

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ

**XI МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

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

6 апреля 2011 г.

*Конференция посвящается памяти
академика РАСХН
Георгия Сергеевича
МУРОМЦЕВА*

Москва - 2011

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* КАК КОМПОНЕНТОВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Аксенова Е.И.

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Россия, 127550,
Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Как известно, туберкулез по-прежнему считается одной из самых опасных инфекционных болезней, распространенных повсеместно, и остается важной причиной гибели людей во всем мире. Единственной разрешенной в настоящее время вакциной от туберкулеза является вакцина BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), которая представляет собой живой аттенуированный штамм *Mycobacterium bovis*. Она безопасна, недорога, достаточно эффективно защищает детей, однако для защиты взрослого населения от легочной формы заболевания, приводящей к тяжелой эпидемической ситуации, ее эффективность колеблется от 0 до 80 % (Rook G.A.W., 2001).

Субъединичные генно-инженерные препараты, содержащие отдельные антигены микобактерий, представляют большой интерес. Они обладают такими существенными преимуществами как низкая реактогенность, высокая чистота получаемого продукта, а также безопасность для людей с ослабленным иммунитетом. По мнению многих авторов, основными иммунодоминантными антигенами протективного иммунитета являются секреторные белки, присутствующие в культуральном фильтрате *M. tuberculosis*. Среди них наиболее полно охарактеризованы близкородственные белки комплекса Ag85 (Ag85A, B и C), ESAT-6 (Early Secret Antigen Target) и CFP-10 (Culture-Filtrate Protein) (Andersen P., 2005, Mustafa A.S., 2002).

Однако получение рекомбинантных белков осложнено гетерологичной экспрессией, сложностями с выделением и очисткой. Для преодоления существующих трудностей в настоящей работе использовали следующий подход: конструирование химерных белков за счет соединения в одной рамке трансляции двух генов – гена целевого белка и белка-носителя, приводящего к синтезу рекомбинантных белков в штамме-продуценте.

На основе непатогенных лабораторных штаммов *Escherichia coli* были созданы эффективные бактериальные продуценты. Синтезируемые в клетках химерные белки содержат последовательности полноразмерных белков CFP-10, ESAT-6, Ag85A *M. tuberculosis*, Gly-Ser спейсера и целлюлозосвязывающего домена (CBD) эндо-1,4-β-глюканазы CelD *Anaerocellum thermophilum*. Благодаря аффинному взаимодействию CBD с целлюлозной матрицей, проводили выделение, концентрирование и очистку рекомбинантных белков в одну стадию (Волков И.Ю., 2004, Великодворская Г.А., 2006). Синтезируемые в штаммах-продуцентах белки CFP10-CBD (32,8 кДа), ESAT6-CBD (32,0 кДа), Ag85A-CBD (54,1 кДа) являются единственными прочно связывающимися с целлюлозным сорбентом, поскольку в клетках *E. coli* отсутствуют белки, взаимодействующие с этим полисахаридом. Из нескольких видов проверенных в работе целлюлозных сорбентов, наибольшей сорбционной емкостью обладали препараты сферической пористой целлюлозы с аморфной структурой Perloza (фирма Iontosorb, Czech Republic). Они позволяли получить высокую концентрацию белка на матрице и в то же время, в условиях наименьшего повреждающего действия для белков обеспечивали их эффективную десорбцию с сорбента. В свободном состоянии

антигены представляли собой растворы белков с определенной ионной силой, свободные от примесей полисахаридов, ДНК штамма-производителя.

Сохранение нативной конформации рекомбинатных молекул проверяли методом многокомпонентного иммуноанализа. В частности для белков CFP10-CBD, ESAT6-CBD было показано, что смысловые домены ESAT-6 и CFP-10 в составе химерных белков сохранили свои антигенные свойства.

Для усиления иммуногенных свойств, рекомбинатные белки за счет CBD иммобилизовали на аморфной целлюлозе, полученной медно-аммиачным способом по методу Гурвича А.Е. с модификациями. Мы предположили, что использование этого полисахарида в качестве адъюванта (Гурвич А.Е. 1987) будет способствовать формированию пространственной структуры антигенов, что позволит эффективно презентовать белки клеткам иммунной системы, усилит иммунный ответ за счет укрупнения молекулы иммуногена, замедлит высвобождение антигена и пролонгирует иммунный ответ (функция депо в организме).

В серии проведенных опытов на разных линиях мышей при экспериментальном туберкулезном инфицировании нами было показано, что двукратное подкожное введение полученных препаратов белково-целлюлозных комплексов (10 мкл белка/мышь), индуцировало антиген-специфический иммунный ответ (Рис. 1, на примере антигена Ag85A-CBD) и стимулировало продукцию Т-лимфоцитами ИФН- γ , который является основным цитокином в развитии адаптивного иммунитета, преимущественно клеточного характера (North R.J., 2004), при туберкулезе.

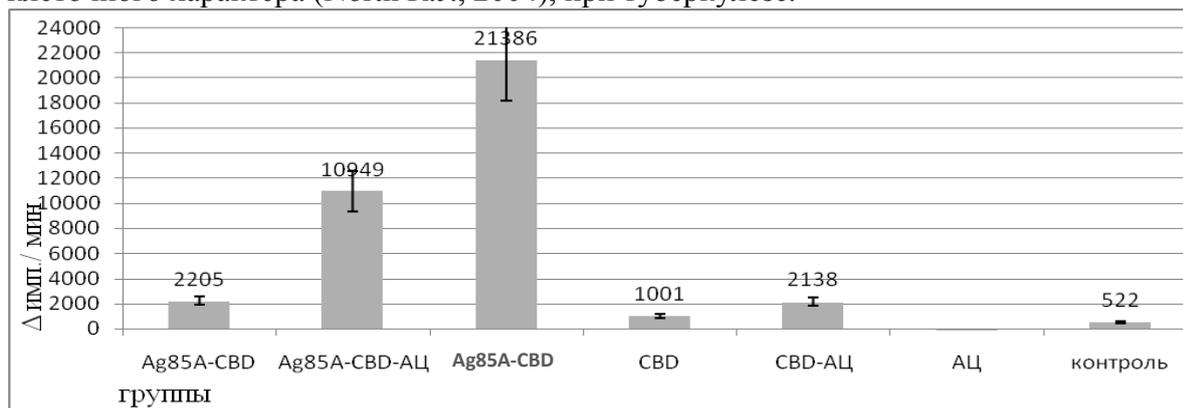


Рисунок 1. Проллиферативный ответ клеток паховых лимфатических узлов на антиген Ag85A после двукратной подкожной иммунизации препаратами Ag85A-CBD, Ag85A-CBD-АЦ, Ag85A-CBD+НАФ, CBD, CBD-АЦ, АЦ мышей линии C57Bl/6. Δ имп./мин – разница значений имп./мин для каждой группы при добавлении и без антигена Ag85A. АЦ – аморфная целлюлоза.

Основным показателем эффективности вакцинных препаратов является их способность защищать организм от заболевания, вызываемого вирулентным штаммом *M. tuberculosis*. Это проявляется, в частности, в снижении бактериальной нагрузки в органах и удлинении времени жизни зараженных животных. В проведенных экспериментах *in vivo* удалось также показать, что при двукратном подкожном введении рекомбинатные антигены (CFP10-CBD, ESAT6-CBD, Ag85A-CBD) в иммобилизованной форме, снижали бактериальную нагрузку в легких (7-9 раз) и в селезенке (2-4 раза) после внутривенного заражения *M. tuberculosis* H37Rv. Препараты увеличивали продолжительность жизни как устойчивых (C57Bl/6), так и чувствительных (I/St) к туберкулезной инфекции линий мышей при внутривенном и аэрозольном заражении *M. tuberculosis* H37Rv.

Таким образом, разработанные препараты белково-целлюлозных комплексов могут рассматриваться как охарактеризованные перспективные компоненты для получения кандидатной субъединичной генно-инженерной противотуберкулезной вакцины.

ОТКРЫТАЯ РАМКА СЧИТЫВАНИЯ 2 В ГЕНОМЕ X ВИРУСА ШАЛОТА КОДИРУЕТ МОЩНЫЙ СУПРЕССОР РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Архипов А.В.

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

X вирус шалота (ХВШ) - типовой представитель рода *Allexivirus* сем. *Alphaflexiviridae*. Вирионы ХВШ представляют собой нитевидные частицы длиной 800 нм и диаметром 12 нм. Геном ХВШ – одноцепочечная РНК (+)полярности и длиной 8890 нуклеотидов (не считая 3' – концевой полиА последовательности) – включает шесть открытых рамок считывания (ORF, Рис 1). Характерной особенностью ХВШ является наличие ORF, кодирующей уникальный (не имеющий гомологов за пределами рода *Allexivirus*) белок с мол. массой 42 kDa.

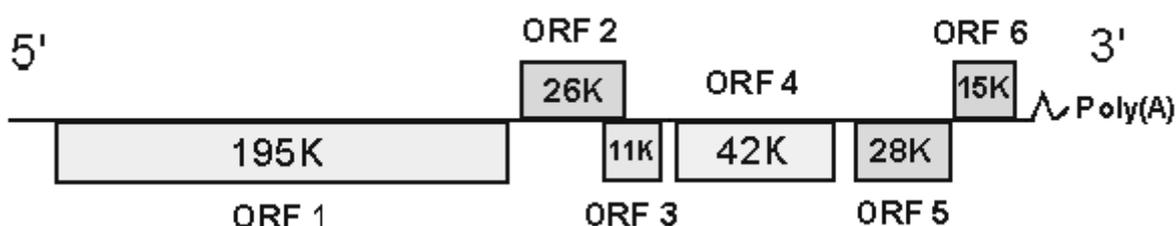


Рис 1. Генетическая карта ХВШ.

В контексте общей задачи исследования структуры и механизмов экспрессии генов ХВШ и функций кодируемых ими белков целью данной работы являлось идентификация гена белка-супрессора РНК-интерференции – основного механизма противовирусного фитоиммунитета. Для решения этой задачи была применена технология «silencing on the spot». Гены 3'-области генома ХВШ амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с фланкирующими праймерами, несущими сайты рестрикции *Xba*-I и *Nco*-I, и ампликоны клонировали в бинарный вектор pLH – 7000*. Плазмидами pLH – 7000*, содержащими вставки, кодирующие тот или иной белок, трансформировали устойчивый к рифампицину штамм C58C1 *Agrobacterium tumefaciens*, и последующую агроинъециацию растений *Nicotiana benthamiana* осуществляли в следующих вариантах: 1. агробактерии (АГ), несущие вставку, кодирующую растворимую форму зеленого белка медузы (GFP) + АГ без вставок; 2. АГ, несущие вставку GFP + АГ со вставкой, кодирующей шпилечную структуру, подавляющую экспрессию GFP (dsGFP) + АГ без вставок; 3. АГ, несущие вставку, кодирующую белок-супрессор γb + АГ со вставками GFP или dsGFP; 4. АГ, несущие вставку, кодирующую белок-супрессор p19 + АГ со вставками GFP и dsGFP; 5. АГ, несущие вставку, кодирующую первый белок тройного блока генов (TGB1, ORF2) + АГ со вставками GFP и dsGFP; 6. АГ, несущие вставку, кодирующую второй белок тройного блока генов (TGB2, ORF3) + АГ со вставками GFP и dsGFP; 7. АГ, несущие вставку, кодирующую 42К-белок + АГ со вставками GFP и dsGFP; 8. АГ, несущие вставку, кодирующую капсидный белок (СР) + АГ со вставками GFP и dsGFP; 9. АГ, несущие вставку, кодирующую 15К- белок + АГ со вставками GFP и dsGFP. Инфильтрированные листья *N. benthamiana* были собраны через 2, 4 и 6 дней. Уровень экспрессии GFP, коррелирующий с уровнем супрессорной активности того или иного белка, исследовали методом иммуноблоттинга. Максимальный эффект наблюдали на 4 день после инфильтрации.

Полученные результаты свидетельствуют о сильной супрессорной активности белка TGB1 (ORF2); незначительной супрессорной активностью обладает также белок TGB2 (ORF3), что, возможно, является артефактом, обусловленным наличием

перекрывающихся последовательностей в соответствующих генах. Эти данные соответствуют нашим представлениям об участии потексвируса в возникновении генома ХВШ и позволяют использовать данные, полученные на модели р25-белка потексвирусов, при изучении механизма действия белка-супрессора ХВШ.

ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЁРОВ УСТОЧИВОСТИ К ПРОРАСТАНИЮ В КОЛОСЕ У ГЕКСАПЛОИДНОЙ ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ

Баженов М.С.

*Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.
Тимирязева, Россия, Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д.49.*

Тритикале – новый род культурных растений семейства злаковых (Poaceae Barnhart), созданный человеком путем гибридизации пшеницы с рожью и представляющий собой совокупность аллополиплоидов различного геномного состава. В настоящее время наибольшее распространение в сельском хозяйстве получила гексаплоидная тритикале ($2n=42$) с геномной формулой AABBRR, которую выращивают как зерновую, укосную с пастбищную культуру.

Использование зерна тритикале в хлебопекарной промышленности ограничено, как правило, низкой водоудерживающей способностью крахмала и слабой клейковиной. Одной из причин снижения урожайности и хлебопекарных качеств зерна тритикале является его прорастание в колосе до уборки. Начавшее прорасти в колосе зерно быстро теряет всхожесть при хранении. Повышение устойчивости тритикале к прорастанию зерна в колосе является актуальной проблемой селекции для всех регионов возделывания, где наблюдаются осадки в период созревания и уборки зерна.

Устойчивость зерновых культур к предуборочному прорастанию является комплексным свойством. Основным компонентом устойчивости считается продолжительность покоя семян после созревания; дополнительными – физические (водозащитные) свойства колоса, химический состав колосовых чешуй, сроки созревания зерна. Помимо устойчивости также встречается явление толерантности, когда крахмал зерна не повреждается при прорастании.

Сложный генетический контроль устойчивости к прорастанию в колосе и высокая трудоемкость селекционных испытаний обусловили целесообразность поиска локусов количественных признаков (QTL) и генов, определяющих это свойство у пшеницы и ржи. Несмотря на успехи в данной области исследований, молекулярных маркёров устойчивости, пригодных для использования на тритикале, до сих пор найдено не было. Целью данной работы стоит проверка эффективности некоторых маркёров устойчивости к прорастанию в колосе, разработанных на пшенице, применительно к тритикале.

Материалом для исследований послужили 4 популяции F_2 следующих гибридных комбинаций: 1 – 21759/97 x Александр, 2 – 21759/97 x Fidelio, 3 – 21759/97 x КП-08-№2, 4 – Александр x Fidelio. Следует отметить, что среди родительских форм, участвовавших в скрещиваниях, только лишь польский сорт Fidelio достоверно отличался пониженной устойчивостью к прорастанию зерна в колосе и слабым покоем семян. Линия 21759/97 имеет замещение ржаной хромосомы 2R на хромосому 2D мягкой пшеницы (Баженов и др, 2011). Было обнаружено, что сорт Fidelio и линия 21759/97 обладают аллелем гена *Rht1*, обуславливающим гиббереллин-нечувствительную низкостебельность.

Исследование проводилось на Селекционной станции имени П.И. Лисицына и в Центре молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева в 2010

году. Покой семян, собранных в фазу восковой спелости с растений F₂, определяли проращиванием в чашках Петри на свету при 26°C с последующим расчётом взвешенного индекса прорастания по формуле, предложенной Walker-Simmons (1988), модифицированной для 14-и дней испытания. Пробы листовой ткани для выделения ДНК отбирали с тех же растений ранее, помечая их этикетками. ДНК выделяли по методу Bernatzky и Tanksley (1986) с модификациями. ПЦР-анализ проводили с использованием следующих SSR-маркёров: *Xwmc111* и *Wms261* как маркёров 2D-хромосомы – в гибридных комбинациях 1, 2 и 3; *Xwmc104*, *Xgwm155* – в комбинациях 2 и 4; *Xbarc55*, *Xbarc170*, *Xbarc12* – в комбинации 4; STS-маркёров: *Vp-1B3* – маркёра аллельного состояния гена *Vp* (*Viviparous*) в комбинациях 2 и 4; *BF-MR1* и *BF-WR1* – маркёров аллельного состояния гена короткостебельности *Rht1* (*Rht-B1*) – в комбинациях 1, 3 и 4, *Sec2* – маркёра гена запасного белка ржи (секалина) для идентификации 2R-хромосомы в комбинациях 1, 2 и 3. Разделение продуктов ПЦР осуществляли электрофорезом в 1,5%-ном и 3%-ном агарозном геле с ТВЕ-буфером при напряжённости электрического поля 6 В/см. Для статистической обработки данных использовали однофакторный дисперсионный анализ в программе MS Excel.

Статистически значимую связь со взвешенным индексом прорастания показали маркёры 2D и 2R хромосом в F₂ гибридной комбинации 21759/97 x Fidelio. Причём растения, с ДНК которых амплифицировались маркёры *Xwmc111* и *Wms261*, присущие 2D-хромосоме, но не амплифицировался маркёр гена *Sec2*, локализованного во второй хромосоме ржи, имели наиболее глубокий покой семян. Так, по-видимому, проявляют себя растения, имеющие 2R/2D хромосомное замещение. Повышенная устойчивость к прорастанию в колосе у 2R/2D-замещённых форм, по-видимому, является следствием влияния QTL, локализованных на 2-ой хромосоме ржи и соответствующей хромосоме D-генома пшеницы. В остальных двух комбинациях с участием 2D/2R-замещённой линии 21759/97 достоверной связи покоя семян с амплификацией маркёров 2D и 2R хромосом обнаружено не было. В то же время, во всех трёх гибридных популяциях выявлена тесная связь данных маркёров с морфологическими параметрами растений (числом колосков и длиной колоса).

В комбинации Александр x Fidelio была обнаружена значимая связь индекса прорастания с дозой аллеля короткостебельности *Rht-B1b*, причём наличие последнего в генотипе растения давало более продолжительный покой созревших на нём семян. Данная связь может объясняться тем, что аллель *b* гена *Rht-B1* (*Rht1*) представляет собой мутацию, обуславливающую пониженную чувствительность тканей растения к гиббереллинам. Известно, что данные фитогормоны способствуют выходу семян из состояния покоя и стимулируют процессы, происходящие при прорастании. Достоверной связи с аллельным состоянием гена *Rht-B1* в других полиморфных по нему популяциях выявлено не было.

Статистически достоверной связи индекса прорастания с аллельным состоянием других микросателлитных локусов (*Xwmc104*, *Xgwm155*, *Xbarc55*, *Xbarc170*, *Xbarc12*) и гена *Vp* в вышеуказанных гибридных комбинациях обнаружено не было.

Предварительные результаты скрининга коллекции озимой тритикале по гену *Rht-B1* показали отсутствие прямой связи высоты растений с наличием аллеля короткостебельности. Таким образом, низкорослый фенотип растения не позволяет судить о наличии данного аллеля в генотипе. Применение молекулярных маркеров аллельного состояния гена *Rht-B1* в гибридных популяциях или подбор родительских пар с их использованием позволит целенаправленно вести одновременный отбор на устойчивость к полеганию, высокую урожайность совместно и устойчивостью к прорастанию зерна в колосе. Следует учитывать, однако, что влияние данного гена на покой семян может быть подавлено действием других генов, а также специфическими погодными условиями.

Целесообразность использования 2D/2R-замещённых форм в селекции тритикале является спорным, так как предыдущими исследованиями была показана их пониженная адаптивность к абиотическим стрессовым факторам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баженов М.С. и др. 2011. Известия ТСХА, №2 (в печати).
2. Bernatzky R. and S.D. Tanksley. 1986. Theor. Appl. Genet. 72:314-321.
3. Walker-Simmons M. 1988. Plant, Cell and Environment. 11:769-775.

«ИСКУССТВЕННЫЕ СЕМЕНА» ЗЕМЛЯНИКИ: ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ И ХРАНЕНИЮ

Белякова Л.В.

Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства Россельхозакадемии, Россия, 115598 г. Москва

В настоящее время технология создания «искусственных», или «синтетических семян» считается перспективным направлением в области биотехнологии сельскохозяйственных растений, поскольку позволяет сохранить и размножить ценные генотипы и формы. Одним из главных преимуществ данного метода является упрощение процесса хранения растительного материала, а также адаптации «искусственных семян» к нестерильным условиям. Это позволяет существенно экономить материальные и трудовые ресурсы, что особенно важно при промышленном тиражировании растений.

Анализ литературных данных показывает, что проблемой создания «искусственных семян» активно занимаются зарубежные ученые с 1980-х гг. и к настоящему моменту достигнуты определенные успехи. Так, например, подобран набор реагентов для инкапсуляции – это 2%-ный раствор альгината натрия и комплексообразующий 100 мМ раствор хлорида или нитрата кальция [1-3]. Проведен обширный ряд исследований, посвященных индуцированию устойчивости инкапсулированных зародышей к высушиванию для последующего хранения в жизнеспособном состоянии [1, 4, 5]. В результате серии экспериментов учеными была показана возможность хранения «искусственных семян» в течение определенного промежутка времени с сохранением жизнеспособности и всхожести на питательной среде и в почве [6-9]. Проводится работа по усовершенствованию качества «искусственной» оболочки, разрабатывается методика двойного инкапсулирования для увеличения ее прочности.

Однако, несмотря на весомые достижения, ряд проблем остается нерешенным в настоящее время. И большая часть из них связана с объектом для инкапсуляции. В качестве «искусственного зародыша» исследователи чаще всего отдают предпочтение соматическим эмбрионам, получение которых можно полностью автоматизировать при помощи биореакторов. Вместе с тем их широкому применению препятствуют следующие трудности:

- 1) ограниченное производство жизнеспособных эксплантов, пригодных для создания «искусственных семян»;
- 2) аномальное и асинхронное развитие соматических эмбрионов;
- 3) неправильное созревание соматических эмбрионов, в результате чего они не способны прорасти и превращаться в нормальные растения;

4) отсутствие периода покоя и устойчивости к стрессовым факторам препятствует хранению «искусственных семян» в течение длительного промежутка времени в жизнеспособном состоянии;

5) даже внешне нормально созревшие соматические эмбрионы плохо прорастают в нормальные растения, что существенно снижает их ценность.

Альтернативой соматическому эмбриогенезу может являться использование микропобегов и почек в качестве объекта для инкапсуляции. Цель наших исследований - отработка методики создания «искусственных семян» земляники, а также исследование возможности их хранения при пониженной температуре и проращивания на искусственной питательной среде и в почве.

Мы использовали микропобеги и почки земляники садовой (*Fragaria x ananassa Duch.*) сортов Роксана, Покахонтас и Дивная для создания «искусственных семян». Использовали два раствора для инкапсуляции: первый содержал хлорид кальция (0,1М 20%-ный), растворенный в бидистиллированной воде; в состав второго раствора входили соли по Мурасиге-Скугу, БАП (0,25 мг/л), ИМК (0,0025 мг/л) и альгинат натрия (30 г/л). Для проращивания «искусственных семян» использовали питательную среду Мурасиге-Скуга, обогащенную 1 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, без сахарозы. В рекогносцировочном опыте с эксплантами земляники сорта Роксана изучали влияние сахарозы, добавленной в раствор альгината натрия в концентрациях 3% (контроль) и 6% (опыт). В дальнейшем изучали влияние состава питательной среды для подготовки эксплантов перед инкапсуляцией на процент прорастания «искусственных семян» земляники сортов Покахонтас и Дивная в почве. Первый вариант: питательная среда Мурасиге-Скуга, обогащенная БАП (0,2 мг/л) и сахарозой (6%); второй вариант: питательная среда с добавлением паклобутразола (1 мг/л). Полученные «искусственные семена» земляники были помещены в закрытых чашках Петри в холодильник при температуре +2...+4°C и через 30 дней адаптированы к нестерильным условиям теплицы.

В результате экспериментов было установлено, что повышение концентрации сахарозы в оболочке капсулы существенно не повлияло на жизнеспособность и процент прорастания «искусственных семян» земляники сорта Роксана. В контрольном варианте выжило и проросло на питательной среде 65% инкапсулированных микропобегов, в опытном – 69%, полученные микрорастения в дальнейшем нормально росли и развивались и были готовы к адаптации к нестерильным условиям.

Прорастание «искусственных семян» земляники сортов Покахонтас и Дивная было замечено, спустя 30 дней после хранения при пониженной температуре. При этом мы отметили, что микрорастения земляники сорта Покахонтас были лучше подготовлены к инкапсуляции на питательной среде с повышенной концентрацией сахарозы при пониженной концентрации БАП (1-й вариант), благодаря чему процент прорастания «искусственных семян» в почве составил 56,8%, а в варианте с паклобутразолом (2-й вариант) – 43,2%.

Установлено, что приживаемость и процент прорастания «искусственных семян» земляники зависят как от условий подготовки эксплантов перед инкапсуляцией и хранения капсул, так и от сортовых особенностей растений. Результаты опыта показали, что при хранении инкапсулированных пропагул земляники сорта Дивная, подготовленных на питательной среде с паклобутразолом, процент прорастания их в условиях холодильника составил 32,4%. У сорта Покахонтас этот показатель был в 2,5 раза ниже (13,2%). Процент прорастания в почве «искусственных семян» земляники сорта Покахонтас, подготовленных на питательной среде с паклобутразолом, составил 43,2%. У сорта Дивная проросло в 1,8 раза больше «синтетических семян» (76,7%) при тех же условиях подготовки микрорастений и хранения капсул.

Таким образом, в результате проведенных исследований мы получили «искусственные семена» земляники, способные храниться в холодильнике при пониженной температуре в течение месяца и затем успешно прорасти в почве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Redenbaugh, K. Application of artificial seeds to tropical crops / K. Redenbaugh // HortSci. – 1990. – N 25. – P. 251–255.
2. Redenbaugh, K. Hydrated coatings for synthetic seeds / K. Redenbaugh, J.A. Fujii and Slade // in Synseeds (ed. Redenbaugh K.), CRC Press, Boca Raton. – 1993. – P. 38–46.
3. Ara, H. Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*Mangifera indica*) / H. Ara, U. Jaiswal and V.S. Jaiswal // Plant Cell Rep. – 1999. – N 19. – P. 166–170.
4. Senaratna, T. Significance of the zygotic seed coat on quiescence and desiccation tolerance of *Medicago sativa* L. somatic embryos / T. Senaratna, P.K. Saxena, M.V. Rao and J. Afele // Plant Cell Reports. – 1995. – V. 14. – N. 6. – P. 375–379.
5. Attree, S. M. Development of white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum and their tolerance to drying and frozen storage / S. M. Attree, M. K. Pomeroy and L. C. Fowke // J. Exp. Bot. – 1995. – 46. – P. 433–439.
6. Tsai, C.J. Encapsulation, germination and conversion of somatic embryos in sugar beet / C.J. Tsai, J.W. Saunders // Journal of sugar beet research. – 1999. – V. 36. – N. 4. – P. 11–32.
7. Bagniewska-Zadworna, A. *In vitro* storage of *Polypodium vulgare* L. rhizome shoot tips using ABA treatment before dehydration –encapsulation technique / Agnieszka Bagniewska-Zadworna, Elzbieta Zenkteler // Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. – 2002. – N. 44. – P. 231–236.
8. Micheli, M. Effects of double encapsulation and coating on synthetic seed conversion in M.26 apple rootstock / M. Micheli, S. Pellegrino, E. Piccioni and A. Standardi // Journal of Microencapsulation. – 2002. – V. 19. – N. 3. – P. 347–356.
9. Fan, S. Method of *ex vitro* sowing, germination, growth and conversion of plant somatic embryos or germinants and nutrient medium used therefor / S. Fan, S. C. Grossnickle, M. Rise, S. M. Attree, R. Folk // Патент № WO2005053383 (A1). Дата публикации 16.06.2005.

БЕЛКИ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА РАСТЕНИЯ-ЭКСТРЕМОФИТА *THELLUNGIELLA SALSUGINEA*

Бердникова М.В., Таранов В.В.

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Россия, 127550, Москва,
ул. Тимирязевская, д. 42, e-mail: mberdnikova@yahoo.com

В близком к *Arabidopsis thaliana* растении-экстремофите *Thellungiella salsuginea* (новой модели для изучения стресс-устойчивости) идентифицированы четыре гена, кодирующие белки с доменом холодового шока (CSDP). Трансляция *in silico* показала высокую гомологию (до 95%) с белками AtCSP1–4 арабидопсиса; белки *T. salsuginea*, обозначенные TsCSDP1–TsCSDP4, имеют почти идентичные CSD, но различаются числом следующих за ним мотивов “цинковый палец” (6, 2, 7, 2 соответственно), разделенных богатыми глицином участками.

Чтобы выяснить, какие структурные особенности необходимы для РНК-шаперонной активности CSDP *T. salsuginea*, мы провели тест на восстановление способности к росту при пониженной температуре (17°C) у четверного мутанта *E. coli*

(BX04: $\Delta cspA$, $\Delta cspB$, $\Delta cspE$, $\Delta cspG$). Белки с доменом холодового шока *Thellungiella salsuginea* не способны восстанавливать рост мутантных бактерий, также как и С-концевые домены, несвойственные бактериям и включающие в себя глицин-богатые участки и мотивы цинковых пальцев. В то же время домены холодового шока данных белков способствуют восстановлению роста бактерий при пониженной температуре.

Дальнейшее изучение устойчивости к абиотическим стрессам трансгенных растений, протрансформированных аналогичными конструкциями, позволит сделать вывод о том, насколько способность к восстановлению роста мутантных бактерий коррелирует с увеличением устойчивости трансгенных растений.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ПРОДУКТИВНОСТИ

Богачева Н.Н., Федуллова Т. П., Федорин Д.Н.

***ГНУ Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А. Л. Мазлумова РАСХН
Россия, 396030, Воронежская обл. Рамонский р-н, ВНИИСС
e-mail: biotechnologiya@mail.ru***

Получение высокопродуктивных гибридов сахарной свеклы предполагает привлечение для скрещиваний ценного в селекционном отношении исходного материала. Решению проблем при создании и отборе форм растений способствует разностороннее изучение как родительских компонентов, так и получаемых гибридов.

В настоящее время ведутся обширные исследования, направленные на поиск маркеров, сцепленных с гетерозисом. Важную роль в проявлении гетерозиса играет наличие генетической дивергенции между исходными формами (Конарев, 1993). Широко применяются методы молекулярного маркирования (RELP, RAPD, AFLP, SSR, белковые), которые позволяют сгруппировать изучаемый материал по степени генетического родства (Yong-II Cho, Xiao, Li, 1996).

С использованием белковых маркеров (11S-глобулинов) нами исследована генетическая отдаленность исходных родительских компонентов гибридов сахарной свеклы с различной продуктивностью по урожаю корнеплодов. Математической обработке подвергался компонентный состав основных (наиболее часто встречающихся в процентном отношении) типов спектров, характерных для каждой изучаемой линии. Генетические дистанции рассчитывали с использованием программы Statistika 6.0.

Сопоставление данных по продуктивности исследованных селекционных материалов с результатами кластерного анализа (рис.1) показало, что скрещивание линий, наиболее генетически отдаленных друг от друга, играет важную роль в проявлении эффекта гетерозиса у гибридов. Так, наибольшее генетическое расстояние (2,65) выявлено между мужскостерильной линией МС 94 Ар и многосемянным опылителем ОП 15202. Гибрид, полученный при скрещивании данных селекционных материалов, превышает стандарт по урожайности на 19% (37,50т/га). Минимальное генетическое расстояние (1,7) выявлено для образцов МС Льговская одн. 52 и ОП15202. Гибрид, полученный с использованием этих линий, не является гетерозисным и характеризуется урожайностью ниже на 1,2%, чем у его лучшей исходной родительской формы - мужскостерильной линии Льговская одн. 52.

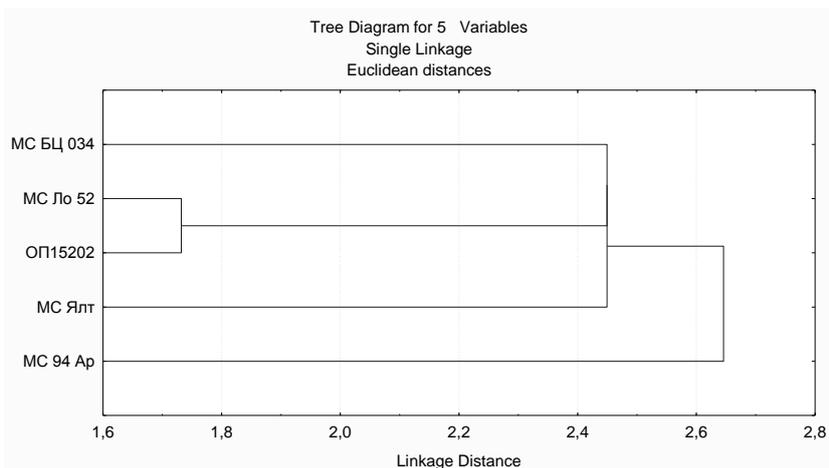


Рис. 1. Дендрограмма генетических расстояний по компонентному составу основных белковых спектров исходных материалов сахарной свеклы.

Выявленные нами генетические различия по белковым маркерам между родительскими формами позволяют прогнозировать повышенную продуктивность гибридов с их участием.

Проведение молекулярного анализа (RAPD - PCR) с использованием праймеров, сконструированных на основе произвольных локусов генома (PAWS 5, PAWS 6, PAWS 16, PAWS17) исходных родительских форм и гибридов сахарной свеклы позволили выделить праймер PAWS 5, характеризующийся наибольшим генетическим полиморфизмом. Анализ электрофореграмм показал, что низкопродуктивные гибриды характеризуются уменьшением числа повторов локуса генома PAWS 5, отсутствием фрагментов ДНК, характерных для родительских исходных форм. Высокопродуктивные гибриды отличаются увеличением числа повторов данного локуса, их родительские формы имеют значительные генетические различия, выявляемые на электрофореграмме продуктов амплификации праймером PAWS 5. Так, гибрид № 08003, превышающий по урожайности (29,11 т/га) стандарт на 8% и наиболее продуктивный по сбору сахара – 112,2 % от стандарта, имеет восьмикратный повтор участка генома с последовательностью AAC GAG GGG TTC GAG GCC (PAWS 5) длиной от 200 п.н. до 1500 п.н. Данный локус обнаружен у обоих родительских компонентов в значительно меньшем количестве (у каждого из родителей двукратный повтор). Увеличение повторов локуса при гибридизации, возможно, объясняется эпистатическим межгеномным взаимодействием и является основой проявления гетерозиса и усиления признака продуктивности.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности применения молекулярно-генетических маркеров для подбора родительских пар при проведении гибридизации.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНОТИПА АНТУРИУМА АНДРЕ (*ANTHURIUM ANDREANUM* LINDEN) НА ПОБЕГООБРАЗОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Богданова В.Д., Исачкин А.В.

Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д.49., Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева, e-mail: meecado@gmail.com

Антуриум Андре на сегодняшний день является одной из наиболее перспективных красивоцветущих горшечных и срезочных культур в России. В промышленном цветоводстве антуриум размножают исключительно через культуру тканей. В большинстве случаев используют культуру каллусной ткани (О.В. Митрофанова, А.М. Мустафин, 1985). В качестве экспланта используют сегменты листовой пластинки. В таком способе in vitro размножения существует ряд недостатков: самоклональная вариабельность и длительность культивирования. В исследовании использовали в качестве эксплантов сегменты побега с терминальной или боковой почкой для получения прямого побегообразования и изучили влияние генотипа антуриума Андре на побегообразование в условиях in vitro.

ВВЕДЕНИЕ

Антуриум Андре (*Anthurium andreanum* Linden) – относится к семейству ароидные, подсемейству потосовые. Растет в субтропических районах Колумбии — на болотах, в сырых местах, иногда как эпифит. Листья продолговато-ланцетные, до 30 см длиной, с сердцевидным основанием и длинными черешками (Н.Н. Капранова, 1989). Мелкие, невзрачные цветки антуриума Андре собраны в соцветие — желто-белый, розовый или малиновый початок длиной 6-7,5 см, до 10 см. Початок окружен большим (у некоторых сортов и гибридов до 15 см в диаметре) розовым, белым, красным или малиновым покрывалом (Н.А. Денисьевская, Т.К. Майко, Г.П. Кушнир, 1988).

При использовании метода прямого побегообразования из выделенных почек первичные побеги в культуре образуются без промежуточной стадии каллусообразования, таким образом исчезает вероятность самоклональной вариабельности и аномальное перерождение растения, но при этом увеличиваются затраты на размножение. От 5-10 почек можно получить со стебля растения антуриума Андре; сегменты побега с почкой поверхностно стерилизуют и очищают до 2мм в основании. Побегообразование поддерживается на жидкой модифицированной среде MS, содержащей 3/8 макро солей MS, 15% эндосперма кокосового ореха, 2% сахарозы. Через 12-18 месяцев из каждой почки развивается единственный удлиненный побег. (Kunisaki, 1980).

Следует отметить, что генотип играет важную роль при регенерации и размножении антуриума (Pierik, 1974).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в лаборатории генетики, селекции и биотехнологии овощных культур на Селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева в 2006-2010 годах.

В качестве экспланта были использованы сегменты побегов антуриума Андре, содержащих терминальную или боковую почки, таких сортов как: 'Orange love', 'Dakota', 'Sumi', 'Marasol'. В качестве основы питательной среды использовали 1/2 MS по макро элементам, 2 мг/л БАП, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агар-агара, pH 5,8. Опыт проводили в 3-кратной повторности.

Использовали стандартный метод стерилизации эксплантов. Побеги антуриума нарезали сегментами 1X1,5 см с терминальной или боковой почкой, которые замачивали в 1/10 (0,5%) гипохлорите натрия в течение 15 мин. В стерильных условиях выделяли эксплант с почкой, таким образом, чтобы расстояние от почки до

питательной среды было не менее 2 мм и замачивали в течение 25 мин в 1/10 (0,5%) гипохлорита натрия с последующей 3-кратной промывкой в стерильной воде (Kute Lydiane, Kleyn, John G., 1996).

Далее экспланты помещали в стерильных условиях на питательную среду и культивировали при 16-и часовом фотопериоде, температуре 24°C в течение 40 дней. Из меристематических тканей стебля в процессе культивирования получили адвентивные почки. Сегменты стебля с адвентивными почками поместили на питательную среду ½ MS по макро элементам, 2 мг/л БАП, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агар-агара, рН 5,8 для дальнейшего культивирования и побегообразования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные по основным показателям побегообразования, такие как количество побегов со 100 мм² базальной части (сегмент стебля с меристематической тканью), средняя длина побегов, количество узлов и площадь листовой пластинки представлены в табл. № 1. Для оценки достоверности различий между вариантами опыта был использован однофакторный дисперсионный анализ.

Анализ показал, что на длину побега достоверно влияет генотип антуриума, доля влияния фактора составляет 72%. Установлено, что сорт 'Sumi' достоверно отличается от сортов 'Orange love', 'Dakota' и имеет наибольшую среднюю длину побегов – 14,52 мм (рис. 1).

На площадь листовой пластинки достоверно влияет генотип антуриума, доля влияния фактора составляет 94%. Установлено, что сорт 'Sumi' достоверно отличается от сортов 'Orange love', 'Dakota', 'Marasol' и имеет наибольшую площадь листовой пластинки – 70,13 мм² (рис. 1). Установлена обратная зависимость – с увеличением количества побегов с базальной части, уменьшается длина побегов и площадь листовой пластинки. Коэффициент корреляции между количеством и длиной побегов $r = - 0,75$, корреляция тесная. Коэффициент корреляции между количеством побегов и площадью листовой пластинки $r = - 0,71$, корреляция тесная. Также установлена прямая зависимость между длиной побега и площадью листовой пластинки – с увеличением длины побега, увеличивается площадь листовой пластинки, $r = 0,80$, корреляция тесная.

Таблица № 1. Показатели побегообразования сортов антуриума Андре.

	признак	orange love	dakota	sumi	marasol
1	площадь базальной части, мм ²	100,00	100,00	100,00	100,00
2	количество побегов с 100 мм ²	4,45	5,80	1,81	2,58
3	длина побега, мм ср	7,94	4,62	14,52	10,13
4	количество узлов, шт. ср	2,7	1,93	5,1	3,35
5	площадь листовой пластинки, мм ²	4,25	14,25	70,13	20,62

ВЫВОДЫ

На длину побегов и площадь листовой пластинки в условиях *in vitro* влияет генотип антуриума Андре. При культивировании на питательной среде ½ MS по макро элементам, 2 мг/л БАП, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агар-агара, рН 5,8 наибольшую длину побегов – 14,52 мм и наибольшую площадь листовой пластинки – 70,13 мм² получили у сорта 'Sumi', при этом наблюдалось наименьшее количество побегов со 100 мм² базальной части. Наибольшее количество побегов было получено у сорта 'Dakota' -5,80 шт. Вероятно, способность к побегообразованию у сортов с красной окраской

покрывала выражена лучше. Поэтому для сортов со светлой окраской покрывала необходимы дополнительные исследования. На этапе размножения в условиях *in vitro* необходимо получение оптимального соотношения количество побегов к длине побегов. Поэтому необходимы дополнительные исследования при размножении ценных сортов антуриума в условиях *in vitro*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Kunisaki J.T.(1980) *In vitro* propagation of Anthurium andreaum Lind. Hort. Science 15: 508-509. Matsumoto T.K. and Kuehne A.R (1997) Micropropagation of Anthurium. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 40, pp 14-29. Croat T (1986) The distribution of Anthurium (Araceae) in Mexico, Middle America and Panama. Selbyana 9: 94-99.
2. Kytte, Lydiane. Plants from test tubes: an introduction to micropropagation, 3rd ed. 1996.
3. Pierik RLM, Steegmans NHM, van der Meys JAJ (1974) Plantlet formation in callus tissue of Anthurium andreaum Lind. Sci Horti 2: 193-198.
4. Денисьевская Н.А., Майко Т.К., Кушнир Г.П. Значение эндогенных факторов при микроразмножении антуриума Андре // Интродукция и акклиматизация растений. - Киев: Наук. Думка. - 1988. - Вып. 9. - С. 66-69.
5. Капранова Н.Н. Комнатные растения в интерьере. - М.: изд. МГУ. - 1989. - 190 с.
6. Митрофанова О.В., Мустафин А.М. Технология выращивания безвирусного антуриума Андре // Интродукционное изучение цветочных растений. Сборник научных трудов. - Ялта. - 1985. Т. 97, - С. 1-11.

ИЗУЧЕНИЕ ХРОМОСОМНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МЕЖМИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК И TУ-1-CОPIА РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ У ЛУКА БАТУНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ FISH

Будылин М.В., Хрусталёва Л.И.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязев, Центр молекулярной биотехнологии, Москва, 127550
E-mail: VomBovoZ@mail.ru

Лук батун (*Allium fistulosum* L. $2n=2x=16$) содержит в себе полезные гены устойчивости для селекции лука репчатого. В диплоидном наборе лука репчатого содержится 32830 Mbp (Kuhl et al. 2004), что превышает, например, размер генома риса в 34 раза. 92- 95% генома луковых представлена некодирующей ДНК (Stack & Comings 1979). Исследования Кумара и соавторов (Kumar et al. 1997) показали, что Tу-1-*сорiа* группа ретротранспозонов составляет 75% всей некодирующей ДНК у *A. сера*. Однако количественное содержание и хромосомная организация Tу-1-*сорiа* у лука батунa, близкородственного вида *A. сера*, не изучены. В последние годы микросателлиты широко используются как генетические маркеры у растений (Lagercrantz et al. 1993), потому что они являются ко-доминантными маркерами (Jones et al. 1997). В 2004 году были впервые выделены микросателлиты у лука-батунa, в которых доминировали GT мотивы (Song et al. 2004). Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) уже на протяжении 40 лет успешно применяется для изучения хромосомной организации различных последовательностей ДНК (John et al. 1969).

Для проведения FISH мы использовали препараты митотических хромосом лука батунa сорта «Параде». Пробы были получены путём ПЦР-мечения Dig-11-dUTP с использованием праймеров: для Tу1-*сорiа* - PR1 и PR2, которые амплифицируют консервативный участок фрагмента обратной транскриптазы, для межмикросателлитных последовательностей был использован праймер K10 - [AC]8YG.

Матрицей служила геномная ДНК лука батуна. Жесткость гибридизации FISH составила 76%.

В результате FISH анализа было установлено, что Tu1- сорія ретротранспозоны были распределены по всем хромосомам за исключением теломерных окончаний, в которых, как было показано ранее, располагается 375 п.н. субтеломерный повтор (Фесенко и др. 2002). ПЦР продукт, полученный с праймерами на межмикросателлитный повтор, локализовался в виде отдельных сайтов гибридизации, что может указывать на кластерную организацию микросателлитов. Кластеры размером более 10 тыс. п.н. всегда детектировались в определенных сайтах хромосом. Кластеры размером ниже или на пороге детекции FISH не всегда выявлялись. Выраженная сайт специфичная гибридизация была выявлена на хромосоме 2, которая может служить хромосом-специфичным маркером. Полученные результаты хромосомной организации Tu1- сорія ретротранспозонов и межмикросателлитных повторов будут использованы при создании молекулярных маркеров, основанных на полиморфизме ретротранспозонов и межмикросателлитных последовательностей. Информация о хромосомной организации некодирующей ДНК расширяет наши знания об эволюции генома луковых.

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO СЛАБОРОСЛЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ

Бьядовский И.А.

Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства Россельхозакадемии, Россия, 115598 г. Москва, vstisp@vstisp.org

По объему мирового промышленного производства плодов семечковых культуры занимают первое место по сравнению с другими культурами. Это обуславливается интерес к закладке садов современными и районированными сортами, с принципиально новыми качественными характеристиками и экологическими возможностями, в связи с чем, растет потребность в таком посадочном материале. Актуальным остается создание и закладка маточников слаборослых подвоев яблони, что может значительно повысить биологический потенциал культивируемых сортов. Данную потребность может решить метод клонального микроразмножения растений. С помощью его можно создавать оздоровленные коллекции плодовых растений и длительно их поддерживать без контакта с внешней средой, а в случае необходимости в достаточно короткие сроки размножать материал до необходимых количеств.

Существует ряд проблематичных моментов на этапе введения в культуру in vitro, эксплантов подвоев яблони, связанных с невысоким процентом приживаемости. А прижившиеся микрорастений часто имеют различные морфозы (хлороз листьев, витрификация и каллусообразование), что создает предпосылки для дальнейшего изучения и оптимизации данного этапа.

Исследования проводились в отделе биотехнологии ГНУ ВСТИСП Россельхозакадемии. В работе были взяты различные формы клоновых подвоев яблони: 54-118, 62-223, 69-6-217, 57-490, Малыш Будаговского, а также ММ106. Исходные материалы и применяемые методы на этапах изучения в культуре in vitro соответствовали общепринятым для данного раздела исследований, с некоторыми изменениями (В.Г. Трушечкин, 1985). При выборе концентраций регуляторов роста основывались на своих ранее проведенных исследованиях. Для введения в культуру in vitro использовали латеральные почки.

Эффективность введения составила от 0 до 100% от начального количества введённых в культуру *in vitro* эксплантов и зависела от формы клонового подвоя яблони и содержания минеральных солей в питательной среде. Введение в культуру *in vitro* форм клоновых подвоев яблони проводили в осенний (2-я декада октября – 2-я декада ноября) и весенний период (3-я декада – 2-я декада мая).

При введении, на среде Мурасиге – Скуга (МС) с полным содержанием минеральной части, приживаемость эксплантов не превышала 50% (за исключением формы ММ 106 (до 75%)), а у части эксплантов наблюдались морфозы (хлороз листьев, витрификация и каллусообразование). В последующем прижившиеся микрорастения не удавалось перенести на среду размножения, особенно быстро они погибали после введения их в культуру *in vitro* на более высоких концентрациях регуляторов роста в среде. Значительно удалось повысить приживаемость вводимых эксплантов, в 1,5-3,4 раза (до 66,7–100%), при разбавлении минеральной части среды МС до 75%, от полной. При разбавлении среды МС в два раза (50% от полной) также наблюдалось повышение приживаемости в 1,5-2,8 раза (до 37-83,3%, кроме формы ММ 106 и 69-6-217) в сравнении с полным содержанием минеральной части. Но процент приживаемости был несколько ниже в сравнении с разбавлением минеральной части до 75% от полной. Кроме того, при разбавлении минеральной части питательной среды МС до 50, 75% от полной не наблюдались морфозы (хлороз листьев, витрификация и каллусообразование).

При проведении исследований по введению в культуру *in vitro* клоновых подвоев яблони в весенний период наблюдались те же тенденции по приживаемости. При разбавлении минеральной части среды МС до 75% от полной приживаемость вводимых эксплантов клоновых подвоев яблони составляла 62,5–100%, а при разбавлении среды МС в два раза (50% от полной) 71,4-100%. При полном содержании минеральной части среды МС приживаемость не превышала 77,8%.

Анализируя выше изложенное, можно отметить, что при введении в культуру *in vitro* для повышения процента приживаемости эксплантов клоновых подвоев яблони на среде Мурасиге – Скуга необходимо разбавлять ее минеральную часть до 50-75% от полной.

ПЕРВЫЕ ШАГИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ МАРКЕР ОПОСРЕДОВАННОГО ОТБОРА В СЕЛЕКЦИИ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ В КРАСНОДАРСКОМ НИИСХ ИМ. П.П.ЛУКЪЯНЕНКО

Васильев А.В., Беспалова Л.А.

*ГНУ Краснодарский НИИСХ им. П.П. Лукьяненко Россельхозакадемии,
Россия, 350012, Краснодар-12, Ц/У КНИИСХ*

Краснодарский НИИСХ им. П.П.Лукьяненко является одним из крупнейших селекционных центров юга России. Сорты пшеницы и тритикале, выведенные в институте, занимают лидирующее положение в структуре посевных площадей Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, а также широко представлены в странах ближнего зарубежья.

Фундамент классической селекции в Краснодарском НИИСХ был заложен академиком П.П.Лукьяненко. Методы и приемы, которые он разработал и использовал, широко опубликованы. В настоящее время технология селекции, методические подходы и приемы модифицированы, значительно расширены и продолжают совершенствоваться. С целью интенсификации и повышения эффективности работ по выведению новых сортов пшеницы и тритикале нами открыто новое направление,

нацеленное на применение новых методов отбора при помощи молекулярных маркеров на основе ПЦР анализа в системе традиционной селекции пшеницы и тритикале.

После изучения мировых и отечественных достижений в этой области и проведения предварительных исследований мы начали нашу работу одновременно по нескольким направлениям:

Скрининг коммерческих сортов на наличие эффективных генов устойчивости к бурой (*Lr*), желтой (*Yr*) и стеблевой (*Sr*) ржавчинам, генов, контролирующих высоту растений (*Rht*), потребность в яровизации (*Vrn*), чувствительность к фотопериоду (*Ppd*), устойчивость к прорастанию на корню (*Vp*);

Использование маркер опосредованного отбора с целью переноса комплекса генов устойчивости к бурой (*Lr*), желтой (*Yr*) и стеблевой (*Sr*) ржавчинам от сортов источников в адаптированный к местным условиям материал и создания устойчивых пирамид этих генов;

Применение молекулярных маркеров для контроля передачи мутантных аллелей по *Waxy* генам с целью создания сортов озимой пшеницы с измененным составом крахмала;

Использование маркер опосредованного отбора в селекции на устойчивость к фузариозу колоса;

Создание картирующих популяций для локализации и маркирования локусов количественных признаков, обуславливающих устойчивость к фузариозу колоса сортов озимой пшеницы селекции КНИИСХ;

Создание картирующей популяции на основе сортов озимой пшеницы селекции КНИИСХ для локализации и маркирования генов и локусов количественных признаков, обуславливающих устойчивость к пиренофорозу;

Локализация и маркирование гена редукции высоты растений *Rht11*, контролирующего высоту растений в некоторых полукарликовых сортах селекции КНИИСХ;

Поиск наиболее эффективных точек приложения молекулярных маркеров в традиционной схеме селекции.

СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ КНИИСХ ИМЕНИ П.П. ЛУКЪЯНЕНКО НА НАЛИЧИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ WAXY-ГЕНОВ

Гладких Н.И.¹, Климушина М. В.¹, Дивашук М.Г.¹, Беспалова Л.А.², Васильев А.В.², Карлов Г.И.¹

¹ *Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А.*

Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Москва 127550

E-mail: mklimushina@gmail.com

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

Крахмал является основным компонентом зерновки пшеницы – его содержание составляет 65-70% в расчете на сухую массу. Он накапливается в виде гранул, которые состоят из полисахаридов двух типов – разветвленного амилопектина и линейной амилозы. Амилоза крахмала синтезируется за счет активности гранул-связанной синтазы крахмала (GBSSI). Так как мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) относится к аллогексаплоидным видам ($2n = 6x = 42$, геномная формула AABBDD), её геном несет три гомеологичных гена, кодирующих три изоформы GBSSI фермента. Данные гены получили название *Waxy* и расположены на 7AS (*Wx-A1*), 4AL (*Wx-B1*) и 7DS (*Wx-D1*) хромосомах. Недавно были идентифицированы мутации (нуль-аллели), приводящие к

потере одного или более изоформ GBSSI. Присутствие нуль-аллелей *Waxy* генов приводит к образованию крахмала с пониженным содержанием амилозы. Пшеницы с тремя нуль-аллелями GBSS генов производят в основном безамилозный или *Waxy* крахмал. Частично *Waxy* пшеницы являются источником муки с оптимальными качественными характеристиками для определенных отраслей пищевой промышленности. Кроме того, частично *Waxy* пшеницы являются важными для выведения пшениц с желаемыми агрономическими характеристиками. Биохимические свойства крахмала из *Waxy* пшеницы схожи со свойствами крахмала *Waxy* кукурузы, поэтому *Waxy* пшеницы могут найти применение в производстве модифицированных пищевых крахмалов. Мука из *Waxy* пшениц также может быть использована для увеличения срока хранения хлебобулочных изделий без сопутствующего ослабления пшеничной клейковины.

В мире на аллельное состояние *Waxy*-генов были охарактеризован ряд коллекций различных видов пшеницы. Для их характеристики использовали молекулярное маркирование, одномерный и двухмерный гель-электрофорез *Waxy* белков. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является наиболее простым и эффективным методом выявления аллельных вариантов *Waxy*-генов. Целью нашей работы был поиск аллельных вариантов *Waxy*-генов в коллекции мягкой пшеницы с помощью молекулярных маркеров. В исследованиях использовали коллекцию из девяноста девяти краснозерных сортов мягкой пшеницы селекции Краснодарского НИИСХ имени П.П. Лукьяненко и одиннадцати образцов белозерной мягкой пшеницы китайской селекции.

К настоящему времени, на каждый из нуль-аллелей *Waxy*-генов разработано несколько молекулярных маркеров. Для анализа локуса *Wx-B1* необходимо использовать сочетание молекулярных маркеров, разработанных Vanzetti с соавторами (2009) и Nakamiga с соавторами (2002) для выявления различных аллельных вариантов. Наиболее надежным маркером для выявления нуль-аллелей по гену *Wx-D1* является маркер, разработанный Shariflou с соавторами (2001). На основании амплификации четырех различных систем молекулярных маркеров нами было установлено, что только два сорта из девяноста девяти сортов КНИИСХА имени П.П. Лукьяненко – Нота и Ласточка – несут в своем геноме аллель *Wx-B1e*. Сорт, несущий нуль-аллели по гену *Wx-B1*, выявлено не было. Среди образцов белозерной мягкой пшеницы три образца из одиннадцати – Yumai 30, Yumai 36, 90-Zhong-657 – несут в своем геноме аллель *Wx-B1e*, а образец Ноккай 252 является носителем нуль-аллеля (*Wx-B1b*). С помощью двух молекулярных маркеров на ген *Wx-A1* было выявлено, что сорта Старшина и Сила несут в своем геноме нуль-аллели по данному гену. По гену *Wx-D1* были выявлены только аллели дикого типа.

Таким образом, среди сортов коллекции мягких пшениц КНИИСХ имени П.П. Лукьяненко, было обнаружено всего два сорта несущих аллели *Wx-B1e* по гену *Wx-B1* и два сорта несущих нуль-аллели *Wx-Alb* по гену *Wx-A1*. В тоже время в коллекциях других стран обнаруживалось до двадцати процентов сортов несущих нуль-аллель по локусу *Wx-B1*. И это, прежде всего, связывалось с тем, что нуль-аллель по гену *Wx-B1* оказывает положительное влияние на качество лапши удон, основного продукта, на который используется мягкая пшеница в азиатских странах. Основное использование мягкой пшеницы у нас это, прежде всего хлебопечение, соответственно давление отбора в данном случае не наблюдалось. Так же следует учитывать, что основные источники нуль-аллелей это белозерные сорта азиатского происхождения, а наша селекция традиционно ориентируется на краснозерные сорта, ввиду их преимущества в нашей климатической зоне. Поэтому и вероятность нейтрального привнесения нуль-аллеля в результате селекционных скрещиваний была крайне мала.

СОХРАНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ДИОСКОРЕИ ЯПОНСКОЙ (*DIOSCOREA JAPONICA*) И ДИОСКОРЕИ КАВКАЗСКОЙ (*DIOSCOREA CAUCASIA*) IN VITRO

Доан Тху Тхуи, Калашникова Е.А.

Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д.49.

Диоскорея (лат. *Dioscorea*) - род растений семейства Диоскорейные, включающий в себя около 600 видов, распространённых в тропических районах мира, среди которых особый интерес представляют диоскорея японская (*Dioscorea japonica*) и диоскорея кавказская (*Dioscorea caucasia*). Они относятся к ценным ресурсным видам, в корневищах которых содержатся сапонины (до 8%), в том числе стероидный диосцин (до 1,2%), расщепляющийся при гидролизе на глюкозу, рамнозу и диосгенин. *D. japonica* и *D. caucasia* в настоящее время являются исчезающими видами, они занимают ограниченные ареалы произрастания и занесены в Красную Книгу России. Поэтому сохранение биоразнообразия данных растений является актуальной проблемой, которая может быть успешно решена с применением современных методов биотехнологии.

В работе использовали стерильные растения *D. japonica* и *D. caucasia*, полученные в лаборатории биотехнологии растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Изучали влияние гормонального состава питательной среды на коэффициент размножения. Для этого использовали различные вещества с цитокининовой активностью: дропп, цитодеф и 2ip. Данные препараты добавляли в питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга, в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л в сочетании с НУК 0,5 мг/л. Растения в течение 5 месяцев выращивали в климакамере, где поддерживался 16-ти часовой фотопериод, температура 22-24⁰С, освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью 3 клк. У растений измеряли длину стебля, корня, количество микроклубней, образовавшихся у основания стебля, и воздушных клубней, образовавшихся на междоузлиях и в пазухе листа.

В результате исследований были установлены некоторые закономерности: 1) из двух изучаемых видов наибольшей морфогенетической активностью обладала Диоскорея японская, для которой было характерно во всех изучаемых вариантах образование от 2 до 4 шт. клубней, от 7 до 9 шт. корней, и высота растений составила в среднем 5,7 см.; 2) формирование клубней происходило в 97,3% случаев в основании побега; 3) коэффициент размножения зависел от исследуемого генотипа и гормонального состава питательной среды.

Эспериментально установлено, что из всех изучаемых цитокининов наибольшей стимулирующей активностью индуцировать образование клубней и побегов обладал препарат дропп. В этих вариантах учитываемый показатель находился в пределах 3-4 шт, в то время как в вариантах с 2ip и цитодефом частота образования клубней составила 1-2 шт. и 1 шт, соответственно. Показано, что с увеличением концентрации цитокинина в питательной среде (с 0,5 до 1,0 мг/л во всех вариантах) коэффициент размножения увеличивался, однако при этом формировались по форме мелкие клубни и по высоте не большие побеги.

Таким образом, для получения стабильного коэффициента размножения и формирования растений с правильной морфологией, целесообразно в питательную среду в качестве цитокинина добавлять препарат дропп в концентрации 0,5 мг/л в сочетании с НУК 0,5 м/л.

ФИЗИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ АЛЛИНАЗЫ И СЛЕЗОТОЧЕНИЯ ФАКТОРА СИНТАЗЫ НА ХРОМОСОМАХ *ALLIUM SERA* L.C ПОМОЩЬЮ TYR-FISH

Киров И.В., Романов Д.В., Фесенко И.А., Хрусталёва Л.И.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.
Тимирязева, Центр Молекулярной Биотехнологии, Москва, 127550
E-mail: kirovez@gmail.com*

Характерной особенностью рода луковых, *Alliaceae*, является специфический аромат и вкусовые качества. *A. sera*, кроме выраженных ароматических и вкусовых свойств, обладает способностью индуцировать слезоточение при разрушении целостности клеток, т.е. когда мы чистим луковицу. Последние исследования показали, что эти специфические особенности *A. sera* – результат одного метаболического пути, который контролируется двумя генами – аллиназой и слезоточения фактор синтазой (lachrymatory factor synthase, LFS).

Используя ДНК сиквенсы генов аллиназы и LFS из базы данных NCBI, были созданы праймеры и получены ПЦР продукты с геномной ДНК *A. sera* как матрицы, а затем клонированы фрагменты генов аллиназы и LFS. С использованием модификации флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) - tyr-FISH, было проведено физическое картирование данных генов на хромосомах лука репчатого *A. sera*.

Показана локализация гена аллиназы в дистальной части хромосомы 4, что совпадает с ранее полученными результатами по генетическому картированию этого гена. Согласно генетической карте два локуса гена аллиназы расположены в группе сцепления 4, соответствующей хромосоме 4, на расстоянии 6 cM [Martin et al. 2005]. Благодаря высокой чувствительности метода tyr-FISH и корректно подобранным условиям, не снижающим разрешающей способности метода, мы смогли визуализировать оба локуса этого гена на плотноупакованной митотической метафазной хромосоме *A. sera*. Было вычислено приблизительное физическое расстояние между tyr-FISH сигналами, исходящими от сайтов гибридизации с генами аллиназ. Интегрирование физической и генетической карт показало, что гены аллиназ локализованы в регионе с повышенной рекомбинационной активностью. LFS ген был локализован в проксимальном регионе длинного плеча хромосомы 5. Интенсивность полученного tyr-FISH сигнала позволяет предположить наличие нескольких копий LFS гена в сайте гибридизации. Дальнейшие наши исследования по изучению физической организации LFS генов с использованием FISH на растянутой ДНК должны подтвердить это предположение.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что tyr-FISH является ценным инструментом для детектирования небольших фрагментов ДНК на растительной хромосоме, что позволяет более эффективно проводить картирование отдельных генов и интегрирование физических и генетических карт.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЯ *Wx-B1E* У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЕГО С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

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

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

Гранул-связанная синтаза крахмала (Granule-Bound Starch Synthase I – GBSSI) является ключевым ферментом, обеспечивающим биосинтез линейного полисахарида – амилозы, которая вместе с амилопектином формирует крахмал эндосперма зерновки пшеницы. Геном мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. несет три гомеологичных гена, кодирующих изоформы GBSSI фермента. Данные гены получили название *Wxу* и расположены на 7AS (*Wx-A1*), 4AL (*Wx-B1*) и 7DS (*Wx-D1*) хромосомах. Мутации *Wxу*-генов влияют на количество амилозы и, соответственно, на физико-химические и функциональные свойства крахмала. У мягкой пшеницы с одним или двумя нефункциональными *Wxу*-генами (нуль-аллелями) синтезируется крахмал с пониженным содержанием амилозы. Было показано, что наибольшее влияние на содержание амилозы и качество конечного продукта оказывают *Wx-B1*-гены, а затем уже *Wx-D1* и *Wx-A1*. Для идентификации аллельного состояния *Wxу*-генов используют как одномерный (или двухмерный) гель-электрофорез GBSSI белков, так и молекулярное маркирование. К настоящему времени, для изучения аллельного состояния локуса *Wx-B1* широко применяют молекулярные маркеры, разработанные McLauchlan с соавторами (2001), Nakamura с соавторами (2002), Vanzetti с соавторами (2009) и Saito с соавторами (2009). Помимо нуль-аллелей у мягкой пшеницы выявлены различные функциональные аллельные варианты *Wxу*-генов. В 2009 году у мягкой пшеницы был обнаружен аллель *Wx-B1e*, отличный от нуль-аллеля и аллеля дикого типа. Влияние функциональных аллелей на содержание амилозы мало изучено из-за сложности их выявления и создания линий пшеницы с различными аллельными вариантами. Изучение различных аллельных вариантов *Wxу*-генов имеет большое значение в связи с их потенциальной ценностью. Целью нашей работы было молекулярно-генетическое изучение аллеля *Wx-B1e* у мягкой пшеницы и возможности идентификации его с помощью различных молекулярных маркеров.

Основываясь на данных молекулярного анализа с помощью четырёх молекулярных маркеров и одномерного электрофореза белков, находящихся в крахмале двадцатидневных зерновок, нами было установлено, что сорт Коротышка является носителем аллеля *Wx-B1e*. При изучении амплификации молекулярных маркеров на аллеле *Wx-B1e*, было выявлено, что с помощью праймеров, предложенных McLauchlanetal с соавторами и Nakamura с соавторами не удается отличить нуль-аллель от аллеля *Wx-B1e*. Молекулярный маркер, разработанный Saito с соавторами, затрудняет идентификацию аллеля *Wx-B1e* и аллеля дикого типа, хотя при этом очень четко позволяет идентифицировать нуль-аллель. Наиболее подходящим маркером, позволяющим отличить все три аллеля (*Wx-B1b*, *Wx-B1e* и *Wx-B1a*), является маркер, разработанный Vanzetti с соавторами. Таким образом, при идентификации аллельного состояния *Wxу* генов следует использовать несколько молекулярных маркеров.

Нами был клонирован и секвенирован фрагмент размером 804 п.о. аллеля *Wx-B1e*, полностью перекрывающий место посадки всех молекулярных маркеров на аллельное состояние гена *Wx-B1*. При сравнении с сиквенсом аллеля мягкой пшеницы дикого типа (*Wx-B1a*) было выявлено, что изучаемый аллель несет инсерцию в 34 п.н., делецию в 8 пар нуклеотидов и 23 нуклеотидные замены. Но при этом различие по

аминокислотной последовательности между аллелем *Wx-B1e* и аллелем дикого типа *Wx-B1a* составляет всего четыре аминокислотные замены. При BLAST анализе, полученный нами сиквенс аллеля *Wx-B1e* дает наибольшую гомологию к сиквенсам *Waxy*-генов: *Triticum spelta*, *Triticum durum* и к сиквенсу *Aegilops speltoides*. При кластерном анализе изучаемый сиквенс попадает в один кластер с сиквенсами *Waxy* генов, относящихся к видам *Triticum spelta* и *Triticum durum*, а сиквенс *Wx-B1a*, принадлежащий *Triticum aestivum*, попадает в другой кластер. При этом следует отметить, что полученный нами сиквенс *Wx-B1e* находится ближе к *Aegilops speltoides*, чем к *Wx-B1a* *Triticum aestivum*.

Основываясь на полном совпадении в зоне перекрытия сиквенса, полученного нами на сорте Коротышка, с сиквенсом *Wx-B1e*, полученного из образца эндемичного сорта аргентинской селекции *Buck Poncho*, а так же данных кластерного и BLAST-анализа, можно предположить, что аллель *Wx-B1e* был привнесен в геном мягкой пшеницы из генома пшеницы спельта или твердой пшеницы в результате спонтанной или искусственной гибридизации данных видов. Альтернативно можно высказать предположение, что аллель *Wx-B1e* является более эволюционно древним, по сравнению с аллелем *Wx-B1a*, о чем может свидетельствовать его относительная близость к *Aegilops speltoides* по сравнению с *Wx-B1a*.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР В «РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ И АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙ ПАРВОВИРУСНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ И РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

Козлова А.Д.¹, Астахова Т.С.², Обухов И.Л.¹

¹ ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Россия, 123002, Москва, Звенигородское шоссе д.5

² ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Россия, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3а

Развитие свиноводства в России привело к широкому распространению заболеваний, ранее не встречавшихся в нашей стране. Одной из значимых проблем в промышленных свинокомплексах стала цирковиральная инфекция свиней (ЦВИС).

Известны два типа цирковирусов свиней. Цирковирал свиней 1-го типа (ЦВС-1) не вызывает заболевания, цирковирал свиней 2-го типа (ЦВС-2) является этиологическим агентом различных заболеваний, клиническое проявление которых в значительной степени зависит от вторичных инфекций вирусной и бактериальной природы. Наиболее часто ЦВИС осложняется парвовирусом, вирусом РРСС и микоплазмами. ЦВИС – факторное заболевание, проявляющееся на фоне неблагоприятного воздействия на животных различных факторов окружающей среды.

ЦВС-2 обладает иммуносупрессорным действием на организм животного, снижая количество лимфоцитов в крови. Поэтому РРСС или парвовирусная инфекция свиней (ПВИС) в стадах, где наблюдается циркуляция цирковируса, протекают значительно тяжелее и хуже поддаются лечению. Так же циркуляция в хозяйстве ЦВС снижает эффективность вакцинации против других патогенов. Иммунитет к РРСС генотипоспецифичен, поэтому большое значение имеет не только выявление вируса РРСС в биологическом материале, но и его генотипирование.

Диагностика данных заболеваний на основании клинической картины часто затруднена из-за развития смешанных инфекций или бессимптомного носительства.

При этом животные-вирусоносители выделяют вирус в окружающую среду и являются источниками заражения здоровых животных. Для эпизоотологического контроля за данными заболеваниями необходима своевременная лабораторная диагностика.

Целью нашей работы была разработка ПЦР-тест-систем с гибридизационно-флуоресценной детекцией результатов амплификации в режиме «реального времени» для выявления цирковирусов свиней 2 типа и ассоциированных с ним парвовируса и возбудителя респираторно-репродуктивного синдрома свиней.

В результате анализа литературных данных, характеризующих структуры геномов ЦВС, ПВС и РРСС, в качестве мишеней для подбора праймеров и зондов выбраны наиболее консервативные гены. Для ЦВС – ген ORF1, для ПВС – ген NS1, для дифференцирования европейского и американского генотипа вируса РРСС – ген ORF7.

Специфичность всех пар праймеров проверялась на штаммах ЦВС (НПО Нарвак), ПВС (шт. ВЛ-94), РРСС (шт. БД – американский генотип, шт. VP046 – европейский генотип), вируса болезни Ауески (шт. ГНКИ, Арский, МБА, из вакцины Аускипра), классической чумы свиней (шт. Синлак, ГМ-94), трансмиссивного гастроэнтерита (НПО Нарвак); кДНК из положительных образцов содержащих вирус эпидемической диареи свиней и ДНК генома свиньи. В результате экспериментов доказано отсутствие неспецифической амплификации гетерологичных штаммов и геномной ДНК свиньи.

Выделение тотальной РНК/ДНК из материала проводили набором «Рибо-преп» (Amplisens, ФГУН «ЦНИИЭ») согласно инструкции. Амплификацию проводили на приборах RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия) и iQCyler (BioRad, США) с использованием реактивов Amplisens (ФГУН «ЦНИИЭ»).

Для определения аналитической чувствительности тест-системы выявляющей РНК вируса РРСС получены рекомбинантные контроли для каждого генотипа путем клонирования участка гена-мишени в ms2 фаг, а для тест-систем обнаруживающих ДНК цирковируса и парвовируса – в фаг λ . Эксперимент проведен на панелях образцов сыворотки крови (только для РРСС), суспензий фекалий, патматериала (смесь разных внутренних органов) и спермы, содержащих 5×10^4 , 5×10^3 , 10^3 и 5×10^2 коп/мл рекомбинантного контроля.

Чувствительность тест-системы для выявления вируса РРСС составила при исследовании сыворотки крови – 10^3 коп/мл, суспензий фекалий и патматериала – 5×10^3 коп/мл, спермы – 5×10^4 коп/мл для каждого генотипа. Чувствительность тест-систем, выявляющих ДНК ЦВС и ПВС, при тестировании суспензии фекалий и патматериала составила 5×10^2 коп/мл, а при исследовании спермы – 5×10^3 коп/мл.

Для контроля качества экстракции нуклеиновых кислот (НК) из биологического материала и предотвращения получения ложноотрицательных результатов в каждую пробу на этапе экстракции НК вносится экзогенный неконкурентный внутренний контрольный образец (ВКО), что позволяет контролировать качество выполнения всех этапов ПЦР-исследования. Амплификация и детекция ВКО происходит с помощью отдельной пары праймеров и зонда одновременно со специфической мишенью.

Проверка работы тест-систем проводилась на клиническом (фекалии, сыворотка крови, сперма) и патологическом (селезенка, лимфатические узлы, легкие, печень, сердце, кишечник, абортплоды) материале от свиней. Биоматериал получен из нескольких хозяйств Белгородской и Ростовской областей в период с октября 2008 по ноябрь 2010. Весь полученный биоматериал тестировался на ЦВС и ПВС. Всего было исследовано 420 образцов. Результаты тестирования приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты исследований методом ПЦР в «реальном времени»

Название биоматериала	Общее количество исследованных образцов	Количество образцов, содержащее ДНК ПВС	Количество образцов, содержащее ДНК ЦВС	Количество образцов, содержащее ДНК ЦВС и ДНК ПВС
фекалии	146	16 (11,0%)	58 (37,9%)	10 (6,8%)
сыворотка	18	0	2 (11,1%)	0
сперма	21	0	3 (14,3%)	0
патматериал	135	29 (21,5%)	90 (66,7)	23 (17%)
аборт. плод	62	3 (4,8%)	5 (8,1%)	3 (4,8%)
легкое	26	6 (23,1%)	13 (50%)	5 (19,2%)
кишечник	8	2 (25%)	2 (25%)	1 (12,5%)
Итого	416	56 (13,5%)	173 (41,6%)	42 (10,1%)

Во время вспышки РРСС в Белгородской области в июле 2010 года нами исследовано 25 образцов: 3 пробы абортплодов, 1 плаценты, 4 патматериала и 1 легкого от павших животных и 16 сывороток крови от поросят подозрительных на РРСС по клинической картине. В 21 пробе, что составляет 84% исследованных образцов, обнаружен вирус РРСС европейского генотипа. Результаты ПЦР-исследования подтверждены секвенированием. ДНК ЦВС-2 и ПВС в этих образцах не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны тест-системы для выявления ДНК возбудителей ЦВС-2 и ПВС и генотипирования вируса РРСС методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме «реальном времени». Данный метод позволяет использовать для исследования разные виды биологического материала. Тестирование образцов от животных показало наличие ЦВИС во всех исследованных хозяйствах. В 10% случаях наблюдалось коинфицирование ПВС.

ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА СТЕВИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОЛХИЦИНИРОВАНИЯ IN VITRO

Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы имени А.Л. Мазлумова, Россия, 396030, Рамонь, Воронежская область

Стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni) – субтропическое растение семейства *Asteraceae*, эндемик плоскогорий Северо-восточного Парагвая у границы с Бразилией. Эта культура является альтернативой искусственным заменителям сахара благодаря наличию во всех надземных органах комплекса дитерпеновых гликозидов (стевиозид, ребаудиозиды А, В, С, Д, Е и др.). Данные соединения проходят через пищеварительный тракт, не расщепляясь, что делает стевию безопасной для тех, кому необходимо контролировать уровень сахара в крови. Кроме дитерпеновых гликозидов в стевии содержатся эфирные масла, а также флавоноиды, обладающие широким спектром лечебных свойств.

Успех интродукции в ЦЧР *Stevia rebaudiana* определяется способностью данной сахароносной культуры адаптироваться к новым почвенным и климатическим условиям умеренной зоны. Неприспособленность растения к новым условиям существования обуславливает необходимость селекционной работы по созданию высокопродуктивных сортов стевии с адаптивными свойствами для возделывания в

ЦЧР. Цветение стевии в умеренных широтах наступает поздно, вследствие чего она обладает ограниченной семенной продуктивностью. Это ставит определённые трудности при создании новых форм данного растения. Вместе с тем, стевия отзывчива к культивированию в условиях *in vitro*, благодаря чему возможно использование биотехнологических методов для получения нового исходного материала этого растения с улучшенными признаками.

Полиплоидия является одним из перспективных методов, который можно применить в селекции стевии. Этот приём способствует улучшению существующих и созданию новых, более совершенных форм у растений. Для полиплоидизации стевии был использован раствор колхицина в 4-х различных концентрациях при разном времени воздействия. В процессе исследований были установлены основные параметры, способствующие возникновению генетических изменений стевии. Наибольшее количество полиплоидов образовалось при воздействии 0,005 % концентрации колхицина в течение 48 часов, остальные концентрации оказались менее эффективными.

Определение количественного содержания ядерной ДНК в листьях методом проточной цитофотометрии и цитологический анализ позволили выявить микроклоны с диплоидным, триплоидным и тетраплоидным набором хромосом, которые различались по форме листовой пластинки и габитусу растений. Полученные формы были размножены в культуре *in vitro* и переведены в закрытый грунт. Впоследствии из них были сформированы диплоидные, триплоидные и тетраплоидные линии, включённые в базовую коллекцию стевии.

Изучение созданных линий было продолжено в полевых условиях. Это позволило с использованием индивидуального и повторно-индивидуального отборов выделить наиболее ценный исходный материал с повышенной урожайностью и адаптивностью к условиям умеренного климата. Данный селекционный материал послужил основой для создания тетраплоидных сортов стевии «Улада» и «София», на которые получены авторские свидетельства.

Проведение дальнейших полевых испытаний коллекционных сортообразцов позволило также выделить триплоидный сортообразец №37. Растения данного номера показали высокую урожайность зелёной массы и сухого листа. Показателями сорта, позволяющими отличить его от стандарта, явились триплоидный набор хромосом, содержание суммы сладких веществ, достигающее 15,8%.

Таким образом, полиплоидизация стевии в условиях *in vitro* позволила получить линии с различной плоидностью, из которых в последние годы был выделен коллекционный сортообразец №37, имеющий триплоидный набор хромосом. В 2010 г. он представлен в Госкомиссию по сортоиспытанию в качестве нового сорта «Мечта».

Новые сорта стевии будут способствовать успешной интродукции этого ценного растения в Российской Федерации.

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ ПШЕНИЦЫ

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

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

Бурая листовая ржавчина, вызываемая возбудителем *Puccinia triticina*, является заболеванием пшеницы, причиняющее серьёзный ущерб сельскому хозяйству. В годы

эпифитотий потеря урожая от этого заболевания достигают 50%. На данный момент в мире найдено более 50 генов устойчивости к листовой ржавчине. Многие из них интрогрессированы в пшеницу из дикорастущих сородичей. Однако со временем в результате половой гибридизации у патогена появляются вирулентные биотипы и расы, и устойчивость преодолевается. Поэтому важен постоянный поиск новых генов устойчивости. Потенциалом в качестве источника *Lr*-генов обладает коллекция октоплоидных пшенично-пырейных гибридов (ППГ, $2n=56$) созданных в отделе отдалённой гибридизации ГЭС им. Н.В. Цицина РАН. Целью нашей работы было выявление нуклеотидных последовательностей, которые могут являться новыми генами-кандидатами устойчивости к листовой ржавчине у пшеницы. Данная коллекция была охарактеризована по устойчивости к листовой ржавчине. Было проведено постулирование ювенильных генов устойчивости к листовой ржавчине ППГ методом тест культуры патогена. 29 образцов изучены на устойчивость к 10 тест-изолятам бурой листовой ржавчины: 16 образцов были устойчивы ко всем изолятам, 9 образцов показали восприимчивость к 1-5 изолятам и 4 образца были восприимчивы к более чем 5 изолятам. В ходе работы нами были использованы ряд праймеров на гены устойчивости привнесённые в пшеницу из дикорастущих сородичей. Полиморфизм между устойчивыми и неустойчивыми образцами был выявлен с помощью комбинации праймеров Ag15F4 Ag15R1, Ag15R5. С помощью данных праймеров были выявлены амплифицируемые участки характерные только для устойчивых линий. В дальнейшем данные последовательности были просеквенированы. BLAST анализ не показала полной гомологии ни к одной из известных последовательностей. Однако показал относительно высокую гомологию к последовательности гена-кандидата *Lr19*, который был привнесён в мягкую пшеницу из пырея понтийского. Таким образом, выявленную нами последовательность можно отнести к гену-кандидату, полученному из пырея среднего, обеспечивающему устойчивость к бурой ржавчине.

УСТАНОВЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ АКТИВНО ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ

Кунда М.С., Воронина О.Л.

***ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Россия, 127550, Москва,
ул. Тимирязевская, д. 42, e-mail: markunda@rambler.ru***

Лактобациллы – основные микроорганизмы заквасок, кисломолочных продуктов, неизменно используются в современном пищевом производстве, при изготовлении про- и синбиотических БАД, в фармацевтике.

Для грамотного применения штаммов лактобацилл, корректного описания состава продуктов и препаратов медицинского назначения, а также для контроля состояния микроорганизмов в готовой продукции и в организме человека и животных чрезвычайно важно, как отмечают ведущие специалисты в области пробиотических микроорганизмов Felis G.E. и Dellaglio F., верно идентифицировать видовую принадлежность штаммов бактерий.

Особую настороженность вызывает состояние видовой идентификации в группе активно используемых штаммов с названием *Lactobacillus acidophilus*. Tannock G. W. и Reuter G. неоднократно отмечали, что штаммы этой группы требуют реклассификации, поскольку названы «*acidophilus*» для узнаваемости и роста продаж продукции с их использованием.

В задачу нашего исследования входила проверка идентификации штаммов *Lactobacillus acidophilus* из коллекций ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

Минздравсоцразвития России и ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Для выделения и анализа ДНК микроорганизмов использовали разработанные в лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных конструкций подходы, наборы и ферменты. Секвенирование фрагментов последовательностей генов *16S rDNA* и *groA* выполняли на оборудовании фирмы Applied Biosystems. Анализ последовательностей и выравнивание - с помощью программы CLUSTAL W (1.83). Видовую идентификацию микроорганизмов на основе последовательностей генов *16S rDNA* и *groA* осуществляли с применением программного средства BLAST. Полученные последовательности зарегистрировали в GenBank под номерами HQ379170, HQ379173, HQ379176-HQ379179, HQ379184-HQ379186, HQ379188.

Анализ видовой идентификации штаммов выбранных микроорганизмов показал, что ни один штамм, заявленный как *Lactobacillus acidophilus*, не соответствует этому видовому названию. Большинство штаммов принадлежало виду *L. helveticus*: INMIA-Er317-402, FHHMB118:100ASH, FHHMB111:NK-1, FHHMB74:K3SH24, GIMC21:LB52-ISO, GIMC22:NRF, GIMC23:KSN. По одному штамму было отнесено к видам лактобацилл *L. fermentum* FHHMB126 и *L. casei* GIMC10:76SPb. Один штамм, используемый в комплексных пробиотических препаратах, GIMC501:BS-75, был идентифицирован, как *Enterococcus fecium*.

Таким образом, разработанный нами метод идентификации лактобацилл показал свою эффективность в анализе предоставленной выборки. На основании проведенного исследования мы можем подтвердить, что *Lactobacillus acidophilus* – скорее, коммерческий бренд, чем видовое название. Следует отметить, что и широко известный в настоящее время штамм лактобацилл LGG был первоначально депонирован в ATCC под названием *Lactobacillus acidophilus*. В настоящее время его видовая идентификация исправлена - *L. ramosus*.

Проявляемое в последние годы в нашей стране внимание к состоянию отечественных коллекций пробиотических микроорганизмов и заквасок вселяет надежду в коррекцию маркировки штаммов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ НА РАННИХ ЭТАПАХ СЕЛЕКЦИИ НА КАЧЕСТВО

Мельникова Е.Е., Зима В.Г., Букреева Г.И.

ГНУ Краснодарский НИИСХ им. П.П. Лукьяненко Россельхозакадемии, Россия, 350012, Краснодар-12, Ц/У КНИИСХ, e-mail: vkpbio@mail.ru

Глиадинкодирующие локусы как генетические маркеры, отражающие специфические особенности генетической системы пшеницы, эффективно используются в селекционной программе на качество в Краснодарском НИИСХ им. П.П.Лукьяненко уже 30 лет. Наиболее широко (более 35 тысяч анализов сортообразцов в год) используется методика электрофореза глиадинов в крахмальном геле (КГ). Именно для аллелей, выявляемых в КГ, более полно исследована связь с проявлением хозяйственно значимых признаков пшеницы (Копусь М.М. и др., 1992). Поэтому на ранних этапах селекции (уже в контрольном питомнике) этим методом изучается и отслеживается внутрисортовой полиморфизм компонентов глиадина перспективных линий пшеницы с выявлением среди них линий с такими аллелями и их сочетаниями, которые связаны с высоким качеством. Одновременно используется методика электрофореза глиадина в полиакриламидном геле (ПААГ). Это необходимо для получения дополнительной электрофоретической характеристики перспективных

линий и районированных сортов, тем более, что для определения сортовой чистоты семян стандартизирована именно эта методика. Нами изучена связь между некоторыми аллелями, выявленными в ПААГ и показателями качества зерна.

Несмотря на то, что ежегодно в первичную гибридизацию вовлекается большое количество генотипов, имеющих разные аллели, сорта, созданные в одном селекционном центре, как правило, имеют определённый комплект аллелей глиадинкодирующих локусов. Это объясняется тем, что селекционеры отбирают аллели локусов, ассоциированные с хозяйственно ценными признаками. Одновременно естественный отбор обуславливает преобладание в сортах аллелей генотипов, наиболее приспособленных к местным условиям выращивания.

В сортах озимой пшеницы селекции КНИИСХ, районированных и переданных в ГСИ за период 2006-2010г, преобладают аллели Gld 1B1 (*Gli B1b*) с частотой встречаемости 63%, и аллель Gld 1B3 (*Gli B1l*)- 26%. По хромосоме 1A наиболее часто в сортах селекции КНИИСХ присутствует аллель Gld 1A4 (*Gli A1b*) -37%, также достаточно высокая частота встречаемости аллелей Gld 1A10(*Gli A1g*), Gld 1A5(*Gli A1a*), Gld 1A12 (*Gli A1b'*) и т.д. По хромосоме 1D - Gld 1D1(*Gli D1b*) -35%, реже Gld 1D7 и Gld 1D5 (*Gli D1g*), Gld 1D4(*Gli D1j*).

Большое внимание уделяется изучению исходного материала с целью подбора пар для гибридизации. Изучение генотипических формул глиадин сортов из коллекции имеет большое значение, так как позволяет обнаружить новые аллели и их сочетания. Если эти аллели обнаружены в сортах с хорошими хозяйственно- ценными признаками, то вероятнее всего они будут вовлечены в гибридизацию. В сортах коллекционного материала, также наиболее часто встречаются аллели Gld 1A4 (*Gli A1b*) -33%, Gld 1B1 (*Gli B1b*)-57%, Gld 1D1(*Gli D1b*)-50%. Надо отметить, что эти аллели характерны для сорта Безостая 1(формула глиадин 4.1.1.1.1.1. или *b.b.b.b.b.b*), что ещё раз подтверждает широкое использование генотипа сорта Безостая 1 в качестве исходного материала с 60-х годов прошлого века не только у нас в стране, но и за рубежом. В коллекционных образцах отмечена низкая встречаемость аллелей Gld 1B3 (*Gli B1l*)- 13%, Gld 1A12 (*Gli A1b'*)-2,5%, и Gld 1D5(*Gli D1g*) -2%.

По нашим данным аллели Gld 1A12 (*Gli A1b'*), Gld 1A5(*Gli A1a*), Gld 1A4 (*Gli A1b*), Gld 1B1 (*Gli B1b*), Gld 1D7 (*Gli D1g*), Gld 1D4(*Gli D1 j*), имеющие высокую частоту встречаемости в сортах селекции КНИИСХ, связаны с высоким качеством зерна. Выявление этих аллелей у генотипов на ранних этапах селекции, даёт возможность ожидать высокий потенциал качества у таких генотипов.

Большое значение для формирования оптимального генотипа пшеницы имеет сочетание аллелей, то есть взаимодействие генов, расположенных на разных хромосомах. Так, нами выявлены сочетания аллелей глиадинкодирующих локусов, где «отрицательный» эффект аллеля Gld 1B3 (*Gli B1l*) компенсируется за счёт других аллелей. Такими сочетаниями по первым трём хромосомам являются 5.3.7. и 4.3.4. выявленные при электрофорезе в КГ (или a.l.g. и b.l.j. идентифицированные с помощью ПААГ). Сорта Иришка и Афина с формулами глиадин 4.3.4.3.1.3. и 4.3.4.3.1.2. согласно каталогу для КГ и формулами b.l.j.f.b.j. и b.l.j.f.b.p. по ПААГ-каталогу, способны формировать качество зерна на уровне «сильных» и «ценных» пшениц.

СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЗРЕЛОМ ЗЕРНЕ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ЗИМУЮЩЕГО ГОРОХА КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЁР МОРОЗОСТОЙКОСТИ СОРТОВ

Мельникова Е.Е., Евтушенко Я.Ю., Букреева Г.И., Насонов А.И., Плотников В.К.

*ГНУ Краснодарский НИИСХ им. П.П. Лукьяненко Россельхозакадемии,
Россия, 350012, Краснодар-12, Ц/У КНИИСХ, e-mail: vkpbio@mail.ru*

Развитие маркёр-зависимой селекции предполагает наличие простых молекулярных методов анализа селекционного материала в селекционно-значимых масштабах. Результаты многолетних исследований лаборатории молекулярной биологии КНИИСХ свидетельствуют в пользу того, что важнейшее проявление жизнедеятельности – синтез белка и его регуляция, а, следовательно – регуляция экспрессии генов, может воспроизводиться и изучаться в простейших условиях на объектах и системах всё более примитивного уровня, вплоть до молекул: от активности *in vitro* полисом, выделенных методом дифференциального ультрацентрифугирования из проростков и созревающего зерна злаков, до качественных характеристик рРНК зрелого зерна. Это открывает перспективы развития простых молекулярно-кинетических маркёров, необходимых для проведения селекции сельскохозяйственных растений по одному из центральных признаков – взаимодействие «генотип-среда», определяющего норму (амплитуду) реакции растений на изменение условий внешней среды. Развитие исследований в этом направлении привело нас к выводу о целесообразности изучения долгоживущей РНК зрелых семян зерновых и зернобобовых культур. Оценка количества долгоживущей РНК в шроте зрелых семян нескольких десятков сортов озимой мягкой пшеницы модифицированным методом Шмидта и Тангаузера показала, что повышение морозостойкости сопряжено с увеличением количества РНК в зрелом зерне и снижения количества катионов магния в золе шрота. При этом была обнаружена сортоспецифическая вариабельность в содержании РНК, ДНК и катионов магния, (коэффициенты корреляции для содержания РНК - +0,88, для ДНК - +0,80, для магния - -0,51) (Плотников В.К. «Биология РНК зерновых культур»).

Таким образом, морозостойкость сортов озимой мягкой пшеницы прямо пропорциональна содержанию РНК и ДНК в зрелом зерне и обратно пропорциональна содержанию катионов магния. Слабо морозостойкие сорта также могут иметь высокое содержание РНК в зрелом зерне, но это наблюдается на фоне высокого содержания катионов магния, что определяет иные качественные характеристики РНК.

Принципиально важным представлялось исследовать содержание нуклеиновых кислот в зрелом зерне ржи, отличающейся наиболее высокой среди зерновых морозостойкостью, и ряда переходных к пшенице форм тритикале. Данные, представленные в таблице 1, подтверждают прямо пропорциональную связь между количеством долгоживущей РНК в зрелом зерне и морозостойкостью культуры и сорта. Особенностью ржи является пониженное содержание ДНК в зерне.

Вместе с тем, литературные данные о содержании катионов магния в зерне свидетельствуют в пользу нашего вывода о том, что морозостойкость обратно пропорциональна содержанию катионов магния в зерне. Слабо морозостойкий ячмень содержит 180, более морозостойкая пшеница – 157, в высоко морозостойкая рожь – 92 мг магния на 100 г сухого вещества (Кретович В.Л. «Биохимия зерна», 1981).

Выведенные в КНИИСХ сорта зимующего гороха, как и высоко морозостойкие сорта озимой пшеницы имеют повышенное содержание РНК в зрелом зерне. Однако содержание ДНК одинаково, как в зерне зимующих, так и у яровых сортов гороха (таблица 2). Вероятно, морозоустойчивость гороха сопряжена с увеличением

транскрипции, а у озимой пшеницы относительно высокое содержание РНК определяется, по-видимому, увеличением ploидности клеток.

Таблица 1. Содержание долгоживущих нуклеиновых кислот в шроте зрелого зерна ржи, тритикале и пшеницы (среднее из четырёх измерений) (мкг/мг)

Культура (сорт)	Происхождение	РНК	ДНК	РНК/ ДНК
Рожь (Саратовская 7)		5,40	1,02	5,30
Тритикале (Валентин)	озимое тритикале X яровое тритикале	4,16	1,53	2,71
Тритикале (Хонгор)	тритикале X озимая мягкая пшеница	4,03	1,21	3,33
Тритикале (АД зелёный)	твёрдая пшеница X рожь	3,55	1,02	3,48
Озимая мягкая пшеница (Половчанка)	с блоком 1В3, ответственным за адаптацию к стрессам	3,09	0,88	3,50

Таблица 2. Содержание нуклеиновых кислот в зрелых семенах яровых и зимующих сортов гороха (мкг/мг шрота)

Сорта	РНК	ДНК	РНК/ДНК
Яровые			
Ареал	4,81±0,17	2,40±0,02	2,00
Статус	4,78±0,10	2,44±0,09	1,96
Зимующие			
Агрый	5,72±0,45	2,25±0,03	2,54
Фазтон	6,04±0,36	2,36±0,11	2,76

МЕТОД КУЛЬТУРЫ МИКРОСПОР В ПРОИЗВОДСТВЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ОВОЩНЫХ И МАСЛИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДА *BRASSICA RAPA*

Монахос С.Г.¹, Увирагвайе А.², Зао Дж.², Занг Н.², Боннема Х.²

¹ *Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Селекционная станция им. Н.Н.Тимофеева, Россия, Москва*
sokrat@hotmail.ru

² *Университет Вагенингена, Вагенинген, Нидерланды*

Технология культуры микроспор разрабатываемая в течение многих лет в настоящее время является очень важным и полезным инструментом в производстве удвоенных гаплоидов для генетических исследований и селекции растений. Вид *Brassica rapa* L. включающий ряд важнейших овощных и масличных культур по-прежнему остается относительно малоизученным в области культуры ткани и культуры микроспор в частности. Использованная в данном исследовании методика производства удвоенных гаплоидов основана на руководстве по культуре микроспор для *B. napus* Custers (2003) и Coventry et al. (1988).

Исследовано девятнадцать генотипов *B. rapa*, для одиннадцати из них успешно получены эмбриониды. Наибольший выход эмбрионидов около 12000 на 100 бутонов был получен на образце капусты пекинской F₁ Нежность селекции Селекционной станции им. Н.Н.Тимофеева (Москва); данный показатель является одним из наиболее высоких

среди опубликованных выходов эмбриоидов в культуре микроспор *B. rapa*. Установлен оптимальный размер бутонов для изолирования микроспор - 2,5-2,8 мм, соответствующий среднепоздней и поздней одноядерной стадии развития пыльцы. Отмечена существенная стимуляция эмбриогенеза при добавлении в питательную среду активированного угля, при этом показано, что увеличенный выход эмбриоидов сопряжен с более быстрым их развитием. Отмечено значительное влияние состояния растения-донора на эмбриогенез: более отзывчивыми являются взрослые растения (старше 5 недель), рекомендовано содержание цветущих растений при пониженной положительной температуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coventry J., Kott L. and Beversdorf W.D. (1988) Manual for microspore culture technique for *Brassica napus*, Dept. of Crop Science, University of Guelph, 35 pp.
2. Custers J.B.M. (2003) Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In doubled haploid production in crop plants. Eds.: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P. and Szarejko I. Kluwer Academic Publisher, 185-194

НИТРАТНЫЙ СИГНАЛИНГ САХАРОЗОСИНТАЗЫ КАК МАРКЕР ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ СОРТОВ С АЛЬТЕРНАТИВНЫМ ВЫБОРОМ НАКОПЛЕНИЯ БЕЛКА ИЛИ УГЛЕВОДОВ

Никитин А.В., Брускова Р.К., Измайлов С.Ф.

Учреждение Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия, Москва, E-mail: nitrogenexchange@mail.ru

Важным научным достижением последнего времени явилось открытие факта, что наиболее усвояемые источники азота для растений — нитрат и аммоний помимо выполнения роли индукторов экспрессии генов, участвующих в ассимиляции азота, являются сигнальными агентами в регуляции ферментов углеродного обмена. Авторами в последние годы показано, что нитрат и аммоний способны вовлекать в сферу позитивной регуляции стартовую реакцию углеродного обмена, контролируруемую сахарозосинтазой (СС). Физиологическая целесообразность данного феномена состоит в том, что действие нитрата и аммония на СС интенсифицирует поток углерода на последующий синтез азотсодержащих веществ уже на начальном уровне метаболизма универсальной транспортной формы углерода — сахарозы. Благодаря этому создаются условия для активации на субстратном уровне последующих ферментов углеродного обмена, прямо или анаплеротически связанных с азотным обменом в С-акцепторных органах растений. На основе выявленного факта открывается перспектива для дальнейших исследований, значимых не только в фундаментальном, но и в прикладном отношении. В частности, возможна разработка новых методических подходов к созданию технологий, связанных с альтернативой выбора различных стратегий продукционного процесса — накопления белка или углеводов в сельскохозяйственных растениях. Активируя или ингибируя указанный фермент метаболизма сахарозы, источники азота могут влиять на выбор потока углерода преимущественно в направлении азотного или углеродного обмена и, тем самым, способствовать избирательному накоплению в растении N- или С-метаболитов. Конкретным выражением такого подхода может быть использование нитратного (аммонийного) сигналинга СС как реперного и индикационного показателя при создании новых технологий рационального азотного питания в онтогенезе культур, различающихся типом обмена веществ: белокнакопителей, например, бобовых, и сахаронакопителей — сахарной свеклы и других культур. В первом случае конечной целью оптимизации

азотного питания является интенсификация потока углерода сахарозы в направлении биосинтеза аминокислот, амидов и далее – белка, во втором, напротив, минимизация включения углерода сахарозы в азотный обмен и, соответственно, предотвращение накопления «вредного азота» с целью увеличения сахаристости корнеплодов и качества получаемого продукта. Нитратзависимая активность СС может быть также предложена и в качестве маркера для скрининга исходных форм сельскохозяйственных растений с целью получения новых белок- или углеводнакапливающих сортов.

РАЗРАБОТКА SCAR МАРКЕРА ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К КИЛЕ У КАПУСТЫ ПЕКИНСКОЙ (*BRASSICA RAPA* SSP. *PEKINENSIS* (LOUR.) HANELT.)

Нгуен Минь Ли, Монахос С.Г.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени
К.А.Тимирязева, Селекционная станция им. Н.Н.Тимофеева, Россия, г. Москва,
cokrat@hotmail.ru*

В пределах вида *B.rapa* выявлено, маркировано и локализовано на генетических картах генома АА по меньшей мере восемь главных расоспецифичных генов устойчивости к киле и локусов количественных признаков (QTL). Однако, как отмечают сами авторы, использование предлагаемых молекулярных маркеров на популяциях отличных от использованных для картирования даже таксономически близкородственных часто не позволяет дифференцировать устойчивые и восприимчивые генотипы, т.е. данные маркеры могут быть неэффективными.

В данной работе представлены результаты генетического анализа устойчивости к киле инбредной линии капусты пекинской, проведена оценка эффективности опубликованных маркеров, а так же приведены результаты создания SCAR-маркера гена устойчивости.

Для генетического анализа в условиях весенней пленочной теплицы проведено скрещивание самонесовместимых инбредных линий капусты пекинской устойчивой 20-2сс1 и восприимчивой ЕС-1 к киле, получены потомства BC1 и F2. Оценка и дифференциация растений по устойчивости/восприимчивости к киле выполнены на искусственном инфекционном фоне модифицированным пипеточным методом. Результаты анализа показали, что устойчивость линии 20-2сс1 определяется одним доминантным геном.

Оценка эффективности молекулярных маркеров RA12-75 (Y.Kuginuki et al. 1997); CRS-5 (M.Kikuchi et al. 1999); TCR05, TCR10 (Z.Piao et al. 2004); BRMS-100, BRMS-297, BRMS- 088, BRMS- 096 (K.Suwabe et al. 2003, 2006); OPC11-1S, OPC11-2S (M.Hirai et al. 2004); rapdE49380 (E.Matsumoto et al. 2005); HC352b-SCAR (N.Hayashida et al. 2008); BrSTS-78 (M.Saito et al. 2006); SCARp91F-SCARp636R (С.Монахос, 2007); m6R (Sakamoto et al. 2008), сцепленных с восемью локусами устойчивости (Crr1, Crr2, Crr3, Crr4, CRa, CRb, CRk, CRc), выявила, что ни один из предлагаемых маркеров не различает устойчивые и восприимчивые генотипы в расщепляющихся популяциях данного донора.

С целью создания молекулярного маркера доминантного гена устойчивости к киле линии 20-2сс1 проведен BSA-анализ (bulked segregant analysis) с использованием 287 RAPD-маркеров. В результате анализа был выявлен один маркер - 394RAPD, тесно сцепленный с геном устойчивости и локализованный на расстоянии 2,9 сМ. Для конвертирования 394RAPD маркера в SCAR маркерный фрагмент был выделен из агарозного геля, клонирован и секвенирован. На основе известной последовательности фрагмента разработаны 4 праймер - комбинации, одна из которых после оптимизации

условий амплификации была выделена в качестве SCAR маркера, обозначенного tau_cBrCR400. При амплификации с маркером tau_cBrCR400 были амплифицированы два фрагмента, и по одному фрагменту длиной 400 п.н. дифференцировались устойчивые и восприимчивые растения. Также было установлено, что расщепление растений популяции BC1 по маркеру полностью соответствуют первоначальному 394RAPD маркеру, исходя из этого была подтверждена эффективность данного маркера. Следует обратить внимание, что маркер tau_cBrCR400 имеет доминантный характер в комбинации 20-2сс1 x ES-1, однако, в комбинации ECD04 (турнепс) x Кит1-3с15 (капуста пекинская) маркер проявляет кодоминантный характер.

Оценка эффективности разработанного маркера на различных устойчивых к киле линиях капусты пекинской коллекции Селекционной станции им. Н.Н.Тимофеева, показала, что из двадцати двух устойчивых к киле линий фрагмент, сцепленный с геном устойчивости, амплифицирован только у семи. Такой результат можно объяснить тем, что в коллекции линий устойчивость к киле определяются несколькими генами устойчивости к киле, а разработанный маркер сцеплен только с одним из них. Таким образом, разработанный маркер имеет потенциал для применения в процессе селекции капусты пекинской на устойчивость к киле с использованием данного гена устойчивости, а также поиска маркеров других генов устойчивости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hayashida N., Takabatake Y., Nakazawa N., Aruga D., Nakanishi H., Taguchi G., Sakamoto K., Matsumoto E. Construction of a practical SCAR marker linked to clubroot resistance in Chinese cabbage, with intensive analysis of HC352b genes / J. Jpn. Soc. Hortic. Sci., 77, 2008. P. 150-154.
2. Hirai M., Harada T., Kubo N., Tsukada M., Suwabe K., Matsumoto S. A novel locus for clubroot resistance in Brassica rapa and its linkage markers / Theor. Appl. Genet., 108, 2004. P. 639-643.
3. Kikuchi M., Ajisaka H., Kuginuki Y., Hirai M. Conversion of RAPD markers for a clubroot resistance gene of Brassica rapa into sequence-tagged Sites (STSs) / Breed. Sci., 49, 1999. P. 83-88.
4. Kuginuki Y., Ajisaka H., Yui M., Yoshikawa H., Hida K., Hirai M. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in Brassica rapa L. / Euphytica, 98, 1997. P. 149-154.
5. Matsumoto E., Hayashida N., Sakamoto K., Ohi M. Behavior of DNA markers linked to a clubroot resistance gene in segregating populations of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) / J. Jpn. Soc. Hortic. Sci., 74, 2005. P. 367-373.
6. Piao Z.Y., Deng Y.Q., Choi S.R., Park Y.J., Lim Y.P. SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) / Theor. Appl. Genet., 108, 2004. P. 1458-1465.
7. Saito M., Kubo N., Matsumoto S., Suwabe K., Tsukada M., Hirai M. Fine mapping of the clubroot resistance gene Crr3 in Brassica rapa / Theor. Appl. Genet., 114, 2006. P. 81-91.
8. Sakamoto K., Saito A., Hayashida N., Taguchi G., Matsumoto E. Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) / Theor. Appl. Genet., 117, 2008. P. 759-767.
9. Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Matsumoto S., Hirai M. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in Brassica rapa L. / Theor. Appl. Genet., 107, 2003. P. 997-1002.
10. Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Kondo M., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Hirai M., Matsumoto S. Simple sequence repeat-based comparative genomics between Brassica rapa and Arabidopsis thaliana: the genetic origin of clubroot resistance / Genetics, 173, 2006. P. 309-319.

Монахос С.Г. Игнатов А.Н. Создание молекулярного маркера гена устойчивости к киле (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) для селекции родительских линий капусты пекинской (*Brassica rapa* L.)// Изв. ТСХА. Вып. 1. М., 2007.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В ИСПЫТАТЕЛЬНОМ МОДУЛЕ, ИМИТИРУЮЩЕМ СОЛЕВОЙ СТРЕСС

Полякова М.Н., Серенко Е.К.,

***ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН
Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42***

В естественных условиях произрастания растения часто подвергаются действию различных стрессовых факторов. Одним из наиболее часто встречаемых стрессоров, ограничивающих рост растений и их продуктивность, является повышенное содержание солей в почве. Засоление вызывает у растений увеличение содержания ионов в клетках, гиперосмотические эффекты, дезорганизацию мембран, а также повышение уровня активных форм кислорода (АФК) и нарушение метаболических процессов. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что суперэкспрессия генов, кодирующих синтез ферментов защиты от окислительной деструкции в трансформированных растениях, оказывает существенный эффект на происходящие метаболические процессы, приводит к повышению устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям.

В процессе эволюции растения выработали различные стратегии снижения отрицательного воздействия засоления, среди которых важное место принадлежит антиоксидантным защитным системам, они включают как низкомолекулярные соединения, так и ферменты: супероксиддисмутаза (СОД) каталаза (КАТ), пероксидаза и др. СОД катализирует преобразование супероксидрадикала в H_2O_2 . Последующее превращение перекиси осуществляется каталазой. В повышении устойчивости растений участвуют и другие ферменты. Так, например, экспрессия генов аскорбатпероксидазы у растений арабидопсиса повышала их устойчивость к солевому стрессу.

В рамках данного исследования был проведен анализ физиологических показателей растений, направленно подвергшихся искусственно созданному солевому стрессу, в созданном испытательном модуле и в почвенной культуре.

Растения выращивали в почвенной культуре в климатической камере с 12 часовым фотопериодом при освещении $120 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$, температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ }^\circ\text{C}$ (день/ночь) и относительной влажности 65/80 % (день/ночь). Исследования проводили в утренние часы на листьях верхнего яруса. Растения томата сорта Белый налив – контрольные и растения с введенным геном СОД (трансгенная линия № 8) –подвергали солевому стрессу в течение 3 дней, используя в качестве поливной воды 190 мМ раствор хлористого натрия.

В испытательном модуле (универсальная аэропонная установка) растения выращивались при следующих условиях: 12 часовой фотопериод, температура $20 \text{ }^\circ\text{C}/18 \text{ }^\circ\text{C}$, освещение $140 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$, относительная влажность 60 %. Питание растений осуществляли путем периодического впрыскивания питательного раствора в корневую зону выращиваемых растений. В паузах между подачей раствора происходила аэрация корней. Основные компоненты питательного раствора: 1 г/л Кемира Гидро, 0,5 г/л $MgSO_4$ и 0,5 г/л $Ca(NO_3)_2$. Солевой стресс создавали путем добавления в питательный раствор 11,2 г/л и 5,6 г/л хлорида натрия (190 мМ и 95 мМ).

Для измерения скорости фотосинтеза образцы освещали лампой диапроектора. Интенсивность освещения на уровне растений была насыщающей и составляла 200 Вт/м², температура – 25 °С. Скорость фотосинтеза рассчитывали на 1 грамм сырой биомассы листьев в секунду.

При действии солевого стресса наблюдалось снижение скорости фотосинтеза в контроле до 22,6 % от начальных значений. У растений, трансформированных СОД, - до 31 %. Скорость транспирации снижалась, соответственно до 10,8 и 36,5 % от начальных значений.

Снижение скорости транспирации могло быть связано с уменьшением проводимости устьиц (Gs). Действительно, в контроле проводимость устьиц снижалась до 11,1 %, а у опытных растений до 20 % от начальных значений.

Наблюдаемое уменьшение ассимиляции углекислоты растениями было связано как с изменением апертуры устьиц и уменьшения концентрации углекислоты на поверхности мезофильных клеток (Ci) в контроле, так и изменением активности самого фотосинтетического аппарата.

Аппроксимация углекислотных кривых фотосинтеза с использованием модели Фаркьюхара показала, что значительные изменения происходили на уровне темновых реакций фотосинтеза. Так, после трехдневного действия солевого стресса, в контроле происходило уменьшение активности карбоксилирующего фермента на 13,1 %, скорости регенерации триозофосфатов - на 15,7 %. Напротив, у трансформированных растений, с введенным геном СОД, имело место повышение потенциальной активности РБФК/О на 32,8 %, увеличивалась скорость использования триозофосфатов в цикле Бенсона- Кальвина на 21,7 %.

Наблюдаемое повышение устойчивости трансформированных растений может быть связано с увеличением содержания перекиси водорода, изменением соотношения про/антиоксиданты и запуском реакций приспособления растений к неблагоприятным условиям, о чем косвенно говорят данные о большей стимуляции активности СОД. Действительно, исследование активности фермента-нейтрализатора активных форм кислорода - супероксиддисмутазы (СОД) показало, что в условиях развивающегося солевого стресса происходит повышение активности фермента, более значительное у трансформированных растений.

Отмеченные изменения активности фотосинтетического аппарата, а также активности СОД в листьях трансгенных растений томата, имели место при относительно длительном действии стрессового фактора (солевой стресс) на растения.

Также нами были проведены цитологические исследования меристематической ткани корней опытных и контрольных растений после действия низких и высоких концентраций хлорида натрия.

Итак, генетически модифицированный томат (линия №8 сорт «Белый налив») избирательно реагировал на высокие и низкие концентрации хлорида натрия по сравнению с контрольными нетрансформированными растениями томата сорта «Белый налив».

Представленные результаты, а также полученные ранее экспериментальные данные по кратковременному воздействию ультрафиолетового облучения на растения томата свидетельствуют о том, что введение гена СОД приводит к повышению устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды. Вместе с тем, необходима оценка реакции растений в более широком диапазоне изменения факторов среды, оценка продукционных характеристик растений, выращиваемых в оптимальных и неблагоприятных условиях.

Проведенные, с использованием аэропонной установки, исследования на томатах, с введенным геном, кодирующим синтез супероксиддисмутазы, позволили продемонстрировать более эффективную работу фотосинтетического аппарата

растений в условиях окислительного стресса, вызванного повышенным содержанием соли в питательном растворе.

БИОБЕЗОПАСНЫЕ БЕЗМАРКЕРНЫЕ ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ, СИНТЕЗИРУЮЩИЕ HBs-АНТИГЕН

Пучко Е.Н., Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И.

Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Россия, Пущино
Электронный адрес: Elena.Puchko@gmail.com

Традиционно для отбора трансформантов растений используются селективные маркеры, которые переносятся в геном вместе с целевым геном. Дальнейшее присутствие маркерных генов в растениях бесполезно, и в некоторой степени даже опасно ввиду возможного неконтролируемого переноса в близкородственные растения и микроорганизмы. Наличие маркерных белков ухудшает пролиферацию и дифференциацию растительных клеток, во многом остается не ясным их влияние на окружающую среду и человека, можно отметить невозможность создания пирамид целевых генов при использовании одного и того же маркера. Таким образом, создание безмаркерных растений является важной задачей для биотехнологов.

С целью повышения биобезопасности генетически модифицированных растений нами разработан способ получения безмаркерных трансгенных растений, содержащих ген поверхностного антигена вируса гепатита В (*HBsAg*), без селективных генов устойчивости к антибиотикам, гербицидам и генов-репортеров. Преимущество разработанного метода заключается в том, что обеспечивается экологическая и биологическая безопасность трансгенных растений, экспрессирующих гены целевых белков без дополнительных селективных маркеров. Сокращается время отбора трансгенных растений и одновременно появляется возможность прямой детекции синтеза продукта целевого гена с помощью иммуноферментного анализа. Этот анализ, основанный на высокой избирательности и специфичности реакций “антиген-антитело”, обладает рядом преимуществ: использование минимальных количеств образцов, высокая чувствительность (0,1-0,5 нг/мл), возможность как качественной, так и количественной оценки результатов экспрессии целевого гена.

На основе вектора pVIN19 нами сконструирована плаزمиды pVM, не содержащая селективных маркеров устойчивости к антибиотику канамицину. Вектор для трансформации растений pVM содержит область Т-ДНК агробактерий для интеграции в растительный геном, а также полилинкер исходного вектора с удобными сайтами для клонирования.

В эту плазмиду клонирован ген *HBsAg* под контролем двойного промотора РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S). Полученную конструкцию pVM-Ag перенесли в штамм агробактерий *A. tumefaciens* LBA4404 (pAL4404), который использовали для заражения листовых эксплантов табака и гипокотилей томата с помощью обычной агробактериальной трансформации, а также семян табака и томата посредством инфильтрации. Применение такого метода позволило повысить трансформацию на 15-20%, по сравнению с обычной трансформацией. В результате получено несколько линий растений табака и томата, синтезирующих HBs-антиген на уровне до 0,05% от общего растворимого белка. Анализ с помощью ПЦР показал наличие гена *HBsAg* в трансгенных растениях поколений F0 и F1. Расщепление признака в потомстве растений было 3:1, что соответствует менделеевскому

расщеплению и может косвенно свидетельствовать о встраивании в геном растений одной копии гена *HBsAg*.

Таким образом, получены безмаркерные трансгенные растения, не содержащие селективного маркера устойчивости к канамицину. Такие растения удовлетворяют требованиям повышенной безопасности при применении их в качестве продуцентов белков терапевтического назначения. Достигнутый уровень экспрессии достаточен для проведения исследований иммуногенности полученных растений в качестве пероральной вакцины.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 11-08-00413) и Программы Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере "Участник молодежного научно-инновационного конкурса (У.М.Н.И.К)"-2009.

КЛОНИРОВАНИЕ И СИКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ АЛЛИНАЗУ И СЛЕЗОТОЧЕНИЯ ФАКТОР СИНТАЗУ

Романов Д.В., Киров И.В., Фесенко И.А., Хрусталёва Л.И.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.
Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Москва, 127550
E-mail: akabos1987@gmail.com*

Полученные на сегодня данные о важной роли аллииназы и слезоточения фактор синтазы (LFS) в формировании специфических вторичных метаболитов у луковых и широкое использование видов этого рода не только в пищу, но и в медицинских целях, обуславливают необходимость разносторонних исследований этих ферментов и генов их кодирующих. Гены, кодирующие аллииназу, клонированы и сиквенированы у *Allium cepa*, *A. tuberosum*, *A. ascalonicum* и *A. sativum*. Однако практически нет информации о структуре гена аллииназы у *A. fistulosum* – вида, представляющего практический интерес для селекции лука репчатого. Гены, кодирующие LFS, были выделены у *A. ascalonicum*, *A. fistulosum*, *A. chinense*, *A. porrum* и *A. ampeloprasum*. Недавно проведенные исследования ученых из Новой Зеландии показали, что при «выключении» LFS гена происходит качественное и количественное изменение серосодержащих вторичных метаболитов (Eady et al. 2008), обладающих выраженным противораковым эффектом.

В задачу наших исследований входило клонирование и сиквенирование генов аллииназы и LFS двух близкородственных видов *A. cepa* и *A. fistulosum* для дальнейшего использования полученных клонов в исследованиях по физической организации этих генов в геноме луковых.

Для клонирования гена аллииназы был использован ПЦР продукт, полученный с праймерами Allbe1. Дизайн праймеров был выполнен на L48614.1 (номера в GenBank). Были получен ПЦР продукт размером 1100 п.н. Сиквенирование полученного клона и последующий BLASTN анализ выявили высокую гомологию к генам аллииназы *A. cepa* и *A. wakegi*, природного гибрида между *A. cepa* и *A. fistulosum*. Нами впервые был клонирован и сиквенирован фрагмент гена аллииназы *A. fistulosum*.

Аmplификацию LFS гена проводили с праймерами на нуклеотидную последовательность AB089203 (номера в GenBank). Был получен ПЦР продукт размером 550 п.н., что соответствовало ожидаемому размеру, а с геномной ДНК *A. fistulosum* ПЦР продукт не был получен. Подобренные нами праймеры на сиквенс AB089203 гена *A. cepa* оказались видоспецифичными. Сиквенирование клонов LFS и их анализ показали 100% уровень гомологии к имеющимся в GenBank

последовательностям *A. sera* и 96% гомологии к LFS гену *A. fistulosum*. В работе обсуждаются особенности организации генов аллиназы и LFS.

ВЛИЯНИЕ СОРБИТА КАК ОСМОТИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

Сашенко М.Н.

***ГНУ Всероссийский НИИ сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова
Россельхозакадемии, 396030 Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС,
vniss@mail.ru, samani84@mail.ru***

Интенсификация сельскохозяйственного производства ставит перед селекционерами сложные задачи по созданию новых сортов, отличающихся высокой урожайностью, устойчивостью к болезням и вредителям, стрессовым факторам внешней среды, высокой пластичностью. Для создания таких сортов необходим поиск и привлечение современных достижений науки, ускоряющих и повышающих результативность селекционного процесса. Одним из наиболее динамично развивающихся направлений, ориентированных на создание нового исходного материала для селекции, является использование биотехнологических методов.

Культура клеток и тканей *in vitro* в настоящее время находит применение в широком диапазоне биологических исследований. Это стало возможным в результате разработки технологий культивирования тканей и клеток с последующей регенерацией из них растений. Подобные технологии отстают в своем развитии применительно к такой экономически важной зернобобовой культуре как горох.

При культивировании клеток и тканей гороха на искусственных средах имеются многочисленные доказательства появления генетической изменчивости, как на клеточном уровне, так и у растений-регенерантов (Гостимский С.А., 1987).

Изучение вопросов микроразмножения гороха во многом определяет дальнейшее использование культуры клеток и тканей *in vitro* для целей селекции. В методическом аспекте изучение данных вопросов предполагает создание растений-регенерантов, сохраняющих высокий морфогенетический потенциал в течение длительного времени и их всестороннее изучение.

Актуальной задачей селекции гороха является создание новых генотипов, устойчивых к воздействию атмосферной и почвенной засухи. Засухоустойчивость может быть обусловлена приспособительными реакциями, как на клеточном, так и на уровне целого организма. Успех селекционной работы во многом определяется качеством исходного материала.

Перспективным источником расширения спектра исходного материала по признаку засухоустойчивости является отбор генотипов в культуре тканей на питательной среде с повышенным содержанием осмотиков. В качестве осмотических компонентов питательной среды возможно применение ПЭГ, агара, сахарозы, маннита, сорбита и др. В наших исследованиях роль осмотика играл сорбит.

Наши исследования были направлены на поиск оптимальных условий культивирования регенерантов гороха при проведении селективных отборов на засухоустойчивость.

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

В качестве эксплантов для введения в культуру тканей использовались зрелые семена. Культивирование эксплантов проводилось в условиях ($t = +23-25^{\circ}\text{C}$, 16-ти

часовой фотопериод), оптимальных для большинства растений. Стерилизацию семян гороха при введении в культуру *in vitro* проводили лемаксхлор в концентрации 0,05 %. Время экспозиции – 60 минут. После обработки стерилизующим агентом экспланты промывали трехкратно автоклавированной дистиллированной водой и вводились в культуру. После прорастания семян гороха в асептических условиях, их пересаживали на питательную среду с сорбитом (рис.1). Концентрация осмотического компонента колебалась в пределах 1 – 8 г/л.

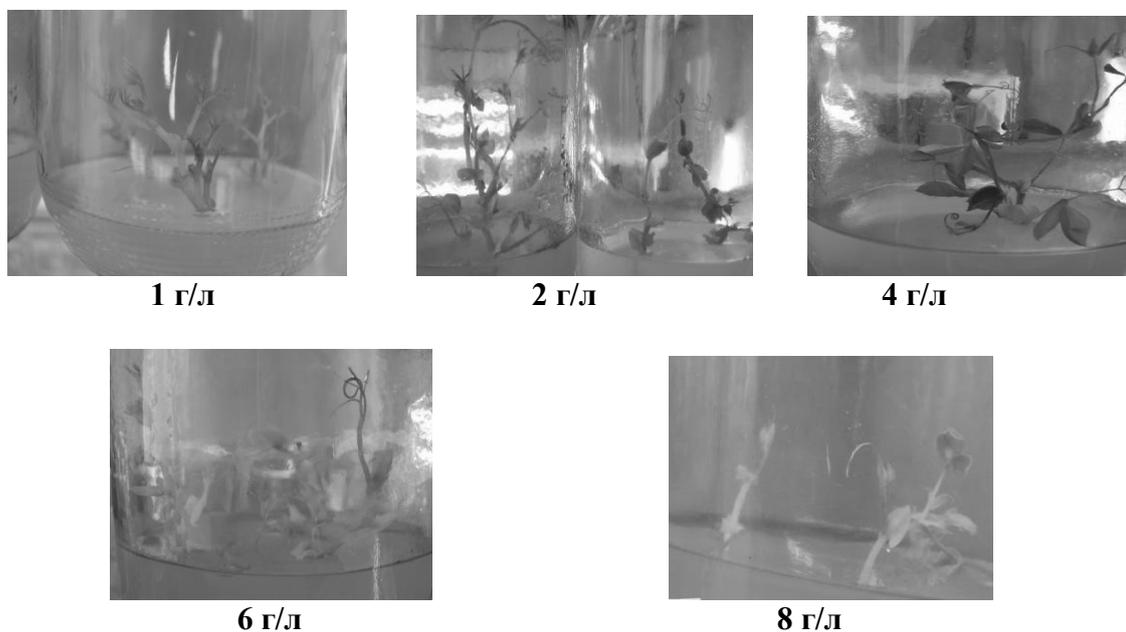


Рис.1. Внешний вид растений при культивировании на среде с сорбитом.

Установлено, что оптимальной для роста и развития регенерантов гороха в культуре тканей в наших опытах является концентрация осмотика 1-2 г/л. На данных вариантах сред микроклоны имели интенсивную зеленую окраску листьев и стеблей, продолжали нормально расти и развиваться. Наблюдался активный рост боковых побегов из пазушных почек. После 8-14 дней культивирования их высота достигла 2 - 4 см.

При увеличении содержания сорбита в питательной до 6 г/л наблюдался ингибирующий эффект. Растения резко теряли способность к росту. Высота эксплантов находилась на уровне посаженных. Через 7-10 дней нижние листья растений высыхали, а затем все растение погибало.

На высоких концентрациях осмотика (8 г/л и выше) регенеранты полностью погибали на 5 день после посадки, не приступая к росту.

Таким образом, оптимальной концентрацией сорбита как осмотического компонента питательной среды при проведении селективных отборов на засухоустойчивость регенерантов гороха является 1 – 2 г/л.

В результате проведенных исследований установлено, что оптимальной для роста и развития регенерантов гороха в культуре *in vitro* является концентрация сорбита 1 -2 г/л. На данных вариантах сред микроклоны имели интенсивную зеленую окраску листьев и стеблей, продолжали нормально расти и развиваться. У большинства регенерантов формировались боковые побеги. После 8-14 дней культивирования их высота достигла 2 - 4 см. Период культивирования на средах с сорбитом составил 20 – 40 дней. Затем растения были пересажены на питательную среду для микроразмножения.

Данные опыты в настоящее время продолжаются.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ (SSR)МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОРТОВОЙ ЧИСТОТЫ ГИБРИДНЫХ СЕМЯН ПАРТЕНОКАРПИЧЕСКОГО ОГУРЦА

Ушанов А.А., Смирнова Д.С.

*Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А.
Тимирязева, Селекционная станция им. Н.Н.Тимофеева, Россия, Москва
breedst@mail.ru*

Огурец (*Cucumis sativus* L.) является одной из самых важных овощных культур во всём мире. Селекционно-семеноводческим компаниям, производящим семена F1 гибридов, необходимо проверять генетическую чистоту перед экспортом и реализацией семян. Для определения уровня гибридности семян у огурца в России обычно проводится грунт контроль. Этот метод основан на оценке морфологических признаков, которые находятся под влиянием условий окружающей среды. Это достаточно длительная (не менее двух месяцев) и затратная процедура. Грунт контроль требует высокой степени компетентности специалистов для проведения фенотипической идентификации сортовых признаков. Метод генетического маркирования с использованием микросателлитов позволяет значительно сократить время (до одной недели) и затраты по определению уровня гибридности семян. В данной работе использованы десять SSR пар праймеров для поиска маркеров для идентификации сортовой чистоты четырех гибридов партенокарпического огурца F1 Задор; F1 Кассандра; (Мш1хВвс2-48); F1 (Sa2хPc3-1) и их родительских линий селекции Селекционной станции им. Н.Н.Тимофеева. Пары праймеров для маркирования были выбраны из 110 SSR маркеров (Fazio et al., 2002), опираясь на данные Байназаровой А.Н. (2009) о кодоминантном характере наследования некоторых из них. В результате исследования для гибрида Кассандра создана эффективная система оценки уровня гибридности семян, включающая в себя оптимизированные методы экспресс-выделения ДНК и SSR-ПЦР с выявлением результатов в 1,5% агарозном геле. Данный маркер обладает кодоминантным типом наследования и способен надёжно определять гибридную природу F1 Кассандра.

1. Fazio et al. Development and Characterization of PCR Markers in Cucumber. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127(4): 545-577, 2002.
2. Байназаровой А.Н. Молекулярно-генетическое изучение полиморфизма генома огурца посевного (*Cucumis sativus* L.) и его применение для оценки гибридности семян и маркирования устойчивости к мучнистой росе. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук (2009).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ГОМОЛОГОВ ГЕНА *FRIGIDA* В ГЕНОМАХ А И С КУЛЬТУРНЫХ ВИДОВ *BRASSICA*

Фадина О.А., Панкин А.А.

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

Переход от вегетативной к репродуктивной фазе развития является важнейшим этапом жизненного цикла растений. Одним из факторов внешней среды, запускающих процессы формирования меристемы соцветия у растений умеренных широт, является

продолжительное холодное воздействие, или вернализации. Изучение генетических механизмов вернализации у культурных растений позволяет регулировать такой важный признак, как время зацветания, что позволяет выращивать экономически важные культуры в регионах с разнообразным климатом. К настоящему времени наиболее подробно исследованы две альтернативные модели генетической регуляции процесса вернализации, представленные пшеницей и арабидопсисом (Greenup et al., 2009. Ann. Bot., 103, 1165-1172).

На примере видов *Arabidopsis* (семейство Brassicaceae) установлено, что время зацветания ранне- и позднецветущих экотипов связано с аллельным полиморфизмом генов *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, репрессирующего зацветание, и его позитивного регулятора *FRIGIDA (FRI)*. Опыты по сверхэкспрессии аллелей *FRI* и *FLC* у растений *A. thaliana* подтвердили прямое участие этих генов в процессах вернализации (Shindo et al., 2005. Plant Physiol., 38, 1163-1173).

Однако у культурных видов *Brassica*, несмотря на их огромное экономическое значение, строение и функции гомологов гена *FRI* практически не исследованы. Эти виды представлены тремя диплоидами: *B. rapa* (геном AA), *B. nigra* (геном BB) и *B. oleracea* (геном CC) - и тремя аллотетраплоидами: *B. juncea* (геном AABB), *B. napus* (геном AACC) и *B. carinata* (геном BBCC). Масличные формы *B. rapa* (сурепица) и *B. napus* (рапс) представлены озимыми и яровыми формами, и ортолог *FRI* арабидопсиса, может принимать участие в регуляции перехода этих растений к цветению.

Для выделения и структурного анализа полноразмерных последовательностей гомологов *FRI* в геномах *Brassica* мы использовали метод генов-кандидатов, начальным этапом которого стал поиск гомологов *FRI* в доступных базах данных. Геном пекинской капусты Chifu (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) наиболее полно представлен в базах данных, и BLAST поиск с использованием *FRI* из *A. thaliana* обнаружил контиги и фосмидный клон *B. rapa*, содержащие полноразмерные гомологи *FRI*. Примечательно, что, по сравнению с геномом *Arabidopsis*, в котором ген *FRI* представлен единственной копией, в геноме А дигаметоидной формы *B. rapa* мы обнаружили два гомолога *FRI*, сходные только на 81%, которые мы обозначили как *FRIa* и *FRIb*. Геномные контиги, содержащие гомологи *FRIa* и *FRIb*, картированы на разных группах сцепления генома А - соответственно, А3 и А4, что позволило определить *FRIa* и *FRIb* как два генетических локуса.

Ген *FRI* в *A. thaliana* состоит из трех экзонов и двух интронов. Для предсказания экзон-интронной структуры локусов гомологов *FRI* у *B. rapa* мы применили алгоритм FGENSH, основанный на скрытой марковской модели (hidden Markov model), а также сравнили геномные последовательности локусов *FRI* с гомологичными EST последовательностями (мПНК) *Brassica* и *Arabidopsis*, извлеченными из баз данных. Мы установили, что по экзон-интронной структуре *FRIa* *B. rapa* сходен с *FRI* из *A. thaliana* и кодирует белок длиной 576 а.о. Однако с помощью этих методов нам не удалось однозначно установить экзон-интронную структуру *FRIb*.

На основании множественного выравнивания гомологов *FRI* из *B. rapa* и гомологичных последовательностей из *B. oleracea* и *B. napus* мы сконструировали и оптимизировали систему локус-специфичных праймеров, специфичных для геномов А и С и фланкирующих полноразмерную последовательность *FRI*. Скрининг 15 образцов *B. rapa* и трех образцов *B. oleracea* с помощью этих праймеров показал, что оба локуса *FRI* присутствуют одновременно во всех обследованных образцах. По-видимому, паралоги *FRI* образовались еще до разделения видов *B. rapa* и *B. oleracea*, которое произошло приблизительно 3.7 млн. лет назад. Для изучения аллельного разнообразия мы клонировали локусы *FRIa* и *FRIb* из образцов *B. rapa* Chifu (ssp. *pekinensis*) и PakChoi (ssp. *chinensis*) и *B. oleracea* A12DH (var. *alboglabra*). Нуклеотидные последовательности клонов *FRIa* и *FRIb* из *B. rapa* Chifu совпадали с извлеченными из базы данных последовательностями *FRI* из той же разновидности *B. rapa*, тогда как

последовательности из других форм *Brassica* отличались множественными мононуклеотидными заменами и инделами.

Дальнейшие эксперименты покажут, участвуют ли гомологи *FRI* у растений *Brassica*, подобно гену-прототипу *A. thaliana*, в регуляции процесса вернализации, связан ли аллельный полиморфизм гомологов *FRI* с разнообразием жизненных форм *Brassica*, в чем эволюционный смысл сохранения двух паралогов *FRI* и какой тип отбора действовал на эти локусы.

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) К ВОЗБУДИТЕЛЮ ФИТОФТОРОЗА ЗА СЧЕТ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ХИТИНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ГЕВЕИН-ПОДОБНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ

Халилуев М.Р.

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Россия, 127550, Москва, Тимирязевская ул., 42

Фитофтороз, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, является одним из наиболее опасных заболеваний томата. По данным ФАО в 2009 г. томат в России промышленно выращивался на площади 117 тыс. га, а валовой сбор товарной продукции составил около 2,2 млн т. Прямые потери урожая томата от фитофтороза в годы эпифитотии составляют больше, чем от всех других болезней вместе взятых и в полевых условиях достигают 100%. Фитофтороз приносит значительные экономические убытки в России, особенно в ее Средней полосе, где потери достигают критических величин, а также во многих странах Европы и США.

Одной из приоритетных возможностей противостояния фитофторозу томата является получение и последующее промышленное выращивание устойчивых сортов. К настоящему времени охарактеризованы гены томата (*Ph-1 – Ph-3*), обеспечивающие вертикальную устойчивость. Однако существенным недостатком их использования является исключительная расовая специфичность полученной резистентности. Кроме того, существуют также сорта с повышенным уровнем горизонтальной устойчивости, но они не представляют практического значения или не способны вызревать в климатических условиях России. Создание районированных фитофтороустойчивых сортов томата возможно при введении в селекционный процесс диких доноров устойчивости. Несмотря на возможность скрещивания культурного томата с его дикими видами, применение отдаленной гибридизации является достаточно длительным и трудоемким процессом.

Частичное установление молекулярной природы защитных механизмов у растений дало возможность разработать принципиально новые стратегии борьбы с заболеваниями в дополнение к существующим традиционным подходам. Одной из них является привнесение в геном растений, и в частности, томатов чужеродных генов, кодирующих защитные PR-белки и антимикробные пептиды.

В рамках исследования была проведена агробактериальная трансформация селекционной линии томата ЯЛФ (любезно предоставлена Монахосом Г.Ф.). Для генетической трансформации были использованы векторные конструкции, содержащие гены хитинсвязывающих белков и гевеин-подобных антимикробных пептидов, полученные во ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии и любезно предоставленные Бабаковым А.В., Луниным В.Г. и Гулевичем А.А. Бинарные векторы pBI121ac и pR830 содержат, соответственно, хитинсвязывающий ген *ac* из *Amaranthus caudatus* и гибридный ген *RS-intron-Shir*, кодирующий сигнальную

последовательность и первые шесть аминокислот дефензина редьки (*Rs*) с интроном, и хитинсвязывающий белок из *Amaranthus retroflexus* (*Shir*). Бинарный вектор pB-AMP2 содержит ген *amp2*, кодирующий лидерный пептид, два антимикробных пептида (SmAMP1 и SmAMP2), разделённых спейсером, и С-концевую часть из звездчатки (*Stellaria media*). В отличие от pB-AMP2, несущего полную копию кДНК гена звездчатки, pB-AMP1 имеет только лидерную последовательность и один из антимикробных пептидов (SmAMP1) (*amp1*).

В результате серии экспериментов было получено 6, 10, 11 и 13 трансгенных растений, содержащих, соответственно, ген *ac*, *Rs-intron-Shir*, *amp2* и *amp1*. Трансгенная природа трансформантов подтверждена методом ПЦР-анализа. Эффективность трансформации при использовании эксплантов семядолей и векторных конструкций pBI121ac, pR830, pB-AMP2 и pB-AMP1 составила соответственно 6,7, 8,4, 8,8 и 11,3%. Растения были адаптированы к условиям *in vivo* и выращены в условиях защищенного грунта.

Анализ экспрессии целевых генов у трансгенных растений проводили с помощью метода ОТ-ПЦР. Установлено, что экспрессия целевого гена на транскрипционном уровне отмечена у всех 6 регенерантов, содержащих в геноме хитинсвязывающий ген *ac*, а также у 7 из 8 проанализированных растений, содержащих гибридный ген *Rs-intron-Shir*. Использование специфичных праймеров на нуклеотидную последовательность генов, кодирующих гевеин-подобные пептиды, позволило установить образование мРНК у 6 из 10 трансгенных растений с геном *amp2* и у 8 из 10 трансгенных растений с геном *amp1*.

Лабораторную оценку на устойчивость к фитофторозу проводили методом искусственного заражения отделенных листьев, полученных от взрослых вегетирующих растений. Для инокуляции использовали зооспорангии 10-ти суточной культуры трех изолятов *P. infestans*, два из которых были выделены из плодов и листьев томата (ТПМ и ТЛЗ), а третий – из листьев картофеля сорта Ильинский (ИКЗ). В исследовании было использовано по пять линий Т0 с каждым гетерологичным геном. Проанализированы растения, экспрессирующие гены хитинсвязывающих белков и гевеин-подобных антимикробных пептидов, а также исходная линия ЯЛФ и трансгенные линии, у которых не происходило образование мРНК целевых генов. В результате заражения сегментов листа зооспорангиями *P. infestans* установлено, что изоляты, выделенные из томата, обладают значительно большей агрессивностью, чем изолят, выделенный из картофеля. Так, при инокуляции изолятами, выделенными из плодов томата, на 5 сутки отмечено активное проявление болезни (интенсивное спороношение на уровне 3-4 баллов) у всех трансгенных линий, экспрессирующих гены хитинсвязывающих белков и антимикробных пептидов, а также контрольных образцов. Это способствовало тому, что к завершению эксперимента их листовая ткань полностью некротизировалась. Таким образом, все изученные растения были достаточно восприимчивы к изолятам ТПМ и ТЛЗ *P. infestans*. Существенных различий по устойчивости между вариантами установлено не было. Статистически значимые различия по степени устойчивости были обнаружены при инокуляции тестируемых линий изолятом ИКЗ, выделенным из картофеля. Установлено, что у двух линий, экспрессирующих соответственно ген *amp1* и *amp2*, на 7 сутки эксперимента не наблюдалось никаких признаков проявления болезни. Кроме того, у 3 линий, содержащих ген *ac*, и у 2 линий, содержащих ген *amp2*, площадь инфекционного пятна в месте нанесения инокулята была минимальной и существенно отличалась от соответствующего значения контрольного нетрансгенного образца.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА И ОЦЕНКА ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОЛИСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ *WOLFFIA ARRHIZA*

Хватков П.А., Кочелабов Р.А., Чернобровкина М.А.

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

Одним из приоритетных направлений развития биотехнологии является создание трансгенных растений, экспрессирующих различные целевые гены, и использование их в качестве биофабрик по производству белков. Преимуществом использования растительных систем являются отсутствие общих с человеком и животными патогенов, культивирование на достаточно простых искусственных средах, высокий уровень экспрессии гетерологичных белков. Однако, «биофарминг» предполагает использование растений, обладающих определенными качествами – высокой скоростью роста, высоким содержанием белка в тканях, наличием эффективной системы регенерации и генетической трансформации. Растения семейства *Lemnaceae* соответствует перечисленным критериям. В настоящее время отдельные представители семейства (*Lemna minor* и *Spirodela oligorhiza*) используются в качестве источника рекомбинантных терапевтических белков коммерческими предприятиями ряда зарубежных стран. Генетическая трансформация данных растений оказалась возможной в основном благодаря тщательно разработанной системе индукции морфогенеза и регенерации. С этой же целью проводятся разработки с видами подсемейства вольфиевых. Однако сообщения об успешных работах на сегодняшний день отсутствуют.

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

При любом методе трансформации целевые ткани подвержены целому ряду стрессов, например физическое проникновение частиц, дегидратация при обработке осмотиками, контакт с антибиотиками на селективных средах. В связи с этим, прежде чем начинать исследования в сфере трансформации, необходимо провести ряд экспериментов, направленных на разработку протокола эффективной и стабильной регенерации целых растений с частотой не менее 80-90 %. При проведении исследований в первую очередь был осуществлен поиск оптимального сочетания экспланта и гормона добавляемого в среду. Так же изучению подвергся фактор углеводного питания эксплантов, как один из наиболее значимых для индукции морфогенеза растений семейства *Lemnaceae* (Li. J., 2004).

Методом переноса генов бомбардировкой микрочастицами с нанесенной на них ДНК или других молекул, таких как РНК (Tanaka et al., 1995), они принудительно доставляются в клетки или ткани. Этот метод позволяет устранить ограничения, связанные с типом клетки, видом или типом объекта модификации. В экспериментах по трансформации использовали векторную конструкцию pCambia35SGFP. В ее состав входят гены *hpt*, *gfp* и *bar*. Перенос гетерологичной ДНК осуществляли в активно делящиеся клетки. Далее производили анализ эффективности обстрела согласно результатам детекции транзientной экспрессии. После экспланты переносились на среду с селективным агентом (гигромицином). В результате проделанной работы

разработана методика индукции каллусогенеза вольфии бескорневой, оптимизированы параметры биолиственной трансформации с использованием интенсивности транзientной экспрессии гена *gfp* в качестве критерия оценки эффективности трансформации.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАНИЯ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ РЯСКИ МАЛОЙ (*LEMNA MINOR*) ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Хватков П.А., Окунева А.С., Чернобровкина М.А.

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

Одним из приоритетных направлений развития биотехнологии является биофарминг – наработка различных рекомбинантных белков в трансгенных растениях, т.е. создание на базе последних, так называемых, биофабрик. Растительные системы имеют ряд преимуществ перед, например, бактериальными или дрожжевыми, а именно: отсутствие общих с человеком и животными патогенов, культивирование на достаточно простых искусственных средах, высокий уровень экспрессии гетерологичных белков, схожие постраскрипционные и трансляционные изменения. Однако, «биофарминг» предполагает использование растений, обладающих определенными качествами – высокой скоростью роста, высоким содержанием белка в тканях, наличием эффективной системы регенерации и генетической трансформации. Растения семейства *Lemnaceae* соответствует перечисленным критериям. В настоящее время *Lemna minor* и *Spirodela oligorhiza* уже используются в качестве источника рекомбинантных терапевтических белков коммерческими предприятиями ряда зарубежных стран. Культивирование данных продуцентов осуществляется в крытых искусственных водоемах, что не позволяет полностью реализовать потенциал размножения растений. В связи с этим целью наших исследований стала разработка условий культивирования, обеспечивающих максимальную продуктивность, ряски малой *in vitro*.

Ряска малая, принадлежащая к семейству *Lemnaceae*, является водным, свободноплавающим цветковым растением, размножающимся преимущественно вегетативным способом. Культивирование ряски как продуцента целевых белков имеет ряд преимуществ по сравнению с другими объектами, используемыми для этих же целей: 1) малый размер; 2) поглощение питательных веществ непосредственно поверхностью листеца; 3) большая прогрессия размножения, причем характеристики прироста биомассы напоминают таковые у прокариот; 4) высокое содержание белков в сухой массе; 5) наличие эффективной системы регенерации и генетической трансформации.

Среди множества факторов внешней и внутренней среды, влияющих на рост и развитие растений, питание является наиболее доступным для регулирования и оптимизации потребности растений в тех или иных элементах питания. Для изучения влияния разных сред и концентраций минеральных веществ на увеличение биомассы популяции ряски в условиях *in vitro* были использованы среды Хогланда-Арнона, Кнопа, Гамборга, Шенка-Хильдебрандта, Мурасиге и Скугга, Стейнберга, Горхема и ВО₂У в различных концентрациях. Растения культивировали в жидкой питательной среде, размещая по 10 растений в одну банку в пятикратной повторности для каждого варианта. Учетный период составлял 1 месяц со дня посадки. Наиболее сбалансированной по минеральному составу питательной средой для культивирования

ряски оказалась среда Стейнберга с увеличенным в 2 раза содержанием минеральных элементов питания относительно исходной прописи. В следующей серии опытов изучали действие отдельных элементов минерального питания и органических компонентов, в результате чего были получены данные для разработки индивидуально сбалансированной среды, обеспечивающей максимальную продуктивность ряски малой.

ОБРАЗОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН GFP, ИЗ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.)

Хоанг Тхи Жанг¹, Ралдугина Г.Н.², Калашникова Е.А.¹

¹ *Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва*

² *Учреждение Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия, Москва*

В последние годы широко разрабатываются методы биотехнологии, способствующие решению многих проблем селекционного процесса. Большие возможности в создании новых форм организмов даёт использование методов генетической инженерии, позволяющих переносить чужеродные гены в реципиентные организмы, что позволяет преодолевать межвидовые барьеры и передавать отдельные наследственные признаки одних организмов другим. Растения имеют важное преимущество перед животными - они обладают тотипотентностью, то есть возможна их регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных растений. Это открывает большие возможности в получении трансгенных растений, а также в изучении функционирования введенных в растения генов. При этом очень важно, чтобы у генетически модифицированного организма было обеспечено наследование перенесённых генов в новом для них организме.

Целью работы являлось выяснение образования химерных растений после совместного культивирования листовых эксплантов рапса с *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL10, несущей плазмиду pA3011 с генетической конструкцией, содержащей ген *gfp*. Материалом исследования служили 2 сорта: Вестар (канадской селекции) и Подмосковный (ВИК). Листовую пластинку с удалённой главной жилкой нарезали на сегменты по 5 мм и после кокультивирования с агробактерией помещали на среду для морфогенеза (среда МС, 1% сахарозы, БАП, НУК, АБК). Меристематические почки и листья растений-регенерантов просматривали в флуоресцентном микроскопе и лупе. Из листьев растений-регенерантов была выделена ДНК для последующего молекулярного анализа. ПЦР анализ на ген *gfp* проводили в амплификаторе по следующему протоколу: 94°C – 4 мин, 30 циклов (94 °C – 60 сек, 64 °C – 60 сек, 72 °C – 60 сек), 72 °C – 4 мин. В работе использовали праймеры: eGFP-FW 5'-ССТГААГТТСАТСТГСАССАС-3'; eGFP-RV 5'-АСТССАГСАГГАССАТГТГАТ-3' Амплифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 0,8% агарозном геле, который окрашивали этидиум бромидом и фотодокументировали в ультрафиолетовом свете.

На основании проведенных исследований было установлено, что в результате агробактериальной трансформации частота регенерации растений существенно уменьшалась, в то время как в контрольном варианте этот показатель находился на уровне 50-70%. Побеги, индуцированные после трансформации, характеризовались слабо выраженной дифференцировкой, и только в единичных случаях из них формировались растения с правильной морфологией. Особенно слабо процесс дифференцировки растений из листовых эксплантов наблюдался у сорта

Подмосковный (28%), в то время как для сорта Вестар этот показатель составил 47%. Как правило, у растений-регенерантов развивались витрифицированные побеги, которые не были способны в дальнейшем формировать полноценные побеги. Экспериментально установлено, что большое влияние на органогенез при трансформации листовых эксплантов оказывает температурный режим культивирования. В частности, при температуре 20°C и ниже, экспланты погибали за счет образования некрозов на местах среза.

Результаты ПЦР анализа с маркером, а также наблюдения в флуоресцентный микроскоп показали, что свечение белка GFP наблюдалось на всех стадиях развития трансформированных растений – как на стадии первичного морфогенеза, на каллусах с адвентивными почками, так и при образовании микропобегов. Свечение GFP лучше проявлялось на сосудистых тканях (листьях и стеблях), трихомах и устьицах. Очень интересно, что свечение белка GFP на некоторых листьях наблюдали только в группах клеток, тогда как основная ткань листа не флуоресцировала. Это может свидетельствовать о генотипической химерности образовавшихся растений при регенерации. Чтобы выяснить природу образования химерных растений, нами проведены исследования по выращиванию трансформированных растений в почве. Было получено первое трансгенное семенное поколение, которое в настоящее время анализируется на присутствие гена *gfp*.

Работа частично поддержана грантом РФФИ 09-08-01243

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕЙОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА У ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТА (*LYCOPERSICON ESCULENTUM*), СОДЕРЖАЩИХ ГЕН *RECA*

Широколава А.В.

***Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.
Тимирязева, Россия, Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д.49.***

Рекомбинация является одним из важнейших биологических процессов, присущим как про- так и эукариотическим организмам. За счет рекомбинации поддерживается генетическое разнообразие, стабильность генома. В селекции, рекомбинация имеет особое значение, но генотипы растений, трансгрессивные по ряду хозяйственно полезных признаков, выщепляются достаточно редко. Поэтому для их получения необходимо проводить большие объемы скрещиваний и анализировать значительные по численности популяции.

Рекомбинация, как источник изменчивости, представляет собой актуальное направление генетических исследований, позволяющее расширить возможности селекции и увеличить дивергентность полученных форм.

Гены, контролирующие рекомбинацию, и в частности бактериальный ген *RecA*, во многом сходны у всех форм живых организмов, что открывает широкие возможности использования трансгеноза для индуцирования рекомбинации у растений.

Ранее в лаборатории индуцированного рекомбиногенеза ВНИИСБ РАСХН для индукции рекомбинации в растениях было предложено использовать ген *recA* из *Escherichia coli*, который является прокариотическим гомологом эукариотических рекомбиназ. Продукт гена *recA* является многофункциональным белком, который необходим бактериальной клетке для гомологичной генетической рекомбинации, регуляции экспрессии ряда генов, а также SOS-репарации.

Материалом для цитологического изучения особенностей мейотического деления служили трансгенные гибриды томата, содержащие различные генетические

конструкции: *recA* и *NLS-recA-licBM3*; в качестве контроля использовались образцы, не содержащие целевой ген. Технология получения трансгенных форм и их описание приведены в (Комахин и др., 2010). Для изучения мейоза отбирались пыльники длиной 1,5-2,5 мм. Фиксацию материала и приготовление препаратов осуществляли по методикам, описанным в (Пухальский и др., 2007). Работа выполняется на базе опытных теплиц Центра молекулярной биотехнологии и кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. В ходе эксперимента проводится сопоставление прохождения стадий мейоза у гибридов *recA* и *NLS-recA-licBM3* не трансгенных форм, что позволит сделать вывод о влиянии различных генных конструкций на прохождение мейоза у трансгенных растений. Полученные результаты будут использованы при подготовке практических рекомендаций по использованию данных генных конструкций с целью индуцирования рекомбинации у различных растений.

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. Пухальский В.А., Соловьев А.А., Бадаева Е.Д., Юрьев В.Н. Практикум по цитологии и цитогенетике. – М.: КолосС, 2007.

ИНТРОДУКЦИЯ ГЕНА ВАКУОЛЯРНОГО Na^+/H^+ -АНТИПОРТЕРА ГАЛОФИТНОГО РАСТЕНИЯ *ATRIPLEX GMELINI* В ГЕНОМ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) МЕТОДОМ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Шурлова Е.И., Халилуев М.Р.

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

В период роста и развития растения подвержены воздействию различных неблагоприятных условий окружающей среды. Засоление является одним из главных стрессовых факторов, лимитирующих выращивание большинства сельскохозяйственных культур во многих агроклиматических зонах и существенно снижающих их качество и урожайность. Согласно сведениям ФАО, опубликованным в 2005 г., площадь засоленных почв в мире, включая щелочное засоление, составила 831 млн. га. По различным литературным данным от 33% до 50% общей площади орошаемых земель в мире подвержено засолению.

Устойчивость к засолению является полигенным генетическим признаком и обуславливает необходимость физиологических адаптаций сразу к нескольким независимым факторам: увеличению осмотического давления, оксидативному стрессу и токсическому действию ионов. Осмотический стресс приводит к нарушению гомеостаза и транспорта ионов в клетках. Оксидативный стресс способствует нарушению функций структурных и ферментативных белков, а также липидов мембраны. Токсическое действие засоления определяется вмешательством активных ионов в метаболизм на клеточном и организменном уровнях.

Томат – высокочувствительная к засолению культура. Пороговое значение электропроводности почвенного раствора (EC_e) для томата составляет 2,5 дСм/м, что, согласно классификации, принятой ФАО, соответствует почве со слабой степенью засоления ($EC_e = 2,0 - 4,0$ дСм/м). Одной из приоритетных возможностей повышения

устойчивости томата к засолению является получение и последующее промышленное выращивание солеустойчивых генотипов.

Развитие генно-инженерных технологий обеспечили возможность разработки новых стратегий борьбы в дополнение к существующим традиционным подходам, которые в последнее десятилетие находят все более широкое применение. Одной из них является интродукция в геном сельскохозяйственных растений генов вакуолярных Na^+/H^+ -антипортеров. К настоящему времени Na^+/H^+ -антипортеры выделены у растений арабидопсиса (*SOS1*, *AtNHX1*), риса (*OsNHX1*), люцерны (*MsNHX1*), пырея (*AeNHX1*), галофитов (*Atriplex gmelini* (*AgNHX1*), *Suaeda salsa* (*SsNHX1*)) и многих других. Анализ литературных данных свидетельствует о наличии немногочисленных сообщений, в которых приводятся сведения об успешном повышении устойчивости томата к засолению за счет интродукции в геном генов, кодирующих вакуолярные Na^+/H^+ -антипортеры.

Целью настоящей работы была интродукция гена вакуолярного Na^+/H^+ -антипортера, выделенного из галофитного растения *Atriplex gmelini* (*AgNHX1*), в хозяйственно ценные генотипы томата для повышения устойчивости к засолению.

Растительным материалом послужили коммерческие сорта томата Рекордсмен и Транс Новинка селекции Всероссийского НИИ орошаемого овощеводства и бахчеводства Россельхозакадемии. Перед проведением экспериментов по генетической трансформации был изучен морфогенетический потенциал исследуемых генотипов. Для этого экспланты семядолей и гипокотилей культивировали на 7 различных вариантах питательной среды Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением различных типов и концентраций регуляторов роста (6-БАП, зеатин, ИУК). Эксперименты по трансформации проводили методом кокультивации эксплантов с суспензией агробактерии. Для трансформации использовали бинарный вектор pBI35SAgNHX2, в состав экспрессионной кассеты которого входит ген вакуолярного антипортера (*AgNHX1*) и селективный ген *npt II*, обуславливающий устойчивость к канамицину.

В результате эксперимента было установлено, при культивировании семядолей и гипокотилей обоих сортов на питательных средах, содержащих зеатин в качестве цитокининового компонента, обеспечивало больший выход побегов, чем использование 6-БАП. Показано, что исследуемые генотипы обладают высокой регенерационной способностью, позволяющей проведение генетической трансформации.

В качестве эксплантов для генетической трансформации были использованы 10-дневные семядоли, полученные от асептически выращенных проростков. В результате трансформации было получено соответственно 17 и 5 независимых канамицин-устойчивых регенерантов томата сорта Рекордсмен и Транс Новинка. Проведенный ПЦР-анализ подтвердил интродукцию селективного гена у всех линий, тогда как интеграция гена *AgNHX1* отмечена только у 8 и 3 канамицин-устойчивых линий томата сорта Рекордсмен и Праздничный соответственно. Препараты тотальной геномной ДНК также были проверены на отсутствие бактериального гена *virB* с целью исключения ложно-положительных результатов вследствие бактериальной контаминации. Независимые трансгенные растения с геном Na^+/H^+ -антипортера были адаптированы к условиям *in vivo* и в настоящее время выращиваются в условиях защищенного грунта для получения T1 поколения, последующего выделения гомозиготных линий, а также проведения лабораторных и тепличных испытаний на устойчивость к засолению.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> КАК КОМПОНЕНТОВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ Аксенова Е.И.	5
ОТКРЫТАЯ РАМКА СЧИТЫВАНИЯ 2 В ГЕНОМЕ X ВИРУСА ШАЛОТА КОДИРУЕТ МОЩНЫЙ СУПРЕССОР РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ Архипов А.В.	7
ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЁРОВ УСТОЧИВОСТИ К ПРОРАСТАНИЮ В КОЛОСЕ У ГЕКСАПЛОИДНОЙ ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ Баженов М.С.	8
«ИСКУССТВЕННЫЕ СЕМЕНА» ЗЕМЛЯНИКИ: ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ И ХРАНЕНИЮ Белякова Л.В.	10
БЕЛКИ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА РАСТЕНИЯ-ЭКСТРЕМОФИТА <i>THELLUNGIELLA SALSUGINEA</i> Бердникова М.В., Таранов В.В.	12
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ПРОДУКТИВНОСТИ Богачева Н.Н., Федулова Т. П., Федорин Д.Н.	13
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНОТИПА АНТУРИУМА АНДРЕ (<i>ANTHURIUM ANDREANUM LINDEN</i>) НА ПОБЕГООБРАЗОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ IN VITRO Богданова В.Д., Исачкин А.В.	15
ИЗУЧЕНИЕ ХРОМОСОМНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МЕЖМИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК И TУ-1-COPIA РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ У ЛУКА БАТУНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ FISH Будылин М.В., Хрусталёва Л.И.	17
ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO СЛАБОРОСЛЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ Бьядовский И.А.	18
ПЕРВЫЕ ШАГИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ МАРКЕР ОПОСРЕДОВАННОГО ОТБОРА В СЕЛЕКЦИИ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ В КРАСНОДАРСКОМ НИИСХ ИМ. П.П.ЛУКЪЯНЕНКО Васильев А.В., Беспалова Л.А.	19
СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ КНИИСХ ИМЕНИ П.П. ЛУКЪЯНЕНКО НА НАЛИЧИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ WAXУ-ГЕНОВ Гладких Н.И., Климушина М.В., Дивашук М.Г., Беспалова Л.А., Васильев А.В., Карлов Г.И.	20
СОХРАНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ДИОСКОРЕИ ЯПОНСКОЙ (<i>DIOSCOREA JAPONICA</i>) И ДИОСКОРЕИ КАВКАЗСКОЙ (<i>DIOSCOREA CAUCASIA</i>) IN VITRO Доан Тху Тхуи, Калашникова Е.А.	22

ФИЗИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ АЛЛИНАЗЫ И СЛЕЗОТОЧЕНИЯ ФАКТОРА СИНТАЗЫ НА ХРОМОСОМАХ <i>ALLIUM CEPA</i> L.С ПОМОЩЬЮ TYR-FISH	23
Киров И.В., Романов Д.В., Фесенко И.А., Хрусталёва Л.И.	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЯ <i>WX-B1E</i> У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЕГО С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ	24
Климушина М.В., Дивашук М.Г., Карлов Г.И.	
ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР В «РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ И АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙ ПАРВОВИРУСНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ И РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ	25
Козлова А.Д., Астахова Т.С., Обухов И.Л.	
ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА СТЕВИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОЛХИЦИНИРОВАНИЯ <i>IN VITRO</i>	27
Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П.	
ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ ПШЕНИЦЫ	28
Коротаева А.А., Крупин П.Ю., Дивашук М.Г. Карлов Г.И.	
УСТАНОВЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ АКТИВНО ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ	29
Кунда М.С., Воронина О.Л.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ НА РАННИХ ЭТАПАХ СЕЛЕКЦИИ НА КАЧЕСТВО	30
Мельникова Е.Е., Зима В.Г., Букреева Г.И.	
СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЗРЕЛОМ ЗЕРНЕ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ЗИМУЮЩЕГО ГОРОХА КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЁР МОРОЗОСТОЙКОСТИ СОРТОВ	32
Мельникова Е.Е., Евтушенко Я.Ю., Букреева Г.И., Насонов А.И., Плотников В.К.	
МЕТОД КУЛЬТУРЫ МИКРОСПОР В ПРОИЗВОДСТВЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ОВОЩНЫХ И МАСЛИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДА <i>BRASSICA RAPA</i>	33
Монахос С.Г., Увирагвайе А., Зао Дж., Занг Н., Боннема Х.	
НИТРАТНЫЙ СИГНАЛИНГ САХАРОЗОСИНТАЗЫ КАК МАРКЕР ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ СОРТОВ С АЛЬТЕРНАТИВНЫМ ВЫБОРОМ НАКОПЛЕНИЯ БЕЛКА ИЛИ УГЛЕВОДОВ	34
Никитин А.В., Брускова Р.К., Измайлов С.Ф.	
РАЗРАБОТКА SCAR МАРКЕРА ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К КИЛЕ У КАПУСТЫ ПЕКИНСКОЙ (<i>BRASSICA RAPA</i> SSP. <i>PEKINENSIS</i> (LOUR.) HANELT.)	35
Нгуен Минь Ли, Монахос С.Г.	
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В ИСПЫТАТЕЛЬНОМ МОДУЛЕ, ИМИТИРУЮЩЕМ СОЛЕВОЙ СТРЕСС	37
Полякова М.Н., Серенко Е.К.	

БИОБЕЗОПАСНЫЕ БЕЗМАРКЕРНЫЕ ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ, СИНТЕЗИРУЮЩИЕ НВS-АНТИГЕН Пучко Е.Н., Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И.	39
КЛОНИРОВАНИЕ И СИКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ АЛЛИНАЗУ И СЛЕЗОТОЧЕНИЯ ФАКТОР СИНТАЗУ Романов Д.В., Киров И.В., Фесенко И.А., Хрусталёва Л.И.	40
ВЛИЯНИЕ СОРБИТА КАК ОСМОТИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ Сащенко М.Н.	41
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ (SSR)МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОРТОВОЙ ЧИСТОТЫ ГИБРИДНЫХ СЕМЯН ПАРТЕНОКАРПИЧЕСКОГО ОГУРЦА Ушанов А.А., Смирнова Д.С.	43
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ГОМОЛОГОВ ГЕНА <i>FRIGIDA</i> В ГЕНОМАХ А И С КУЛЬТУРНЫХ ВИДОВ <i>BRASSICA</i> Фадина О.А., Панкин А.А.	43
ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ТОМАТА (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.) К ВОЗБУДИТЕЛЮ ФИТОФТОРОЗА ЗА СЧЕТ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ХИТИНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ГЕВЕИН- ПОДОБНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ Халилуев М.Р.	45
РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА И ОЦЕНКА ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОЛИСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ <i>WOLFFIA ARRHIZA</i> Хватков П.А., Кочелабов Р.А., Чернобровкина М.А.	47
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАНИЯ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ РЯСКИ МАЛОЙ (<i>LEMNA MINOR</i>) ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> Хватков П.А., Окунева А.С., Чернобровкина М.А.	48
ОБРАЗОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН GFP, ИЗ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ РАПСА (<i>BRASSICA NAPUS</i> L.) Хоанг Тхи Жанг, Ралдугина Г.Н., Калашникова Е.А.	49
ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕЙОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА У ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТА (<i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i>), СОДЕРЖАЩИХ ГЕН <i>RECA</i> Широколава А.В.	50
ИНТРОДУКЦИЯ ГЕНА ВАКУОЛЯРНОГО Na^+/H^+-АНТИПОРТЕРА ГАЛОФИТНОГО РАСТЕНИЯ <i>ATRIPLEX GMELINI</i> В ГЕНОМ ТОМАТА (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.) МЕТОДОМ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ Шурлова Е.И., Халилуев М.Р.	51

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