological assessment of carrot plants obtained in anther culture.

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ HER2, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ *Nicotiana benthamiana*

Щербаков А.И., Косоруков В.С.

**ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» РАМН,
Москва, 115478, E-mail: www.walther@mail.ru**

Обычно рекомбинантные антитела получают из культуры животных клеток, что является весьма дорогостоящим и нестабильным процессом. Использование растений, как платформы для получения терапевтических белков обусловлено рядом преимуществ, по сравнению с другими экспрессионными системами. Процесс получения рекомбинантных антител из растений менее дорогостоящий. Так же наблюдается более высокая продукция биомассы и высокий выход белка при относительно быстрой экспрессии белка. В растениях осуществляется сборка белка, в результате чего образуются уже активные антитела. При выделении антител из состава растительного экстракта важно не только очистить целевой белок от множества примесей, но и провести контроль качества на каждом из этапов выделения.

В данной работе использовалась технология высокоэффективной транзиторной экспрессии провирусных векторов. Такая технология позволяет практически полностью переключить системы и ресурсы растительной клетки на синтез целевого белка. При этом выход целевого белка составляет до 300 мг в 1 кг биомассы.

Целью данной работы стала экспрессия рекомбинантных моноклональных антител, специфичных к онкобелку HER2/neu, в растении *Nicotiana benthamiana*, с его последующей очисткой. Так же были подобраны оптимальные методы контроля качества, которые отражали качественные и количественные характеристики белка на каждой этапе получения и очистки.

Извлечение антител из растительного материала проводили посредством гомогенизации листьев с последующей фильтрацией. Далее экстракт фракционировали селективным осаждением сульфатом аммония. После растворения и фильтрации осадка проводили очистку с помощью аффинной, ионообменной и гельфильтрационной хроматографии.

На каждом этапе очистки для подтверждения наличия антител проводили иммуоферментативный анализ и электрофоретическое разделение белков в ПААГ.

Было показано, что наибольшее количество белка осаждается при концентрации сульфата аммония 30-40%. При осаждении белка сульфатом аммония происходит наибольшая потеря белка, около 30%. На последующих этапах очистки потери значительно меньше. Общие потери белка не превышают 38-42%.

В результате эксперимента удалось экспрессировать рекомбинантные моноклональные антитела, специфичные к онкобелку HER2/neu, в растении *Nicotiana benthamiana*, а так же выделить и очистить целевой белок из растительного материала

Применение описанных выше методов позволяет повести контроль качества полученных антител.

СОЗДАНИЕ ХРОСОМ СПЕЦИФИЧНОЙ ДНК БИБЛИОТЕКИ ПОЛОВЫХ ХРОСОМ ХМЕЛЯ ЯПОНСКОГО С ПОМОЩЬЮ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОДИССЕКЦИИ

Яковин Н.А., Дивашук М.Г., Киселева А.В., Соловьев А.А., Карлов Г.И.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Кафедра генетики и биотехнологии, Россия, Москва 127550 ул. Тимирязевская, 49
E-mail: daiske3@gmail.com*

Хмель японский (*Humulus japonicus* Siebold & Zucc.) – ближайший родственник хмеля обыкновенного, представляет собой однолетнее двудомное травянистое растение, оно имеет гетероморфные половые хромосомы и представляет большой интерес для изучения наследования пола у растений. В нашей работе была создана библиотека ДНК клонов половых хромосом (X, Y1, Y2). Половые хромосомы изолировали с препаратов мейоза с помощью системы лазерной микродиссекции (PALM MicroLaser system (P.A.L.M. GmbH)), после чего проводили их амплификацию методом DOP-PCR. Продукт амплификации использовали для проведения флуоресцентной *in situ* гибридизации. При использовании стандартной методики FISH (гибридизация в течении 10 часов) сигнал был распределен по всем хромосомам равномерно, что свидетельствует о наличии в геноме большого количества диспергированных повторов, присутствующих как на половых хромосомах и так и на

аутосомах. При использовании гибридизации в течении 1 часа наблюдалась тенденция к гибридизации пробы преимущественно с половыми хромосомами. Клонирование продуктов DOP-PCR проводили в векторе pGEM-T easy (Promega, USA) в результате чего была получена ДНК библиотека из 1416 клонов. Было проведено секвенирование 24 случайно выбранных клонов. BLAST анализ по базе данных NCBI показал, что 4 сиквенса имеют гомологию к сиквенсам хмеля обыкновенного и 21 – к конопле посевной. 10 - были сходны с последовательностями ретроэлементов растений.

288 клонов было проанализировано методом DOT-blot, где в качестве проб была использована ДНК мужского и женского растений хмеля японского. На 9 клонках наблюдался более сильный интенсивный сигнал гибридизации при использовании ДНК пробы полученной с мужского растения по сравнению с ДНК пробой женского растения. Это может свидетельствовать о наличии в ДНК библиотеке высококопийных Y хромосомоспецифичных последовательностей ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 13-04-02116 А. Благодарим ООО «ОПТЭК» за предоставленное оборудование – PALM MicroLaser system (P.A.L.M. GmbH).

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИИ *Klebsiella planticola* НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ АЭРОПОНИКИ

Якушкина Е.А.

***ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Россия,
127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42
E-mail:yakushkina-elena@mail.ru***

В настоящее время в Российской Федерации существует проблема производства качественного семенного картофеля. Одним из главных факторов, определяющих качество посадочного материала, является использование в производстве оздоровленных от вирусной, виroidной и бактериальной инфекции сортов растений [1].

В последние годы все больше внимания уделяется развитию экологических методов борьбы с заболеваниями растений, которые рассматриваются как альтернатива химическим методам защиты, оказывающим отрицательное воздействие на экологию агрофитоценозов. Среди них особое место занимает применение микробиологических препаратов на основе ризосферных микроорганизмов. Устойчивость растений к заболеваниям и лучший рост во многом определяются результатами взаимодействия между корневой системой растений и разнообразными населяющими ее микроорганизмами.

Установлено, что ряд бактерий, непосредственно *Клебсиелла плантикола* (*Klebsiella planticola*), выделенная из ризопланы огурца и являющаяся ассоциативным азотфиксатором, при применении на картофеле, фиксирует азот воздуха, выделяет в ризосферу ростактивирующие вещества фитогормонной природы и антибиотики и снабжает всем этим растение картофеля. В свою очередь, корневые экссудаты картофеля являются питанием для бактерии. В результате такого симбиоза ризосфера картофеля защищается от фитопатогенной микрофлоры, при этом можно существенно повысить урожайность [2].

Целью наших исследований явилось изучение влияния микробиологического препарата «Биоплант К» на основе бактерии *Klebsiella planticola* на рост, развитие, фитосанитарное состояние растений, урожайность и качество продукции картофеля.

В задачи исследований входило: выявление действия препарата на рост, развитие, фитосанитарное состояние растений, урожайность и качество картофеля; установление влияния бактерии *Klebsiella planticola* на поражаемость растений и клубней картофеля вирусными патогенами, ризоктониозом, паршой и другими болезнями; определение экономической эффективности применения препаратов и целесообразности использования их в сельскохозяйственном производстве.

Суспензия чистой культуры бактерии *Klebsiella planticola* приготовлена на кафедре Микробиологии и иммунологии Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева, опыт заложен и ведется в Институте сельскохозяйственной биотехнологии. В 2 аэропонные установки посажено по 65 растений картофеля. Применена корневая технология инокуляции.

Список литературы

1. Анисимов Б.В. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля (Практическое руководство). – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2004 – 80 с.
2. Михалин С.Е. Влияние предпосадочной инокуляции клубней картофеля микробиологическими препаратами на урожайность и качество продукции: Автореферат, диссертация на соискание уч. ст. к.с.-х.н.: 06.01.09/ С. Е. Михалин.- Москва, 2006. – 25 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ ТРИТИКАЛЕ <i>IN VITRO</i> ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА В СЕЛЕКЦИИ Акинина В.Н.	5
ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА X ВИРУСА ШАЛОТА (РОД <i>Allexivirus</i>), ПЕРСИСТИРУЮЩЕГО В ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАЕМЫХ РАСТЕНИЯХ <i>Allium cepa L. var. aggregatum G. Don.</i> В УСЛОВИЯХ МОНОИНФЕКЦИИ Архипов А.В.	7
ДЕТЕКЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННО ВАЖНЫХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ (ПЛАТФОРМА 454) Беленикин М.С., Криницына А.А., Шмыгля И.В., Дарий М.В., Дмитриев А.А., Кудрявцева А.В., Мельникова Н.В., Сперанская А.С.	8
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ <i>atSPO11-1</i> И <i>scSPO11</i> Белоцерковская Е.П., Милюкова Н.А., Комахина В.В.	9
ДИНАМИКА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА <i>Linum usitatissimum</i> НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ Берестяная А.Н.	11
РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОМА ВИРУСА МИКСОМЫ КРОЛИКОВ Бурмакина Г.С., Цыбанов С.Ж., Луницин А.В.	12
ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА КОЭФФИЦИЕНТ РАЗМНОЖЕНИЯ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ И ГРУШИ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> Бьядовский И.А.	14
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У МЕЖВИДОВЫХ ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН <i>recA Escherichia coli</i> Виноградова Д.А., Милюкова Н.А., Комахина В.В.	15
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>IN VITRO</i> <i>LIGULARIA GLAUCA</i> (L.) J. HOFFM. Герасимова Ю.А., Шелифост А.Е.	17
ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> Гизатуллина А.Т., Сташевски З.	18

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ ТРАНСГЕНННОГО МАТЕРИАЛА В РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТАХ, ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И КОРМАХ НА ОСНОВЕ ПЦР-АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОЧИПОВОГО АМПЛИФИКАТОРА «АРИАДНА»	20
Григорьева М.В., Сляднев М.Н., Мушников Н.В., Наволоцкий Д.В.	
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РИАНОДИНОВОГО РЕЦЕПТОРА У СВИНЕЙ ТРЕХПОРОДНОГО СКРЕЩИВАНИЯ	22
Шалимова О.А., Крюков В.И., Друшляк Н.Г., Радченко М.В.	
ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АДВЕНТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОБЕГОВ ПЕРСИКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ	24
Егорова В.С., Худякова Т.И., Сидорова Т.Н., Долгов С.В.	
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ TUMV И СОЗДАНИЕ ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ <i>BRASSICA</i> – ДОНОРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К НЕМУ	24
Зубарева И.А., Игнатов А.Н.	
СРАНИТЕЛЬНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПРИЦЕНТРОМЕРНОЙ ОБЛАСТИ ХРОМОСОМ <i>Allium cepa</i> И <i>A.fistulosum</i>	26
Киселева А.В., Киров И.В., Будылин М.В., Романов Д.В., Хрусталева Л.И.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ТОМАТА К ФИТОФТОРОЗУ	28
Ковбасенко Р.В., Дмитриев А.П.	
ДНК МАРКИРОВАНИЕ ГЕНА СКРИНИНГ <i>VIVIPAROUS-1</i> ПЫРЕЙНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И АНАЛИЗ КОЛЛЕКЦИИ ПШЕНИЧНО-ПЫРЕЙНЫХ ГИБРИДОВ	30
Кочешкова А.А., Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Белов В.И., Упелник В.П., Карлов Г.И.	
ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ КАЛИЯ НА РОСТ ПРОРОСТКОВ <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
Кучоро Ф., Знаменский А.И.	
РАЗРАБОТКА МЕТОДА ЭКСТРАКЦИИ НИЗКО- И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРУКТАНОВ ИЗ КОРНЕЙ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ	32
Мазник К.С., Елисеева Ю.В., Матвеева Н.А.	
РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СПОСОБОВ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ	33
Макарова Е.Л., Ковалева Т.А., Петракова И.В.	

РАЗЛИЧИЕ ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ КОНСЕРВАТИВНЫХ И УНИКАЛЬНЫХ микроРНК ЛЬНА (<i>Linum usitatissimum</i> L.), ВЫРАЩЕННОГО В ОПТИМАЛЬНЫХ И СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ	35
Мельникова Н.В., Беленикин М.С., Большева Н.Л., Сперанская А.С., Дмитриев А.А., Лакунина В.А., Рачинская О.А., Дарий М.В., Юркевич О.Ю., Криницына А.А., Кишлян Н.В., Рожмина Т.А., Муравенко О.В., Кудрявцева А.В., Зеленин А.В.	
РАЗРАБОТКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР	37
Минакова Н.Ю., Долинская Е.В., Колобова О.С., Копина М.Б., Мазурин Е.С.	
ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ <i>Arabidopsis thaliana</i>, СЕКРЕТИРУЮЩИХ МИКРОБНУЮ ФИТАЗУ <i>PhyCg Bacillus ginsengihumi</i>	39
Нямсурэн Ч., Валеева Л.Р., Ахметова А.И., Сулейманова А.Д., Балабан Н.П., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р.	
ДИАГНОСТИКА ПОЛИПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОРЯДКА <i>Burkholderiales</i>	40
Кунда М.С., Аксенова Е.И., Орлова А.А.	
ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО РАПСА МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ	41
Боровская С.В., Варламов Д.А., Колобова О.С., Пашкевич О.И.	
ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИИ МЕТАНОЛА КАК СИГНАЛА МОБИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СООБЩЕСТВА В ОТВЕТ НА ТРАВМУ И ВТОРЖЕНИЕ ПАТОГЕНА	43
Петруня И.В., Комарова Т.В., Дорохов Ю.Л.	
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ЯБЛОНИ, МАЛИНЫ И ЧЁРНОЙ СМОРОДИНЫ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВНИИСПК, ОРЕЛ	44
Пикунцова А.В., Князев С.Д., Седов Е.Н., Богомолова Н.И.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ КАРИОТИПИРОВАНИЯ ХРОМОСОМ <i>CANNABIS SATIVA</i> L.	46
Разумова О.В., Александров О.С., Дивашук М.Г., Киров И.В., Карлов Г.И.	
ЗАВИСИМОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЭКСПЛАНТА ОТ ЕГО РАСПОЛОЖЕНИЯ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ	47
Сащенко М.Н.	
О ФУНКЦИЯХ БЕЛКОВ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА В РАСТЕНИЯХ	49
Таранов В.В.	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОГРУППЫ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ МЕТОДОМ HRM-АНАЛИЗА	50
Титов И.А., Малоголовкин А.С., Цыбанов С.Ж.	

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА В ХРИЗАНТЕМ	51
Титова С.М., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В.	
АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕНОВ РАСТЕНИЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ	52
Тюрин А.А., Мустафаев О., Бердицевец И.Н., Шимшилашвили Х.Р., Вячеславова А.О., Голденкова-Павлова И.В.	
ГЕН <i>FRIGIDA</i> У ТЕТРАПЛОИДНЫХ ВИДОВ ВИДОВ <i>BRASSICA</i>	53
Фадина О.А., Хавкин Э.Е.	
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГИБРИДНОГО ПОТОМСТВА F₁ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ САХАРНОЙ И КОРМОВОЙ СВЕКЛЫ НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ	54
Федорин Д.Н., Федулова Т.П.	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КАРТОФЕЛЯ	56
Хасанов В.Т., Алексеев Я.И., Абишева З.Т., Бейсембина Б., Фида М.А.	
ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO CRATAEGUS NIGRA</i> WALDST. ET KIT	58
Чебан Л.Н.	
ПОЛУЧЕНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ МОРКОВИ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ	59
Чистова А.В., Монахос С.Г.	
ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ HER2, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ <i>Nicotiana benthamiana</i>	60
Щербаков А.И., Косоруков В.С.	
СОЗДАНИЕ ХРОМОСОМ СПЕЦИФИЧНОЙ ДНК БИБЛИОТЕКИ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ ХМЕЛЯ ЯПОНСКОГО С ПОМОЩЬЮ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОДИССЕКЦИИ	61
Яковин Н.А., Дивашук М.Г., Киселева А.В., Соловьев А.А., Карлов Г.И.	
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИИ <i>Klebsiella planticola</i> НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ АЭРОПОНИКИ	62
Якушкина Е.А.	

