



РОССИЙСКО-БЕЛОРУССКИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Биомедицина и фармакология

Генетика животных

Сельскохозяйственная генетика
и биотехнология растений

Молекулярные биотехнологии

Биоинформатика

наука — 

И ТЕХНОЛОГИИ

Сибири

НАУКА И ТЕХНОЛОГИИ СИБИРИ

Выпуск 7 — Российско-белорусские генетические технологии
Ноябрь 2022 г.

Учредитель:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Сибирское отделение Российской академии наук».
630090, Россия, Новосибирск,
проспект Академика Лаврентьева, дом 17.

Издатель:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Сибирское отделение Российской академии наук».
630090, Россия, Новосибирск,
проспект Академика Лаврентьева, дом 17.

Главный редактор:

академик Валентин Николаевич Пармон.

Редакционный совет:

академики РАН Михаил Воевода, Николай Колчанов, Василий Фомин, Дмитрий Маркович, генеральный директор АО «Академпарк» Дмитрий Верховод, заместитель полномочного представителя Президента России в СФО Вадим Головкин, председатель Совета ректоров СФО профессор Николай Пустовой, заместитель председателя СО РАН д.ф.-м.н. Сергей Сверчков (ответственный за выпуск).

Редакционная группа:

Заместитель главного редактора Сергей Сверчков, Лариса Деева, Владимир Ларин, Андрей Соболевский, Татьяна Урбах, Любовь Батраева, Юлия Андреева.

Фото

авторов представленных материалов и из открытых источников.

Дизайн:

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный университет архитектуры, дизайна и искусств имени А.Д. Крячкова» ректор Багрова Наталья, арт-директор Чешева Татьяна, дизайнеры: Теряева Анна, Перегудова Вероника, Юнг Виктория, Кирпичникова Снежана.

Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-82311

от 03.12. 2021 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Адрес редакции: 630090, Россия, Новосибирск,
проспект Лаврентьева, 17, каб. № 224, тел.: 8 (383) 217-45-78,
e-mail: l.batraeva@sb-ras.ru

Отпечатано в ООО «Новосибирский издательский дом»
630048, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 104
Тел.: (383) 299-29-80, e-mail: knigosibirsk@yandex.ru
<http://книгосибирск.рф/>

Подписано в печать 14.11.2022

Бумага мелованная. Печать офсетная.

Тираж 800 экз. Свободная цена.

Перепечатка материалов только с письменного разрешения редакции.
Изданию присвоен номер ISSN: 2782-4969

© Сибирское отделение РАН, 2022





обращение главного редактора

4

экспертные статьи

6

биомедицина и фармакология

18

В номере

стр. 4 Обращение главного редактора
академика В. Н. Пармона

стр. 6 Практическое использование
генетических технологий в Беларуси.
Опыт сотрудничества с Российской Федерацией

стр. 11 Научное братство

стр. 18 Метод выявления вероятности развития
остеопороза с патологическими переломами

стр. 24 Фармакогенетический подход в оценке
риска лекарственных осложнений при терапии
шизофрении

стр. 28 Разработка способа количественной
оценки генетической предрасположенности
к развитию полигенных патологий

стр. 31 Использование полноэкзомного
секвенирования для диагностики сложных
случаев в педиатрии

стр. 35 Молекулярный тест
для дооперационной диагностики узловых
образований щитовидной железы

стр. 39 Углеродминеральные сорбенты
на основе оксида алюминия СУМС-1

стр. 41 Прорывные разработки Института
химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН в области биофармацевтики
и биомедицины

стр. 46 Способ выявления мутаций 2282del4,
R501X, R2447X в гене филаггрина (FLG) при
вульгарном ихтиозе и atopическом дерматите

стр. 48 Технология молекулярно-генетической
диагностики семейной гиперхолестеринемии
методом таргетного высокопроизводительного
секвенирования

стр. 51 Способ выявления мутации p.L265P
в гене MYD88

стр. 53 Технология диагностики
и персонализированной терапии моногенных
форм сахарного диабета

стр. 56 Технология лечения злокачественных
новообразований «Каранакан»

стр. 64 Персонализированные технологии
прогноза социально значимых заболеваний
человека на основе молекулярно-генетических
маркеров



генетика животных

68

стр. 68 Центр генетических ресурсов лабораторных животных — ключевая инфраструктура в импортозамещении модельных организмов для биоиспытаний

стр. 70 Использование генетических маркёров в животноводстве



сельскохозяйственная генетика и биотехнология растений

78

стр. 78 Молекулярно-цитогенетические методы, направленные на создание эффективной технологии получения гибридов тритикале и секалотритикум

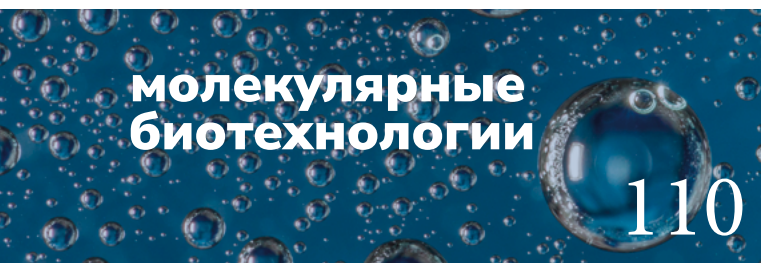
стр. 83 Молекулярная генетика злаковых и плодовых культур для решения практических вопросов в сельском хозяйстве

стр. 87 Тест-система для экспресс-диагностики смешанных инфекций лесных древесных растений

стр. 96 Разработка и внедрение комплекса селекционно-генетических технологий и создание на их основе сортов зерновых культур, адаптированных к различным экологическим зонам

стр. 99 Применение биотехнологии соматического эмбриогенеза в качестве основы для программы MVF в России

стр. 103 Биотехнология получения посадочного материала перспективных для сибирского региона сортов голубики топяной и ее гибридов



молекулярные биотехнологии

110

стр. 110 Производство ферментных препаратов для нужд биотехнологии

стр. 114 Геномные биотехнологии для животноводства в Беларуси



биоинформатика

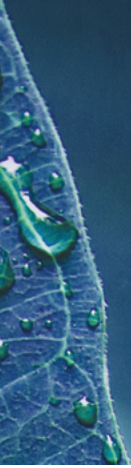
122

стр. 122 ANDSystem: когнитивная система для реконструкции и анализа графа знаний (генных сетей) на основе автоматического извлечения знаний из текстов научных публикаций, патентов и фактографических баз данных

стр. 126 ANDDigest — система семантического поиска информации в научных статьях и патентах на основе методов автоматического анализа текстов и машинного обучения



3



Сельскохозяйственная генетика и биотехнология растений

78	Молекулярно-цитогенетические методы, направленные на создание эффективной технологии получения гибридов тритикале и секалотритикум
83	Молекулярная генетика злаковых и плодовых культур для решения практических вопросов в сельском хозяйстве
87	Тест-система для экспресс-диагностики смешанных инфекций лесных древесных растений
96	Разработка и внедрение комплекса селекционно-генетических технологий и создание на их основе сортов зерновых культур, адаптированных к различным экологическим зонам
99	Применение биотехнологии соматического эмбриогенеза в качестве основы для программы MVF в России
103	Биотехнология получения посадочного материала перспективных для сибирского региона сортов голубики топяной и ее гибридов

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДОВ ТРИТИКАЛЕ И СЕКАЛОТРИТИКУМ



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, пр. Академика Лаврентьева, д. 8/2, г. Новосибирск, 630090

Вершинин Александр Васильевич

заведующий лабораторией молекулярной генетики, доктор биологических наук
тел. +7-383-363-9074, avershin@mcb.nsc.ru

Евтушенко Елена Васильевна

старший научный сотрудник, кандидат биологических наук
тел. +7-383-363-9075, evt@mcb.nsc.ru

Гацкая Сима Сергеевна

младший научный сотрудник
jait@mail.ru



Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», ул. Академическая, 27, г. Минск, Беларусь, 220072

Люсиков Олег Михайлович

научный сотрудник
тел. +375 17 284-18-48, O.Lyusikov@igc.by

Гордей Иван Андреевич

профессор, доктор биологических наук
тел. +375 17 284-18-48, I.Gordej777@mail.ru

Отдаленная гибридизация, т.е. скрещивание между разными видами и родами, в результате которой получаются аллополиплоидные гибриды, является важнейшим фактором в эволюции культурных злаков и широко используется в их селекции. Смысл отдаленной гибридизации — в достижении у гибридов более полного использования природного генетического потенциала или генетического разнообразия, что присутствует в каждой из родительских форм. Например, в известных гибридах тритикале, которые получаются при скрещивании материнских форм пшеницы (*Triticum* L.) и отцовских форм ржи (*Secale* L.), ученые ставят целью соединить гены, определяющие высокую продуктивность и высокое качество зерна, характерные для пшеницы, с генами ржи, контролирующими высокое содержание белков в зерне, высокое содержание лизина, высокую устойчивость ко многим болезням, засухе, зимостойкости.

Это направление скрещивания долгие годы было наиболее приоритетным, если не единственным, которое использовалось в селекции гибридов между пшеницей и рожью. Тритикале обладают рядом достоинств — высоким потенциалом продуктивности, повышенным содержанием белка и отдельных аминокислот, высокой питательной ценностью. В результате селекции на продуктивность в период с 1968 по 1991 год максимальная урожайность тритикале выросла почти в четыре раза (с 2,5 до 9,7 т/га). Республика Беларусь по посевным площадям озимого тритикале занимает третье место в Европе, уступая только Польше и Германии (Гордей и др., 2011).

Какие трудности возникают при получении отдаленных гибридов, почему этот процесс не поставлен на поток? Основное препятствие состоит в несовместимости двух разных геномов в одной гибридной клетке. Скрещивания между пшеницей и рожью происходят относительно легко по сравнению со скрещиваемостью других близких видов и родов растений. Например, значительно труднее получить жизнеспособные гибриды между пшеницей и ячменем или между ячменем и рожью. Несовместимость двух разных геномов выражается прежде всего в нарушении нормального процесса деления гибридных клеток и правильного расхождения хромосом родительских геномов в дочерние клетки. Это сопровождается потерей хромосом или их протяженных участков и, соответственно, всех генов, содержащихся в данных хромосомах.

Генетический контроль за процессом деления клеток у всех видов растений и животных осуществляет специализированный участок хромосом — центромера, который в соответствии со своим названием располагается, как правило, в центре хромосомы. На молекулярном уровне наиболее специализированной, универсаль-

ной характеристикой активной центромеры является наличие специфического белка, который входит в состав нуклеосом центромерного участка хромосом и является ключевым компонентом центромеры. У растений этот белок называется гистон CENH3. Рисунок 1 иллюстрирует важность присутствия белка CENH3 в центромерах. В обычной «нормальной» клетке хромосомы (рисунок 1, слева, меченные красным красителем молекулы CENH3 указывают позиции центромер) при делении равномерно расходятся к полюсам и потом располагаются в дочерних клетках. В гибридных клетках, например, при скрещивании двух видов ячменя (рисунок 1, справа) из-за межвидовых различий в структуре CENH3 эти молекулы не включаются в центромеры некоторых хромосом (красные сигналы отсутствуют в хромосомах, указанных стрелками). Такие хромосомы не отходят к полюсам при делении клетки и обречены на потерю вместе со всеми генами, локализованными в них. Именно эта проблема — селективная элиминация отдельных хромосом — является основным, но не единственным препятствием к получению жизнеспособных гибридов, сохраняющих и реализующих генетический потенциал и лучшие свойства родительских форм.

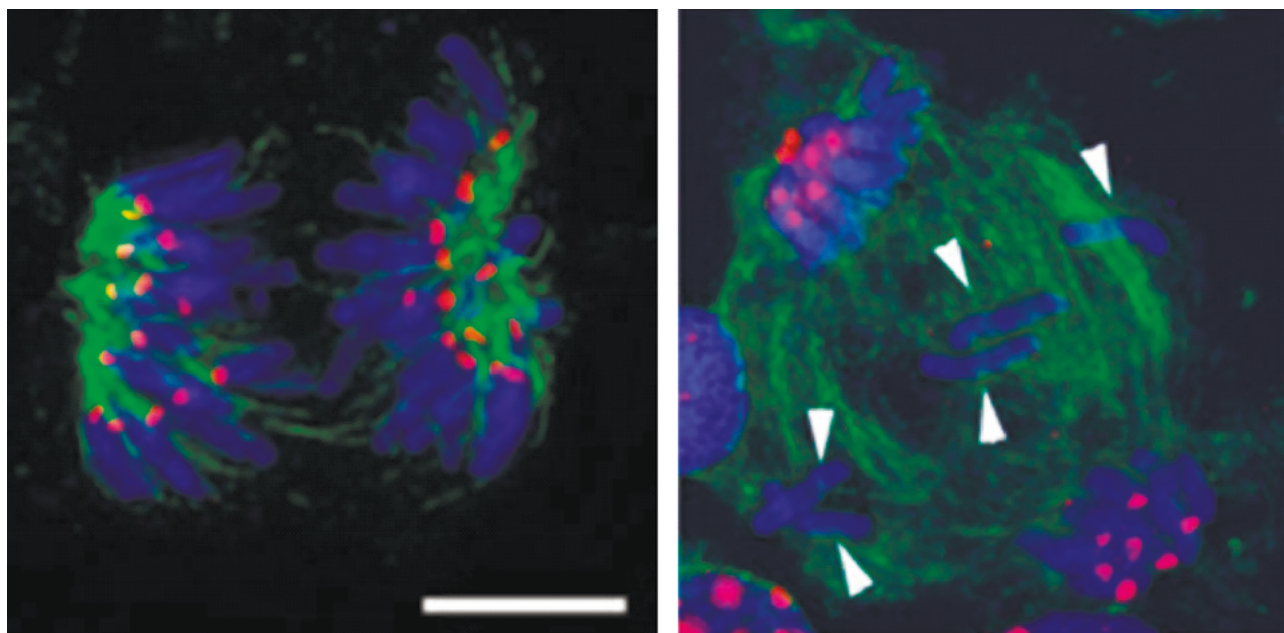


Рисунок 1. Иллюстрация роли центромерного белка CENH3 в правильном перемещении хромосом к полюсам в процессе деления: слева - «нормальной» клетки; справа - гибридной клетки, содержащей хромосомы от скрещивания двух видов ячменя *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum* (взято из Sanej et al., 2011). Хромосомы, в центромеры которых не вошел белок CENH3, показаны стрелками.

Еще одним препятствием для селекционеров, стремящихся при скрещивании объединить лучшие свойства родителей, является слабое проявление желательных полезных родительских признаков у получаемых гибридов. Как правило, наиболее часто наблюдается неполное проявление генетического потенциала отцовской формы вследствие того, что её геном (т.е. все отцовские гены) в ядре гибридной клетки попадает в окружение чужеродной материнской цитоплазмы. Например, даже лучшие современные отечественные и зарубежные сорта тритикале наряду с достоинствами обладают рядом недостатков. В частности, пока до конца не решены проблемы устойчивости к корневым гнилям, снежной плесени, септориозу, спорынье, требуется повышение зимостойкости. Эти недостатки обусловлены неполной экспрессией генома ржи, недостаточной реализацией ее генетического потенциала адаптивности.

Принципиальное значение для расширения генофонда и создания селекционно ценных гибридов может иметь другой тип скрещивания, в результате которого образуются ржано-пшеничные амфидиплоиды ($\times$ Secalotriticum =

Secale L. $\times$ Triticum L.). Такие скрещивания, как правило, затруднены вследствие проявления реакции несовместимости, о чём мы упоминали выше. В ходе многолетних исследований в лаборатории цитогеномики Института генетики и цитологии НАН Беларуси д.б.н. И. А. Гордей и его сотрудники установили, что использование в скрещиваниях с материнской формой ржи вида-посредника тритикале в качестве источника генома пшеницы оказалось эффективным для преодоления барьера несовместимости исходных видов. Ученые получили новые гибриды, которые назвали секалотритикум ($\times$ Secalotriticum). У секалотритикум создаются более благоприятные условия для быстрой коадаптации и сбалансированного функционирования геномов исходных видов, в частности для усиления экспрессии генетических систем ржи и проявления ее ценных адаптивных признаков.

Несколько лет назад у нас в лаборатории молекулярной генетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН возникла идея совместной работы с белорусскими коллегами. Она состоит в том, чтобы сочетать традиционные методы генетики и селекции с современ-

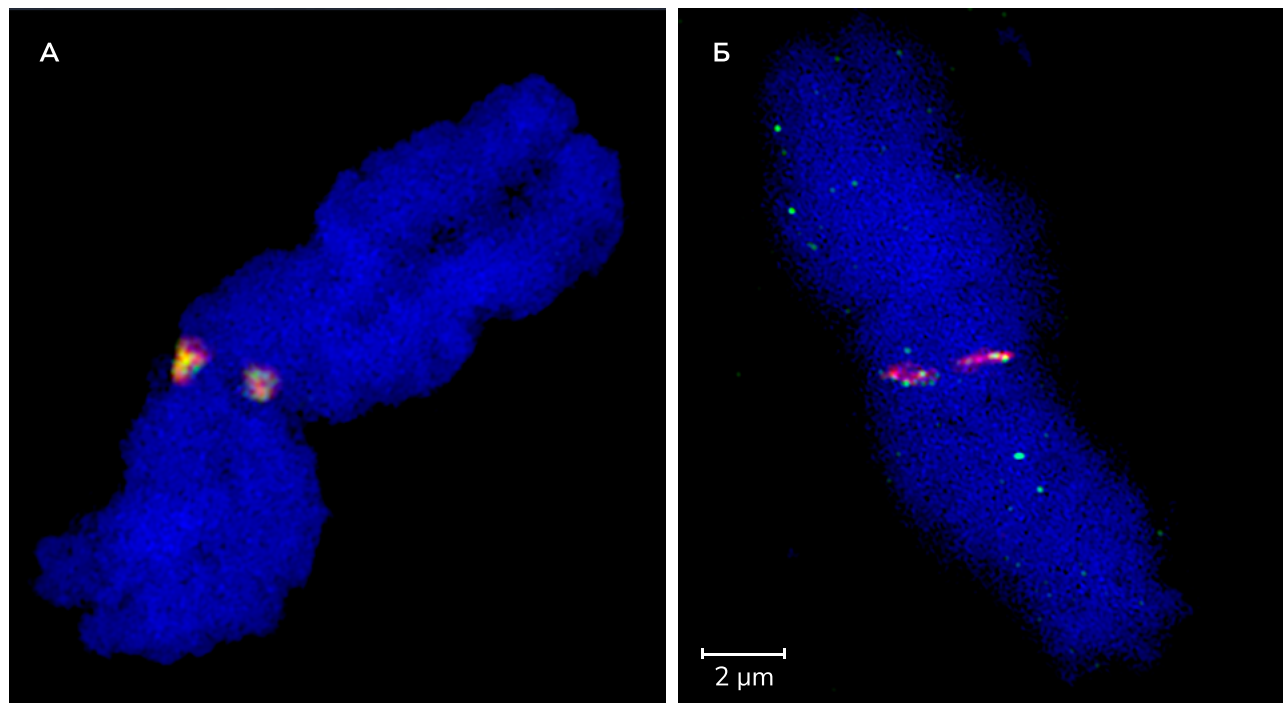


Рисунок 2. Локализация вариантов центромерного белка α CENH3 (красные сигналы) и β CENH3 (зеленые сигналы) в центромерных районах хромосом ржи (А) и пшеницы (Б). Желтые сигналы показывают участки перекрытия обоих вариантов.

ными молекулярными подходами и достижениями в понимании тонкой структуры хромосом. Мы полагаем, что такое исследование будет способствовать разработке эффективной технологии получения продуктивных гибридных форм для использования в селекции.

В момент начала наших исследований молекулярная организация центромер молекулярная структура центромерного гистона CENH3 у таких видов злаков, как пшеница, рожь, была практически не изучена в отличие, например, от риса, кукурузы, арабидопсиса. Поэтому на первых этапах мы создали молекулярную основу, которую составили современные молекулярные и цитогенетические методы, и далее применили ее к анализу молекулярной организации центромер у гибридов тритикале и секалотритикум. Какие результаты мы получили к настоящему моменту?

1. Мы определили, что пшеница и рожь, в отличие от кукурузы и риса, содержат две формы белка CENH3, α CENH3 и β CENH3, и, соответственно, два гена, кодирующие эти формы. Белки α CENH3 и β CENH3 заметно различаются размером, молекула α CENH3 на 15 аминокислот длиннее мо-

лекулы β CENH3 у ржи и на 13 аминокислот у пшеницы. Вместе с тем при сравнении последовательностей аминокислот обоих белков между рожью и пшеницей выявляется, что они очень похожи, т.е. высоко гомологичны. Небольшие различия между этими видами локализуются только в некоторых позициях в N-терминальном домене, который участвует в образовании высокомолекулярной структуры хроматина в центромере. Другая часть последовательности CENH3, которая относится к HFD домену (участку C-терминального домена белка), участвует в связывании этих белков с ДНК хромосомы и имеет высококонсервативную структуру. Такая высокая гомология аминокислотных последовательностей обеспечивается высокой гомологией кодирующих участков соответствующих генов.

2. На основании полученных знаний об аминокислотном составе белков были получены антитела к этим двум формам, которые мы использовали в дальнейшем цитогенетическом анализе. Эти антитела хорошо определяют место локализации центромер на цитологических препаратах и, соответственно, их размеры (рисунок 2).

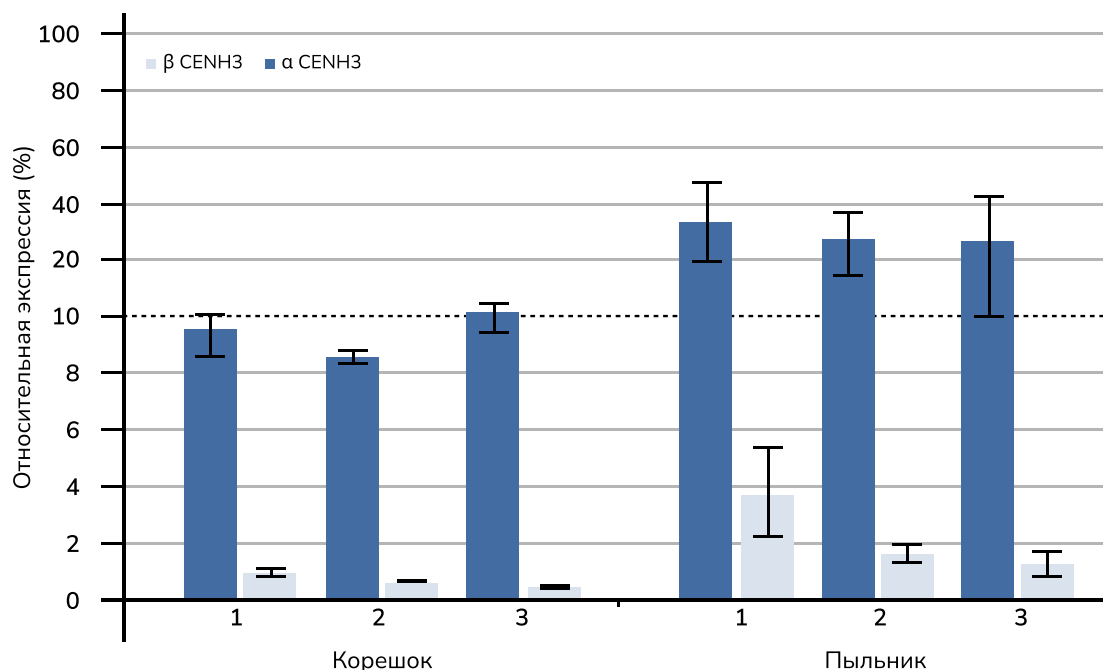


Рисунок 3. Нормализованные уровни транскрипции генов α CENH3 и β CENH3 на различных стадиях индивидуального развития растений: 1 — рожь, сорт «Верасень»; 2 — тритикале, сорт «Міхась»; 3 — гибрид секалотритикум STr B8M (F12 Секалотритикум ((Верасень x Міхась) x Міхась))».

3. Гибридные комбинации секалотритикум, использованные в наших экспериментах, представляют собой 12-е поколение секалотритикум в свободном посеве. Наш цитогенетический анализ подтвердил результаты минских коллег о наступившей стабилизации генотипов гибридных растений, что дало основания использовать их в дальнейшем исследовании. Анализ сигналов α CENH3 и β CENH3 на отдельных стадиях митоза и мейоза у гибридов трех комбинаций скрещиваний с помощью конфокальной микроскопии показал наличие сигналов в хромосомах на протяжении всего процесса деления клетки. Это указывает на синхронизированный характер синтеза и динамики включения обоих вариантов белков в нуклеосомы центромерного хроматина в интерфазе деления.

4. Следующий вопрос, который представлял специальный интерес, заключался в сравнении уровней экспрессии генов, кодирующих белки α CENH3 и β CENH3, на отдельных стадиях индивидуального развития аллополиплоидных гибридов тритикале, секалотритикум и соответствующих родительских форм. Уровни экспрессии оценивались методом RT (Real Time) PCR на двух комбинациях скрещивания. На рисунке 3 представлены относительные уровни экспрессии генов у одной из гибридных комбинаций: отцовской родительской формы ржи «Верасень», материнской формы тритикале «Михась» и гибрида секалотритикум между ними. На другой комбинации, в которой материнская форма была представлена тритикале «Дубрава», были получены подобные данные. Из этих результатов можно сделать следующие выводы:

- Гены центромерного гистона H3, α CENH3 и β CENH3, экспрессируются на всех стадиях индивидуального развития растений как у родителей, так и у гибридов. При этом уровень транскрипции α CENH3, как правило, на порядок превышает соответствующий уровень β CENH3.
- Уровни экспрессии обеих форм CENH3 многократно увеличиваются (в 6,5–11,2 раз) в генеративной ткани по сравнению с вегетативной, что логично следует из увеличения интенсивности деления клеток в генеративных тканях.

- Уровни экспрессии α CENH3 и β CENH3 у гибридов секалотритикум и тритикале соответствуют максимальному уровню экспрессии у лучшей по этому показателю родительской формы.

Обобщая результаты проведенного исследования, мы можем сделать заключение, что центромеры обладают способностью адаптироваться к новому генетическому окружению. Впервые установлено, что высокая идентичность в структуре центромерного гистона CENH3 между различными видами ржи и пшеницы является одним из важнейших условий высокого уровня экспрессии этого белка в гибридах с различной цитоплазмой. Это обеспечивает правильное спаривание и расхождение хромосом в процессе деления гибридных клеток и, соответственно, точную передачу генетической информации от родителей к гибридам. Мы полагаем, что значительно приблизились к ответу на вопрос, почему скрещивания различных видов пшеницы и ржи оказались наиболее успешными с точки зрения получения воспроизводимого продуктивного потомства. Мы можем рекомендовать использовать анализ структуры центромерных белков, и прежде всего центромерного гистона CENH3, в качестве быстрого тестера на вероятность получения стабильных фертильных гибридов при подборе родительских пар для скрещивания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (Проект № 18-54-00013 Бел_a) и Российского научного фонда (Проект № 19-14-00051-П) ■

Список литературы:

1. Гордей И. А., Белко Н. Б., Люсиков О. М. Секалотритикум (x Secalotriticum): генетическая основа для создания и формирования генома. Минск, Издательство «Беларусская наука», 2011.
2. Sanei, M.; Pickering, R.; Kumke, K.; Nasuda, S.; Houben, A. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 108: 498–505, 2011.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ЗЛАКОВЫХ И ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ВОПРОСОВ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ



Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», ул. Академическая, 27, г. Минск, Беларусь, 220072

Урбанович Оксана Юрьевна

заведующий лабораторией,

доктор биологических наук, доцент

тел. +375 29 750 99 62, O.Urbanovich@igc.by

Задача развивать исследования, направленные на получение практических результатов, была поставлена перед нами много лет тому назад. Одни из первых результатов, полученных в данном направлении, касались разработки методов ДНК-идентификации сортов сельскохозяйственных растений. Исследуя распространение и структуру простых повторов, мы смогли оценить генетическое разнообразие ряда злаковых, плодовых и ягодных культур, установить родственные связи между сортами, гибридами и видами. На основе полученных теоретических результатов нами были разработаны методы ДНК-идентификации сортов пшеницы, картофеля, основных плодовых и ягодных культур, выращиваемых в стране. Эти методы оказали помощь селекционерам в систематизации селекционного материала, выделении уникальных генотипов, устранении повторяющихся образцов в коллекционном материале и др. Экономический эффект от их практического применения значительно превысил средства, выделенные на их разработку.

Безусловно, наибольшее практическое значение для селекционных учреждений имеют знания

о хозяйственно ценных генах, которые содержат сорта сельскохозяйственных культур. И с начала двухтысячных годов мы приступили к разработке методов маркер-сопутствующей селекции для нужд селекционных учреждений страны. В этом направлении мы работаем в тесном сотрудничестве с селекционерами, инициатором которого был академик А. В. Кильчевский. Так, нами были разработаны и внедрены в селекционный процесс яблони эффективные методы идентификации на основе ДНК-маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям, генов, влияющих на хозяйственно ценные признаки. В результате были разработаны системы скрещивания и получены гибридные формы новой генерации с комплексной устойчивостью к парше, мучнистой росе, красногалловой яблонной тле, бактериальному ожогу, с длительным сроком хранения плодов за счет пирамидизации генов в одном геноме. Совместно с Институтом плодоводства создан сорт яблони Полонез, который в настоящее время пользуется повышенным спросом у потребителей.

Большое внимание было уделено маркер-сопутствующей селекции пшеницы. Разработаны и внедрены в селекционный процесс этой важнейшей для Республики Беларусь культуры методы ДНК-идентификации генов устойчивости к болезням, оказывающих влияние на качество и массу зерна, высоту растения, тип развития, адаптацию к условиям окружающей среды и др. Проведено ДНК-генотипирование сотен генотипов. По результатам исследований разработаны, в частности Е. А. Фоминой с соавторами, методические рекомендации, созданы базы данных и информационные ресурсы. Благодаря этому селекционерам удобно использовать полученную информацию о генетическом

потенциале сортов как белорусской селекции, так и селекции других стран в своей работе, целенаправленно подбирать сорта для скрещивания. Результатом этой работы являются совместно полученные сорта.

Для Беларуси большое значение имеет устойчивость сортов к действию абиотических и биотических стрессов, так как только здоровые растения могут реализовать свой потенциал продуктивности. Погодные условия в стране не всегда оказываются благоприятными для роста и развития сельскохозяйственных растений. Исследование молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессу является одной из актуальных проблем современной генетики культурных растений. Значимость исследований в этой сфере объясняется большой экономической важностью проблемы.

Генетическая основа устойчивости к разного вида стрессам сложна. На сегодняшний день не было выявлено какого-либо «главного» гена или группы генов, продукт которых отвечал бы за формирование устойчивости к стрессу. Возможности, появившиеся в связи с развитием технологий секвенирования транскриптома растений, свидетельствуют, что в формировании устойчивости к стрессу принимают участие совершенно различные гены, которые могут быть вовлечены в генные сети. И мы в настоящее время обратили свое внимание на гены, вовлеченные в стрессовый ответ. Од-

ним из ключевых модуляторов стрессового ответа у растений считаются stress-associated proteins (SAPs). П. В. Кузмицкой была проведена идентификация *in silico* генов, кодирующих SAP, в геноме яблони домашней сорта Golden Delicious и обнаружен 21 ген, каждый из которых кодирует белок, содержащий как минимум один консервативный домен, характерный для этого семейства. Было показано, что экспрессия стресс-ассоциированных белков у яблони происходит, вероятнее всего, непрерывно, однако изменения условий роста растения могут приводить к увеличению ее уровня у отдельных генов. При этом характерной особенностью изучаемой группы генов является высокая скорость накопления транскриптов в первые 2–4 часа, с последующим ее снижением (рис. 1). Анализ нуклеотидной структуры регионов, расположенных перед генами, свидетельствует о вовлеченности стресс-ассоциированных белков в сложную сеть взаимодействия регуляторных белков, управляющих жизнедеятельностью растительных клеток. Полученные данные будут являться основой для дальнейшего экспериментального изучения роли отдельных генов в ответе на стресс и выделения генов-кандидатов для селекции сортов, имеющих повышенную устойчивость к стрессовым воздействиям.

Большое внимание уделяется созданию трансгенных растений. Работы в этом направлении начались еще в восьмидесятые годы

	0 ч	2 ч	4 ч	24 ч	
sap 1	0,11	0,96	1,2	0,11	0
sap 2	1,13	1,2	1,93	0,22	2
sap 3	2,42	0,79	0,99	6,36	4
sap 4	0,76	2,36	9,38	1,04	6
sap 6	0,75	4,77	12,04	3,06	8
sap 8	0,07	0,05	0,05	0,04	10
sap 11	0,01	0,61	0,52	1	12
sap 12	0,16	2,96	6,05	3,13	
sap 16	0,23	0,79	0,71	0,41	
sap 17	0,69	0,72	0,66	0,44	
sap 19	0,1	0,61	3,76	0,46	
sap 20	1,67	1,41	1,92	0,66	
sap 21	0,97	2,13	3,74	1,55	

Профиль экспрессии генов, кодирующих стресс-ассоциированные белки, в условиях действия засухи на подвой яблони сорта ММ-106 с точками измерения на 0 ч, 2 ч, 4 ч, 24 ч. Цветовая шкала отражает изменение уровня экспрессии генов.



1



2

под руководством академика Н. А. Картеля. В лаборатории молекулярной генетики, которой он руководил до 2012 года, были созданы трансгенные растения табака, арабидопсиса, картофеля, наперстянки, рапса с генами *rhIA* и *rhIB* биосинтеза рамнолипидов, эндохитиназы *chiA*, *cry3A* *Bacillus thuringiensis*, кодирующего дельта-эндотоксин, *CYP11A1* цитохрома *p450* *scc* животного происхождения, глюкозооксидазы, устойчивости к гербициду глюфосинату и др. Работы велись как самостоятельно, так и в тесном сотрудничестве с российскими учеными и учеными других стран.

И здесь мы сталкиваемся с очень серьезной проблемой. Если бы такие растения были получены традиционными методами селекции, они бы безусловно вызвали интерес у селек-

ционеров. Но трансгенные растения не спешат выращивать на наших полях. Генетически модифицированные сорта выращиваются в странах Северной и Южной Америки, Африке, Австралии, регионах юго-восточной Азии, но не в Европе, России и Беларуси. Люди с осторожностью относятся к ГМО, и это факт, с которым невозможно не считаться. Но возрастающее с каждым годом количество видов и сортов трансгенных растений, а также посевные площади, которые они занимают, говорят о том, что от данной технологии отказываться не будут, она будет расширяться и захватывать новые рынки.

В настоящее время мы используем трансгенные растения для изучения функции генов и выделения генов-кандидатов для создания трансгенных растений с хозяйственно ценными признаками. Так, гены, кодирующие *NAD(P)H* дегидрогеназы (*ndb*), играют важную роль в реакции растений на стресс. Считается, что вместе с альтернативной оксидазой они участвуют в образовании нефосфорилирующей дыхательной цепи при окислительном стрессе и подавляют образование активных форм кислорода. Мы выделили ген *ndb2* из генома арабидопсиса, создали эффективные векторные конструкции, в которых данный ген был встроен как в прямой, так и в обратной ориентации. В результате были получены трансгенные растения табака, несущие ген *ndb2* арабидопсиса. Мы изучаем свойства этих растений, поскольку ожидается, что они должны иметь измененный уровень АФК и, соответственно, защитную систему клетки, работающую в ином режиме, будут устойчивы к стрессу, в частности к резкому перепаду температур. Это исследование выполнялось совместно с учеными из Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск) под руководством д.б.н. Г. Б. Боровского.

Если говорить о новых методах создания генетически модифицированных организмов, то это в первую очередь модификация генома с помощью системы CRISPR/Cas. Метод появился менее 10 лет назад и сразу привлек к себе внимание

1. Каллусогенез и растения табака, трансформированного конструкцией *pRGEB31-gRNA4*, на селективной среде.

2. Сорт озимой пшеницы НПЦ 1 в питомнике (2018 г.)

исследователей. CRISPR/Cas9 считается одним из мощнейших инструментов редактирования геномов. С применением методов биоинформатики и онлайн-ресурсов А. М. Шишловой-Соколовской с коллегами было проведено моделирование и синтезированы искусственные спейсеры для нокаута гена мишени *pds* *Nicotiana tabacum*, кодирующего фермент 15-цис-фитоендесатуразу. Растения с нарушенной работой данного гена приобретают фенотип альбиноса, что является удобным признаком для отбора трансформантов. Исследования на модельной линии табака показали возможность использования бинарного вектора pRGEV31 для разработки технологии геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9 системы. В результате впервые в нашей стране нами были получены с по-

мощью системы CRISPR/Cas растения табака (рис. 2). В дальнейшем мы планируем использовать эту систему для получения сортов сельскохозяйственных растений с новыми свойствами. И хотя сейчас растения, полученные методом геномного редактирования, относятся к трансгенным, совершенствование технологии CRISPR/Cas позволяет уже сейчас получать генотипы, в которых отсутствуют чужеродные маркерные гены устойчивости и промоторы. Изменению подвергается только непосредственно область редактирования, иногда один нуклеотид. Активно обсуждается вопрос о том, чтобы на такие организмы не распространялись правила и ограничения, принятые для трансгенных растений, что откроет большие возможности для их использования ■



ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ СМЕШАННЫХ ИНФЕКЦИЙ ЛЕСНЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ



Государственное научное учреждение «Институт леса Национальной академии наук Беларуси»,
ул. Пролетарская, 71,
г. Гомель, Беларусь, 246001

Падутов Владимир Евгеньевич

заведующий химико-технологической группой,
заведующий научно-исследовательским отделом генетики,
селекции и биотехнологии, член-корреспондент НАН
Беларуси, доктор биологических наук
тел. +375 29 3967832, forestgen@mail.ru

Пантелеев Станислав Викторович

ведущий научный сотрудник лаборатории геномных
исследований и биоинформатики, кандидат биологических наук
тел. +375 29 1978264, stasikdesu@mail.ru

Каган Дмитрий Ильич

заведующий лабораторией генетических ресурсов
тел. +375 29 1280641, quercus-belarus@mail.ru

Тест-система предназначена для молекулярно-генетической идентификации видового состава ассоциаций основных групп фитопатогенов на основании использования технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР). Набор рассчитан на проведение 600 анализов, включая референс-стандарты. Набор предназначен для диагностики фитопатогенов в растительном материале, почве и др.

Принцип метода

Методологические принципы идентификации инфекции основаны на особенностях нуклеотидной структуры локусов рибосомальной ДНК

фитопатогенов: высоком уровне консервативности основных функциональных доменов генов рРНК, высоком уровне межвидовой изменчивости межгенных спейсеров (выражающейся в варьировании структуры и размеров локусов), низком уровне внутривидового полиморфизма генов рРНК и межгенных спейсеров, высоком уровне копийности рибосомального оперона и единообразии основного мотива копий рибосомального оперона.

Алгоритм анализа включает в себя получение препаратов суммарной ДНК (содержащей генетический материал фитопатогенов), амплификацию диагностических локусов патогенов методом классической ПЦР, электрофоретический анализ ампликонов и интерпретацию



Фитопатологический анализ растительного материала: пробоподготовка.

результатов. Данная технология может быть использована для диагностики основных групп фитопатогенов лесных древесных видов в растительных образцах, включая определение латентной инфекции в семенном и посадочном материале, в чистых культурах, образцах почвы, воды и прочем при проведении фитопатологического анализа специализированными лабораториями учреждений и инспекций по карантину и защите растений, а также научных учреждений.

Интерпретация электрофоретических спектров ПЦР-продуктов образцов заключается в следующем: размер электрофоретических фракций патогенов (и растений) при использовании универсальных праймеров является величиной видоспецифичной, которая представлена в базе данных, и используется в качестве критерия для проведения видовой идентификации фитопатогенов. В случае смешанных инфекций и в объектах окружающей среды ПЦР-спектры будут являться многофракционными, т.е. содержать генетический материал более чем одного вида микроорганизмов. Интенсивность окраски фракций в ПЦР-спектрах смешанных инфекций будет связана с количественным содержанием того или иного фитопатогена в образце.

Использование универсальных праймеров может быть применимо как при работе с чистыми культурами изолятов патогенных грибов, так и при непосредственном анализе растительных



Фитопатологический анализ растительного материала: получение препаратов ДНК.

тканей и объектов окружающей среды (почва, вода и пр.). При этом в ходе анализа имеется возможность выявления и описания не только отдельных видов, но и их сообществ, т.е. осуществлять метагеномный подход при анализе патогенетических состояний.

Состав тест-системы

1. Комплект А, содержащий набор реагентов для выделения суммарной ДНК из растительных образцов в количестве, достаточном для приготовления 600 аналитических образцов, — 1 уп.
2. Комплект Б, содержащий набор реагентов для выделения суммарной ДНК из почвенных образцов в количестве, достаточном для приготовления 600 аналитических образцов, — 1 уп.
3. Комплект В, содержащий набор реагентов для проведения ПЦР-амплификации в количестве, достаточном для выполнения 600 тест-реакций, — 1 уп.
4. Набор референс-стандартов — образцы ампликонов локусов фитопатогенов в количестве, достаточном для выполнения 300 тест-реакций, — 1 уп.

Аналитические характеристики тест-системы

1. Специфичность.

Видоспецифичность размеров ампликонов для различных доминирующих видов фитопатогенов составляет не менее 99,5 %

2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов диагностики фитопатогенов в одном и том же контрольном образце с пороговым содержанием патогена не превышает 5 %.

3. Линейность.

Линейность определения локусов вирусного генома в диапазоне концентраций от 100–10000 копий/мкл составляет 85–115 %.

4. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая набором концентрация локусов фитопатогенов

в препаратах нуклеиновых кислот не превышает 60–70 копий/мкл.

5. Динамический диапазон.

Динамический диапазон измерений метода 60–300 000 копий локусов фитопатогенов в 1 мкл препарата нуклеиновых кислот.

Интерпретация результатов может проводиться в сочетании с другими фитопатологическими тестами и диагностическими процедурами.

Меры предосторожности

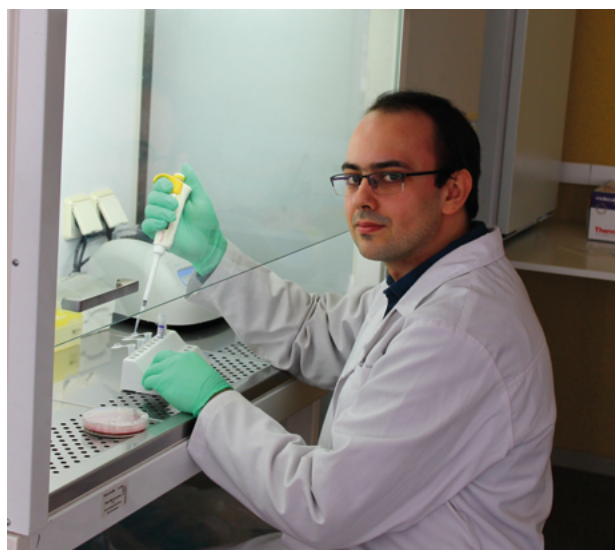
Тест-система для экспресс-диагностики смешанных инфекций лесных древесных растений биологически безопасна, так как содержит неактивные образцы фрагментов локусов фитопатогенов. Однако при работе с любыми реактивами, содержащими компоненты нуклеиновых кислот (в том числе с тестируемыми образцами), их следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, который может содержать различные возбудители заболеваний. Поэтому все работы с тест-системой необходимо проводить в резиновых перчатках, избегать контакта с кожей и слизистыми оболочками. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ПЦР, на-

пример, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Необходимые материалы и оборудование, не входящие в тест-систему

- Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10 000–15 000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, с диапазоном рабочих температур от 0 до +25 °С.
- Лабораторный гомогенизатор биологических образцов.
- Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от -10 до +99 °С.
- Микроцентрифуга-вортекс.
- Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл; 10–100 мкл; 100–1000 мкл).
- ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха.
- Холодильник с интервалом рабочих температур от +2 до +4 °С.
- Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 °С.



ПЦР-анализ чистых культур возбудителей болезней растений.



Высокопроизводительное секвенирование (NGS) на базе геномного секвенатора Ion Torrent PGM.

- Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки препаратов нуклеиновых кислот.
- УФ-стерилизатор или его аналог.
- Термоциклер.
- Генетический анализатор или биоанализатор.
- УФ-трансиллюминатор.
- Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером и принтером.

Набор расходных материалов и лабораторных аксессуаров: резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром до 10, 20, 200, 1000 мкл, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого термоциклера, матированные стеклянные пестики, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др.

Анализируемые образцы

1. Первичный отбор анализируемых образцов растительных тканей.

Материалом для выделения ДНК с целью диагностики генетического материала фитопатогенов являются образцы вегетативных и генеративных органов растений (с подозрением на развитие инфекционных патологических процессов или наличие латентной инфекции), почвенных проб.

2. Хранение растительных образцов.

Хранение растительного материала перед выделением ДНК осуществляется: кратковременно — при 2...4 °С (до 3 суток), среднесрочно (3 суток — 1 год) — при -16...-18 °С, долгосрочно (1-10 лет) — в жидком азоте, или при -16...-18 °С с применением специальных коммерческих растворов или консервирующей среды следующего состава: 10 мМ ЭДТА pH 7,0, 70 % этанол. В случае использования консервирующей среды образцы перед заморозкой следует выдержать в растворе при 4 °С в течение 3-5 часов.

Проведение анализа

1. Общие замечания и предупреждения при работе с тест-системой.

- Реагенты набора стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке, только при указанной температуре хранения для каждого из типов комплектов А-В.
- Необходимо пользоваться новым одноразовым наконечником для каждого образца.
- Запрещается использовать реагенты из тест-систем разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов.
- Не путать элементы упаковки реагентов во избежание кросс-контаминации.
- Плотнo закрывать флаконы с реагентами сразу после использования.
- Пипетировать стандарты и образцы на дно лунок. Для пипетирования рекомендуется держать пипетку вертикально над лункой и раскапывать соответствующий раствор в центр лунки для достижения полного смешивания.
- Все реагенты и требуемое количество пробирок до начала анализа выдержать не менее 30 мин при комнатной температуре (от 20 до 25 °С). Все реагенты необходимо перемешать, избегая появления пены. Упаковку комплектов А-В необходимо вскрывать только по истечении указанного времени прогрева, чтобы избежать конденсации влаги, приводящей к порче реагентов.

Выделение суммарной ДНК из растительных образцов

Навеску тканей растений (масса 5-15 мг) поместить в центрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, содержащую 500 мкл компонента А1. Далее, используя прокаленные стеклянные пестики, произвести гомогенизацию материала при комнатной температуре в течение 30-40 с. По окончании гомогенизации пробирку с растертыми тканями закрыть и перемешать содержимое на вихревом смесителе (400-600 мин⁻¹) в течение 5 с. После этого пробирку поместить на водяную баню и инкубировать в течение 30 мин. при 65 °С.

После экстракции пробирку охладить до комнатной температуры и к образцу добавить 500 мкл компонента А2. Содержимое перемешать на вортексе (200 мин⁻¹) в течение 20 мин.

при комнатной температуре. Далее произвести центрифугирование при 13000xg ($T = 18-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. После этого пипеткой отобрать 500 мкл супернатанта, перенести в другую центрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл и добавить к нему 100 мкл компонента А3. Содержимое перемешать на вихревом смесителе (400 мин - 1) и инкубировать на водяной бане в течение 10 мин. при $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. После инкубации добавить 500 мкл компонента А4. Содержимое перемешать на вортексе (200 мин - 1) в течение 10 мин. при комнатной температуре, после чего центрифугировать при 5000xg ($T = 18-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин.

По окончании центрифугирования пипеткой отобрать 300 мкл супернатанта и перенести в другую центрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, после чего добавить 300 мкл компонента А5. Содержимое перемешать на вихревом смесителе (400 мин - 1) и оставить на 60 мин. при комнатной температуре. Далее произвести центрифугирование при 13000xg ($T = 18-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 20 мин.

Супернатант слить, а полученный осадок ДНК растворить в 400 мкл компонента А6. Далее

добавить 500 мкл компонента А7 и оставить на 30 мин. После промывки содержимое пробирки центрифугировать при 8000xg ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. Супернатант слить, а полученный осадок ДНК растворить в 200 мкл компонента А8, затем к раствору прилить 100 мкл компонента А9. Пробирки инкубировать на ледяной бане ($T = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 20 мин., после чего центрифугировать при 13000xg ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. Далее к отобранному супернатанту добавить 300 мкл компонента А10 и оставить на 20 мин., после чего центрифугировать при 13000xg ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин.

Полученный осадок ДНК промыть 1000 мкл компонента А11, охлажденным до температуры $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. После промывания содержимое пробирки центрифугировать при 15000xg ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин.

После промывки этанолом пробирки разместить в штативе и, открыв крышки, просушить осадок ДНК в течение 30–40 мин. ($T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Высушенный осадок растворить в 100 мкл компонента А12 во встряхивающей ванне (200 мин - 1) при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранить при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ для после-



Тест-система для идентификации патогенов растений.

дующего анализа. Количество полученной суммарной ДНК в препарате оценивают с помощью спектрофотометра.

Выделение суммарной ДНК из почвенных проб

Навеску образца массой 100 мг поместить в центрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, содержащую 1000 мкл компонента Б1. Далее произвести гомогенизацию материала при комнатной температуре с прокаленного стеклянного пестика и дальнейшим перемешиванием содержимого пробирок на вихревом смесителе (2400–2600 мин⁻¹) в течение 10 мин.

После гомогенизации образцы центрифугировать при 15000×g (T = 25 °C) в течение 30 мин. По окончании центрифугирования пипеткой отобрать 750 мкл супернатанта, перенести в другую центрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл и смешать с 750 мкл компонента Б2. Далее произвести перемешивания содержимого пробирок на вихревом смесителе (400–600 мин⁻¹) в течение 10 мин. центрифугировать при 15000×g (T = 25 °C) в течение 20 мин.

По окончании центрифугирования пипеткой отобрать 700 мкл супернатанта, перенести в другую центрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл и добавить 750 мкл компонента Б3. Содержимое пробирки перемешать на вихревом смесителе (600 мин⁻¹) и инкубировать (T = 35 °C) в течение 30 мин. Далее произвести центрифугирование при 15000×g (T = 25 °C) в течение 30 мин. Супернатант слить, а к полученному осадку ДНК добавить 1000 мкл компонента Б4 и перемешать путем инвертирования пробирок. Затем содержимое пробирки центрифугировать при 15000×g (T = 4 °C) в течение 10 мин. Процедуру промывки этанолом провести 2–3 раза для удаления из осадка различных примесей ингибирующих ПЦР.

Далее полученный осадок ДНК растворить в 200 мкл компонента Б5, затем к раствору прилить 100 мкл компонента Б6. Пробирки инкубировать на ледяной бане (T = 0 °C) в течение 20 мин., после чего центрифугировать при 13000×g (T = 4 °C) в течение 10 мин. Далее к отобранному супернатанту добавить 300 мкл охлажденного компонента Б7 и оставить на 20 мин., после чего центрифугировать при 13000×g (T = 4 °C) в течение 10 мин. Полученный осадок ДНК промыть 1000 мкл компонента Б8 аналогичным способом. После промывания содержимое пробирки центрифугировать при

15000×g (T = 4 °C) в течение 10 мин. После промывки пробирки разместить в штативе горизонтально и, открыв крышки, просушить осадок ДНК в течение 30–40 мин. (T = 45 °C).

Высушенный осадок растворить в 100 мкл компонента Б9 во встряхивающей ванне (200 мин⁻¹) при 40 °C в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранить при 4 °C для последующего анализа.

Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формируется следующим образом: компонент Б1 – 2,5 мкл, компонент Б2 – 1 мкл, компонент Б3 – 1 мкл, компонент Б4 – 0,2 мкл, образец ДНК – 1 мкл. Конечный объем доводится компонентом Б5 до 25 мкл.

Для проведения ПЦР более 1 образца готовится общий раствор, в который входят все компоненты смеси в количестве, соответствующем числу образцов, кроме образца ДНК. Образец вносится индивидуально в каждую пробирку, содержащую аликвотированный (на 1 анализ) общий раствор.

Программа амплификации: 1 этап (1 цикл): длительная денатурация. t = 3 мин, T = 94 °C. 2 этап (35 циклов): денатурация. t = 15 сек, T = 94 °C. Отжиг. t = 15 сек, T = 60 °C. Элонгация. t = 45 сек, T = 72 °C. 3 этап: длительная элонгация. t = 6 мин, T = 72 °C. (1 цикл): Охлаждение реакционной смеси. t = 5 мин, T = 4 °C.

Электрофоретический анализ

Электрофоретический анализ выполняется в системах с высоким уровнем дискретности фракционирования: генетических анализаторах или биоанализаторах.

Интерпретация результатов

Использование тест-системы характеризуется особенностями при диагностике грибных заболеваний голосеменных и покрытосеменных видов. В случае электрофоретического анализа ПЦР-продуктов образцы инфицированных растений хвойных видов на фореграммах будут представлены одной или несколькими зонами — выявляемый генетический материал фитопатогенных грибов, в то же время здоровые растения будут характеризоваться

отсутствием ДНК возбудителей заболеваний. ПЦР-спектр образцов покрытосеменных видов кроме генетического материала патогена в случае инфицированных растений будет содержать и ампликоны растения-хозяина, что связано с гомологией нуклеотидных последовательностей в местах отжига универсальных праймеров грибов и цветковых растений. При анализе бактериальной инфекции ПЦР-спектр проб всех видов растений кроме генетического материала патогена в случае инфицированных растений будет содержать и ампликоны растения-хозяина, что связано с гомологией нуклеотидных последовательностей в местах отжига универсальных праймеров в геноме бактерий и органелл (митохондрий и хлоропластов) растений.

Видовая идентификация фитопатогенов проводится на основании сравнения результатов электрофоретического анализа с данными, представленными в таблице.

Учет результатов анализа

Результаты диагностики заносятся в лаборатор-

ный журнал или базу данных.

Условия хранения и эксплуатации тест-системы

- Тест-система должна храниться в упаковке предприятия-изготовителя в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при соответствующей температуре для каждого из комплектов в защищенном от света месте и относительной влажности воздуха не более 70 % в течение всего срока годности. Срок годности тест-системы 12 месяцев.
- Запрещается использовать вместе компоненты из разных серий.
- Не допускается использование компонентов после окончания срока годности, указанного на этикетке.
- Запрещается использовать реагенты других фирм-производителей.
- Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению тест-системы ■



РАЗМЕРЫ АМПЛИКОНОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЛОКУСОВ
 ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ (ФРАГМЕНТ БАЗЫ ДАННЫХ)

Вид	Наименование флуоресцентного канала		
	FAM	NED	VIC
1	3	4	-
<i>Alternaria alternata</i>	244	347	-
<i>Alternaria</i> sp.1	244	346	-
<i>Alternaria</i> sp.2	244	346	-
<i>Alternaria</i> sp.3	244	346	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	259	342	-
<i>Botrytis cinerea</i>	226	333	-
<i>Cercospora kikuchii</i>	225	331	-
<i>Cercospora microsora</i>	225	329	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	234	336	-
<i>Cladosporium herbarum</i>	238	336	-
<i>Cladosporium</i> sp.1	233	336	-
<i>Cladosporium</i> sp.2	237	336	-
<i>Cladosporium</i> sp.3	236	336	-
<i>Cryptococcus pinus</i>	222	377	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	222	343	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	231	328	-
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	229	337	-
<i>Lophodermium pinastri</i>	203	332	-
<i>Melampsora pinitorqua</i>	269	418	-
<i>Melampsoridium betulinum</i>	329	406	-
<i>Meria laricis</i>	222	336	-
<i>Microsphaera alphitoides</i>	300	364	-
<i>Microsphaera betula</i>	298	362	-
<i>Phoma herbarum</i>	217	342	-

Вид	Наименование флуоресцентного канала		
	FAM	NED	VIC
<i>Phoma macrostoma</i>	218	342	-
<i>Phoma pomorum</i>	218	342	-
<i>Phoma sp.2</i>	218	342	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	303	433	-
<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	257	350	-
<i>Rhodotorula sp.</i>	230	392	-
<i>Rhytisma acerinum</i>	215	334	-
<i>Sclerophoma pithya</i>	259	348	-
<i>Sistotrema sp.</i>	251	402	-
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	254	304	-
<i>Sporobolomyces sp.</i>	226	392	-
<i>Sydowia polyspora</i>	260	349	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	1208/1210/1287
<i>Burkholderia sp.</i>	-	-	721/729
<i>Corynebacterium sp.</i>	-	-	450/454
<i>Cupriavidus sp.</i>	-	-	597/608
<i>Erwinia sp.</i>	-	-	538/574
<i>Frateuria sp.</i>	-	-	570
<i>Leifsonia sp.</i>	-	-	548/565
<i>Oxalobacter sp.</i>	-	-	1069
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	595/613
<i>Ralstonia sp.</i>	-	-	583/588
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	-	572
<i>Wautersia sp.</i>	-	-	619/620
<i>Xanthomonas sp.</i>	-	-	564
<i>Xylella sp.</i>	-	-	550

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ КОМПЛЕКСА СЕЛЕКЦИОННО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ И СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ СОРТОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР, АДАПТИРОВАННЫХ К РАЗЛИЧНЫМ ЭКОЛОГИЧЕСКИМ ЗОНАМ



Сибирский НИИ растениеводства и селекции – филиал
Федерального государственного
бюджетного научного
учреждения «Федеральный
исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения
Российской академии наук»,
ул. С-100, здание 21,
Новосибирская область,
р.п. Краснообск, 630501



Федеральное государственное
бюджетное научное
учреждение «Федеральный
исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения
Российской академии наук»,
пр-т Академика Лаврентьева, 10,
г. Новосибирск, 630090

Лихенко Иван Евгеньевич

руководитель СибНИИРС, доктор
сельскохозяйственных наук

Советов Владимир Викторович

старший научный сотрудник СибНИИРС,
кандидат сельскохозяйственных наук

Лихенко Надежда Николаевна

ведущий научный сотрудник СибНИИРС,
кандидат сельскохозяйственных наук

Орлова Елена Арнольдовна

ведущий научный сотрудник СибНИИРС,
кандидат сельскохозяйственных наук

Григорьев Юрий Николаевич

старший научный сотрудник СибНИИРС

Салина Елена Артемовна

профессор, главный научный сотрудник,
доктор биологических наук
тел. +7-913-924-5421

Леонова Ирина Николаевна

старший научный сотрудник, доктор биологических наук

Щербань Андрей Борисович

профессор, главный научный сотрудник,
доктор биологических наук

Шоева Олеся Юрьевна

старший научный сотрудник, кандидат биологических наук

Комплекс технологий разработан в ФИЦ «ИЦиГ СО РАН» на основе современных генетических достижений (определение структуры генома пшеницы и ячменя, создание набора специальных генетических маркеров), включения в селекционный процесс результатов изучения мирового генофонда мягкой пшеницы и ячменя, коллекционных фондов СибНИИРС, ИЦиГ СО РАН, ВИР. Комплекс позволяет ускорить создание сортов зерновых культур с высоким потенциалом продуктивности, планируемого качества зерна, устойчивых к поражению распространенными патогенами.

В состав комплекса входят:

1. Структура геномов российских сортов мягкой пшеницы и ячменя, полученных в ходе работы, разработанные на их основе новые генетические маркеры и информационные ресурсы (от 15 до 250 тысяч маркеров на геном), базы данных по генотипам и фенотипам сортов мягкой пшеницы и ячменя;
2. Генетические технологии ускоренного создания селекционных линий мягкой пшеницы и ячменя по заданным характеристикам, включающие описание способов создания линий методами маркер-ориентированной селекции и дигаплоидными технологиями, перечень разработанных ДНК-маркеров и перечень линий, созданных и используемых в качестве доноров хозяйственно ценных генов;
3. Селекционные технологии, включающие выделенный перечень созданных и охарактеризованных линий — доноров ценных признаков и родительских форм с различной продолжительностью вегетации, высоким потенциалом продуктивности, качеством зерна, устойчивостью к полеганию и поражению патогенами; перечень созданных с использованием выделенных родительских форм высокопродуктивных сортов мягкой пшеницы и ячменя селекции ИЦиГ СО РАН.



1



2



3



4

Линии мягкой пшеницы яровой с разным сроком колошения, полученные методом маркер-ориентированной селекции:

- 1) линия 598-17, Ppd-D1a, Vrn-B3a;
- 2) линия 517-1, Ppd-D1b, Vrn-B3.

Линия ячменя, устойчивая к пыльной головне, полученная путем введения гена Run8 методом МОС:

- 3) линия 79 + ген Run8;
- 4) контроль с поражением.

Использование комплекса генетических и селекционных технологий позволило:

- создать платформу для ускоренного получения сортов зерновых культур по заданным характеристикам, включающую маркер-ориентированную селекцию и диплоидные технологии, реализация которой позволит обеспечить интенсивное и стабильное повышение конкурентоспособности зернового комплекса в различных регионах России;
- создать сорта яровой (Новосибирская 31, Новосибирская 18, Новосибирская 41, Новосибирская 16) и озимой (Новосибирская 3, Новосибирская 51) мягкой пшеницы, ячменя (Ача, Биом), которые возделывают в 15 субъектах Российской Федерации.

Разработанный комплекс по функциональности и совокупности подходов адаптирован для использования в различных климатогеографических регионах Российской Федерации и не имеет аналогов по направлению ускоренного создания сортов мягкой пшеницы. Способы создания селекционного материала, линии-доноры хозяйственно ценных признаков, сорта яровой мягкой пшеницы защищены патентами на изобретения, селекционные достижения – свидетельствами о государственной регистрации.

Комплекс применяется для ускоренного создания сортов ячменя и мягкой пшеницы в различных регионах Российской Федерации и адаптируется для селекции зернобобовых культур. Доноры хозяйственно ценных признаков и селекционные линии пшеницы и ячменя, созданные с использованием комплекса генетических и селекционных технологий, переданы для использования в четырех селекционных центрах Российской Федерации ■



ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ ПРОГРАММЫ MVF В РОССИИ



Институт леса им. В. Н. Сукачева
Сибирского отделения
Российской академии наук –
обособленное подразделение
ФИЦ КНЦ СО РАН (ИЛ СО РАН)
Академгородок, д. 50, стр. 28,
г. Красноярск, 660036

Третьякова Ираида Николаевна

ведущий научный сотрудник лаборатории лесной генетики
и селекции, доктор биологических наук, профессор
тел. (391) 249-46-25, +7-913-045-2433,
culture@ksc.krasn.ru

Пак Мария Эдуардовна

научный сотрудник лаборатории лесной генетики
и селекции
тел. +7-913-562-8155, mtavi@bk.ru



Третьякова Ираида
Николаевна, ведущий
научный сотрудник
лаборатории лесной
генетики и селекции,
доктор биологических наук,
профессор



Пак Мария Эдуардовна,
научный сотрудник
лаборатории лесной генетики
и селекции

Программа Multi-Varietal Forestry, MVF, основанная на применении биотехнологии соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*, является одним из перспективных направлений сортового плантационного лесоразведения (Park, 2014). Применение данной технологии в сочетании с геномной селекцией и криоконсервацией создает базу для получения хозяйственно ценных генетически тестированных клонов и элитных генотипов, а также позволяет сохранить генетические ресурсы видов хвойных на долгие годы (Klimaszewska, Cyr, 2002; Park et al., 2016; Ding et al., 2018). MVF обеспечивает большую генетическую выгоду, чем тради-

ционная селекция деревьев, сокращает время, необходимое для разработки сортов и производства посадочного материала. Постоянно обновляющиеся данные, полученные в результате полевых испытаний сортов, позволяют динамически управлять разнообразием плантаций с течением времени путем тщательного балансирования генетического прироста и разнообразия и обеспечивают гибкость для адаптации к меняющимся целям селекции, окружающей среде, болезням и насекомым (Park et al., 2016).

В начале XXI века в институте леса им. В. Н. Сукачева СО РАН (Красноярск) была разработана

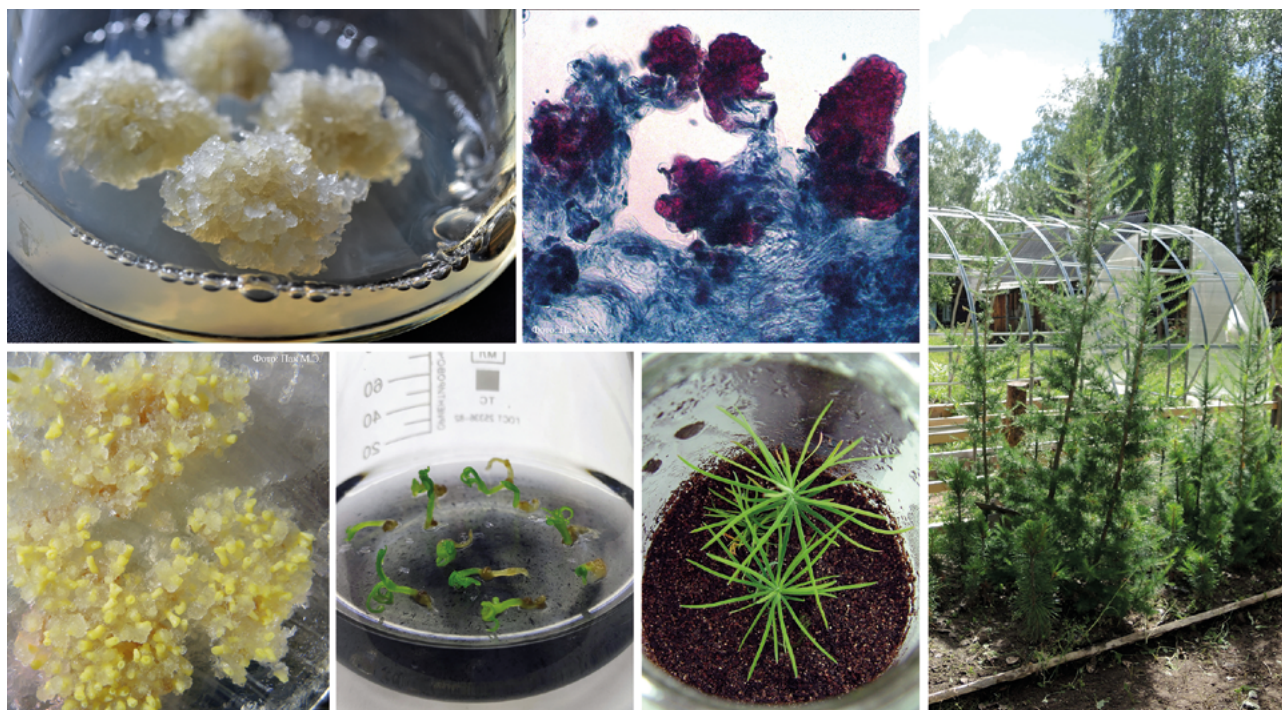


Рис. 1. Технологические этапы получения лабораторных образцов клонов лиственницы сибирской через биотехнологию соматического эмбриогенеза:

а – пролиферация эмбрионально-суспензорной массы, б – гистология эмбрионально-суспензорной массы (глобулы соматических зародышей – красные, суспензоры – синие), в – созревание соматических зародышей, г – прорастание соматических зародышей, д – адаптированные клоны в почвенном субстрате в условиях климатической камеры, е – клоны лиственницы сибирской на стационаре «Погорельский бор» ИЛ СО РАН.

биотехнология соматического эмбриогенеза для сибирских видов хвойных: *Larix sibirica* (патент RU2456344C2, Третьякова), *Pinus sibirica*, *Pinus pumila*, *Picea obovata*. Пролитерирующие клеточные линии (КЛ) сохраняют жизнеспособность около года и могут быть криоконсервированы. 42 длительно пролитерирующие клеточные линии были получены у *Larix sibirica*. Возраст культур достигает 14 и более лет. КЛ лиственницы состояли из эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) и отличались по числу и размеру глобулярных зародышей, способности соматических зародышей созревать и прорасти. У разных клеточных линий на 1 г сырой ЭСМ число глобулярных соматических зародышей колеблется от 2040 до 11103, созревает от 10 до 1220 зародышей. Проведенное генотипирование по девяти ядерным микросателлитным локусам показало слабую изменчивость. Выявленные аллели по большинству локусов соответствовали материнскому дереву-донору. Цитогенетические исследования КЛ показали, что в течение двух лет

число хромосом в клетках остается стабильным и характерным для *Larix sibirica* ($2n=24$). Пloidность эмбриогенных КЛ начинает изменяться с трехлетнего возраста, что проявлялось в значительной вариации числа хромосом в метафазных клетках. Однако единичные клеточные линии сохраняли генетическую стабильность по меньшей мере в течение шести лет.

Приготовление лабораторного образца клонированных сеянцев лиственницы сибирской из ЭСМ, готового для высадки в теплицу, занимает 4–9 месяцев: 1 этап – инициация ЭСМ продолжается 30–45 суток (среда АИ с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) и 6-бензиламинопурином (6-БАП)); 2 – этап пролиферации идет от 1–2 мес., у отдельных клеточных линий способность к пролиферации сохраняется уже 14 и более лет при регулярном субкультивировании (среда АИ с 2,4-Д и 6-БАП) (рис. 1а); 3 этап – созревание соматических зародышей в течение 20–60 дней (среда АИ с абсцизовой кислотой (АБК) и индолил-3-масляной кисло-

той (ИМК))) (рис. 1б, в), 4 этап — прорастание соматических зародышей занимает 5–8 недель (среда $\frac{1}{2}$ АИ без гормонов и витаминов) (рис. 1г), 5 этап — адаптация проростков в стерильной почве в условиях ростовой камеры в течение 3 мес. (рис. 1д). Клонированные сеянцы, достигшие высоты 2–3 см, имеющие хорошо развитый корень и эпикотиль, готовы для высадки в теплицу. В теплице сеянцы выдерживают 1 год, подвергают регулярному уходу (полив и борьба с сорняками), после чего сеянцы высаживают в почву лесопитомника (рис. 1е).

Клоны лиственницы сибирской характеризуются интенсивным ростом. Показатели их роста превышали в 1,4 раза деревья, полученные из семян. Клонированные деревья не имели внешних признаков повреждения лиственничной почковой галлицей. В семилетнем возрасте у клонированных деревьев появились генеративные органы (микро- и мегастробилы), которые развились в последующий весенне-летний период. Генотипирование клонов по микросателлитным локусам показало полную их генетическую идентичность клеточной линии, из которой они были получены. В настоящее время на клонах и высокопродуктивных деревьях-донорах активно ведутся работы по контролируемому опылению (рис. 2а, б).

Таким образом, соматический эмбриогенез является важной биотехнологией в размножении хвойных видов, в том числе для разработки и производства сортов деревьев с желательными селекционными признаками. Данная технология может быть успешно реализована в крупномасштабном коммерческом производстве. Наиболее важным преимуществом производства хвойных деревьев методом соматического эмбриогенеза является то, что эмбрионные клеточные линии могут быть криогенно сохранены в ювенильном состоянии неограниченно долго для длительного хранения гермоплазмы, что было невозможно при других методах размножения деревьев. Это позволяет проводить длительные полевые испытания и последующий отбор тестируемых сортов.

Производители посадочного материала хвойных растений, работающие по биотехнологии соматического эмбриогенеза, представлены только зарубежными компаниями, которые занимаются коммерческим лесовыращиванием (Ding et al., 2018; Park et al., 2018). Косвенные аналоги в России: посадочный материал из семян производят во многих питомниках, озеленительных центрах, лесных хозяйствах. Однако традиционное семенное размножение не может обеспечить генетическую однородность, а сле-



Рис. 2. Эксперимент по контролируемому опылению: пакеты-изоляторы на лиственнице сибирской.

довательно, и гарантировать передачу хозяйственно ценных характеристик. Традиционные способы вегетативного получения генетически однородного посадочного материала (прививки и черенки) для многих видов растений малоэффективны, чтобы применять их в промышленных масштабах, особенно при условии ограниченного количества исходных маточных растений. Разработанная авторами проекта биотехнология соматического эмбриогенеза для *Larix sibirica* и получение ЭСМ, которую подвергают криоконсервации и из которой в любой момент можно получить проростки и затем саженцы, может быть применена с модификациями и для других видов хвойных. В настоящее время необходимо оперативное внедрение многосортного лесного хозяйства (MVF) для плантационного лесовыращивания в России.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-20008, <https://rscf.ru/project/22-14-20008/>, Красноярского краевого фонда науки и при частичной финансовой поддержке базового проекта ИЛ СО РАН «Функционально-динамическая индикация биоразнообразия лесов Сибири» № 0287-2021-0009 ■

Список литературы:

1. Ding C., Park Y. S., Bonga J., Bartlett B., Li Y., Raley F. A brief review of combining genomic selection and somatic embryogenesis for tree improvement. In: Bonga J. M., Park Y. S., Trontin J. F. (Editors) Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on "Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges." September 10–15, 2018. Coimbra, Portugal. P. 55–69.
2. Klimaszewska K., Cyr D. R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. 2002. V. 48. P. 31–39.
3. Park Y.-S. Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry // In: Fenning T (Eds.), Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century. Forestry Sciences, Springer, Dordrecht. 2014. V. 81. P. 425–439.
4. Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis // Vegetative propagation of forest trees. 2016. P. 302–322.
5. Park Y. S., Ding C., Lenz P., Nadeau S., Adams G., Millican S., Beaulieu J., Bousquet J. Implementing genomic selection for multi-varietal forestry of white spruce (*Picea glauca*) in New Brunswick, Canada. In: Bonga J. M., Park Y. S., Trontin J. F. (Editors) Proceedings of the 5th International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on "Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges." September 10–15, 2018. Coimbra, Portugal. P. 230–233.



БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СИБИРСКОГО РЕГИОНА СОРТОВ ГОЛУБИКИ ТОПЯНОЙ И ЕЕ ГИБРИДОВ



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Золотодолинская, 101, г. Новосибирск, 630090

Эрст Анна Алексеевна

старший научный сотрудник, кандидат биологических наук
тел. (383) 339-98-42, +7-983-321-6465
annaerst@yandex.ru

Горбунов Алексей Борисович

старший научный сотрудник, кандидат биологических наук
тел. (383) 339-97-36, alex_gorbunov22@mail.ru

Рынок высококачественного посадочного материала растений интенсивно развивается. За рубежом созданы и функционируют научно-производственные фирмы, занимающиеся оздоровлением посадочного материала плодовых, ягодных, декоративных, овощных культур с привлечением последних достижений науки, в частности методов биотехнологии. Потребность питомниководства России в посадочном материале, отвечающем современным стандартам, в последние 10–15 лет не удовлетворяется. Предлагаемое нами выращивание необходимых новых адаптированных к местным условиям форм и сортов голубики методами *in vitro* позволит как насытить рынок посадочным материалом, так и организовать процесс плантационного выращивания голубик в СФО. Конечный продукт поможет решить проблему ограниченного ассортимента региональных сортов ягодных культур.

Голубика (род *Vaccinium* L., сем. *Ericaceae* Juss.) — одна из ведущих ягодных культур. Наи-



Эрст Анна Алексеевна,
старший научный
сотрудник, кандидат
биологических наук

более распространены в культуре голубика высокорослая (*V. corymbosum* L.), голубика прутьевидная (*V. virgatum* Aiton), голубика узколистная (*V. angustifolium* Aiton) и полувисокорослая (*V. corymbosum* × *V. angustifolium*). Начиная с 1970-х годов в России и других странах проводятся исследования по интродукции голубики топяной — *V. uliginosum* L. (Gorbunov, 1998). В ЦСБС СО РАН получено 8 сортов *V. uliginosum*: Иксинская, Шегарская, Юрковская, Дивная, Нектарная, Голубая россыпь, Таежная красавица. В районах с коротким вегетационным периодом, недостаточным количеством тепла летом и суровой зимой целесообразно создавать отдаленные гибриды аборигенной голубики топяной с зарекомендовавшими себя сортами и отборными формами голубики полувисокорослой, высокорослой и узколистной. По сравнению с ними голубика топяная более зимостойкая, вегетационный период ее короче, однако сорта и отборные формы голубики полувисокорослой, высокорослой и узколистной формируют мощные растения с крупными ягодами и более урожайны (Горбунов, Снакина, 2013). Важным является и подбор наиболее подходящих методов массового вегетативного размножения новых форм, сортов голубики топяной, а также гибридов с ее участием, в том числе с использованием современных методов биотехнологии.

Задача настоящего проекта — разработать эффективные системы микроразмножения и получить селекционный материал межвидовых гибридов голубики, обладающих значительным адаптационным потенциалом для выращивания в южных регионах Северной Азии. В настоящее время селекционной работой по созданию новых перспективных сортов голубики, пригодных для выращивания в Сибирском макрорегионе, а также разработкой методов их массового размножения *in vitro* занимаются только в ЦСБС СО РАН (Новосибирск). Наиболее близким аналогом является Научно-производственный отдел «Биотехнологический комплекс» ЦБС НАН Беларуси (Минск, <https://cbgarden.by/structure/lcrr>), специализирующийся в том числе на выращивании брусничных.

В результате наших исследований показана возможность ускоренного размножения *in vitro* семи сортов *V. uliginosum* селекции ЦСБС СО РАН. Для получения высокого коэффициента размножения необходимо использовать питательную среду Андерсона и культивиро-

вать пазушные почки первые две недели на этой среде, дополненной 20 мкМ, а затем на среде с 5 мкМ 2-изопентиладенина. Показано первостепенное влияние сорта на процесс укоренения *V. uliginosum* в культуре *in vitro*. Наибольшую эффективность показал прием 24-часовой обработки микропобегов растворами ауксинов с последующей высадкой на безгормональные среды (Erst et al., 2018). Нами выявлены генотипические различия по параметру «коэффициент размножения» среди вариантов гибридов *V. uliginosum* × (*V. corymbosum* × *V. angustifolium*). Отмечено, что максимальные показатели достигаются при использовании питательной среды Андерсона, дополненной 15 мкМ 2-изопентиладенина. Показано, что применение методов *in vitro* для размножения и дальнейшего отбора генотипов является эффективным подходом в программах получения межвидовых гибридов *V. uliginosum* × (*V. corymbosum* × *V. angustifolium*) (Erst et al., 2021).

Получение новых сортов нетрадиционных ягодных культур, таких как голубика топяная и гибриды с ее участием, направлено на укрепле-



1

2

1. Гибрид *V. uliginosum* × (*V. corymbosum* × *V. angustifolium*), укорененный в культуре *in vitro* на питательной среде ½ Андерсона. Линейка: 1 см.

2. Варианты гибридов *V. uliginosum* × (*V. corymbosum* × *V. angustifolium*) через 2 года культивирования: (А) № 1-1, 1-2, 1-5, 2-2, 4-2, 4-8; (В) № 7-9; (С) однолетние побеги № 1-1, 1-2, 1-5, 2-2, 4-2, 4-8, 7-9. Линейка: 10 см.

ние продовольственной безопасности нашей страны и решает проблему импортозамещения в рамках приоритетного направления СНТР РФ: «Переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработка и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных, хранение и эффективная переработка сельскохозяйственной продукции, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания». Разработанная технология станет основой селекционных программ по получению новых сортов голубики, менее требовательных к почвенно-климатическим условиям выращивания (зимо- и морозостойкие гибриды) по сравнению с широко распространенными сортами и отборными формами голубики высокорослой, полувисокослой и узколистной.

Предлагаемая технология обеспечивает быстрое массовое размножение новых перспективных форм, гибридов и сортов голубики. Размножение в культуре *in vitro* также позволяет проводить быстрый скрининг голубик на устойчивость к абиотическим и биотическим факторам и имеет важные преимущества по сравнению с отбором растения в полевых условиях. Помимо сокращения времени и материальных затрат на тестирование указанный метод позволяет точно контролировать физические и химические условия выращивания, моделировать неблагоприятные условия среды, проводить скрининг большого количества генотипов одновременно и на небольшой площади. Применение таких современных инструмен-



«Коллекция культур высших растений *in vitro*» лаборатории биотехнологии, входящая в состав УНУ_440534 «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» ЦСБС СО РАН.

тов имеет огромный потенциал в разработке методики ускоренного размножения и оценки устойчивости голубик к различным факторам среды, что позволяет снизить время и расходы на производство посадочного материала и в короткие сроки довести данную культуру до потребителя.

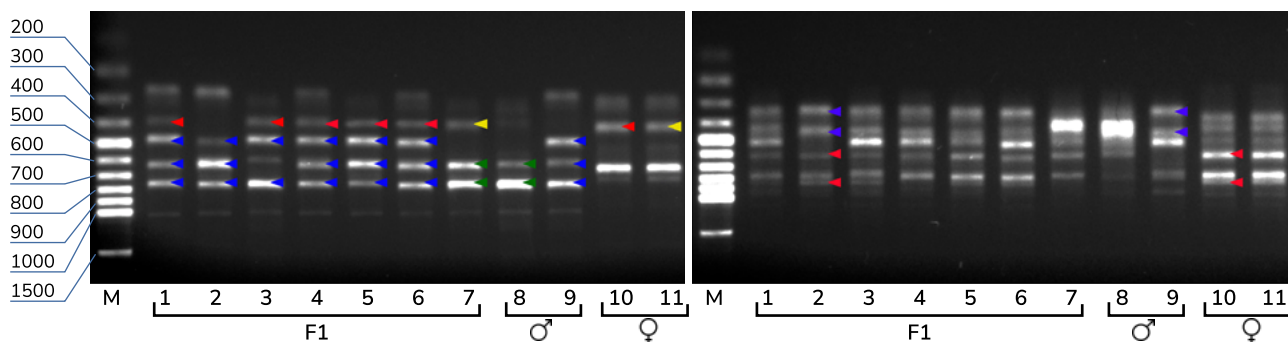


Рисунок 3. ISSR-PCR электрофореграммы геномной ДНК с праймерами UBC825 (слева) и UBC811 (справа). 1 - 7 – варианты гибридов *V. uliginosum* × (*V. corymbosum* × *V. angustifolium*) № 1-1, 1-2, 1-5, 2-2, 4-2, 4-8, 7-9; 8 – 'SC5-8 (♂1)'; 9 – 'NC' (♂2); 10 – *V. ul.* 8 (♀ 1), 11 – *V. ul.* 8 (♀ 2). Примечание: красные стрелки – ♀1 - специфические маркеры; желтые стрелки – ♀2 - специфические маркеры; зеленые стрелки – ♂1 - специфические маркеры; синие стрелки – ♂2 - специфические маркеры.

Лаборатории биотехнологии и интродукции пищевых растений ЦСБС СО РАН имеют большой опыт работы в этой сфере и стартовую исследовательскую базу, что позволит в короткие сроки развернуть производство посадочного материала на отработанных нами методиках. Рентабельность производства возрастает с увеличением количества производимого посадочного материала. Преимущество технологии заключается также в контролируемости условий производства, влияющих на процесс размножения, она максимальна. Не нужно иметь огромные площади под маточники, исключена возможность заражения растений болезнями и вредителями. Быстрое размножение, высокое качество и низкая себестоимость обуславливают высокую рентабельность данного производства.

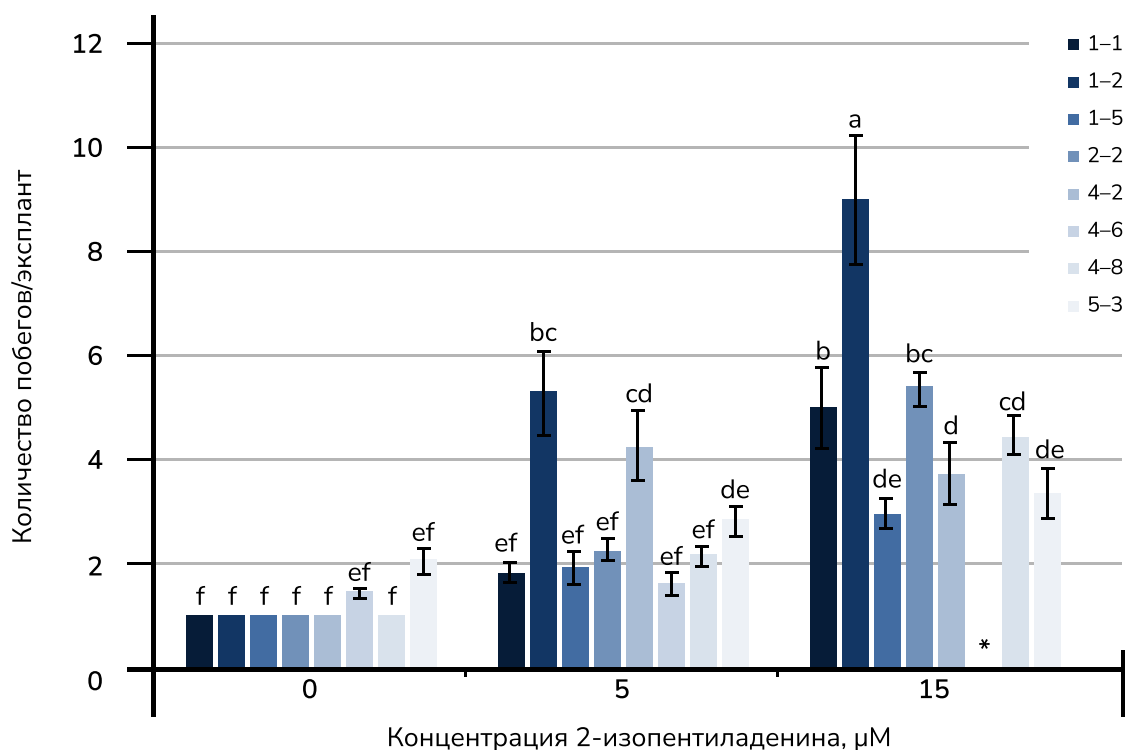
Предложенная технология осуществляется в специализированной лаборатории высококвалифицированными сотрудниками, что позволяет сократить риск появления конкурентов. Технологии клонального микроразмножения позволяют быстро вводить в промышленный оборот перспективные формы, гибриды и сорта голубики. В настоящее время существуют научно-производственные центры, фермерские хозяйства, занимающиеся размножением *in vitro*, но они расположены в европейской части России. Существующие питомники СФО ча-

сто предлагают нерайонированный посадочный материал голубики.

Мы предлагаем создание научно-производственного центра, который будет заниматься получением и массовым размножением новых форм и сортов голубики, обладающих значительным адаптационным потенциалом для выращивания в южных регионах Северной Азии. Продукция — стандартизированный посадочный материал голубики высокого качества, адаптированный для выращивания в Сибирском макрорегионе. Сорта голубики, характеризующиеся меньшей требовательностью к почвенно-климатическим условиям выращивания (зимо- и морозостойкие) по сравнению с широко распространенными сортами и отборными формами голубики полувысокорослой, узколистной и высокорослой, будут востребованы и на мировом рынке.

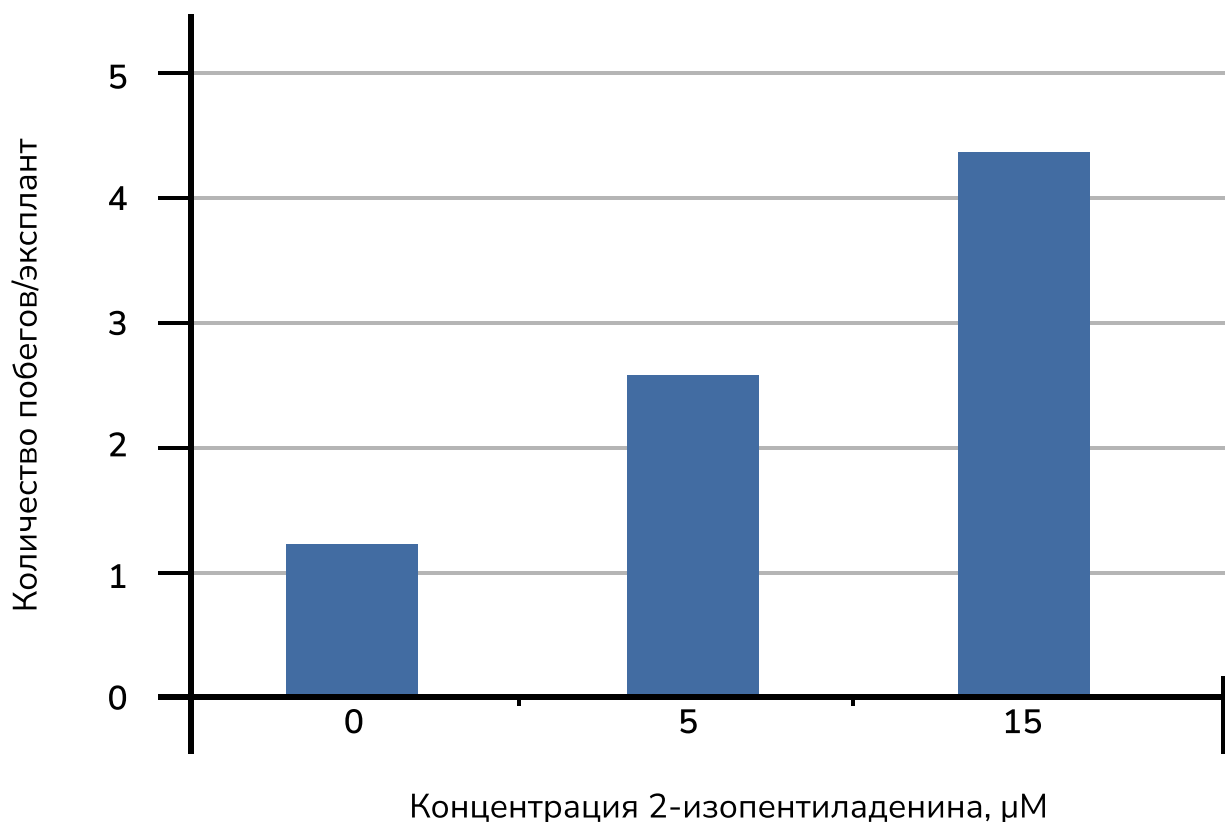
Степень готовности разработки к практическому применению — высокая, отработаны все этапы культивирования *in vitro* и адаптации к условиям *ex vitro* на базе ЦСБС СО РАН. Отдельные этапы микроразмножения форм, гибридов и сортов являются оригинальными.

Области возможного использования — сельскохозяйственное производство, питомниководство и садоводство ■



Список литературы

1. Gorbunov A. B. Bog blueberry — a new horticultural crop // Forestry studies XXX. Wild berry culture: an exchange of western and eastern experiences: Proc. Intern. Conf. Tartu, 1998. P. 54–60.
2. Горбунов А. Б., Снакина Т. И. Голубика // Интродукция нетрадиционных плодовых, ягодных и овощных растений в Западной Сибири. — Новосибирск: Издательство Гео, 2013. 285 с.
3. Erst A. A., Gorbunov A. B., Erst A. S. Effect of concentration, method of auxin application and cultivation conditions on in vitro rooting of bog blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) // Journal of Berry Research. 2019. V. 9, No. 1. P. 41n53.
4. Erst A. A., Gorbunov A. B., Asbaganov S. V., Tomoshevich M. A., Banaev E. V., Erst A. S. Applying biotechnology in the propagation and further selection of *Vaccinium uliginosum* × (*V. corymbosum* × *V. angustifolium*) hybrids // Plants. 2021. V. 10, 1831.



2

Влияние 2-изопентиладенина на коэффициент размножения *V. uliginosum*, форма № 8 × (*V. corymbosum* × *V. angustifolium*), сорт Northcountry:

1 – детальный анализ вариантов гибрида,

2 – средние значения вариантов гибрида.

Примечание: * - конгломерат побегов варианта № 4-6; 1-1, 1-2, 1-5, 2-2, 4-2, 4-6, 4-8, 5-3 – номера вариантов гибрида. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, существенно не различаются в соответствии с LSD при $p \leq 0,05$.