

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

XVI МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

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

14 апреля 2016 г.

Москва – 2016

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

**XVI МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

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

14 апреля 2016 г.

*Конференция посвящается памяти
академика РАСХН
Георгия Сергеевича
МУРОМЦЕВА*

Москва – 2016

СПОНСОР КОНФЕРЕНЦИИ



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SSR МАРКЕРОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОБРАЗЦОВ СТЕРЖНЕВОЙ КОЛЛЕКЦИИ ВИР И ГИБРИДНЫХ КОМБИНАЦИЙ СКРЕЩЕВАНИЯ *BRASSICA RAPA* L.

Беренсен Ф.А., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В.

*Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», 190000, г. Санкт-Петербург,
ул. Большая Морская д. 42-44
E-mail: fberensen@gmail.com*

Brassica – род семейства *Brassicaceae* включающий более 40 видов кормовых, овощных и масличных сельскохозяйственных культур. Вид *Brassica rapa* L. отличающийся высокими содержаниями витаминов, питательных веществ, сахаров крайне важен и ценен для рациона человека. Вид *B. rapa* L. ($n=10$, Геном A), являясь возможно первым domesticiрованным видом рода *Brassica*, вероятно, произошел от вида *B. oleracea* L. ($n=9$, Геном C). Небольшое количество хромосом, малый размер генома *B. rapa*, а также его генетическая близость к уже секвенированному геному рода *Arabidopsis* и представленное большим количеством форм внутривидовое разнообразие, позволяет виду *B. rapa* хорошо подходить на роль модельного объекта для молекулярно-генетических исследований в области картирования локусов количественных признаков (QTL), изучения механизмов наследования QTL сцепленных с важными признаками качества и маркирования QTL с использованием молекулярных маркеров. Коллекция *B. rapa* ВИР насчитывает более 850 образцов восточноазиатских капуст и листовых реп, более 450 образцов корнеплодной репы и постоянно пополняется. Исследовательская база имеющаяся в ВИР, дает возможность проводить оценку уже готового растительного и селекционного материала, а также выводить новые, сорта с особо ценными признаками качества.

Целью нашего исследования было проведение молекулярно-генетического скрининга образцов стержневой коллекции ВИР *Brassica rapa* L. с последующей оценкой аллельного полиморфизма в ранее найденных QTL, сцепленных с хозяйственно-ценными признаками качества, и оценка характера передачи аллелей сцепленных с QTL от родительских форм последующим поколениям гибридных комбинаций скрещивания с использованием SSR молекулярных маркеров.

В качестве исследуемого растительного материала были отобраны 50 фенотипически различных образцов *B. rapa* разного происхождения из стержневой коллекции ВИР - 17 образцов пекинской капусты, 8 образцов китайской, 3 образца японской, 5 образцов капусты ноздреватой, 1 стабильный гибрид между китайской и ноздреватой капустой, 4 образца листовой и 12 образцов корнеплодной репы. Также в исследовании были задействованы 105 образцов полученные путём внутривидовой гибридизации между линиями из картирующих популяций двойных гаплоидов DH30 и DH38 *B. rapa*. и перспективными образцами пекинской, китайской и ноздреватой капусты из стержневой коллекции ВИР *B. rapa*. В исследовании были использованы 9 SSR маркеров неравновесного сцепления, генетически сцепленных с хозяйственно ценными биохимическими и морфологическими признаками качества, находящихся в 6 различных группах сцепления. Для выбора молекулярных маркеров использовались данные генетических карт картирующих популяций *B. rapa* DH30 и DH38 и данные ранее проведенных исследований.

В результате проведения молекулярно-генетического скрининга 7 SSR маркерами 50 образцов *B. rapa* уровень полиморфизма составил 23 полиморфных фрагмента размером от 122 до 380 пар нуклеотидов. Отобранные SSR-маркеры показали наличие

ПЦР фрагмента в 98% случаев. Молекулярные маркеры семейств NA, OI, KS проявили больший полиморфизм, чем маркеры семейства BRMS (по усредненным данным – 3,3 и 3 полиморфных фрагмента соответственно). При молекулярном анализе со всеми SSR маркерами полиморфизм образцов с происхождением из Китая был выше, чем у японских образцов в среднем на 15%. Образцы Российского происхождения, представляющие в основном корнеплодную репу, показали самый низкий полиморфизм близкий к образцам из Японии. При скринировании 3 маркерами из 7, образцы корейского происхождения, относящиеся к разным сортотипам, давали одинаковый набор аллелей.

Наибольшее количество одинаковых комбинаций аллелей было найдено у ноздреватой капусты, а наименьшее у пекинской капусты. В молекулярных маркерах наивысший процент одинаковых комбинаций был у маркеров BRMS-034 и OI10-D08, наименьший был обнаружен у маркеров Na10-D09 и BRMS-043. Наибольший полиморфизм был при скринировании исследуемого материала маркером Na10-D09 – пять аллелей размером от 273 до 360 п.н., было отмечено не более 4 аллелей у одного образца. Отобранные нами маркеры в 32,8% случаев давали одинаковые фрагменты у образцов одного подвида. При скрининге каждым маркером, одинаковый аллель был найден у всех образцов в 75-100% случаев, в среднем – 86,2%. В 87% у образцов одного сортотипа один из фрагментов был общий для всех образцов данного сортотипа.

Образцы китайской капусты показали наибольший полиморфизм среди всех отобранных в исследование сортотипов. Наибольшее количество аллелей при скринировании одним SSR маркером было отмечено у китайской капусты, в среднем 2.07 полиморфных фрагмента на один образец в сортотипе. У ноздреватой, пекинской, японской капуст и листовой репы этот показатель колеблется от 1.68 до 1.56 полиморфных фрагмента на образец. Стабильный гибрид между китайской и ноздреватой капустами к-302 в 57% случаев имел одинаковые аллели с китайской капустой сортотипа Ю-Тсай к-195, сорт Местный к-302 также в 70% случаев имел одинаковый аллельный набор хотя бы с одним из образцов ноздреватой капусты сортотипа Хризантеум. Образцы японской капусты сортотипа Мизуна при скринировании маркерами семейств KS, OI, Na всегда имели разные аллели. А при скринировании маркерами BRMS только в 50% случаев. При молекулярном анализе 34 образцов F₁ и 71 образца F₂ размер полиморфных фрагментов составил от 122 до 340 пар нуклеотидов. Наследование аллелей от образцов коллекции ВИР составило-34%. Самый большой процент передачи аллелей от коллекционных образцов был при анализе комбинаций скрещивания маркером BRMS-042, он составил 48%. Проявление аллелей не выявленных у родительских пар было отмечено в 30% случаев. Расщепление у растений первого поколения не было выявлено у 8 гибридных комбинаций скрещивания среди всех проскринированных. При этом у двух вариантов из них было отмечено расщепление между потомками второго поколения.

В результате проведенного молекулярно-генетического скрининга восточноазиатских капуст и реп стержневой коллекции ВИР *B. rapa* с использованием SSR маркеров неравновесного сцепления была установлена возможность анализа аллельного полиморфизма гетерозиготных образцов *B. rapa* и проведения оценки растительного материала. Анализ образцов *B. rapa* позволил установить генетическое сцепление отобранных нами SSR маркеров с QTL и в дальнейшем проанализировать образцы с целью нахождения морфологических и биохимических признаков качества. Скрининг гибридных комбинаций показал возможность оценки характера наследования аллелей, сцепленных с QTL, от родительских форм последующим поколениям. Используемые в настоящем исследовании молекулярные маркеры можно также рекомендовать для дальнейших исследований *Brassica rapa* L. и проведения молекулярной маркер - вспомогательной помощи селекции у образцов данного вида растений.

ДИАГНОСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *H-FABP* И ЕГО АССОЦИАЦИЯ С МЯСНЫМИ ПРИЗНАКАМИ У СВИНЕЙ

Голубева Н.Г.¹, Радченко М.В.²

¹ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»,
Медицинский институт, 302028, Орёл

²ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет», 302019, Орёл
E-mail: natalisai@mail.ru

Внедрение методов маркерной селекции предусматривает использование в селекционных программах свиноводческих предприятий ДНК-маркеров, напрямую или косвенно связанных с качеством мяса и мясной продуктивностью. Из большого спектра генов-маркеров, оказывающих влияние на качество свинины и выход продукции, можно выделить ген белка, связывающего жирные кислоты (*H-FABP*).

Ген *H-FABP* – оказывает влияние на содержание внутримышечного жира в туше свиней, он локализован на шестой хромосоме. Gerbens F. и соавт. (1997) выявили три аллеля (A, D и H) гена *H-FABP*, обуславливающие три класса полиморфизма. Наиболее стабильно и эффективно проявляются аллельные варианты D-полиморфного участка гена *H-FABP*. Предпочтительным является генотип dd, животные с этим генотипом отличаются повышенной мраморностью мяса по сравнению со свиньями, имеющими генотипы Dd и DD.

Цель работы заключается в генотипировании чистопородных свиней пород йоркшир, ландрас, дюрок а также их двух- и трехпородных гибридов – йоркшир × ландрас (Й×Л) и ландрас × йоркшир × дюрок (Л×Й×Д) по локусу *H-FABP*.

Полученные при ПЦР-ПДРФ анализе полиморфизма гена *H-FABP* фрагменты, «разрезаны» с помощью эндонуклеазы *HaeII* и разделены в агарозном геле. Для D аллеля характерно присутствие двух фрагментов: 683 и 117 пн. У аллеля d присутствуют три фрагмента – 405, 278 и 117 пн. У гетерозиготных животных Dd присутствуют все 4 фрагмента – 683, 405, 278 117п.н. (рис. 1).

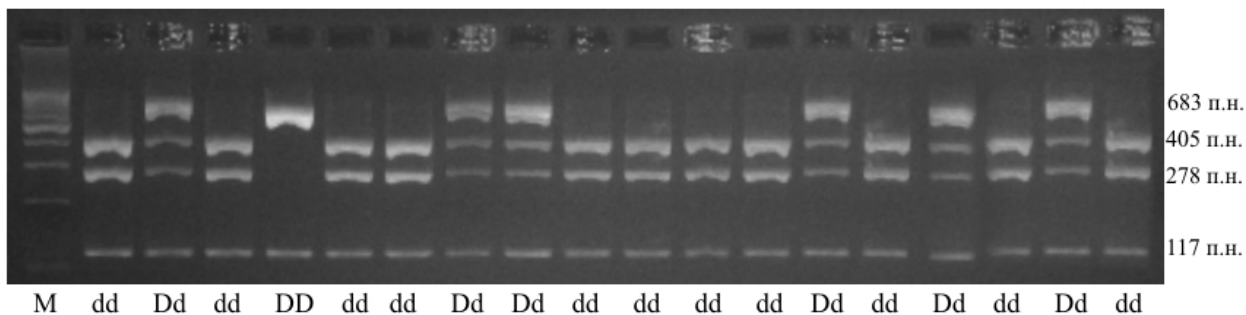


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ генотипирования по локусу *H-FABP* (M – маркер молекулярного веса).

Наибольшая частота встречаемости желательного аллеля d характерна для животных породы ландрас и двухпородных гибридов йоркшир × ландрас.

Генотипирование свиней пород йоркшир, дюрок и гибридов Л×Й×Д по гену белка, связывающего жирные кислоты, выявило неравномерное распределение частоты встречаемости аллелей D (0,6, 0,375 и 0,446) и d (0,4, 0,625 и 0,554), что генотипически проявилось в высокой концентрации генотипа DD, у свиней породы йоркшир (60%) и относительно низкой – у дюрок и Л×Й×Д (25% и 29,5% соответственно). Наибольшее количество особей с гетерозиготным генотипом характерно для трехпородных гибридов – 30,8%.

Данные, полученные методом ПЦР-ПДРФ генотипирования, свидетельствуют как

о внутривидовом, так и о межвидовом генетическом разнообразии аллельных вариантов гена белка, связывающего жирные кислоты. Значительная часть протестированных животных имеет генотип dd – 55,3%. Поскольку животные с этим генотипом отличаются повышенной мраморностью мяса, у производителя есть возможность целенаправленной селекции свиней по содержанию внутримышечного жира. Животные с генотипом DD составляют 26,1% от общего числа протестированных особей. По данным Кононенко С.И. (2011), животные с этим генотипом характеризуются наибольшей толщиной шпика по сравнению с гетерозиготными и рецессивными гомозиготными особями, что также может быть использовано производителем при селекции.

ЭФФЕКТИВНАЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ *PANTOEA AGGLOMERANS* В РАСТЕНИЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Валеева Л. Р.¹, Нямсурэн Ч.¹, Трошагина Д. С.¹, Шарипова М.Р.¹, Шакиров Е.В.^{1,2}

¹ **Казанский (Приволжский) федеральный университет, ИФМиБ, Казань, Россия**

² **University of Texas at Austin, Austin, TX, 78712 USA**

E-mail: lia2107@yandex.ru

Фосфор является одним из основных элементов минерального питания, обеспечивающих функционирование метаболических процессов клетки, построения клеточных и тканевых структур. В связи с растущей проблемой дефицита доступного для растений и животных фосфора, поиск путей ее решения является весьма актуальным для современного сельского хозяйства. Большая часть почвенного фосфора находится в малодоступных органических формах, 50-80% из которых составляет стойкое нерастворимое соединение фитат, которое не может быть усвоено корнями растений. Однако почвенные микроорганизмы способны высвобождать фосфор из фитата, гидролизуя его фитазами – специфическими фосфатазами. Таким образом, использование генов микробных фитаз для экспрессии в растениях – это перспективное направление биотехнологии в решении проблемы фосфорного питания. Цель работы – получение эффективной гетерологичной системы на основе бактериального гена фитазы для экспрессии растениями.

Гетерологичная экспрессионная система гистидиновой кислотной фитазы *PaPhyC* *Pantoea agglomerans* была получена и клонирована в бинарный вектор pCBK05. Последовательность гена фитазы предварительно оптимизировали для эффективной экспрессии в клетках растений и химически синтезировали. Далее к гену фитазы добавили последовательность сигнального пептида экстенина Ext на 5'-конец и HisStrep-Tag последовательность на 3'-конец. Полученную конструкцию Ext::paPhyC::HisStrep-Tag поместили под управление промотора CaMV35S в составе вектора pCBK05. После получения рекомбинантных штаммов *E. coli* и *Agrobacterium tumefaciens*, несущих вектор с геном фитазы, проводили агробактериальную трансформацию растений *Arabidopsis thaliana*. Из полученных растений с интегрированным геном бактериальной фитазы проводили отбор гомозиготных линий растений. Экспрессия фитазы была подтверждена на уровне транскрипции и трансляции. Показано, что при росте на среде с фитатом в качестве единственного источника фосфора сухая масса растений, экспрессирующих бактериальную фитазу, значительно больше, чем у растений дикого типа. Содержание

неорганического фосфата в растениях, экспрессирующих бактериальную фитазу, также выше, чем в растениях контрольных линий.

Таким образом, экспрессия рекомбинантной бактериальной фитазы *PaPhyC* позволяет улучшить рост растений на средах с фитатом в качестве единственного источника фосфора. Полученные данные по эффективной экспрессии бактериальной фитазы в растениях в дальнейшем помогут в поиске новых путей решения проблемы дефицита фосфора в питании растений и животных.

Работа поддержана Грантом № 16-08-00583 А.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ГЕНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Шкаликова М.В., Малоголовкин А.С.

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии - ГНУ ВНИИВВиМ, 601125, Владимирская область, Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр.1

E-mail: masha67111@mail.ru

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) большой двухцепочечный ДНК вирус семейства *Asfarviridae*, который вызывает смертельную геморрагическую лихорадку у домашних свиней и кабанов. Смертность в инфицированных стадах достигает 100%. Заболевание передается от больных животных и вирусоносителей алиментарным, контактным путём, трансплацентарно, вызывая аборт и гибель плодов у супоросных свиноматок (Sanchez-Vizcaino, J.M., 2006).

По данным Silk R.N., 2008 АЧС кодирует несколько белков, участвующих в иммунном уклонении. Эти группы белков участвуют в предотвращении апоптоза инфицированных клеток, клеточной адгезии белков, препятствуют активации транскрипции генов иммунного ответа (Dixon et al., 2004).

Способность АЧС индуцировать апоптоз в иммунных клетках может быть эффективной стратегией для ограничения иммунного ответа на инфекцию. Однако не все известные изоляты вируса АЧС обладают одинаковой иммуномодулирующей активностью. Генетические предпосылки данных различий остаются не выясненными.

Целью данной работы является выявление генетических маркеров иммуномодулирующей активности с помощью филогенетического анализа изолятов вируса АЧС.

Аминокислотные последовательности 7 ортологичных генов (A179L, A224L, A238L, EP153R, EP402R, I329L, DP71L) от 17 (Benin 97/1, E75, Georgia_2007/1, L60, OURT_88/3, BA71, BA71V, Ken05/Tk1, Ken06.Bus, NHV, Malawi Lil-20/1, Tengani 62, Pretorisuskop/96/4, Kenya 1950, Mkuzi 1979, Warthog, Warmbaths) изолятов вируса АЧС были объединены в одну псевдо-последовательность. Следующим шагом было построение филогенетического дерева с использованием метода максимального правдоподобия с помощью программы Mega 5.0 (Tamura, K. et al., 2011). Проведен бутстрэп – анализ этого дерева с использованием 1000 случайных выборок. Кластеры со значением выше 70 были признаны достоверными. Топология дерева была использована в последующем анализе генетической связанности изолятов.

Согласно полученным результатам, мы можем разделить имеющиеся изоляты на 3 основных кластера, которые коррелируют с их географическим распределением и видам хозяев. Первый кластер состоит из 6 тесно связанных изолятов из европейских стран

(Испания и Португалия) и только 1 изолята (Benin 97.1) из Восточной Африки, что подтверждает занос вируса АЧС на территорию Европы из африканского континента, преимущественно домашними свиньями. Второй кластер состоит из нескольких изолятов из Южной Африки: изолят Tengani 62 выделен от домашних свиней, Pretorisuskop/96/4 выделен от клещей, а изолят Warthog изолирован от бородавочников из Намибии. Третий кластер состоит из 4 изолятов, выделенных на территории Юго – Восточной Африки: 3 из них (Kenya 1950, Ken05/Tk1, Ken06.Bus) изолированы от домашних свиней, в то время как изолят Malawi Lil-20/1 от клещей.

Консервативными генами являются A179L, A224L, A238L, а варибельными EP153R, EP402R, I329L, DP71L.

Изолят Georgia_2007/1, по всей видимости, отклоняется от средних значений и не связан с другими изолятами с точки зрения общности происхождения, так как не входит ни в одну из групп, образованную европейскими или африканскими изолятами данного вируса. Возможно, что этот факт обусловлен недостаточным количеством штаммов в базе данных GenBank для полноценного анализа. Изоляты Warmbaths и Mkuzi 1979, изолированные от клещей в Южной Африке, не входят ни в 1 из перечисленных кластеров, однако не являются статистически поддержанными (значение бутстрэп – 42).

Интересно, что топология филогенетического древа на основе псевдопоследовательности из 7 иммуномодулирующих генов полностью совпадает с филогенетическим древо, построенным на основе полных геномов изолятов вируса АЧС. Данный факт может свидетельствовать о наличии генетических маркеров эволюционной изменчивости в иммуномодулирующих генах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-34-20995 мол_a_вед.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СРОКИ КОЛОШЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИИ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ GALLEON x HARUNA NIJO

Теплякова С.Б.

***Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических
ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», 190000, г. Санкт-Петербург,
ул. Большая Морская д. 42-44
E-mail: serafima.teplyakova@mail.ru***

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) – одна из наиболее возделываемых зерновых культур в России. Селекционеры в южных регионах РФ заинтересованы в получении сортов ячменя с ранними сроками колошения, которые бы успевали проходить ключевые стадии своего развития до наступления летней засухи.

Известно, что на сроки колошения у ячменя наибольшее влияние оказывает комбинация аллелей двух генов *Vrn-H1* и *Vrn-H2*, находящихся на хромосомах *5H* и *4H* соответственно. Сочетание доминантного аллеля в локусе *Vrn-H2* и рецессивного аллеля в локусе *VRN-H1* определяет озимый тип развития (Takahashi, Yasuda, 1971). Цель нашего исследования состояла в том, чтобы с использованием модельной популяции дигаплоидных линий (ДГЛ), полученных от скрещивания двух яровых сортов - австралийского сорта Galleon и японского сорта Haruna Nijo, определить, как влияют на сроки колошения ячменя различные комбинации аллелей генов *Vrn* и как проявляется их эффект в разных географических зонах.

Выращивание 89 ДГЛ ячменя производилось в 2009 г. на двух экспериментальных станциях ВИР в различных географических регионах: в Ленинградской области (г. Павловск) и в Краснодарском крае (г. Краснодар). Отсчет сроков колошения производился, начиная с даты посева до момента появления колоса в пазухе флагового листа.

Родительские генотипы Galleon и Naruna Nijo относятся к яровым ячменям. В двух пунктах наблюдения было отмечено расщепление их потомства на озимые и яровые формы. Такое расщепление можно объяснить различными комбинациями унаследованных родительских аллелей в локусах *Vrn-H1* и *Vrn-H2*. Для выявления аллелей этих генов у родительских генотипов и ДГЛ нами были использованы геноспецифичные молекулярные маркеры (Zitzewitz et al., 2005; Cockram et al., 2009). У сорта Galleon были идентифицированы аллели *Vrn-H1-Vrn-H2*, у сорта Naruna Nijo - *vrn-H1-vrn-H2* (рис. 1). Нами установлено, что дигаплоидные линии озимого типа имели комбинацию аллелей *vrn-H1-Vrn-H2*. Среди яровых ДГЛ встречались остальные возможные комбинации аллелей генов *Vrn-H1* и *Vrn-H2* (рис. 1).

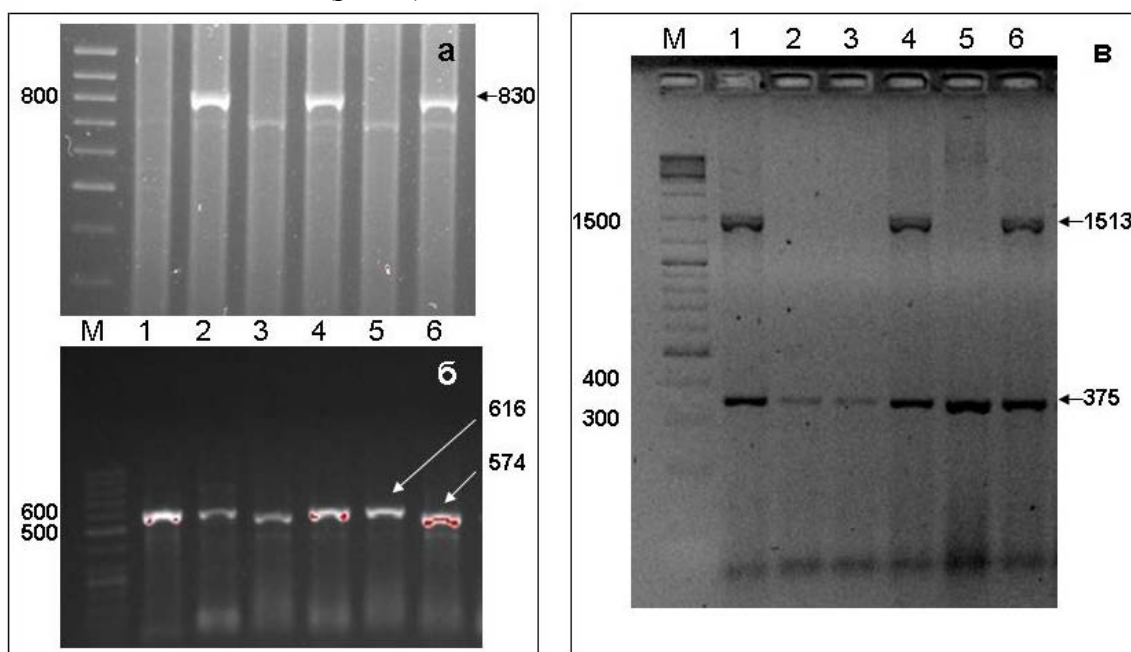


Рис. 1. Выявление аллелей гена *Vrn-H1* (а, б) по Cockram et al. (2009) и *Vrn-H2* (в) по Zitzewitz et al. (2005) у родительских сортов и ДГЛ. Сорта: 1- Galleon (*Vrn-H1-Vrn-H2*) - яровой, 2 – Naruna Nijo (*vrn-H1-vrn-H2*) – яровой. ДГЛ: 3 – G*HN1 (*Vrn-H1-vrn-H2*) - яровой, 4 – G*HN12 (*vrn-H1-Vrn-H2*) - озимый, 5 – G*HN24 (*Vrn-H1-vrn-H2*) - яровой, 6 – G*HN22 (*vrn-H1-Vrn-H2*) - яровой.

Влияние комбинаций аллелей генов *Vrn* на сроки колошения яровых дигаплоидных линий в двух географических регионах выращивания проявлялось по-разному. В Павловске это влияние было недостоверным ($p = 0.7147$), а в Краснодаре – существенным ($p = 0.0427$): ДГЛ с генотипом *Vrn-H1-Vrn-H2* начинали колошение позднее прочих, а для линий с генотипом *vrn-H1-vrn-H2* было характерно более раннее колошение.

Было зафиксировано отличие в сроках колошения яровых ДГЛ при их выращивании в разных географических пунктах (Павловск и Краснодар). В Краснодаре все яровые ДГЛ перешли к колошению на 52-72 день, в Павловске – цветение было более растянутым (28-72 день). Если охарактеризовать скорость перехода к колошению каждой конкретной ДГЛ по ее отклонению от среднего значения в популяции, то ДГЛ, изменившие свой «модуль поведения» в зависимости от региона выращивания, унаследовали сходные родительские аллели на хромосоме 7Н, что было установлено

методом QTL-картирования. В этом участке хромосомы 7Н ранее был картирован ген *Vrt-2*, экспрессия которого регулируется фотопериодом, и который, возможно, является репрессором гена *Vrn-H1* (Szucs et al., 2006).

Таким образом, установлено, что эпистатическое взаимодействие генов *Vrn* определяет сроки колошения у ячменя, однако, выявление только комбинации аллелей генов яровизации не дает полного представления о характере варьирования данного признака. Гены, контролируемые фотопериодом, могут вносить корректировку в модель эпистатического взаимодействия генов *Vrn* и изменять сроки развития ячменя.

СКРИНИНГ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ НА НАЛИЧИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ *LR*, *SR* И *YR* МЕТОДОМ ПЦР-АНАЛИЗА

Трофимова И.А., Волкова Г.В., Шумилов Ю.В.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений», 350039, Краснодар-39

E-mail: galvol@bk.ru

Озимая пшеница, являясь основной сельскохозяйственной культурой на Северном Кавказе, ежегодно занимает третью часть от общего количества пахотных угодий. Эта культура подвержена воздействию комплекса фитопатогенов, наиболее распространенными и вредоносными из них, по-прежнему, остаются ржавчинные заболевания – бурая (*Puccinia triticina* Eriks. and Henn.), желтая (*Puccinia striiformis* West.) и стеблевая (*Puccinia graminis* Pers.) (Волкова и др., 2014). Для разработки научно обоснованной стратегии создания и размещения сортов, устойчивых к данным патогенам, требуется запас генетически разнообразных доноров и источников устойчивости.

Целью данной работы являлся скрининг перспективных сортообразцов пшеницы на наличие эффективных генов устойчивости *Lr*, *Sr* и *Yr* с использованием ДНК-маркеров для целенаправленной и ускоренной селекции.

Для ПЦР-анализа сортообразцов пшеницы использовали молекулярные маркеры, фланкирующие целевые гены: *Lr19* – GbF/R, *Lr24* – J09 F/R (Demichelis et al., 2008), *Sr9a* – WMS47 F/R (www.inta.gov.ar), *Sr24* – Sr24#12 F/R, *Sr31* – IAG95 F/R (Mago et al., 2002), *Yr10* – Xpsp3000-1B F/R (Wang et al., 2002), *Yr24* – BARC187 F/R (Li et al., 2006).

В работе использовали ДНК 16 сортообразцов озимой пшеницы, включенных в Государственный реестр РФ и проходящих Государственное испытание, а также 7 сортов и линий – носителей искомым генов устойчивости, являющиеся положительными контролями.

Были подобраны оптимальные условия проведения ПЦР, обеспечивающие высокий выход продукта амплификации наряду с минимальным количеством синтезированных неспецифичных фрагментов ДНК для каждого апробированного маркера.

Проведенный скрининг изучаемых сортообразцов на наличие целевых генов устойчивости показал, что гены *Lr19*, *Lr24*, *Sr24*, являющиеся эффективными к северокавказским популяциям бурой и стеблевой ржавчины, отсутствуют в исследуемых сортообразцах.

ПЦР-анализ с использованием молекулярного маркера IAG95, фланкирующего ген *Sr31*, соответствующий фрагмент амплификации размером 1200 п.н. выявлен у сортообразца Адель.

С использованием маркера Xpsp3000-1В к гену *Yr10*, характерный фрагмент размером 268 п.н. идентифицирован у образца пшеницы – ГРОМ.

При поиске сортообразцов – носителей гена устойчивости *Yr24*, искомый фрагмент размером в 258 п.н. был выявлен в сортообразцах Золушка и ГРОМ.

С использованием молекулярного маркера WMS47 F/R к гену *Sr9a*, характерный фрагмент размером 166 п.н. выявлен у семи сортообразцов - Адель, Таврида, Гардемарин, Лагуна, Степной янтарь, 2257/07, 2593/07.

Сортообразцы с идентифицированными эффективными генами устойчивости предложены в качестве источников устойчивости к *Puccinia spp.* для целенаправленной селекции сортов и гибридов пшеницы.

Литература:

1. Волкова Г.В., Шумилов Ю.В., Сияк Е.В., Ваганова О.Ф., Кремнева О.Ю. Изучение взаимодействия в патосистеме «*Triticum aestivum-Puccinia spp.*» // Наука Кубани, 2014. - №1. – С. 26-31.

2. Demichelis M., Vanzetti L.S., Bainotti C.T., Aurelia P.R., Helguera M. Identificacion de genes *Lr* presents germoplasma Argentino de trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L.) mediante tecnicas moleculares // VII Congreso Nacional de Trigo. Santa-Rosa, La Pampa. Julio, 2008.

3. www.inta.gov.ar/bordenave/contactos/autores/pabio/genes_T.pdf

4. Mago R., Spielmyer W., Lawrence G.J., Lagudah E.S., Ellis J.G., Pryor A. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines // Theor. Appl. Genet., 2002. – V.104. – P. 1317-1324.

5. Wang L.F., Ma J.X., Zhou R.H., Wang X.M., Jia J.Z. Molecular tagging of the yellow rust resistance gene *Yr10* in common wheat, P.I.178383 (*Triticum aestivum* L.) // Euphytica, 2002. – V. 124. – P. 71-73.

6. Li G.Q., Li Z.F., Yang W.Y., Zhang Y., He Z.H., Xu S.C., Singh R.P., Qu T.T., Xia X.C. Molecular mapping of stripe rust resistance gene *YrCH42* in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with *Yr24* and *Yr26* // Theoretical & Applied Genetics, 2006 – V.112. – P. 1434-1440.

АНАЛИЗ ПРОМОТОРНЫХ ЗОН АБК-РЕГУЛИРУЕМЫХ ГЕНОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*, ГОМОЛОГИЧНЫХ ГЕНУ *AA1*

Виноградов Н.С.

ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН», лаборатория экспрессии генома растений, 127276, Москва

E-mail: act_of_eureka@mail.ru

Растительный организм, попавший в неблагоприятные условия, связанные с нарушением водного баланса, активизирует внутренние защитные механизмы. Ключевым участником этого процесса является фитогормон абсцизовая кислота, который руководит действиями растения в период стресса. На данный момент пути передачи гормонального сигнала АБК изучены достаточно подробно и включают в себя большое количество звеньев, вовлеченных в несколько основных цепей передачи сигнала. Однако существует множество АБК-активируемых генов, продукты которых потенциально могут оказаться еще не описанными элементами пути распространения гормонального сигнала в клетке. В

результате поиска таких элементов был найден и охарактеризован АБК-зависимый ген люпина желтого, названный впоследствии *AA1* (*abscisic acid activated 1*). Для него была показана активация экспрессии в ответ на обработку этиолированных проростков абсцизовой кислотой, а также негативная регуляция после обработки цитокинином. Белковый продукт гена способен связывать АБК и накапливается в течение 48 часов после обработки, что указывает на его участие в позднем ответе на АБК. В дополнительных экспериментах было показано накопление белка AA1 после экспонирования на 150 мМ NaCl и после холодового стресса при +4°C. В геноме модельного растения *A. thaliana* выявлено наличие трех генов, обладающих высокой степенью гомологии с *AA1* (*At1g21670*, *At1g21680*, *At4g01870*). Все три гена, также как и *AA1*, имеют безинтронную структуру и несут в своей аминокислотной последовательности PD40-повторы, ответственные за бета-пропеллерную конформацию белка. Кроме того, аналогично AA1 имеют последовательность, гомологичную дипептидилпептидазе 4 типа. Для белкового продукта гена *At4g01870* было показано свойство связывать АБК и РНК.

Для определения роли *AA1*-подобных генов в клетке необходимо проанализировать характер и особенности их экспрессии. Был проведен анализ предположительных промоторных областей трех генов гомологов и выявлено наличие потенциальных регуляторных мотивов. Для их поиска использовались такие онлайн ресурсы как PLACE и Athena. По результатам биоинформатического анализа промоторных зон составлены карты расположения потенциальных регуляторных мотивов. Среди них присутствуют регуляторные последовательности ABRE, для которых показана АБК-зависимость, а также выявлены зоны, с которыми могут взаимодействовать транскрипционные факторы семейств MYB, MYC и WRKY, которые вовлечены в ответы на АБК и стрессы. Для дальнейшего функционального анализа был выбран промотор гена *At4g01870*. Такой выбор обусловлен наличием в последовательности этого промотора всех обозначенных АБК-зависимых мотивов, а также тем, что в лаборатории ранее велось исследование белкового продукта этого гена.

Для изучения регуляции гена *At4g01870* использовался метод промоторного анализа. Были амплифицированы предположительно полноразмерный промотор (399 п.н.), а также, с учетом расположения цис-элементов, получены 5'-делеционные фрагменты промотора длиной соответственно 313 п.н., 212 п.н. и 118 п.н. На основе амплифицированных участков созданы векторные конструкции для агробактериальной трансформации растений. Конструкции несут репортерный ген *gusA*, находящийся под контролем промотора *At4g01870* и его фрагментов. Созданные векторные конструкции первоначально были использованы для проведения трэнзиентной трансформации растений *A. thaliana*. Флюориметрическое определение активности GUS показало снижение уровня флуоресценции образцов в результате делеций, с частичным восстановлением на варианте с фрагментом в 212 п.н. Это может говорить о том, что в удаленной части с мотивами MYB и W-box находится сайт узнавания негативным регулятором. Таким регулятором может являться *транс*-фактор семейства WRKY. Далее методом агробактериальной трансформации цветonoсов получены стабильные трансформанты растений *A. thaliana*. Среди трансформантов, несущих полноразмерную версию промотора *At4g01870*, отобраны растения, обладающие наиболее высокой активностью репортерного гена *gusA*. Гистохимическое окрашивание целых растений и их частей с использованием реактива Xgluc выявило специфику работы изучаемого промотора. Реакция β-глюкуронидазы с субстратом была наиболее ярко выражена в проводящих тканях корня, листьев и чашелистиков. Это позволяет нам предположить, что экспрессия гена *At4g01870* также происходит именно в этих тканях. Гистохимическое окрашивание трансформантов, несущих делеционные варианты промотора длиной 313 и 212 п.н., не выявило активности репортерного гена ни в одном из отобранных растений. Эти данные также подтверждаются флюориметрическим определением активности GUS.

Это может говорить о том, что делеция фрагмента промотора, содержащего цис-элементы MYB и MYC, ведет к потере активности промотора.

Учитывая характер изменения экспрессии *AAL* в ответ на АБК, цитокинин, повышенный уровень соли и холодовой стресс было решено проанализировать работу промотора его гомолога *At4g01870* в сходных условиях. Трансгенные растения, несущие полноразмерный вариант промотора (399 п.н.) экспонировались в течение 24 часов на чашках Петри с водой, содержащих соответственно абсцизовую кислоту (5×10^{-5} М), БАП (5×10^{-6} М), NaCl (200 мМ). Кроме того был проанализирован ответ на влияние низкой температуры (+4°C), а также дополнительного абиотического стресса – теплового, выраженного в экспонировании растений при +38°C. Абиотическим стрессам растения подвергались в течение 5 часов, перед которыми 19 часов растения находились в контрольных условиях на чашках Петри с водой. В результате гистохимического окрашивания была выявлена активация промотора, специфичная для замыкающих клеток устьиц листовых пластинок и черешков. Данная активация не наблюдалась в единственном варианте – при экспонировании на повышенном уровне соли. Контрольные растения также не проявляли данного признака.

В результате проведенного анализа биоинформатически определены промоторы генов гомологов *AAL* в *A. thaliana*. Созданы трансгенные растения, несущие репортерный ген *gusA* под контролем различных вариантов промотора гена *At4g01870*. Показана тканеспецифичность работы гена *At4g01870* на примере его полноразмерного промотора. Выявлено, что 5` делеции промотора приводят к полному замолчанию репортерного гена. Обнаружена специфичная активация работы репортерного гена, находящегося под управлением полноразмерного промотора, в замыкающих клетках устьиц в ответ на обработку абсцизовой кислотой, БАП, экспонировании при повышенных и пониженных температурах.

ПРОМОТОРЫ pro-SmAMP1 И pro-SmAMP2 ИЗ РАСТЕНИЯ *STELLARIA MEDIA*, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ЭКСПРЕССИЮ СЕЛЕКТИВНОГО ГЕНА, ПОЗВОЛЯЮТ ПОЛУЧАТЬ ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ТАБАКА

Снычёва О.А., Комахин Р.А.

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42
E-mail: recombination@iab.ac.ru**

В генетических конструкциях для трансформации растений в качестве промотора селективных генов часто используется конститутивный вирусный промотор CaMV35S, созданный на основе промоторной области гена белка оболочки 35S вируса мозаики цветной капусты CaMV [1]. Однако этот промотор не может полностью обеспечить потребность генетической инженерии растений в сильных промоторах, поскольку обладает некоторыми недостатками [2]. Кроме того, использование вирусного промотора для генетической модификации растений является нецелесообразным с точки зрения экологической безопасности. Поэтому поиск новых промоторов генов растений, которые могут быть использованы для контроля селективных генов при получении трансгенных растений является актуальной задачей современных исследований.

Ранее было установлено, что коровые промоторы генов антимикробных пептидов *proSmAMP1* и *proSmAMP2* из дикорастущего растения мокрицы (*S. media*) могут быть

использованы для экспрессии целевых генов в ряду последовательных поколений трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum*) [3]. Однако было не ясно, можно ли использовать эти промоторы для экспрессии селективных генов, которые обеспечивают устойчивость трансформированных клеток растений к различным селективным агентам и позволят проводить их отбор.

Чтобы выяснить это, на основе растительных экспрессионных векторов pCambia2300 были созданы генетические конструкции, в которых ген неомицинофосфотрансферазы II (*nptII*), придающий клеткам растений устойчивость к антибиотику канамицину, находится под контролем делеционного варианта 481 п.н. промотора *pro-SmAMP1* или делеционного варианта 495 п.н. промотора *pro-SmAMP2*. В качестве сравнительного контроля была использована плаزمиды pCambia2300 с геном *nptII* под контролем вирусного промотора CaMV35S. С использованием каждой генетической конструкции была выполнена агробактериальная трансформация 60 эксплантов растений табака на двух средах с различными концентрациями антибиотика и оценена эффективность регенерации трансформантов в течение трех месяцев (табл. 1).

Таблица 1. Эффективность регенерации побегов табака на средах с различными концентрациями канамицина.

Генетическая конструкция	Среда с канамицином в концентрации, мг/л					
	100			350		
	Побегов, шт.			Побегов, шт.		
	Всего	На эксплант	Укоренившихся на эксплант	Всего	На эксплант	Укоренившихся на эксплант
С промотором CaMV35S	223	3,7±0,2	1,2±0,2	167	2,8±0,2	0,4±0,1
С промотором <i>proSmAMP2</i>	207	3,5±0,2	1,0±0,2	134	2,2±0,3	0,3±0,1
С промотором <i>proSmAMP1</i>	207	3,5±0,3	1,1±0,2	67	1,1±0,2*	0,1*

* - существенные отличия от контроля при 5% уровне значимости.

Установлено, что на среде с концентрацией канамицина 100 мг/л эффективность регенерации трансформантов в зависимости от использованного промотора не различается и позволяет получать за три месяца не менее 1 устойчивого к канамицину регенранта с одного экспланта. Одновременно на среде с концентрацией канамицина 350 мг/л эффективность регенерации трансформантов с использованием промотора *proSmAMP1* была в 3-4 раза ниже, чем при использовании промотора *proSmAMP2* или вирусного промотора CaMV35S.

Молекулярно-биологический анализ всех устойчивых к канамицину регенрантов табака показал, что практически все растения содержат последовательность соответствующего промотора и гена *nptII*, т.е. являются первичными трансформантами T₀. Работа продолжается.

Литература:

1. Odell J.T., Nagy F. and Chua N.H. (1985) Nature, 313, 810-812.
2. Potenza, C., Aleman, L., Sengupta-Gopalan, C., 2004. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 40, 1–22.
3. Высоцкий Д.А., Стрельникова С.Р., Ефремова Л.Н., Ветчинкина Е.М., Бабаков А.В., Комахин Р.А. Структурно-функциональный анализ нового растительного промотора *pro-SmAMP1* из *Stellaria media* // Физиология растений, 2016. Принята к печати.

В нашем исследовании предпринята попытка проанализировать филогению рода *Ophiorrhiza* по данным последовательностей ядерного внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомального оперона (ITS).

Материалом для исследования послужили высушенные образцы листьев собранные И.А. Шанцером и др. в разные годы на территории Таиланда, а также образцы *Ophiorrhiza* из Таиланда, Китая и других стран из гербариев L, AAU, VKF и QBG.

ДНК выделяли СТАВ методом [6]. Амплификация секвенирование последовательностей ITS проводилась с использованием праймеров NNC18s10 и C26A [7]. В окончательное выравнивание вошли 123 образца. Автоматическое выравнивание последовательностей проводили в программе MAFFT с последующим выравниванием вручную в программе BioEdit.

На основании полученного выравнивания были построены филогенетические деревья методами Neighbour Joining в программе SplitsTree4, максимального правдоподобия в программе TreeFinder и максимальной экономии в программе TNT. Полученные деревья имели сходную топологию.

На рис. 1 показано дерево, построенное методом максимального правдоподобия. Образцы из Китая разделились на 3 группы. Первая генетически ближе к *Ophiorrhiza hayatana* (о. Тайвань) (клада А), вторая *O. sp* обособлена (клада D), третья ближе к *O. pseudofasciculata* (клада D). Образцы *O. cf. ridleyana* оказались разделены и помещены в кладу В: все образцы собраны на одной территории (пров. Мае Хонг Сон на западе Таиланда) и кладу D (пров. Чианграй на севере Таиланда). В отдельную кладу сгруппированы *O. kuroiwai* (Япония).

Клада D содержит образцы: *O. trichocarpon*, *O. pseudofasciculata*, *O. pedunculata*. Также видно, что *O. villosa* и *O. floresiana* (Малазия) сродны к *O. trichocarpon* и *O. pedunculata*. Образцы *O. Trichocarpon* разделились на две подклады (96) и (93) и имеют одинаковую длину ветвей. Образцы при этом собраны в одной точке сбора (пров. Мэхонгсон на с-з Таиланда). *O. pedunculata* находится в нескольких подкладах при низкой бутстреп поддержке (менее 80).

С высокой степенью поддержки обособилась клада С, в которую вошли образцы из отдаленных друг от друга провинций Таиланда (пров. Канчанабури на западе и пров. Наративат на юге на границе с Малайзией).

Литература:

1. Darwin PS. The pacific species of *Ophiorrhiza* L. (Rubiaceae). *Lyonia* 1976; 1: 47–102
2. Lo, H.-S. 1990. Taxonomic revision of the Chinese species of *Ophiorrhiza* (Rubiaceae). *Bulletin of Botanical Research North-Eastern Forestry Institute* 10(2): 1–82
3. Deb, D.B. & Mondal, D.C. 1997, publ. 2001. Taxonomic revision of the genus *Ophiorrhiza* L. (Rubiaceae) in Indian subcontinent. *Bulletin of the Botanical Survey India* 39(1–4):1–148
4. Martin KP, Zhang CL, Hembrom ME, Slater A, Madassery J. Adventitious root induction in *Ophiorrhiza prostrata*: a tool for the production of camptothecin (an anticancer drug) and rapid propagation. *Plant Biotechnol Rep* 2008; 2: 163–169
5. Krishnakumar G at al., Estimation of camptothecin and pharmacological evaluation of *Ophiorrhiza prostrata* D. Don and *Ophiorrhiza mungos* L., *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*(2012)S727-S731
6. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15, 1987.
7. Mort at al. Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci *American Journal of Botany* 94(2): 173–183. 2007.

ПРОМОТОР *pro-SmAMP2* ИЗ РАСТЕНИЯ *STELLARIA MEDIA* СОХРАНЯЕТ ВЫСОКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ПОКОЛЕНИЯХ T₁-T₃ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM*

Казакова К.А., Комахин Р.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42
E-mail: recombination@iab.ac.ru

Ранее практически все трансгенные растения содержали два рекомбинантных гена, один из которых находился под контролем конститутивного промотора и использовался для селективного отбора трансформированных клеток, а другой «целевой» ген - под контролем промотора любого типа был предназначен для изменения фенотипа растения. В настоящее время возможности мультигенной трансформации делают доступными импорт в растения целых метаболических путей, поэтому поиск и изучение новых промоторов для генетической инженерии растений является актуальной задачей современных исследований.

Ранее во ФГБНУ ВНИИСБ из растения звездчатки (*S. media*) был клонирован новый промотор гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* [1]. Этот промотор в трансформантах табака поколения T₀ был сопоставим или превосходил по эффективности известный вирусный промотор CaMV35S. Однако не были охарактеризованы свойства промотора *pro-SmAMP2* в поколениях трансгенных растений табака, в том числе при различных условиях освещения.

Для ответа на этот вопрос были получены трансгенные растения табака поколений T₁-T₃, экспрессирующие репортерный ген *gus* под контролем самого длинного -2160 п.н. и самого короткого -495 п.н. делеционных вариантов промотора *pro-SmAMP2*. Установлено, что высокая активность GUS сохранилась у трансгенных растений всех поколений при использовании обоих делеционных вариантов промотора *pro-SmAMP2*. Уровень активности GUS при использовании короткого делеционного варианта промотора был примерно в два раза выше, чем при использовании длинного делеционного варианта этого же промотора. Короткий делеционный вариант промотора *pro-SmAMP2* в поколениях трансгенных растений табака также был существенно более эффективным, чем вирусный промотор CaMV35S (в сравнении с данными научной литературы). Для получения трансгенных растений предпочтительнее использовать генетические конструкции с коротким делеционным вариантом промотора *pro-SmAMP2*, показавшим наилучшие результаты при меньших размерах нуклеотидной последовательности. Промотор *pro-SmAMP2* может быть использован для экспрессии целевых генов в поколениях трансгенных растений, содержащих инсерции T-ДНК в качестве аллелей. Среди гомозиготных трансгенных растений поколения T₃ с обоими делеционными вариантами промотора *pro-SmAMP2* не было существенных различий в уровнях активности GUS в зависимости от длины дня. Максимальный уровень активности GUS в листьях трансгенных растений табака поколения T₃ с обоими делеционными вариантами промотора *pro-SmAMP2* был отмечен с 60 по 80 день с момента прорастания семян.

Литература:

1. Шукуров Р.Р. Антимикробные пептиды сорного растения *Stellaria media* и их гены: экспрессия и устойчивость к фитопатогенным грибам // Автореф. канд. дисс. 2011 - Москва, 24 с.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА P17 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Мима К.А., Бурмакина Г.С., Латыпов О.Р., Иматдинов А.Р., Титов И.А.,
Малоголовкин А.С.

*Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии - ГНУ ВНИИВВиМ, Владимирская область, Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр., 1601125
E-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru*

Африканская чума свиней является особо опасной болезнью свиней, вызывающей смертность близкую к 100%. Заболевание может протекать в острой и хронической формах. Наибольшую опасность имеет хроническая форма болезни, так как при ней у инфицированных животных отсутствуют клинические признаки заболевания, но животное является носителем вируса. АЧС приносит большой экономический ущерб странам, в которых регистрируется. На сегодняшний день все попытки получить эффективную вакцину против африканской чумы свиней остаются безуспешными, поэтому своевременная диагностика АЧС имеет важное значение для предотвращения ее распространения.

Вирус АЧС кодирует несколько структурных белков, которые образуют основную массу вириона и являются иммуногенными. Одним из таких белков является белок P17, кодируемый геном D117L. Этот белок является шапероном и необходим для сборки вирусного капсида.

Целью работы являлось получение рекомбинантного белка P17 в прокариотической и эукариотической системах для дальнейшего использования в иммунологических реакциях.

В работе использовали праймеры на полноразмерный ген и на растворимый эпитоп (позиции праймеров 1-354, 175-354 соответственно) с сайтами рестрикции BamHI -AgeI и NcoI - XhoI соответственно. В качестве векторов было решено использовать вектор pEGFP-N1 с цитомегаловирусным промотором и маркерным белком GFP и pET32a, несущий в себе нуклеотидную последовательность тиоредоксина и His последовательности на С- и N- концах экспрессируемого белка. Для клонирования в эукариотическую систему экспрессии использовали дополнительный клонировочный вектор pGEM-T-easy, в который клонировали по T/A-концам. Затем при помощи специфических рестриктаз ген реклонировали в экспрессирующий вектор (pGFP-N1 или pET-32a). Для клонирования в прокариотическую систему экспрессии обрабатывали рестриктазами ПЦР- продукт и далее по специфическим сайтам рестрикции клонировали в экспрессирующий вектор.

Рекомбинантную плазмиду pEGFP_p17 доставляли в клетки COS-1 при помощи липофектамина (4 μ l на 2,5 μ l плазмидной ДНК). В то время как трансформацию бактериальных клеток рекомбинантной плазмидой p17C-thioredoxin проводили тепловым шоком (42 С – 90 сек). Наличие специфической вставки было подтверждено постановкой ПЦР, рестрикционным анализом и секвенированием нуклеотидной последовательности плазмиды со специфическими олигонуклеотидными праймерами

Анализ экспрессии рекомбинантных белков в COS-I проводили по репортерной флюоресценции GFP и при помощи иммуноблотинга с моноклональными антителами против белка GFP, а также сывороток от иммунизированных против АЧС животных. Экспрессию в бактериальных клетках подтверждали белковым электрофорезом, с последующим окрашиванием гелей Coomassie Brilliant Blue R-250 и иммуноблотом с моноклональными антителами к His-тагам и поликлональной сывороткой от животных

зараженных вирусом АЧС.. Хроматографическую очистку целевого белка из бактериального клеточного лизата проводили при помощи аффинной хроматографии с Ni-сефарозой.

Репортерную флюоресценцию p17-GFP наблюдали в цитоплазме трансфецированных клеток COS-I на протяжении 96 часов. Наибольший уровень экспрессии в бактериальной культуре Rosetta 2 наблюдали при использовании 0,1 мМ IPTG и инкубировании при 28° С.

По результатам иммуноблота с лизатом клеток COS-I, трансфецированных pEGFP_p17 и EGFP антителами отмечали наличие двух полос. Одна соответствует молекулярной массе белка EGFP (27 kDa), а другая (80 kDa). Молекулярная масса 80 kDa не соответствует предполагаемой массе химерного белка p17-GFP, и превышает ее в два раза. Данные результаты могут говорить о пострансляционных модификациях белка или формировании димеров, за счет образования дисульфидных связей между белками.

Результаты иммуноблота с очищенным рекомбинантным белком p17C-thioredoxin соответствуют ожидаемым. Молекулярная масса белка составляет 24 kDa и специфически взаимодействует с поликлональной сывороткой от иммунизированных вирусом АЧС свиней.

Таким образом, нами получен рекомбинантный полноразмерный белок p17 вируса АЧС в эукариотической системе экспрессии и растворимый эпитоп белка p17 в прокариотической системе экспрессии. Рекомбинантный белок P17-EGFP может быть использован для изучения белок-белковых взаимодействий в инфицированных вирусом АЧС клетках. Тогда как P17C-thioredoxin пригоден для использования в иммунологических реакциях и диагностических реакциях для выявления антител к вирусу АЧС.

ДЕЛЕЦИОННЫЕ ВАРИАНТЫ -1469 И -2550 П.Н. ПРОМОТОРА pro-SmAMP1 ИЗ РАСТЕНИЯ *STELLARIA MEDIA* АКТИВНЫ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

Маджарова Н.В., Комахин Р.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42
E-mail: recombination@iab.ac.ru

Выяснение взаимосвязи между первичной структурой нуклеотидной последовательности промоторной области и ее транскрипционными свойствами является актуальной задачей современных фундаментальных исследований в области биологии растительной клетки. Кроме этого, новые промоторы генов растений с сильной и индуцибельной транскрипционной активностью в различных видах растений приоритетны для использования в биотехнологии и генетической инженерии.

Ранее было установлено, что в растениях мокрицы *Stellaria media* экспрессия гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP1* находится на высоком уровне и дополнительно возрастает от 10 до 70 раз при контакте *S. media* с элиситором метилжасмонатом или с патогенными грибами [1]. Промотор гена *pro-SmAMP1* был клонирован и было показано, что его делеционные варианты до -1235 п.н. (относительно сайта инициации трансляции ATG) в поколениях T₀-T₂ трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum*) по эффективности от 3 до 5 раз превосходят вирусный промотор CaMV35S [2]. Однако эксперименты показали отсутствие индуцибельности у всех делеционных вариантов

промотора pro-SmAMP1 в трансгенных растениях табака при их обработке как метилжасмонатом, так и фитопатогенными грибами. С целью поиска участков промотора pro-SmAMP1 отвечающих за его индуцибельность в лаборатории клеточной инженерии растений ФГБНУ ВНИИСБ были получены еще два делеционных варианта -1469 и -2550 п.н. промотора pro-SmAMP1, содержащих дополнительные потенциальные cis-действующие элементы. Эти делеционные варианты были использованы для получения генетических конструкций в составе плазмиды pCambia1381Z, где они контролировали экспрессию репортерного гена *gus*.

Цель исследований состояла в том, чтобы с использованием новых генетических конструкций получить трансгенные растения табака нескольких поколений и изучить транскрипционные свойства делеционных вариантов -1469 и -2550 п.н. промотора pro-SmAMP1 при обработке растений метилжасмонатом и фитопатогенными грибами.

Методом агробактериальной трансформации растений табака с использованием каждой из генетических конструкций было получено более 30 независимых регенерантов, устойчивых к селективному агенту гигромицину в концентрации 50 мг/л. Из их числа было отобрано не менее 20 трансгенных растений поколения T₀, экспрессирующих репортерный ген *gus* под контролем делеционных вариантов -1469 и -2550 п.н. промотора pro-SmAMP1.

Установлено, что в асептических условиях уровни активности GUS в листьях трансгенных растений табака T₀ с делеционными вариантами -1469 и -2550 п.н. промотора pro-SmAMP1 не различались между собой и не отличались от контроля - трансгенных растений табака с геном *gus* под контролем вирусного промотора CaMV35S (рис. 1).

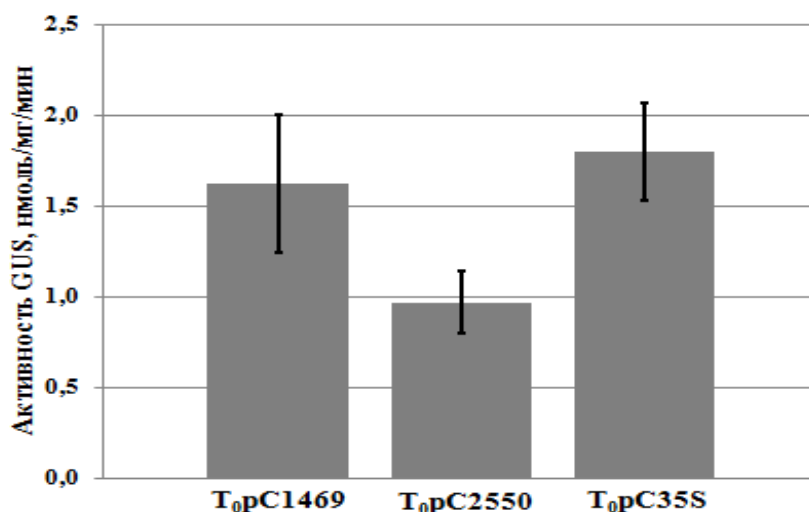


Рис. 1. Уровни активности GUS в листьях асептических трансгенных растений табака с разными промоторами.

В теплице уровни активности GUS в листьях трансгенных растений табака с обоими делеционными вариантами -1469 и -2550 п.н. промотора pro-SmAMP1 были сопоставимы между собой и с ранее полученными результатами у их более коротких вариантов [2] и также в 2-3 раза превосходили эффективность промотора CaMV35S.

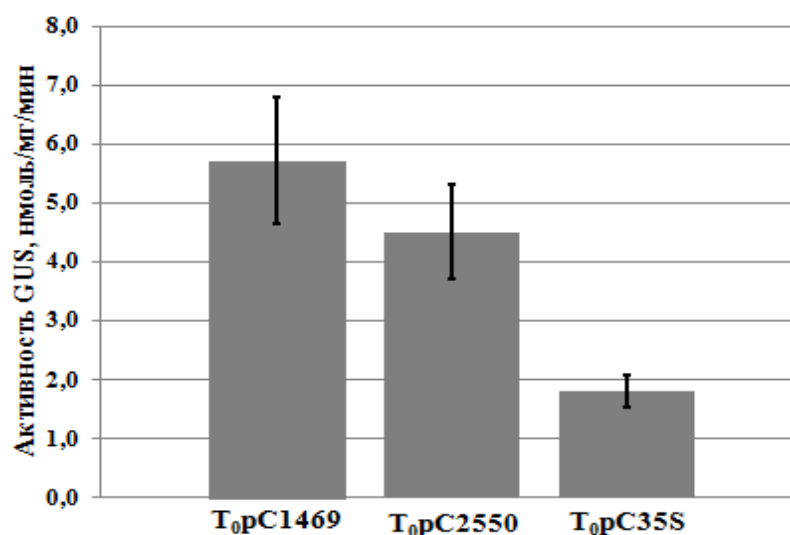


Рис. 2. Уровни активности GUS в листьях трансгенных растений табака в условиях теплицы.

С целью проверки индуцибельности делеционных вариантов -1469 и -2550 п.н. промотора *pro-SmAMP1* был проведен эксперимент по обработке асептических трансгенных растений табака элиситором метилжасмонатом. Измерения активности GUS в листьях трансгенных растений до и после обработки не выявили изменения его уровня. Исследования продолжаются.

Литература:

1. Shukurov R.R., Voblikova V.D., Nikonorova A.K. et al. Transformation of tobacco and *Arabidopsis* plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens // *Transgenic Res.* 2012. Apr. Vol. 21. № 2. P. 313-25.
2. Высоцкий Д.А., Стрельникова С.Р., Ефремова Л.Н., Ветчинкина Е.М., Бабаков А.В., Комахин Р.А. Структурно-функциональный анализ нового растительного промотора *pro-SmAMP1* из *Stellaria media* // *Физиология растений*, 2016. Принята к печати.

НОВЫЕ БИОЦИДНЫЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧЕРНОЙ НОЖКИ *DICKEYA SOLANI*

Яремко А.Б., Мазурин Е.С.

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42
E-mail: n-a-s-t-e-n-a94@inbox.ru**

Хорошо известно, что эффективным профилактическим санитарно-эпидемическим средством, направленным на инактивацию микроорганизмов в питьевой воде, воздухе и на поверхности помещений является ультрафиолетовое (УФ) излучение [1].

В современных бактерицидных установках, в качестве источников УФ-излучения используют ртутные лампы низкого давления. Такие лампы имеют ряд серьезных недостатков (эффективность ламп реализуется в узком диапазоне, селективность испускаемого УФ-излучения, а также ряд эксплуатационных недостатков) [2]. Новые биоцидные УФ-технологии основанные на использовании, в отличие от традиционных,

высокоинтенсивного импульсного УФ-излучения сплошного спектра решают эти проблемы [3-4]. Спектр излучения таких ламп сплошной и по характеру близок к спектру солнечного излучения.

Данный источник излучения уже нашел своё применение в импульсной дезинфекции и дезодорации воздуха и УФ-обработки поверхностей.

В настоящее время актуальной проблемой является отсутствие эффективных способов защиты картофеля от возбудителей черной ножки.

Воздействие на патоген при работе установок происходит за счет облучения поверхностей ультрафиолетовым излучением. В качестве источников излучения использовались ртутная лампа низкого давления и импульсная ксеноновая лампа. Импульсной обработке подвергались ломтики картофеля зараженные возбудителем черной ножки и культура возбудителя в чистом виде.

Результаты на искусственно инокулированных ломтиках картофеля показали эффективность импульсного облучения в дозе 20, 1205, 3614 и 9637 кДж/см² (учитывался диаметр мацерированной ткани). В опыте с чистой культурой возбудителя подсчитывали количество колоний на чашку Петри. При сравнении результатов эффективности облучения без обработки и с обработкой наблюдали мощный бактерицидный эффект в дозе 30 и 300 мДж/см².

Литература:

1. Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях. Руководство Р 3.1.683-98. Минздрав России. 1997// Светотехника. 1998. №4.

2. А.С. Камруков, Н.П. Козлов, С.Г. Шашковский, М.С. Яловик. Новые биоцидные ультрафиолетовые технологии и аппараты для санитарии, микробиологии и медицины // Безопасность жизнедеятельности. - 2003. №1.С. 32-40.

3. Камруков А.С., Овчинников П.А., Опекан А.Г., Протасов Ю.С. Экспериментальное исследование радиационно-плазмодинамических устройств лабораторного и промышленного назначения / Радиационная плазмодинамика / Под ред. Ю.С. Протасова. М.: Энергоатомиздат. 1999. Т. 1. С. 552-573.

4. Камруков А.С., Шашковский С.Г., Короп Е.Д. и др. Способ дезинфекции и стерилизации открытых поверхностей объектов, жидкости и воздуха. Патент РФ № 2001629. 1993. Приоритет от 28.06.1991 г.

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ МИКРОКЛУБНЕЙ НА РАСТЕНИЯХ СОРТА НЕВСКИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Гизатуллина А.Т., Сташевски З.

ФГБНУ «Татарский научно исследовательский институт сельского хозяйства», отдел сельскохозяйственной биотехнологии, 420059,

г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 48

E-mail: gizatyllina.a@mail.ru

Актуальной задачей оригинального семеноводства является оптимизация процесса выращивания миниклубней, с целью сокращения трудовых, материальных затрат и повышения эффективности производства. Общепринятая рассадная технология производства миниклубней имеет ряд ограничений, связанных с трудоемкостью и наличием дорогостоящей материально-технической базы (Индустрия картофеля, 2013).

Использование микроклубней, по сравнению с рассадным способом имеет ряд преимуществ: значительное повышение коэффициента размножения, круглогодичное выращивание и простые условия хранения и транспортировки микроклубней. Необходимость подбора для каждого сорта индивидуальных условий получения клубней в асептической культуре *in vitro* сдерживает массовое использование данного биотехнологического подхода в оригинальном семеноводстве картофеля (Dobrąnszki et al., 2008).

Целью нашего исследования являлась оценка влияния фотопериода и состава питательной среды на массу микроклубней сорта Невский в асептических условиях *in vitro*.

Эксперимент проводили на наиболее распространенном в РФ сорте картофеля Невский. Микрорастения получены из рабочей коллекции ОСХБ ТатНИИСХ г. Казань. Для получения микроклубней растения выращивали на питательной среде Мурасиге и Скуга с повышенной концентрацией сахарозы (8%) и добавлением разных концентраций фитогормонов (Murashige et al., 1962). Перед началом индукции клубнеобразования, микрорастения в течение 10 дней подращивали в условиях длинного светового фотопериода (16/8 ч), с целью создания благоприятного уровня энергетического развития листа и стебля. Далее микрорастения делили на две равные группы и инкубировали при коротком фотопериоде (8/16 ч) и в темноте (0/24 ч). Оценивали влияние концентрации фитогормонов: кинетина (KIN) (1; 1,75; 2,5 мг/л), бензоаминопурина (BAP) (1; 3; 5; 8 мг/л) и фотопериода (8/16 ч и 0/24 ч) на массу получаемых микроклубней. Контролем служили микрорастения, высаженные на питательной среде Мурасиге и Скуга с повышенной концентрацией сахарозы (8%).

В результате эксперимента показано влияние продолжительности фотопериода на массу образовавшихся микроклубней (рис. 1). Масса микроклубней, сформировавшихся в условиях короткого дня (8/16 ч) на фитогормон-содержащих питательных средах, была до 1,5 раза больше, чем в аналогичных вариантах в условиях отсутствия освещения и по сравнению с контролем. Повышение массы микроклубней показано при трех концентрациях BAP (1; 3; 8 мг/л) и двух концентрациях KIN (1; 2,5 мг/л). В контрольном варианте, на безгормональной питательной среде влияние фотопериода на массу микроклубней не обнаружено. Масса клубней, полученных в условиях короткого дня (8/16 ч) и в темноте (0/24 ч.), была на одном уровне и составила соответственно 84 мг и 88 мг.

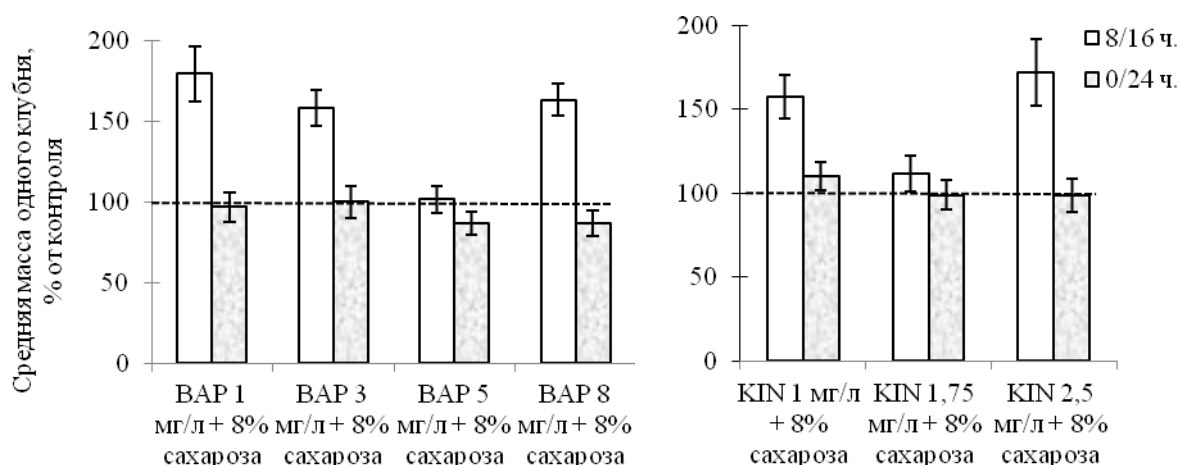


Рис. 1. Изучение влияние концентрации фитогормонов и фоторпериода на среднюю массу микроклубней сорта Невский. За 100% принята средняя масса клубня на питательной среде Мурасиге и Скуга с повышенной концентрацией сахарозы (8%) без добавления фитогормонов.

Максимальный размер микроклубней сорта Невский был получен при инкубации асептических микрорастений *in vitro* в условиях короткого дня (8/16 ч) на питательных средах, содержащих 1 мг/л ВАР и 2,5 мг/л КИН. Средняя масса клубней составила соответственно 150±17,4 мг и 144±20,1 мг.

Литература:

1. Индустрия картофеля. Справочник / Е. Симаков, В. Старовойтов, Б. Анисимов и др. — НПФ АгроНИР г. Москва, 2013. — С. 272.
2. Dobránszki, J. In vitro tuberization in Hormone – Free Systems on solidified medium and dormancy of potato microtubers / J. Dobránszki, K. Magyar-Tabori, I. Hudak // Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. – 2008. – P. 83-91.
3. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.

ПЦР-АНАЛИЗ СОРТОТИПОВ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS L.*) ДЛЯ ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Федорин Д.Н., Федулова Т.П.

***ФГБНУ «Всероссийский научно – исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», 396030, Воронежская область, Рамонский район,
п. ВНИИСС, д.86***

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Одним из наиболее важных аспектов практической генетики и селекции является четкая характеристика генетического материала. Различные сорта и гибриды растений, созданные в процессе селекции, сочетают в своём генотипе уникальные комбинации генов, обеспечивающих адаптацию к условиям жизни и необходимый уровень развития хозяйственно ценных признаков, особенности набора генов, и, следовательно, фрагментов ДНК, представляющие «генетический паспорт» сорта. Необходимым является создание надежной системы молекулярно-генетических маркеров, выявляющих и отражающих эти особенности. Маркерные системы, основанные на полиморфизме фрагментов ДНК, соответствуют этим требованиям (Бальвинская и др., 2003).

Цель работы - выявление полиморфизма RAPD-маркеров, характеризующих генетическую изменчивость селекционных материалов свёклы рода *Beta*.

В качестве материалов для исследований были использованы проростки следующих разновидностей корнеплодной свёклы: кормовой красной и белой свёклы; мужскостерильные образцы сахарной свёклы; гибридные комбинации с их участием; гибриды иностранной селекции, предоставленные д. с.- х. н. Богомоловым М.А. и д.с.-х. н. Ошевневым В.П. Для выявления генетической структуры родительских форм сахарной, кормовой свёклы и их гибридов использовали RAPD-праймеры: OP-AN9: 5'-GGGGGAGATG-3'; OP-09: 5'-TCGGTCATAG-3'; AB1-4: 5'-GGACTGGAGT-3'; AB2-2: 5'-TGCCGGCTTC-3'; AB3-3: 5'-TCTCCGCTTG-3'; AB6-15: 5'-AGTCGCCCTT-3'; AB9-3: 5'-AGCCAGGCTG-3'; UBC278: 5'-GACAACAGGA-3' (Nouhi, 2008; Amiri, 2009).

В результате ПЦР - анализа геномных ДНК родительских форм свёклы (МС – растений сахарной свёклы, кормовой свёклы и гибридов с их участием) с одноцепочечным RAPD – праймером AB-2-2 выявлена следующая закономерность: в растениях многосемянного кормового опылителя присутствуют характерные ПЦР-продукты с длинами 500 и 1000 п.н. Эти фрагменты довольно хорошо наследуются, т.к.

имеются в гибридах. В Рамонских стерильных формах (РС) данные аллели не обнаружены. Возможно, это может быть специфическим признаком для опылителя – кормовой белой свёклы и одним из тест-признаков при её идентификации. У гибрида иностранной селекции Портланд имеется характерный продукт 500 п.н., а также специфические аллели (800 п.н.) у гибрида Витязь и МС – формы МС 94 Ар. В гибриде МС 94 Ар х кормовая красная доминирует ДНК кормовой красной свеклы. По праймеру ОР-AN9 практически все образцы имеют единообразие выявленных ДНК-ампликонов длиной около 1000 п.н. Установлено только отличие в гибриде РС1119 х Оп (кормовая белая), в котором не обнаружено ни одного аллеля. По локусу АВ1-4 показан сходный набор ампликонов 500, 700, 1000 п.н. у образцов РС 1119 и РС 8, что может являться одним из тест - признаков при идентификации данных стерильных форм. Аллель в 500 п.н. характерен для генотипов: РС 8 х Оп, РС1119 х Оп и РС 1119 х РФ 1119. Селекционные материалы РС 1119 х Оп и Оп не имеют ни одного ПЦР - продукта по данному локусу. В ходе гибридизации не выявлено строгой закономерности передачи данного признака, но можно отметить, что наследуется только вариант длиной 500 п.н. Максимальный набор продуктов амплификации - 500, 700, 800 п.н. установлен у гибрида иностранного происхождения Портланд, и полное отсутствие фрагментов ДНК у гибрида Муррей. Все остальные образцы имеют по одному проявлению данного признака (длина 500 п.н.). По праймеру АВ3-3 отмечено, что максимальный набор продуктов амплификации наблюдается у образца кормовой белой свёклы Оп (600 и 800 п.н.). Данный признак не является доминирующим при передаче потомству при гибридизации (не у всех гибридов он проявляется). При передаче в образце РС 1119 х Оп проявляется только ампликон 800 п.н. Аналогичный продукт амплификации имеется и у образца РС 1119 х РФ 1119. В остальных номерах данный признак обнаружен только в гибриде Витязь (800 п.н.). По локусу ОР-09 в гибриде РС 8 х Оп и растениях кормовой белой свёклы (Оп) обнаружен одинаковый набор продуктов амплификации, что, вероятно, связано с передачей признака при гибридизации в неизменном состоянии. В образце, полученном при гибридизации стерильных растений сахарной свёклы с О-типом (РС 1119 х РФ 1119), обнаружено 2 ПЦР-продукта 600 и 800 п.н. Все остальные генотипы не имеют проявления этого признака в своем составе, что свидетельствует о глубоком генетическом отличии данных форм. В номерах МС 94 Ар и кормовой красной свёкле присутствуют ампликоны 300, 600 и 800 п.н. У всех остальных материалов данный признак не обнаружен. По праймеру АВ6-15 образцы: МС 94 Ар, кормовая красная, гибриды Витязь и Муррей имеют одинаковый набор ампликонов 400, 600, 700 и 1000 п.н. У всех номеров имеется общий аллель длиной 600 п.н. Обособленно выглядит образец Портланд, т.к. он имеет 2 продукта амплификации. Селекционные материалы лаборатории ЦМС имеют практически полное единообразие в ампликонах, при этом признак передается гибридам от опылителя без потерь. Однако, при гибридизации стерильной формы и опылителя сформировался новый вариант исследуемого признака длиной 1400 п.н. (возможно, это результат дупликации имеющегося ранее у опылителя ампликона длиной 700 п.н. По локусу АВ9-3 у гибрида МС 94 Ар х корм.красн. проявилась только одна полоса длиной 500 п.н., тогда как в опылителе - кормовой красной свёкле их 8 с длинами 200, 300, 500, 600, 700, 800, 900 и 1200 п.н. Показано, что при гибридизации у образцов с кормовой белой свёклой наблюдается редукция числа ампликонов (относительно опылителя). Отмечено, что у всех селекционных материалов имеется общий признак длиной 600 п.н. Вероятно, это маркерный компонент, т.к. он наследуется в 100% - ах случаях. Большинство амплифицированных фрагментов оказались полиморфными и выявляли различия между изученными генотипами. При этом значительная часть выявленных аллелей относится к редким. Число фрагментов, амплифицируемых одним праймером, варьирует от 1 (ОР - AN 9) до 8 (АВ 9-3), что свидетельствует о высоком уровне полиморфизма рассматриваемых RAPD - локусов. По локусу UVC278 выявлено, что при гибридизации происходит передача полного набора исследуемого признака опылителя –

кормовой белой свёклы, поскольку у всех гибридов присутствует полный набор ампликонов 600, 700, 1000 и 1200 п.н., характерных для опылителя. Общим для всех исследуемых образцов является ампликон в 1200 п.н. детекция исследуемого материала с использованием восьми RAPD-праймеров позволила выявить наличие внутривидового полиморфизма. Полученные данные могут быть использованы при планировании скрещиваний.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА ПРЕДАСТАВИТЕЛЕЙ РАЗНЫХ ВИДОВ СОРГО (*SORGHUM*) НА ОСНОВЕ МУЛЬТИЛОКУСНОЙ ПЦР

Шалаева Т.В., Анискина Ю.В., Шилов И.А.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42
E-mail: shalaeva.tv@mail.ru***

Благодаря засухоустойчивости и биоэнергетическому потенциалу сорго (*Sorghum*) представляет большой интерес для многопрофильного использования в сельскохозяйственном и промышленном производстве.

Для селекционного процесса сорго (*Sorghum*) необходима объективная информация об исходном материале. Внедрение методов генетического анализа позволит осуществлять контроль всех этапов селекции (оценка генетической подлинности, однородности и гибридности селекционных форм, решение правовых аспектов - надежное различение и идентификация сортов и гибридов сельскохозяйственных культур) и значительно ускорит селекционный процесс. Среди методов генетического анализа наиболее перспективным для различения и идентификации растительных форм является анализ полиморфизма длин микросателлитных локусов, с помощью которого можно получить индивидуальную характеристику каждого отдельного генотипа – ДНК-профиль [1].

Целью данной работы являлась разработка системы микросателлитного анализа представителей разных видов сорго (*Sorghum*) на основе мультилокусной ПЦР.

На первоначальном этапе для исследования полиморфизма видов сорго (*Sorghum*) по литературным данным было отобрано и проанализировано 28 микросателлитных локусов [2]. В результате проведенного исследования было отобрано 15 наиболее полиморфных микросателлитных локусов. Данные проведенного сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей исследуемых микросателлитных локусов позволили сделать вывод, что в большинстве случаев полиморфизм длин выявленных аллелей связан с различием в числе повторов. На основе результатов микросателлитного анализа были составлены уникальные генетические профили представителей 9 исследуемых видов сорго (*Sorghum*). В ходе работы было установлено, что для надежной идентификации растительных образцов сорго (*Sorghum*) необходимо использовать оптимальный набор микросателлитных локусов (не менее 15).

Для дальнейшего анализа расширенной коллекции представителей разных видов сорго (*Sorghum*) по 15-ти микросателлитным локусам возникла необходимость разработки системы мультиплексной ПЦР, позволяющей анализировать образец ДНК одновременно по нескольким микросателлитным локусам в одной ПЦР-пробе. Данный подход позволит значительно сократить материальные и временные затраты на проведение генетического анализа.

На основе отобранных микросателлитных локусов было разработано два варианта мультилокусных систем, состоящие из 7 и 8 локусов, для детекции ПЦР-продуктов посредством капиллярного электрофореза в автоматическом генетическом анализаторе «НАНОФОР-05». В процессе разработки мультилокусных систем были оптимизированы условия проведения одновременного ПЦР-анализа нескольких микросателлитных локусов: были синтезированы пары праймеров со специальными флуоресцентными красителями, подобраны оптимальные температуры одновременного отжига нескольких пар праймеров. Флуоресцентные красители были подобраны таким образом, чтобы диапазоны длин фрагментов микросателлитных локусов, детектируемых по одному каналу, не перекрывались. Разработанная система генотипирования на основе мультилокусной ПЦР позволяет определять длину выявленных фрагментов ДНК с точностью до одного нуклеотида и получать оцифрованные генетические паспорта представителей разных видов сорго (*Sorghum*).

Литература:

1. Шилов И.А. Применение технологии микросателлитного анализа ДНК в растениеводстве. // Проблемы агробиотехнологии; под ред. П.Н. Харченко. - М., 2012. - С. 140 - 162.
2. Kong L., Dong J., Hart G.E. Characteristics, linkage-map positions, and allelic differentiation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench DNA simple-sequence repeats (SSRs). // Theor. Appl. Genet. – 2000. V. 101. - P. 438–448.

ПОЛУЧЕНИЕ *IN VITRO* МИКРОКЛУБНЕЙ НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОНТЕЙНЕРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Колесова О.С., Овэс Е.В.

***ФГБНУ «Всероссийский НИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха»
140051, Московская обл., Люберецкий р-н, п. Красково-1, ул. Лорха 23
E-mail: e_oves@bk.ru***

Для обеспечения высоких урожаев клубней в семеноводстве картофеля одним из главных элементов технологического процесса является получение здорового исходного материала, свободного от вирусных и других инфекций. На первоначальном этапе ведения семеноводства компании производящие высокие классы семенного картофеля в большинстве случаев используют *in vitro* материал в виде микрорастений, реже – микроклубней. Не столь широкая распространенность микроклубней в качестве здорового исходного материала обусловлено технологией и календарными сроками их получения, а также размерными характеристиками, позволяющими отнести их к стандартной фракции.

Целью проводимых исследований являлось изучение количественного выхода и размерных характеристик *in vitro* микроклубней с применением контейнерной технологии.

В биотехнологической практике для получения *in vitro* микроклубней применяются различного состава жидкие или агаризованные питательные среды с использованием пробирок, колб разного диаметра, сосудов различной конструкции или биореакторов. При этом во всех сообщениях описан сходный процесс, включающий выращивание растений на свету из эксплантов (черенков с одной или несколькими почками) в течение 4-5 недель на питательной среде, содержащей 2-3 % сахарозы, индукцию клубнеобразования (в условиях темноты либо рассеянного света) с внесением в среду регуляторов роста и повышением содержания сахарозы до 6-9 % и выращивание микроклубней до стадии созревания в течение 5-8 недель.

У подавляющего большинства исследователей применение жидкой питательной среды для получения микроклубней *in vitro* предусматривает ее замену с целью регулирования направления развития растений *in vitro*.

Контейнер для получения *in vitro* микроклубней состоит из полипропиленового корпуса, в котором размещают специальный вкладыш. Крышка контейнера герметично закрывается и снабжена фильтрами для газообмена. Конструкция имеет специальную насадку, через которую производится обмен питательной среды без нарушения стерильности контейнера. Это позволяет на разных фазах роста и развития растений регулировать питательный режим и индуцировать образование столонов.

При закладке лабораторных опытов в качестве исследовательского биоматериала использовали стеблевые экспланты с одной пазушной почкой и листом, вычлененные из средней части 4-недельных микрорастений *in vitro* сортов картофеля различных групп спелости: Жуковский ранний, Удача, Метеор, (раннеспелые), Невский (среднеранний), Юбилей Жукова, Голубизна и Колобок (среднеспелые), Никулинский (среднепоздний).

Для получения микроклубней используют три состава жидких питательных сред с минеральной основой Мурасиге-Скуга. При прохождении каждой фазы роста и развития создаются специальные температурные и фоторежимы с использованием специальных климатических камер (инкубаторов).

Для сравнительной оценки влияния различных питательных сред на рост, развитие и *in vitro* микроклубнеобразование в контейнерах применяли модифицированную среду. Особенность изменения данного состава заключалась в добавлении в зависимости от варианта опыта регуляторов роста из классов цитокининов (кинетин) и/или ауксинов (ИУК).

Модификация питательной среды с добавлением ИУК в концентрации 1 мг/л и кинетина 0,04 мг/л способствовало увеличению коэффициента размножения растений в 1,5-2,2 раза. На сортах Жуковский ранний и Невский, характеризующиеся интенсивным клубнеобразованием было получено 2,2- 2,3 микроклубней. Сорта с низким уровнем инициации столонов как Удача, Голубизна и Метеор образовали от 1,2 до 2,2 микроклубней. Выход стандартной фракции зависел от сортовых особенностей и составил от 67 до 83%.

Общеизвестно, что скороспелость сорта не оказывает существенного влияния на формирование *in vitro* микроклубней. В каждой группе спелости имеются сорта, как с высокой, так и со средней и низкой способностью закладывать микроклубни *in vitro*. Определенной закономерности преобладания каких-либо признаков в зависимости от скороспелости сортов не отмечено и это, определяется биологическими особенностями сорта, а не хозяйственными признаками.

Для большинства изученных сортов оптимальной для клубнеобразования концентрацией сахарозы в среде является 6-8%, но добавление в среду ИУК и, особенно, кинетина снижает оптимальное и критическое для растений содержание сахарозы в среде и повышает интенсивность клубнеобразования.

В результате проведенных исследований установлено, что для оптимизации процесса микроклубнеобразования целесообразно использовать жидкую питательную среду с добавлением фитогормонов ИУК в концентрации 1 мг/л и кинетин в концентрации 0,04 мг/л.

Внедрение технологии выращивания микроклубней в лабораторный процесс способствует круглогодичному выращиванию *in vitro* материала и может быть использовано в качестве дополнения к программе клонального микроразмножения.

Преимущество метода получения микроклубней заключается в отсутствие сезонности при их выращивании и возможности длительного хранения исходного материала. Применение контейнерной технологии получения микроклубней *in vitro* позволят увеличить выход стандартной фракции и, таким образом, создать дополнительный фонд исходного материала для оригинального семеноводства картофеля.

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВЫХ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

Тимошенко А.А.^{1,2}, Спеченкова Н.А.^{1,2}, Шульга О.А.^{2,3}, Мишуткина Я.В.^{2,3}, Гапоненко А.К.²

¹ *Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550, Москва*

² *ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», 119334, Москва
E-mail: timoshenko.alekseevna@gmail.com*

³ *Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва*

Создание современных конкурентноспособных сортов и гибридов, обладающих не только высокой урожайностью, но и устойчивостью к абиотическим и биотическим стрессам невозможно без методов генетической инженерии. Эффективность получения таких сортов зависит от трех основных составляющих: 1) наличия исходного высокопродуктивного материала (сорта, линии, гибрида), 2) наличия гена/ов, экспрессия которых обеспечит необходимую устойчивость и 3) наличие эффективной системы введения данного гена в геном исходного растения.

Выбор исходного материала. Пшеница одна из трех главных сельскохозяйственных культур мира и является стратегическим ресурсом продовольственной безопасности РФ. Выбор исходных сортов, в которые будет вводиться необходимый признак или признаки, является ключевым моментом исследования. Исходный сорт-реципиент должен быть востребован среди производителей и обладать необходимыми для эффективного возделывания признаками. Например, для пшеницы важны такие признаки, как высокая урожайность, высокое содержание белка в зерне, хлебопекарные качества, устойчивость к полеганию и районированность. Эти и другие признаки являются определяющими при выборе исходного материала.

Выбор генов-кандидатов. Известно, что в ответ на стресс в растениях активируется большое количество различных генов, ответственных как за восприятие и передачу стрессового сигнала, так и за развитие ответной реакции растения. Как правило, направленное изменение активности какого-либо одного гена из всего массива стрессового ответа, не приносит желаемого результата в виде стабильной устойчивости к тому или иному стрессу. «Стрессовые» гены имеют сложную иерархическую организацию регуляции активности, поэтому модификация растений на уровне генов транскрипционных факторов (ТФ), выполняющих регуляторную роль, даёт возможность получить сорта с новыми хозяйственно ценными признаками устойчивости к различным неблагоприятным воздействиям (Flowers, 2004; Chen, et al., 2011; Kovalchuk, et al., 2013; Sahoo, et al., 2013).

Выбор способа трансформации. Эффективность методов получения генетически модифицированных растений зависит от наличия воспроизводимых систем трансформации клеток, селекции трансформированных клеток и регенерации из этих клеток полноценных фертильных растений. Известно, что для трансформации однодольных растений прямое введение генов (ПЭГ-трансформация, электропорация, баллистическая трансформация, микроинъекция) является более предпочтительным, чем использование *Agrobacterium tumefaciens*, из-за низкой эффективности последней. Однако агробактериальная трансформация имеет ряд преимуществ - обеспечивает низкую копияность генов, меньшее количество перестроек, и более стабильную экспрессию трансгенов в поколениях (Gelvin 2003). Поэтому для своих исследований мы решили использовать оба метода трансформации.

Целью нашей работы было получение трансгенных растений пшеницы, несущих гены ТФ TaDREB3 и OsGATA, методом агробактериальной и баллистической трансформации.

Методы и материалы. Для настоящего исследования были выбраны 4 сорта яровой пшеницы - Злата, Эстер, Агата, Амир, созданные под руководством д.с.-х.н. Н.В. Давыдовой (МосНИИСХ «Немчиновка») и 4 сорта озимой пшеницы - Донская Лирика, Юнона и Дея, созданные под руководством заведующей отдела селекции пшеницы и тритикале КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко академика, Л.А. Беспаловой.

Кассета экспрессии TaDREB3 в составе бинарного вектора предоставлена д-ром С. Лопато (Австралийский центр функциональной геномики). Кассета экспрессии OsGATA в векторе pCAMBIA1304::OsGATA предоставлена д-ром А. Парииком (Университет Джавахарлала Неру, Индия). Также для баллистической трансформации была использована плазида psGFP/BAR, содержащая селективный ген *bar*, обеспечивающий устойчивость к гербициду фосфинотрицину (BASTA), и ген маркерного белка GFP. Агробактериальную трансформацию проводили с использованием штамма AGL0, содержащего либо pCAMBIA1304::OsGATA, либо pWRKY71-TaDREB3.

Предварительные результаты. На первом этапе работы была отлажена регенерация сортов мягкой озимой пшеницы в условиях *in vitro*, как для агробактериальной, так и для баллистической трансформации. Нами отработаны способы получения морфогенного каллуса пшеницы для всех используемых сортов, компетентного к регенерации и трансформации. Подобраны необходимые для эффективного селективного отбора концентрации селективных агентов – фосфинотрицина (5 мг/л) и гигромицина (15 мг/л). Оптимизирован метод адаптации укоренившихся побегов к условиям теплицы, через стадию культивирования в перлите.

На втором этапе работы было проведено клонирование кассеты экспрессии TaDREB3 и OsGATA в плазмидный вектор pBS для использования при биолиственной трансформации. Каждая кассета была клонирована в отдельный вектор - pBS-TaDREB и pBS-GATA. Известно, что частота коинтеграции в геном при биолиственной трансформации двумя конструкциями составляет порядка 80%. Мы использовали одновременно две плазмиды – одну с геном интереса (pBS-TaDREB или pBS-GATA), а вторую с селективным и маркерным геном - psGFP/BAR.

На третьем этапе работы была проведена серия экспериментов по агробактериальной и баллистической трансформации исходных сортов с использованием описанных выше генетических конструкций. На данном этапе были отобраны все устойчивые к селективным агентам линии. К настоящему моменту были проверены линии, трансформированные конструкциями pBS-TaDREB/ psGFP/BAR на наличие генов *bar* и WRKY71/TaDREB3 методом ПЦР. Эффективность генетической трансформации варьировала от 4,8 до 9,4 % в зависимости от генотипа.

На следующем этапе работы планируется провести анализ остальных потенциальных трансгенных растений на наличие селективных/маркерных генов, OsGATA и TaDREB3. От подтвержденных трансгенных линий будет получено потомство и проведен анализ устойчивости к абиотическим стрессам.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ *STEVIA REBAUDIANA* BERT. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Шульгина А.А., Калашникова Е.А.

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

Тумирязева

E-mail: alja.shulgina@yandex.ru

В последнее время возрастает интерес ко вторичным метаболитам высших растений. Дитерпеноиды представляют собой большой класс природных соединений специализированного обмена высших растений. Исследование их метаболизма имеет практическую значимость, т. к. многие из них являются коммерчески ценными веществами. Примером может служить дитерпеновый гликозид стевиозид (13-гидрокси-энт-каур-16-ен-19-овая кислота), содержащийся в листьях растения *Stevia rebaudiana* в концентрации до 20% от сухой биомассы. Стевиозид – белый кристаллический порошок без запаха с сильным сладким вкусом (примерно в 300 раз слаще сахарозы), обладает гипогликемическим действием (не приводит к повышению уровня сахара в крови даже в концентрации, в 10-15 раз превышающей ее среднесуточное потребление), устойчив к высокой температуре.

Целью нашей работы являлось оптимизировать гормональный состав питательной среды при культивировании микропобегов стевии (*Stevia rebaudiana*) *in vitro*, а также определить влияние спектрального состава света на рост и развитие микрорастений.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: отработать методику по введению в культуру *in vitro* изолированных эксплантов и получить хорошо растущую стерильную культуру, оптимизировать условия культивирования на разных этапах клонального микроразмножения, изучить влияние регуляторов роста и спектра освещения на морфологические процессы.

В качестве первичного экспланта были взяты сегменты побегов, содержащих две пазушные почки, которые культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасиге-Скуга. В качестве регуляторов роста использовали Дропп, Эпин, кинетин, *2ip*, БАП, ИМК, ИУК и НУК, которые изучали как самостоятельно, так и в сочетании друг с другом на морфогенетическую активность изолированных эксплантов. Учет результатов проводили ежемесячно, при этом учитывали количество образовавшихся адвентивных почек, побегов и рассчитывали коэффициенты размножения. В качестве искусственных источников облучения использовали белые люминесцентные лампы и узкополосные светоиспускающие диоды красно-синего спектра.

В результате проведенных исследований нами было установлено, что гормональный состав питательной среды оказывает существенное влияние на процессы морфогенеза, в частности, на индукцию образования адвентивных почек и побегов. Так, культивирование первичных эксплантов на питательной среде, содержащей 1 мг/л кинетина и 0,5 мг/л ИУК, приводило к образованию адвентивных почек, которые формировались, как правило, в единичных количествах, а сформировавшиеся из них микропобеги имели длинные междоузлия. Такие растения были способны к дальнейшему микроразмножению. При культивировании первичных эксплантов на среде МС, содержащей 1 мг/л БАП в сочетании с 0,5 мг/л ИУК, наблюдали формирование хорошо пролиферирующей каллусной ткани, которая формировалась в базальной части эксплантов. На безгормональной среде МС наблюдали только хороший рост растений в высоту.

Самой лучшей средой для индукции образования адвентивных почек при введении в культуру *in vitro* оказалась среда МС с добавлением Эпина и ИУК в концентрациях 0,1 и

0,5 мг/л, соответственно. В этом варианте формировались по 2-3 крупных микропобега с одного экспланта, что привело к получению самого высокого коэффициента размножения.

На этапе укоренения было изучено влияние различных ауксинов (ИУК, НУК, ИМК) на процесс ризогенеза. Исследования показали, что при добавлении в среду ИУК в концентрации 1 мг/л наблюдалось образование корневой системы с одновременным ростом надземной части растений. Аналогичные результаты были получены и при использовании 1 мг/л НУК и ИМК. Однако в этих вариантах в случае соприкосновения листа с питательной средой наблюдали формирование каллусной ткани на среде с НУК и образование корней из листовых пластинок на среде с ИМК. На безгормональной среде МС также был отмечен процесс ризогенеза. Средняя укореняемость микропобегов составила 35-40%. Разница в степени укоренения между разными средами была несущественна.

Как известно, регулирование морфогенетическими процессами возможно осуществлять не только гормональным составом питательной среды, но и условиями освещения, в частности, спектральным составом света. Поэтому в следующей серии экспериментов нами были проведены исследования по влиянию спектра освещения на культуру стевии *in vitro*. Установлено, что красно-синий свет оказывает ингибирующее действие на формирование и рост побегов *in vitro* по сравнению с контрольным вариантом, где были применены белые люминесцентных лампы. В опытном варианте, как правило, формировались побеги с сильно укороченными междоузлиями. Однако при возвращении побегов с красно-синего светодиодного освещения на контрольный световой режим (с использованием белых люминесцентных ламп) отмечено удлинение верхних новообразующихся междоузлий. Кроме того, нами было установлено, что изменение спектрального состава света оказало стимулирующее действие на формирование корневой системы, что не было отмечено в контрольном варианте. Вероятнее всего, это связано с тем, что воздействие красного и синего света индуцировало биосинтез естественных растительных гормонов, в том числе и ауксинов, которые и оказали влияние на формирование корневой системы.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что присутствие в составе питательной среды МС Эпина и ИУК в концентрациях 0,1 и 0,5 мг/л, соответственно, а также культивирование микропобегов при красно-синем светодиодном освещении приводит к формированию хорошо развитых микрорастений стевии, обладающих высоким коэффициентом размножения в условиях *in vitro*.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО МЕТОДУ ВИТРИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ НОСИТЕЛЕЙ, ОСНОВАННЫХ НА ПРИНЦИПЕ ОХЛАЖДЕНИЯ В МИНИМАЛЬНОМ ОБЪЕМЕ

Корниенко Е.В., Романова А.Б.

**ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»,
127422, Москва**

E-mail: kornienko.katerina@gmail.com

Эффективные методы криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота значительно расширяют возможности применения метода трансплантации и рационального использования животных-реципиентов. Так, ежегодно в мире около 60-70% полученных *in vivo* эмбрионов крупного рогатого скота трансплантируется после процедуры медленного замораживания (Blondin, 2015). Иначе обстоит дело с эмбрионами,

полученными *in vitro* (*in vitro* production, IVP): процент трансплантируемых после заморозки IVP эмбрионов не превышает 5%. Это связано с повышенной чувствительностью IVP эмбрионов крупного рогатого скота к криоповреждениям, и, как следствие, с более низким уровнем выживания после медленного замораживания по сравнению с эмбрионами, полученными *in vivo* (Vajta, 2000). Перспективным подходом к решению проблемы криоконсервации IVP эмбрионов крупного рогатого скота является метод витрификации, позволяющий избежать формирования кристаллов льда внутри клетки — основного источника криоповреждений. Витрификация широко применяется в качестве вспомогательного метода в репродуктивной медицине. Основным принципом современных методик витрификации является принцип охлаждения в минимальном объеме (*minimum volume cooling*), при котором объем витрификационного раствора не превышает 0,1 мкл, что позволяет значительно увеличить скорости охлаждения и нагревания образца и, как следствие, снизить концентрацию проникающих криопротекторов в растворах витрификации. На данном принципе основано применение ряда носителей открытого типа таких, как Cryotop (Kuwayama et al., 2005). Носители такого типа показывают высокую эффективность при криоконсервации эмбрионов млекопитающих, в том числе, крупного рогатого скота (Gutnisky et al., 2013). Однако, они предназначены для криоконсервации ограниченного числа эмбрионов, которые необходимо обрабатывать в индивидуальном порядке, что делает результат зависимым от уровня мастерства отдельного оператора. Для одновременной витрификации группы эмбрионов был предложен новый метод с использованием в качестве носителя триацетат целлюлозных полых волокон (*hollow fiber vitrification*, HFV, Matsunari et al., 2012), позволяющий значительно упростить и стандартизировать процедуры витрификации и отогревания. На основе данного метода нами было разработано устройство для витрификации и хранения ооцитов и эмбрионов млекопитающих (Malenko et al., 2015).

Целью данной работы было сравнение эффективности витрификации эмбрионов крупного рогатого скота в возрасте семи суток с использованием носителя открытого типа Cryotop и устройства для витрификации и хранения ооцитов и эмбрионов млекопитающих в полой волоконке.

В возрасте семи суток после начала оплодотворения оценивали развитие полученных *in vitro* эмбрионов крупного скота. Эмбрионы, достигшие стадии бластоцисты и расширенной бластоцисты, использовали для формирования экспериментальных и контрольной групп.

Витрификацию и отогревание эмбрионов с использованием носителя Cryotop проводили в соответствии с методом, предложенным Kuwayama et al. (2005). При витрификации с использованием устройства эмбрионы обрабатывали следующим образом. Отобранные бластоцисты инкубировали в двух сменах среды TALP-HEPES с 20% ФСК (ТН20) в течение 10 минут. Затем переносили в раствор эквilibрации, содержащий 7,5% этилен гликоля (ЭГ) и 7,5% диметилсульфоксида (ДМСО), и загружали в устройство для витрификации группами по 5–10 эмбрионов. Общее время инкубации в растворе эквilibрации составляло 5 минут. Затем полая волоконка, содержащая бластоцисты, переносили в раствор витрификации, содержащий 0,5 М сахарозы, 15% ЭГ и 15% ДМСО, инкубировали в течение 60 секунд, после чего волоконку погружали в жидкий азот.

При отогревании эмбрионов полая волоконка переносили из жидкого азота в среду отогревания, содержащую 1 М сахарозы. Кончик стеклянного капилляра отламывали, а волоконку с эмбрионами инкубировали в течение 60 секунд. Затем полая волоконку последовательно инкубировали в растворе разбавления с 0,5 М сахарозы и двух сменах ТН20. В последнем растворе бластоцисты выгружали из полого волокна. Затем эмбрионы переносили в среду SOF и инкубировали в течение 72 часов. Уровень выживания и выхода эмбрионов из блестящей оболочки регистрировали через 24, 48 и 72 часа. В качестве контроля использовались IVP бластоцисты и расширенные бластоцисты

крупного рогатого скота, не подвергавшиеся витрификации. Результаты представлены в виде процента выживших или вылупившихся бластоцист от числа витрифицированных бластоцист.

Уровень выживания эмбрионов через 24 часа после отогревания в группе эмбрионов, витрифицированных с использованием устройства, составлял 87,5% (21/24 эмбрионов), снизившись к 72 часам культивирования до 83,3%. Соответствующий показатель в группе, витрифицированной с использованием Cryotop, составлял 97,0% (32/33 эмбрионов) и не снижался при дальнейшем культивировании эмбрионов. В группе, витрифицированной с использованием устройства, уровень выживания эмбрионов на стадии развития бластоциста был значительно ниже (66,7%), чем уровень эмбрионов на стадии расширенной бластоцисты (100%). Отличие по уровню выживания между эмбрионами на данных стадиях развития в группе носителя Cryotop было менее выражено (94,4 и 100%, соответственно). Уровень выхода из блестящей оболочки в группе устройства составлял 83,3%, в группе носителя Cryotop – 90,9%, и в контрольной группе — 87,9%.

По уровню выживания эмбрионов после витрификации с использованием устройства, основанного на триацетат целлюлозном волокне, полученные результаты сопоставимы с результатами полученными при групповой витрификации с использованием других носителей (Abdalla et al., 2010, Min et al., 2014). Более высокие показатели по уровню выживания семидневных эмбрионов крупного рогатого скота по сравнению с результатами, полученными с использованием полого волокна, также получены Saucedo et al. (2015) при использовании устройства Cryologic. Однако, как и в случае с носителем Cryotop, это устройство предназначено для витрификации отдельных эмбрионов. Нами было показано, что негативные последствия витрификации в полом волокне проявляются в группе семидневных эмбрионов, находящихся на стадии бластоцисты. Данные результаты могут быть обусловлены как физическими свойствами триацетат целлюлозного волокна, так и морфофизиологическими отличиями эмбрионов на разных стадиях развития. При этом, уровень выхода бластоцист из блестящей оболочки через 72 часа культивирования в группе устройства при пересчете в виде процента выживших бластоцист от числа выживших бластоцист составлял 100%. Максимальной эффективности витрификации семидневных эмбрионов крупного рогатого скота на данный момент можно достичь путем отбора эмбрионов, достигшей соответствующей стадии развития.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРИМОРДИАЛЬНЫХ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК КУР

Томгорова Е.К., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А.

ФГБУН «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», Центр биотехнологии и молекулярной диагностики животных, 142132, МО, п. Дубровицы. E-mail: tomgorova@rambler.ru

Создание биоинженерных форм в животноводстве, в том числе в птицеводстве является одним из перспективных направлений развития современной науки. Однако, несмотря на заметные успехи в области трансгенеза птиц, само создание трансгенных кур затруднено особенностями их воспроизводства и развития. Одним из альтернативных методов направленного переноса генов является использование в качестве клеток-

мишеней для введения рекомбинантной ДНК разных типов плюрипотентных стволовых клеток, в том числе примордиальных зародышевых клеток.

Примордиальные зародышевые клетки (ПЗК) являются предшественниками высокодифференцированных половых клеток (гамет). ПЗК могут быть использованы в качестве вектора для переноса рекомбинантных ДНК в организм животных и птиц.

С целью оптимизации и усовершенствования отдельных этапов технологии создания трансгенных кур нами были проведены исследования генетической трансформации примордиальных зародышевых клеток *in vitro* и *in vivo*. Материалом для получения ПЗК служили эмбрионы кур с 4 по 8 день развития. Методические приемы выделения данного типа клеток и условия их культивирования *in vitro* отработывали экспериментально. Изучали влияние на эффективность выделения ПЗК из эмбрионов кур таких факторов как: способ дезагрегации эмбрионов, очистка ПЗК от других типов клеток и возраст эмбрионов, используемых для получения ПЗК.

В работе использовали ретровирусный вектор pL-GFP, содержащий репортерный ген GFP (зеленый флюоресцирующий белок). Генетическую трансформацию ПЗК в культуре осуществляли путем совместного культивирования с клетками-упаковщицами и инфицированием вирусным препаратом. Экспрессию репортерного гена в трансфицированных клетках изучали на 3-5 день культивирования. Частоту генетической трансформации определяли как процентное отношение числа трансформированных клеток к общему числу клеток, взятых для эксперимента.

В экспериментах *in vitro* максимальный процент трансформированных ПЗК был установлен при совместном культивировании данного типа клеток с клетками-упаковщицами. Частота генетической трансформации при этом достигала 8×10^{-4} . При трансфекции ПЗК вирусным препаратом результативность переноса рекомбинантной ДНК в клетки-мишени была в 1,9-2,2 раза ниже по сравнению с совместным культивированием с клетками-упаковщицами. Частота генетической трансформации при этом варьировала от 3×10^{-4} до 4×10^{-4} .

Трансформацию ПЗК *in vivo* осуществляли путем введения вирусного препарата и клеток-упаковщиц в дорсальную аорту эмбрионов на 55-60 часу развития. Эффективность трансформации клеток гонад оценивали на 9 день эмбриогенеза методом иммуногистохимии с использованием специфических антител к GFP. При введении генной конструкции pL-GFP в эмбрионы кур *in vivo*, высокая эффективность трансформации клеток-мишеней была установлена при использовании в качестве источника генной конструкции клеток-упаковщиц. Максимальная частота интеграции генной конструкции (процент эмбрионов с трансформированными гонадами от общего числа развившихся эмбрионов) наблюдалась при введении в эмбрионы кур суспензии клеток-упаковщиц в концентрации 1000-2000 клеток/эмбрион и составила 35,6-37,2%. При этом эффективность трансформации ПЗК в трансформированных гонадах эмбрионов достигала 3,2%.

При введении в эмбрионы кур вирусного препарата в концентрации 1×10^6 и 1×10^8 КОЕ/мл и клеток-упаковщиц в дозе 500 клеток/эмбрион частота интеграции трансгена была на 14,2-16,1% ниже и составила, соответственно, 20,8, 28,3 и 27,7% при эффективности трансформации ПЗК 1,8%, 2,2% и 2,5%. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования ретровирусных векторов для генетической трансформации ПЗК кур *in vivo* с целью получения трансгенной птицы.

АПРОБАЦИЯ PLUG-МАРКЕРОВ КАК ИНСТРУМЕНТА ИДЕНТИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА *DASYPYRUM VILLOSUM* В ГЕНЕТИЧЕСКОМ БЭКГРАНУДЕ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Соколов П. А.

Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, 127550, Москва
E-mail: biotech@iab.ac.ru

Дазипирум мохнатый (*Dasyphyrum villosum* (L.) Borbas, $2n=14$, V геном) – дикорастущий сородич мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., $2n=42$), который используется в качестве донора генов хозяйственно-ценных признаков в её селекции. Для направленной интрогрессии чужеродного хроматина в геном мягкой пшеницы используются молекулярные маркеры. Ishikawa и др. (2009) разработали ПЦР-маркеры PLUG (PCR Landmark Unique Gene) на основе консерватизма ортологичных генов между пшеницей и рисом, и на полиморфизме интронов между тремя ортологичными генами, полученными с трех субгеномов пшеницы А, В и D. Этот тип маркеров обладает тем преимуществом, что он позволяет идентифицировать за одну реакцию наличие перестроек хромосом одной гомеологичной группы всех трёх субгеномов мягкой пшеницы (А, В, D), а также чужеродного генома в отдалённых гибридах пшеницы. Цель нашего исследования состояла в отборе PLUG-маркеров, выявляющих хроматин *D. villosum* на генетическом бэкграунде мягкой пшеницы.

В нашем исследовании использовалась коллекция дополненных линий *T. aestivum* ($2n=44$), каждая из которых помимо пшеничных несёт дополнительную пару одной из хромосом *D. villosum* (1V-7V, созданы А.Ж.Лукaszewski), а также сорт *T. aestivum* Иволга и образец *D. villosum* W6 21717 (GRIN) в качестве контроля. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на геномной ДНК исследуемых образцов с праймерами двух V-геном специфичных SCAR-маркеров DV1, DbC11 и 37 PLUG-маркеров, локализованных на всех семи гомеологичных группах, разработанных Ishikawa и др. (2009), с последующей рестрикцией и электрофоретическим разделением полученных фрагментов в агарозном геле.

Так как в ходе размножения дополненных линий может происходить потеря чужеродных хромосом, для верификации коллекции линий пшеницы, дополненных по хромосомам *D. villosum*, нами была проведена ПЦР с двумя V-геном специфичными SCAR-маркерами. В результате удалось отобрать и использовать в дальнейшем анализе только ДНК тех растений, которые показали специфичные для V-генома бэнды. Вторым этапом работы была апробация PLUG-маркеров на данной коллекции. Условия прохождения ПЦР подбирались на основе литературных данных. ПЦР осуществлялась по следующему протоколу: из 1 цикл 5 минут при 95°C ; 35 циклов 94°C - 30 секунд, $55-60^{\circ}\text{C}$ - 30 секунд, 72°C - 30 секунд; 1 цикл 10 минут при 72°C . Температура отжига варьировалась от 55 до 60°C в зависимости от условий работы конкретных маркеров и подбиралась индивидуально. Полученные электрофореграммы ПЦР-продуктов всех семи дополненных линий пшеницы (1V-7V) сравнивали с электрофореграммами мягкой пшеницы и *D. villosum* с целью выявления *D. villosum*-специфичных бэндов на дополненных линиях. При отсутствии искомого полиморфизма ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *TaqI*, *HaeIII*, *MspI*, *BstHNI* для получения дополнительных бэндов. Из 37 PLUG-маркеров, отобранных для исследования, 21 маркер выявил полиморфизм между *D. villosum* и *T. aestivum*, 12 из них помимо бэндов пшеничного типа давали бэнды дазипирума на дополненных линиях пшеницы. При этом все 12 маркеров были локализованы на тех же гомеологичных группах, что и на мягкой пшенице, перекрёстная амплификация с других гомеологичных групп *D. villosum*

отсутствовала: 1 маркер на хромосому 1V, 2- на 2V, 1- на 3V, 2-на 4V, 3-на 5V, 1-на 6V, 2-на 7V. Таким образом, апробированные нами PLUG-маркеры могут быть использованы для мониторинга передачи хромосом *D. villosum* в геноме отдалённых гибридов мягкой пшеницы в селекционном процессе.

Литература:

1. Li G. et al. Chromosomal distribution of a new centromeric Ty3-gypsy retrotransposon sequence in *Dasyphyrum* and related Triticeae species // *Journal of genetics*. – 2012. – Т. 91. – №. 3. – С. 343.
2. Zhang J. et al. Characterization of a genome-specific Gypsy-like retrotransposon sequence and development of a molecular marker specific for *Dasyphyrum villosum* (L.) // *Journal of genetics*. – 2013. – Т. 92. – №. 1. – С. 103.
3. Salina E. A. et al. A *Thinopyrum* intermedium chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases // *Euphytica*. – 2015. – Т. 204. – №. 1. – С. 91-101.
4. Ishikawa G. et al. Localization of anchor loci representing five hundred annotated rice genes to wheat chromosomes using PLUG markers // *Theoretical and applied genetics*. – 2009. – Т. 118. – №. 3. – С. 499-514.
5. Hu L. J. et al. New St-chromosome-specific molecular markers for identifying wheat–*Thinopyrum* intermedium derivative lines // *J Genet*. – 2012. – Т. 91. – С. e69-e74.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДА КУР *IN VIVO*

Ветох А.Н., Белоглазов Д.В., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», Центр биотехнологии и молекулярной диагностики животных, 142132, МО, п. Дубровицы.

E-mail: anastezuya@mail.ru

Создание трансгенных кур-биореакторов — перспективное направление биотехнологии. Вместе с тем, создание трансгенных кур представляет сегодня определенную проблему, что требует поиска и разработки альтернативных методов направленного переноса генов, одним из которых является генетическая трансформация отдельных органов, в частности яйцевода кур (соматический трансгенез). Этот метод позволяет значительно сократить материальные и временные затраты на получение трансгенных организмов по сравнению с использованием для адресной доставки ДНК других клеток-мишеней (клеток бластодермы, примордиальных зародышевых клеток, эмбриональных стволовых клеток), проведение генно-инженерных манипуляций с которыми возможно только на эмбриональном материале.

Целью настоящей работы было изучение эффективности доставки рекомбинантной ДНК в клетки яйцевода кур *in vivo* и разработка методических подходов, позволяющих повысить результативность трансгенеза. В работе использовали ретровирусный вектор, полученный на основе вируса лейкемии мышей Молони (Mo-MuLV), в состав которого была клонирована последовательность маркерного гена GFP.

Первоначально был определен оптимальный возраст кур для введения генных конструкций в клетки яйцевода *in vivo*. Гистологические исследования клеток белковой части яйцевода кур в возрасте 1, 2, 3, 4, 4,5 и 5 месяцев показали, что оптимальным

сроком для введения генных конструкций является возраст от 4 до 4,5 месяцев: в данный возрастной период отмечалась высокая пролиферативная активность клеток яйцевода. Однако эффективность трансгеноза при введении ретровирусного вектора в яйцевод кур в этот период была относительно низкой ($17,2 \pm 3,1$ %), что было обусловлено достаточно большими размерами органа. С целью повышения эффективности трансгеноза было осуществлено введение генных конструкций в яйцевод кур в возрасте 2 месяцев после их гормональной стимуляции 0,1 % раствором синэстрола, что способствовало повышению пролиферативной активности клеток яйцевода и, как следствие, увеличению в 3,3 раза (до $57,3 \pm 6,3$) эффективности генетической трансформации клеток-мишеней. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования ретровирусных векторов для генетической трансформации клеток яйцевода взрослой птицы *in vivo*.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У РАСТЕНИЙ ЛЬНА В ОТВЕТ НА ИЗБЫТОК И НЕДОСТАТОК ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПОЧВЕ

Мельникова Н.В.¹, Коробан Н.В.¹, Большева Н.Л.¹, Сперанская А.С.^{1,2}, Криницына А.А.², Кудрявцева А.В.¹, Дмитриев А.А.¹

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, 119991, Москва
E-mail: mnv-4529264@yandex.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва

Лен культурный (*Linum usitatissimum* L.) – важная сельскохозяйственная культура, выращиваемая для получения волокон и семян. Льняное волокно и масло используются в текстильной, химической и фармацевтической промышленности. В настоящее время созданы сорта льна с высокой потенциальной продуктивностью, однако неблагоприятные факторы внешней среды значительно снижают урожайность этой культуры. Для создания устойчивых к стрессам сортов льна необходимо выявить генетические механизмы ответа растений на неблагоприятные воздействия. Целью нашей работы была идентификация генов льна, которые могут участвовать в ответных реакциях на недостаток или избыток питательных веществ в почве.

Проростки льна линии Stormont cirrus и сорта Bethune выращивали в стандартных условиях – N (каждые 7 дней в каждый горшок вносилось 100 мл 0,5x раствора Хогланда), в условиях недостатка фосфата – P (каждые 7 дней в каждый горшок вносилось 100 мл 0,5x раствора Хогланда с уменьшенной в 100 раз концентрацией K_2HPO_4), а также в условиях избыточного питания – NPK (каждые 7 дней в каждый горшок вносилось 100 мл 0,5x раствора Хогланда и 2,76 г. удобрения MASTER (Valagro, Italy)). Выделение ДНК проводили фенол-хлороформным методом. Тотальную РНК выделяли наборами ZR RNA MicroPrep (Zymo Research, США). Качество и концентрацию выделенной РНК оценивали на флуориметре Qubit 2.0 и биоанализаторе Agilent 2100. Для дальнейшей подготовки библиотек мРНК использовали только высококачественную РНК с показателем RIN не менее 8.

Пробоподготовка библиотек мРНК для высокопроизводительного секвенирования проводилась с использованием набора Illumina TruSeq RNA Library Preparation Kit (Illumina, США). Качество полученных кДНК библиотек оценивали на биоанализаторе Agilent 2100. На секвенаторе платформы Illumina определены нуклеотидные последовательности мРНК растений линии льна Stormont cirrus, выращенных в

контрольных условиях, а также в условиях недостаточного и избыточного питания. Всего получено 27 млн, 69 млн и 24 млн прочтений длиной 100 нуклеотидов для N, P и NPK условий соответственно. Сборка транскриптома проводилась программой SOAPdenovo. Аннотация собранных транскриптов выполнена с использованием BLAST анализа. Всего идентифицирован 43471 транскрипт: число транскриптов для нормальных условий – 34924, для избытка питания – 33698, для недостатка питания – 33797. Для количественной оценки и определения транскриптов с дифференциальной экспрессией осуществляли нормализацию. Выявлены гены со значительным повышением или понижением уровня экспрессии в условиях избыточного или недостаточного питания.

Для оценки изменения экспрессии на расширенной выборке образцов (10 растений льна, выращенных в N условиях, 11 – в P и 10 – в NPK) на основе полученных данных высокопроизводительного секвенирования выбрано 17 потенциально дифференциально экспрессирующихся генов, к которым подобраны праймеры. Количественную ПЦР проводили на амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) в 20 мкл реакционной смеси. Реакционная смесь для амплификации мРНК содержала 1×ПЦР-смесь 2-FRT (AmpliSens, Россия), 250nM dNTP (Fermentas, Латвия), 350 nM прямого и обратного праймеров, 2 U TaqF полимеразы (AmpliSens, Россия), 1× EvaGreen (Biotium, США) и кДНК. Программа амплификации была следующей: 95°C – 15 мин; 50 циклов по 95°C – 15 с, 60°C–62°C (в зависимости от праймеров) – 60 с; плавление.

Полученные данные анализировали $\Delta\Delta C_t$ -методом с использованием двух контрольных генов (*ETIF3E* и *ETIF3H*) и оригинального приложения АТГ (Анализ Транскрипции Генов). Относительный уровень мРНК рассчитывался по формуле:

$$C_t^{eff} = C_t \times \log_2(1 + E)$$

где E – эффективность реакции для каждой пары праймеров, C_t – пороговый цикл (усредненный по 3-м повторностям). Более высокое значение ΔC_t^{eff} соответствует более низкому значению уровня экспрессии. Эффективности всех реакций были более 95%. Для оценки статистической значимости различий между группами образцов использовали критерии Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса.

Выявлено значительное повышение экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы семейства WRKY и белки семейства JAZ, в условиях избыточного питания. В условиях недостатка фосфатов показано повышение экспрессии генов, кодирующих нуклеазу HARB11 и ингибитор роста ING1.

Полученные результаты дают новую информацию о процессах, происходящих при воздействии на растения стрессовых факторов внешней среды, и об эпигенетических изменениях, имеющих место у растений льна при выращивании в неблагоприятных почвенных условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №16-16-00114).

Г ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ В СЛОЖНЫХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДАХ КАРТОФЕЛЯ

Фаина О. А., Бекетова М. П.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42

E-mail: fadinaokcaha@gmail.com

Пирамидирование генов устойчивости к фитофторозу путем обратного скрещивания [1-2] и генной инженерии [3-6] дает возможность создания новых сортов картофеля с высокой и долговременной устойчивостью. Сложные межвидовые гибриды картофеля, которые содержат генетический материал до восьми диких видов *Solanum* и показывают высокую устойчивость к фитофторозу в полевых и лабораторных испытаниях (Рогозина и др., 2014) являются перспективными источниками для выведения новых сортов картофеля. С использованием молекулярных маркеров мы провели скрининг стандартных сортов картофеля и межвидовых гибридов на наличие генов устойчивости к фитофторозу R1, R2 / Rpi-blb3, R3a, R3b, RB / Rpi-blb1, Rpi-vnt1 и Rpi-blb2. Родословные некоторых гибридов были проверены с помощью ДНК маркеров, специфичных для геномов *S. bulbocastanum* и *S. demissum*, генома В *Solanum* и генов устойчивости к *Rysto*. Последовательности обнаруженных маркеров R генов были клонированы и соотнесены с генами-прототипами и их ортологами из уже характеризованных диких видов *Solanum* секции *Petota*.

Статистический анализ числа маркеров и баллов устойчивости к фитофторозу по результатам лабораторных и полевых испытаний поддерживает первоначальное предположение, что пирамидирование генов устойчивости в сложных межвидовых гибридах из различных видов *Solanum* значительно повышает устойчивость к фитофторозу. Интересно, что в части исследуемых межвидовых гибридов, устойчивость в лабораторных тестах была в значительной степени связана с наличием SCAR маркеров, но мы не наблюдали четкую корреляцию между уровнем устойчивости и количеством маркеров на гибрид. Очевидно, что значительная часть зарегистрированной устойчивости зависит от еще не охарактеризованных генов и генов, которые мы не сумели распознать из-за ограниченного набора маркеров.

Литература:

1. Kim H.J. et al., 2012. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes. *Theor. Appl. Genet.*, 124, 923–935.
2. Rietman H. et al., 2012. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 25, 910–919.
3. Haverkort A.J. et al., 2009. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Res.*, 52, 249–264.
4. Jo K.R. et al., 2014. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnol.*, 14:50.
5. Jones J.D.G. et al., 2014. Elevating crop disease resistance with cloned genes. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 369, 20130087.
6. Zhu S. et al., 2012. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Res.*, 21, 89-99.

РАЗРАБОТКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ КУКУРУЗЫ ЛИНИЙ 5307 И MON89034 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Моисеева М.В.^{1,2}, Букина Е.Ю.², Алексеев Я.И.¹, Беленович Е.В.¹, Кузубова О.В.¹, Варламов Д.А.^{1,2}, Мазурин Е.С.¹, Харченко П.Н.¹

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42

E-mail: maria.moiseeva92@gmail.com

² Закрытое акционерное общество «Синтол», 127422, Москва

Кукуруза – ценная сельскохозяйственная культура, широко используемая в пищевой и легкой промышленности, а также в производстве кормов. С каждым годом в мире возрастает производство сельскохозяйственных ГМ культур. По данным ISAAA в 2014 году суммарная площадь посевов ГМ культур составила 181,5 млн. га. В Российской Федерации пищевые продукты, содержащие более 0,9% ДНК генетически модифицированных организмов (ГМО), подлежат обязательной маркировке. Распространённым методом выявления ДНК ГМО является полимеразная цепная реакция в реальном времени. Метод позволяет быстро и с высокой специфичностью и чувствительностью исследовать любой образец, содержащий ДНК.

В 2014 году в РФ были разрешены для использования в продуктах питания, пищевом сырье и кормах для животных две новые линии ГМ кукурузы 5307 (устойчива к жесткокрылым насекомым-вредителям рода *Diabrotica*) и MON89034 (устойчива к чешуекрылым насекомым). В связи с этим появилась необходимость в разработке наборов реагентов для обнаружения и идентификации данных линий.

Для обнаружения ДНК кукурузы линий 5307 и MON89034 был проведен дизайн праймеров и зондов для ПЦР-РВ на основании анализа последовательностей генов, взятых из официальных международных данных.

Исследование специфичности и чувствительности разработанных праймеров и зондов проводили с помощью реакционных смесей, подготовленных следующим образом: в готовую 2,5-кратную реакционную смесь с Taq-ДНК полимеразой (ЗАО «Синтол», Россия) добавляли по 6 пмоль каждого праймера и 4 пмоль зонда, 5 мкл исследуемой ДНК и стерильную бидистиллированную воду до конечного объема 25 мкл.

Использовали стандартные образцы, содержащие ДНК линий ГМ кукурузы, сои, а также различные пищевые продукты, не содержащие ГМО. ДНК из образцов выделяли набором «Сорб-ГМО-Б» (ВНИИСБ/Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Исследования методом ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) при следующих условиях: 95°C – 300 с, (60°C – 40с, 95°C – 15с) 50 циклов.

Специфичность праймеров и зондов для обнаружения ДНК кукурузы линии MON89034 и линии 5307 была исследована методом ПЦР-РВ на образцах ДНК, выделенных из сои, кукурузы, риса, ГМ-линий сои (GTS4032, A2704-12, A5547-35, MON89788) и ГМ-линий кукурузы (MON810, Vt11, MON88017, T25, NK603, 5307, MON89034).

Возрастание сигнала флуоресценции наблюдалось только в реакции с образцом ДНК, выделенным из кукурузы линии MON89034 и линии 5307. Для всех остальных образцов возрастание сигнала флуоресценции не наблюдалось, что подтверждает специфичность подобранных праймеров и зондов для ПЦР-РВ на исследованной выборке.

Чувствительность определения ДНК ГМ-линий кукурузы с использованием разработанных праймеров и зондов исследовали на серии образцов, полученных путем

десятикратных разведений раствора ДНК, выделенного из стандартных образцов, содержащих 100% ГМ кукурузу. Коэффициент корреляции R^2 , рассчитанный с помощью метода наименьших квадратов, при исследовании серии четырех десятикратных разведений составил 0,999.

Для исключения ложноотрицательных результатов в состав реакционных смесей был введен внутренний положительный контроль (ВПК), представляющий собой синтетическую плазмидную ДНК и пару праймеров и зонд для ее выявления.

В наборе реагентов «Кукуруза MON89034 идентификация» по каналу детекции флуоресцентного красителя ROX (карбокси-X-родамин) проводится выявление фрагмента гена (*Cry2Ab2*) кукурузы линии MON89034, по каналу детекции флуоресцентного красителя Cy5 (индодикарбоцианин) – выявление ДНК внутреннего положительного контроля. Аналогичный дизайн имеет набор реагентов «Кукуруза 5307 идентификация», за исключением того, что по каналу детекции ROX выявляется фрагмент гена *esg3.1Ab* кукурузы линии 5307.

Эффективность ПЦР-РВ для разработанных наборов составила более 95%. Было установлено, что аналитическая чувствительность разработанных наборов реагентов составляет 0,01% содержания ДНК ГМО в образце, что соответствует 10 геном-эквивалентам в реакции.

Разработанные наборы реагентов позволяют выявлять и идентифицировать ДНК линий кукурузы 5307 и MON89034 в продуктах питания, пищевом сырье и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ОЗДОРОВЛЕННОГО СЕМЕННОГО КАРТОФЕЛЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ПОЛЕВОЙ ОЫТНОЙ СТАНЦИИ РГАУ-МСХА ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА

Полякова М.Н., Пастухов С.А., Хабарова Л.Н., Горбатов Д.А.

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

Развитие картофелеводства – приоритетное направление развития сельского хозяйства в настоящее время. Производство товарного и семенного картофеля невозможно без налаженной системы качественного семеноводства. Также сейчас на первый план выходит проблема острой нехватки качественных специалистов в данной отрасли.

В этой связи на базе Полевой опытной станции РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева осуществляется работа по оздоровлению и ускоренному размножению различных отечественных сортов картофеля. Размножение растений ведется по 4 различным технологиям: первая – ускоренное размножение растений *in vitro* с последующей высадкой их в рассадные кассеты, а затем в грунт в зимние теплицы (в осенний и зимне-весенний периоды), вторая - ускоренное размножение растений *in vitro* с последующей высадкой их в поле (в летний период), третья – получение микроклубней *in vitro* с последующей высадкой их в кассеты, а затем пересадкой их в условия, соответствующие сезону и времени года. Четвертая технология – высаживание пробирочных растений в установку КД-10, разработанную во Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной биотехнологии в 1980-е годы XX века. В установку высаживаются

только несколько сортов отечественной селекции, способные расти в условиях периодического затопления корневой системы.

Во всех этапах производства картофеля на базе Полевой опытной станции под руководством опытных специалистов принимают участие студенты академии, им предоставляется возможность на практике ознакомиться со всеми этапами отечественного семеноводства картофеля.

Ведутся работы по оптимизации имеющихся технологий и методов, проводятся исследования по изучению минерального питания и удобрения растений в теплицах и в поле, испытанию различных химических препаратов, регуляторов роста, кремний-ограниченных соединений, источников облучения растений. Данные исследования на базе Полевой опытной станции являются частью научно-исследовательских работ студентов-бакалавров, магистров, аспирантов и школьников.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПОЛУЛЯЦИЙ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ FGF И LIF

Кашапова И.С., Межевикина Л.М., Косовский Г.Ю.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение Центр экспериментальной
эмбриологии и репродуктивных биотехнологий,
127422, Москва, ул. Костякова, д.12, стр.4,
E-mail: info-ceerb@mail.ru*

В настоящее время в источниках литературы отсутствуют сведения о разработках комплексных методов и подходов для оценки прижизненного состояния мезенхимных стволовых клеток костного мозга крупного рогатого скота (МСК КМ КРС), не выявлены регуляторные факторы пролиферации и дифференцировки, а также специфика регуляции морфофункционального состояния в зависимости от условий культивирования и микроокружения МСК. Такие исследования чрезвычайно важны и актуальны как для разработок новых экспериментальных подходов в решении задач повышения генетической стабильности МСК, так и для получения на их основе дифференцированной ткани с заданными свойствами.

Из литературных данных известно, что ростовой фактор фибробластов FGF способствует дифференцировке МСК КМ.

В настоящем исследовании 3 группы МСК КМ КРС (контрольная; с добавлением 20 нг/мл FGF (Fibroblast Growing Factor, Sigma, США) — группа F; лейкоз ингибирующего фактора LIF (PeproTech.inc., Канада) — группа L) культивировали в стандартной среде alpha-MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в 5% CO₂ при 37°C.

Клетки высевали в концентрации 36000 кл/мл среды и культивировали 10 дней с заменой среды раз в трое суток.

Клетки контрольной группы достигли полного монослоя на пятые сутки, тем временем, как сформировавшийся монослой в группе L наблюдался через три дня, а в группе F - уже через 48 часов культивирования.

По истечении 10 дней культивирования препараты фиксировали 70% этанолом в течение 1 часа, после чего окрашивали ализариновым красным (Sigma, Германия) так же в течение часа и проводили сравнительный анализ морфофункционального состояния МСК КМ КРС.

В препаратах группы контроля клетки приобретали морфологию, характерную для остеогенной дифференцировки, так же было отмечено появление фокусов кальцификации. В экспериментальной группе F отчетливо видны очень крупные и плотные очаги образования кальцификатов, в общей сложности превышающие половину площади, занимаемой культурой клеток. Тем временем в группе L не было выявлено мест локализации начала дифференцировки, а клетки в большинстве своем продолжали сохранять фибробластоподобную структуру.

Исходя из данных, полученных в ходе вышеописанного эксперимента, можно сделать выводы о том, что присутствие FGF в среде культивирования МСК КМ КРС хорошо стимулирует клеточную пролиферацию и дифференцировку. Культивирование МСК КМ КРС в присутствии LIF так же приводит к ускоренному росту клеточных популяций, но все-таки менее интенсивному, чем при использовании FGF. Основываясь на результатах исследования, соответствующих многим литературным данным, можно утверждать, что LIF блокирует клеточную дифференцировку и способствует сохранению клетками исходной морфологии.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ ДНК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВНУТРИВИДОВОГО И МЕЖВИДОВОГО РАЗЛИЧИЯ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ РОДА *CENCHRUS*

С.В. Сыксин^{1,2}, А.А. Соловьев¹, Е.С. Мазурин², Ю.Ю. Кулакова³

¹ *Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550, Москва. E-mail: biotech@iab.ac.ru*

² *ФГБНУ ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Москва, Россия,*

³ *ФГБНУ ВНИИ Карантина растений, Московская область, Раменский район, п. Быково, 140150*

Ценхрус малоцветковый (*Cenchrus longispinus*) – карантинный однолетний злаковый сорняк, который распространён во многих странах мира. На территории России ценхрус малоцветковый имеет ограниченное распространение в пяти регионах (в Краснодарском и Ставропольском краях, Волгоградской и Белгородской областях, республике Дагестан), потенциальный же ареал сорняка на территории России может доходить до 60° северной широты. Наиболее благоприятны для его развития условия степей юга России. Наиболее сильно засоряет посевы кукурузы, подсолнечника, злаковых, овощных, бахчевых и др. Необходимость изучения адвентивного элемента флоры связана с тем, что данный вид мало изучен, ограниченно распространён на территории России и является крайне опасным карантинным растением.

Целью исследования был поиск молекулярных маркеров для идентификации карантинного вида *Cenchrus longispinus*. Было исследовано 10 образцов, включающих 6 видов растений рода *Cenchrus* из различных регионов России, ближнего и дальнего зарубежья. Биологический материал был предоставлен ФГБУ ВНИИКР. Выделение ДНК проводили из зеленых листьев растений методом адсорбции на магнитных частицах. Была испытана 31 пара праймеров, относящихся к RAPD, ISSR, STS и Chloroplast intergenic psbA-trnH spacer маркерам.

ПЦР продукты были исследованы методом электрофореза, в 1,25% агарозном геле. Были получены потенциально информативные маркеры, относящиеся как к внутривидовой так и межвидовой дифференциации ценхруса.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГЕНОТИПОВ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.), РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СТЕПЕНИ УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАСОЛЕНИЮ, В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Богоутдинова Л.Р.^{1,2}, Халилуев М.Р.¹

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42

² Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия
E-mail: biotech@iab.ac.ru

В качестве растительного материала для исследований были использованы промышленный сорт томата Рекордсмен и селекционная линия ЯЛФ, использующаяся в качестве отцовской линии при получении гибрида F1 Юниор. Объектом для проведения экспериментов являлись 12-дневные проростки в фазе семядольных листьев, полученные из пророщенных в асептических условиях семян. Влияние засоления на рост и развитие проростков томата *in vitro* оценивали при их культивировании на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга с ½ концентрацией макроэлементов, дополненной 2% сахарозой, 0,2 мг/л ИМК и NaCl в различных концентрациях (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 и 300 мМ). Для этого в районе гипокотилия у проростков отсекали корневую часть, чтобы размер проростка составлял 1,5 см. Оценку результатов эксперимента проводили после 7 дней культивирования по количеству и длине регенерирующих корней, сухой и сырой биомассе корня и побега. Кроме того, на 8 день проводилась фиксация фрагмента семядольного листа для проведения световой микроскопии. Полутонкие срезы получали с помощью ультрамикротомы LKB-V, после чего их монтировали на предметные стекла.

В результате эксперимента установлено, что исследуемые генотипы томата существенно отличались по степени устойчивости к хлоридному засолению. Так, уже добавление в состав питательной среды NaCl в наименьшей концентрации (25 мМ) негативно влияло на количество регенерирующих корней у проростков линии ЯЛФ, а также сырой и сухой биомассе корней и побега по сравнению с контролем (среда без NaCl). При дальнейшем увеличении концентрации NaCl в среде наблюдалось достоверное снижение соответствующих показателей. Что касается сорта Рекордсмен, то концентрациями NaCl, существенно ингибирующими количество регенерирующих корней и снижающими их длину, является соответственно 150 мМ и 50 мМ. Максимальными концентрациями NaCl в питательной среде, при которых у проростков томата линии ЯЛФ и сорта Рекордсмен происходил ризогенез, являются 150 мМ и 250 мМ соответственно. При культивировании проростков на среде с большими концентрациями NaCl уже на 5 день наблюдалась некротизация тканей гипокотилия на месте среза. Кроме того, в условиях сильного засоления семядольные листья проростков проявляли признаки хлороза, степень которого возрастала с увеличением концентрации в среде NaCl. В ходе эксперимента установили сублетальные концентрации хлорида натрия для изученных генотипов: 150 мМ NaCl для линии ЯЛФ и 250 мМ NaCl для сорта Рекордсмен.

По результатам гистологического анализа семядольных листьев были выявлены различия в анатомическом строении эпидермальных и мезофильных клеток между исследуемыми генотипами. При культивировании проростков обоих генотипов на среде высоким уровнем хлоридного засоления объем клеток эпидермиса, столбчатого и губчатого мезофилла семядолей существенно уменьшался. Изменение размера и формы клеток данных типов тканей могут использоваться в качестве цитологических маркеров для сравнительной оценки генотипов томата по чувствительности к засолению.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01331 мол_а.

СОЗДАНИЕ НАБОРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ КАРТИРОВАНИЯ ГЕНА-ВОССТАНОВИТЕЛЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПРИ ЦМС Р-ТИПА В ЛИНИЯХ ОЗИМОЙ РЖИ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

Никифорова Н.В., Высоцкий Д.А., Харченко П.Н.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42
E-mail: biotech@iab.ac.ru

Для озимой ржи (*Secale cereale* L.) характерен сильный гетерозисный эффект, выражающийся в среднем в 15% прибавке урожая по отношению к сортам классической популяционной селекции, что позволяет создавать высокопродуктивные гибриды.

Наиболее эффективным методом получения высокопродуктивных гибридов ржи является селекция гибридов F1 на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). На сегодняшний день в селекционных программах в основном используют ЦМС Р-типа («Пампа»-типа), для которой известны гены-восстановители фертильности. ФГБНУ МосНИИСХ «Немчиновка» располагает коллекцией линий ржи, среди которых имеются линии, являющиеся донорами генов-восстановителей фертильности ЦМС Р-типа. Однако использование маркеров, описанных в литературе для известных генов-восстановителей фертильности, не дает никакого результата при попытке их детекции в линиях ржи отечественной селекции. Это может означать либо присутствие в этих линиях аллели, несцепленной с известными маркерами, либо наличие нового гена-восстановителя фертильности ЦМС Р-типа. Поэтому актуальной задачей является создание наборов молекулярных маркеров для картирования и выявления генов-восстановителей фертильности при ЦМС Р-типа в линиях ржи отечественной селекции.

Исследования проводились на базе лаборатории клеточной инженерии растений ВНИИСБ. 12 полиморфных участков генома ржи, находящиеся в разных хромосомах, охарактеризованы для нескольких генотипов отечественной селекции. На сегодняшний момент в охарактеризованных генотипах выявлен ряд однонуклеотидных замен, которые можно использовать в качестве молекулярных маркеров при создании картирующих популяций для локализации гена-восстановителя фертильности ЦМС Р-типа.

ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СООТНОШЕНИЯ АММОНИЙНОГО И НИТРАТНОГО АЗОТА В СОСТАВЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФОТОАВТОТРОФНЫХ И ФОТОМИКСОТРОФНЫХ ПРОРОСТКОВ ТОМАТА.

Турба А.А.^{1,2}, Халилуев М.Р.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва, Тимирязевская 42

² Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства, Москва 127550
E-mail: biotech@iab.ac.ru

Одним из ключевых факторов, влияющих на ростовые и физиолого-биохимические процессы культивируемых в условиях *in vitro* растений, регенерантов, а также изолированных органов и тканей, является базовый состав питательной среды. Цель настоящего исследования – изучить влияние присутствия углеводного компонента

(сахарозы), а также количественного соотношения аммонийной и нитратной форм азота в составе питательной среды, составленной на основе прописи среды MS, на морфометрические и физиолого-биохимические характеристики проростков томата. Объектом исследования служили 10-12-дневные асептические проростки томата (*Solanum lycopersicum* L.) сорта Форвард. На этапе образования 1-го настоящего листа у проростков отсекали корни и часть гипокотыля, чтобы длина побеговой части составляла 1.5–2 см. Впоследствии фрагменты переносили на агаризованные (0.7%) питательные среды для индукции ризогенеза (0.2 мг/л 3-индолилмасляной кислоты), различающиеся наличием (3%) или отсутствием сахарозы, а также количественным содержанием нитрата аммония (соответственно 0 и 18.8; 10.3 и 29.1; 20.6 и 39.4; 30.9 и 49.7; 41.2 и 60.0 мМ NH₄⁺ и NO₃⁻ соответственно). Остальные макро- и микроэлементы, а также витамины соответствовали прописи MS. После 15 суток культивирования проводили учет по числу и длине регенерированных корней, сырой и сухой биомассе корней и побеговой части проростка. Параллельно закладывался опыт для измерения дыхательного и фотосинтетического CO₂-газообмена укорененных проростков с помощью ИК-газоанализатора. В результате исследования было установлено, что число регенерируемых корней у фотоавтотрофных проростков томата было существенно меньше, чем у фотомиксотрофных. Высокие концентрации ионов аммония и нитрата (41.2 и 60 мМ NH₄⁺ и NO₃⁻ соответственно) приводили к уменьшению числа корней у фотоавтотрофных проростков томата. Что касается фотомиксотрофных проростков томата, то какой-либо очевидной зависимости между концентрацией нитратного и аммонийного форм азота и числа регенерируемых корней не выявлено. При отсутствии аммонийного азота в питательной среде длина корней у фотоавтотрофных проростков была в 3,5 раза больше, чем у фотомиксотрофных. Добавление катиона аммония в концентрациях 10.3 и 20.6 мМ в сочетании с 29.1, и 39.4 мМ аниона нитрата у последних приводило к постепенному увеличению их длины. Напротив, длина корней у фотоавтотрофных проростков томата не зависела от присутствия катиона аммония, а также количественного соотношения ионов NH₄⁺ и NO₃⁻. Наличие в среде катиона аммония в сочетании с различными концентрациями аниона нитрата способствовало увеличению сырой биомассы регенерированных корней (в 3.9–5.4 раза) и побега (в 2.1–2.6 раз) у фотомиксотрофных проростков томата. Подобного рода изменений у фотоавтотрофных проростков томата установлено не было. Схожая реакция наблюдалась и в отношении сухой биомассы корней и побеговой части проростка. Показано, что у фотоавтотрофных проростков томата интенсивность истинного фотосинтеза была значительно выше, чем у фотоавтотрофных. При этом присутствие NH₄⁺, а также количественное соотношение аммонийного и нитратного форм азота не оказывало достоверного влияния на интенсивность истинного фотосинтеза у фотомиксотрофных проростков.

БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ТРИТИКАЛЕ – ВЛИЯНИЕ ЭКСПЛАНТА

Акинина В.Н., Хомякова О.В., Поминов А.В.

**Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение
«НИИСХ Юго-Востока», 410010, Саратов
E-mail: kostina_vichka@mail.ru**

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

Наиболее подходящими эксплантами, формирующими эмбриогенный каллус у злаков, в том числе и тритикале, являются незрелые и зрелые зародыши. Зрелые зародыши являются идеальным эксплантом для индукции соматического эмбриогенеза, т.к. они могут использоваться для работы в течение круглого года. Зрелые зародыши тритикале с кусочками эндосперма в качестве ткани-«няньки» были наиболее подходящим эксплантом для индукции соматического эмбриогенеза у тритикале. В связи с отсутствием у стерильных растений зародыша необходимо подобрать эксплант, способный формировать тотипотентные клеточные культуры.

В наших исследованиях в качестве эксплантов были выбраны фрагменты побегов в стадии кущения (2-3 этап органогенеза), а также фрагменты колосьев (5-6 этап органогенеза).

Каллусообразование в культуре сегментов колоса происходит с частотой от 17,7 до 100%. Регенерация растений наблюдалась у всех изученных генотипов с различной частотой (8,3-100%) (таблица 1). При использовании в качестве эксплантов сегментов побегов каллусогенез происходит с такой же эффективностью, как и в культуре сегментов колоса, однако регенерация растений наблюдалась всего у трех генотипов (табл. 2). За годы исследований при использовании микроклонального размножения тритикале *in vitro* получено 253 растения.

Таблица 1. Эффективность микроклонального размножения тритикале в культуре *in vitro* сегментов колосьев.

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

Примечание: ¹ - гибриды: 399 – Прикумчанка х Красноколоска, 403 – Гелиос х Красноколоска, ² - гаплоиды: ПТГ оз. пш. Л15 х АД гекса (Леукурум 1701h389 х Саратовская 6).

Таблица 2. Эффективность микроклонального размножения тритикале в культуре *in vitro* сегментов побегов

Генотип	Кол-во эксплантов, шт	Частота каллусо- образования		Получено каллусов за 1-2 пассажа	Получено растений	
		шт	%		шт.	%
583 ²	9	7	77,8	18	2	11,1
596 ²	9	7	77,8	22	0	-
588 ²	4	2	50,0	7	0	-
584 ²	5	3	60,0	4	0	-
578 ¹	9	4	44,5	11	9	81,8
606 ²	11	7	63,6	20	0	-
582 ²	11	9	81,8	25	1	4,0
559 ¹	14	6	42,9	21	0	-
571 ¹	8	6	75,0	16	0	-
564 ¹	11	5	45,5	17	0	-
549 ¹	6	5	83,3	10	0	-
Всего	97	61	62,9	171	12	
F _{факт.}			1,0*			
НСР ₀₅			46,3			

Примечание: ¹ - гибриды: 578, 559 – Прикумчанка х Красноколоска, 571, 564, 549 – Гелиос х Красноколоска, ² - гаплоиды: ПТГ оз. пш. Л15 х АД гекса (Леукурум 1701h389 х Саратовская 6).

Биотехнология микроклонального размножения включает использование фрагментов колосьев на 5-6 этапе органогенеза в качестве эксплантов для получения тотипотентных клеточных культур (у стерильных растений отсутствует зародыш – эксплант, традиционно используемый для получения эмбрионного каллуса), их культивирование на питательной среде, содержащей 2,4-Д (2мг/л) и сахарозу в качестве источника углеводов (2%) для получения эмбрионного каллуса и последующую регенерацию растений на питательной среде с ИУК (1 мг/л). Оптимизированная биотехнология позволяет сохранять и размножать уникальные генотипы тритикале (отдаленные гибриды и гаплоиды).

ОГЛАВЛЕНИЕ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SSR МАРКЕРОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОБРАЗЦОВ СТЕРЖНЕВОЙ КОЛЛЕКЦИИ ВИР И ГИБРИДНЫХ КОМБИНАЦИЙ СКРЕЩЕВАНИЯ <i>BRASSICA RAPA</i> L. Беренсен Ф.А., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В.	3
ДИАГНОСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА <i>n-FABP</i> И ЕГО АССОЦИАЦИЯ С МЯСНЫМИ ПРИЗНАКАМИ У СВИНЕЙ Голубева Н.Г., Радченко М.В.	5
ЭФФЕКТИВНАЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i> В РАСТЕНИЯХ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> Валеева Л. Р., Нямсурэн Ч., Трошагина Д. С., Шарипова М.Р., Шакиров Е.В.	6
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ГЕНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Шкаликова М.В., Малоголовкин А.С.	7
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СРОКИ КОЛОШЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИИ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ <i>GALLEON</i> x <i>HARUNA NIJO</i> Теплякова С.Б.	8
СКРИНИНГ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ НА НАЛИЧИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ <i>LR</i>, <i>SR</i> И <i>YR</i> МЕТОДОМ ПЦР-АНАЛИЗА Трофимова И.А., Волкова Г.В., Шумилов Ю.В.	10
АНАЛИЗ ПРОМОТОРНЫХ ЗОН АБК-РЕГУЛИРУЕМЫХ ГЕНОВ <i>A.</i> <i>thaliana</i>, ГОМОЛОГИЧНЫХ ГЕНУ <i>AA1</i> Виноградов Н.С.	11
ПРОМОТОРЫ <i>pro-SmAMP1</i> И <i>pro-SmAMP2</i> ИЗ РАСТЕНИЯ <i>STELLARIA</i> <i>MEDIA</i>, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ЭКСПРЕССИЮ СЕЛЕКТИВНОГО ГЕНА, ПОЗВОЛЯЮТ ПОЛУЧАТЬ ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ТАБАКА Снычёва О.А., Комахин Р.А.	13
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>ORNIORRHIZA</i> ИЗ КИТАЯ И ТАЙЛАНДА ПО ДАННЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ITS Набатов А.А., Шанцер И.А.	15

ПРОМОТОР pro-SmAMP2 ИЗ РАСТЕНИЯ <i>STELLARIA MEDIA</i> СОХРАНЯЕТ ВЫСОКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ПОКОЛЕНИЯХ T₁-T₃ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ <i>NICOTIANA TABACUM</i> Кзакова К.А., Комахин Р.А.	17
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Р17 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Мима К.А., Бурмакина Г.С., Латыпов О.Р., Иматдинов А.Р., Титов И.А., Малоголовкин А.С.	18
ДЕЛЕЦИОННЫЕ ВАРИАНТЫ -1469 И -2550 П.Н. ПРОМОТОРА pro-SmAMP1 ИЗ РАСТЕНИЯ <i>STELLARIA MEDIA</i> АКТИВНЫ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА Маджарова Н.В., Комахин Р.А.	19
НОВЫЕ БИОЦИДНЫЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧЕРНОЙ НОЖКИ <i>DICKEYA SOLANI</i> Яремко А.Б., Мазурин Е.С.	21
ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ МИКРОКЛУБНЕЙ НА РАСТЕНИЯХ СОРТА НЕВСКИЙ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> Гизатуллина А.Т., Сташевски З.	22
ПЦР-АНАЛИЗ СОРТОТИПОВ СВЁКЛЫ (<i>BETA VULGARIS L.</i>) ДЛЯ ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ Федорин Д.Н., Федулова Т.П.	24
РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА ПРЕДАСТАВИТЕЛЕЙ РАЗНЫХ ВИДОВ СОРГО (<i>SORGHUM</i>) НА ОСНОВЕ МУЛЬТИЛОКУСНОЙ ПЦР Шалаева Т.В., Анискина Ю.В., Шилов И.А.	26
ПОЛУЧЕНИЕ <i>IN VITRO</i> МИКРОКЛУБНЕЙ НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОНТЕЙНЕРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ Колесова О.С., Овэс Е.В.	27
ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВЫХ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ Тимошенко А.А., Спеченкова Н.А., Шульга О.А., Мишуткина Я.В., Гапоненко А.К.	29
ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ <i>STEVIA REBAUDIANA</i> ВЕРТ. В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> Шульгина А.А., Калашникова Е.А.	31
КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО МЕТОДУ ВИТРИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ НОСИТЕЛЕЙ, ОСНОВАННЫХ НА ПРИНЦИПЕ ОХЛАЖДЕНИЯ В МИНИМАЛЬНОМ ОБЪЕМЕ Корниенко Е.В., Романова А.Б.	32

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРИМОРДИАЛЬНЫХ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК КУР Томгорова Е.К., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А.	34
АПРОБАЦИЯ PLUG-МАРКЕРОВ КАК ИНСТРУМЕНТА ИДЕНТИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА <i>DASYPYRUM VILLOSUM</i> В ГЕНЕТИЧЕСКОМ БЭКГРАНУДЕ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ Соколов П. А.	36
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДА КУР <i>IN VIVO</i> Ветох А.Н., Белоглазов Д.В., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А.	37
ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У РАСТЕНИЙ ЛЬНА В ОТВЕТ НА ИЗБЫТОК И НЕДОСТАТОК ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПОЧВЕ Мельникова Н.В., Коробан Н.В., Большева Н.Л., Сперанская А.С., Креницына А.А., Кудрявцева А.В., Дмитриев А.А.	38
R ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ В СЛОЖНЫХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДАХ КАРТОФЕЛЯ Фадина О. А., Бекетова М. П.	40
РАЗРАБОТКА НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ КУКУРУЗЫ ЛИНИЙ 5307 И MON89034 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ Моисеева М.В., Букина Е.Ю., Алексеев Я.И., Беленович Е.В., Кузубова О.В., Варламов Д.А., Мазурин Е.С., Харченко П.Н.	41
ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ОЗДОРОВЛЕННОГО СЕМЕННОГО КАРТОФЕЛЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ПОЛЕВОЙ ОБЫТНОЙ СТАНЦИИ РГАУ-МСХА ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА Полякова М.Н., Пастухов С.А., Хабарова Л.Н., Горбатов Д.А.	42
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПОЛУЛЯЦИЙ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ FGF И LIF Кашапова И.С., Межевикина Л.М., Косовский Г.Ю.	43
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ ДНК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВНУТРИВИДОВОГО И МЕЖВИДОВОГО РАЗЛИЧИЯ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ РОДА <i>CENCHRUS</i> С.В. Сыксин, А.А. Соловьев, Е.С. Мазурин, Ю.Ю. Кулакова	44
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГЕНОТИПОВ ТОМАТА (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.), РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СТЕПЕНИ УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАСОЛЕНИЮ, В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> Богоутдинова Л.Р., Халилуев М.Р.	45

СОЗДАНИЕ НАБОРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ КАРТИРОВАНИЯ ГЕНА-ВОССТАНОВИТЕЛЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПРИ ЦМС Р-ТИПА В ЛИНИЯХ ОЗИМОЙ РЖИ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ	46
Никифорова Н.В., Высоцкий Д.А., Харченко П.Н.	
ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СООТНОШЕНИЯ АММОНИЙНОГО И НИТРАТНОГО АЗОТА В СОСТАВЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФОТОАВТОТРОФНЫХ И ФОТОМИКСОТРОФНЫХ ПРОРОСТКОВ ТОМАТА.	46
Турба А.А., Халилуев М.Р.	
БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ТРИТИКАЛЕ – ВЛИЯНИЕ ЭКСПЛАНТА	48
Акинина В.Н., Хомякова О.В., Поминов А.В.	

