

---

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,  
Kazan Scientific Center, RAS  
K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS  
Kazan (Volga Region) Federal University  
Branch of Biological Sciences of the Russian Academy of Sciences  
Scientific Council on Plant Physiology and Photosynthesis, RAS*

## *The X International Conference*

### *“Plant Cell Biology In Vitro and Biotechnology”*

*ABSTRACTS*

*Kazan,  
October 14-18, 2013*

---

УДК [581.17+663.1](063)

The X International Conference “Plant Cell Biology *In Vitro*  
and Biotechnology” – Abstracts

X Международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и  
биотехнология» - Тезисы

Научное издание

*Тезисы воспроизведены без редактирования с согласия авторов*

Подготовили к печати: Гумерова Е.А., Сибгатуллина Г.В.,  
Никонорова Н.А.

©Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва)  
©Казанский институт биохимии и биофизики  
КазНИЦ РАН (г. Казань)

---

*Казанский институт биохимии и биофизики  
Казанского научного центра РАН  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН  
Казанский (Приволжский) федеральный университет  
Отделение биологических наук РАН  
Научный совет по физиологии растений и фотосинтезу РАН*

***X Международная  
конференция***

***«Биология клеток растений in vitro и  
биотехнология»***

***СБОРНИК ТЕЗИСОВ***

*Казань,  
14-18 Октября 2013 г.*

---

Дорогие коллеги и друзья!

Мы рады приветствовать Вас на десятой, Юбилейной, конференции по культуре клеток высших растений и биотехнологии.

Первая из этих конференция была проведена в Москве 45 лет назад - в 1968 году. Это была первая в мире конференция по культурам клеток высших растений: аналогичная зарубежная конференция состоялась в Страсбурге лишь в 1970 году.

Вдохнителем и бессменным организатором большинства наших конференций была член-корр. АН СССР, академик ВАСХНИЛ Раиса Георгиевна Бутенко – выдающийся ученый и человек удивительной судьбы.

Р.Г. Бутенко была основателем работ по культуре клеток высших растений – к настоящему времени важнейшей области клеточной биологии, физиологии растений и биотехнологии - не только в нашей стране, но и в мире. С самого начала своих исследований, Раиса Георгиевна активно привлекала к ним специалистов различных областей биологии и молодежь. Важнейшим инструментом развития исследований в области биологии клеток растений *in vitro* стали организуемые Р.Г. Бутенко регулярные конференции – сначала Всесоюзные, затем Международные. С целью расширения работ и привлечения к ним новых исследователей и коллективов было решено каждую новую конференцию организовывать в новом городе - и география наших конференций оказалась весьма широка. Это Киев (1975 г.), Ереван (1979 г.), Кишинев (1983 г.), Новосибирск (1988 г.), Алматы (1993 г.), Москва (1997 г.), Саратов (2003 г.), Звенигород (2008 г.).

Сейчас мы рады приветствовать вас в замечательном городе, столице Татарстана Казани. Мы надеемся, что во время конференции вы сможете не только поделиться результатами своих исследований, обменяться мнениями и пообщаться с коллегами, но и узнаете много нового о нашем древнем городе и нашей культуре. Мы хотим сохранить основные приоритеты Раисы Георгиевны – поэтому в нашей конференции будет не только научная, но и образовательная программа для молодежи.

В заключение, мы хотели бы предложить посвятить десятую, Юбилейную конференцию по культуре клеток и биотехнологии памяти нашего Учителя, Раисы Георгиевны Бутенко.



**Бутенко Раиса Георгиевна**  
13.09.1920–26.03.2004

Оргкомитет

---

Dear colleagues and friends!

We are pleased to welcome you to the 10<sup>th</sup> anniversary conference on plant cell culture and biotechnology!

The first of these conferences was held in Moscow 45 years ago – in 1968. It was the first conference on cell culture of higher plants in the world. The similar conference abroad took place in Strasburg only in 1970.

The inspirer and permanent organizer of the most of our conferences was Raisa Georgievna Butenko, Corresponding Member of the USSR Academy of Sciences, Academician of VASKhNIL (Lenin All-Union Academy of Agricultural Sciences). Raisa Georgievna was the outstanding scientist and the woman of amazing destiny.

R.G. Butenko was the founder of the works on cell culture of higher plants, which is nowadays the most important area of cell biology, plant physiology and biotechnology not only in our country but all over the world.

From the very beginning of R.G. Butenko's investigations the experts from different branches of biology and young people were involved in these studies. Regular conferences (at first All-Union then the international ones) organized by R.G. Butenko gave impetus to the development of investigations in the field of plant cell biology *in vitro*. With the view of expansion of works and the involvement of new researchers and teams it was decided to hold these conferences in different cities. The geography of our conferences was very wide: Kyiv (1975), Yerevan (1979), Chisinau (1983), Novosibirsk (1988), Almaty (1993), Moscow (1997), Saratov (2003), Zvenigorod (2008).

Now we are glad to greet you in a wonderful city Kazan, the capital of Tatarstan. During the conference we hope that you can not only share the results of your research, exchange views and communicate with colleagues but find out a lot of new things about our ancient city and our culture.

We want to keep the main priority of R.G. Butenko, so our conference will include not only the scientific but the educational programme for the young researchers.

We would like to suggest dedicating the 10<sup>th</sup> anniversary conference on plant cell culture and biotechnology to the memory of Raisa Georgievna Butenko, our Teacher and Authority.

Organizing committee

---

*Конференция организована при финансовой поддержке:*

- Президиума Российской академии наук
- Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 13-04-06067)
- Отделения биологических наук РАН
- Казанский (Приволжский) федеральный университет по Программе развития деятельности студенческих объединений на 2013-2014 гг.

*Conference organized by financial support of:*

- Presidium of the Russian Academy of Sciences
- Russian Foundation for Basic Research
- Branch of Biological Sciences of the Russian Academy of Sciences
- Kazan (Volga Region) Federal University (Program of development of student's associations' activity)

---

*Спонсоры конференции:  
Sponsors:*



<http://www.labmetod.ru/>



<http://www.dia-m.ru/>



<http://www.eppendorf.com>



ООО Биофармос  
[www.bioconstructor.ru](http://www.bioconstructor.ru)



<http://www.ecopharm.ru/>



<http://www.chimmed.ru/>

## СОДЕРЖАНИЕ

<b><u>ТЕЗИСЫ ПЛЕНАРНЫХ ДОКЛАДОВ</u></b>	Стр.
<b><u>ABSTRACTS OF PLENARY PRESENTATIONS</u></b>	
<i>Fungal symbionts of the genus periglandula are responsible for the occurrence of ergot alkaloids in higher plants</i>	40
Leistner E.	
<i>Advanced micropropagation system for plantlet production of ornamental plants</i>	41
Paek K. Y.	
<i>Microspore biotechnology</i>	42
Tougaev A.	
<i>Трансгенные растения-биопродуценты фармацевтически ценных белков</i>	43
Дейнеко Е. В.	
<i>Transgenic plants as bioreactors of recombinant pharmaceutical proteins</i>	44
Deineko E.V.	
<i>Качественный и количественный состав тритерпеновых гликозидов культур клеток in vitro представителей семейства Araliaceae (на примере Panax spp. и Polyscias spp.)</i>	45
Кочкин Д.В., Носов А.М.	
<i>Triterpene glycosides content of cell-suspension cultures of members of Araliaceae (Panax spp. and Polyscias spp.)</i>	46
Kochkin D.V., Nosov A.M.	
<i>Популяций in vitro: особенности, механизмы, движущие силы и следствия</i>	47
Кунах В.А.	
<i>Evolution of cell populations in vitro: peculiarities, driving forces, mechanisms and consequences</i>	48
Купах V.A.	
<i>Индукторы и ингибиторы биотехнологических процессов размножения и сохранения растений</i>	49
Митрофанова И.В.	
<i>Inductors and inhibitors of biotechnology process of plant propagation and conservation</i>	50
Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P.	
<i>Создание криобиологических коллекций для сохранения генетических ресурсов высших растений: стратегия или тактика?</i>	51
Попова Е.В., Kim H.H., Paek K.Y., Kim D.H., Носов А.М.	



<b><i>Recent advances in cryopreservation of plant genetic resources: from trial-and-error tactics to systematic approach</i></b>	52
<i>Ророва Е.В., Kim H.H., Paek K.Y., Kim D.H., Nosov A.M.</i>	
<b><i>Эмбрионные культуры растений: принципы поддержания долгой жизни</i></b>	53
<i>Румянцева Н.И.</i>	
<b><i>Plant embryogenic cultures: the principles of maintaining a long life</i></b>	54
<i>Rumyantseva N.I.</i>	
<b><u>СЕКЦИЯ 1. Молекулярно-биологические, генетические, биохимические, цитологические, физиологические особенности культур клеток растений</u></b>	
<b><u>SECTION 1. Physiological, biochemical, genetic, cytological and molecular biology features of plant cell cultures</u></b>	
<b><i>Генетическая дифференциация соматоклональных вариантов яровой мягкой пшеницы с использованием IRAP-маркеров</i></b>	56
<i>Амирова А.К., Касымхан К., Бишимбаева Н.К., Рахимбаев И.Р.</i>	
<b><i>Genetic differentiation of spring wheat somaclonal lines by the use of IRAP-markers</i></b>	57
<i>Amirova A.K., Kasymkhan K., Bishimbayeva N.K., Rakhimbayev I.R.</i>	
<b><i>Изучение физиологической активности экстрацеллюлярных полисахаридов из культуры клеток пшеницы</i></b>	58
<i>Бишимбаева Н.К., Парменова А.К., Шилманова А.А., Муртазина А.С., Рахимбаев И.Р.</i>	
<b><i>Investigation of physiological activity of extracellular polysaccharides from wheat cell culture</i></b>	59
<i>Bishimbayeva N.K., Parmenova A.K., Shilmanova A.A., Murtazina A.S., Rakhimbayev I.R.</i>	
<b><i>Частота индукции каллюсогенеза различных генотипов картофеля (<i>Solanum tuberosum</i> L.) в зависимости от типа первичного эксплантата</i></b>	60
<i>Бородай В.В., Бальвас К.М., Миголь М.О.</i>	
<b><i>Frequency of callus formation induction of different potato genotypes (<i>Solanum tuberosum</i> L.) depending on the type of primary explants</i></b>	61
<i>Borodai V.V., Balvas K.M., Mihol M.O.</i>	
<b><i>Биохимические особенности каллусных культур как продуцентов пектиновых веществ</i></b>	62
<i>Гюнтер Е.А., Попейко О.В., Оводов Ю.С.</i>	
<b><i>Biochemical features of the callus cultures as pectin substances producer</i></b>	63
<i>Gunter E. A., Popayko O. V., Ovodov Yu. S.</i>	

<b>Влияние стрессов на генетическую изменчивость культивируемых тканей растений</b>	64
<i>Долгих Ю.И., Осипова Е.С., Соловьева А.И., Седов К.А., Лысенко Е.А., Высоцкая О.Н.</i>	
<b><i>The effect of stresses on genetic variability of cultured plant tissues</i></b>	65
<i>Dolgikh Yu.I., Osipova E.S., Solov'eva A.I., Sedov K.A., Lysenko E.A., Vysotskaya O.N.</i>	
<b>Основные направления в изучении фенольных соединений в клеточных культурах растений</b>	66
<i>Загоскина Н.В.</i>	
<b><i>Main directions in studying of phenolic compounds in plant cell cultures</i></b>	67
<i>Zagoskina N.V.</i>	
<b>Роль генов и условий среды в регуляции андрогенеза в культуре пыльничков подсолнечника <i>in vitro</i></b>	68
<i>Костина Е.Е., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В.</i>	
<b><i>Role of genes and medium conditions in androgenesis regulation in sunflower anther culture in vitro</i></b>	69
<i>Kostina E.E., Tkachenko O.V., Lobachev Yu.V.</i>	
<b>Цитологические особенности формирования эмбриогенных каллусов гречихи татарской</b>	70
<i>Костюкова Ю.А., Румянцева Н.И.</i>	
<b><i>The cytological peculiarities of the formation of embryogenic callus of tatar buckwheat</i></b>	71
<i>Kostyukova Yu.A., Rumyantseva N. I.</i>	
<b>Альбинизм в культуре пыльничков <i>in vitro</i> пшеницы и тритикале: структурные изменения хлоропластного генома</b>	72
<i>Мозгова Г.В., Зайцева О.И., Лемеш В.А.</i>	
<b><i>Albinism in wheat and triticale anther culture in vitro: chloroplast genome structural rearrangements</i></b>	73
<i>Mozgova G.V., Zaitseva O.I., Lemesh V.A.</i>	
<b>Механическая дисагрегация эмбриогенных культур клеток моркови и сладкого апельсина как способ получения мелкоагрегированных фракций, сохраняющих способность к соматическому эмбриогенезу</b>	74
<i>Моисеева Н.А., Серебрякова В.Н.</i>	
<b><i>Mechanical dispersal of carrot and sweet orange embryogenic cultures is a way for obtaining small size cell fractions capable for somatic embryogenesis</i></b>	75
<i>Moiseeva N.A., Serebryakova V.N.</i>	
<b>Идентификация белков эмбриогенных и неэмбриогенных каллусных культур гречихи татарской</b>	76
<i>Никонорова Н.А., Костюкова Ю.А., Нигматуллина Л.Р., Ризванов И.Х., Румянцева Н.И.</i>	

<b><i>Identification of proteins of embryogenic and non-embryogenic tatar buckwheat callus cultures</i></b>	77
<i>Nikonorova N.A., Kostukova J.A., Nigmatullina L.R., Rizvanov I.H., Rumyantseva N.I.</i>	
<b><i>Цитологический анализ последствий амитотиков при полиплоидизации растений in vitro</i></b>	78
<i>Папихин Р.В.</i>	
<b><i>Cytological analysis of amitotic aftereffect at poliploidisation of the plants in vitro</i></b>	79
<i>Papihin R.V.</i>	
<b><i>Тирозиновое фосфорилирование внеклеточных белков суспензионных культур клеток гречихи татарской с разной морфогенной способностью</i></b>	80
<i>Петрова Н.В., Акулов А.Н., Каримова Ф.Г. Румянцева Н.И.</i>	
<b><i>Tyrosine phosphorylation of extracellular proteins of tatar buckwheat suspension cultures with different morphogenic capacity</i></b>	81
<i>Petrova N.V., Akulov A.N., Karimova F.G., Rumyantseva N.I.</i>	
<b><i>Клеточная селекция с ионами тяжёлых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости</i></b>	82
<i>Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И.</i>	
<b><i>Cell selection with heavy metal ions: new aspects of combined resistance</i></b>	83
<i>Sergeeva L.E., Bronnikova L.I.</i>	
<b><i>Динамика содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и по в клетках каллусов гречихи татарской, различающихся по гормонозависимости и скорости роста</i></b>	84
<i>Сибгатуллина Г.В., Низматуллина Л.Р., Румянцева Н.И.</i>	
<b><i>Dynamic of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and no content in tatar buckwhet cell cultures with different hormone-dependence and growth rate</i></b>	85
<i>Sibgatullina G.V., Nigmatullina L.R., Rumyantseva N.I.</i>	
<b><i>Аммоний – фактор формирования рибосом в растительной клетке (на примере клеток каллуса сои и водоросли хламидомонады).</i></b>	86
<i>Смолов А. П.</i>	
<b><i>Ammonium is the factor of ribosomes formation in a plant cells (in term of soybean callus cells and chlamydomonas cells).</i></b>	87
<i>Smolov A. P.</i>	
<b><u>СЕКЦИЯ 2. Регуляция морфогенеза растительных клеток in vitro</u></b>	
<b><u>SECTION 2. Regulation of morphogenesis of plant cells in vitro</u></b>	
<b><i>Physiological and biochemical aspects of regeneration capacity in hardwood trees</i></b>	90
<i>Park S.Y., Moon H.K., Shin H., Kang K.S., Paek K.Y.</i>	

<b>Индукция морфогенеза <i>Fragaria x Potentilla in vitro</i></b> <i>Амброс Е.В., Полубоярова Т.В., Новикова Т.И.</i>	91
<b><i>Morphogenesis induction of in vitro Fragaria x Potentilla</i></b> <i>Ambros E.V., Poluboyrova T.V., Novikova T.I.</i>	92
<b>Анализ полиморфизма микросателлитных локусов, связанных со способностью к андрогенезу <i>in vitro</i>, у ярового гексаплоидного тритикале</b> <i>Антоненко Е.В., Кременевская Е.М., Ермишина Н.М., Лемеш В.А.</i> <b><i>Analysis of polymorphism of microsatellite loci related to the ability to androgenesis in vitro in spring hexaploid triticale</i></b> <i>Antonenko E.V., Kremenevskaya E.M., Ermishina N.M., Lemesh V.A.</i>	93
<b>Гаплоидная биотехнология в ускоренной селекции <i>Triticum aestivum</i> L. на устойчивость к неблагоприятным биотическим факторам окружающей среды</b> <i>Анапияев Б.Б., Исакова К.М., Бейсенбек Е.Б., Казкеев Д.Т., Жанбырбаев Е.А.</i>	94
<b><i>Haploid biotechnology in rapid breeding of Triticum aestivum L. for adverse biotic environmental factors resistance</i></b> <i>Anapiyayev B.B., Iskakova K.M., Beisenbek E.B., Kazkeev D.T., Zhanbirbayev E.A.</i>	95
<b>Крахмалы с различным содержанием амилозы и амилопектина как компоненты питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников <i>in vitro</i></b> <i>Белинская Е.В., Тымчук С.М., Дербизова О.Ю.</i> <b><i>Starches possessing different content of amilose and amilopectine as components of nutrient medium for barley haploid production in another culture in vitro</i></b> <i>Belinskaya E.V., Tymchuk S.V., Derebizova O. Y.</i>	96
<b>Изучение клеточных механизмов индукции и длительного поддержания тотипотентности <i>in vitro</i> у зерновых злаков</b> <i>Бишимбаева Н.К.</i> <b><i>Investigation of cell mechanisms of the induction and long-term maintenance of cereals' totipotency in vitro</i></b> <i>Bishimbayeva N.K.</i>	97
<b>Преодоление генотипической зависимости регенерации растений <i>in vitro</i> у зерновых злаков</b> <i>Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Карабаев М.К., Рахимбаев И.Р.</i> <b><i>Overcoming the genotype-dependence of plant regeneration in vitro for cereals</i></b> <i>Bishimbayeva N.K., Amirova A.K., Karabayev M.K., Rakhimbayev I.R.</i>	98
	99
	100
	101
	102

<b>Изучение формирования адвентивных побегов из каллуса персика</b>	103
<i>Vagapova T.I., Sidorova T.N., Dolgov S.V.</i>	
<b>Research of adventitious shoots formation from callus of peach</b>	104
<i>Vagapova T.I., Sidorova T.N., Dolgov S.V.</i>	
<b>Особенности морфогенеза в культуре пыльников сортов картофеля с разным типом и уровнем формирования передущированной пыльцы</b>	105
<i>Voronkova E.V., Zharich V.M., Yermishin A.P.</i>	
<b>Peculiarities of morphogenesis in another culture of potato varieties with different type and level of unreduced pollen production</b>	106
<i>Voronkova E.V., Zharich V.M., Yermishin A.P.</i>	
<b>Соматический эмбриогенез в культуре мегагаметофитов и зиготических зародышей <i>pinus sibirica</i></b>	107
<i>Voroshilova E.V., Tretyakova I.N.</i>	
<b>Somatic embryogenesis induction in siberian pine megagametophyte and zygotic embryos cultures</b>	108
<i>E. Voroshilova, I. Tretyakova</i>	
<b>Использование культуры пыльников для закрепления гетерозисного эффекта у гибридов риса</b>	119
<i>Goncharova Yu.K., Haritonov E.M., Bushman N.Yu.</i>	
<b>Use of another culture for fastening heterosis effect of rice hybrids</b>	110
<i>Goncharova J.K., Haritonov E.M., Bushman N.Y.</i>	
<b>Влияние регуляторов роста на регенерацию побегов нута <i>cicer arietinum l. in vitro</i></b>	111
<i>Донская М., Суворова Г.</i>	
<b>Effect of growth regulators on the shoot regeneration of chickpea <i>Cicer arietinum L. in vitro</i></b>	112
<i>Donskaia M., Suvorova G.</i>	
<b>Факторы, определяющие соотношение типов морфогенеза в каллусной ткани кукурузы</b>	113
<i>Деркач Е. В., Абраимова О. Е., Сатарова Т. Н.</i>	
<b>Factors affecting the ratio of types of morphogenesis in maize callus tissue</b>	114
<i>Derkach E. V., Abraimova O. E., Satarova T. N.</i>	
<b>Регенерация побегов <i>Rhododendron sichotense</i> из листовых эксплантов в культуре <i>in vitro</i></b>	115
<i>Зайцева Ю.Г., Новикова Т.И.</i>	
<b><i>In vitro</i> shoot regeneration from leaf explants of <i>Rhododendron sichotense</i></b>	116
<i>Zaytseva Yu.G., Novikova T.I.</i>	

<b>Полисахариды, выделяемые эмбриогенным каллусом гречихи татарской при разрыхлении проэмбриональных клеточных комплексов</b>	117
<i>Ибрагимова Н.Н., Акулов А.Н., Горшкова Т.А., Румянцева Н.И.</i>	
<b>Polysaccharides secreted by embryogenic callus <i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) during proembryonal cell complex loosening</b>	118
<i>Ibragimova N.N., Akulov A.N., Gorshkova T.A., Rummyantseva N.I.</i>	
<b>Цитоэмбриологическое изучение клеточных линий <i>larix sibirica</i>, полученных в культуре <i>in vitro</i></b>	119
<i>Иваницкая А.С., Пак М.Э., Третьякова И.Н.</i>	
<b>Cytoembryological investigation of <i>larix sibirica</i> cell lines, obtained in culture <i>in vitro</i></b>	120
<i>Ivanitskaya A.S., Park M.E., Tretiakova I.N.</i>	
<b>Влияние низких положительных температур на морфогенез микроспорофиллов <i>larix sibirica</i> <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i></b>	121
<i>Иванова А.Н., Голованова Т.И.</i>	
<b>Effect of low temperature on positive morphogenesis microsporophylls <i>larix sibirica</i> <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i></b>	122
<i>Ivanova A.N., Golovanova T.I.</i>	
<b>Изучение влияния нетрадиционных регуляторов роста на морфогенетическую активность изолированных эксплантов и пересадочной культуры бересклета, диоскореи и кирказона</b>	123
<i>Калашишникова Е.А., Доан Тху Тхуи</i>	
<b>Studying of influence of nonconventional regulators of growth on morphogenetic activity isolated explants and transfer culture of the <i>euonymus</i>, <i>dioscorea</i> and <i>aristolochia</i></b>	124
<i>Kalashnikova E.A., Doan Thu Thuy</i>	
<b>Получение гаплоидных растений белокочанной капусты (<i>Brassica oleracea</i> L) из микроспор изолированных пыльников</b>	125
<i>Калашишникова Е.А., Киракосян Р.Н.</i>	
<b>Obtaining haploid plants of cabbage (<i>Brassica oleracea</i> L.) from microspores of isolated anthers</b>	126
<i>Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N.</i>	
<b>Особенности морфогенеза <i>Fritillaria dagana</i> и <i>F. sonnikovae</i> в культуре <i>in vitro</i></b>	127
<i>Кульханова Д.С., Эрст А.А., Новикова Т.И.</i>	
<b>Features of the morphogenesis of <i>Fritillaria dagana</i> and <i>F. sonnikovae</i> <i>in vitro</i> culture</b>	128
<i>Kulkhanova D.S., Erst A.A., Novikova T.I.</i>	
<b>Эндогенные олигосахарины, активирующие иук-индуцируемое корнеобразование</b>	129
<i>Ларская И.А., Барышева Т.С.</i>	

<b>Endogenous oligosaccharine activating iaa-induced rooting</b> <i>Larskaya I.A., Barisheva T.S.</i>	130
<b>Разработка методов регенерации растений из изолированных соматических тканей садовых культур</b> <i>Муратова С.А.</i>	131
<b>The development of plant regeneration methods from isolated somatic tissues of horticultural crops</b> <i>Muratova S.A.</i>	132
<b>Влияние чужеродного генетического материала на андрогенез <i>in vitro</i> у мягкой пшеницы</b> <i>Осадчая Т.С., Першина Л.А., Девяткина Э.П.</i>	133
<b>The effect of alien genetic materials to androgenesis <i>in vitro</i> of common wheat</b> <i>Osadchaya T.S., Pershina L.A., Devyatkina E.P.</i>	134
<b>Влияние тидиазурона на органогенез побегов <i>Disanthus cercidifolius maxim.</i> (Hamamelidaceae)</b> <i>Новикова Т.И., Полубоярова Т.В.</i>	135
<b>Thidiazuron-induced shoot organogenesis of <i>Disanthus cercidifolius maxim.</i> (Hamamelidaceae)</b> <i>Novikova T.I., Poluboyarova T.V.</i>	136
<b>Влияние растворителя регуляторов роста на морфогенез в культуре <i>in vitro</i> облепихи (<i>Hippophae rhamnoides l.</i>)</b> <i>Плаксина Т.В.</i>	137
<b>Effect solvent of hormones on induction of morphogenesis seabuckthorn (<i>Hippophae rhamnoides l.</i>) <i>in vitro</i></b> <i>Plaksina T.V.</i>	138
<b>Особенности морфогенеза <i>Allium karataviense</i> культуре <i>in vitro</i></b> <i>Полубоярова Т.В., Новикова Т.И.</i>	139
<b>Morphogenesis peculiarities of <i>Allium karataviense</i> <i>in vitro</i> culture</b> <i>Poluboyarova T.V., Novikova T.I.</i>	140
<b>Влияние длительности воздействия имк на ризогенез клоновых подвоев яблони <i>in vitro</i></b> <i>Пронина И.Н.</i>	141
<b>The effect of duration of iba on apple clonal rootstock rhizogenesis <i>in vitro</i></b> <i>Pronina I.N.</i>	142
<b>Влияние расположения экспланта в культуре тканей на способность к микроразмножению</b> <i>Сащенко М.Н.</i>	143
<b>Influence of the explants orientation in tissue culture on ability to micropropagation</b> <i>Saschenko M.N.</i>	144

**Ультраструктурные изменения проэмбриогенных клеточных масс моркови в связи с соматическим эмбриогенезом** 145  
Серебрякова В.Н., Моисеева Н.А.

**Ultrastructural alterations of carrot proembryogenic cell masses related with somatic embryogenesis** 146  
Serebryakova V.N., Moiseeva N.A.

**Индукцированный морфогенез у *Iris ensata thunb.* в культуре *in vitro* и его гистологические аспекты** 147  
Тихомирова Л.И.

**Induced morphogenesis of *Iris ensata thunb.* in culture *in vitro* and its histological aspects** 148  
Tikhomirova L.I.

**Влияние бактериального липополисахарида на морфогенетический потенциал каллусных клеток пшеницы *in vitro*** 149

Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Спивак В.А., Матора Л.Ю., Бурьгин Г.Л., Лобачев Ю.В., Щеголев С.Ю.

**Influence of bacterial lipopolisakharid on morphogenetic potential of wheat callus cells *in vitro*** 150  
Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Spivak V.A., Matora L.Yu., Burygin G.L., Lobachev Yu.V., Shchyogolev S.Yu.

**Эмбриогенные клеточные линии и соматический эмбриогенез *in vitro* у видов хвойных произрастающих в сибире** 151  
И.Н. Третьякова, Е.В. Ворошилова, А.С. Ивануцкая, М.Э Пак. Д.Н. Шуваев

**Embryogenic cell lines and somatic embryogenesis *in vitro* of comiferous species growing in siberia** 152  
I.N. Tretiakova , E.V. Voroshilova, A.S. Ivanitskya, M.E. Park D.N. Shuvaev

**Патологии митоза в длительно культивируемых эмбриогенных клеточных линиях *Pinus pumila* (Pall.) Regel** 153  
Шуваев Д. Н.

**Pathologies of mitosis in long-term cultured embryogenic cell lines of *Pinus pumila* (Pall.) Regel** 154  
Shuvaev D. N.

**СЕКЦИЯ 3. Культивируемые клетки растений как модель для изучения механизмов фундаментальных клеточных процессов**  
**SECTION 3. Plant cell culture as a model systems for studying the basic mechanisms of fundamental cellular events**

**Транскрипция гена 1-цис пероксиредоксина в культуре клеток гречихи татарской** 156  
Акулов А.Н., Горшков О.В., Румянцева Н.И.



<b><i>Transcription of I-cys peroxiredoxin gene in tartary buckwheat cell culture</i></b>	157
<i>Akulov A.N., Gorshkov O.V., Rumyantseva N.I.</i>	
<b><i>Влияние комплекса фенилпропаноидов на модуляцию ферментов антиоксидантного комплекса в культуре клеток диоскореи дельтовидной и в растениях картофеля in vitro</i></b>	158
<i>Волкова Л.А., Урманцева В.В., Бургутин А.Б., Носов А.М.</i>	
<b><i>Анализ эффективности питательных сред для индукции каллусообразования у гибридов риса</i></b>	159
<i>Гончарова Ю.К., Бушман Н.Ю., Верецагина С.А.</i>	
<b><i>The analysis of efficiency of nutrient mediums for induction of callus for rice hybrids</i></b>	160
<i>Goncharova J.K., Bushman N.Y., Vereshchagina S.A.</i>	
<b><i>Особенности накопления фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения в условиях окислительного стресса</i></b>	161
<i>Гончарук Е.А., Клейменова Ю.К., Загоскина Н.В.</i>	
<b><i>Features of phenolic compounds accumulation in callus of tea plant in the conditions of oxidative stress</i></b>	162
<i>Goncharuk E.A., Kleimenova Yu.K., Zagoskina N.V.</i>	
<b><i>Влияние метилжасмоната на фенольный метаболизм, ростовую и морфогенную активность суспензионной культуры гречихи татарской F. tataricum (L.) Gaertn.</i></b>	163
<i>Гумерова Е.А., Иванова А.С., Акулов А.Н., Румянцева Н.И.</i>	
<b><i>Effects of methyl jasmonate on phenolic metabolism, growth and morphogenic activity in suspension culture of tartary buckwheat F. tataricum (L.) Gaertn.</i></b>	164
<i>Gumerova E.A., Ivanova A.S., Akulov A.N., Rumyantseva N.I.</i>	
<b><i>Выращивание суспензионной культуры клеток P.japonicus var. repens с добавлением регулятора роста мелафена</i></b>	165
<i>Демидова Е.В., Решетняк О.В., Носов А.М.</i>	
<b><i>Growing P.japonicus var. repens cell suspension with addition mefenfen</i></b>	166
<i>Demidova E.V., Reshetnyak O.V., Nosov A.M.</i>	
<b><i>Культуры клеток как экспериментальная модель для изучения физиологических последствий генетической трансформации растений</i></b>	167
<i>Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Максимова Л.А., Нурминская Ю.В., Шафилова Т.Н., Гаманец Л.В., Швецов С.Г.</i>	
<b><i>Cell cultures as an experimental model for the study of physiological consequences of plant genetic transformations</i></b>	168
<i>Enikeev A.G., Kopytina T.V., Maksimova L.A., Nurminskaya Yu.V., Shafikova T.N., Gamanets L.V., Shvetsov S.G.</i>	

<b>Адаптация антарктических мхов к действию абиотических стрессов: изменение содержания полифруктанов</b>	169
<i>Кваско О. Ю., Лучаковская Ю. С, Дробот Е.С., Чапкевич С.А., Матвеева Н. А.</i>	
<b>Adaptation of antarctic plants to abiotic stresses: the change of polyfructan content</b>	170
<i>Kvasko O. Yu., Luchakovskaya Yu. S., Drobot K. O., Chapkevych S.E., Matvieieva N. A.</i>	
<b>Регуляция биосинтеза резвератрола в культурах клеток винограда <i>Vitis amurensis</i> Rupr. с помощью генов кальций-зависимых протеинкиназ.</b>	171
<i>Киселев К.В. Дубровина А.С., Шумакова О.А</i>	
<b>Regulation of resveratrol biosynthesis in cell cultures of wild-growing grape <i>Vitis amurensis</i> Rupr. by overexpressing calcium-dependent protein kinase genes</b>	172
<i>Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Shumakova O.A.</i>	
<b>Фитогормоны и полярный рост пыльцевых трубок</b>	173
<i>Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Воронков А.С., Андреев И.М.</i>	
<b>Phytohormones and the polar pollen tube growth</b>	174
<i>Kovaleva L.V., Zakharova E.V., Voronkov A.S., Andreev I.M.</i>	
<b>Экспериментальная лишенология: культивирование и «культуры тканей» лишайников.</b>	175
<i>Лобакова Е.С</i>	
<b>Experimental lichenology: cultivation of and 'tissue cultures' from lichens</b>	176
<i>Lobakova E.S.</i>	
<b>Особенности гибели клеток в суспензионных культурах озимой пшеницы <i>Triticum aestivum</i> L. и сахарного тростника <i>Saccharum officinarum</i> L., вызванной действием отрицательной температуры</b>	177
<i>Любушкина И.В., Грабельных О.И., Федяева А.В., Побежимова Т.П., Степанов А.В., Федосеева И.В., Войников В.К.</i>	
<b>Features of cell death, caused by the freezing temperature influence, in winter wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) and sugar cane (<i>Saccharum officinarum</i> L.) suspension cultures</b>	178
<i>Lyubushkina I.V., Grabelnych O.I., Fedyaeva A.V, Pobezhimova T.P., Stepanov A.V., Fedoseeva I.V., Voinikov V.K.</i>	
<b>Каллусная культура огурца как модель для изучения стрессового воздействия ионов <math>Zn^{2+}</math> и <math>Ni^{2+}</math></b>	179
<i>Михайлова И. Д., Лукаткин А. С.</i>	
<b>Cucumber callus as a model for studying <math>Zn^{2+}</math> and <math>Ni^{2+}</math> stress effects</b>	180
<i>Mikhailova I.D., Lukatkin A.S.</i>	

<b>Соматоклональная изменчивость в культуре клеток табака, как источник уникальных моделей для цитологических исследований</b>	181
<i>Мурсалимов С.Р., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В.</i>	
<b>Somaclonal variation in tobacco cell culture as a source of unique models for cytological studies</b>	182
<i>Mursalimov S.R., Sidorchuk Y.V., Deineko E.V.</i>	
<b>Изменения в фенольном комплексе каллусной культуры чайного растения, выращенной на среде с кадмием</b>	183
<i>Нечаева Т.Л., Храмова Е.П., Высочина Г.И., Загоскина Н.В.</i>	
<b>Changes in phenolic complex of callus cultures the tea plants grown in the media with cadmium</b>	184
<i>Nechaeva T.L., Chratova E.P., Vysochina G.I., Zagoskina N.V.</i>	
<b>Влияние стрессовых воздействий на геном культивируемых in vitro клеток Arabidopsis thaliana и Zea mays</b>	185
<i>Седов К.А., Долгих Ю.И., Соловьева А.И.</i>	
<b>Influence of stress on the genome of cultured in vitro cells Arabidopsis thaliana and Zea mays</b>	186
<i>Sedov K.A., Dolgikh Yu.I., Solov'yova A.I.</i>	
<b>Тест на прорастание пыльцевых зерен для определения биологической активности экстрактов биомассы культур клеток полипсиаса</b>	187
<i>Суханова Е.С., Кочкин Д.В., Титова М.В., Носов А.М.</i>	
<b>Pollen tube growth test for biological activity of polyscias plant cell cultures biomass extracts research</b>	188
<i>Sukhanova E.S., Titova M.V., Kochkin D.V., Nosov A.M.</i>	
<b>Биологическая активность суммарных препаратов пептидов в условиях абиотических стрессов in vitro</b>	189
<i>Терлецкая Н.В., Рысбекова А.Б., Мамонов Л.К.</i>	
<b>Biological activity of total drugs peptides in abiotic stress conditions in vitro</b>	190
<i>Terletskaaya N.V., Rysbekova A.B., Mamonov L.K.</i>	
<b>Влияние АБК на некоторые параметры клеток суспензионной культуры озимой пшеницы, находящихся на разных стадиях развития</b>	191
<i>Трофимова О.И., Ларская И.А., Заботин А.И.</i>	
<b>ABA effect on some parameters of winter wheat suspension-cultured cells at different phases of development</b>	192
<i>Trofimova O. I., Larskaya I.A., Zabolin A.I.</i>	
<b>Изучение транскрипционной регуляции генов стильбен синтаз в клеточных культурах амурского винограда Vitis amurensis Rupr.</b>	193
<i>Тюнин А.П., Киселев К.В.</i>	

<b><i>Investigation of stilbene synthase genes transcriptional regulation in grape cell cultures of <i>Vitis amurensis</i> Rupr.</i></b>	194
<i>Tyunin A.P., Kiselev K.V.</i>	
<b><i>Различные эффекты 24-эпибрассинолида на тирозиновое фосфорилирование белков морфогенных каллусов гречихи татарской</i></b>	195
<i>Федина Е.О., Акулов А.Н., Румянцева Н.И., Каримова Ф.Г.</i>	
<b><i>Different effects of 24-epibrassinolide on tyrosine protein phosphorylation in morphogenic callus of tatar buckwheat</i></b>	196
<i>Fedina E.O., Akulov A.N., Rumyantseva N.I., Karimova F.G.</i>	
<b><i>Влияние 2,4-д на поглотительную способность клеток в суспензионной культуре сои в начале цикла выращивания</i></b>	197
<i>Швецов С.Г., Еникеев А.Г.</i>	
<b><i>2,4-D action on cell absorbing capacity in soybean suspension culture at the beginning of growing cycle</i></b>	198
<i>Shvetsov S.G., Enikeev A.G.</i>	
<b><i>Влияние экспрессии гена <i>pgcdpk2ds</i> на эмбриогенез в культуре клеток женьшеня <i>Panax ginseng</i> С.А. Meyer.</i></b>	199
<i>Шумакова О.А., Киселев К.В.</i>	
<b><i>Influence of expression <i>pgcdpk2ds</i> gene on the embryogenesis in the ginseng cell cultures <i>Panax ginseng</i> С.А. Meyer.</i></b>	200
<i>Shumakova O.A., Kiselev K.V.</i>	
<b><u>СЕКЦИЯ 4. Генетически трансформированные клетки, изолированные органы и растения</u></b>	
<b><u>SECTION 4. Genetically transformed plant cells, organs and plants</u></b>	
<b><i>Создание реципиентных систем для генетической трансформации клевера лугового и люцерны</i></b>	202
<i>Агафодорова М.Н., Солодкая Л.А., Лапотышкина Л.И., Клименко И.А., Шамустакимова А.О.</i>	
<b><i>Creation of recipient systems for genetic transformation of red clover and alfalfa</i></b>	203
<i>M.N. Agafodorova, L.A. Solodkaya, L.I. Lapotishkina, I.A. Klimenko, A.O. Shamustakimova</i>	
<b><i>Особенности фотосинтетического аппарата у трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией бактериальных генов синтеза цитокининов и ауксинов</i></b>	204
<i>Алексеева В.В., Мудрик В.А.2, Рукавцова Е.Б., Голубчикова Ю.С., Ермошин А.А.</i>	
<b><i>Features of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants with constitutive expression of bacterial genes of auxin and cytokinin synthesis</i></b>	205
<i>Alekseeva V.V.1, Mudrik V.A.2, Rukavtsova E.B.1, Golubchikova Yu.S., Ermoshin A.A.</i>	

<b><i>LC and LC-MS/MS studies of anthraquinones in genetically transformed hairy root cultures of Rubia tinctorum L.</i></b>	206
<i>Bányai P., Kursinszki L., Kuzovkina I., Szőke É.</i>	
<b><i>Получение растений Arabidopsis thaliana с интегрированным геном микробной фитазы</i></b>	207
<i>Валеева Л.Р., Нямсүрэн Ч., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р.</i>	
<b><i>Generation of transgenic Arabidopsis thaliana plants with integrated microbial phytase genes</i></b>	208
<i>Valeeva L., Nyamsuren Ch., Shakirov E.V., Sharipova M.R.</i>	
<b><i>Создание новых ассоциативных симбиозов между рапсом и ризобиями, обладающими фунгистатической активностью</i></b>	209
<i>Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Оркодашвили А.М., Баймиев А.Х.</i>	
<b><i>Establishment new associative symbiosis between rape and rhizobia with fungistatic activity</i></b>	210
<i>Vershinina Z.R., Blagova D.K., Nigmatullina L.R., Orkodashvili A.M., Baymiev A.Kh.</i>	
<b><i>Модификация свойств растений осины путем суперэкспрессии рекомбинантного гена ксилоглюканазы sp-Xeg</i></b>	211
<i>Видягина Е.О., Ковалицкая Ю.А., Шестибратов К.А.</i>	
<b><i>The properties modification of aspen plants by means of overexpression of the recombinant gene of xyloglucanas sp-Xeg</i></b>	212
<i>Vidyagina E.O., Kovalitskaya Yu.A., Shestibratov K.A.</i>	
<b><i>Генетический анализ трансгенных растений яблони, содержащих шпилечную конструкцию комплементарную второму экзону гена асо яблони</i></b>	213
<i>Власова А.А., Скляр Ю.А., Пушин А.С., Тимербаев В.Р., Долгов С.В.</i>	
<b><i>Genetic analysis of transgenic apple plants containing a complimentary hairpin structure to the second exon of the apple gene асо</i></b>	214
<i>A.A. Vlasova<sup>1,2</sup>, Y.A. Sklyar, A.S. Pushin<sup>2</sup>, V.R. Timerbayev<sup>3</sup>, S.V. Dolgov<sup>2,3</sup></i>	
<b><i>Стабильность наследования трансгенной вставки в вегетативном и генеративном потомстве гм-картофеля с устойчивостью к колорадскому жуку</i></b>	215
<i>Воронкова Е.В., Лукаша В.И., Полохович Ю.В., Свиточ О.В., Ермишин А.П.</i>	
<b><i>Inheritance stabiliti of transgene insertions in vegetativeli and generatively propagated clones of transgene potato with colorado beetl resistance</i></b>	216
<i>Voronkova E.V., Luksha V.I., Poliukchovich Yu.V., Svitoch O.V., Yermishin A.P.</i>	

<b>Экспрессия гирудина в растениях ряски малой (<i>Lemna minor</i> L.)</b>	
Гиляшова Н.В., Таранов А.И., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В.	217
<b>Expression of hirudin in duckweed <i>Lemna minor</i> L.</b>	
Gilyashova N.V., Taranov A.I., Firsov A.P., Mitiouchkina T.U., Dolgov S.V.	218
<b>Agrobacterium-опосредованная трансформация апикальной меристемы проростков пшеницы</b>	219
Гончарук А.Н., Бавол А.В., Дубровная О.В.	
<b>Agrobacterium-mediated transformation of the apical meristem of wheat seedlings</b>	220
Goncharuk O.M., Baval A.V., Dubrovnaya O.V.	
<b>Создание векторов, содержащих бактериальный ген <i>coda</i> из <i>Arthrobacter globiformis</i> для интеграции в ядерный и пластидный геном двудольных растений</b>	221
Гулевич А.А., Кунакова Е.А., Данилова С.А., Баранова Е.Н., Ралдугина Г.Н.	
<b>Creation of expression cassettes containing the bacterial gene <i>coda</i> of <i>Arthrobacter globiformis</i> for integration into the nuclear and plastid genome of dicotyledonous plants</b>	222
Gulevich A.A., Kunakova E.A., Danilova S.A., Baranova E.N., Raldugina G.N.	
<b>Получение транспластомных растений.</b>	223
Данилова С.А.	
<b>Producing of transplastomic plants.</b>	224
Danilova S.A.	
<b>Влияние сверхэкспрессии сплайсированных форм гена <i>VaCDPK3a</i> на рост и морфологию клеточных культур винограда амурского <i>Vitis amurensis</i> Rupr.</b>	225
Дубровина А.С., Шумакова О.А., Христенко В.С., Киселев К.В.	
<b>The effect of <i>VaCDPK3a</i> splice variant overexpression on the growth and morphology of <i>Vitis amurensis</i> cell cultures.</b>	226
Dubrovina A.S., Shumakova O.A., Khristenko V.S., Kiselev K.V.	
<b>Изучение динамики иук и выявление <i>fzy</i>-генов у трансгенных растений табака</b>	227
Загорская А.А., Розов С.М., Дейнеко Е.В.	
<b>The study of the dynamics of <i>iaa</i> and identify <i>fzy</i>-genes in transgenic tobacco plants</b>	228
Zagorskaya A.A., Rozov S.M., Deineko E.V.	
<b>Генно-инженерный подход к решению проблемы устойчивости растений к абиотическому стрессу</b>	229
Ибрагимова С.М., Кочетов А.В.	

<b>Genetic engineering for abiotic stress resistance in plants</b> <i>Ibragimova S. M., Kochetov A.V.</i>	230
<b>Сравнительная визуализация актинового цитоскелета в различных типах клеток трансгенных растений <i>Nicotiana tabacum</i> L.</b> <i>Киняйкин В.И., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В.</i>	231
<b>Comparative actin cytoskeleton visualization in various cell types of transgenic plants <i>Nicotiana tabacum</i> L.</b> <i>Kinajikin V.I., Sidorchuk Yu.V., Deineko E.V.</i>	232
<b>Экспрессия гена <i>lac</i> из гриба <i>trametes hirsuta</i> в трансгенных растениях осины</b> <i>Ковалицкая Ю.А., Филиппов М.В., Васина Д.В., Даянова Л.К., Логинов Д.С., Королева О.В., Шестибратов К.А.</i>	233
<b>The expression of <i>lac</i> gene from the fungus <i>trametes hirsuta</i> in aspen transgenic plants</b> <i>Kovalitskaya Yulia A., Filippov Michail V., Vasina Darya V., Dayanova Lutsiya K., Loginov Dmitriy S., Koroleva Olga V., Shestibratov Konstantin A.</i>	234
<b>Agrobacterium-опосредованная трансформация подсолнечника (<i>Helianthus annuus</i> L.) in planta, с использованием штамма LBA4404, несущего pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы</b> <i>Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н.</i>	235
<b>Agrobacterium-mediated transformation in planta of sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.) using LBA4404 harboring pBi2E with double sequences RNA-suppressor of gene <i>prodh</i></b> <i>Komisarenko A.G., Mykhalskaya S.I., Sergeeva L.E., Tishchenko E.N.</i>	236
<b>Морфометрические особенности и накопление <math>Na^+</math> и <math>K^+</math> трансгенными растениями картофеля, несущими ген <i>HvNHX2</i>, на фоне повышенного содержания <math>NaCl</math></b> <i>Кривошеева А.Б., Юрьева Н.О., Беляев Д.В.,</i>	237
<b>Growth parameters and accumulation of <math>Na^+</math> and <math>K^+</math> in transgenic potato plants expressing the <i>HvNHX2</i> gene under salt stress</b> <i>Krivosheyeva A. B., Yur'eva N. O., Belyaev D. V.</i>	238
<b>Получение трансгенных растений осины при помощи <i>Agrobacterium rhizogenes</i> с использованием микрочастиц карбида кремния</b> <i>Кулуев Б.Р., Князев А.В.</i>	239
<b>Creation a transgenic plants of aspen with <i>Agrobacterium rhizogenes</i> using microparticles of silicon carbide</b> <i>Kuluev B.R., Knyazev A.V.</i>	240

<b>Рост и биобезопасность трансгенных растений осины и березы с модифицированным метаболизмом азота</b>	241
<i>Лебедев В.Г., Салмова М.А., Розова Х.А., Ларионова А.А., Шестибратов К.А.</i>	
<b>Growth and biosafety of aspen and birch transgenic plants with modified nitrogen metabolism</b>	242
<i>Lebedev V.G., Salmova M.A., Rosova C.A., Larionova A.A., Schestibratov K.A.</i>	
<b>Трансформация <i>Digitalis purpurea</i> L. разными штаммами <i>Agrobacterium rhizogenes</i> вызывает различные фенотипические и биохимические проявления</b>	243
<i>Лёшина Л.Г., Булко О.В., Егоров О.А.</i>	
<b>Transformation of <i>Digitalis purpurea</i> L. using different strains of <i>Agrobacterium rhizogenes</i> causes various phenotypic and biochemical manifestations</b>	244
<i>Liozhina L.G., Bulko O.V., Iegorov O.A.</i>	
<b>Tissue culture techniques for successful genetic transformation of common wheat</b>	245
<i>Miroshnichenko D.N., Dolgov S.V.</i>	
<b>Создание трансгенных растений моркови (<i>Daucus carota</i> l) продуцентов иммуногенных белков <i>M. tuberculosis</i></b>	246
<i>Пермякова Н. В., Уварова Е.А., Дейнеко Е.В.</i>	
<b>Production of transgenic carrot plants (<i>Daucus carota</i> l.) producers of immunogenic proteins of <i>M. tuberculosis</i></b>	247
<i>Permyakova N.V., Uvarova E.A., Deineko E.V.</i>	
<b>Трансгенные симбиотические микроорганизмы-гипераккумуляторы тяжелых металлов</b>	248
<i>Постригань Б.Н., Благова Д.К., Чемерис А.В.</i>	
<b>Transgenic symbiotical microorganisms heavy metals hyperaccumulators</b>	249
<i>Postrigan B.N., Blagova D.K., Chemeris A.V.</i>	
<b>Сравнение накопления сахаров под действием тяжелых металлов и охлаждения у трансгенных растений рапса, содержащих ген трансфакторного белка</b>	250
<i>Ралдугина Г.Н., Бурмистрова Н.А., Гомаа А.А., Марей М.М., Букарев Р.В., Шумкова Г.А.</i>	
<b>Comparison of the accumulation of sugars under heavy metals and cooling in transgenic plants of rape containing the gene of transcription factor</b>	251
<i>Raldugina G.N., Burmistrova N.A., Goma A.M., Mareay M.M., Bukarev R.V., Shumkova G.A.</i>	



<b><i>Повышенная устойчивость трансгенных растений с геном стильбенсинтазы к фитопатогенам</i></b>	
<i>Рукавцова Е.Б., Захарченко Н.С., Алексеева В.В., Лазарева Н.В., Бурьянов Я.И.</i>	252
<b><i>The increased resistance of transgenic plants with stilbene synthase gene to phytopathogens</i></b>	
<i>Rukavtsova E.B., Zakharchenko N.S., Alekseeva V.V., Lazareva N.V., Buryanov Ya.I.</i>	253
<b><i>Ранс с трансгеном desc цианобактерии Synechococcus vulcanus: жирнокислотный состав листьев</i></b>	
<i>Сахно Л.А., Сливец М.С., Остапчук А.Н., Король Н.А., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В.</i>	254
<b><i>Canola with cyanobacterium Synechococcus vulcanus desc transgene: leaf fatty acid composition</i></b>	
<i>Sakhno L.O., Slyvets M.S., Ostapchuk A.M., Korol N.A., Sheludko Y.V., Goldenkova-Pavlova I.V.</i>	255
<b><i>Структурно-функциональные характеристики трансгенных растений томата, экспрессирующих Fe-зависимую супероксиддисмутазу</i></b>	
<i>Серенко Е.К., Аканов Э.Н., Чеботарева И.Б., Куренина Л.В., Гулевич А.А., Баранова Е.Н.</i>	256
<b><i>Structural and functional characterization of transgenic tomato plants expressing the Fe-dependent superoxide dismutase</i></b>	
<i>Serenko E.K., Akanov E.N., Chebotareva I.B., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Baranova E.N.</i>	257
<b><i>Клонирование и характеристика регуляторных элементов для экспрессии трансгенов в меристемах растений</i></b>	
<i>Сидорчук Ю.В., Герасименко И.М., Казанцев А.А., Шелудько Ю.В., Дейнеко Е.В.</i>	258
<b><i>Cloning and characterization of regulatory elements for specific transgene expression in plant meristems</i></b>	
<i>Sidorchuk Y., Gerasymenko I., Kazantsev A., Sheludko Y., Deineko E.V.</i>	259
<b><i>Культура трансформированных корней как альтернативный способ получения фенольных кислот из Fagopyrum esculentum Moench.</i></b>	
<i>Оксана Ситар, Ахмед Магди Габр, Наталия Таран, Ирина Сметанская</i>	260
<b><i>Генетическая инженерия Pleurotus ostreatus как один из методов сохранения и воспроизведения её генофонда.</i></b>	
<i>Смирнова ЮВ., Лавлинский А.В., Попов В.Н.</i>	261
<b><i>Genetic engineering Pleurotus osteatus as one of the methods to maintain and reproduce its gene pool.</i></b>	
<i>Smirnova U.V., Lavlinskiy A.V., Popov V.N.</i>	262

<b>Экспрессия гетерологичных генов в растительных системах: новые возможности</b>	263
Тюрин А.А., Бердичевец И.Н., Мустафаев О., Никифорова Х.Р., Фадеев В.С., <u>Голденкова-Павлова И.В.</u>	

<b>Heterologous gene expression in plant systems: new opportunities</b>	264
Turin A.A., Berdichevats I.N., Mustafaev O., Nikiforova Ch.R., Fadeev V.S., <u>Goldenkova-Pavlova I.V.</u>	

<b>Агробактериальная трансформация сорго <i>in planta</i> и в культуре <i>in vitro</i> и получение трансгенных растений с измененным составом запасных белков</b>	265
Эльконин Л.А., Итальянская Ю.В., Баранкова И.В., Носова О.Н., Ракитин А.Л., Равин Н.В.	

<b>Agrobacterium-mediated genetic transformation of sorghum in <i>in planta</i> and <i>in vitro</i> conditions and obtaining of transgenic plants with modified composition of seed storage proteins</b>	266
Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Barankova I.V., Nosova O.N., Rakitin A.L., Ravin N.V.	

**СЕКЦИЯ 5. Коллекции культур клеток и тканей растений и методы сохранения генофонда**

**SECTION 5. Collections of plant cell and tissue cultures; the methods of gene pool preservation**

<b>Криосохранение растительного материала земляники <i>Fragaria L.</i></b>	268
Балекин А.Ю., Высоцкая О.Н.	

<b>Cryopreservation of strawberry plant material (<i>Fragaria L.</i>)</b>	269
Balekin A.Y., Vysotskaya O.N.	

<b>Технология культивирования <i>in vitro</i> некоторых сортов винограда</b>	270
Х.И.Бободжанова, Абдулалिशоева С.Ф., Ясаулова Ш.К., Бабаева С.Х.	

<b>Rowing technology of some varieties of grape <i>in vitro</i></b>	271
Bobodzhanova, S. F. Abdulalishoeva, Sh. K. Yasaulova, S. Kh. Babaeva	

<b>Влияние спектрального состава света на развитие микрорастений жимолости при клональном микроразмножении</b>	272
В.А. Валиков	

<b>Длительное беспересадочное хранение различных генотипов осины в условиях <i>in vitro</i></b>	273
Видягина Е.О., Филиппов М.В., Шестибратов К.А.	

<b><i>Long-term of different aspen genotypes in vitro without repotting</i></b> <i>Vidyagina E.O., Filippov M.V., Shestibratov K.A.</i>	274
<b><i>Сохранение цитогенетических и физиологических характеристик в культуре клеток люцерны после криохранения в течение длительного времени</i></b> <i>Волкова Л.А., Урманцева В.В., Носов А.М.</i>	275
<b><i>Особенности криохранения дегидратированных апексов, изолированных из растений земляники (Fragaria l.) культивированных in vitro</i></b> <i>Высоцкая О.Н.</i>	276
<b><i>Cryostorage particulars of dehydrated apices isolated from strawberry (Fragaria l.) plantlets cultivated in vitro</i></b> <i>Vysotskaya O.N.</i>	277
<b><i>Сохранение генетического разнообразия вегетативно размножаемых культурных растений в контролируемых условиях среды in vitro</i></b> <i>Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Шувалова А.Р., Крылова Е.А., Овчинникова А.Б., Пендинен Г.И., Шувалова Л.Е., Черепко М.М., Волкова Н.Н.</i>	278
<b><i>Maintenance of genetic diversity of vegetatively propagated plant crops under controlled environment in vitro</i></b> <i>Gavrilenko T.A., Dunaeva S.E., Antonova O.Y., Shvachko N.A., Shuvalova A.R., Krylova E.A., Ovchinnikova A.B., Pendinen G.I., Cherepko M.M., Shuvalova L.E., Volkova N.N.</i>	279
<b><i>Сохранение разнообразия малин и ежевик в коллекции in vitro ВНИИР им. Н.И. Вавилова (ВИР)</i></b> <i>Дунаева С. Е., Шувалова Л. Е., Гавриленко Т. А.</i>	280
<b><i>In vitro preservation of raspberry and blackberry diversity at the VIR</i></b> <i>Dunaeva S. E., Shuvalova L. E., Gavrilenko T. A.</i>	281
<b><i>Подбор информативных праймеров к полиморфным микросателлитным локусам для идентификации картофеля</i></b> <i>Есимсеитова А.К., Шустов А.В., Какимжанова А.А.</i>	282
<b><i>Selection of informative primers to microsatellite loci for identification of potato genotypes</i></b> <i>Esimseitova A.K., Shustov A.V., Kakimzhanova A.A.</i>	283
<b><i>Технология проращивания семян Nitraria sibirica в культуре in vitro</i></b> <i>Железниченко Т. В., Новикова Т. И., Банаев Е. В.</i>	284
<b><i>Germination technology of Nitraria sibirica in vitro culture</i></b> <i>Zheleznichenko T. V., Novikova, T. I., Banaev E. V.</i>	285

<b>Влияние освещения на морфогенез <i>Potentilla recta</i> L. subsp. <i>laciniosa</i> (Waldst. et Kit. ex Nestler) Nyman в условиях <i>in vitro</i></b> Заяц А.Ю., Митрофанова И.В.	286
<b>The effect of illumination on morphogenesis <i>in vitro</i> of <i>Potentilla recta</i> L. subsp. <i>laciniosa</i> (Waldst. et Kit. ex Nestler) Nyman</b> Zaiats A., Mitrofanova I.	287
<b>Различные пути регенерации растений фейхоа в условиях <i>in vitro</i></b> Иванова Н.Н., Митрофанова И.В.	288
<b>Different ways of feijoas plants regeneration <i>in vitro</i></b> Ivanova N.N., Mitrofanova I.V.	289
<b>Оценка регенерационной способности эксплантов клематиса разных садовых групп на этапе введения в культуру <i>in vitro</i></b> Корзина Н.В., Митрофанова И.В.	290
<b>Особенности введения в культуру <i>in vitro</i> лапчатки волжской (<i>Potentilla volgarica</i> Juz.)</b> Крицкая Т.А., Кашин А.С.	291
<b>Features of the introduction of <i>Potentilla volgarica</i> Juz. to the culture <i>in vitro</i></b> Kriczkaya T.A., Kashin A.S.	292
<b>Введение в культуру <i>in vitro</i> видов семейства <i>Cupressaceae</i></b> Е.В. Курицкая, Э.В. Вржосек, Е.В. Болтенков	293
<b>Cultivation of <i>Cupressaceae</i> <i>in vitro</i></b> E.V. Kuritskaya, E.V. Wrjhossek, E.V. Boltenkov	294
<b>Создание банка генов картофеля с использованием культуры <i>in vitro</i> и криосохранения</b> Магзумова Г.К., Какимжанова А.А.	295
<b>Creation of potato gene bank using <i>in vitro</i> cultures and cryopreservation</b> Magzumova G.K., Kakimzhanova A.A.	296
<b>Влияние типа эксплантов на пролиферацию крыжовника <i>in vitro</i></b> Матушкин С.А.	297
<b>The effect of explant type on gooseberry proliferation <i>in vitro</i></b> Matushkin S.A.	298
<b>Влияние биологически активных веществ на регенерацию яблони и груши <i>in vitro</i></b> Матушкина О.В.	299
<b>The effect of biologically active substances on apple and pear regeneration <i>in vitro</i></b> Matushkina O.V.	300

<b>Цитогенетические и молекулярно-генетические особенности коллекции ценных генотипов березы, длительно культивируемой в условиях <i>in vitro</i></b>	301
<i>Машкина О.С., Табацкая Т.М., Баранов О.Ю., Зеленина Е.А.</i>	
<b><i>Cytogenetic and molecular-genetic features of valuable birch genotypes collection, long-term cultured in vitro</i></b>	302
<i>Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Baranov O.Yu., Zelenina E.A.</i>	
<b>Индукторы и ингибиторы биотехнологических процессов размножения и сохранения растений</b>	303
<i>Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П.</i>	
<b><i>Inductors and inhibitors of biotechnology process of plant propagation and conservation</i></b>	303
<i>Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P.</i>	
<b>Сохранение и устойчивое воспроизводство генофонда высших растений с использованием методов биотехнологии</b>	305
<i>Молканова О.И.</i>	
<b><i>Preservation and sustainable reproduction of the gene pool of higher plants with biotechnological methods</i></b>	306
<i>Molkanova O.I.</i>	
<b><i>Dactylorhiza baltica (Orchidaceae) в криоколлекции семян ИФР РАН</i></b>	307
<i>Никишина Т.В., Козлова О.Н., Левицкая Г.Е.З, Высоцкая О.Н.</i>	
<b><i>Dactylorhiza baltica in orchid seed cryocollection of IPP RAS</i></b>	308
<i>Nikishina T.V., Kozlova O.N., Levitskaya G.E., Vysotskaya O.N.</i>	
<b>Культура крестовников <i>in vitro</i> для морфометрии побеговых меристем</b>	309
<i>Озерова Л.В., Бургутин А.Б.</i>	
<b>Размножение семян дуба черешчатого <i>in vitro</i> в свете биохимических особенностей материнских растений</b>	310
<i>Полякова Л.В.</i>	
<b><i>Mitropropagation of quercus robur seedlings with the help of biochemical traits</i></b>	311
<i>Polyakova L.V.</i>	
<b>Генофонд коллекции асептических культур как источник материала для селекции и клонального микроразмножения</b>	312
<i>Решетников В.Н., Фоменко Т.И., Спиридович Е.В., Козлова О.Н., Филипеня В.Л., Брель Н.Г., Бердичевец Л.Г.</i>	
<b><i>Genofund of the collection of aseptic cultures as the material source for selection and klonal micropropagation</i></b>	313
<i>Reshetnikov V. N., Fomenko T.I., Spiridovich E.V., Kozlova O. N., Filipenia V. L., Brel N. G., Berdichevets L.G.</i>	

<b>Сохранение оздоровленных от вирусов коллекций плодовых и ягодных культур <i>in vitro</i></b>	314
<i>V.A. Samus, N.V. Kukharchuk, M.S. Kastritskaya</i>	
<b>Maintenance of virus free collection of horticultural crops <i>in vitro</i></b>	315
<i>V.A. Samus, N.V. Kukharchuk, M.S. Kastritskaya</i>	
<b>Влияние длительности дегидратации на молекулярные и физиологические характеристики растений земляники лесной, восстановленных после криосохранения</b>	316
<i>Соловьева А.И., Высоцкая О.Н., Долгих Ю.И.</i>	
<b>Effect of dehydration duration on molecular and physiological characteristics of wild alpine strawberry plants recovered from cryopreservation</b>	317
<i>Solov'yova A.I., Vysockaya O.N., Dolgih Yu.I.</i>	
<b>Микроклональное размножение некоторых видов льна в культуре <i>in vitro</i>.</b>	318
<i>Сперанская А.С., Криницына А.А., Мельникова Н.В., Беленикин М.С., Большева Н.Л., Зеленин А.В., Муравенко О.В.</i>	
<b>Micropropagation of some species of flax <i>in vitro</i>.</b>	319
<i>Speranskaya A.S., Krinitsina A.A., Melnikova N.V, Belenikin M.S., Bolsheva N.L., Zelenin A.V., Muravenko O.V.</i>	
<b>Сохранение в условиях <i>in vitro</i> генофонда сирени селекции ЦБС НАН Беларуси</b>	320
<i>Спиридович Е.В., Брель Н.Г., Фоменко Т.И., Власова А.Б., Юхимук А.Н.</i>	
<b><i>In vitro</i> conservation of genetic pool of lilac collection of Central Botanical Gardens of Belarus selection</b>	321
<i>Spiridovich E.V., Brel N.G., Fomenko T.I., Vlasova N.B, Yukhimuk A.N.</i>	
<b>Подбор молекулярно-генетических маркеров для изучения полиморфизма днк яровой мягкой пшеницы с целью их паспортизации</b>	322
<i>Тагиманова Д.С., Хапилина О.Н., Турганбаева А.К., Райзер О.Б., Ергалиева А. Ж.</i>	
<b>Selection of molecular genetic markers to study spring wheat dna polymorphism to their certification</b>	323
<i>Tagimanova D.S., Khapilina O.N., Turganbaeva A.K., Reizer O.B., Ergalieva A.</i>	
<b>Каллусогенез в культуре тканей <i>Taxus baccata L. in vitro</i></b>	324
<i>Теплицкая Л.М., Сидякин А.И.</i>	
<b>Callus formation in callus cell culture of <i>Taxus baccata L. in vitro</i></b>	325
<i>Teplitskaya L.M., Sidiakin A.I.</i>	

<b>Криоконсервация местных южно-американских сортов картофеля из <i>in vitro</i> коллекции ВИР</b>	326
<i>Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А.</i>	
<b>Cryopreservation of potato landraces from <i>in vitro</i> collection of VIR</b>	327
<i>Shvachko N, Volkova N., Gavrilenko T.</i>	
<b>Регенерационная способность перспективных сортов малины на этапе введения в культуру <i>in vitro</i></b>	328
<i>Ярмоленко Л.В.</i>	
<b>The regenerative ability of promising raspberry cultivars at the stage of introduction into <i>in vitro</i> culture</b>	329
<i>Yarmolenko L.V.</i>	
<b><u>СЕКЦИЯ 6. Использование культур клеток растений в промышленной и сельскохозяйственной биотехнологии</u></b>	
<b><u>SECTION 6. Application of plant cell cultures in industry and agricultural biotechnology</u></b>	
<b>Гаплоидные технологии и возможности использования культуры пыльников для создания форм, устойчивых к водному дефициту.</b>	332
<i>С.С.Беккужина, И. Рахимбаев</i>	
<b>Haploid technologies and possibilities of using anther culture for creating forms resistant to water deficit</b>	333
<i>S.S.Bekkuzhina, I. Rahimbaev</i>	
<b>Создание и изучение ассоциативного симбиоза <i>Azospirillum brasilense</i> и <i>Solanum tuberosum</i> <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i></b>	334
<i>Бойкова Н.В., Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Матора Л.Ю., Бурьгин Г.Л., Щеголев С.Ю.</i>	
<b>Creation and study of associative symbiosis of <i>Azospirillum brasilense</i> and <i>Solanum tuberosum</i> <i>in vitro</i> and <i>ex vitro</i></b>	335
<i>Boykova N.V., Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Shchyogolev S.Yu.</i>	
<b>Методы культуры тканей растений в селекции и семеноводстве картофеля</b>	336
<i>Гизатуллина А.Т., Сташевски З., Гимаева Е.А.</i>	
<b>Plant tissue culture methods in breeding and seed potato production</b>	337
<i>Gizatullina A.T., Stasevski Z., Gimaeva E.A.</i>	
<b>Использование клеточной селекции для получения растений, устойчивых к неблагоприятным условиям городов</b>	338
<i>Гладков Е.А., Долгих Ю.И.</i>	
<b>Use of cell selection for receiving the plants resistant against adverse conditions of cities</b>	339
<i>Gladkov E.A., Dolgikh Yu.I.</i>	

<b>Культура клеток в селекции пшеницы и тритикале</b>	
<i>Дьячук Т.И., Акинина В.Н., Поминов А.В., Кибкало И.А., Итальянская Ю.В., Сафронова Н.Ф.</i>	340
<b>Cell culture in wheat and triticale breeding</b>	
<i>Dyatchouk T.I., Akinina V.N., Pominov A.V., Kibkalo I.A., Italianskaya Ju.V., Safronova N.F.</i>	341
<b>Разработка методов селекции <i>in vitro</i> для получения устойчивых к осмотическому стрессу форм эфиромасличных растений</b>	342
<i>Егорова Н.А., Ставцева И.В.</i>	
<b>Development of selection <i>in vitro</i> methods for obtaining osmotic stress resistant forms of essential oil plants</b>	343
<i>Yegorova N.A., Stavtzeva I.V.</i>	
<b>Изучение влияния наноконпозитов селена на <i>Solanum tuberosum</i> сорта луговской <i>in vitro</i>.</b>	
<i>Живетьев М.А., Папкина А.В., Перфильева А.И., Турская А.Л., Маркова Ю.А., Граскова И.А., Боровский Г.Б., Сухов Б.Г.</i>	344
<b>Study of selenium nanocomposites on <i>Solanum tuberosum</i> of lugovskoy variety <i>in vitro</i>.</b>	345
<i>Zhivet'yev M.A., Papkina A.V., Perfilyeva A.I. Turskaya A.L., Markova YuA., Graskova I.A., Borovsky G.B., Sukhov B.G.</i>	
<b>Молекулярно–генетический полиморфизм клеточных линий и растений-регенерантов мягкой пшеницы при клеточной селекции на устойчивость к водному дефициту</b>	346
<i>Зинченко М. А., Бавол А. В., Дубровная О. В.</i>	
<b>Molecular polymorphism of wheat cellular lines and regenerated plants at the cell selection for resistance to drought tolerance</b>	347
<i>Zinchenko M. O. Baval A. V., Dubrovna O. V.</i>	
<b>Разработка гаплоидной биотехнологии риса (<i>Oryza sativa</i> L.) на основе культуры изолированных микроспор <i>in vitro</i></b>	348
<i>Искакова К.М., Анапияев Б.Б., Бейсенбек Е.Б., Жанбырбаен Е.А., Казкеев Д.Т</i>	
<b>Development of haploid biotechnology of rice (<i>Oryza sativa</i> L.) on base of isolated microspores culture <i>in vitro</i></b>	349
<i>Iskakova K.M., Anapiyayev B.B., Beisenbek B.B., Zambirbayev E.A., Kazkeev D.T.</i>	
<b>Тритерпеновые гликозиды как маркеры адаптационного потенциала и продуктивности сахарной свеклы (<i>Beta vulgaris</i> L.)</b>	350
<i>Кляченко О.Л., Крыловская С.А.</i>	
<b>Triterpene glycosides as markers of the sugar beet's (<i>Beta vulgaris</i> L.) adaptive potential and productivity</b>	351
<i>Klyachenko O.L., Krylovskaya S.A.</i>	



<b>Использование методов клеточной селекции для получения засухоустойчивых растений озимого рапса (<i>Brassica napus</i> L.)</b>	352
<i>Кляченко О.Л., Никифорова Н.В.</i>	
<b>Особенности каллусогенеза <i>Hypericum perforatum</i> L. и <i>Hypericum maculatum</i> Crantz. in vitro</b>	353
<i>Коваль О. С., Дробык Н. М.</i>	
<b>Peculiarities of <i>Hypericum perforatum</i> L. and <i>Hypericum maculatum</i> Crantz. callus formation in vitro</b>	354
<i>Koval O. S., Drobuk N.M.</i>	
<b>Инициация асептических культур спонтанных гибридов березы (<i>Betula pubescens</i> Ehrh × <i>Betula pendula</i> Roth) для получения клонов форм с измененной плоидностью</b>	355
<i>Константинов А.В., Кулагин Д.В., Богинская Л.А.</i>	
<b>Initiation of aseptic cultures of spontaneous hybrids of birch (<i>Betula pubescens</i> Ehrh × <i>Betula pendula</i> Roth) to produce clonal forms with altered ploidy</b>	356
<i>Konstantinov A.V., Kulagin D.V., Boginskaya L.A.</i>	
<b>Экспериментальные и клинические исследования антитератогенного действия экстрактов биомассы <i>Polyscias filicifolia</i> («Витагмала»), получаемой методами культуры клеток: итоги и перспективы</b>	357
<i>Котин А.М.</i>	
<b>Влияние различных типов цитокининов на микроразмножение сирени сорта «Великая Победа».</b>	358
<i>Криницына А.А., Чурикова О.А.</i>	
<b>The influence of different types of cytokinines on the micropropagation of Lilac cv. “Velikaya Pobieda”.</b>	359
<i>Krinitsina A.A., Churikova O.A.</i>	
<b>Предпосылки реального использования генетически трансформированных корней шлемника в медицинской промышленности</b>	360
<i>Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Прокофьева М.Ю., Умралина А.Р., Чернышева Т.П.</i>	
<b>Background for real using of genetically transformed skullcap roots in the medical industry</b>	361
<i>Kuzovkina I.N., Guseva A.V., Prokofieva M.Yu., Umralina A.R., Chernyshova N.P.</i>	
<b>Проблема введения в культуру клеток льна декоративного</b>	362
<i>Литвинова И.И., Gladkov E.A.</i>	
<b>Introduction problems into the cell culture of <i>Linum grandiflorum</i> L. and <i>Linum perenne</i> L.</b>	363
<i>Litvinova I.I., Gladkov E.A.</i>	

<b>Получение хризантемы килеватой (<i>Chrysanthemum carinatum</i> L.) устойчивой к ионам меди</b>	364
Литвинова И.И., Гладков Е.А.	
<b>Getting <i>Chrysanthemum carinatum</i> L. resistant to cooper ions</b>	365
Litvinova I.I., Gladkov E.A.	
<b>Физиологические особенности культивирования каланхоэ в условиях <i>in vitro</i></b>	366
Майсурян А.Н., Садирмекова К.Г., Овчинникова В.Н., Варламова Н.В., Харченко П.Н.	
<b>Physiological peculiarities of <i>in vitro</i> culturing of <i>kalanchoe</i></b>	367
Maisuryan A.N., Sadirmekova K.G., Ovchinnikova V.N., Varlamova N.V., Kharchenko P.N.	
<b>Содержание вторичных метаболитов в клеточной и тканевой культуре <i>Hedysarum theinum</i> Krasnob.</b>	368
Новикова Т.И., Кузовкова А.А., Эрст А.А., Банаев Е.В.	
<b>Content of secondary metabolites in cell and tissue culture of <i>Hedysarum theinum</i> Krasnob.</b>	369
Novikova T.I., Kuzovkova A.A., Erst A.A., Banaev E.V.	
<b>Морфогенез и клональное микроразмножение в культуре <i>in vitro</i> скорцонеры (<i>Scorzonera hispanica</i> L.)</b>	370
Овчинникова В.Н., Варламова Н.В., Майсурян А.Н., Садирмекова К.Г., Харченко П.Н.	
<b>Morphogenesis and microclonal propagation of <i>scorzonera</i> (<i>Scorzonera hispanica</i> L.), cultured <i>in vitro</i></b>	371
Ovchinnikova V.N., Varlamova N.V., Sadirmekova K.G., Maisuryan A.N., Kharchenko P.N.	
<b>Методы культивирования <i>in vitro</i> в основе хромосомной инженерии при создании новых генотипов мягкой пшеницы</b>	372
Першина Л.А., Осадчая Т.С., Трубачеева Н.В., Кравцова Л.А., Белан И.А., Росеева Л.П.	
<b>Methods <i>in vitro</i> in basic of chromosome engineering for development of new common wheat genotypes</b>	373
Pershina L.A., Osadchaya T.S., Trubacheeva N.V., Kravtzova L.A., Belan I.A., Rosseeva L.P.	
<b>Молекулярно - генетическая идентификация линий регенерантов мягкой пшеницы с использованием ретротранспозонов</b>	374
Райзер О.Б., Хапилина О.Н.	
<b>Molecular -genetic identification of regenerants of spring wheat using retrotransposons</b>	375
Raiser O.B., Hapilina O. N.	

<b>Получение ценных форм пшеницы на основе клеточной технологии длительной регенерации растений</b>	376
<i>Рахимбаев И.Р., Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Парменова А.К., Шилманова А., Касымхан К., М.К. Карабаев</i>	
<b>Obtaining of valuable wheat forms by the use of long-term plant regeneration cell technology</b>	377
<i>Rakhimbayev I.R., Bishimbayeva N.K., Amirova A.K., Parmenova A.K., Shilmanova A.A., Kasymkhan K., Karabayev M.K.</i>	
<b>Подбор оптимальных схем селекции на устойчивость к фитофторозу для получения регенерантов гибридов картофеля</b>	378
<i>Сарсекова А.Н., Измагамбетова А.Ж., Нечай Н.Л., Есимсеитова А.К., Какимжанова А.А.</i>	
<b>Selection of the optimal selection scheme for resistance to late blight in potato</b>	379
<i>Sarsekova A.N., Izmagambetova A., Nechay N.L., Esimseitova A.K., Kakimzhanova A.A.</i>	
<b>Использование культур клеток растений при создании плантаций с коротким циклом ротации</b>	380
<i>Сергеев Р.В., Новиков П.С., Большакова Е.Е., Шургин А.И.</i>	
<b>Суспензионные культуры клеток растений как перспективные системы для продукции гетерологичных белков</b>	381
<i>Сидорчук Ю.В., Загорская А.А., Дейнеко Е.В.</i>	
<b>Suspension cultures of plant cells as perspective systems for production of heterologous proteins</b>	382
<i>Sidorchuk Yu.V., Zagorskaya A.A., Deineko E.V.</i>	
<b>Штаммы лекарственных растений – модель инновационных фитобиотехнологий</b>	383
<i>Слепян Л.И., Каухова И.Е., Кириллова Н.В., Громова О.Н., Н.С. Пивоварова.</i>	
<b>The strains of medicinal plant tissue cultures as a model of innovative phytobiotechnology</b>	384
<i>Slepyan L.I., Kauchova I.E., Kirilova N.V., Gromova O.N., Pivovarova N.S.</i>	
<b>Использование селективных систем <i>in vitro</i> в селекции гороха (<i>Pisum sativum</i> L.) на засухоустойчивость</b>	385
<i>Соболева Г.В.</i>	
<b>Use of <i>in vitro</i> selective systems in breeding of pea (<i>Pisum sativum</i> L.) for resistance to drought</b>	386
<i>Soboleva G.V.</i>	
<b>Регенерационный популяционный потенциал <i>Syringa vulgaris</i> L. в культуре <i>in vitro</i></b>	387
<i>Соловьева В.В., Тихомирова Л.И.</i>	

<b>Regeneration potential of <i>Syringa vulgaris</i> L. in culture in vitro</b> Solovjeva V.V., Tikhomirova L.I.	388
<b>Использование биотехнологических методов в межвидовой гибридной селекции чечевицы</b> Суворова Г.Н., Иконников А.В.	389
<b>Use of bioechnological approaches in interspecific hybridisation of lentil</b> Suvorova G., Ikonnikov A.	390
<b>Влияние смены системы культивирования на дыхательную активность суспензионной культуры клеток <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall.</b> Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Горшкова Е.Н., Носов А.М.	391
<b>Исследование процессов роста и биосинтеза в суспензионной культуре клеток <i>Taxus baccata</i> при выращивании в колбах и биореакторах</b> Титова М.В., Черняк Н.Д., Соловьева Л., Кочкин Д.В., Суханова Е.С., Спринчану Е.К., Носов А.М.	392
<b>Разработка методов искусственного заражения хризантем <i>Chrysanthemum virus b</i> (cvb)</b> Титова С.М., Фирсов А.П., Митюшкина Т. Ю., Долгов С.В.	393
<b>Development of artificial infection of <i>Chrysanthemum virus b</i> (cvb) in <i>Chrysanthemum</i></b> Titova S. M., Firsov A. P., Mitiochkina T. Yu., Dolgov S.V.	394
<b>Особенности гаметоклональной изменчивости у генотипов мягкой пшеницы гибридного происхождения</b> Трубачеева Н.В., Осадчая Т.С., Кравцова Л.А., Першина Л.А.	395
<b>Gametoclonal variation in germplasm of hybrid common wheat</b> Trubacheeva N.V., Osadhaya T.S., Kravtsova L.A., Pershina L.A.	396
<b>Генотипирование пшеницы с использованием ДНК-маркеров</b> Турганбаева А.К., Хапилина О.Н., Какимжанова А.А., Тагиманова Д.С., Ергалиева А.Ж.	397
<b>Genotyping of wheat with DNA-markers</b> Turganbayeva A.K., Napilina O.N., Kakimzhanova A.A., Tagimanova D.S., Ergalieva A.Z.	398
<b>Клеточные биотехнологии повышения содержания ценных метаболитов в растениях <i>Agastache rugosa</i></b> Фоменко Т.И., Спиридович Е.В., Мазур Т.В., Юхимук А.Н.	399
<b>Cellular biotechnologies of valuable metabolites content increase in <i>Agastache rugosa</i> plants</b> Fomenko T.I. Spiridovich E.V. Masur T.V. Yukhimuk A.N.	400

<b>Укоренение микрочеренков сирени в вермикулите.</b> <i>Шипунова А.А., Валиков В.А.</i>	401
<b>Rooting of lilac micro-cuttings in vermiculite</b> <i>Shipunova A.A., Valikov V.A.</i>	402
<b>Биохимическая и цитологическая оценка на устойчивость к алюминию отобранных <i>in vitro</i> растений ячменя</b> <i>Широкых И.Г., Огородникова С.Ю., Баранова Е.Н.</i>	403
<b>Biochemical and cytological estimation in resistant to aluminum of barley plants obtained <i>in vitro</i></b> <i>Shirokikh I.G., Ogorodnikova S.Yu., Baranova E.N.</i>	404
<b>Получение <i>in vitro</i> генотипов ячменя с устойчивостью к токсичным металлам</b> <i>Шуплецова О.Н., Широких И.Г.</i>	405
<b>Obtaining <i>in vitro</i> genotypes barley with resistance to toxic metals</b> <i>Shupletsova O.N., Shirokikh I.G.</i>	406
<b>Соматическая гибридизация картофеля: проблемы, перспективы</b> <i>Яковлева Г.А., Семанюк Т.В., Дубинич В.Л., Родькина И.А., Щурко К.А., Монархович С.В.</i>	407
<b>Somatic hybridization of potato: problems and perspectives</b> <i>Yakovleva G.A., Semanyuk T.V., Dubinich V.L., Rodzkina I.A., Schcurko K.A., Manarkhovich S.V.</i>	408
<b>Вторичная соматическая гибридизация картофеля</b> <i>Яковлева Г.А., Семанюк Т.В., Дубинич В.Л., Родькина И.А., Щурко К.А., Маханько О.В., Монархович С.В.</i>	409
<b>Secondary somatic hybridization of potato</b> <i>Yakovleva G.A., Semanyuk T.V., Dubinich V.L., Rodzkina I.A., Schcurko K.A., Makhanko O.V., Manarkhovich S.V.</i>	410
<b>Авторский указатель</b>	411



*Пленарные доклады*  
*Plenary presentations*

**FUNGAL SYMBIONTS OF THE GENUS PERIGLANDULA ARE RESPONSIBLE FOR THE OCCURRENCE OF ERGOLINE ALKALOIDS IN HIGHER PLANTS**

**Leistner E.,<sup>1</sup>Steiner U.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institut für Pharmazeutische Biologie, Rheinische Friedrich Wilhelms-Universität Bonn, Nussallee 6, D-53115 Bonn, Germany

e-mail: [eleistner@uni-bonn.de](mailto:eleistner@uni-bonn.de)

<sup>2</sup>Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES), Rheinische Friedrich Wilhelms-Universität Bonn, Germany

e-mail: [u-steiner@uni-bonn.de](mailto:u-steiner@uni-bonn.de)

Convolvulaceous plants such as *Ipomoea asarifolia* and *Turbina corymbosa* are esteemed in southern Mexico as one of the principal hallucinogens for use in divinations as well as magico-religious rituals. The physiologically active hallucinogens are ergot alkaloids which occur not only in Convolvulaceae but also fungi of the family Clavicipitaceae. The disjunct occurrence of ergoline alkaloids in higher plants and fungi seems to contradict the principle of chemotaxonomy that identical or at least structurally related natural products occur in taxonomically related organisms. This question has now been solved by the observation that some dicotyledonous plants belonging to the family Convolvulaceae such as *Ipomoea asarifolia* and *Turbina corymbosa* carry epibiotic fungi. The fungi present on different plant species are not identical albeit taxonomically closely related clavicipitaceous fungi. They belong to the newly described fungal genus *Periglandula*.

Thus, the presence of ergoline alkaloids in dicotyledonous plants is not based on their capacity to synthesize ergoline alkaloids but rather on the ability to live in a symbiotic association with ergoline alkaloid producing fungi. These fungi carry genes known to be responsible for ergoline alkaloid biosynthesis. Although the fungi are the site of synthesis the alkaloids occur almost exclusively in the host plant indicating that a transport system must exist that translocates alkaloids from the fungus into the plant.



**ADVANCED MICROPROPAGATION SYSTEM FOR PLANTLET  
PRODUCTION OF ORNAMENTAL PLANTS**

**Paek, Kee Yoeup<sup>1</sup>, Park, So Young<sup>1</sup> and Lee, Eun Jung<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, 361-763, Korea. Email:paekky@cbnu.ac.kr

<sup>2</sup> Cheongsol Biotech. Gaesindong, Heungduk Gu, Cheongju, Chungbuk Province, 361-763, Korea

The ability to clonally propagate plants has been in common practice for centuries, including propagation by cuttings, grafting, layering and specialized structures such as corms, tubers and bulbs. Further applications of clonal propagation are now being realized through the use of plant tissue culture and biotechnology. Modern biotechnology owes much to its roots derived from plant tissue culture and micropropagation. Success of biotechnological approaches is dependent on regeneration of intact plants following genetic modification, generally by micropropagation, in which rapid proliferation is achieved from small stem cuttings, axillary buds, and to a limited extent from somatic embryos, cell clumps in suspension cultures and bioreactors. The cultured cells and tissues can take several pathways. The pathways that lead to the production of true-to-type plants in large numbers are the preferred ones for commercial multiplication. The process of micropropagation is usually divided into several stages i.e., maintenance of clean stock material, initiation of explants, subculture of explants for multiplication, shooting and rooting, and acclimatization greenhouse. These stages are universally applicable in large –scale micro-plant production. The shipping of acclimatized small micropropagated plants to growers and market also need extra care. The health status of the donor mother plant and of the plant multiplied from it are among the most critical factors, which determine the success of a tissue culture operation. The indexing of the mother plants for freedom from virus, mycoplasma, bacterial and fungal disease is a normal procedure in large-scale propagation through tissue culture. The elimination of most viruses can be achieved by a combination of apical meristem culture and thermotherapy by three and/or four weeks heat treatment at 37-40C. Quality checks are essential to assure production of high quality plants and to have end-users confidence in terms of elimination of somaclonal variants. Varietal conformity based on morphological characters has been basis for identification in conventional propagation and the same applies to the plants derived from tissue culture. But morphological characters are not an absolute proof of genetic conformity or genetic stability in tissue culture. Many times, physiological changes may lead to the appearance of types among micropropagated plants that differ from the parental clone. Genetic changes not associated with morphological traits can be detected by DNA based molecular methods. Low-cost tissue culture technology is the adoption of practices and use of equipment to reduce the unit cost of micropropagule and plant production. Low cost options should lower the cost of production without compromising the quality of the microplants. In low cost technology cost reduction is achieved by improving process efficiency and better utilization of resources.

**MICROSPORE BIOTECHNOLOGY**

**Touraev A.**

Moscow State University, Moscow , Russian Federation; University of Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria; Vienna International Plant Conference Association, Vienna, Austria  
[alisher.touraev@vipca.at](mailto:alisher.touraev@vipca.at); tel. (mobile): +43 699 186 77 203

Higher plant microspores can be switched from their gametophytic mode of development towards sporophytic pathway by several stresses, such as carbohydrate starvation, temperature shock (heat and cold), antimetabolic drugs, high pH and some other not widely used treatments, when isolated and cultured *in vitro*. Formed totipotent microspore can divide sporophytically and further develop into haploids and doubled haploids spontaneously or after treatment with chromosome doubling agent. Thus, plant microspores are haploid cells, which are used in many areas of plant biology, including doubled haploid production, genetic transformation, gene targeting, gene mapping, as a model for studying plant cell totipotency, embryogenesis and plant regeneration, etc. Examples of the use of microspores in plant biotechnology is discussed using authors laboratory research.

**ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ – ПРОДУЦЕНТЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЦЕННЫХ БЕЛКОВ**

Дейнеко Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, Россия, просп. Академика Лаврентьева, 10, тел.: +7(383) 363-49-26 (доб.3204), E-mail:[deineko@bionet.nsc.ru](mailto:deineko@bionet.nsc.ru)

Для медицинских целей растения используются человечеством уже многие тысячи лет. Однако только на рубеже 21 века с помощью методов генетической инженерии стало возможным создавать новые типы растений, в тканях которых могут синтезироваться и накапливаться белки из различных гетерологичных систем (вирусов, бактерий, животных и человека). В биотехнологии развитых стран наблюдается тенденция привлечения растительных систем экспрессии для производства различных биофармацевтических веществ в трансгенных растениях (биофарминг). К настоящему времени методами биофарминга разрабатывается получение около ста различных субстанций для медицины и ветеринарии. Созданы трансгенные растения, в ядерный и хлоропластный геномы которых перенесены гены, контролирующие синтез соответствующих рекомбинантных белков, важных в терапии различных заболеваний. Успешно коммерциализированы и находятся в продаже рекомбинантные белки (авидин, бета-глюкуронидаза, трипсин и апротинин, Sigma-Aldrich Inc., США), полученные на основе растительных экспрессионных платформ. Несколько десятков различных рекомбинантных субстанций, полученных в растениях, находятся на различных фазах клинических испытаний. По оценкам зарубежных экспертов трансгенные растения могли бы быть более дешевым и безопасным источником рекомбинантных белков или лекарственных субстанций для медицины и ветеринарии по сравнению с традиционными системами экспрессии.

Привлекательность растений в качестве систем экспрессии для накопления рекомбинантных фармацевтически ценных белков обеспечивается многими обстоятельствами. В растительных тканях нет риска загрязнения рекомбинантного белка патогенами животного происхождения – вирусами и прионами. Растительные клетки обеспечивают правильную посттрансляционную модификацию рекомбинантного белка, характерную для эукариотических клеток, а также его сборку и фолдинг. Экспрессированные в растительных клетках рекомбинантные белки могут быть направлены в различные компартменты растительной клетки (вакуоли или люмены эндоплазматического ретикулума), а также в апопласт и различные органы растения (семена, клубни, плоды и т.д.). Благодаря этому рекомбинантные белки в растительных тканях могут быть длительное время (месяцы и годы) сохранены без каких-либо изменений и снижения биологической активности. Немаловажным является и тот факт, что разработанные к настоящему времени методы агробиологического возделывания хозяйственно-важных видов растений, а также системы семеноводства для той или иной культуры, делают растения привлекательными для их использования в качестве биофабрик белков медицинского назначения. Важно отметить, что растения, не подвергаемые термообработке, могут использоваться в качестве готового продукта для профилактики и лечения заболеваний. Такие растения, в тканях которых синтезируются и накапливаются рекомбинантные бактериальные антигены, привлекательны для использования в качестве вакцин и получили специальное название – «съедобные» вакцины. Более того, трансгенные растения представляют удобные модели для разработки новых альтернативных способов доставки (перорально и интраназально) рекомбинантных белков в организмы теплокровных.

Рассмотрено современное состояние рынка рекомбинантных белков медицинского назначения, полученных на основе трансгенных растений и перспективы его развития.

**TRANSGENIC PLANTS as BIOREACTORS of RECOMBINANT  
PHARMACEUTICAL PROTEINS**

**Deineko E.V.**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 630090, Novosibirsk, Russia, Ave. Academy of Sciences, 10, tel.: +7 (383) 363-49-26 (dob.3204), E-mail: deineko@bionet.nsc.ru

For medical purposes, the plants are used by mankind for thousands of years. However, only at the turn of the 21st century through genetic engineering was possible to create new types of plants in the tissues which can be synthesized and accumulated proteins from different heterologous systems (viruses, bacteria, animals, and humans). In biotechnology developed countries tend to attract plant expression systems for the production of a variety of biopharmaceutical compounds in transgenic plants (biopharming). To date, the methods developed biopharming getting about a hundred different substances for human and veterinary medicine. Created transgenic plants in the nuclear and chloroplast genomes are transferred genes that control the synthesis of the corresponding recombinant proteins that are important in the treatment of various diseases. Successfully commercialized and are on sale recombinant proteins (avidin, beta-glucuronidase, trypsin and aprotinin, Sigma-Aldrich Inc., USA), derived from the plant expression platforms. Several dozen different recombinant substances derived from plants, are in various phases of clinical trials. According to foreign experts, transgenic plants could be a cheaper and safe source of recombinant proteins or drug substances for human and veterinary medicine compared to traditional expression systems.

Attractiveness of plants as expression systems for the accumulation of recombinant pharmaceutical proteins provides valuable to many circumstances. In plant tissues there is no risk of contamination of the recombinant protein of animal pathogens - viruses and prions. Plant cells provide proper post-translational modification of the recombinant protein, characteristic of eukaryotic cells, and its assembly and folding. The expressed in plant cells to recombinant proteins can be targeted to different compartments of the plant cell (vacuoles or lumens endoplasmic reticulum), and in the apoplast and the various organs of the plant (seeds, tubers, fruits, etc.). With this recombinant proteins in plant tissues may be a long time (months or years) kept unchanged and reduce biological activity. Also important is the fact that developed to date methods of agro-farming economically important plant species and seed systems to a particular culture, the plants make them attractive for use as bioreactors for medical purposes. It is important to note that the plants are not subjected to heat treatment, can be used as a finished product for the prevention and treatment of diseases. These plants, which are synthesized in the tissues and accumulate recombinant bacterial antigens are attractive for use as vaccines and received a special name - "edible" vaccines. Moreover, transgenic plants are convenient model for the development of new alternative delivery methods (oral and nasal) of recombinant proteins in warm-blooded organisms.

The current state of the market of recombinant proteins of medical derived from transgenic plants and the prospects for its development.

**КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ТРИТЕРПЕНОВЫХ  
ГЛИКОЗИДОВ КУЛЬТУР КЛЕТОК *IN VITRO* ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА  
ARALIACEAE (НА ПРИМЕРЕ *PANAX* SPP. И *POLYSCIAS* SPP.)**

**Кочкин Д.В., Носов А.М.**

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, 119234, Ленинские горы, 1/12, Биологический факультет МГУ, факс: +7 (495) 939-43-09; тел.: +7 (495) 939-21-18, e-mail: dmitry-kochkin@mail.ru

В настоящей работе проведено исследование структурного многообразия и особенностей накопления тритерпеновых гликозидов в культурах клеток представителей семейства Araliaceae - женьшеня настоящего *Panax ginseng*, женьшеня японского *Panax japonicus* var. *repens*, полисциаса папоротниколистного *Polyscias filicifolia* и полисциаса кустарникового *Polyscias fruticosa*.

Систематическое фитохимическое исследование суспензионных культур клеток двух видов полисциаса проведено впервые. Доказано наличие в культурах клеток *P. filicifolia* и *P. fruticosa* тритерпеновых гликозидов с олеаноловой кислотой в качестве агликона. С помощью масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии определена структура четырех из обнаруженных соединений: ладигинозида А, полисциозида А, полисциозида Е и глюкопиранозид-(1-2)-глюкуронопиранозид-3-олеаноловой кислоты-28-глюкопиранозид. С помощью ВЭЖХ анализа выяснены особенности накопления этих гликозидов в процессе роста данных культур клеток. Показано различие качественного и количественного состава тритерпеновых гликозидов суспензионных культур клеток *P. filicifolia* и *P. fruticosa*, установлено, что культура клеток *P. filicifolia* характеризуется более высоким уровнем накопления тритерпеновых гликозидов.

Для культуры клеток *Panax japonicus* var. *repens* с использованием методов масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии впервые доказано присутствие гинзенозидов малонил-Rb<sub>1</sub>, -Rc, -Rb<sub>2</sub>, -Rd. Для выяснения закономерностей образования индивидуальных гинзенозидов (Rg<sub>1</sub>, R<sub>0</sub>, малонил-Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub>, and Rd) в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens* было проведено изучение изменения их содержания при длительном (около 4 лет) выращивании этой культуры в колбах. При этом установлено, что более 75% от общего содержания гинзенозидов в сумме составляли Rg<sub>1</sub>, R<sub>0</sub> и малонил-Rb<sub>1</sub>. На основании этих результатов и данных литературы высказано предположение о том, что образование в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens* значительного количества гинзенозидов, должно быть связано с их компартиментацией. В частности, накопление гинзенозидов 20(S)-протопанаксадиола (прежде всего Rb<sub>1</sub>) тесно связано с процессом образования соответствующих малонильных производных. При этом предполагается, что присоединение остатка малоновой кислоты способствует перераспределению этих гликозидов в вакуоль, как это показано для флавоноидов. С другой стороны, уникальное строение гликозидов группы 20(S)-протопанаксатриола, которые содержат редко встречающийся в природе способ присоединения углеводного фрагмента (к α-гидроксильной группе у шестого положения даммарана), вероятно, делает их устойчивыми к действию различных гликозилгидролаз. Следовательно, накопление гинзенозида Rg<sub>1</sub> может происходить без существенного ущерба для жизнедеятельности клеток женьшеня *in vitro*. Данные предположения подтверждаются результатами анализа содержания индивидуальных гинзенозидов в течение выращивания культуры клеток *P. ginseng* в колбах. При этом было показано, что более 60% от общего содержания гинзенозидов в сумме составляли Rg<sub>1</sub>+Re, и малонил-Rb<sub>1</sub>.

**TRITERPENE GLYCOSIDES CONTENT OF CELL-SUSPENSION CULTURES OF MEMBERS OF ARALIACEAE (PANAX SPP. AND POLYSCIAS SPP.)****Kochkin D.V., Nosov A.M.**

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1-12, 119234 Moscow, Russia, fax: +7 (495) 939-43-09; tel.: +7 (495) 939-21-18, e-mail: dmitry-kochkin@mail.ru

In this work the structural diversity and the features of the triterpene glycosides accumulation in cell cultures of members of Araliaceae (*Panax ginseng*, *Panax japonicus* var. *repens*, *Polyscias filicifolia*, and *Polyscias fruticosa*) were studied.

The systematic phytochemical investigation of the two *Polyscias* species suspension cell cultures has been carried out for the first time. The presence of triterpene glycosides with the oleanolic acid as an aglycon in *P.filicifolia* and *P.fruticosa* plant cell cultures was proved and the structure of four of them was identified on the basis of spectroscopic evidence ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR and HRESI MS/MS data). These compounds are ladiginoside A, polyscioside A, polyscioside E and glucopyranosyl-(1-2)-glucuronopyranosyl-3-oleanolic acid-28-glucopyranosyl ester. It was shown the difference of qualitative and quantitative triterpene glycosides composition in *P.filicifolia* and *P.fruticosa* suspension cell cultures. It was established that the *P.filicifolia* cell culture exposed higher level of triterpene glycosides accumulation.

The presence of large amounts of ginsenosides malonyl-Rb<sub>1</sub>, -Rc, -Rb<sub>2</sub>, and -Rd in a suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* cells was demonstrated for the first time. Identification of ginsenoside malonyl-Rb<sub>1</sub> was based on chromatographic, chemical, and spectroscopic evidence. Ginsenosides malonyl-Rc, -Rb<sub>2</sub>, and -Rd were identified on the basis of chromatographic and chemical data. Content and composition of the individual ginsenosides (Rg<sub>1</sub>, R<sub>0</sub>, malonyl-Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub>, and Rd) were monitored in the suspension culture over four years. The RP-HPLC-UV analysis showed that Rg<sub>1</sub>, R<sub>0</sub>, and malonyl-Rb<sub>1</sub> accounted for more than 75% of the total pool of ginsenosides. In accordance with this result, and data analysis reported in the literature, we propose that ginsenoside formation in the cells of *P. japonicus* var. *repens* *in vitro* is closely related to the cellular compartmentation of these substances. In particular, the accumulation of the 20(*S*)-protopanaxadiol ginsenosides (especially Rb<sub>1</sub>) is strongly dependent on their pattern of malonylation, which likely targets them for transport into the vacuole. As opposite to the 20(*S*)-protopanaxadiol-type ginsenosides, the esterification (particularly malonylation) is not typical of 20(*S*)-protopanaxatriol ginsenosides. Therefore, we suggest that the unique pattern of glycosylation of the 20(*S*)-protopanaxatriol-type ginsenosides (attachment of one of the sugar chains to the  $\alpha$ -hydroxyl group at the C-6 position of the dammarane-type aglycone) makes them resistant to non-specific glycosyl hydrolases. Accordingly, the accumulation of ginsenoside Rg<sub>1</sub> is possible without significant disturbance of the metabolic activity of *P. japonicus* var. *repens* cells *in vitro*. This finding is supported by the results of the ginsenoside profiling during growth of *Panax ginseng* cell culture in flasks. Here, the total amount of the ginsenosides varied over a wide range but the ratios of the major groups remained nearly constant: Rg<sub>1</sub>+Re and malonyl-Rb<sub>1</sub> accounted for more than 60% of the total ginsenoside pool.

These findings provide a new approach for understanding of the ginsenoside accumulation machinery, and may be helpful for the rational and efficient optimisation of their production in ginseng cell cultures and intact plants.

**ЭВОЛЮЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *IN VITRO*:  
ОСОБЕННОСТИ, МЕХАНИЗМЫ, ДВИЖУЩИЕ СИЛЫ И СЛЕДСТВИЯ**  
**Кунах В.А.**

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 03680, ул. Акад. Заболотного, 150, факс (+38044) 526-07-89, тел. (+38044) 526-07-98 e-mail: [kunakh@imbg.org.ua](mailto:kunakh@imbg.org.ua)

Многолетние исследования динамики генетической структуры клеточных популяций *in vitro*, роли и особенностей действия отбора в процессе их адаптации к условиям выращивания в культуре, изменчивости и особенностей эволюции генома в длительнопассируемой культуре (25-30 лет и более) позволил нам сделать следующие главные обобщения:

- культура клеток *in vitro* является динамично-гетерогенной биологической системой - клоновой популяцией, которая развивается (эволюционирует) в результате действия основных движущих факторов эволюции - изменчивости, наследственности, отбора и дрейфа генов (генотипов); взаимодействие этих процессов обуславливает биологические особенности каждой конкретной клеточной линии, выращиваемой в конкретных условиях;

- адаптация клеток к условиям длительного культивирования *in vitro* - процесс сложный и многоступенчатый, на разных стадиях формирования пассируемой культуры (дифференцировка клеток и их последующая пролиферация, первые пассажи *in vitro*, длительное субкультивирование) наблюдаются различные типы и уровни геномной изменчивости, действуют различные типы естественного отбора - дестабилизирующий, движущий (направленный) или, преимущественно, стабилизирующий;

- в процессе адаптации клеток к условиям роста *in vitro* выявляются три периода: первичной популяции изолированных клеток, становления штамма (клеточной линии), сформированного штамма. Разделение на периоды определяется типом, направлением и жесткостью "естественного" отбора, действующего в клеточной популяции. Сформированные (адаптированные к росту *in vitro*) клеточные линии и штаммы являются генетически гетерогенными, для них характерно наличие физиологического и генетического гомеостаза, что объясняется в основном действием стабилизирующего отбора;

- значительная часть реорганизаций генома культивируемых клеток является каналлизированной: изменчивость, которая наблюдается в культуре *in vitro*, часто аналогична естественной изменчивости растений родственных видов; изменения претерпевают преимущественно те последовательности ДНК, которые характеризуются природными межвидовыми различиями внутри рода, отдельные (перестроенные в культуре *in vitro*) последовательности напоминают последовательности, присущие геномам растений близких видов в природе; доминирование в генетически гетерогенных популяциях каналлизированных изменений может свидетельствовать об адаптивности именно таких изменений генома;

- любая соматическая клетка с живым (функционально активным) ядром при ее введении в культуру тканей вследствие процессов «соматической» изменчивости, происходящей в рамках закона гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова, может восстановить в своих потомках, в том числе среди растений-регенерантов, весь генетический полиморфизм (или, по крайней мере, значительную его часть) свойственный данному виду, а возможно, даже и роду растений. Это открывает возможность сохранения и восстановления природного полиморфизма в культуре клеток и тканей *in vitro*.

**EVOLUTION OF CELL POPULATIONS IN VITRO: PECULIARITIES,  
DRIVING FORCES, MECHANISMS AND CONSEQUENCES**

**Kunakh V.A.**

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, Kyiv, 03680, Acad.  
Zabolotnoho str., 150, Fax (+38044) 526-07-89, tel.(+38044) 526-07-98  
e-mail: [kunakh@imbg.org.ua](mailto:kunakh@imbg.org.ua)

Multiyear investigations into the dynamics of cell population *in vitro* genetic structure, role and peculiarities of selection effect in the course of adaptation to growing conditions in culture, variability, and genome evolution details in long-term passaged culture (25-30 years and over) let us make generalizations as follows:

- cell culture *in vitro* presents the dynamically-heterogeneous biological system, clone population, which is developing (evolving) as a result of major driving factors of evolution – variation, heredity, selection and drift of genes (genotypes); interaction between these processes determines the biological characteristics of each particular cell line grown in specific conditions;

- cell adaptation to conditions of long-term cultivation *in vitro* is complicated and multistage process, various stages of passaged culture (cell dedifferentiation and their further proliferation, early passages *in vitro*, durable subculturing) demonstrate different types and levels of genome variation, as well as effect of various types of natural selection: destabilizing, directional or, predominantly, stabilizing.

- in the course of cell adaptation to growing conditions *in vitro* three periods can be singled out: the period of isolated cells' primary population, that of strain (cell line) formation and the period of established strain. Subdivision into the periods is determined by the type, direction and intensity of the "natural" selection operating in cell population. The established (adapted to growth *in vitro*) cell lines and strains are genetically heterogeneous, they are characterized by physiological and genetic homeostasis which can be explained by the action of stabilizing selection.

- considerable proportion of genome reorganizations in cultured cells appears to be canalized: variation to occur in culture *in vitro* is frequently comparable to natural variation in plants of related species; changes affect preferentially those DNA sequences which are distinguished by natural interspecies differences within the genus, individual sequences (rearranged in culture *in vitro*) may resemble those inherent to plant genomes of related species in nature; dominance of canalized changes in genetically heterogeneous populations may suggest adaptivity of precisely such genome alterations.

- any somatic cell with living (functionally active) nucleus upon tissue culture initiation as a result of "somaclonal" variation events to occur within the frame of N.I.Vavilov's law of homologous series in hereditary variation can restore in its descendants including regenerated plants overall genetic polymorphism (or at least significant proportion of it) inherent to given species, and, presumably, even plant genus as well. This opens vistas for conservation and restoration of natural polymorphism in cell and tissue culture *in vitro*.



**ИНДУКТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ  
РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ РАСТЕНИЙ****Митрофанова И.В.<sup>1,2</sup>, Митрофанова О.В.<sup>2</sup>, Лесникова-Седошенко Н.П.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Учебно-научный центр биологии и экологии субтропических растений и ландшафтоведения Национального университета биоресурсов и природопользования Украины, Украина, АР Крым, Ялта, 98648, Никита, д. 52, тел./факс: 38 (0654) 336-446, e-mail: [nikita@nauu.kiev.ua](mailto:nikita@nauu.kiev.ua)

<sup>2</sup>Никитский ботанический сад – Национальный научный центр НААН Украины, Украина, АР Крым, Ялта, 98648, Никита, факс: 38 (0654) 335-386, тел. 336-859, e-mail: [in\\_vitro@ukr.net](mailto:in_vitro@ukr.net)

Известно, что различные экспланты (меристемы, вегетативные почки, зиготические и соматические зародыши, листья, побеги и корни) исследуемых многолетних садовых культур культивируются в условиях *in vitro* на ряде питательных сред, таких как Уайта, Нитча, Гамборга (B5), Мурашиге и Скуга (МС), WPM, DKW и др. Среда МС обычно используется в половинной концентрации макро- и микросолей и является базовой питательной средой для многих культурных и диких видов растений (Бутенко, 1962; 1999; Калинин и др., 1992; Митрофанова, 1997, 2011; Dunstan et al., 1995; Merkle, 1997, 2000). Для каждого этапа морфогенеза *in vitro* применяются соответствующие питательные среды. Это могут быть одна, две или три среды, которые содержат как ингибиторы, так и индукторы определенных процессов. Особое место в этих процессах занимают регуляторы роста, витамины и осмотики. Часто лимитирующее или избыточное содержание этих веществ в среде вызывает гибель культивируемых органов и тканей. Так, для культур, которые регенерируют из дифференцированной ткани, необходимо добавление в питательную среду экзогенных регуляторов роста. Пределы эффективных концентраций ауксинов составляют 1,1 – 22,6 мкМ для 2,4-Д и 0,5 – 1,7 мкМ для НУК. Форма поступления азота в растения и его оптимальная концентрация зависят также от концентрации таких ауксинов, как пиклорам и дикамба. В случае использования зиготических зародышей определяющими факторами могут быть питательные среды, низкие положительные температуры и продолжительность стратификации. Субкультивирование соматических зародышей со среды, содержащей ауксины, на среду без ауксинов способствует дифференциации их органов. Цитокинин БАП и БА применяют на этапах пролиферации соматических зародышей и регенерации эмбриоидов в полноценные растения. Вместе с тем для индукции прямого соматического эмбриогенеза и органогенеза из генеративных и вегетативных тканей растений широко используют тиадазурон (ТДЗ). У трудно размножаемых видов растений применение ТДЗ повышает частоту регенерации до 90 – 100%. Добавление в среду АБК обеспечивает нормальное развитие соматических зародышей *in vitro*, стимулируя накопление запасных веществ и ингибируя их раннее прорастание. Важнейшими факторами регулирования морфогенеза растений *in vitro* являются также освещение и температура. Оба эти фактора могут ингибировать и индуцировать процессы регенерации растений в условиях *in vitro*. Так низкая освещенность (500 – 1000 лк) ингибирует процесс образования фенолов у эксплантов введенных в условия *in vitro*. Температура 21±1 °С ингибирует процессы индукции регенерации у субтропических растений, при этом активизирует рост и развитие эксплантов, представителей умеренного климата.

Особую роль в сохранении *in vitro* растительных объектов играют ретарданты, осмотики и физические факторы культивирования (температура и освещенность). Эти факторы ингибируют ростовые процессы и при этом позволяют длительный период сохранять декоративные, субтропические и косточковые плодовые, эфиромасличные и лекарственные культуры. Продолжительность сохранения значительно различается у различных видов и сортов растений. Часть ретардантов кроме ингибирующего эффекта оказывают индуцирующее действие на образование и рост корней. Такой эффект был отмечен у большинства сортов клематиса, розы и сливы. Наряду с эффектом сохранения ценных растительных объектов комплексное воздействие осмотиков, ретардантов, низкой позитивной температуры и освещенности способствует последующей активной регенерации при перенесении в стандартные условия культивирования.

**INDUCTORS AND INHIBITORS OF BIOTECHNOLOGY PROCESS OF PLANT PROPAGATION AND CONSERVATION****Mitrofanova I.V.<sup>1,2</sup>, Mitrofanova O.V.<sup>2</sup>, Lesnikova-Sedoshenko N.P.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Educational Scientific Center of Biology and Ecology of Subtropical Plants and Landscape Management of National University of Life and Environmental Science of Ukraine, Ukraine, Crimea, Yalta, 98648, Nikita, 52, phone/fax: 38 (0654) 336-446, e-mail: [nikita@nauu.kiev.ua](mailto:nikita@nauu.kiev.ua)

<sup>2</sup>Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center NAAS of Ukraine, Ukraine, Crimea, Yalta, 98648, Nikita, fax: 38 (0654) 335-386, phone. 336-859, e-mail: [in\\_vitro@ukr.net](mailto:in_vitro@ukr.net)

It is known that different explants (meristem, vegetative buds, zygotic and somatic embryos, leaves, stems and roots) of investigated perennial horticultural plants cultivated *in vitro* on such culture medium, as White, Nitsch, Gamborg (B5), Murashige and Skoog (MS), WPM, DKW, etc. MS media typically used in half concentration of macro-and microelements and is a basic culture medium for many cultivated and wild plant species (Butenko, 1962, 1999; Kalinin et al, 1992; Mitrofanova, 1997, 2011; Dunstan et al., 1995; Merkle, 1997, 2000). For each stage of morphogenesis *in vitro* appropriate medium have been applied. This may be one, two or three medium supplemented both inhibitors and inducers of certain processes. Special places in these processes take growth regulators, vitamins and osmotics. Often the limited or excess amount of these substances in the medium causes the death of cultured organs and tissues. Thus, for plants regeneration from differentiated tissue the exogenous growth regulators must be added to the culture medium. The limits of effective concentrations of auxin are 1.1 - 22.6  $\mu\text{M}$  for 2,4-D and 0.5 - 1.7  $\mu\text{M}$  for NAA. The form of nitrogen in the plant and its optimum concentration also depends on the concentration of auxin such as dicamba and picloram. In the case of zygotic embryos using in experiments the determinants should be culture media, low positive temperatures and the duration of stratification. Subculture of somatic embryos from medium containing auxins to medium without auxins promotes differentiation of organs. BAP and BA applied at the stages of proliferation of somatic embryos and regeneration of the embryos into plants. However, for the induction of direct somatic embryogenesis and organogenesis from generative and vegetative tissues of plants, thidiazuron (TDZ) has been widely used. For difficult-propagated plant species application of TDZ increased the frequency of regeneration up to 90 - 100%. The addition of ABA provides the normal development of somatic embryos *in vitro*, stimulating the accumulation of reserve substances and inhibiting their early germination. The most important factors regulated of plant morphogenesis *in vitro* are also light intensity and temperature. Both of those factors inhibit and induce plant regeneration *in vitro*. Low light intensity (500 - 1000 lx) inhibits the phenols formation during the time of explants introduction *in vitro*. Temperature  $21 \pm 1^\circ \text{C}$  inhibits the induction of subtropical plants regeneration, while stepping up the growth and development of explants in temperate plants.

Special roles in plants conservation *in vitro* play retardants, osmotics and physical factors of cultivation (temperature and light intensity). Those factors inhibit the growth processes and thus allow us to maintain during a longer period ornamental, subtropical and stone fruits, essential oil and medical plants. Duration of *in vitro* conservation considerably depend on different plant species and cultivars. It was found that retardants simultaneously have the inhibitory effect on explants development and inducing effect on the formation and growth of roots. This effect was seen in most cultivars of clematis, roses and plums. Alongside with the effect of valuable plants conservation combined effect of osmotics, retardants, low positive temperature and light intensity promotes the subsequent active plants regeneration after transferring of explants to standard culture conditions.

**СОЗДАНИЕ КРИОБИОЛОГИЧЕСКИХ КОЛЛЕКЦИЙ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ: СТРАТЕГИЯ ИЛИ  
ТАКТИКА?**

**Попова Е.В.<sup>1</sup>, Kim H.H.<sup>2</sup>, Paek K.Y.<sup>3</sup>, Kim D.H.<sup>4</sup>, Носов А.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Отдел Биологии Клетки и Биотехнологии, Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева. Ботаническая ул., 35, Москва 127276, Россия. Тел.: (499) 977-80-22; Факс: (499) 977-80-18

<sup>2</sup> Department of Well-Being Resources, Sunchon National University, Sunchon, Korea. Тел. 82-61-750-3216; Факс: 82-61-750-3210

<sup>3</sup> Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju, Korea. Тел.: 82-(0)43-261-2531; Факс: 82-(0)43-271-0414

<sup>4</sup> Division of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, 44-3 Omokdong, Suwon 441-350, Korea. Тел.: 82-2-961-2522; Факс: 82-2-967-5101.

Криосохранение, т.е. замораживание и долговременное хранение живых тканей и клеток растений при температуре ниже  $-130^{\circ}\text{C}$ , остается одним из самых эффективных и надежных способов консервации генетического материала. Сверхнизкие температуры позволяют если не полностью остановить, то значительно замедлить процессы окисления, деградации и старения. В большинстве развитых стран создание криобанков является одним из важных пунктов государственных и частных программ по сохранению растительного биоразнообразия. Для многих декоративных, сельскохозяйственных культур криосохранение стало рутинной практикой. На первых план выходят задачи технологического, финансового, юридического характера, имеющие целью добиться максимального упрощения, удешевления и стандартизации методик создания криоколлекций. Однако остаются культуры, методики хранения которых еще предстоит разработать. Это прежде всего культуры тропического и субтропического регионов, такие как кокос; культуры с семенами III типа (по Pritchard), резко теряющими всхожесть при обезвоживании и низких температурах, а также многие недостаточно изученные виды природных растений. Серьезной проблемой остается невозможность полной стандартизации методик замораживания, которые в той или иной степени приходится «адаптировать» индивидуально для каждого генотипа. Попытка решить некоторые из этих задач в лаборатории криобанка Rural Development Administration (Суwon, Южная Корея) в 2003-2012 гг привела к созданию новой для криобиологии высших растений системы оценки степени воздействия различных факторов на жизнеспособность замораживаемых объектов. Разработанная система позволяет оценить влияние комплекса факторов, таких как скорость замораживания, состав криозащитной смеси или степень обезвоживания, на каждом этапе криосохранения, а также учитывает размер и структуру экспланта, его происхождение. Кроме стандартных криозащитных растворов PVS2 and PVS3 были предложены альтернативные смеси криопротекторов, позволившие добиться более высокой выживаемости после криосохранения для большинства исследованных культур. В докладе приводятся данные, полученные в ходе тестирования новой методики на различных объектах: культурах адвентивных и бородачатых корней, апикальных меристемах, эмбриональных и каллусных культурах клеток, ризомах. Предлагается предварительная схема экспресс-оценки влияния различных факторов на состояние замораживаемых эксплантов. Обсуждаются практические вопросы применения криосохранения в рамках программ по сохранению биоразнообразия и преимуществ комплексного, «стратегического», подхода к разработке методик по замораживанию растительных объектов с различными исходными характеристиками.

**RESENT ADVANCES IN CRYOPRESERVATION OF PLANT GENETIC RESOURCES: FROM TRIAL-AND-ERROR TACTICS TO SYSTEMATIC APPROACH**  
**Popova E.V.<sup>1</sup>, Kim H.H.<sup>2</sup>, Paek K.Y.<sup>3</sup>, Kim D.H.<sup>4</sup>, Nosov A.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Cell Biology and Biotechnology, Institute of Plant Genetic Resources.

Botanicheskaya ul., 35, Moscow 127276, Russia. Tel.: (499) 977-80-22; Fax: (499) 977-80-18

<sup>2</sup> Department of Well-Being Resources, Sunchon National University, Sunchon, Korea. Tel.: 82-61-750-3216; Fax: 82-61-750-3210

<sup>3</sup> Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju, Korea. Tel.: 82-(0)43-261-2531; Fax: 82-(0)43-271-0414

<sup>4</sup> Division of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, 44-3 Omokdong, Suwon 441-350, Korea. Tel.: 82-2-961-2522; Fax: 82-2-967-5101.

Cryopreservation has been acknowledged as one of the best options for the long-term storage of plant germplasm with minimum requirements for space and operating costs. Recent advances in cryopreservation methodology allowed routine implementation of cryostorage for numerous important crops like potato, apple, banana, cassava, etc. Cryopreservation is widely used in forestry as one of basic storage methods. However, several important shortcomings impede routine cryobanking of species originated from tropical and subtropical regions, as well as species which produce type III seeds (as defined by Pritchard), and wild endigenous plants. Cryopreservation protocols for vast majority of vegetatively propagated crops are complicated and need to be adjusted to every new genotype, which makes the process very laborious and time-consuming. At the National Agrobiodiversity Center (RDA, Korea) major steps were made towards developing and implementing a new «systematic» approach for cryopreserving plant materials. The results of thermal analysis, moisture content dynamics, HPLS, in vitro regrowth and histological observations were combined to define the most critical factors affecting regrowth of plant explants after cryopreservation. Based on the results of 10-years experimental work, we propose a new strategy for cryopreservation of plant genetic materials which fascinates development and optimization of cryopreservation protocols for every new genotype. In the systematic approach, plant explants undergo a series of predetermined treatments based on their initial characteristics, i.e. size, tolerance to desiccation and low temperature, and genetic origine. Vitrification solutions PVS2 and PVS3 have been substituted by less toxic and more effective alternative cryoprotector mixtures. We present recent results obtained upon cryopreservation of very diverse plant materials of important agricultural and forest species including embryogenic and non-embryogenic cell cultures, isolated root cultures of several medicinal plants, shoot apices, bulbils and rhizomes. For most species tested regrowth after cryopreservation via new systematic approach rated above 70%.

**ЭМБРИОГЕННЫЕ КУЛЬТУРЫ: ПРИНЦИПЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ДОЛГОЙ  
ЖИЗНИ**

**Румянцева Н.И.**

Федеральное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики  
Казанского научного центра Российской академии наук  
E-mail: nat\_rumyantseva@mail.ru

Потеря регенерационной активности с течением времени культивирования – феномен, с которым сталкиваются практически все исследователи, работающие с культурами растительных клеток. Принято, что этот феномен связан с усилением генетической и эпигенетической изменчивости в клетках при действии факторов *in vitro*, а также клеточной селекцией в пользу быстро пролиферирующих неморфогенных клонов, образованных сильно вакуолизированными, главным образом, полиплоидными и анеуплоидными клетками. Следовательно, стабильность морфогенных культур в значительной степени зависит от того, умеем ли мы (эмпирически или направленно) ограничивать рост неморфогенных клонов и, соответственно, насколько мы понимаем механизмы их возникновения и принципы их существования. Не менее важным является понимание того, что эмбриогенные культуры растений – наиболее эффективные в отношении регенерации растений и наиболее часто используемые в экспериментах по трансгенезу – представляют собой сложноорганизованные системы, которые только в первом приближении можно назвать каллусом.

На основе собственных и литературных данных анализируется цитолого-гистологическая организация основных типов эмбриогенных культур растений, их физиологические и биохимические особенности; обсуждаются некоторые механизмы, которые поддерживают морфологическую и генетическую стабильность эмбриогенных культур в течение длительного времени культивирования или, наоборот, приводят к «перерождению» и формированию неморфогенных каллусов. Значительное внимание уделено роли межклеточных взаимодействий, осуществляемых, в том числе и посредством экстраклеточных соединений разного происхождения.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-97136- р\_поволжье\_а)

**EMBRYOGENIC CULTURES: THE PRINCIPLES OF LONG LIFE  
MAINTENANCE**

**Rumyantseva N.I.**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of the Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.

E-mail: nat\_rumyantseva@mail.ru

The loss of the regenerative activity over long-term culture is the common phenomenon experienced by almost all researchers working with plant cell cultures. In general, this phenomenon is related to increased genetic and epigenetic variability in cultured cells under the action of factors in vitro and cell selection in favour of rapidly proliferating non-morphogenic clones, consisted of strongly vacuolated, mainly polyploid and aneuploid cells. Following this, the stability of the morphogenic cultures depends largely on whether we can limit empirically or directionally the growth of non-morphogenic clones and, whether we understand the mechanisms of their origin, their physiology and principles of maintenance. Moreover, it is equally important to keep in mind that embryogenic plant cultures being the most effective in the plant regeneration and the most commonly used in experiments on transformation are complexly organized systems that are only in the first approximation can be called a “callus”.

On the basis of our experimental results and data in the literature the cytohistological organization of main types of plant embryogenic cultures and their physiological and biochemical characteristics are analyzed; some mechanisms that preserving their morphological and genetic stability over long-term culture or, in contrast, leading to transformation and establishing non-morphogenic calli are discussed. The considerable attention is paid to the role of cell-to-cell interactions, especially realizing via the action of different extracellular substances of various origin.

The study was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research, project 13-04-97136.

**СЕКЦИЯ 1.**

**Молекулярно-биологические,**  
**генетические, биохимические,**  
**цитологические, физиологические**  
**особенности культур клеток**  
**растений**

**SECTION 1.**

**Physiological, biochemical, genetic,**  
**cytological and molecular biology**  
**features of plant cell cultures**

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СОМАКЛОНАЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ  
ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ IRAP-МАРКЕРОВ  
Амирова А.К., Касымхан К., Бишимбаева Н.К., Рахимбаев И.Р.**

Республиканское государственное предприятие «Институт биологии и биотехнологии растений» МОН РК, г. Алматы, ул. Тимирязева, 45, тел./факс: 8(727)3947562,  
e-mail: gen\_jan@mail.ru

Благодаря легкой вывлекмости и воспроизводимости результатов в последнее время для изучения полиморфизма ДНК исходных сортов и линий, полученных биотехнологическими методами, успешно используются новые технологии в виде IRAP и REMAP. Данные маркерные системы основаны на анализе полиморфизма наиболее вариабельных фрагментов ДНК, фланкированных фрагментом LTR ретротранспозона и его инвертированным повтором либо участками микросателитов.

Выделена ДНК соматклональных вариантов пшеницы и исходных сортов. Для генетической дифференциации соматклональных вариантов яровой мягкой пшеницы использовали следующие комбинации IRAP-маркеров: 1) PawS 5 + PawS 16; 2) PawS 6 + PawS 17; 3) NikitaC0699 + SabrinaC0945; 4) NikitaC0699 + Sukkula 9900.

При использовании IRAP маркеров с использованием комбинаций праймеров PawS 5 + PawS 16 и PawS 6 + PawS 17 наиболее полиморфной оказалась комбинация праймеров PawS 5 + PawS 16. Выявлено отличие соматклонов от исходного сорта Целинная 3С по 4 локусам, заключающееся в появлении высокомолекулярных ампликонов 1300, 1500, 1800 и 2000 п.о. Так, у исходного сорта Целинная 3С было идентифицировано 13 фрагментов амплификации длиной от 100 до 1400 п.о., у раннеспелой линии Целинная 3С - 16 фрагментов длиной от 100 до 2000 п.о. У неполегающей скороспелой линии Целинная 3С выявлено 14 фрагментов. У сорта Отан суммарный спектр продуктов амплификации состоит из 20 фрагментов размером от 100 до 2100 п.о. В то время как у соматклонов сорта Отан суммарный спектр ампликонов колеблется от 19 до 21 фрагментов в зависимости от наличия или отсутствия ампликонов размером 530 и 800 п.о.

При использовании комбинаций праймеров Nikita C0699 + Sabrina C0945 и Nikita C0699 + Sukkula 9900 наиболее полиморфной оказалась комбинация праймеров Nikita C0699 + Sabrina C0945. При использовании этой комбинации праймеров в спектрах продуктов амплификации сорта Целинная 3С обнаружены 14 фрагментов размером от 280 до 2800 п.о. У раннеспелой линии Целинная 3С выявлено 18 ампликонов, появились новые локусы, состоящие из 800, 1750 и 3200 п.о., исчез фрагмент размером 650, имеющийся у исходного сорта. Неполегающая скороспелая линия Целинная 3С отличалась от первого соматклона тем, что в ее спектре добавились фрагменты размером 550 и 650 п.о. и отсутствует один ампликон (800 п.о.). В спектре сорта Отан выявлено 15 фрагментов размером от 280 до 3200 п.о. Спектр амплификации крупнозерной соматклональной линии состоял из 12 фрагментов, отсутствовали ампликоны размером 550, 800 и 2500 п.о., имеющиеся у исходного сорта Отан. В продуктах амплификации остистой линии с. Отан обнаружено 13 фрагментов, отсутствовали три фрагмента размером 550, 800 и 2500 п.о., но присутствовал фрагмент в 400 п.о., отсутствующий у сорта Отан. В спектре выравненной линии отсутствовали два фрагмента размером 550 и 2500 п.о.

Таким образом, нами подобраны наиболее полиморфные комбинации праймеров: PawS 5 + PawS 16 и Nikita C0699 + Sabrina C0945. ПЦР анализ геномной ДНК соматклональных вариантов и их исходных форм с использованием молекулярно-генетических IRAP-маркеров позволил выявить различия соматклональных линий как по сравнению с исходным сортом, так и между собой.



**GENETIC DIFFERENTIATION OF SPRING WHEAT SOMACLONAL LINES  
BY THE USE OF IRAP- MARKERS****Amirova A.K., Kasymkhan K., Bishimbayeva N.K., Rakhimbayev I.R.**

Republican State Enterprise "Institute of Plant Biology and Biotechnology"  
Almaty, Timiryazeva street, 45, tel./fax: 8 (727) 3947562, e-mail: gen\_jan@mail.ru

New technologies as IRAP and REMAP-analysis are being successfully used recently for the study of DNA polymorphism of the original lines and new lines obtained by biotechnological methods because of easy detection and reproducibility of results. These marker systems based on the analysis of polymorphism of most variable DNA fragments which are flanked by LTR retrotransposons fragment and its inverted repeat or microsatellite regions.

The DNA of wheat somaclonal lines and initial varieties has been isolated. Following combination of IRAP-markers have been used for the genetic differentiation of somaclonal lines of spring wheat 1) PawS 5 + PawS 16, 2) PawS 6 + PawS 17, 3) Nikita C0699 + Sabrina C0945; 4) Nikita C0699 + Sukkula 9900.

Primer combination PawS 5 + PawS 16 appeared to be a most polymorphic for genetic differentiation of original cultivars and somaclonal lines among the IRAP-markers primer combinations PawS 5 + PawS 16 и PawS 6 + PawS 17. Somaclonal lines differ from the initial cultivar Celinnaya 3S by the arising of high weight bands 1300, 1500, 1800 and 2000 bp. Thus, 13 amplification fragments ranging in length from 100 to 1400 bp were identified in the original variety Celinnaya 3S. There are 16 fragments ranging in length from 100 to 2000 bp present in precocious lines of Celinnaya 3S, 14 fragments – in precocious lines of Celinnaya 3S resistant to layering. Total spectrum amplification products of the initial Otan cv. composed of 20 fragments ranging in size from 100 to 2100 bp. While in somaclonal lines of Otan cv. the total spectrum of amplicons range from 19 to 21 fragments depending on the presence or absence of 530 and 800 bp amplicons.

The primer combination Nikita C0699 + Sabrina C0945 was chosen as a most polymorphic among the two used primer combinations Nikita C0699 + Sabrina C0945 and Nikita C0699 + Sukkula 9900. There are 14 fragments of amplification products ranged from 280 to 2800 bp were found in spectrums of cv. Celinnaya 3S by use of this primers combination. As well as the 18 amplicons were revealed for the precocious somaclonal line of Celinnaya 3S consisting new bands with size 800 bp, 1750 bp and 3200 bp, while one fragment of 650 bp is absent. Resistant to layering precocious somaclonal line of Celinnaya 3S differ from the first precocious line by the arising of fragments of 550 bp and 650 bp as well as by loss of one 800 bp amplicon.

There are 15 fragments ranged from 280 to 3200 bp is present in the spectrum of PCR products of Otan cv. The spectrum of amplification fragments for large grain somaclonal line consists of 12 bands, where the amplicons of 550, 800, and 2500 bp characterised initial Otan cv., are absent. Amplification products of spinalis somaclonal line of Otan cv. consists of 13 fragments, where three fragments with size of 550, 800, and 2500 bp is absent and one fragment of 400 bp arise in comparison with spectrum of initial Otan cv. Two fragments of 550 and 2500 bp were not found in the spectrum of somaclonal line of Otan cv. characterized by equal stem height.

Thus, the most polymorphic primer combinations PawS 5 + PawS 16 and Nikita C0699 + Sabrina C0945 have been selected during investigation. PCR analysis of somaclonal lines genomic DNA and their initial cultivars revealed differences between somaclonal lines as themselves and as compared with the initial cultivars by the use of molecular-genetic IRAP-markers.

## ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ

Бишимбаева Н.К., Парменова А.К., Шилманова А.А., Муртазина А.С.,  
Рахимбаев И.Р.

Республиканское государственное предприятие «Институт биологии и биотехнологии растений» МОН РК, г. Алматы, ул. Тимирязева, 45, тел./факс: 8(727)3947562,  
e-mail: [gen\\_jan@mail.ru](mailto:gen_jan@mail.ru)

Исследована рост регулирующая и протекторная активность экстрацеллюлярных полисахаридов (ПС), выделенных из культуры клеток пшеницы, на примере десяти сельскохозяйственных культур (пшеница, ячмень, кукуруза, рапс, томат, огурцы, арбуз, дыня, соя, хлопчатник). Для изучения рост регулирующей активности семени с/х культур предварительно замачивали в растворах полисахаридов, разведенных в различных концентрациях (0,1, 0,01, 0,001 и 0,0001 мкг/мл). После чего семена извлекали из растворов ПС и проращивали в воде в течение 5 дней при температуре 26° С и 16-ти часовом фотопериоде. В ходе проращивания вели наблюдения за энергией прорастания семян, подсчитывали всхожесть семян, измеряли длину побегов и корней проростков. Для изучения протекторной активности внеклеточных полисахаридов для каждой культуры определяли сублетальные дозы стрессовых факторов - солевого и осмотического, создаваемых различными концентрациями NaCl и сахарозы, соответственно. Семена, предварительно замоченные в различных концентрациях ПС (0,1, 0,01, 0,001 и 0,0001 мкг/мл), проращивали в растворах с сублетальными концентрациями NaCl и сахарозы.

Показаны существенные различия в рострегулирующей и протекторной активностях ПС в зависимости от вида с/х культур. У всех культур очень низкие (наномолярные) концентрации ПС - 0,001 мкг/мл и 0,0001 мкг/мл, оказывали стимулирующий эффект на рост проростков. Наряду с этими концентрациями средние концентрации ПС - 0,01 мкг/мл, стимулировали рост проростков томата, ячменя, огурцов. У хлопчатника и рапса рост проростков стимулировала высокая концентрация ПС - 0,1 мкг/мл. В целом, под действием ПС рост стеблей усиливается в 2-4 раза, а корней – от 0,5 до 5,5 раз по сравнению с контролем (предварительное замачивание в H<sub>2</sub>O без ПС) в зависимости от культуры. Все испытанные концентрации ПС повышали всхожесть семян, в особенности, очень низкие (наномолярные) - 0,0001 мкг/мл. Так, у томата, арбуза и пшеницы всхожесть при этой концентрации повышалась от 50 до 100%, у рапса – от 20% до 75%.

В условиях солевого и осмотического стресса оказались активными все концентрации ПС, в особенности, средние – 0,01 мкг/мл, и очень низкие (наномолярные) – 0,001 и 0,0001 мкг/мл. При осмотическом стрессе рост стеблей под действием ПС возрастает в 2-3 раза, а корней - в 3-4 раза по сравнению с контролем (сахароза, предварительное замачивание в H<sub>2</sub>O без ПС). Также показана способность экстрацеллюлярных ПС повышать всхожесть семян в условиях солевого и осмотического стресса. При солевом стрессе протекторный эффект ПС наблюдается при средних – 0,01 мкг/мл и очень низких концентрациях (0,001 и 0,0001 мкг/мл). Всхожесть семян при этом повышается от 10-40% до 50-100%. При осмотическом стрессе протекторная активность ПС проявляется в очень низких (наномолярных) концентрациях - 0,001 и 0,0001 мкг/мл. Всхожесть семян при этом, повышается от 12-35% до 60-75% по сравнению с контролем (сахароза, предварительное замачивание в H<sub>2</sub>O без ПС), в зависимости от культуры.

Полученные результаты позволяют предложить препараты экстрацеллюлярных полисахаридов к использованию в биотехнологии и сельском хозяйстве в качестве биостимуляторов роста и устойчивости растений с наномолярной активностью.

**INVESTIGATION OF PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACELLULAR  
POLYSACCHARIDES FROM WHEAT CELL CULTURE****Bishimbayeva N.K., Parmenova A.K., Shilmanova A.A., Murtazina A.S.,  
Rakhimbayev I.R.**

Republican State Enterprise "Institute of Plant Biology and Biotechnology" MES RK, Almaty,  
Timiryazeva street, 45, tel./fax: 8 (727) 3947562, e-mail: [gen\\_jan@mail.ru](mailto:gen_jan@mail.ru)

Growth regulative and protective activity of extracellular polysaccharides (PS) isolated from wheat cell culture were investigated by the use of ten agricultural crops (wheat, barley, corn, rape, tomato, cucumber, watermelon, melon, soybean, cotton). For the investigation of growth-regulative activity seeds of agricultural crops were preliminary soaked into polysaccharide solutions in different concentrations (0,1, 0,01, 0,001 and 0,0001 mkg/ml). After that seeds were removed from polysaccharide solution and grewed up in water during 5 days at 26 C° and 16-hours photoperiod. During the growth process we studied the energy and percentage of seeds germination, measured the length of shoots and roots. To identify the protective activity of PS, we determined for each crop sublethal doses of stress factors – salt and osmotic, initiated by different concentrations of NaCl and saccharose, accordingly. Seeds, preliminary soaked in PS solutions, were grown in solutions with sublethal concentrations of NaCl and saccharose.

Considerable differences in growth-regulative and protective activity of PS on various types of crops have been shown in the result of investigation. Very low (nanomolar) concentrations of PS – 0,001 and 0,0001 mkg/ml, showed stimulating effect on the seedlings growth of all investigated crops. As well as medium concentrations of PS – 0,01 mkg/ml, stimulated the growth of seedlings in tomato, barley and cucumber. High concentration of PS – 0,1 mkg/ml, stimulated the growth of seedlings in cotton and rape. In general, under the PS influence, the growth of shoots increased by 2-4 times, the growth of roots – from 0,5 to 5,5 times in comparison to control (H<sub>2</sub>O without preliminary soaking in PS), depending on the crop. All tested concentrations of PS have shown to accelerate germination of seeds, particularly, very low (nanomolar) concentrations – 0,0001 mkg/ml. For example, percentage of germination for tomato, watermelon and wheat elevated from 50 to 100%, for rape – from 20 to 75%.

Under the salt and osmotic stress all PS concentrations have been found to be a physiologically active, in particular, in medium (0,01mkg/ml) and very low (nanomolar 0,001; 0,0001 mkg/ml) concentrations. During osmotic stress PS demonstrated protective activity as the growth of shoots increased 2-3 times, the growth of roots – 3-4 times, compared to control (saccharose without preliminary soaking in PS solutions). We have shown capability of extracellular PS to increase germination of seeds under the salt and osmotic stresses as well. Under the salt stress protective activity of PS was found in medium - 0,01 mkg/ml, and very low – 0,001 and 0,0001 mkg/ml concentrations. Seeds germination increased from 10-40% to 50-100%. Protective activity of PS during osmotic stress is being expressed in very low (nanomolar) concentrations – 0,001 and 0,0001 mkg/ml. Seeds germination, overall, increased from 12-35% to 60-75%, compared to control, depending upon the crop.

Obtained results allow to suggest the preparations of extracellular polysaccharides for implementation in biotechnology and agriculture as a biostimulators of plant growth and immunity with nanomola

**ЧАСТОТА ИНДУКЦИИ КАЛЛОСОГЕНЕЗА РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ  
КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM L.*) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА  
ПЕРВИЧНОГО ЭКСПЛАНТАТА**

**Бородай В.В., Бальвас К.М., Миголь М.О.**

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 03041,  
ул. Героев Оборона 13, тел. +380964253540, e-mail: veraboro@gmail.com

Болезни картофеля грибной и бактериальной этиологии приводят не только к большим потерям урожая при выращивании и хранении (25 – 85%), но и ускоряют вырождение сортов. Использование биотехнологических методов позволит эффективно решить эти проблемы. Усовершенствование методологических подходов по управлению морфогенезом клеток и тканей, а также получению высокой частоты регенерации растений *in vitro* линий и сортов картофеля является необходимым условием для успешного проведения клеточной селекции на устойчивость к возбудителям болезней. Регулируют процессы морфогенеза влиянием на следующие факторы: изменение состава питательной среды, концентрации фитогормонов, но особенно важно использовать сорта картофеля, обладающие высоким регенерационным потенциалом в культуре *in vitro*. Вследствие большого разнообразия видов и сортов картофеля, корреляции между морфогенетическими процессами и генотипическими особенностями, нашей задачей было изучение особенностей каллусогенеза различных генотипов картофеля украинской селекции.

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии растений Национального университета биоресурсов и природопользования Украины. Материалом для исследований послужили клубни картофеля селекции Института картофелеводства НААН Украины: ранних сортов - Серпанок и Повинь, среднеранних сортов – Обериг и Зелёный Гай, среднеспелых сортов - Калиновская и Былина, среднепоздних – Червона Рута и Джерело Полесья.

В качестве эксплантатов использовали стерильные листовые пластинки площадью 0,5-0,8 см<sup>2</sup>, части стеблей с пазушными почками и диски микроклубней площадью 0,7-1,0 см<sup>2</sup>. На эксплантатах искусственно делали насечки скальпелем для увеличения поверхности пролиферации. Для индукции каллусогенеза использовали среду МС с добавлением фитогормонов ауксинового типа действия (3-4 мг/л 2,4-Д - 2,4 - дихлорфеноксиуксусная кислота) и цитокининового типа действия (кинетин в концентрации 0,2-0,4 мг/л). Начало каллусогенеза на листовых сегментах наблюдалось на 4-5 сутки, при использовании частей стебля с почками - на 6-7 сутки, на дисках микроклубней - на 7-8 сутки культивирования. При этом происходили процессы пролиферации с набуханием, деформацией и дедифференциацией тканей, смена окраски с темно-зелёного на светло-зелёный. На частях стебля и дисках процессы каллусообразования начинались с периферии эксплантатов, тогда как для листовых сегментов - в зоне механического повреждения. При изучении влияния первичных эксплантатов на каллусогенез наиболее интенсивно процесс происходил при использовании листовых сегментов, наименее интенсивно - дисков микроклубней. Частота индукции каллусогенеза составила 94,3±1,76%, 87,8±1,92% и 67,3±1,54% соответственно. Процессы каллусогенеза на листовых сегментах происходили более быстро - 21-24 дня, тогда как на частях стебля -25-28 дней, а на дисках - 29-32 дня. Каллус, образовавшийся на сегментах листьев, имел средне плотную консистенцию, крупнозернистую структуру светло-коричневой окраски, на междоузлиях и дисках - более плотную. Интенсивность процесса зависела от исследуемого генотипа. Из всех исследуемых генотипов наиболее интенсивный рост каллусной ткани наблюдался у сорта Зелёный Гай (75,2% по сравнению с 25,4-65,4% у других сортов). У ранних сортов Повинь и Серпанок интенсивность каллусогенеза была в 1,5 - 1,8 раз ниже.

Изучение и оптимизация условий индукции морфогенеза из культивируемых клеток является необходимой составной частью работы по изучению современных перспективных сортов картофеля.

**FREQUENCY OF CALLUS FORMATION INDUCTION OF DIFFERENT  
POTATO GENOTYPES (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) DEPENDING ON THE TYPE OF  
PRIMARY EXPLANTS**

**Borodai V.V., Balvas K.M., Mihol M.O.**

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,  
Heroev Oborony st., 13, 03041, Kiev, Ukraine, +380964253540, e-mail: [veraboro@gmail.com](mailto:veraboro@gmail.com)

Potato diseases of fungal and bacterial etiology not only lead up to large losses in crop cultivation and storage (25 - 85%), but also increase the degeneration of sorts. The using of biotechnology techniques will effectively solve these problems. Improvement of methodological approaches for manipulating of cells and tissues morphogenesis is a necessary condition for the success of cell selection for resistance to pathogens, as well as obtaining high frequency plant regeneration in vitro lines and cultivars of potatoes. The morphogenesis regulates of impact of the following factors: changes in the composition of nutrient medium, the concentration of plant hormones, but especially important to use a potatoes cultivars, with a high regenerative potential in culture in vitro. Because of the great diversity of species and cultivars of potatoes, the correlation between morphogenetic processes and genotypic characteristics, our objective was to study the peculiarities of callus formation of the different genotypes of Ukrainian selection.

Investigations were carried out in the Laboratory of Plant Biotechnology, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine.

Material for investigation of tubers of Institute of potato growing NAAS of Ukraine: early ripening - Serpanok and Povin, middle-early - Oberig and Zeleniy Gay, mid-season - Kalinovskaya and Bylyna, middle-late - Chervona Ruta and Dzherelo Polesya.

Sterile leaf segments (0.5-0.8 cm<sup>2</sup>), the stems with axillaries buds and microtubers disks (0.7-1.0 cm<sup>2</sup>) were used as explants. The small incisions on the explants were made by scalpel for better proliferation. MS medium was used for induction callus formation with the addition of plant hormones of auxin type (3-4 mg/l of 2,4-D - 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid) and cytokinin type (kinetin at a concentration of 0.2-0.4 mg/l).

Beginning of callus formation on the leaf segments were observed at 4-5 days, using parts of the stem with buds - 6-7 day, on disks of microtubers - by 7-8 days of cultivation. In this case, the processes of cell proliferation with swelling, deformity and dedifferentiation of tissues, change color from dark green to light green took place. The callus formation started on the parts of the stem and disc from the periphery of the explants, whereas the leaf segments - in the area of mechanical damage. The callus formation was more intensive at using of leaf segments, the least of all – disks of microtubers. Frequency induction of callus formation was  $94,3 \pm 1,76\%$ ,  $87,8 \pm 1,92\%$  and  $67,3 \pm 1,54\%$  respectively. Processes of callus formation on the leaf segments occurred more quickly - 21-24 days, while in parts of the stem - 25-28 days, and on discs - 29-32 days. Callus formed on leaf segments had an average dense texture, a coarse-grained structure of a light-brown color, the interstices and disks - more dense.

Callus formation depended on the genotypes. Of all the studied genotypes most intensive growth callus tissue was observed in cv Green Guy (75.2% compared to 25,4-65,4% for other grades). The rate of callus formation at the early varieties Povin and Serpanok was 1.5 - 1.8 times lower.

Study and optimization of the conditions of induction of morphogenesis from cultured cells is a necessary part of modern research on the modern cultivars of potatoes.

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР КАК  
ПРОДУЦЕНТОВ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ****Гюнтер Е.А., Попейко О.В., Оводов Ю.С.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, 167982, ул. Первомайская, 50, факс: (8212) 241001, тел. (8212) 241001, e-mail: [gunter@physiol.komisc.ru](mailto:gunter@physiol.komisc.ru)

Сравнительная биохимическая характеристика культур клеток и нативных растений выявила, что каллусные культуры смолевки обыкновенной *Silene vulgaris* (M.) G., смолевки татарской *Silene tatarica* L., ряски малой *Lemna minor* L. и пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., подобно нативным растениям, синтезируют пектиновые вещества, представленные гомогалактуронами и рамногалактуронами I (RG-I). При этом содержание полисахаридов в культурах клеток может значительно превышать таковое в нативных растениях. Дедифференцированные клетки разных видов и классов растений могут продуцировать пектины как близкие, так и отличные от пектинов нативных растений. Пектины каллусных культур, подобно пектинам нативных растений, состоят из линейных и разветвленных областей. Содержание линейного 1,4- $\beta$ -D-галактурона варьирует в пектинах из различных клеточных культур. Разветвленная область макромолекулы представлена RG-I, который отличается разнообразием структуры для разных пектинов. Пектины из каллусных культур разных видов растений отличаются по молекулярной массе, степени метилэтерификации и строению боковых цепей. Показано, что пектины каллуса водного растения ряски малой отличаются более развитой разветвленной областью макромолекулы RG-I, чем пектины исследованных нами каллусных культур наземных растений.

Выявлены отличия в строении пектинов каллуса ряски малой и смолевки татарской от нативного растения. В частности, пектины, полученные из каллусов и из нативных растений, отличаются строением разветвленной области макромолекулы. Пектин из каллуса ряски, по сравнению с нативным растением, отличается большим содержанием остатков галактозы и арабинозы в боковых углеводных цепях RG-I и меньшим содержанием остатков апиозы. Пектин из каллуса смолевки татарской отличается более высокой молекулярной массой и большим содержанием остатков галактозы и арабинозы, а также более низким содержанием остатков галактуроновой кислоты по сравнению с пектином из нативного растения.

Кроме пектинов каллусные культуры синтезируют кислые арабиногалактаны (AG), которые отличаются строением боковых цепей: AG каллуса двух видов смолевки отличаются более высоким содержанием остатков галактозы, чем AG каллуса ряски и пижмы; AG каллусов смолевки обыкновенной и ряски малой характеризуются более высоким содержанием остатков арабинозы; содержание остатков галактуроновой кислоты выше в AG каллуса смолевки татарской. Внеклеточные AG обладают моносахаридным составом, близким внутриклеточным AG и отличаются по молекулярной массе.

Полученные данные указывают с одной стороны на общность процессов биосинтеза полисахаридов в культуре клеток и в нативном растении. В то же время, существуют особенности биосинтеза и постсинтетической модификации пектиновых веществ в культивируемых клетках растений, которые, по-видимому, связаны с переходом клеток к дедифференцированному состоянию, их генетическими особенностями и с условиями культивирования каллусных культур.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН (проект № 12-С-4-1006); программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**BIOCHEMICAL FEATURES OF THE CALLUS CULTURES AS PECTIN SUBSTANCES PRODUCER****Günter E. A., Popeyko O. V., Ovodov Yu. S.**

Institute of Physiology, Komi Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Pervomaiskaya 50, 167982 Syktyvkar, Russia, fax: (8212) 241001, tel.: (8212) 241001, e-mail: gunter@physiol.komisc.ru

Comparative biochemical characteristic of the cell cultures and native plants was studied. It was shown that callus cultures of campion *Silene vulgaris* (M.) G., *Silene tatarica* L., duckweed *Lemna minor* L. and tansy *Tanacetum vulgare* L. as well as native plants synthesize pectin substances as follows homogalacturonan and rhamnogalacturonan I (RG-I). The polysaccharide contents into the cell cultures may exceed those into native plants significantly. Undifferentiated cells of different plant species and plant classes produce pectines similar as well as different from the native plants pectines. Pectines of cell cultures and native plants consist of smooth and hairy regions. The contents of linear 1,4- $\alpha$ -D-galacturonan vary into pectines obtained from different cell cultures. The hairy regions of macromolecule represented by RG-I. RG-I has various structures in different pectines. The cell culture pectines from different plant species were distinguished in molecular weight, methylesterification degree and the side chain structure. The pectines from the duckweed water plant were shown to have more developed hairy regions of RG-I macromolecule than pectines from investigated callus cultures obtained from land plants.

Distinctions in pectin structure of *L. minor* and *S. tatarica* callus and native plants were discovered. In particular, pectines obtained from callus and native plants vary in structure of hairy regions of macromolecule. Duckweed pectin in comparison with native plant was shown to have more galactose and arabinose residues into the RG-I side chains and less apiose residues. Pectin from *S. tatarica* was found to have higher molecular weight, more galactose and arabinose residues and less galacturonic acid residues in comparison with pectin from native plant.

In addition to pectines callus cultures synthesize acidic arabinogalactanes (AG) which differ in structure of side chains. AGs from both *S. vulgaris* and *S. tatarica* calluses have higher contents of galactose residues than AGs from both *L. minor* and *T. vulgare* calluses. AGs from both *S. vulgaris* and *L. minor* have higher contents of arabinose residues. The content of galacturonic acid residues was higher in AG from *S. tatarica*. Extracellular AGs differ in molecular weight and have sugar composition similar to intracellular AGs.

These data indicate that processes of polysaccharide biosynthesis in cell culture and native plant are overall on the one hand. On the other hand there are features of biosynthesis and post synthetic modification of pectic substances in cultured plant cells. Apparently these features connected with turn cells into undifferentiated status, their genetic peculiarities and culture conditions of callus culture.

This work was supported by the Basic Research Program of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (project No. 12-C-4-1006) and by the Russian Academy of Sciences Presidium Program "Molecular and Cell Biology".

**ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВ НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ  
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ****Долгих Ю.И., Осипова Е.С., Соловьева А.И., Седов К.А., Лысенко Е.А.,  
Высоцкая О.Н.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, 127276, ул. Ботаническая, 35, факс: (499)977-80-18, тел: (499) 231-83-34, e-mail: [gsc@ippras.ru](mailto:gsc@ippras.ru)

Генетическая изменчивость, индуцированная условиями культивирования *in vitro*, известная как соматоклональная изменчивость, представляет интерес для селекции, но становится нежелательным явлением, если целью является клональное микроразмножение или генетическая трансформация растений. Поэтому важно знать частоту, распределение по геному, механизмы и факторы, влияющие на соматоклональную изменчивость. Мы изучили генетическую изменчивость маркеров ДНК, полученных в ходе полимеразной цепной реакции, в культивируемых тканях и растениях-регенерантах *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* and *Triticum aestivum*. Исходная линия кукурузы A188 и полученные из нее соматоклоны были проанализированы с использованием 38 RAPD и 10 ISSR праймеров. Ни с одним из использованных праймеров не было выявлено различий между индивидуальными растениями линии A188. Однако среди соматоклонов были обнаружены вариации в ПЦР-спектрах, в частности, 22 RAPD и 6 ISSR праймеров выявляли их отличия от исходной линии. На основе некоторых RAPD и ISSR ампликонов были созданы SCAR маркеры. Их наследование было прослежено в потомстве от самоопыления на протяжении 2-4 поколений, а также при гибридизации с линией A188 в F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>. Полиморфные маркеры были секвенированы. Биоинформационный поиск, проведенный с целью выяснения молекулярной природы обнаруженных у соматоклонов генетических изменений, показал, что все мутации произошли в некодирующих последовательностях. Среди выявленных изменений были инсерции или вырезание транспозонов, микроделеции, рекомбинации и изменения в пуле митохондриальной ДНК. В двух группах независимо полученных соматоклонов были обнаружены вариации одних и тех же фенотипических признаков и молекулярных маркеров, что подтверждает существование «горячих точек» в геноме. Уровень генетической изменчивости, определенный с помощью RAPD и ISSR в культуре клеток *A. thaliana* был в несколько раз ниже, чем у кукурузы. Соматоклональная изменчивость может быть вызвана стрессовыми воздействиями во время культивирования *in vitro*. Например, при криосохранении клетки испытывают стресс, вызванный дегидратацией и замораживанием. Для изучения влияния процедур, связанных с подготовкой образцов к криосохранению, проанализировали вариабельность ISSR и REMAP маркеров в каллусной ткани и растениях-регенерантах пшеницы. Предкультивирование с сахарозой и замораживание не повлияли на генетическую стабильность растительного материала. Но после этапа дегидратации в одной из проб в спектре REMAP фрагментов появился новый ампликон. Как показали результаты секвенирования полиморфного фрагмента, наиболее вероятной причиной его появления была индуцированная дегидратацией инсерция ретротранспозона рядом с микросателлитной последовательностью, комплементарной ISSR праймеру.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00950*



**THE EFFECT OF STRESSES ON GENETIC VARIABILITY OF CULTURED PLANT TISSUES****Dolgikh Yu.I., Osipova E.S., Solov'eva A.I., Sedov K.A., Lysenko E.A., Vysotskaya O.N.**

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, 127276, Botanicheskaya str, 35, fax: (499)977-80-18, tel: (499)231-83-34, e-mail: [gsc@ippras.ru](mailto:gsc@ippras.ru)

The genetic variability induced by *in vitro* conditions known as somaclonal variation is of practical interest due to its potential uses in plant breeding but if clonal micropropagation or transformation is main goal, it becomes an unwelcome phenomenon. Thus, it is important to know frequency, the genomic distribution, the mechanisms and factors influencing somaclonal variation. We studied variability of PCR-based DNA markers of cultured tissues and regenerated plants of *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* and *Triticum aestivum*. The original A188 line of maize and the somaclones obtained were tested using 38 RAPD and 10 ISSR primers. No A188 plants showed variation in the RAPD and ISSR spectra for any of the primers used. However, the PCR spectra obtained from the somaclones demonstrated some variations, i.e., 22 RAPD primers and 6 ISSR primers differentiated at least one somaclonal variant from the progenitor line. Six SCAR markers were developed based on several RAPD and ISSR fragments. The inheritance of these SCAR markers was verified in the selfing progeny of each somaclone in the R<sub>1</sub>–R<sub>4</sub> generations and in the hybrids, with A188 as the parental line in the F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations. These markers were sequenced and performed bioinformatic searches to understand the molecular events that may underlie the variability observed in the somaclones. All changes were found in noncoding sequences and were induced by different molecular events, such as the insertion or excision of transposons, microdeletion, recombination, and a change in the pool of mitochondrial DNA. In two groups of independently produced somaclones, the same features (morphological, molecular) were variable, which confirms the theory of 'hot spots' occurring in the genome. The level of genetic variability as measured using RAPD and ISSR in cell culture *A. thaliana* was several times lower than in maize. Stress during tissue culture can induce somaclonal variation. For example, during cryopreservation cells are under stress caused by dehydration and freezing. To study the effect of the procedures relating to the preparation of samples for cryopreservation, we analyzed the variability of ISSR and REMAP markers in calli and regenerated plants of wheat. Precultivation with sucrose and freezing did not affect the genetic stability of the plant material. But after the stage of dehydration in one of the samples in the range of REMAP fragments, a new amplicon was detected. As the results of the sequencing of the polymorphic fragments, the most likely cause of his appearance was induced by dehydration insertion of retrotransposon near the microsatellite sequence complementary to the ISSR primer.

*This work was supported by RFBR grant № 13-04-00950*

## ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ИЗУЧЕНИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ РАСТЕНИЙ

Загоскина Н.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276, ул. Ботаническая, 35  
факс: (499) 977-80-18, тел. (499) 977-94-33, e-mail: phenolic@ippras.ru

Фенольные соединения относятся к числу одних из наиболее распространенных в высших растениях представителей вторичного метаболизма, которые в последние годы привлекают большое внимание, как исследователей, так и практиков. В значительной степени это обусловлено их высокой антиоксидантной активностью и возможностью использования в фармакологии и медицине.

Известно, что в условиях *in vitro* клетки сохраняют способность к образованию соединений фенольной природы, характерных для интактных растений. Несмотря на уже давнюю «историю» этого вопроса, до сих пор получение клеточных и суспензионных культур из различных фармакологически-ценных видов и изучение накопления в них полифенолов, в том числе и с оценкой их состава, остается важным направлением исследований по биологии и биотехнологии.

Каллусные и суспензионные культуры успешно используются для выяснения механизмов адаптации к действию различных стрессовых факторов (УФ-Б радиации, тяжелых металлов, температур и др.). И в этом случае уделяется внимание не только изучению фенольных соединений, но и всей антиоксидантной системы клеток.

Важным аспектом является исследование прооксидантной и антиоксидантной активности полифенолов. В этом случае часто используют экзогенное воздействие различных их представителей на культуры *in vitro*.

Все это свидетельствует о важной роли фенольных соединений в жизнедеятельности растительных клеток, необходимости изучения их образования в условиях *in vitro*, а также поиска подходов для повышения продуктивности клеточных культур, как биофабрик для получения фармакологически ценных биопродуктов.

---

**MAIN DIRECTIONS IN STUDYING OF PHENOLIC COMPOUNDS IN PLANT CELL CULTURES****Zagoskina N.V.**

Timiriazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul., 35. Moscow. 127276 Russia; fax: (499) 977-80-18, tel. (499) 977-94-33, e-mail: phenolic@ippras.ru

Phenolic compounds are among some of the most common in higher plants, representatives of secondary metabolism, which in recent years attracted great attention of both researchers and practitioners. This is largely due to their high antioxidant activity and the ability to use in pharmacology and medicine.

It is known that the *in vitro* cells retain the ability to form of phenolic compounds typical for intact plants. Despite the already long "history" of this question is still obtaining callus and cell cultures from various pharmacologically-value species and investigation of phenolic compounds remains an important area of research in biology and biotechnology.

Callus and suspension cultures used to elucidate the mechanisms of adaptation to a variety of stress factors (UV-B radiation, heavy metals, temperature, etc.). In this case, attention is paid not only to phenolic formation, but also antioxidant systems.

An important direction is the study of prooxidant and antioxidant activity of polyphenols. In this case, frequently used influence of phenolic compounds on cultured *in vitro*.

All of this suggested an essential role of phenolics in the life of the plant cells, the need to study their formation, as well as the search for approaches to increase the productivity of cell cultures as biofactories for pharmacologically valuable compounds.

**РОЛЬ ГЕНОВ И УСЛОВИЙ СРЕДЫ В РЕГУЛЯЦИИ АНДРОГЕНЕЗА В  
КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА IN VITRO****Костина Е.Е., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, 410012, Театральная пл. 1, факс: (8452)26-27-83, тел.: (8452)23-46-97, e-mail: [kostinaee@yandex.ru](mailto:kostinaee@yandex.ru)

Для обеспечения сельского хозяйства высокоурожайными и высокомасличными сортами и гибридами недостаточно традиционных методов селекции, так как они связаны с затратами времени и ресурсов. Ускорение и оптимизация селекционного процесса возможны на основе использования биотехнологических приёмов, в том числе методов получения гаплоидов в культуре пыльников и микроспор *in vitro*. Это позволяет сократить продолжительность этапов селекционного процесса, увеличить спектр генетического разнообразия и повысить эффективность отбора.

Процесс гаплоиндукции зависит от ряда взаимосвязанных факторов, среди которых решающая роль принадлежит генотипу донорных растений. Необходим поиск универсальной методики для получения гаплоидов подсолнечника из любых генетических систем.

Целью наших исследований было оптимизировать методику получения гаплоидов подсолнечника на основе изучения влияния различных генов и углеводов в составе индукционной питательной среды.

Объектами исследований являлись самофертильная линия ЮВ-28Б и набор из экспериментальных высокобеккроссных линий подсолнечника, созданных в генофоне этой линии и несущих 10 различных генов короткостебельности и 5 генов окраски язычковых цветков.

Донорные растения исследуемых генотипов выращивали в полевых условиях. Из крайних внешних рядов корзинки диаметром 4-5 см вычленили неокрашенные цветки размером 3-5 мм. Пыльники помещали на питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга с увеличенным содержанием нитрата калия  $\text{KNO}_3$  3,1 г/л и добавлением  $\beta$ -индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) 1 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4 Д) 2 мг/л, 6 бензиламинопурина (БАП) 0,5 мг/л, гидролизата казеина 400 мг/л. Использовали различные варианты сред с содержанием сахарозы 30 и 60 г/л или мальтозы 30 г/л.

В каждую пробирку помещали по 15 пыльников. Анализ полученных на пыльниках новообразований проводили на 30 сутки. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа. Эффекты генов рассчитывали путем сопоставления величины признака у линии с геном и исходной линии ЮВ 28Б.

Цитологический анализ пыльников и новообразований на различных этапах культивирования позволил проследить процесс формирования эмбрионидов из микроспор и соматических тканей пыльника. Установлено, что степень и характер формирования структур зависит как от состава питательной среды, так и от генотипа растения-донора. Увеличение концентрации сахарозы не оказывает достоверного положительного влияния на каллусогенез и формирование эмбрионидов подсолнечника. Замена сахарозы в индукционной питательной среде на мальтозу приводит к снижению эффективности калусогенеза и эмбриогенеза. Скрининг экспериментальных линий подсолнечника выявил, что ряд генов короткостебельности и генов, контролирующих окраску язычковых лепестков, могут существенно повышать выход каллусов, морфогенных структур и регенерантов в культуре пыльников подсолнечника *in vitro*.

**ROLE OF GENES AND MEDIUM CONDITIONS IN ANDROGENESIS  
REGULATION IN SUNFLOWER ANTHHER CULTURE *IN VITRO*****Kostina E.E., Tkachenko O.V., Lobachev Yu.V.**

Vavilov Saratov State Agrarian University, 1 Teatralnaya Ploshchad, Saratov 410012, Saratov,  
Fax: +7(8452)26-27-83, tel.: +7(8452)23-46-97; e-mail: kostinaee@yandex.ru

Traditional breeding methods are not enough for providing agriculture with high-yielding and high-oleic varieties and hybrids as they relate to time and resources expenses. Acceleration and optimization of breeding process are possible using biotechnological techniques, including haploids producing methods in anther culture and microspores *in vitro*. It allows reducing of stages length of breeding process, enhancing of genetic diversity range and increasing of selection efficiency.

Haploinduction process depends on number of interconnected factors, among which the leading role belongs to donor plants genotype. Search of universal technique is necessary for sunflower haploids producing from any genetic systems.

The aim of our researches was to optimize the technique of sunflower haploids producing based on studying of various genes and carbohydrates influence as a part of induction basal medium.

Objects in study were self-fertile line YuV-28B and range of experimental advanced backcross lines of sunflower created in this line genetic background and bearing 10 various genes of short-stemness and 5 genes of ray flowers coloring.

Donor plants of genotypes in study were grown up in field conditions. Uncoloured flowers of 3-5 mm in size were selected from outer external rows of capitula of 4-5 cm in diameter. Anthers were placed in Murashige-Skoog basal medium supplemented with 3,1 g/l potassium nitrate  $KNO_3$  and 1 mg/l  $\beta$ -indole-3-acetic acid (IAA), 2 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D), 0,5 mg/l 6-Benzylaminopurine (BAP), 400 mg/l casein hydrolysate. There were used various mediums containing 30 and 60 g/l sucrose or 30 g/l maltose.

15 anthers were placed in each test tube. Analysis of the tumors in the anthers was performed on the 30th day. Data were processed by analysis of variance method. Genes' effects were calculated by comparing the character value in gene line and baseline YuV- 28B.

Cytological analysis of anthers and tumors at different stages of cultivation makes it possible to trace the formation of embryoids out of microspores and anther somatic tissues. It was defined that the degree and nature of structure formation depends both on basal medium structure and donor plant genotype. The increase in sucrose concentration does not have significant positive impact on of callogenesis and formation sunflower embryoids. Replacement of sucrose in the induction basal medium to maltose reduces the efficiency of callogenesis and embryogenesis. Screening of experimental sunflower lines revealed the fact that a number of short-stemness genes and genes controlling the color of ray flowers, can significantly increase calli production, morphogenic structures and regenerants in sunflower anther culture *in vitro*.

**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ  
ЭМБРИОГЕННЫХ КАЛЛУСОВ ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ****Костюкова Ю.А., Румянцева Н.И.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, 420111, ул. Лобачевского, 2/31,  
факс: (843) 292 -73-47, тел. (843) 231-90-42, e-mail: j.kostyukova@mail.ru

Каллусные культуры представляют собой удобный объект для изучения процессов морфогенеза. Важным фактором в получении морфогенных каллусных культур является выбор экспланта. Эмбриогенные каллусные культуры гречихи татарской относятся к нодулярному типу каллусов и образованы проэмбриональными клеточными комплексами (ПЭКК) и мягким каллусом. Наибольший выход нодулярных каллусов наблюдали при использовании в качестве эксплантов зародышей длиной 2-2.5 мм (65.5%) , в то время как для семян и незрелых зародышей длиной 1-1,5мм этот показатель не превышал 33-35%, а для зародышей 3.0-3.5 мм - 52.2%. Можно предположить, что формирование нодулярных каллусов гречихи определяется степенью дифференцированности клеток экспланта, которая выражается в различной компетентности клеток разных тканей семядолей незрелых зародышей к гормональным условиям среды культивирования. Предположительно, развитие компетентности в отдельных клетках определенной ткани семядолей достигает максимума у зародышей определенного размера. С целью выяснения причин различной способности незрелых зародышей гречихи к формированию нодулярных каллусов были проведены гистологические, гистохимические и электронномикроскопические исследования тканей семядолей незрелых зародышей различной длины. Показано, что с увеличением размера зародыша изменяется цвет экспланта от прозрачного (1мм), к белому (1мм, 2мм), желтеющему (2мм, 3мм). Возрастает дифференциация клеток семядолей на столбчатый и губчатый мезофилл, в клетках увеличивается количество пластид с крахмалом и фенольных включений в вакуолях клеток. Окрашивание клеток семядолей Суданом II показало, что увеличение размера зародыша коррелирует с увеличением количества сферосом в клетке. Увеличение синтеза липидов, фенолов и крахмала подтверждают и электронномикроскопические исследования. Наибольшее содержание липидов и фенольных соединений было отмечено в эпидермальных клетках абаксиальной поверхности семядолей. Наименьшие изменения в ультраструктуре клеток с увеличением размера зародыша были отмечены в эпидермальных и субэпидермальных клетках адаксиальной поверхности семядолей незрелых зародышей.

Проведенные гистологические исследования показали, что формирование ПЭКК происходит из эпидермальных и субэпидермальных клеток адаксиальной поверхности семядолей (зародыши 1 мм, 2 мм, 3 мм) и прокамбиальных тканей (зародыши 2 мм). Тогда как формирование ПЭКК из клеток абаксиальной поверхности – редкое явление и наблюдается у зародышей длиной 1.5 - 2мм. Такая разница, вероятно, связана с тем, что клетки абаксиального эпидермиса рано дифференцируются, что подтверждают наши цитологические исследования, и становятся не компетентными к экзогенным гормонам. Полученные результаты позволяют заключить, что наиболее оптимальными для получения нодулярного каллуса являются зародыши 1,5 - 2мм, так как в этих эксплантах компетентностью к гормонам среды культивирования обладают клетки адаксиального эпидермиса, клетки прокамбиальных тканей, а также в редких случаях – клетки абаксиального эпидермиса. Необходимо отметить, что степень дифференцированности клеток экспланта также коррелировала с возрастом в клетках веществ вторичного метаболизма, присутствие которых, вероятно, необходимо для дальнейшего роста ПЭКК.

**THE CYTOLOGICAL PECULIARITIES OF THE FORMATION OF  
EMBRYOGENIC CALLUS OF TATARY BUCKWHEAT****Kostyukova Yu.A., Rumyantseva N. I.**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Scientific Center of RAS  
Kazan, 420111, Lobachevsky st., 2/31,  
факс: (843) 292 -73-47, (843) 231-90-42 e-mail: j.kostyukova@mail.ru

The callus cultures are convenient objects for the study of morphogenesis. The selection of explants is an important factor in the establishment of morphogenic callus cultures. The embryogenic cell cultures of tatar buckwheat belong to the nodular type of calli. They consist of proembryonal cell complexes (PECCs) and soft callus. The highest yield of nodular callus formation was obtained from embryo of 2.0-2.5 mm long (65.5%), while the yield of nodular cultures from ovule and immature embryos of 1.0 - 1.5 mm long was not above 33-35% and for embryos of 3.0-3.5 mm long – 52.2%. It may be suggested that the induction of nodular callus of buckwheat depends on the degree of cell differentiation of explants which in turn is expressed in various competence of different cotyledon tissues to the hormonal conditions of culture medium. Probably, the development of competence in some cells of certain cotyledon tissue reaches the high degree in embryo of fixed length. The histological, histochemical and electron microscopic studies of cotyledon tissue of immature buckwheat embryos having different length were used to determine the causes of different ability of immature embryos to form the nodular cell culture.

It was shown that the color of immature embryos from transparent (at 1mm), through white (at 1mm and 2mm) to yellowish (at 2mm and 3mm) changed with increasing embryo in size. During embryo growth the differentiation of cotyledon cells to the columnar and sponge mesophyll increased. The bigger was an embryo, the bigger content of storage substances it had. As a whole, the number of plastids with starch grains, vacuoles with phenolic inclusions and spherosomes in cells of cotyledons of embryo are increased with embryo length. The most content of lipids and phenolic inclusions was shown to accumulate in the epidermal cells of abaxial surface of cotyledons. The smallest increase in number of lipids and phenolic inclusions was observed in epidermal and subepidermal cells of adaxial surface of cotyledon of immature buckwheat embryos.

The histological study showed that the formation of PECCs arised from epidermal and subepidermal cells of adaxial surface of cotyledon (immature embryos of 1mm, 2 mm, and 3 mm long) and procambial bands (immature embryos of 2mm long). The formation of PECCs from cells of abaxial epidermis was very rare event and was observed in immature embryos of 1.5-2 mm long. This difference, probably, is connected with early differentiation of cells of abaxial epidermis as confirmed by our cytological studies, which became non-competent to the exogenic hormones.

Our results led us to conclusion that immature embryos of 1.5-2mm long were the best explants to induce the nodular callus in buckwheat, because at this stage of embryo development different cells of cotyledons (adaxial epidermis, procambial bands and, even, the cells of abaxial epidermis) had a lowest degree of differentiation, and were competent to the hormones of culture medium.

It is necessary to note that the level of differentiation of explant cells and the increase in content of reserved substances were correlated. The presence of these substances seems to be necessary for further PECC growth.

**АЛЬБИНИЗМ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO* ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ: СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМА**  
**Мозгова Г.В., Зайцева О.И., Лемеш В.А.**

Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, 220072, ул. Академическая, 27  
факс: +(375)(17) 284 -19-17, тел. +(375)(17) 294-91-82, e-mail: g.mozgova@igc.bas-net.by

Получение гаплоидных растений и удвоенных гаплоидов с применением метода культуры пыльников позволяет значительно сократить сроки создания гомозиготного материала и новых сортов растений. Явление эмбриогенеза и впоследствии регенерации растений из микроспор пыльника, помещенных на питательные среды, также успешно используется для отбора клеточных линий, устойчивых к различным химическим соединениям, выделения жизнеспособных протопластов, экспериментов по генетической инженерии. Процесс культивирования генеративных тканей злаковых культур имеет ряд особенностей, отличающих его от культивирования соматических тканей. К ним относится низкая частота индукции эмбриогенеза, каллусогенеза и формирования зеленых растений у отдельных генотипов, а также регенерация альбиносных растений. Тот факт, что развитие эмбриоида или каллуса в культуре пыльников *Triticum aestivum* L. и × *Triticosecale* Wittm. может идти из вегетативной клетки, позволяет предполагать, что основные нарушения, приводящие к формированию альбиносного фенотипа, должны происходить в геноме хлоропластов. В связи с этим целью нашего исследования являлось изучение структурных перестроек ДНК, затрагивающих хлоропластные гены, связанные с процессами фотосинтеза, и поиск участков хлоропластного генома, в которых изменения данных генов происходят с высокой частотой.

Объектом исследования служили 84 альбиносных растения, регенерировавшие в культуре пыльников 27 генотипов ярового тритикале и мягкой яровой пшеницы. Использование для исследований особенностей морфогенеза *in vitro* искусственно созданного гибрида пшеницы и ржи – тритикале и сравнение полученных данных с результатами исследований по пшенице, может дать принципиально новые знания о закономерностях и механизмах формирования альбиносного растения.

У альбиносных растений, полученных методом культуры пыльников, проведено исследование частоты возникновения структурных изменений пластидного генома, затрагивающих гены, связанные с фотосинтезом (*rbcL*, *psaA*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *petA*, *atpB*, *atpE*, *trnE*). Выявлено, что гены *psbA*, *psbC*, *psbD* фотосистемы 2 амплифицируются практически у всех исследованных растений пшеницы и тритикале. Это подтверждает полученную ранее информацию о сохранении области включающей данные гены в пределах большого однокопийного региона хлоропластной ДНК. У хлорофилл-дефектных растений пшеницы и тритикале ген *atpB*, кодирующий β-субъединицу CF<sub>1</sub>-комплекса АТФ-азы, не выявляется с высокой частотой. Ранее было установлено, что структурные изменения плазмона имеют, в основном, характер делеций различной протяженности и локализации в зависимости от пути возникновения растения-регенеранта *in vitro*. Это позволяет нам утверждать то, что происходит делеция гена *atpB* либо участка хлоропластной ДНК, включающего данный ген. Следует отметить, что ген *atpB* расположен в области хлоропластного генома, в которой с наибольшей частотой происходят делеции и инсерции у пшениц и эгилопсов, полученных в естественных условиях. Делеция гена *atpB* может являться одной из главных причин андрогенетического альбинизма, поскольку затрагивает ключевой процесс, связанный с фотосинтезом, и может привести к нарушению экспрессии других генов фотосинтеза и синтеза хлорофилла в ядерном или хлоропластном геноме.



**ALBINISM IN WHEAT AND TRITICALE ANTHHER CULTURE *IN VITRO*:  
CHLOROPLAST GENOME STRUCTURAL REARRANGEMENTS****Mozgova G.V., Zaitseva O.I., Lemesh V.A.**

State Scientific Institution «Institute of Genetics and Cytology at the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, 220072, Akademicheskaya street 27  
fax:+(375)(17)284-19-17, tel. +(375)(17) 294-91-82, e-mail: g.mozgova@igc.bas-net.by

Production of haploid plants and double haploids using the anther culture method allows considerable shortening of the time for developing homozygous material and new plant cultivars. Embryogenesis and subsequent plant regeneration from anther microspores placed an nutrient media are successfully used for selection of cell lines resistant to different chemical compounds, isolation of viable protoplasts and for genetic engineering experiments. The process of grain crops generative tissues culturing has a number of features distinguishing it from culturing somatic tissues. A low frequency of embryogenesis and callusing induction, formation of green plants in some genotypes as well as regeneration of albino plants are among them. The fact that development of embryoid or callus in anther culture of *Triticum aestivum* L. and × *Triticosecale* Wittm. can take place from vegetative cell allows supposition that basic disturbances resulting in formation of albino phenotype should take place in a chloroplast genome. In this connection the goal of our research was to study structural DNA rearrangements affecting chloroplast genes related to the photosynthesis processes and to search for chloroplast genome sites where changes in the given genes occur with a high frequency.

84 albino plants, regenerated in the anther culture of 27 genotypes of spring triticale and spring common wheat, were taken as a research object. Study on morphogenesis features *in vitro* of artificially developed wheat and rye hybrid (triticale) and comparison between the obtained data and the results of wheat study can give in essence new knowledge of regularities and mechanisms of albino plant formation in these important agricultural crops.

The analysis of the frequencies of plastid genome structural rearrangements affecting the genes involved in the photosynthesis (*rbcl*, *psaA*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *petA*, *atpB*, *atpE*, *trnE*) was conducted. It was revealed that genes *psbA*, *psbC*, *psbD* of the photosystem 2 are amplified practically in all the studied plants of wheat and triticale. The results verifies the earlier obtained information about conservation of the region including the given genes within the limits of a large single-copy region of chloroplast DNA. *AtpB* gene, encoding  $\beta$ -subunit of CF<sub>1</sub>-complex of ATP synthase, was not detected with a high frequency in chlorophyll-deficient plants of wheat and triticale. Earlier studies have shown that structural changes in plasmon have primarily a deletion pattern of a different extent and localization depending on the way of regenerant plant development *in vitro*. It allows to claim, that deletion of the gene *atpB* or the chloroplast DNA site containing the given gene proceeds. It should be noted that the gene *atpB* is located in the chloroplast genome region where deletions and insertions take place with the higher frequency in wheat and aegilops produced under natural conditions. Deletion of the gene *atpB* can be one of the major causes of androgenetic albinism since it affects the key process associated with photosynthesis that can result in expression disturbance of other genes of photosynthesis and chlorophyll synthesis in nuclear and chloroplast genomes.

**МЕХАНИЧЕСКАЯ ДИСАГРЕГАЦИЯ ЭМБРИОГЕННЫХ КУЛЬТУР  
КЛЕТОК МОРКОВИ И СЛАДКОГО АПЕЛЬСИНА КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ  
МЕЛКОАГРЕГИРОВАННЫХ ФРАКЦИЙ, СОХРАНЯЮЩИХ СПОСОБНОСТЬ К  
СОМАТИЧЕСКОМУ ЭМБРИОГЕНЕЗУ**

**Моисеева Н.А., Серебрякова В.Н.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276, ул. Ботаническая, 35,  
факс: (495)9778018, тел. (499)2318329, e-mail: [morphogenesis@mail.ru](mailto:morphogenesis@mail.ru)

Культура клеток моркови длительный период времени была единственной, которая считалась удобной модельной системой для изучения организации соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* на организменном, клеточном и молекулярных уровнях. Именно на этой культуре впервые было продемонстрировано, что использование в качестве источника соматических зародышей мелкоагрегированной фракции, выделенной из эмбрионной суспензии путем ее фракционирования через сетчатые фильтры, имеет ряд преимуществ. Прежде всего это возможность проведения как качественной оценки, т.е. регистрации структурных изменений, происходящих в связи с соматическим эмбриогенезом в исходно достаточно гомогенной популяции, так и количественной оценки эмбрионного потенциала, т.е. определение числа культивируемых единиц, способных в заданных условиях эксперимента к регенерации соматических зародышей.

Эмбрионные культуры клеток разных видов растений обычно различаются по своей морфоанатомической структуре. По всей вероятности эти различия связаны с тем, что в культуре *in vitro* мультипликация соматических зародышей может осуществляться на разных стадиях их развития. В эмбрионной культуре клеток моркови этот процесс происходит при достижении соматическим зародышем предглобулярной стадии развития. В связи с этим эмбрионная культура клеток моркови имеет типичную для неорганизованно растущих культур клеток растений структуру и состоит из различающихся по размеру и форме одиночных клеток и клеточных агрегатов. В эмбрионной культуре клеток сладкого апельсина процесс мультипликации происходит на уровне глобулярного зародыша, поэтому в ней присутствуют исключительно крупные клеточные комплексы с гранулярной структурой. Механическая дисагрегация эмбрионной ткани является довольно простым способом искусственного получения мелкоагрегированных клеточных фракций оптимального размера. Совмещая этот способ с последующим фракционированием были выделены «связанные», т.е. находящиеся в составе крупных клеточных комплексов, фракции клеток моркови размером 100-38мкм и клеток сладкого апельсина размером 150-50мкм. Результаты проведенных физиологических экспериментов свидетельствуют, что в морфогенетическом отношении (частоте регенерации соматических зародышей) «свободная», т.е. естественно присутствующая в эмбрионной культуре, и «связанная» фракции 100-38мкм клеток моркови не различались. Показано, что в жидкой среде, традиционно используемой для стимуляции адвентивного эмбриогенеза, из агрегатов, образующих «связанную» фракцию 150-50мкм клеток сладкого апельсина, формируется популяция соматических зародышей, находящихся на глобулярной стадии развития. Последовательное использование трех сред, содержащих разные концентрации не проникающего плазмолитика, обеспечивает дальнейшее развитие глобулярных зародышей, которое осуществляется путем прямого морфогенеза.

**MECHANICAL DISPERSAL OF CARROT AND SWEET ORANGE  
EMBRYOGENIC CULTURES IS A WAY FOR OBTAINING SMALL SIZE CELL  
FRACTIONS CAPABLE FOR SOMATIC EMBRYOGENESIS**

**Moiseeva N.A., Serebryakova B.N.**

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul.35,  
Moscow, 123276 Russia, fax: 7(495)9778018, tel. (499)2318329, e-mail:  
[morphogenesis@mail.ru](mailto:morphogenesis@mail.ru)

For a long time carrot cell culture was the only one that has been considered and has been applied intensively as a model system to study somatic embryogenesis at organismal, cellular and molecular levels. Size-fractionation technique was first adapted to carrot embryogenic suspension culture. It was found that small size fraction isolated from initial suspension could be used as a source of somatic embryos. The primary advantage of small size fractions i.e. proembryogenic masses (PEM), is their adaptability as embryogenic suspension cultures. PEMs allow to increase output of the single somatic embryos and give possibilities to evaluate both the structural alterations coincided with somatic embryo development and quantification of small size fraction units capable for somatic embryogenesis.

It is known that embryogenic cultures of various plant species can have different morphology and anatomy. This variation could occur due to propagation of somatic embryos *in vitro* at various stages of their development. In embryogenic carrot cultures the propagation started prior to globular stage. It results in the formation of suspension composed of various size single cells and cell aggregates. Repetitive embryogenesis in sweet orange embryogenic cultures occurs at the globular embryo stage. In connection with this there is not small size fraction in sweet orange embryogenic culture and it consists of only large cellular conglomerates with granular structure.

We have worked out the protocol, in which the large cell aggregates of carrot and sweet orange embryogenic cultures were mechanically dispersed and then were fractionated on sieves for separation of optimal size cell fractions. In the case of carrot embryogenic culture there were obtained two fractions: "free" fraction 100-38  $\mu\text{m}$  - naturally present in embryogenic suspension and "dispersed" fraction 100-38  $\mu\text{m}$  - bound up with large cell aggregates. The results of our physiologic experiments showed that the regeneration frequency of somatic embryos was similar in "free" and "dispersed" fractions 100-38  $\mu\text{m}$ . Using the medium traditionally applied for the stimulation of repetitive embryogenesis in citrus cultures it was demonstrated the ability of "dispersed" sweet orange cell fraction 150-50  $\mu\text{m}$  to develop into globular somatic embryos. We succeed to stimulate the further development of the sweet orange globular embryos transferring them to consecutive media containing various concentrations of non-permeable plasmolytic.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ЭМБРИОГЕННЫХ И НЕЭМБРИОГЕННЫХ  
КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ**

**Никонова Н.А.<sup>1</sup>, Костюкова Ю.А.<sup>1</sup>, Нигматуллина Л.Р.<sup>1</sup>, Ризванов И.Х.<sup>2</sup>,  
Румянцева Н.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31 e-mail: [nikonorova\\_nat@mail.ru](mailto:nikonorova_nat@mail.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической и физической химии Казанского научного центра РАН, 420088, г. Казань, ул. Арбузова, д. 8 e-mail: [rizvanov@iopc.ru](mailto:rizvanov@iopc.ru)

Культура клеток растений служит не только удобным объектом для решения практических задач клеточной и геномной инженерии, но и модельной системой для изучения фундаментальных вопросов клеточной биологии и биологии развития. Однако при работе с культурой клеток существует ряд проблем, одной из которых является постепенное снижение эмбрионной способности клеток при длительном культивировании, вплоть до ее полной утраты. Исследователи разных стран, используя различные методы, пытаются выяснить, какие молекулярные и биохимические пути при этом включаются и/или выключаются. Протеомика уже довольно давно зарекомендовала себя как мощный системный подход к анализу экспрессируемых в клетке белков. В настоящее время происходит существенный рост количества работ, посвященных протеомному анализу культивируемых клеток растений, чему в значительной степени способствует постоянное совершенствование протеомных методик. Однако крайне важным является правильный подбор модельной системы, в которой:

1. эмбрионная культура должна сохранять способность к формированию полноценных зародышей при длительном культивировании;

2. неэмбрионная культура должна быть получена из эмбрионной.

Это позволяет использовать эмбрионные и полученные из них неэмбрионные культуры для изучения механизмов морфогенеза и его регуляции. В связи с этим, целью нашей работы была идентификация белков эмбрионных и неэмбрионных каллусных культур гречи татарской и последующий их анализ.

Для изучения белков эмбрионной и неэмбрионной культуры был проведен двумерный гель-электрофорез и последующий сравнительный анализ полученных белковых спектров. Для дальнейшего изучения нами были отобраны 135 хорошо разделенных белков, среди которых были как общие белки, так и специфичные для каждого типа культуры. Из них методом пептидного фингерпринта был идентифицирован 91 белок. Используя белковую базу знаний UniProt, идентифицированные белки были разделены на группы в зависимости от их локализации и функции в клетке.

Большая часть специфичных белков имела плазмидную и ядерную локализацию и была связана с метаболизмом белков, регуляцией, защитой и ответными реакциями на стрессоры. Тот факт, что большинство белков, идентифицированных в нашей работе, являлись плазмидными и ядерными, может свидетельствовать о серьезных изменениях в этих органеллах. Это предположение также подтверждается ультраструктурным и цитогенетическим анализом клеток. В отличие от эмбрионной культуры, для которой характерны преобладание диплоидного набора хромосом и нормальная форма ядер и пластид, в неэмбрионной культуре наблюдаются очень высокий уровень анеуплоидии и полиплоидии, лопастные ядра, а также амебодные и чашеобразные пластиды.

*Работа частично поддержана грантом РФФИ № 13-04-97136-р\_новолжье\_a*

**IDENTIFICATION OF PROTEINS OF EMBRYOGENIC AND NON-EMBRYOGENIC TATARY BUCKWHEAT CALLUS CULTURES****Nikonorova N.A.<sup>1</sup>, Kostukova J.A.<sup>1</sup>, Nigmatullina L.R.<sup>1</sup>, Rizvanov I.H.<sup>2</sup>,  
Rumyantseva N.I.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of the Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

e-mail: [nikonorova\\_nat@mail.ru](mailto:nikonorova_nat@mail.ru)

<sup>2</sup>Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of the Kazan Scientific Center of Russian Academies of Sciences, Kazan, Russia

e-mail: [rizvanov@iopc.ru](mailto:rizvanov@iopc.ru)

Plant cell culture is not just a convenient object for practical purposes such as cell and genetic engineering. It is also a model system for the study of the fundamental problems of cell biology and developmental biology. However, there are some problems concerning the usage of cell cultures. One of the main problems is gradual decrease of embryogenic capacity during long-term cultivation. Sometimes this leads to complete inability to embryogenesis or another type of morphogenesis. Scientists all over the world, using various methods, are trying to understand which molecular and biochemical pathways switch on and/or switch off during this process. Proteomics is a powerful approach to protein expression analysis. Nowadays there is an essential increase of studies concerning proteome analysis of cultivated plant cells triggered by continued improvement of proteomic techniques. On the other hand there is another important step such as right selection of model system in which: embryogenic culture should maintain the capacity to form proper embryos during long-term cultivation non-embryogenic culture should be derived from embryogenic one.

This allows to use embryogenic and derived from them non-embryogenic cultures for studying the mechanisms of morphogenesis and its regulation. Thus, the aim of our study was identification and further analysis of proteins of embryogenic and non-embryogenic tatar buckwheat callus cultures.

To study of embryogenic and non-embryogenic cell cultures proteins two-dimensional gel electrophoresis followed by comparative analysis of proteins were performed. For further study 135 well-separated common and specific for both cell culture types proteins were selected. Using peptide mass fingerprint 91 proteins were identified and according to protein knowledgebase Uniprot they were separated on groups depending on their localization and function.

The most of specific proteins belonged to plastid and nuclear proteins and took part in protein metabolism, regulation and stress response and defense. The fact that the most of differentially expressed proteins identified in our study were plastid and nuclear may indicate some crucial alterations in these organelles. This is also confirmed by ultrastructural and cytogenetical analyses. Unlike cells of embryogenic culture with diploid chromosome set and normal shape plastids and nuclei, in non-embryogenic callus cells there is a high level of aneuploidy and polyploidy. In non-embryogenic callus, nucleus are lobed and hypertrophied with very irregular shape and plastids are mainly amoeboid-like or cup-shaped (with irregular shape and cytoplasmic inclusions).

*This work was partially supported by RFBR grant № 13-04-97136*

## ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДЕЙСТВИЯ АМИТОТИКОВ ПРИ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*

Папихин Р.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, 393760, ул. Интернациональная, 101, факс (47545) 5-26-35, тел. (47545) 5-31-37, e-mail: parom10@mail.ru

Необходимым инструментом современной селекции является экспериментальная полиплоидия. Полиплоидия - достаточно широко распространенная в природе геномная мутация, которая может дать дополнительные возможности для выживания организма в экстремальных неблагоприятных условиях среды.

Целью работы являлось выявление цитологических особенностей последствия оризалина и колхицина при полиплоидизации ежевики кустистой (*Rubus fruticosus*).

Для корректного анализа влияния дестабилизирующего мутагенного фактора провели предварительное исследование кариотипа ежевики Whitford Thornless. В результате исследований установлено, что ядра соматических клеток содержат диплоидный набор хромосом ( $2n=2x=14$ ). У изучаемой формы отмечено 6 пар метацентрических хромосом и 2 пары субметацентрических.

В результате воздействия колхицина и оризалина на растительные ткани ежевики в условиях *in vitro* обнаружен ряд морфологических аномалий. Негативное влияние колхицина проявляется в появлении некротических участков, оризалина - в нетипичной морфологии корней. С увеличением концентрации негативный эффект воздействия амитотиков усиливается. Под влиянием амитотиков у ежевики, как и у других культур, изменяется ход митотического цикла. Это происходит в результате блокировки тубулинового цитоскелета. Отмечены дифференциально окрашенные структуры, представляющие собой, разрушаемое веретено тубулиновых микротрубочек. Данные структуры не имеют четкой полярности. При концентрации колхицина в среде 0,5% обнаружены клетки с не полностью разрушенным или дезориентированным веретеном.

Во всех вариантах воздействия колхицина на соматические ткани ежевики наблюдали классическое явление к-митозов. Наибольшее их количество обнаружено при концентрации колхицина 0,5%. Оризалин, как и колхицин деполимеризует веретено деления, но при этом не способствует образованию к-пар. Выявлены перестройки хромосомного типа под влиянием оризалина и колхицина: разрывы отдельных хроматид, слияние разорванных концов, фрагментация хромосом, слипание фрагментированных участков.

Наибольшее число фактов формирования полиплоидных клеток зафиксировано при использовании в качестве полиплоидизирующего агента колхицина в концентрации 0,5% и 1,0%. Оризалин обладает большим цитотоксическим эффектом, в результате этого жизнеспособность эксплантов снижена.

**CYTOLOGICAL ANALYSIS OF AMITOTIC AFTEREFFECT AT  
POLIPLIODISATION OF THE PLANTS IN VITRO****Papihin R.V.**

Michurinsk State Agrarian University Michurinsk, Russia 393760 Internationalnaya str., 101, fax (47545) 5-26-35, tel. (47545) 5-25-07, e-mail: parom10@mail.ru

The necessary instrument of modern breeding is experimental polyploidy. Polyploidy is widely enough distributed in nature genomic mutation, which may provide additional opportunities for the survival of the organism in extreme disadvantage condition of the ambience.

The purpose of the work is to reveal the cytological particularities of the aftereffect oryzalin and colchicine at polyploidisation of blackberry (*Rubus fruticosus*).

For correct analysis of the influence of destabilizing factors, including the mutagenic load, a preliminary study of karyotype blackberry Whitford Thornless was carried out. It was found that the nuclei of somatic cells contain the diploid number of chromosomes ( $2n = 2x = 14$ ). Besides under investigation form 6 pairs of metacentric chromosomes and 2 pairs of submetacentric are found.

As a result of influences of colchicine and oryzalin on plant tissue of blackberry Whitford Thornless in condition in vitro a number of morphological anomalies have discovered. The negative influence of colchicine reveals itself in appearance necrotic area, oryzalin - in anomalies morphology of the roots. With increase in concentration amitotic negative effect increases.

Under the influence of amitotic on blackberry, as well as on the other cultures, changes the mitotic cycle. The reason is blocking tubulin cytoskeleton. Differentially painted structures have been found presenting itself, destroyed spindle of tubulin microtubules. The data of the structure have not a clear polarity. At concentration of colchicine 0.5% in the medium detected cells are not completely destroyed or disoriented by spindle.

A classical phenomenon k-mitosis has been observed in all the samples of the colchicine influence on somatic tissues of blackberry. The most amount is discovered at the colchicine concentration - 0.5%. Oryzalin, as colchicine depolymerize mitotic spindle, but it does not contribute to the formation of a k-pairs.

Reorganization of the chromosome type under the influence of oryzalin and colchicine has been identified: breakups separate chromatids, merging of torn ends, chromosome fragmentation, sticking of fragmented plots.

The large biggest numbers of evidence of formation of polyploid cells are fixed when using colchicine as as polyploidisation agent in concentrations 0.5% and 1.0%. Oryzalin has high cytotoxic effect the result is reduced viability of the explants.

## ТИРОЗИНОВОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ С РАЗНОЙ МОРФОГЕННОЙ СПОСОБНОСТЬЮ

Петрова Н.В., Акулов А.Н., Каримова Ф.Г. Румянцева Н.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, 420111, ул. Лобачевского, 2/31, факс: (843) 292 -73-47, тел. (843) 231-90-47, e-mail: npetrova@inbox.ru

Экстраклеточный протеом *in vitro* представляет собой совокупность белков, выделяемых клетками в среду культивирования. В связи с этим суспензионные культуры, различающиеся по морфогенной способности, являются наиболее удобным объектом для выделения и идентификации секретируемых факторов, вовлеченных в регуляцию морфогенеза *in vitro*. Суспензионные культуры гречихи татарской были получены из каллусных культур путем помещения их в жидкую питательную среду и выращивании на орбитальном шейкере.

Методами двумерного электрофореза с последующим иммуноблоттингом с моноклональными антителами РУ20 было показано, что белки суспензионной культуры гречихи фосфорилируются по остаткам тирозина. Выявлено 27 фосфорилируемых белков молекулярной массой от 12 до 50 кДа и *pI* от 4 до 8 из более, чем 80 внеклеточных белков. При этом 15 из них не фосфорилируются внутриклеточно. В неморфогенной суспензии количество внеклеточных фосфорилируемых по тирозину белков было значительно меньше по сравнению с морфогенной суспензией (выявлено 12 белков – из них 6 – общие с морфогенной культурой). В спектре внеклеточных белков морфогенной суспензии особенно интенсивно фосфорилировался белок молекулярной массой 35 кДа и *pI* 5.2, идентифицированный как фрагмент 23,7 кДа шаперона, выделенного ранее из пшеницы, а также белок молекулярной массой 25 кДа и *pI* 5.2, имеющий гомологию с разветвленным белком сахарного тростника. В среде культивирования неморфогенных суспензий эти белки не были выявлены.

При индукции соматического эмбриогенеза в морфогенных культурах гречихи татарской в спектре фосфорилированных по тирозину внеклеточных белков по сравнению с внеклеточными белками суспензионной культуры произошли значительные изменения: появились новые белки - один молекулярной массой 70 кДа и два молекулярной массой 45 и 46 кДа, экспрессия 14 белков не была выявлена. Важно отметить, что 13 из 16 фосфорилированных по тирозину внеклеточных белков при индукции соматического эмбриогенеза не фосфорилируются внутриклеточно.

Таким образом, насыщенность спектра внеклеточных белков и интенсивность их фосфорилирования существенно выше в морфогенных культурах, Эти результаты позволяют сделать вывод о вовлечении фосфорилирования внеклеточных белков в регуляцию процессов дифференцировки и эмбриогенеза *in vitro*.



---

**TYROSINE PHOSPHORYLATION OF EXTRACELLULAR PROTEINS OF  
TATAR BUCKWHEAT SUSPENSION CULTURES WITH DIFFERENT MORPHOGENIC  
CAPACITY****Petrova N.V., Akulov A.N., Karimova F.G., Rumyantseva N.I.**

Kazan institute of biochemistry and biophysics, Kazan research center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111, Lobatchevsky str., 2/31, fax: (843) 292 -73-47, tel. (843) 231-90-47, e-mail: npetrova@inbox.ru

Extracellular proteome *in vitro* is a set of proteins that are secreted by cells to the culture medium. In connection with this suspension cultures differing in morphogenic capacity are the most convenient objects to isolate and identify secreted factors involved in morphogenesis regulation *in vitro*. Suspension cultures of tatar buckwheat were obtained from callus cultures by placing them to liquid medium and grown on an orbital shaker.

Using methods of two-dimensional electrophoresis followed by immunoblotting with monoclonal antibody PY20 it was shown that proteins of buckwheat suspension culture are phosphorylated on tyrosine residues. 27 phosphorylated proteins with a molecular weight from 12 to 50 kD and *pI* from 4 to 8 was revealed from more than 80 extracellular proteins. Thus 15 of them are not phosphorylated intracellular. In nonmorphogenic suspension the number of extracellular tyrosine phosphorylated proteins was significantly lower compared with morphogenic suspension (12 proteins were identified - 6 from these were common with morphogenic culture). In the spectrum of morphogenic suspension extracellular proteins most intensively was phosphorylated protein 35 kD and *pI* 5.2, identified as 23.7 kD chaperone fragment isolated previously from wheat, as well as a protein of molecular mass 25 kD and *pI* 5.2, having homology with a branched protein of sugarcane. In the culture medium of nonmorphogenic suspension these proteins have not been identified.

By the induction of somatic embryogenesis in nonmorphogenic culture of tatar buckwheat the spectrum of tyrosine phosphorylated extracellular proteins have significant changes compared with extracellular proteins of suspension culture: new protein with molecular weight 70 kD and two proteins with molecular weight 45 and 46 kD were revealed and expression of 14 proteins was not identified. Significantly, 13 of 16 tyrosine phosphorylated extracellular proteins by the induction of somatic embryogenesis are not phosphorylated intracellular.

Thus, the spectrum saturation of extracellular proteins and the intensity of their phosphorylation are significantly higher in morphogenic cultures. These results suggest the involvement of extracellular protein phosphorylation to the regulation of processes of differentiation and embryogenesis *in vitro*.

## КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ С ИОНАМИ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ: НОВЫЕ АСПЕКТЫ КОМПЛЕКСНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И.

Институт физиологии генетики НАН Украины, 03022, Киев ул. Васильковская, 31/17 e-mail: [Zlenko\\_lora@ukr.net](mailto:Zlenko_lora@ukr.net)

Ионы тяжёлых металлов (ИТМ) считаются одними из наиболее опасных токсикантов, поскольку могут вызывать обширные патологические изменения во многих тканях растительного организма. Однако, как правило, ИТМ действуют совместно с неблагоприятными абиотическими факторами, усиливая стрессовое давление окружающей среды. И тем самым расширяется спектр стрессовых поражений растения. С другой стороны, устойчивость к ИТМ может сочетаться с устойчивостью к абиотическим стрессам.

ИТМ можно условно подразделить на две категории: первая – ионы, необходимые в микроколичествах; вторая – ионы, вредные в любых дозах. Ко второй относят катионы бария ( $Ba^{2+}$ ), кадмия ( $Cd^{2+}$ ) и анионы вольфрамата ( $WO_4^{2-}$ ) и ванадата ( $VO_3^-$ ).  $Ba^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  оказывают действие на осмотические характеристики клетки;  $WO_4^{2-}$  и  $VO_3^-$  являются ингибиторами нитратредуктазы (НР, К.Ф. 1.6.6.1).

На селективных средах с добавлением летальных концентраций катионов  $Ba^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  и анионов  $WO_4^{2-}$  и  $VO_3^-$  получены клеточные линии табака, сои, подсолнечника. За всё время культивирования (для некоторых линий продолжительность превышала пять лет) отобранные варианты не теряли своего уровня устойчивости, напротив, в отдельных случаях удалось выделить клоны с повышенным уровнем резистентности. Устойчивые к действию ИТМ клеточные линии тестировали в условиях действия других летальных стрессов.

Так, Ва- и Cd-устойчивые клеточные линии (УКЛ) нормально пролиферировали в условиях различных осмотических стрессов (засоление, водный стресс), независимо от условий (стресс или норма) их предыдущего выращивания. При этом жизнеспособность клеток поддерживалась за счёт адаптации к конкретному стрессовому агенту.

V-УКЛ и W-УКЛ табака и сои тестировали на чувствительность/устойчивость к действию альтернативных анионов-ингибиторов НР. Данные варианты на стрессовом фоне росли и наращивали биомассу за счёт усвоения нитратной формы азота. При этом на V- и W-средах усвоение нитратов, вероятно, происходило различным способом, о чём свидетельствовало отличие в динамике синтеза белка. Редукция нитратов происходила в условиях, исключающих действие нитратредуктазы обычного типа и вызывающих гибель клеточных культур дикого типа. Общее свойство метаболизировать нитраты сочеталось с адаптацией к типу стрессора ( $WO_4^{2-}$  или  $VO_3^-$ ).

Регенеранты табака R0, полученные из Ва-УКЛ и Cd-УКЛ, развивались на фоне продолжительных солевого и водного стрессов *in vitro* или выдерживали обезвоживание *in vivo*. Жизнеспособность целостного растения обеспечивалась комплексом адаптивных реакций клеточного уровня: компартиментацией неорганических ионов и колебаниями уровня (синтез/деградация) свободного пролина.

Из растений R0 получено семенное поколение R1. Испытание семян *in vitro* (всхожесть, выживание, восстановление) при действии 20,0г/л солей морской воды и 0,5М маннита выявило повышенный уровень устойчивости поколения R1.

Регенеранты табака, полученные из V-УКЛ и W-УКЛ, характеризовались повышенной активностью НР при культивировании *in vitro* на контрольной среде, а также активностью фермента при стрессе, репрессирующем НР у растений дикого типа.

Клеточная селекция с использованием летальных доз ионов тяжёлых металлов может быть перспективным методом получения растительных форм с улучшенными показателями.

**CELL SELECTION WITH HEAVY METAL IONS: NEW ASPECTS OF  
COMBINED RESISTANCE****Sergeeva L.E., Bronnikova L.I.**

Institute of Plant Physiology and Genetics NAS Ukraine, 03022 Kyiv, Vasylykivska st. 31/17  
e-mail: [Zlenko\\_lora@ukr.net](mailto:Zlenko_lora@ukr.net)

Heavy metal ions (HMI) – are the most dangerous toxicants because they can product vast pathological alterations in different tissues of plant organism. But usually HMI act together with abiotic stresses and their joint action is more hazardous. From the other hand, the tolerance to HMI and abiotic stresses may be combined.

HMI are divided into two categories. Physiologically essential elements are belong to one group. Another – are toxic at trace concentrations.  $Ba^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  cations and  $WO_4^{2-}$ ,  $VO_3^-$  oxyanions are members of the second group.  $Ba^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  disorganize various osmotic cell parameters;  $WO_4^{2-}$   $VO_3^-$  repress activity of the nitrate reductase (NR, E.C. 1.6.6.1).

On selective media with the addition of lethal doses of  $Ba^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $WO_4^{2-}$ ,  $VO_3^-$  ions cell lines of tobacco, soybean, sunflower were obtained. Those clones retain their initial level of their resistance during whole period of cultivation (five and more years). Cell variants with higher levels of the resistance appeared among them. HMI-resistant plant cello lines were tested under alternative lethal stresses.

Ba- and Cd-resistant cell lines (RCL) grew normally under osmotic stresses (salinity, water stress) after their transfer either from normal or from ion-containing media. The cells viability is maintained by adaptation to specific stressor.

V-RCL and W-RCL of tobacco and soybean were tested for their sensitivity/resistance to the inhibitory effects of the NR repressors. These variants under stress pressure grew and increased biomass by nitrate assimilation. Nitrate assimilation in cells cultivated on V- and W-containing media are fulfilled in different manners. Those processes were reflected at protein biosynthesis. The pathway of nitrate reduction/assimilation took place under crucial conditions that inhibited usual nitrate reductase and lead to death of wild type cultures. Common ability of RCL-es – nitrate reduction – is combined with the adaptation to the individual stressor.

R0 regenerants of tobacco from Ba-RCL and Cd-RCL grew *in vitro* under modeling salinity or water stress and challenged desiccation *in vivo*. The viability of intact plants was supported through number of cellular reactions of adaptation: compartmentation of inorganic ions and fluctuations of the free proline levels (synthesis/degradation).

Seeds and seed progeny R1 were obtained. *In vitro* young shoots survive under salinity (20,0g/l sea water salts) and water stress (0,5M mannitol). Such doses were toxic for control.

Regenerants of tobacco from V-RCL and W-RCL showed the high level of the nitrate reductase activity (two times over than that parameter of wild type) during cultivation *in vitro* on control medium. Plants also assimilated nitrates under stress that inhibited the nitrate reductase activity of wild type plants.

Cell selection with heavy metal ions in lethal doses is the advanced method of improving plants.

**ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ  $H_2O_2$  И  $NO$  В КЛЕТКАХ КАЛЛУСОВ ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ГОРМОНОЗАВИСИМОСТИ И СКОРОСТИ РОСТА****Сибгатуллина Г.В., Нигматуллина Л.Р., Румянцева Н.И.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, 420111, ул. Лобачевского, 2/31,  
факс: (843) 292 -73-47, тел. (843) 231-90-42, e-mail: [kam-guz@yandex.ru](mailto:kam-guz@yandex.ru)

Пролиферация клеток – это сложно программируемый процесс, зависящий как от внутренних, так и внешних стимулов. Как правило, под действием ростовых факторов инициируется каскад событий, включающий изменение активности и экспрессии транскрипционных факторов, протеинкиназ и других белков, участвующих в регуляции генов клеточного цикла. Известно также, что в этих процессах участвуют активные формы, как кислорода (АФК), так и азота (АФА). Изучение взаимодействия АФК и АФА с гормонами может способствовать пониманию механизмов клеточной пролиферации. Каллусные культуры, различающиеся по митотической активности и гормонозависимости, являются удобными моделями для таких исследований. Цель настоящей работы заключалась в изучении динамики содержания активных форм кислорода и азота в каллусных культурах, различающихся по гормонозависимости и пролиферативной активности.

В качестве объектов исследования были использованы неморфогенные каллусы (НК) гречихи татарской и полученные из них гормононезависимые неморфогенные каллусы (НК бг). Митотический индекс и средний размер клеток НК бг были в 2 раза ниже по сравнению с НК. При этом на 14-е сут культивирования прирост биомассы НК составлял 650%, а НК бг – только 200%. Было установлено, что для НК характерно высокое содержание перекиси водорода в клетках (до 110 мкМ/г сух веса), тогда как в НК бг содержание перекиси водорода было в 1,5 - 5 раз ниже. Содержание  $NO$  в клетках НК составляло 0,1- 0,5 мкМ/г сухого веса, в НК бг – 0,01-0,3 мкМ/г сухого веса. Таким образом, исследования показали, что в каллусах, растущих на среде с гормонами, выше митотический индекс и скорость нарастания биомассы, что коррелирует с высоким содержанием, как перекиси водорода, так и  $NO$  по сравнению с культурами, растущими на среде без добавления гормонов. Было сделано предположение, что экзогенное добавление гормонов способствует образованию как АФК, так и АФА, при этом происходит двойная активация пролиферации - через редокс-сигнальные каскады и гормональные каскады. Вероятно, высокое содержание перекиси водорода обеспечивает интенсивное растяжение клеток, тогда как  $NO$  может выступать в качестве индуктора деления клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-31006.

**DYNAMIC OF H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> AND NO CONTENT IN TATAR BUCKWHEAT CELL CULTURES WITH DIFFERENT HORMONE-DEPENDENCE AND GROWTH RATE**  
**Sibgatullina G.V., Nigmatullina L.R., Rumyantseva N.I.**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111, Lobachevsky st., 2/31,  
fax: (843) 292 -73-47, tel. (843) 231-90-42, e-mail: kam-guz@yandex.ru

Cell proliferation is the complicated programmable process depends on both the internal and external stimuli. Typically, the action of growth factors initiates a cascade of events, including changes in the activity and the expression of transcription factors, protein kinases and other proteins involved in the regulation of cell cycle genes. It is also known that reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are involved in this process. The study of the interaction of ROS and RNS with hormones may contribute to the understanding of the mechanisms of cell proliferation. Callus cultures that differ in the mitotic activity and the hormonal requirement are the suitable models for such studies. The aim of the present work was to study the dynamics of the ROS and RNS in the callus cultures that differ in hormonal requirement and proliferative activity.

As objects, non-morphogenic callus (NC) of tatar buckwheat and derived from its non-morphogenic habituated (NCH) callus were used. Mitotic index and average cell size of NCH cells were about 2-fold lower compared to NC. After 14 days of culture, biomass level of NC was increased up to 650% of fresh weight, while in NCH it was changed only up to 200%. It has been found that intracellular hydrogen peroxide content in NCH was about 1.5 - 5 times lower than the content of hydrogen peroxide in NC. The NO content in NC cells was 0.1 - 0.5 mM / g dry weight, in NCH - 0.01-0.3 mM / g dry weight. Thus, our studies have shown that calli grown on medium with hormones, have higher mitotic index and biomass growth as compared with the ones grown on medium without hormones. These characteristics correlate with the high intracellular content of hydrogen peroxide as well as NO content. It has been suggested that the addition of exogenous hormones promotes the formation of ROS and RNS. Thus, a double activation of proliferation - via redox and hormonal signal transduction cascades occurs. It appears that high level of hydrogen peroxide provides intensive cell extension, whereas NO can serve as an inducer of cell division.

This work was supported by RFBR grant № 12-04-31006

**АММОНИЙ – ФАКТОР ФОРМИРОВАНИЯ РИБОСОМ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ (НА ПРИМЕРЕ КЛЕТОК КАЛЛУСА СОИ И ВОДОРΟΣЛИ ХЛАМИДОМОНАДЫ).****СМОЛОВ А. П.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии РАН; Россия, 142290 Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, 2; тел.: 7 496 773 18 37, факс.: 7 496 733 05 32, e-mail: smar49@mail.ru

Проведен сравнительный анализ полученных экспериментальных данных по влиянию экзогенного аммония на содержание общего белка, хлорофилла, структурную организацию хлоропластов, количество рибосомальных структур и экспрессию рибосомальных генов кодирующих белок малой субъединицы *grs6* и 18S рРНК в клетках миксотрофной каллусной культуры сои (*Glycine max*) и одноклеточной зеленой водоросли хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii*). Сравнительный анализ показал, что под влиянием экзогенного аммония увеличение количества рибосомальных структур в клетках каллуса сои, как и в клетках водоросли, не вызваны увеличением активности соответствующих рибосомальных генов. Однако клетки каллуса сои и хламидомонады по-разному реагировали на присутствие аммонийного компонента в составе питательной среды. Так, например, содержание общего белка и хлорофилла в клетках каллуса сои существенно снижалось, если среда на которой они выращивались не содержала аммонийного компонента, тогда как в клетках водоросли хламидомонады эти показатели практически не менялись в зависимости от наличия или отсутствия экзогенного аммония. Присутствие аммония в питательной среде влияло на структурную организацию хлоропластов клеток каллуса, но не клеток хламидомонады. На основании полученных результатов обсуждаются возможные механизмы аммонийного воздействия как на содержание рибосом в клетках, так и на содержание в них белка и хлорофилла.

---

**AMMONIUM IS THE FACTOR OF RIBOSOMES FORMATION IN A PLANT CELLS (IN TERM OF SOYBEAN CALLUS CELLS AND CHLAMYDOMONAS CELLS).****Smolov A. P.**

Institute of basic biological problems RAS; Russia, 142290 Moscow region, Pushchino, Institutskaya, 2; tel.: 7 496 7 73 18 37; fax.: 7 496 7 33 05 32; e-mail: smap49@mail.ru

We compared total protein and chlorophyll contents, chloroplast structural organization, the number of ribosomes and expression of two ribosomal genes of the small subunit encoding for rps6 and 18S rRNA in soybean (*Glycine max*) callus cells and in chlamydomonas (*Chlamydomonas reinhardtii*) cells. These results demonstrated that decrease in the number of ribosomes in two cell types (plant and alga) were caused by absence of exogenous ammonium was not due to the reduction of the activities of the appropriate ribosomal genes (rps6 and 18S rRNA). The effect of ammonium presence in the culture medium on total protein and chlorophyll contents as well as on structural organization of chloroplasts was different in two types of cells. For example, total protein and chlorophyll contents in callus cells dramatically decreased if they grew without ammonium, however these characteristics of algal cells did not change in the presence or in the absence of ammonium in the medium. The ammonium presence in the medium influenced on chloroplast structure of callus cells but did not influence on chloroplast structure of algal cells. Based on these results, the possible mechanisms of ammonium effect on protein and chlorophyll contents, chloroplast structural organization, the number of ribosomes and the expression level of the ribosomal genes are discussed.





**СЕКЦИЯ 2.**

**Регуляция морфогенеза растительных  
клеток *in vitro***

**SECTION 2.**

**Regulation of morphogenesis of plant  
cells *in vitro***

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF REGENERATION CAPACITY  
IN HARDWOOD TREES****Park S.Y.<sup>1</sup>, Moon H.K.<sup>2</sup>, Shin H.<sup>2</sup>, Kang K.S.<sup>2</sup>, Paek KY<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Department of Horticultural Science, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763 Korea, fax. (82) 43 -271-0414, tel. (82) 261-2531, e-mail: soypark7@cbnu.ac.kr, paeky@cbnu.ac.kr

<sup>2</sup>Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847 Korea

fax (82) 31-290-1163, tel. (82)31-290-1163, e-mail: hkmoon@forest.go.kr

Micropropagation, including somatic embryogenesis in woody species, is considered as one powerful approach in cloning elite genotypes and genetic transformation. However, regeneration is difficult to achieve in tissue or cell beyond the mature embryo phase in trees. Additionally regeneration capacity has often been considered as a species-specific characteristic because of the difficulty to identify the reasons for the problem as it is a consequence of the complex interplay of several factors, so still its physiological process involved are poorly understood.

In an attempt to obtain deeper insight into the variation in embryogenic and organogenic capacity from *Kalopanax septemlobus* and *Populus euramericana* which are important, we investigated endogenous metabolites including polyamines (PAs) from embryogenic (EC) and non-embryogenic cells (NEC), and response and recalcitrant genotype. The PA contents were remarkably different between the cell types, the highest levels occurring in the NEC on proliferation medium, when putrescine and spermidine were most abundant. Spermine was present in only minute quantities and showed only a small change. A comparison of metabolic compositions of NEC and EC using GC/MS identified around 50 compounds, partly displaying significant changes in metabolite levels, e.g., highly elevated levels of xanthosine and methyloxazole in EC compared to in NEC. From this analysis, we have identified numerous compounds including PAs involved with the embryogenic state. For organogenesis of *P. euramericana*, stem discs cultured on regeneration medium were sampled and the contents of three PAs were analyzed during the entire culture period. Total PA contents were higher in the non-recalcitrant clone than response one, however putrescine(put)/spermidine(sp) is dramatically increased in recalcitrant clone after 18 days of culture. To overcome those recalcitrant characteristics in embryogenesis, pre-treatments with strong concentration of 2,4-D for 1-day and high osmotic stress with 1 M sucrose stimulated embryogenic cell formation from leaf segment in *K. septemlobus*. For organogenesis, shoot regeneration was improved by 1mM of exogenous Put and Spd, and manipulation of light quality. These results showed that the cellular PAs and Put/Spd ratios are important indicators of the regeneration ability, and morphogenetically poor and recalcitrant species or genotype could be found by metabolite profilings and simply PAs analysis. Furthermore the results showed that regeneration in recalcitrant genotype could be enhanced by manipulation of physiological status of explants.

**ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА *FRAGARIA X POTENTILLA IN VITRO*****Амброс Е.В., Полубоярва Т.В., Новикова Т.И.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, Новосибирск, 630090, ул. Золотодолинская, 101, факс: (383) 330-19-86, тел. (383) 339-98-27, e-mail: ambros\_ev@mail.ru

В настоящее время при получении новых форм растений широко используются биотехнологические методы, которые позволяют значительно повысить эффективность селекционного процесса. Благодаря тотипотентности растительных клеток под влиянием регуляторов роста индуцируется морфогенез, в процессе которого образуются ткани и органы *de novo*, способные формировать целый организм. Регенерация растений из зародышевых тканей *in vitro* используется в селекции плодовых растений для преодоления постгамной несовместимости при получении отдаленных гибридов.

Цель исследования – изучить морфогенетические особенности формирования побеговых структур, полученных в культуре *in vitro* из незрелых зиготических зародышей *Fragaria x Potentilla*.

Зародыши извлекали из незрелых семянков в несколько периодов: через 10-15 дней после опыления (ДПО), 15-20 ДПО, 20-25 ДПО, 25-30 ДПО. Затем их разрезали продольно между семядолями и помещали на индукционные модифицированные среды МС с БАП, 2,4-Д и НУК в различных комбинациях и концентрациях. Экспланты выдерживали 4-5 недель в темноте при температуре 25<sup>0</sup>С. После каллусообразования их переносили в условия 16-ти часового фотопериода, при температуре днем 23-25 °С, ночью 16-18 °С, освещенности 4 клк. Почти у всех эксплантов на 7 день культивирования отмечено появление каллусной ткани с различной морфогенной активностью. На среде МС с 0.2 мг/л БАП + 1.0 мг/л 2,4-Д у 92-97% эксплантов, изолированных на 20-25 и 25-30 ДПО, образовался морфогенный каллус - плотный, молочного цвета, зеленеющий на свету. Гистологический анализ эксплантов культивируемых на индукционной среде показал, что через 2 недели в поверхностном слое каллуса формировались очаги клеток меристематического типа. После 3-5 недель культивирования деление клеток меристематических очагов приводило к образованию бугорков на поверхности каллуса. Затем экспланты помещали на среду для дифференциации (МС с БАП 0.75 мг/л + 0.1 мг/л ГК<sub>3</sub>), на которой через 6-8 недель появлялись многочисленные побеги, находящиеся на разных стадиях развития. На гистологических срезах в этот период отмечено формирование меристем адвентивных побегов, заложение листовых примордиев, а также рост почек и развитие побегов из почек.

Таким образом, морфогенез в культуре каллусной ткани *Fragaria x Potentilla* реализуется путем геммогенеза. Установлено, что морфогенным потенциалом обладают поверхностные слои клеток экспланта. Получение морфогенного каллуса оказалось возможным только при использовании в качестве исходного материала эксплантов, изолированных из семянков на 20-25 и 25-30 ДПО при культивировании на модифицированной среде МС с 0.2 мг/л БАП и 1.0 мг/л 2,4-Д. Наиболее компетентными к развитию оказались зародыши, выделенные из семянков через 25-30 ДПО. Этот период изоляции эксплантов обеспечил наибольший выход растений – регенерантов на среде для дифференциации (3,8% побегов).

**MORPHOGENESIS INDUCTION OF *IN VITRO* FRAGARIA X POTENTILLA**  
**Ambros E.V., Poluboyrova T.V., Novikova T.I.**

Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch, RAS, Novosibirsk, 630090, Zolotodolinskaya st., 101, fax (383) 330-19-86, tel. (383) 339-98-27, e-mail: [ambros\\_ev@mail.ru](mailto:ambros_ev@mail.ru)

At present biotechnological methods allowing increase efficiency of breeding process are widely used for obtaining new forms of plants. Due to totipotency of plant cells under the influence of plant growth regulators the morphogenesis is induced. During this process *de novo* tissues and organs capable of forming a whole organism appear. Plants regeneration from *in vitro* embryo tissues is used in breeding of fruit plants for overcoming postgametic incompatibility when obtaining remote hybrids.

The aim of this research is to study the morphogenetic characteristics of shoot structures obtained in tissue culture from immature *Fragaria x Potentilla* zygotic embryos.

Embryos were taken from immature seeds during in several periods: 10-15 days after pollination (DAP), 15-20 DAP, 20-25 DAP, 25-30 DAP. Then these embryos were cut between cotyledons and placed on modified induction MS media supplemented with BA, 2,4-D and NAA in various combinations and concentrations. Explants were incubated for 4-5 weeks in the dark at 25°C and were transferred at 23-25/ 16-18°C for 16/8 hours (day/ night) photoperiod at 4 Klux light intensity after callus formation. Morphogenic callus activity of most of explants was observed on the 7<sup>th</sup> day of culturing.

Morphogenic callus (dense, milky, becoming green on light) was formed on the MS medium with 0.2 mg l<sup>-1</sup> BA and 1.0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D at 92-97% of the explants isolated in 20-25 and 25-30 DAP. The histological analysis of explants cultivated on the induction medium showed that 2 weeks later cell centers of meristematic type were formed in a surface layer of callus. Cell divisions of the meristematic centers led to formation of protuberances on callus surface after 3-5 weeks of culturing. Then explants were placed on the medium for differentiation (MS with 0.75 mg l<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>) where numerous shoots at different developmental stages appeared 6-8 weeks later. Formation of adventitious shoot meristems, initiation of leaf primordial, as well as growth of buds and development of shoots from buds were noted on histological cuts in this period.

Thus, the morphogenesis in callus tissue culture of *Fragaria x Potentilla* is realized by the gemmogenesis. It has been established that surface layers of explant cells have morphogenic potential. Obtaining morphogenic callus was possible with the use of explants isolated from seeds 20-25 and 25-30 DAP when culturing on the modified MS medium with 0.2 mg l<sup>-1</sup> BA and 1.0 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D as an initial material. The embryos isolated from the seeds 25-30 DAP turned out to be most competent to development. This period of explants isolation provided the greatest number of regenerants on the medium for differentiation (3.8% of shoots).

**АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ,  
СВЯЗАННЫХ СО СПОСОБНОСТЬЮ К АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO*, У ЯРОВОГО  
ГЕКСАПЛОИДНОГО ТРИТИКАЛЕ**

**Антоненко Е.В., Кременевская Е.М., Ермишина Н.М., Лемеш В.А.**

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, 220072, ул.  
Академическая, 27 факс: (8017) 284-19-17, тел. 8(017) 294-91-82, e-mail:  
E.Antonenko@igc.bas-net.by

Разработка и совершенствование биотехнологических методов с целью использования их для создания нового исходного материала и ускорения селекционного процесса важнейших зерновых культур в настоящее время приобретает особое значение. Культура пыльников *in vitro* является одним из наиболее эффективных методов экспериментальной гаплоидии и применяется в различных селекционных программах для создания гомозиготных линий на основе гибридов ранних поколений. В условиях культуры *in vitro* возможно не только вовлечение в искусственный отбор огромного числа генотипов, но и создание высокой жесткости отбора в строго контролируемых условиях. Этот метод лежит в основе создания новых сортов растений, в особенности, хлебных злаков.

Тритикале ( $\times$  *Triticosecale* Wittm.) – культура, полученная в результате объединения геномов пшеницы и ржи, которая сочетает в себе ряд хозяйственно-биологических особенностей, присущих исходным видам, таких как высокий потенциал урожайности зерна и зеленой массы, повышенные адаптивные свойства, относительная устойчивость к грибным заболеваниям, высокое содержание белка лизина и крахмала в зерне и т.д. Однако новая сельскохозяйственная культура нуждается в серьезной доработке. Несмотря на то, что с момента получения первых растений-регенерантов тритикале в культуре пыльников *in vitro* эффективность данного метода значительно увеличилась, он не получил широкого практического применения. Это обусловлено тем, что до сих пор не разработаны подходы массового получения гаплоидов в культуре *in vitro* и создания гомозиготных линий тритикале. Поскольку одним из лимитирующих факторов, обеспечивающих успех применения метода культуры пыльников является генотип донорного растения, важно разработать эффективную систему отбора наиболее перспективных для введения в культуру форм тритикале, которые в дальнейшем можно будет использовать в качестве доноров генов, связанных с высокой отзывчивостью в культуре пыльников *in vitro*. Локализация генов и генетических систем, связанных с высоким эмбрионным потенциалом в культуре *in vitro*, позволит управлять данными процессами и повысить эффективность метода культуры клеток и тканей. Способность к индукции каллусов и регенерации у пшеницы зависит в большей степени от хромосом 2A, 2D, 5A, 5B, 4A, 2B. Поскольку тритикале содержит A и B геномы пшеницы, целью работы было установить целесообразность использования разработанных для пшеницы ДНК-маркеров для скрининга по генам, контролирующим параметры пыльцевого эмбриогенеза у тритикале. Осуществлен анализ полиморфизма микросателлитных локусов, расположенных на пятой хромосоме A-генома у 65 генотипов ярового гексаплоидного тритикале. Были использованы праймеры к 3 микросателлитным локусам, связанным с признаками пыльцевого андрогенеза *in vitro* у мягкой пшеницы. Исследуемые микросателлитные локусы равномерно распределены по хромосоме 5A, все они представлены единичными копиями. Полученные данные свидетельствуют о наличии полиморфизма по единственному локусу *Xgwm186* у исследованных генотипов ярового гексаплоидного тритикале. Для того, чтобы сделать вывод о пригодности или непригодности использования разработанных для пшеницы ДНК-маркеров для отбора высокоэмбрионных генотипов тритикале в дальнейшем планируется проведение более комплексного исследования, затрагивающего другие хромосомы генома.

**ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE LOCI RELATED  
TO THE ABILITY TO ANDROGENESIS IN VITRO IN SPRING HEXAPLOID  
TRITICALE**

**Antonenko E.V., Kremenevskaya E.M., Ermishina N.M., Lemesh V.A.**

SSI "Institute of Genetics and Cytology", Minsk, 220072, Academicheskaya St., 27  
fax: (8017) 284-19-17, phone: 8(017) 294-91-82, e-mail: E.Antonenko@igc.bas-net.by

The development and improvement of biotechnological methods that can be used in order to create new starting material as well as to accelerate the breeding process of the major crops are acquiring special significance nowadays. Anther culture in vitro is one of the most efficient methods of experimental haploidy which is often used in various breeding programs to create homozygotic lines on the basis of the hybrids of previous generations. In vitro culture conditions not only is it possible to include a huge amount of genotypes but also to create the rigid selection in strictly controlled condition. In vitro culture conditions is not only a possibility to include a huge amount of genotypes in artificial selection but also to create the rigid selection in strictly controlled condition. This method underlies the creation of new species of plants particularly of crop plants.

Triticale ( $\times$  Triticosecale Wittm.) – is a culture obtained by combining genomes of wheat and rye. This culture embodies a number of features inherent to the original species such as high yield potential of grain and vegetative mass, increased adaptive properties, relative resistance to fungal diseases, high content of lysin and starch in grain etc.

Nevertheless this new agricultural culture needs serious selection revision. Despite the fact that since the first regenerants of triticale were obtained in anther culture the efficiency of this method has significantly improved, it still doesn't have wide practical application. This happened due to the fact that the mass production of haploids in cell culture and the creation of homozygotic lines of triticale still haven't been developed. As one of the limiting factors ensuring the success of the application of the anther culture method is the donor plant genotype it's important to work out an effective selection system of the most promising triticale forms to be brought introduced into the culture and later it would be possible to use them as donors of genes associated with high responsiveness in anther culture in vitro.

The localization of genes and genetic systems connected with the high embryogenic potential in vitro culture allows to control the given processes and improve the effectiveness of cell and tissue culture callus induction and regeneration ability of wheat depends mainly on the chromosomes 2A, 2D, 5A, 5B, 4A, 2B. As the triticale contains A and B wheat genomes, the aim of the work was to define advisability of using the DNA markers which were developed for wheat to screen the genes controlling triticale pollen embryogenesis. We analyzed polymorphism of microsatellite loci, located on the fifth chromosome of A genome of 65 genotypes of spring hexaploid triticale. primers to 3 microsatellite loci, connected with the trait of pollen androgenesis in vitro of soft wheat were used. The examined microsatellite loci are evenly spread on chromosome 5A, all of them are represented by single copies. The acquired data indicate the presence of polymorphism on a single locus Xgwm186 in the examined genotypes of spring hexaploid triticale. In order to draw a conclusion about the suitability or unsuitability of wheat developed for DNA markers for selection of highly embryogenic triticale genotypes will be a more comprehensive study of other chromosome of triticale genome.

**ГАПЛОИДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ В УСКОРЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ  
*TRITICUM AESTIVUM* L. НА УСТОЙЧИВОСТЬ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ  
БИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

**Анапияев Б.Б.<sup>1</sup>, Исакова К.М.<sup>1</sup>, Бейсенбек Е.Б.<sup>1</sup>, Казкеев Д.Т.<sup>2</sup>, Жанбырбаев Е.А.<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Институт высоких технологии и устойчивого развития КазНТУ им. К.И. Сатпаева МОН РК, Алматы, 050013; ул. Сатпаева 22, Казахстан, E-mail: [bak\\_anapiyayev@mail.ru](mailto:bak_anapiyayev@mail.ru)

<sup>2</sup>Институт биологии и биотехнологии растений МОН РК, Алматы, 050013, ул. Тимирязева, 45

Проблема устойчивости культурных растений к неблагоприятным факторам внешней среды, наряду с ростом численности населения Земли, признана глобальной проблемой. Перед учеными стоит важная задача по ускоренному созданию новых сортов основных продовольственных культур, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды.

Современные разработки андроклинии, одного из направлений гаплоидной биотехнологии, в основе которого лежит метод культуры изолированных пыльников и микроспор, позволяют создавать константные гомозиготные удвоенные гаплоидные линии из гибридных популяций растений за 1-2 года, в то время как методом традиционной селекции для получения стабильных линий необходимо затратить 8-10 лет.

Проведен мониторинг генотипов пшеницы в условиях Южного Казахстана на устойчивость к ржавчинным заболеваниям в естественном и инфекционном питомнике. В качестве инфицирующего агента использовали расы *Puccinia graminis*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia recondita*. Интенсивность поражения ржавчиной учитывали по шкале Питерсона и др. визуально по всем растениям делянки. Высокую устойчивость к ржавчинным болезням показали следующие генотипы: *Triticum kihara*, *Triticum diccocum*, *Triticum thimofeevi*, Almaly, Naz, Taza и другие. Отобранные устойчивые генотипы были использованы для скрещивания и создания перспективных межсортовых и межвидовых отдаленных гибридов. Было создано более 120 гибридных комбинаций. Полученные гибриды были генетически стабилизированы методом гаплоидной биотехнологии на основе культуры изолированных пыльников и микроспор *in vitro*. Были модифицированы составы питательных сред на основе Vlaydes и №6 с добавлением активированного угля и амилдекстрина. В следующей серии экспериментов устойчивые и восприимчивые к ржавчинным болезням родительские формы, созданные гибридные формы и новые гаплоидные линии были проанализированы на уровне ДНК с использованием молекулярных маркеров. В результате SSR-анализа и изогенных линий на основе Thatcher установлено, что устойчивые к ржавчинным болезням генотипы и линии имеют ген *Lr 24*. В заключительной стадии новые перспективные дигаплоидные линии были тестированы на устойчивость к ржавчинным болезням на естественном и искусственном фонах в двух областях Южного Казахстана (Алматинская и Жамбылская). Среди изученных дигаплоидных линий выделены номера DHL 1057, DHL 1050, DHL 1045 и DHL 1027, которые оказались устойчивыми к ржавчинным заболеваниям и характеризуются высокой урожайностью и качеством зерна.

На основе проведенных исследований и использования гаплоидной биотехнологии впервые в Республике Казахстан был создан новый высокопродуктивный сорт пшеницы «Нуреке», который был районирован в Алматинской и Жамбылской области Южного Казахстана.

**HAPLOID BIOTECHNOLOGY IN RAPID BREEDING OF *TRITICUM AESTIVUM* L. FOR ADVERSE BIOTIC ENVIRONMENTAL FACTORS RESISTANCE**  
**Anapiyayev B.B.<sup>1</sup>, Iskakova K.M.<sup>1</sup>, Beisenbek E.B.<sup>1</sup>, Kazkeev D.T.<sup>2</sup>, Zhanbirbayev E.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of High Technologies & Sustainable Development KazNTU, Kazakhstan, Almaty, 050013, Satpayev str, 22, E-mail: bak\_anapiyayev@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, 050013, Timiryazev str., 45

The problem of cultural plants resistance to adverse environmental factors, alongside with Earth population growth, is recognized as a global problem. Scientists have faced the important problem of new cultivars accelerated breeding of the basic food cultures which are steady to abiotic and biotic environmental factors.

Modern developments of androgenesis which is one of the haploid biotechnology directions and the basis of it is the method of isolated anthers and microspores culture, allow to create the constant homozygous double haploid lines from plant hybrid populations during 1-2 years while a traditional breeding method of stable lines reception demands about 8-10 years.

Wheat genotypes monitoring on rust diseases resistance was carried out in Southern Kazakhstan conditions in natural and infectious nursery. Races *Puccinia graminis*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia recondita* were used as an infecting agent. Intensity of rust defeat was taken into account on Peterson et al scale visually on all plants of the plot. The following genotypes have shown a high stability to rust diseases: *Triticum kihara*, *Triticum dicocum*, *Triticum thimofeevi*, Almaly, Naz, Taza and others. The selected steady genotypes have been used for crossing and breeding of perspective inter-cultivar and inter-species remote hybrids. More than 120 hybrid combinations were created. Received hybrids were genetically stabilized by haploid biotechnology method on the basis of isolated anthers and microspores culture in vitro. The structures of nutrient mediums on Blaydes and №6 basis were modified through activated coal and amyloextrine addition. In the following experiments series rust-disease steady and rust-disease susceptible parental forms, bred hybrid forms and new haploid lines were analyzed at DNA level using molecular markers method. As a result of the SSR-analysis and isogenic lines on the Thatcher basis it was established that rust-disease steady genotypes and lines have Lr 24 gene. In a final stage new perspective dihaploid lines were tested on stability to rust diseases in natural and artificial conditions in two areas of Southern Kazakhstan (Almaty and Zhambyl). Among investigated dihaploid lines the numbers DHL 1057, DHL 1050, DHL 1045 and DHL 1027 were allocated. They appeared rust-diseases steady and are characterized with high productivity and grain quality.

On the basis of the carried out researches and use of haploid biotechnology for the first time in Kazakhstan a new high productive cultivar of common wheat "Nureke" which is zoned in Almaty and Zhambyl areas of Southern Kazakhstan.



**КРАХМАЛЫ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ АМИЛОЗЫ И АМИЛОПЕКТИНА  
КАК КОМПОНЕНТЫ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДОВ ЯЧМЕНЯ  
В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ IN VITRO**

**Белинская Е. В., Тымчук С. М., Дербизова О. Ю.**

Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук Украины,  
Харьков, 61060, проспект Московский, 142, факс: +380 (057) 779-84-17, тел. +380 (057) 392-13-43, e-mail: [bilinska@ukr.net](mailto:bilinska@ukr.net)

Гаплоидные технологии, которые основаны на индукции спорофитного развития микроспор в культуре пыльников *in vitro*, позволяют существенно ускорить процесс создания гомозиготных линий. Однако целесообразность применения этих технологий в селекции зависит от возможности обеспечить массовый характер образования морфогенных структур и регенерации растений, в связи с чем, актуальной задачей современной биотехнологии является поиск методических приемов повышения регенерационного потенциала пыльниковой культуры при максимальном нивелировании генотипической зависимости гаплопродукционного процесса. Исходя из этого, целью исследований была оценка эффективности стимуляции эмбриоидогенеза и регенерации в культуре пыльников *in vitro* ячменя ярового путём замены агар-агара в питательной среде кукурузными крахмалами.

Материалом для исследований служили три модельных генотипа с контрастной способностью к андрогенезу *in vitro* и пять гибридных популяций F<sub>3</sub>. Базовая индукционная среда NMSмод.2 (контроль) и среда для регенерации растений содержали 0,8 % агар-агара „Difco” (США). В опытных вариантах в состав среды в качестве гелеобразователя были включены кукурузные крахмалы, выделенные из зерна линий-носителей мутантных генов структуры эндосперма *ae*, *ix*, *su<sub>1</sub>* и *su<sub>2</sub>*.

При изучении гелеобразующих свойств этих крахмалов было установлено, что высокоамилозные кукурузные крахмалы из зерна линий-носителей генов *ae* и *su<sub>2</sub>* (содержание амилозы – соответственно 65 % и 35 %) в концентрации 6,5 % образуют гели, плотность которых достаточна для инокуляции эксплантов. Крахмалы *su<sub>1</sub>* (содержание амилозы – 35 %) и *ix* (содержание амилопектина – более 90 %) оказались непригодными для использования в качестве гелеобразователей питательных сред.

Анализ результатов культивирования пыльников *in vitro* свидетельствует о том, что у линии андрогенного происхождения ДГ00-126, обладающей высокой способностью к андрогенезу *in vitro*, на среде с *ae*-крахмалом (Патент 34859 Украина) частота регенерации нормально пигментированных растений составила 52,5 %, в то время, как в контроле этот показатель был на уровне 31,3 %. Высокие показатели гаплопродукции были получены и при замене агар-агара *su<sub>2</sub>*-крахмалом. В частности, у линии ДГ00-126 выход зеленых растений увеличился с 25,6 % до 53,4 %. У сорта Феникс, которому присуща низкая способность к андрогенезу *in vitro*, было достигнуто возрастание частоты регенерации с 0,6 % до 15,8 %. Апробация инновационной разработки – замены агар-агара *su<sub>2</sub>*-крахмалом (Патент 42192 Украина) – на гибридном селекционном материале подтвердила ее эффективность. Так, при использовании среды с крахмалом отмечено увеличение среднего количества морфогенных пыльников с (19,6 ± 0,9) % до (27,0 ± 0,9) % и средней частоты регенерации растений с (5,9 ± 0,5) % до (14,8 ± 0,7) %.

Таким образом, в результате изучения структурно-механических свойств гелей, полученных из зерновых крахмалов кукурузы с различным содержанием амилозы и амилопектина, отобраны препараты мутантных по генам структуры эндосперма форм *ae* и *su<sub>2</sub>*. Впервые дана характеристика морфогенетического эффекта этих крахмалов в культуре пыльников *in vitro* ячменя ярового. Наличие мутаций ортоголических генов структуры эндосперма у других видов растений позволяет сделать предположение о возможности выявления новых перспективных гелеобразователей питательных сред для культивирования растительных и микробиологических объектов.

**STARCHES POSSESSING DIFFERENT CONTENT OF AMILOSE AND  
AMILOPECTINE AS COMPONENTS OF NUTRIENT MEDIUM FOR BARLEY  
HAPLOID PRODUCTION IN ANTHHER CULTURE IN VITRO**

**Belinskaya E.V., Tymchuk S.V., Derebizova O. Y.**

Yurjev Plant Production Institute of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 142 Moskovsky av., Kharkiv, 61060, Ukraine,  
fax: +38 (572) 779-84-17, phone: +380 (057) 392-13-43, e-mail: bilinska@ukr.net

Haploid production technologies based on the induction of microspore sporophytic development in anther culture in vitro allow substantially accelerate a homozygous line creation. However the expediency of application of these techniques in plant breeding depends on the possibility to ensure a mass character of morphogenetic structure induction and plant regeneration. Consequently a search for the new approaches to increase anther culture regeneration potential together with the maximum reduction of haploid production genotypic dependence is considered to be an actual task of a modern biotechnology.

The aim of this investigation was to evaluate the efficiency of embryo production and plant regeneration promotion in spring barley anther culture in vitro via agar substitution in the inductive medium for corn starches with the different amylose content.

Three model genotypes with a contrast androgenetic capacity and five F<sub>3</sub> hybrid populations were used as an initial material. Both the inductive medium NMSmod.2 (control variant) and the regeneration medium were containing 0.8 % agar “Difco” (USA). Corn starches obtained from the seeds of lines which were the carries of endosperm structure mutations *ae*, *wx*, *su<sub>1</sub>* u *su<sub>2</sub>* were added to the experimental variants of a medium.

Investigation on a gelling capacity has shown that corn starches with a high amylose content obtained from the seeds of lines which were the carries of genes *ae* and *su<sub>2</sub>* (amylose content – 65 % and 35 % respectively) formed gels with the density sufficient for explant inoculation. The starches of *su<sub>1</sub>* type (35 % amylose content) and *wx* type (more than 90 % amylopectin content) were appeared to be unsuitable for use as gelling components of nutrient media.

Analysis of the obtained data concerning anther cultivation in vitro has shown that a green plant regeneration frequency in a high responsive line DH00-126 which has androgenetic origin was 52.5 % on the medium containing *ae*-starch (Patent 34859 Ukraine) while in the control variant this trait was at a level of 31.3 % (LSD<sub>05</sub>=7.1). High values of haploid production traits were also obtained when agar was substituted for *su<sub>2</sub>*-starch. Particularly green plant yield has increased from 25.6 % to 53.4 % (LSD<sub>05</sub>=6.6) in line DH00-126. In this experiment it has been reached an increasing of a green plant regeneration frequency from 0.6 % to 15.8 % in spring barley cultivar Fenix possessing a low androgenetic capacity.

Test of the agar substitution for *su<sub>2</sub>*-starch as innovative elaboration (Patent 42192 Ukraine) in a breeding material has proved its efficiency. In particular it has been noted an arising of a morphogenic anther mean number from (19.6 ± 0.9) % to (14.8 ± 0.7) %. The mean frequency of plant regeneration has also increased from (5.9 ± 0.6) % to (14.8 ± 0.7) %.

Thus preparations of corn starches obtained from genotypes which were *ae* and *su<sub>2</sub>* endosperm structure mutant forms have been selected on the base of the study on structural and mechanical properties of the gels made of starches with a different amylose and amylopectin content. At the first time a morphogenetic effect of these starches in spring barley anther culture in vitro has been characterized. The existence of orthological endosperm structure gene mutations in other plant species allows make a supposition about the possibility to reveal new perspective gelling agents of nutrient media for cultivation of plant and microbiological objects.

**ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ ИНДУКЦИИ И  
ДЛИТЕЛЬНОГО ПОДДЕРЖАНИЯ ТОТИПОТЕНТНОСТИ IN VITRO У  
ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВ  
Бишимбаева Н.К.**

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» МОН РК, г. Алматы, ул. Тимирязева, 45,  
тел./факс: 8(727)3947562, e-mail: gen\_jan@mail.ru

Принципиально важным моментом в изучении процесса соматического эмбриогенеза является изучение самых ранних его этапов. При этом важно выяснить не только сигналы и индукторы этого процесса, но и механизмы, заставляющие дифференцированную клетку *in vitro* переключаться на другой путь развития (Бутенко, 1999). Длительно культивируемые рыхлые эмбрионные каллусы являются удобными модельными системами для изучения этих вопросов, так как они имеют одноклеточное происхождение эмбриоидов и являются отзывчивыми к регуляции морфогенеза при помощи фитогормонов и трофических факторов.

Методами световой и электронной микроскопии проведено исследование влияния фитогормонов на состав клеточных популяций длительно культивируемых рыхлых эмбрионных (РЭ) каллусов пшеницы и ячменя в сравнении с неэмбрионными тканями различной морфологии (рыхлые и плотные). В результате, нами выявлены особенности эмбрионных каллусов, резко отличающие их от неэмбрионных тканей: наличие клеток с признаками программированной клеточной смерти (ПКС), накопление густой сети полисахаридов в межклеточном пространстве, обособление сферических эмбрионно-компетентных клеток, имеющих каллозную оболочку. Показано, что возрастные пропорции клеток с признаками ПКС в РЭ тканях под действием 2,4-Д сопровождается усилением накопления экстрацеллюлярных полисахаридов (ЭПС), стимуляцией роста и эмбрионного потенциала каллусов. Методами цитохимии и гистохимии обнаружено, что клетки с признаками ПКС в процессе гибели секретируют внеклеточные вещества полисахаридной природы. При помощи биотестов *in vivo* и *in vitro* установлено, что отдельные фракции секретируемых ЭПС обладают антиауксиновой активностью, т.е. ингибируют рост клеток растяжением, стимулируемый 2,4-Д; повышают устойчивость растений к стрессам; приводят к обособлению клеток каллуса при помощи каллозной оболочки и перепрограммированию их на эмбрионный путь развития; стимулируют рост каллусных тканей.

На основании проведенных исследований разработана концепция о цитофизиологических закономерностях, лежащих в основе индукции и длительного поддержания тотипотентности в культуре тканей зерновых злаков. Предложена гипотетическая схема, демонстрирующая цикличность процессов инициации и дезинтеграции соматических эмбриоидов (СЭ) в длительно тотипотентных эмбрионных каллусах. Согласно этой схеме последовательность событий, запускаемых фитогормоном 2,4-Д, представляется следующей. Высокие концентрации 2,4-Д (5,0-7,0 мг/л) оказывают стрессовое действие на клетки каллусных тканей, блокируя процесс дифференциации 2-х, 3-х, 4-х клеточных проэмбрио и вызывая их дезинтеграцию и гибель клеток. При этом эмбриоиды распадаются на клетки с признаками ПКС и одиночные эмбрионно-компетентные клетки, вновь вступающие на путь эмбриогенеза. Иницированные проэмбрио также могут вновь диссоциировать по пути ПКС с образованием эмбрионных клеток. Таким образом в ходе многократного субкультивирования каллусов поддерживается их эмбрионный потенциал. При снижении концентрации 2,4-Д до 1,0 мг/л стрессовое действие фитогормона снижается, гибели клеток не происходит, и СЭ имеют возможность к нормальному развитию и дифференциации вплоть до формирования целого растения. В целом, нами показана важная роль ПКС и секретируемых в ходе гибели клеток полисахаридов в переключении клеток каллусов на эмбрионный путь развития, в поддержании пула эмбрионно компетентных клеток при субкультивировании, в регуляции формы и размеров клеток, а также процессов дифференциации СЭ и роста каллусных тканей.

**INVESTIGATION OF CELL MECHANISMS OF THE INDUCTION AND LONG-TERM MAINTENANCE OF CEREALS' TOTIPOTENCY IN VITRO****Bishimbayeva N.K.**

Republican State Enterprise "Institute of Plant Biology and Biotechnology" Almaty, Timiryazevstreet, 45,  
tel./fax: 8 (727) 3947562, e-mail: gen\_jan@mail.ru

The key moment in the investigation of somatic embryogenesis process is study of its very early stages. It is crucial to clarify not only the signals and inductors of this process, but also the mechanisms that force differentiated cell in vitro to switch over to other developmental pathway (Butenko, 1999). Because the long-term cultivated friable embryogenic (FE) calli have a single cell origin of embryoids and appeared to be a very responsive to morphogenesis regulations by phytohormones and trophic factors, they have become a very useful model systems for investigation of these issues. Effect of phytohormones on the composition of cell populations of wheat and barley long-term FE calli, compared to friable and compact non-embryogenic tissues, have been investigated in this work by the methods of light and electron microscopy. As a result, we found the distinct features of embryogenic tissues in comparison non-embryogenic: the presence of cells with signs of programmed cell death (PCD), accumulation of dense net polysaccharides in the intercellular space, separation of spherical embryogenic competent cells covered by callose envelope. It has been shown, that the increase of the proportion of cells with signs of PCD in FE tissues under the effect of 2,4-D is accompanied by enhanced accumulation of extracellular polysaccharides (EPS) as well as by the stimulation of calli's growth and embryogenic potential. As it has been determined by cytochemical and histochemical methods, cells with signs of PCD secrete polysaccharide extracellular substances during the course of death. Bioassays in vitro and in vivo revealed that fractions of secreted EPS have auxin activity, i.e. they inhibit the growth of cells by elongation, stimulated by 2,4-D; increase the stress tolerance of plants; cause separation of callus cells by means of callose envelope and their reprogramming into the embryoidogenic developmental pathway; stimulate the growth of callus tissues.

On the basis of fulfilled research, we developed the concept of cytophysiological regularities underlying the induction and long-term maintenance of totipotency in cereals tissue culture. We suggest hypothetical scheme, that demonstrates the cycle of initiation and desintegration processes of somatic embryoids in the long-term totipotent embryogenic calli. According to this scheme, the sequence of events, caused by 2,4-D, is the following. High concentrations of 2,4-D (5,0-7,0 mg/l) effect on callus cells as strong stress factors, blocking differentiation processes of two-, three- and four- celled proembryos, causing their desintegration. During this process embryoids are destructed into the cells with signs of PCD and single competent cells, that again enter the path of embryoidogenesis. Initiated proembryos also are capable to dissociate through the PCD process with the formation of spherical competent cells. By this way embryogenic potential of calli is constantly maintained during multiple subcultivations. The decrease of 2,4-D concentration up to 1,0 mg/l diminishes stressful influence of phytohormone, and cell death does not occur. Somatic embryoids are able in this case to normal development and differentiation with the formation of the whole plant. On the whole, we have shown the important role of PCD and polysaccharides secreted during cell death in the switching over of callus cells to the embryoidogenic developmental pathway, in the maintenance of embryogenic competent cells' pool, in the regulation of cells' shape and size as well as in the regulation of embryoid's differentiation and callus tissues' growth.

## ПРЕОДОЛЕНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ *IN VITRO* У ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВ

Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Карабаев М.К., Рахимбаев И.Р.

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» МОН РК, г. Алматы, ул. Тимирязева, 45, тел./факс: 8(727)3947562, e-mail: gen\_jan@mail.ru

Основными препятствиями, лимитирующими разработку клеточных технологий для зерновых злаков являются высокая зависимость регенерационной способности *in vitro* от генотипа и потеря ее при длительном субкультивировании. Последнее связано с морфологической гетерогенностью и нестабильностью морфологии каллусных тканей злаков. Несмотря на то, что во многих исследованиях разработаны пути активации соматического эмбриогенеза и регенерации растений, до сих пор не выработаны общие методологические подходы к регуляции морфогенеза у *in vitro* у зерновых злаков. Вследствие этого, для каждого вида и даже сорта условия регенерации долгое время приходилось подбирать эмпирически.

Нами проведен цикл исследований по изучению морфологической гетерогенности и метаморфоза в ходе многократного субкультивирования каллусных тканей пшеницы и ячменя. Проведена классификация каллусных тканей на морфотипы, изучено их гистологическое строение, метаморфоз и способность к регенерации при многократном субкультивировании на питательных средах различного состава.

В результате, выявлены универсальные для различных генотипов и стабильные при субкультивировании типы каллусов, клетки которых обладают свойством морфогенетической пластичности или полипотентности; изменяя состав питательной среды, из них можно индуцировать различные типы морфогенеза, в том числе, соматический эмбриогенез. Это позволяет, в свете современных представлений, провести аналогию между клетками универсального стабильного типа каллуса и стволовыми клетками.

На этой основе нами разработан подход к решению важной проблемы в области биотехнологии растений - преодолению генотипической зависимости процесса длительной регенерации растений *in vitro*, заключающийся в отборе универсальных для различных генотипов меристематически активных каллусов, которые под действием 2,4-Д и стресса могут проявлять одну и ту же морфогенетическую реакцию у разных генотипов – подвергаться метаморфозу с образованием эмбриогенных тканей, потенциально способных к длительному сохранению способности к регенерации растений. При этом, различия в морфогенетических реакциях *in vitro* между генотипами нивелируются. Выяснены процессы клеточной дифференцировки, происходящие в ходе метаморфоза: под действием стресса происходят ингибирование клеточных делений, разрыв межклеточных связей, гибель клеток по пути запрограммированной клеточной смерти (ПКС), усиленная секреция внеклеточных веществ, обособление и перепрограммирование клеток на путь эмбриогенеза. После удаления стресса происходит активация клеточных делений, активная пролиферация эмбриогенных клеточных комплексов, инициация и дифференциация эмбрионидов из перепрограммированных компетентных клеток вплоть до регенерации целых растений.

В результате этих фундаментальных исследований нами разработана генотип-независимая технология длительной регенерации растений в культуре тканей пшеницы и ячменя, которая в настоящее время успешно используется для улучшения коммерчески важных сортов Казахстана.

**OVERCOMING THE GENOTYPE-DEPENDENCE OF PLANT  
REGENERATION IN VITRO FOR CEREALS****Bishimbayeva N.K., Amirova A.K., Karabayev M.K., Rakhimbayev I.R.**

Republican State Enterprises "Institute of Plant Biology and Biotechnology" Almaty, Timiryazeva street, 45, tel./fax: 8 (727) 3947562, e-mail: gen\_jan@mail.ru

The high genotype dependence of regeneration capability in vitro and the loss of regeneration capability during long-term subcultivation are the main obstacles that limit the development of cell technologies for cereals. This is due to morphological heterogeneity and instability of callus tissue's morphology in cereals. Despite the development of somatic embryogenesis and plant regeneration activation pathways in various research works, there are no sufficient common methodological approaches of morphogenesis in vitro has been developed in cereals. Consequently, there was the need to select regeneration conditions empirically for each variety and even for an every cultivar.

We have conducted research on morphological heterogeneity and metamorphosis during multiple subcultivations of wheat and barley callus tissues. We classified callus tissues on morphotypes with the investigation of their histological structure, methamorphosis and capability to regeneration during long-term subcultivation on mediums with various composition.

In the result, we identified universal for various genotypes and stable during subcultivation callus type, which contain morphogenetically plastic or polypotent cells; changes in media composition could lead to the induction of different types of morphogenesis from these cells, including somatic embryogenesis. Considering recent understandings, this allows to assume analogy between the cells of universal stable callus type and stem cells.

On this basis we developed an approach to solve an important problem in the area of plant biotechnology – overcoming genotype dependence of long-term regeneration process in vitro. This approach means the selection of meristematically active calli universal for different genotypes, that under the impact of 2,4-D and stress can display the same morphogenetic reaction for all genotypes– undergoing the methamorphosis with generation of embryogenic tissues potentially capable to maintain long-term regeneration capacity. At the same time, differences in morphogenetic reactions in vitro between the genotypes are eliminated. Processes of cells differentiation during methamorphosis have been revealed in this work: stress causes inhibition of cell division, disruption of intercellular connections, death of cells by means of programmed cell death, increased secretion of extracellular substances, isolation and reprogramming of competent cells on the pathway of embryoidogenesis. After the stress elimination we observed activation of cell divisions, active proliferation of embryogenic cell complexes, initiation and differentiation of embryoids from reprogrammed competent cells up to the regeneration of the whole plants.

As a result of this fundamental research, genotype-independent long-term regeneration technology in cereal tissue culture have been developed and is successfully being used for the improvement of commercially valuable varieties of Kazakhstan.

**ИЗУЧЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ АДВЕНТИВНЫХ ПОБЕГОВ ИЗ КАЛЛУСА ПЕРСИКА****Вагапова Т.И.<sup>1,2</sup>, Сидорова Т.Н.<sup>2</sup>, Долгов С.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Пушкинский государственный естественно-научный институт; Пушкино, Московская область, 142290, проспект Науки, дом 3, тел. (4967) 73-25-38, e-mail: [tatya38@yandex.ru](mailto:tatya38@yandex.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Московская область, 142290, проспект Науки, дом 6, тел. (4967) 73-17-79, e-mail: [sidorovat@rambler.ru](mailto:sidorovat@rambler.ru)

Персик (*Prunus persica* L. Batsch) – одна из самых ценных плодовых культур. Плоды персиков потребляются в свежем виде и используются в производстве сухофруктов, консервов, джемов, сиропов, соков. В настоящее время наблюдается снижение урожайности персика, так как данная культура в значительной степени подвержена влиянию различного рода неблагоприятных факторов (подмерзание, грибные и вирусные заболевания). Повышение урожайности персика за счет повышения устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам, в том числе и к наиболее опасному патогену косточковых плодовых культур – вирусу оспы сливы (Plum Pox Virus, PPV), способствовало бы увеличению производства плодов. Применение традиционных методов селекции для получения сортов, устойчивых к вирусам, является низкоэффективным, поскольку отсутствуют природные доноры устойчивости. Из наиболее приемлемых выходов из данной ситуации является использование современных методов генной инженерии, которые дают возможность значительно ускорить процессы создания устойчивых высокопродуктивных сортов персика. Более того в настоящее время с помощью методов генной инженерии можно получать генетически модифицированные растения, которые не содержат нежелательные чужеродные последовательности ДНК (например, гены селективных и репортерных маркеров).

Получение морфогенного каллуса и последующая регенерация растений являются важными и неотъемлемыми этапами при создании трансгенных сортов косточковых культур. Однако отсутствие надежных методик, способных обеспечить достаточно высокую частоту регенерации побегов из соматических тканей коммерческих сортов персика, является главным препятствием при создании трансгенных растений персика.

Целью нашей работы являлся подбор состава питательных сред и длительности культивирования, позволяющие индуцировать образование морфогенного каллуса на растениях-донорах каллуса и последующую регенерацию побегов из каллусов двух подвоев персика «Bailey», «Nemaguard». Индукцию каллусообразования осуществляли на питательных средах MS и LP с добавлением 6-БАП и ИМК в три этапа. Образовавшийся каллус помещали на среду регенерации, содержащую минеральные соли MS и регуляторы роста (6-БАП-2 мг/л и НУК-1 мг/л). Регенерацию из каллусов наблюдали три месяца. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что минеральный состав среды оказывает существенное влияние на индукцию образования морфогенного каллуса и адвентивную регенерацию. Культивирование растений-доноров на среде MS приводит к образованию морфогенного каллуса, способного регенерировать побеги с большей частотой. Для более эффективной регенерации предпочтительней культивирование растений-доноров на среде индукции в течение двух – трех месяцев.

**RESEARCH OF ADVENTITIOUS SHOOTS FORMATION FROM CALLUS OF PEACH****Vagapova T.I.<sup>1,2</sup>, Sidorova T.N.<sup>2</sup>, Dolgov S.V.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290, Prospect of Science, 3, tel. (4967) 73-25-38, e-mail: [tatya38@yandex.ru](mailto:tatya38@yandex.ru)

<sup>2</sup>Federal State Institution of Science Branch of Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290, Prospect of Science, 6, tel. (4967) 73-17-79, e-mail: [sidorovat@rambler.ru](mailto:sidorovat@rambler.ru)

Peach (*Prunus persica* L. Batsch) is one of the most valuable fruits. Peach fruits are consumed fresh and used in the production of dried fruit, canned goods, jam and juice. There is currently decrease of the yield of peach, as the peach is heavily influenced by various unfavorable factors (freezing, fungal and viral diseases). Rise of the peach yields by increasing peach resistance to biotic and abiotic stress factors including the most dangerous pathogens of stone fruit trees - Plum Pox Virus (PPV) would promote increase the production of fruits. Application of conventional breeding for improvement of the cultivars which will be resistant to various unfavorable factors is low effective as there are not natural resistance donors. The most acceptable way of the solution of this problem is application of modern genetic methods that enable significantly accelerate the development of resistant high-yield varieties of the peach. Moreover nowadays using genetic methods we could receive genetically modified plants which do not contain undesirable alien DNA sequences (e.g., reporter genes and selective markers).

Induction of morphogenic callus and the subsequent regeneration of plants are important and integral steps in development transgenic varieties of stone fruit. However lack of the reliable methods capable to provide rather high frequency of shoot regeneration of from mature tissues of the peach is the main obstacle to development of transgenic peach plants.

The aim of our work was improvement of culture conditions for cultivation of donor plants of peach rootstocks “Nemaguard” and “Bailey” and induction of morphogenic callus. Callus induction was made on culture media MS and LP with the addition of 6-BAP and IBA for one, two and three months. Formed callus was placed on regeneration medium containing MS mineral salts and growth regulators (BA-2 mg/l, NAA-1 mg/l). Regeneration from callus was observed during three months. The obtained data allowed to make a conclusion that the mineral composition of the medium had a significant effect on the induction of morphogenic callus and adventitious regeneration. The cultivation of donor plants on MS medium resulted in formation of morphogenic callus capable to regenerate shoots with high frequency. The cultivation of donor plants on the induction medium for two or three months was preferred for more efficient regeneration of plants than one month.



## ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ С РАЗНЫМ ТИПОМ И УРОВНЕМ ФОРМИРОВАНИЯ НЕРЕДУЦИРОВАННОЙ ПЫЛЬЦЫ

Воронкова Е.В., Жарич В.М., Ермишин А.П.

Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ГНУ ИГиЦ НАНБ), Минск, 220072, ул. Академическая, 27,  
Факс: (37517) 284-19-17, тел. (37517) 263-53-26, e-mail: E.Voronkova@igc.bas-net.by

В селекции растений метод культуры пыльников обычно используют для снижения уровня плоидности исходного материала. Однако для культурного картофеля характерно формирование в большом количестве наряду с диплоидными также и тетраплоидных растений-регенерантов. Эти тетраплоидные регенеранты могут представлять интерес для селекции [Воронкова, 1999; Воронкова и др., 2004]. Гаметоклональная изменчивость растений-регенерантов в культуре *in vitro* пыльников значительно превосходит изменчивость растений-регенерантов, полученных в культуре соматических клеток (сомаклональную изменчивость), поскольку основным механизмом ее возникновения является не мутационный процесс, а рекомбинация генов в мейозе при образовании мужских половых гамет. Недостатком этого способа селекции картофеля является то, что у большинства сортов картофеля тетраплоидные растения-регенераты, полученные в культуре пыльников, существенно уступают исходному сорту по показателям продуктивности из-за повышения гомозиготности (они являются удвоенными дигаплоидами). Сохранение высокого уровня гетерозиготности андрорегенератов возможно при морфогенезе из нередуцированных пыльцевых зерен FDR (FDR-first division restitution: восстановление плоидности по типу первого деления мейоза, связанное с наличием мутации *fs*-слияние веретен) или SDR (SDR-second division restitution: восстановления плоидности по типу второго деления мейоза, связанное с наличием мутации *pc*-преждевременный цитокинез)-типа. Целью настоящего исследования было изучить, каким образом наличие, тип и частота мейотических мутаций в формирующейся пыльце влияют на уровень андрогенетического потенциала сортов картофеля.

Определяли частоту каллюсообразования в культуре пыльников и частоту регенерации побегов из пыльцевого каллюса в культуре пыльников 11 сортов картофеля с разной частотой и типом формирования нередуцированных гамет. Сорта Верас, Нептун, Прамень не формировали нередуцированные гаметы. Сорт Блакит имел низкий уровень (до 5 %) формирования диад FDR-типа, сорта Луговской, Adora, Aula и Anosta имели средний (от 5 до 20%), а сорта Дубрава, Лазурит и Загадка Питера – высокий (от 43,5% у сорта Дубрава до 85,6% у сорта Загадка Питера) уровень этого признака. У сорта Загадка Питера наблюдали формирование 2n-пыльцы преимущественно FDR-типа, у сорта Дубрава – преимущественно SDR-типа. У сорта Лазурит диады обоих типов были представлены примерно в равной пропорции.

В результате проведенных исследований установлено, что частота образования диад и тип мейотических мутаций у растений-доноров пыльников не оказывали существенного влияния на частоту каллюсообразования (она колебалась от 4,35% до 60,7%). С одной стороны, минимальный по опыту выход каллюса в культуре пыльников был отмечен у сорта Прамень, не образующего нередуцированную пыльцу. С другой стороны, низкий уровень каллюсообразования (около 13%) также был у сорта Лазурит, для которого характерна высокая частота мейотических мутаций одновременно нескольких типов. По-видимому, более значимую роль при пыльцевом морфогенезе играет уровень жизнеспособности пыльцы и доля в ней эмбриогенных пыльцевых зерен. Несмотря на то, что более высокая регенерационная активность наблюдалась у сортов, не формирующих нередуцированную пыльцу, или формирующих ее с невысокой частотой, нами не было выявлено четкой зависимости между этими двумя явлениями.

**PECULARITIES OF MORPHOGENESIS IN ANTHR CULTURE OF POTATO VARIETIES WITH DIFFERENT TYPE AND LEVEL OF UNREDUCED POLLEN PRODUCTION**

**Voronkova E.V., Zharich V.M., Yermishin A.P.**

Institute of Genetics and Cytology of Belorussian National Academy of Science (SSO IGC NAS of Belarus), Minsk, Akademicheskaja st., 27,  
Fax: (37517) 284-19-17, tel. (37517) 263-53-26, e-mail: E.Voronkova@igc.bas-net.by

Anther culture technique is usually used in breeding for the purposes of reducing ploidy level of initial material. Nevertheless, it is characteristic for potato that tetraploid regenerants are produced along with diploid ones in anther culture. These tetraploid regenerants may be interesting for breeding [Voronkova 1999; Voronkova et al. 2004]. Gametoclonal variability of plants regenerated in anther culture well exceeds variability of regenerants produced in somatic tissue culture (somaclonal variability), as far as the main mechanism of its origin is not mutation process, but gene recombination in meiosis during male gamete development. The shortcoming of this breeding technology is that tetraploid plants regenerated in anther culture of majority of potato varieties are inferior in productivity of initial plants because of rise in homozygosity (they are doubled dihaploids). Prevention of high level of heterozygosity in regenerants is possible if they are originated from FDR- or SDR unreduced pollen grains (FDR – first division restitution, it is associated with meiotic mutation *fs* – fusion of spindles; SDR – second division restitution due to mutation *pc* – premature cytokinesis). The aim of the present work was to study whether the presence, type and frequency of meiotic mutations in developing pollen have an influence on the level of androgenic ability of potato varieties.

There were determined the frequency of callus formation and plantlet regeneration in anther culture of 11 potato varieties having different type and frequency of unreduced gamete formation. Varieties Veras, Neptun and Pramen did not produce 2n-pollen. The variety Blakit had low level (less than 5%) of FDR-dyad formation, varieties Lugovskoi, Adora, Aula and Anosta had medium (5 to 20%), and varieties Dubrava, Lazurit and Zagadka Pitera – high (from 43.5% in Dubrava to 85.6% in Zagadka Pitera) level of this character. We observed mainly FDR 2n-pollen formation in variety Zagadka Pitera, and predominantly SDR 2n-pollen in variety Dubrava. Dyads of both types (FDR and SDR) were presented in approximately equal frequencies in Lazurit variety.

As the result of the study it has been revealed that frequency of dyad formation and type of meiotic mutation in anther donor plants did not have a significant influence on frequency of callus formation (it varied from 4.4% to 60.7%). On the one hand, minimal in the experiment frequency of callus formation in anther culture was registered in variety Pramen which did not produce unreduced pollen. On the other hand, variety Lazurit which was characterized by high frequency of meiotic mutations of different types had low level of callus formation (about 13%) as well. Probably, the level of pollen viability and proportion of embryogenic grains in pollen play more important role in microspore morphogenesis. We did not reveal clear dependence between regeneration ability of potato varieties and unreduced gamete formation regardless of the fact that varieties, which did not produce 2n-pollen or produced it with low frequency, highlighted, in general, by better plantlet regeneration from callus.

**СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ МЕГАГАМЕТОФИТОВ И  
ЗИГОТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ *PINUS SIBIRICA*****Ворошилова Е.В.<sup>1</sup>, Третьякова И.Н.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования Сибирский федеральный университет, 660041 Красноярск, пр-т Свободный 79, Тел. (391) 291-29-42; e-mail: bretill@mail.ru

<sup>2</sup>Учреждение российской академии наук Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, 660036 Красноярск, Академгородок 50, стр. 28. Тел. (391)249-46-25; Факс: (391) 243-36-86; e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Для проведения работ по микроклональному размножению в культуре *in vitro* использовали зиготические зародыши и мегагаметофиты кедра сибирского, произрастающего на клоновой прививочной плантации Западно-Саянского ОЛХ. Экспланты вводили в культуру на стадии неразвитого зародыша - кливажа и инициации семядолей (начало июля).

Культивирование проводили на среде 1/2LV с регуляторами роста 2,4-Д (9µM) и 6-БАП (4,5µM), дополненной сахарозой (30 г/л), глутамином (1 г/л), казеином (0,5 г/л), мезоинозитом (0,1 г/л) и аскорбиновой кислотой (0,3 г/л).

В культуре мегагаметофитов через 7-10сут. культивирования в коррозионной полости вдоль продольной оси наблюдалось образование каллуса. Ядра длинных вакуолизованных клеток, из которых состоял каллус, делились, и формировался четырехядерный ценоцит. Далее образовавшиеся четыре ядра мигрировали к одному из полюсов клетки, где формировались инициальные клетки, которые затем образовывали глобулы эмбриоидов и суспензоры.

В культуре зиготических зародышей на 4-8сут культивирования формирование каллуса происходило в области зародышевого корешка. Через 30сут культивирования каллус нарастал по всей длине гипокотыля. Образовавшийся каллус состоял из вытянутых вакуолизованных эмбриональных трубок, в которых на пролиферационной среде происходило асимметричное деление, с последующим формированием эмбриональных глобул и эмбриональных трубок. В формирующейся эмбрионально-суспензорной массе происходило выделение соматических зародышей.

Таким образом, было показано, что процесс образования соматических зародышей в культуре мегагаметофитов и культуре зиготических зародышей отличается: в культуре мегагаметофитов образование соматических зародышей идет через стадию ценоцита, миграцию ядер к полюсу клетки и формирование инициальных клеток и глобул соматических зародышей; в культуре зиготических зародышей идет удлинение клеток эксплантов и их асимметричное деление, так же, как у зародышей, образующихся естественным путем.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-00281*

**SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION IN SIBERIAN PINE  
MEGAGAMETOPHYTE AND ZYGOTIC EMBRYOS CULTURES****Voroshilova<sup>1</sup> E., Tretyakova<sup>2</sup> I.**

<sup>1</sup> Siberian Federal University, 660041 Krasnoyarsk, Svobodny 79, tel. (391) 291-29-42; e-mail: [breitill@mail.ru](mailto:breitill@mail.ru) <sup>2</sup> V. N. Sukachev Institute of Forest, 660036 Krasnoyarsk, Academgorodok 50, 28; tel. (391)249-46-25; fax: (391) 243-36-86; e-mail: [culture@ksc.krasn.ru](mailto:culture@ksc.krasn.ru)

Induction of embryogenic callus and somatic embryos was attempted using Siberian pine (*Pinus sibirica*) megagametophyte and zygotic embryos cultures. Megagametophytes and zygotic embryos at the cleavage and globular embryo stages, 3-4 weeks after egg cell fertilization, served as explants. Culturing was done on 1/2LV medium added by 2,4-D (9 μM) and 6-BAP (4.5 μM) growth regulators, 30 g/l sucrose, 1 g/l glutamine, 0.5 g/l casein, 0.1 g/l mesoinositol, and 0.3 g/l ascorbic acid.

After 7-10 days of megagametophytes culturing, callus began to form along the megagametophyte axes in corrosion cavities. A cytological analysis of megagametophyte culture revealed that cells elongation set on along the longitudinal megagametophyte axes on the culturing days 7-10. By the end of the first month of culturing the calluses formed were completely composed of elongated vacuolated cells each containing 2-4 conspicuous nuclei. The 4 nuclei migrated toward either cell pole, where later embryoid initial cell formation occurred. The initials divided to form aggregates, which then made up somatic embryoid globules. The cells of the lower globule parts grew longer and formed suspensors, each composed of a bunch of 6-7 long, vacuolated cells. After the embryogenic calluses had been cultured on a proliferation medium with lower contents of 6-BAP (2.2 μM) and sucrose (20 g/l) 2-month, cenocysts with 2-4 nuclei in the appeared in suspensor edge cells. The nuclei in cenocytes migrated to the distal suspensor end, where formation of initials and somatic embryos then took place.

After 4-8 days zygotic embryos culturing, callus formed in the area of embryonic root. In the zygotic embryos culture elongated embryonal tubes formed. Embryonic tube asymmetrically divided into proliferation medium. Embryonic globules and suspensors formed. Formation of somatic embryos occurred.

Thus it was shown that formation of somatic embryoids in megagametophyte culture and zygotic embryo culture is different. In the zygotic embryos culture, cells elongated and asymmetrically divided, like in vivo. In the megagametophyte culture, coenocytes formed, nuclei migrated toward either cell pole, where formation of initial cells and somatic embryoids globules occurred.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ ДЛЯ ЗАКРЕПЛЕНИЯ ГЕТЕРОЗИСНОГО ЭФФЕКТА У ГИБРИДОВ РИСА

Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М., Бушман Н.Ю.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт риса Российской академии сельскохозяйственных наук, , 350921, Россия, Краснодар, п. Белозерный, ГНУВНИИ риса , факс: (8612) 29-49-91, тел. 918 6295299, e-mail: [serggontchar@mail.ru](mailto:serggontchar@mail.ru)

Повысить урожайность риса на данном этапе методами традиционной селекции не представляется возможным, так как во всем мире отмечено снижение эффективности селекционной работы. Потенциал продуктивности новых сортов, несмотря на увеличение устойчивости к стрессам и повышение качества, остается на уровне сортов созданных еще в 1960-е годы. Только использование гетерозисного эффекта дает возможность радикально, более чем на 50 %, поднять продуктивность.

Однако в мире до сих пор не предложено реализованных подходов к закреплению гетерозиса гибридов в последующих поколениях, или другими словами фиксации комплекса генов определяющих гетерозисный эффект. Методы решения данной проблемы, предложенные академиком Струнниковым В.А. испытаны и модифицированы во ВНИИ риса.

Гетерозис возникает при гибридизации особей, в генотипах которых сформировались комплексы генов повышающих жизнеспособность. Такие комплексы генов формируются у родительских форм в противовес наличию леталей и полuletалей в генотипе. Следовательно, гетерозисный гибрид должен нести гены снижающие жизнеспособность. Удалить эти гены из генотипа гибрида можно за счет рекомбинации. Сам процесс мы контролировать не можем, но в условиях стресса (в нашем случае культуры пыльников) выживает только та часть потомства гибрида, которая унаследовала от него большую часть благоприятных генов. Так как гомозиготные организмы, в генотипе которых содержится много леталей, полuletалей и субвитаблей в подавляющем большинстве погибают на ранних стадиях развития. Выживают только те особи, которым в результате мейоза не досталось, или досталось очень мало вредных генов. В случае выживания таких особей их легко удалить из популяции за счет их низкой жизнеспособности или продуктивности. При этом комплекс генов определяющих гетерозис распределяется по популяции дигаплоидных линий. Для создания сорта с продуктивностью аналогичной гетерозисному гибриду задачей селекционера становится объединение лучших аллелей в одном генотипе с использованием молекулярного маркирования. Ранее мы показали селективную элиминацию аллелей в культуре пыльников на организменном уровне, и на популяции дигаплоидных линий на молекулярном уровне, что подтверждает возможность использования культуры пыльников для удаления генов снижающих жизнеспособность и продуктивность из генотипа гетерозисного гибрида. По разработанному нами методикам возможно получение сортов с урожайностью исходного гибрида в течение 3-4 лет, что позволит увеличить потенциал продуктивности культуры на 20-50% и в короткие сроки создать сорта риса с урожайностью 12-15 т/га.

Для успешного массового применения методики закрепления гетерозиса необходимо дальнейшее совершенствование методов получения дигаплоидов, значительное сокращение периода до высадки пыльников на среду до получения регенерантов, а также получение большого процента регенерации зеленых почек и растений в каждой гибридной комбинации.

**USE OF ANTHR CULTURE FOR FASTENING HETEROSIS  
EFFECT OF RICE HYBRIDS****Goncharova J.K., Haritonov E.M., Bushman N.Y.**

The state scientific institution the All-Russian scientific rice research institute of the Russian academy of agricultural sciences, 350921, Russia, Krasnodar, Belozernyi , ARRI.  
Fax: (861) 229-49-91, ph. 918 6295299, e-mail: [sergogontchar@mail.ru](mailto:sergogontchar@mail.ru)

Yield potential of newly-released varieties by conventional breeding method in various regions of the world remains at the same level many years. To raise productivity of rice at the given stage by methods of traditional selection it is not obviously possible, as decrease in efficiency of selection work all over the world is noted. The new varieties productivity potential , despite of increasing of stability to stresses and improvement of quality, remains at level of varieties created in 1960th years. Only use of heterosis effect gives the chance considerably, more than on 50 % to lift productivity if crop.

However in the world till now it is not offered the realised approaches to fastening heterosis hybrids in the subsequent generations, or in other words to fixing complex of genes defining heterosis effect. Methods of decision given problem, are offered by the academician Strunnikov V. A, and was studied and modified in ARRI.

Heterotic effect appears as a result of inheritance from parents coordinated compensation complex of favourable genes, appeared as a result of screening on the base of harmful genetic and ecological factors effect. Hence heterosis hybrid should bear genes reducing viability. Problem of heterosis maintenance can be solved by means of getting hybrids without lethals and half-lethals. For cleaning hybrid genotype from decreasing viability and productivity genes, we used anther culture. For removing of these genes from a hybrid genotype it is possible to use recombination. We cannot supervise of this process, but in the conditions of stress (in our case - anther culture) , survives only that part of posterity of a hybrid which has inherited from it the most part of favorable genes. . If parental lines of hybrid carry unfavorable genes, they could only survive (and also has a good productivity) in the case that they have also a complex of favorable genes that are strong enough to compensate the effects of unfavorable gene. In hybrid, unfavorable gene must be in the recessive and we can control them through decreasing the productivity. In case of a survival individuals with unfavorable gene, it is easy to remove this plant from population because of their low viability or productivity. A complex of favorable genes from one or both parental lines provides manifestation of heterosis effect. When we receive double haploid line the complex of genes defining heterosis effect distributed on population double haploid lines.

Main task of breeder in this step - to combine best alleles of initial hybrid in one genotype by using of molecular marking . Earlier efficiency of using anther culture for cleaning of hybrid genotype from unfavorable gene was shown by us on molecular and organism level.

By the methods developed, it could be possible to develop varieties with the yield similar to the original hybrid within 3–4 years and increase the productivity potential of a crop by 20–50% and in short terms to create rice varieties with productivity 12-15 t/hectares.

For successful mass application of a technique of fastening heterosis in the further generation it is necessary to develop method of considerable decrease time of reception of double haploid line, and also obtaining more high percent of regeneration of green plants in each hybrid combination .

**ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОБЕГОВ НУТА  
*CICER ARIETINUM L. IN VITRO*  
Donskaia Maria, Suvorova Galina**

All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, p/b Streletskoye, 302502, Orel, fax: (4862)403130, phone. (4862)403224, e-mail: [galina@vniizbk.ru](mailto:galina@vniizbk.ru)

Известные исследования показывают возможность регенерации побегов нута *Cicer arietinum* L. из зародышевых осей проростков. Авторы используют различные регуляторы роста и схемы культивирования, однако информации о возможности длительного культивирования *in vitro* изолированных тканей нута недостаточно. Цель настоящих исследований заключалась в изучении влияния минерального состава и регуляторов роста на процессы регенерации побегов в изолированных эксплантах нута *in vitro*.

Материалом для исследований служили образцы нута коллекции ВИР к- 1029 (семена черные, морщинистые, тип Desi), к-1507 (семена темно-коричневые, морщинистые, тип Desi), к-1737 Красноградский 5 (семена желтые окраски, гладкие, тип Kabuli). Первичными эксплантами являлись фрагменты эпикотилей недельных стерильных проростков. Изучали 14 вариантов индукционных сред с минеральной основой MS или B5 и различающихся составом регуляторов роста с различными вариантами органических добавок. В качестве регуляторов роста использовали 6-бензиламинопурина (БАП), 2iP, индолил-3-уксусную кислоту (ИУК),  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК), индолил-3-масляную кислоту (ИМК). Содержание 6-бензиламинопурина (БАП) в средах составляло 5...20  $\mu$ M, 2iP – 10  $\mu$ M, индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) или  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК) - 0,1...1  $\mu$ M, индолил-3-масляной кислоты - 0,5  $\mu$ M. Семена нута перед проращиванием стерилизовали в течение нескольких секунд в 70% этаноле и в течение 5 минут в 0,5% или 0,25% растворе хлоргексидингликоконата натрия.

На первом этапе эксперимента результаты дисперсионного анализа выявили существенное влияние фактора генотипа как на формирование побегов *in vitro*, так и на прирост тканевой массы. Лучшие результаты получены у образца к-1507, у которого в среднем по всем вариантам опыта формировалось 4,0 побега на эксплант и прирост ткани составил 16,9 мг/сутки, у образца к-1029 среднее число побегов составило 2,6 на эксплант, и средний прирост тканевой массы 7,5 г/сутки. В целом наиболее эффективным для роста было использование 6-бензиламинопурина в сочетании с  $\alpha$ -нафтилуксусной кислотой, чем с индолилуксусной кислотой.

На втором этапе выявлено существенное преимущество минеральной основы B5 в сравнении с MS в отношении формирования побегов *in vitro*. Влияние типа цитокинина на развитие побегов было несущественным. На средах B5 формировалось в среднем 4,4 побега на пробирку, на средах MS развивалось 3,3 побега на пробирку.

На третьем этапе изучалось действие органических добавок в виде глутамина (1500 мг/л) и гидролизата казеина (1000 мг/л). Дисперсионный анализ не выявил существенных различий между вариантами сред. Таким образом, нами установлено что рост и развитие изолированных сегментов проростков нута в культуре *in vitro* зависят от генотипа, минерального состава питательных сред и регуляторов роста в среде.

Вопросы укоренения регенерантных побегов нута и длительного культивирования требуют дальнейшего изучения.

*Исследования поддержаны грантом РФФИ и Управления промышленности Орловской области № 12-04-97552.*

**EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON THE SHOOT REGENERATION OF CHICKPEA *CICER ARIETINUM* L. *IN VITRO*****Donskaia Maria, Suvorova Galina**

All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, p/b Streletskoye, 302502, Orel, fax: (4862)403130, phone. (4862)403224, e-mail: [galina@vniizbk.ru](mailto:galina@vniizbk.ru)

Shoot regeneration from embryo axis of chickpea *Cicer arietinum* L. was demonstrated by a number of investigations. Researchers use various growth regulators and culture methods, but information regarding long term *in vitro* cultivation of chickpea is insufficient. The aim of the present research was to study on effect of growth regulators and mineral composition on shoot regeneration in a culture of isolated explants of chickpea.

The initial materials used there were three accessions of chickpea received from the Vavilov Research Institute: k-1029 (black colored wrinkled seeds, Desi type), k-1507 (brown colored wrinkled seeds, Desi type), κ-1737 vr. Krasnogradcki 5, (yellow smooth seeds, Kabuli type). Primary explants were cuts of epicotyls of one week old seedlings. Fourteen variants of nutrient media with mineral salts of MS or B5 and various combinations of growth regulators were studied. As growth regulators there were used 6-benzylaminopurine, 2iP, indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, α-naphthylacetic acid. Content of 6-benzylaminopurine varied at the level of 5...20 μM, 2iP – 10 μM, indole-3-acetic acid or α-naphthylacetic acid - 0,1 - 1 μM, indole-3-butyric acid – 0,5 μM. Seeds were sterilized by 70% ethanol for a few seconds, and by 0,25...0,5% sodium chlorhexidine gluconate for 5 minutes.

On the first phase of the experiment analysis of variance revealed a significant effect of genotype on shoot formation *in vitro*, as well as on the rate of tissue growth. Accession κ-1507 demonstrated the best results, where 4 shoots per explant were formed in average and tissue growth rate was 16,9 g/day. While accession k-1029 formed 2,6 shoots per explant with tissue growth rate 7,5 g/day. Use of 6-benzylaminopurine in combination with α-naphthylacetic acid was more effective comparatively with indole-3-acetic acid.

On the second stage it was revealed that the most preferred media were those with mineral salts of B5 comparatively with MS. Influence of cytokinin type was insignificant. There were formed 4,4 shoots per explants in average on B5 media and 3,3 shoots on MS media.

On the third phase effect of organic substances as glutamine (1500 mg/l) and casein hydrolyzate was studied. Analysis of variance revealed no significant differences between media variants. So it was found that growth and development of chickpea seedling cuts *in vitro* depend on chickpea genotype, medium mineral base and growth regulators. Rooting procedure and long term cultivation of isolated chickpea tissue required further research.

*The reported study was funded by RFBR and Industry department of Orel region, research project No. 12-04-97552.*



## ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СООТНОШЕНИЕ ТИПОВ МОРФОГЕНЕЗА В КАЛЛУСНОЙ ТКАНЕ КУКУРУЗЫ

Деркач Е. В., Абраимова О. Е., Сатарова Т. Н.

Государственное учреждение Институт сельского хозяйства степной зоны Национальной академии аграрных наук Украины, г. Днепрпетровск, 49600, ул. Дзержинского, 14, факс: (+380562) 36-26-18, тел. (+38056) 745-02-36, e-mail: satarova2008@yandex.ru

Получение растений-регенерантов в культуре каллусной ткани – важный заключительный этап в работах по клеточной селекции, получению соматональных вариантов и генетической трансформации. Регенерация растений из каллусной ткани может осуществляться в результате таких типов морфогенеза как органогенез (гемморизогенез, геммогенез) или соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез).

У кукурузы регенеранты, сформировавшиеся путем органогенеза, представляют собой побег или розетку листовых структур, которые чаще всего не имеют корня, т.е. развиваются путем геммогенеза. Растения-регенеранты, возникшие путем эмбриоидогенеза, обычно имеют один побег и один корень. Побег и корень таких растений объединены общей проводящей системой и, поэтому, лучше приживаются при пересадке в почву. Растения-регенеранты, полученные из эмбриоидов, не нуждаются в укоренении, что сокращает длительность и трудоемкость биотехнологического процесса получения растений *in vitro*. Фитогормоны лишь в незначительной степени затрагивают тип морфогенеза у кукурузы, основным фактором, определяющим успех регенерации, является генотип эксплантата. В связи с этим генотипическая оценка способности кукурузы к тому или иному типу морфогенеза *in vitro* является актуальной.

Нами оценивалась способность к различным типам морфогенеза каллусной ткани, полученной из незрелых зародышей длиной 1-1,5 мм, у линий и гибридов кукурузы. Исследовались линии ДК267, ДК6080, ДК420-1, ДК298 и ДК3070 зародышевой плазмы Ланкастер, как одной из наиболее коммерчески и селекционно-ценной для Украины, а также модельные линии А188, PLS61 и Chi31. Исследуемые гибриды были представлены прямыми и обратными гибридами линий кукурузы плазмы Ланкастер и модельных линий. Каллусогенез индуцировали на модифицированной среде N<sub>6</sub>, а регенерацию – на модифицированной среде MS.

Растения-регенеранты у всех изученных генотипов образовывались как путем геммогенеза, так и путем эмбриоидогенеза. Однако было установлено, что у модельных линий геммогенез значительно преобладал над эмбриоидогенезом (на 55,22%), в то время как у линий плазмы Ланкастер оба типа встречались примерно с одинаковой частотой (57,69% и 42,31%, соответственно). У гибридов, созданных при участии модельной линии PLS61, геммогенез преобладал над эмбриоидогенезом на 73,26%. Вместе с тем, у гибридов с линиями А188 и Chi31 тип морфогенеза зависел от длительности культивирования на каллусогенной среде. При трансплантации 30-суточной каллусной ткани этих гибридов на среды для регенерации чаще наблюдался геммогенез (93,67% для гибридов с линией А188 и 80,00% для гибридов с линией Chi31). При высадке 60-суточной культуры гибридов с линией А188 преобладал эмбриоидогенез (70,59%), а у гибридов с линией Chi31 уровни геммогенеза и эмбриоидогенеза достоверно не различались (57,89 и 42,11%). Увеличение длительности культивирования на каллусогенной среде приводило к формированию дополнительного количества эмбриоидов.

Таким образом, тип морфогенеза в культуре *in vitro* у кукурузы зависит главным образом от генотипа эксплантата, а также от длительности культивирования каллусной ткани. В биотехнологических исследованиях для увеличения выхода растений-регенерантов рекомендуется использовать линии плазмы Ланкастер и гибриды этих линий с модельными

линиями A188 и Chi31, а также увеличивать срок культивирования каллусной ткани до переноса на среду для регенерации.

### **FACTORS AFFECTING THE RATIO OF TYPES OF MORPHOGENESIS IN MAIZE CALLUS TISSUE**

**Derkach E. V., Abraimova O. E., Satarova T. N.**

Agricultural Steppe Zone Institute of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Dnepropetrovsk, 49600, Dzerzhynskiy str., 14,  
fax: (+380562) 36-26-18, tel. (+38056) 745-02-36, e-mail: satarova2008@yandex.ru

The production of regenerated plants in callus tissue culture is an important final step in cell selection, generation somaclonal variants and genetic transformation.

Plant regeneration from callus tissue can be realized as a result of such types of morphogenesis as organogenesis (gemmorizhogenesis, gemmogenesis) or somatic embryogenesis (embryoidogenesis). Maize regenerants having been evolved by organogenesis are represented by a shoot or a rosette of leaf structures, which often have no roots, i.e. developed by gemmogenesis. Regenerated plants having been evolved by embryoidogenesis usually have one shoot and one root. Shoots and roots of regenerated plants have common vascular system and, therefore, they get better acclimatization after transplanting into the soil. Regenerants derived from embryoids do not need rooting, that reduces the duration and laboriousness of the biotechnological process of plant obtaining in vitro. Plant hormones slightly affect the type of maize morphogenesis, the main factor which determines regeneration success is the genotype of an explant. Therefore, genotypic evaluation of the ability of maize to one or to the other type of the morphogenesis in vitro is relevant.

We have estimated the ability to various types of morphogenesis of calli of maize lines and hybrids derived from immature embryos 1-1.5 mm in length. We studied lines ДК267, ДК6080, ДК420-1, ДК298 and ДК3070 of Lancaster germplasm, as one of the most commercially and selectionally valuable for Ukraine, as well as model lines A188, PLS61 and Chi31. The investigated hybrids were presented by direct and diverse ones composed with Lancaster and model lines. Callus formation was induced on the modified medium N<sub>6</sub>, and regeneration was induced on the modified medium MS.

Regenerated plants of all studied genotypes have been formed both through gemmogenesis and embryoidogenesis. However, it was found that embryoidogenesis significantly prevailed over gemmogenesis for the model lines (about 55,22%), while both types have the same frequencies for Lancaster lines (57,69% and 42,31% respectively). Gemmogenesis prevailed over the embryoidogenesis for hybrids, created with the participation of model line PLS61, on about 73,26%. However, for hybrids with A188 and Chi31 the type of morphogenesis depends on the duration of cultivation on the callus induction medium. Gemmogenesis was observed more frequently if the callus tissue of these hybrids at the age of 30 days had been transplanted on the regeneration medium (93,67% for hybrids with A188 and 80,00% for hybrids with Chi31). When 60-days culture of hybrids with A188 had been transplanted on the same medium the embryoidogenesis prevailed (70,59%), and levels of the gemmogenesis and the embryoidogenesis did not significantly differ among the hybrids with Chi31 (57,89% and 42,11%). Increasing the duration of cultivation on the callus induction medium has led to the formation of additional embryos.

In conclusion, the type of morphogenesis in maize in vitro culture depends mainly from the genotype of the explant, as well as from the duration of callus tissue cultivation. For the increasing of the yield of regenerated plants it is strongly recommended to use the lines of Lancaster germplasm and hybrids of these lines with model lines A188 and Chi31, as well as to prolong the term of the cultivation of callus tissue before its transfer to the regeneration medium.

**РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОБЕГОВ *RHODODENDRON SICHOTENSE* ИЗ  
ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*****Зайцева Ю.Г., Новикова Т.И.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Золотодолинская, 101, факс (383) 339-97-01, тел. (383) 339-98-29, e-mail: [ulianna\\_zaitseva@mail.ru](mailto:ulianna_zaitseva@mail.ru)

Культура изолированных листовых эксплантов является не только перспективной системой для массового размножения ценных генотипов растений, но и служит моделью для изучения фундаментальных основ морфогенеза *in vitro*, поскольку отсутствие у листа апикальных меристем дает возможность индуцировать в культуре ткани весь спектр морфогенных ответов. Существует множество работ посвященных клональному микроразмножению европейских видов и сортов рода *Rhododendron*, в то время как азиатские виды остаются малоизученными. Сведения о путях морфогенеза *Rhododendron sichotense* *Pojark.* в культуре листовых эксплантов практически отсутствуют. В связи с этим целью нашего исследования явилось выявление морфогенного потенциала листовых эксплантов и оптимизация технологии микроразмножения *Rhododendron sichotense* *Pojark.*

Материалом для исследования послужили молодые листья микроклонов *Rhododendron sichotense*. В качестве индукционной среды использовали питательные среды по прописи Андерсена (АМ) дополненные 0,1 – 10 мкМ тидиазурона (ТДЗ). Время культивирования составило 15 недель. Экспланты фиксировали на протяжении всего эксперимента для дальнейшего морфо-гистологического анализа. Постоянные микропрепараты для световой микроскопии готовили и окрашивали по методике Паушевой (1988). После обработки ТДЗ конгломераты перенесли на безгормональную среду (АМ0). Регенеранты укореняли на АМ0 после предварительной обработки 30мг/л индолил-3-масляной кислотой (ИМК).

Установлено, что использование ТДЗ (0,1 – 5 мкМ) индуцировало прямое образование адвентивных побегов из листовых эксплантов *Rhododendron sichotense*. Уже после 8 недель культивирования на черешках листовых эксплантов формировались конгломераты адвентивных почек. Максимальный процент регенерации (87 и 96,6%) получен на средах с низким содержанием ТДЗ (0,5 и 1 мкМ, соответственно). Повышение концентрации ТДЗ до 5 мкМ в индукционной среде вызвало снижение регенерации. Длительное культивирование на средах, содержащих ТДЗ, приводило к анатомическим и морфологическим нарушениям в строении побегов. Для преодоления этих аномалий конгломераты побегов переносили на среду АМ0. Через 8 недель элонгации коэффициент размножения в среднем составил 25 побегов на эксплант. Гистологический анализ постоянных микропрепаратов показал, что начальные этапы морфогенеза под действием ТДЗ происходят в эпидерме черешка или основания листа.

**IN VITRO SHOOT REGENERATION FROM LEAF EXPLANTS OF  
RHODODENDRON SICHOTENSE****Zavtseva Yu.G., Novikova T.I.**

Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, Zolotodolinskaya st., 101, Tel. (383) 339-98-29, Fax: (383) 330-19-86, e-mail: [ulianna\\_zaitseva@mail.ru](mailto:ulianna_zaitseva@mail.ru)

Culture of the isolated leaf explants is not only a promising system for the mass propagation of valuable plant genotypes, but it also serves a model for studying fundamental bases of morphogenesis *in vitro*, since the lack of leaf apical meristems makes possible induce a range of morphogenic responses in tissue culture. There are a lot of works on clonal micropropagation of European species and varieties of *Rhododendron* genus, whereas the Asian species are insufficiently studied. The data on morphogenesis pathways of *Rhododendron sichotense* Pojark in the leaf explants culture are practically absent. In this connection the aim of the study was to identify the morphogenic potential of leaf explants and optimize the micropropagation technology of *Rhododendron sichotense* Pojark.

Young leaves of *Rhododendron sichotense* cultured *in vitro* were a source of leaf explants. Anderson's medium (AM) supplemented with 0.1 – 10  $\mu\text{M}$  thidiazuron (TDZ) was used as the induction medium. The culture was maintained on AM for 15 weeks. Explants were fixed throughout the experiment for the further morphological and histological analysis. The permanent preparations for light microscopy were made by Pausheva method (1988). After TDZ treatment, clumps were transferred to hormone-free medium (AM0) for shoot elongation. The microshoots were rooted on AM0 after pretreatment by 30 mg/l indole-3-butyric acid (IBA).

Using TDZ (0,1 – 5  $\mu\text{M}$ ) was found to induce direct adventitious shoot production from leaf explants of *Rhododendron sichotense*. The adventitious buds clumps formed on the petioles of leaf explants after culturing for 8 weeks. The maximum regeneration level (87 and 96.6%) was obtained when used medium with low concentration of TDZ (0.5 and 1 mM, respectively). TDZ concentration increasing to 5  $\mu\text{M}$  in the induction medium resulted in decreasing regeneration. Prolonged cultivation on the media containing TDZ led to anatomical and morphological anomalies of the shoots structure. To overcome these anomalies, shoot clumps were transferred on AM0 medium. Histological analysis of the permanent preparations showed that the initial stages of morphogenesis under the TDZ occurred in the petiole epidermis or leaf base.

**ПОЛИСАХАРИДЫ, ВЫДЕЛЯЕМЫЕ ЭМБРИОГЕННЫМ КАЛЛУСОМ  
ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ ПРИ РАЗРЫХЛЕНИИ ПРОЭМБРИОНАЛЬНЫХ  
КЛЕТОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ**

**Ибрагимова Н.Н., Акулов А.Н., Горшкова Т.А., Румянцева Н.И.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, 420111, ул. Лобачевского, 2/31,  
факс: (843) 292 -73-47, тел. (843) 231-90-42, e-mail: [nibra@yandex.ru](mailto:nibra@yandex.ru)

С использованием хроматографических и иммунохимических методов были охарактеризованы полисахаридные фракции, выделяемые при разрыхлении проэмбриональных клеточных комплексов эмбрионным каллусом гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.). Выявлены две отличающиеся по молекулярной массе фракции пектиновых полисахаридов, в которых присутствуют остов RGI, галактаны и полигалактуронан. Присутствие пектиновых полисахаридов в среде культивирования, вероятно, обусловлено растяжением клеточных стенок и солюбилизацией срединных пластинок – процессами, которые вовлечены в образование популяции мягкого каллуса, состоящего из сильно вакуолизованных, слабо контактирующих друг с другом клеток.

Обсуждаются возможные функции секретируемых полисахаридов и их фрагментов в процессах циклической реинициации проэмбриональных клеточных комплексов эмбрионных каллусов.

**POLYSACCHARIDES SECRETED BY EMBRYOGENIC CALLUS  
*FAGOPYRUM TATARICUM* (L.) DURING PROEMBRYONAL CELL COMPLEX  
LOOSENING**

**Ibragimova N.N., Akulov A.N., Gorshkova T.A., Rumyantseva N.I.**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111, Lobachevsky str., 2/31,  
fax: (843) 292-73-47, tel. (843) 231-90-42, e-mail: [nibra@yandex.ru](mailto:nibra@yandex.ru)

To characterize polysaccharide fractions secreted by embryogenic callus of tatar buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) during proembryonal cell complex (PECC) loosening different chromatographic techniques combined with immunochemical methods were used. Two distinct molecular weight fractions of pectin polysaccharides, containing the RGI backbone, galactans and polygalacturonan were revealed.

The accumulation of pectic polysaccharides in culture media was most probably due to the stretching of the cell walls and middle lamellae solubilization that are involved in the formation of soft callus having highly vacuolated, loosely attached cells. The possible functions of the secreted polysaccharides and their fragments in cyclic reinitiation of PECCs in embryogenic calli are discussed.

## ЦИТОЭМБРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *LARIX SIBIRICA*, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Иваницкая А.С., Пак М.Э., Третьякова И.Н.

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, 660036, Академгородок, 50, стр.28, тел.: (391) 249-44-47, факс: (391) 243-36-86, e-mail: [dolka1981@mail.ru](mailto:dolka1981@mail.ru)

Соматический эмбриогенез является мощным инструментом в селекционных программах, поскольку он позволяет генерировать большое количество клоновых линий из семян ценных генотипов. У видов лиственницы соматический эмбриогенез и регенеранты получены и активно изучаются у лиственницы европейской (*Larix decidua*) и её гибридов. Лиственница сибирская занимает обширный ареал на территории Сибири, однако для нее свойственна нерегулярность урожая или полное их отсутствие. Кроме того деревья лиственницы Сибирской сильно поражаются лиственничной почковой галлицей. Поэтому актуальным является разработка современных и инновационных биотехнологий позволяющих получать быстрорастущие, высокопродуктивные, устойчивые к патогенам дерева данного вида.

Объектом исследования служили 35-40-летние деревья *Larix sibirica* произрастающие на территории дендрария Института леса (г. Красноярск), а также на территории ОЭП «Черное озеро» (Республика Хакасия). Материалом служили зиготические зародыши, на стадии развития семядолей. Для культивирования с целью индукции соматического эмбриогенеза использовали базовую среду АИ (Патент № 2010114891).

В результате экспериментальной работы было обнаружено, что образование очагов эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) в каллусе происходило на 25-35 сутки. Высокая пролиферационная активность ЭСМ была получена у восьми клеточных линий (КЛ). Семь из них были получены от материнского дерева 1С: КЛ 1 (2008), КЛ 2, 3, 4 (2009), КЛ 6, 7 (2011), КЛ 10 (2012), и одна КЛ 5 (гибридная) получена в результате контролируемого опыления генотипа 1С (лиственница сибирская) генотипом лиственницы Сукачева (2009 год).

Анализ КЛ № 2, 4, 5, 6, 7, показал, что они сохраняли способность пролиферировать в течение 2–4 лет. КЛ отличались по содержанию незрелых соматических зародышей в ЭСМ. Длительное культивирование клеточных линий (19-32 месяца) приводило к снижению или к потере их эмбриогенного потенциала (у КЛ1 и КЛ3). Число соматических зародышей в расчете на 100 мг ЭСМ составляло от 210 до 390 шт у КЛ2 и КЛ1 соответственно. Пролиферирующие эмбриогенные клеточные линии отличались размерами эмбриональных структур (глобулы и суспензора соматического зародыша). Диаметр глобулы у активно пролиферирующей КЛ2 составил  $201 \pm 55$  мкм, длина суспензора –  $1169 \pm 157$  мкм. Зародыши этой линии успешно созревали. У гибридной КЛ5 диаметр глобулы составил только  $91 \pm 18$  мкм, а длина суспензора –  $126 \pm 38$  мкм. Зародыши у КЛ5 не созревали. Количество созревших соматических зародышей варьировало в расчете на 100 мг ЭМ (на 40-е сут. культивирования): от 2 шт у КЛ4 до 30 шт у КЛ6. Среди зрелых соматических зародышей были обнаружены зародыши с аномальным строением. Наиболее успешное прорастание соматических зародышей было отмечено у КЛ6 на базовой среде АИ без добавления витаминов и активированного угля, у которой прорастали 87,5% зародышей. У КЛ2 при таких же условиях культивирования прорастало только 56 % зародышей. У этой же линии при добавлении в базовую среду активированного угля (0,1 г/л) прорастание зародышей увеличивалось до 80%.

В результате проведенной работы по культивированию зародышей семян *Larix sibirica* были получены длительно пролиферирующие клеточные линии, исследованы их морфологические и цитологические особенности, и впервые получены 10-ти месячные регенеранты.

**CYTOEMBRYOLOGICAL INVESTIGATION OF *LARIX SIBIRICA* CELL LINES, OBTAINED IN CULTURE IN VITRO****Ivanitskaya A.S., Park M.E., Tretiakova I.N.**

V.N. Sukachev Institute of Forest Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036, Akademgorodok, 50, bld.28, tel.: (391) 249-44-47, fax: (391) 243-36-86, e-mail: [dolka1981@mail.ru](mailto:dolka1981@mail.ru)

Somatic embryogenesis is the powerful tool in selection programs, because it allows to generate a large number of clonal lines from seeds of valuable genotypes. Somatic embryogenesis and plantlets were obtained at different larch species and actively studied in European larch (*Larix decidua*) and its hybrids. Siberian larch occupies an extensive area in the territory of Siberia, however for it the irregularity of crops or their total absence is peculiar. Besides trees of a Siberian larch are strongly damaged by larch bud midge. Therefore development of modern and innovative biotechnologies which allows to receive fast-growing, highly productive, resistant to pathogens trees is actual.

The objects of the study were 30-40 years old trees of *Larix sibirica* growing at the territory of the arboretum of the Institute of Forest (Krasnoyarsk) as well as at experimental base "Chornoe ozero" (Republic of Khakassia). The material for the experiments was immature zygotic embryos at the stage of cotyledons development. For somatic embryogenesis induction the AI media (patent № 2010114891) was used.

At the result of investigations it was found that the formation of embryonal-suspension mass in the callus occurred in 25-35 days. The high proliferation activity were obtained in eight cell lines (CL). Seven of them were obtained from mother tree 1C: CL 1 (2008), CL 2, 3, 4 (2009), CL 6, 7 (2011), CL 10 (2012), and one CL 5 (hybrid) was obtained as a result of control pollination of 1C genotype (Siberian larch) by pollen from Sukachev Larch genotype (2009).

The analysis of CL 2, 4, 5, 6, 7 showed that they kept their proliferation ability during 2-4 years. CL differed on immature somatic embryos number in ESM. Long-term cultivation of cell lines (19-32 month) leads to the decreasing or losing of their embryogenic potential (in CL1 and CL3). The number of somatic embryos per 100 mg of ESM was 210-390 in CL2 and CL1 respectively. Proliferating embryogenic cell lines differed by embryological structure sizes (globule and suspensor of somatic embryo). The globule diameter of actively proliferating CL2 was  $201 \pm 55$  mkm, the suspensor length -  $1169 \pm 157$  mkm. The embryos of that line passed maturation successfully. In hybrid CL5 diameter of globule was  $91 \pm 18$  mkm, the suspensor length -  $126 \pm 38$  mkm. The embryos of the CL5 didn't mature. The number of mature somatic embryos per 100 mg of ESM varies from 2 (in CL4) to 30 (in CL6) in 40 days of culturing. There were found anomaly embryos among mature somatic embryo. Among mature somatic embryos, the embryos with an anomalnalny structure were found. The most successful germination of somatic embryos was noted at CL6 on the AI basal medium without addition of vitamins and activated carbon when germinated 87,5% of embryos. At CL2 under the same conditions of culturing germinated only 56% of germs. At the same line the addition of absorbent carbon (0,1 g/l) to basal medium caused increased of germination rate to 80%.

As a result of the carried-out work on culturing of embryos of *Larix sibirica* seeds were received long-term proliferation cell lines, their morphological and cytologic features are investigated, and 10-month plantlets ready to planting in the soil for the first time were received.



**ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР НА  
МОРФОГЕНЕЗ МИКРОСПОРОФИЛЛОВ *LARIX SIBIRICA* IN VIVO И IN VITRO**  
**Иванова А.Н., Голованова Т.И.**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет», Красноярск, 660041, пр. Свободный, 79, факс: (391) 244-86-25, тел. ((391) 244-86-25, e-mail: [annaivanova\\_2000@mail.ru](mailto:annaivanova_2000@mail.ru), [tigolovanova@mail.ru](mailto:tigolovanova@mail.ru)

Морфогенез как процесс развития многоклеточных организмов из одной клетки или группы клеток остается сложнейшей проблемой биологии. Одним из наиболее перспективных экспериментальных подходов к изучению особенностей морфогенеза растений является метод культуры *in vitro* изолированных мужских генеративных органов. Данный метод основан на использовании явления андроклинии *in vitro*, то есть феномена образования растений-регенерантов из морфогенетически компетентных микроспор. Показано стимулирующее действие внешних факторов, в частности низких положительных температур, на индукцию андроклинии у пшеницы. Обнаружено что воздействие низкими положительными температурами провоцирует отрыв микроспор от стенки пыльника, приводит к нарушению морфогенетических корреляций, изменению структурной организации микроспор и тем самым нарушает целостность пыльника как интегрированной системы. Однако влияние данного фактора на голосеменных растениях не достаточно изучено, что и явилось предпосылкой для изучения влияния низких положительных температур на морфогенез микроспорофиллов *Larix sibirica* *in vivo* и *in vitro*.

Объектами исследования служили 40-летние деревья лиственницы сибирской, произрастающие на территории экспериментальной базы Института леса СО РАН г. Красноярска. Производился сбор микростробилл в период с октября по май. 1 вариант: микростробиллы, взятые с деревьев, произрастающих в естественных условиях; 2 вариант: часть микростробилл были обработаны низкими положительными температурами в течении 3 сут., а затем микроспорофиллы, выделенные из них, помещены на среду без регуляторов роста; 3 вариант: часть микроспорофилл, выделенных их микростробилл, не обработанных температурным фактором, были помещены на среду без регуляторов роста. Проводили биохимический анализ микроспорофилл *Larix sibirica* на разных стадиях развития.

В первом варианте отмечено, что в октябре микроспорофиллы находятся в профазе I на стадии диплотены, у которых содержание белков и углеводов составляло 2,1 % 4,5 %, соответственно, в декабре отмечена та же закономерность, в апреле микроспорофиллы уже находятся на стадии интерфазы и около 6 % образуют тетрады. Во втором варианте у микроспорофилл в октябре ускоряется процесс мейоза, у них на четырнадцатые сутки культивирования шло образование пыльцевой трубки. В микроспорофиллах наблюдалось уменьшение суммарного содержания белков и углеводов в первые трое суток, а далее отмечалось незначительное увеличение данных метаболитов. В зимние сроки культивирования отмечено снижение интенсивности мейоза, микроспор образовалось в 5 раз меньше, чем в октябре, хотя содержание белков и углеводов находилось на том же уровне, что и в октябре. В апреле у микроспорофиллов на третьи сутки культивирования идет 100 % образование микроспор, которые на 7 сутки дают пыльцевые трубки и данный процесс сопровождается активным образованием белков и углеводов. У третьего варианта в октябре к концу второй недели культивирования произошло образование микроспор, содержание белков и углеводов не менялось в течение данного периода. Такие же изменения наблюдаются и у микроспорофиллов собранных в декабре. В апреле уже на третьи сутки идет 100 % образование микроспор, но образование пыльцевых трубок не происходит.

Таким образом, низкие положительные температуры можно использовать в качестве к фактора, регулирующего процесс мейоза у *Larix sibirica* в условиях *in vitro*.

**EFFECT OF LOW TEMPERATURE ON POSITIVE MORPHOGENESIS  
MICROSPOROPHYLLS LARIX SIBIRICA IN VIVO AND IN VITRO****Ivanova A.N., Golovanova T.I.**

Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041, Svobodny Prospect, 79, fax: (391) 244-86-25, tel. ((391) 244-86-25, e-mail: annaivanova\_2000@mail.ru, tigolovanova@mail.ru

Morphogenesis as the development of multicellular organisms from single cells or groups of cells are difficult problems of biology. One of the most promising experimental approaches to the study of the features of plant morphogenesis is the method of in vitro culture of isolated male generative organs. This method is based on the phenomenon androklinii in vitro, that is, the phenomenon of formation of regenerated plants of morphogenetic competent microspores. Shows the stimulatory effect of external factors, such as low positive temperature on the induction androklinii in wheat. Found that exposure to low positive temperatures provokes separation of microspores from anther wall, leads to disruption of morphogenetic correlations change the structural organization of microspores and violates the integrity of the seal, as an integrated system. However, the influence of this factor on gymnosperms not quite understood, that was a prerequisite for the study of the effect of low temperatures on the positive morphogenesis microsporophyll *Larix sibirica* in vivo and in vitro.

The objects of the study were 40 years of Siberian larch trees growing in the experimental facilities of the Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk. Mikrostrombill were collected from October to May. Option 1: mikrostrombilly taken from trees growing in the wild, and 2 option: part mikrostrombill were processed low positive temperature for 3 days., Then microsporophylls derived from them, are placed on the medium without growth regulators, 3 version: part microsporophylls , isolated from mikrostrombill not treated temperature factor, were placed on the medium without growth regulators. Performed biochemical analysis microsporophylls *Larix sibirica* in various stages of development.

In the first case noted that in October microsporophylls are in prophase I in the diplotene stage, in which the content of protein and carbohydrates was 2.1% 4.5%, respectively, in December marked by the same law, in April microsporophylls already on the interphase and about 6% form tetrads. In the second variant in microsporophylls in October accelerated process of meiosis in their fourteenth day of cultivation went pollen tube formation. In microsporophylls observed decrease in total protein and carbohydrates in the first three days, and then showed a slight increase in these metabolites. In the winter time cultivation decreased intensity of meiosis, microspores formed 5 times less than in October, although the content of protein and carbohydrates is at the same level as in October. In April, a microsporophyll on the third day of cultivation is 100% formation of microspores that on the 7th day allow pollen tube and the process is accompanied by the active form of proteins and carbohydrates. The third option in October to the end of the second week of cultivation has created, microspores, protein and carbohydrates did not change during this period. Similar changes are observed in microsporophyll collected in December. In April, on the third day is 100% microspore formation, but the formation of pollen tubes occurs.

Thus, low positive temperatures can be used as a factor regulating the process of meiosis in *Larix sibirica* in vitro.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕТРАДИЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЭКСПЛАНТОВ И ПЕРЕСАДОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ БЕРЕСКЛЕТА, ДИОСКОРЕИ И КИРКАЗОНА

Калашникова Е.А., Доан Тху Тхуи

Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 49, кафедра генетики и биотехнологии, тел. 8(499) 976-40-72, e-mail: [kalash0407@mail.ru](mailto:kalash0407@mail.ru)

Существующие для травянистых растений традиционные методы клонального микроразмножения нельзя применять без серьезных корректировок для древесных пород. При размножении древесных растений *in vitro* встречается множество трудностей на всех этапах микроразмножения, начиная с получения стерильной культуры эксплантов, дальнейшего размножения и кончая этапом укоренения. Для кустарниковых пород, в частности, для бересклета карликового (*Euonymus nana* Vieb.) и многолетних лиан - диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasica* Lypsky), диоскореи ниппонской (*Dioscorea nipponica* Makino) и кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.), указанные сложности значительно усиливаются.

Формообразовательные процессы в условиях *in vitro* происходят при наличии в составе питательной среды биологически активных веществ, таких как регуляторы роста, аминокислоты, растительные экстракты и др. Однако применение традиционных, широко используемых веществ не всегда приводит к получению положительного результата. Поэтому поиск или создание новых отечественных высокоэффективных нетоксичных регуляторов роста остается актуальной проблемой не только для сельского хозяйства, но и для биотехнологии растений.

К таким веществам относится препарат Мицефит, а также вещества с цитокининовой активностью Дропп и Цитодеф.

Изучено влияние нетрадиционных регуляторов роста Дропп, Цитодеф и Мицефит на морфогенетическую активность изолированных органов и пересадочную культуру бересклета карликового (*Euonymus nana* Vieb.), диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasica* Lypsky), диоскореи ниппонской (*Dioscorea nipponica* Makino) и кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.). Установлено, что присутствие в составе питательной среды препаратов Цитодеф и Дропп в концентрации 0,01 мг/л стимулировало процесс индукции образования адвентивных почек, формирование микропобегов или микроклубней и увеличивало коэффициент размножения. Выявлено, что длительное культивирование микропобегов бересклета карликового на средах, содержащих препарат Мицефит в концентрации  $10^{-6}$  мг/л, приводило к формированию побегов не только первого порядка, но и побегов второго и третьего порядка, а также активизировался процесс ризогенеза. Для растений диоскореи в этих условиях культивирования формирование микроклубней наступало в два раза быстрее, по сравнению с контрольным вариантом.

**STUDYING OF INFLUENCE OF NONCONVENTIONAL REGULATORS OF  
GROWTH ON MORPHOGENETIC ACTIVITY ISOLATED EXPLANTS AND  
TRANSFER CULTURE OF THE EUONYMUS, DIOSCOREA AND ARISTOLOCHIA**  
**Kalashnikova E.A., Doan Thu Thuy**

Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, 127550, st. Timiryazevskaya, 49, Department of Genetics and Biotechnology, Tel. 8 (499) 976-40-72, e-mail: [kalash0407@mail.ru](mailto:kalash0407@mail.ru)

Existing for traditional herbs clonal micropropagation cannot be applied without major adjustments to trees. When propagating woody plants *in vitro* meets many difficulties at all stages of micropropagation such as: receiving sterile culture explants, further breeding and finishing stage of rooting. For shrub species, in particular, for *Euonymus nana* Bieb.; perennial vines – as *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Dioscorea nipponica* Makino and *Aristolochia manshuriensis* Kom., the difficulties is greatly enhanced.

Morphogenetic processes *in vitro* conditions occurred in the culture medium of biologically active substances such as growth regulators, amino acids, plant extracts, etc. However, traditional application, widely used substances, does not always lead to receiving positive result. Therefore, search or creation a new national highly effective nontoxic regulators of growth remains an actual problem, not only for agriculture but also for biotechnology of plants.

These substances include preparation Mitsefit and substances with cytokinins activity as Dropp and Tsitodef.

Influence of nonconventional regulators of growth Dropp, Tsitodef and Mitsefit on morphogenetic activity of isolated organs and transfer culture of *Euonymus nana* Bieb.; *Dioscorea caucasica* Lipsky; *Dioscorea nipponica* Makino and *Aristolochia manshuriensis* Kom. It is established that presence of preparations Tsitodef and Dropp at 0.01 mg / l in the culture medium stimulated process of induction adventitious buds, formation microshoots or microtubers and increased the rate of reproduction. Found that, long-term cultivation of microshoots *Euonymus nana* Bieb. on medium containing preparation Mitsefit in concentration of  $10^{-6}$  mg/l, resulted in the formation of shoots not only the first order, but shoots second and third order, as well as to intensify the process rhizogenesis. The formation of microtubers of yam plants, which cultivated in these conditions, occurred in half the time, compared to the control.

**ПОЛУЧЕНИЕ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ БЕЛОКОЧАННОЙ КАПУСТЫ  
(*BRASSICA OLERACEA* L) ИЗ МИКРОСПОР ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ**  
**Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н.**

Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д. 49, кафедра генетики и биотехнологии, тел. 8(499) 976-40-72, e-mail: [kalash0407@mail.ru](mailto:kalash0407@mail.ru)

Белокочанная капуста (*Brassica oleracea* L.) - наиболее распространённая овощная культура в Российской Федерации, которую в настоящее время выращивают на площади 161,7 тыс. га. Однако данная культура подвержена многочисленным заболеваниям и поэтому выведение сортов, обладающих единичной, групповой или комплексной устойчивостью является актуальной проблемой. Применение методов биотехнологии, и в частности, создание гаплоидных растений *in vitro* позволяет решить данную проблему за более короткий срок.

Объектом исследования служили изолированные пыльники и микроспоры белокочанной капусты (гибрид F<sub>1</sub> Юбилей, линии ЭТ1 и АМФ 3Л). Стерилизацию бутонов проводили по методике, разработанной на кафедре генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА. В работе изучали влияние предобработки бутонов, состава питательной среды и условий культивирования на процессы прямого эмбриогенеза.

В результате проведенных исследований были оптимизированы этапы получения растений-регенерантов путем прямого эмбриогенеза из микроспор изолированных пыльников. Предложена схема комплексной предобработки соцветий пониженными (+4-6<sup>0</sup>С в течение 2-х суток) и повышенными (+32<sup>0</sup>С в течение 1-х суток) температурами в сочетании с обработкой соцветий нитратом серебра (40 мг/л). Установлено, что присутствие в питательной среде Мурасиге и Скуга НУК в концентрации 1мг/л и Дропп – 0,01 мг/л стимулировало процесс прямого эмбриогенеза (4,2%). Дальнейшее культивирование эмбриоидов приводило к формированию растений-регенерантов, которые были перенесены в условия открытого грунта. Проведенный цитологический анализ растений-регенерантов (подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и хромосом в меристеме корня) подтвердил их гаплоидную природу.

**OBTAINING HAPLOID PLANTS OF CABBAGE (*BRASSICA OLERACEA* L.)  
FROM MICROSPORES OF ISOLATED ANTHERS****Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N.**

Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A.Timiryazev, 127550, st. Timiryazevskaya, 49, Department of Genetics and Biotechnology, Tel. 8 (499) 976-40-72, e-mail:[kalash0407@mail.ru](mailto:kalash0407@mail.ru)

Cabbage (*Brassica oleracea* L.) - the most common vegetable crop in the Russian Federation, which is now grown on the area of 161.7 hectares. However this crop is exposed to large diseases and therefore breeding varieties having a single, group or complex resistance is an important issue. Using of biotechnological methods and in particular, the obtaining haploid plants in vitro allows us to solve this problem in a shorter time.

Objects of our research were isolated anthers and microspores of cabbage (F1 hybrid Jubilei, line ET1 and AMF 3L). Sterilization of buds was carried out by the method developed at the Department of Genetics and Biotechnology RGAU-ICCA. We studied the effect of preprocessing of buds, composition of nutrient medium and cultivation conditions on the processes of direct embryogenesis.

In the result of research were optimized steps of obtaining regenerated plants by direct embryogenesis from microspores of isolated anthers. Suggested a scheme for integrated of preprocessing of inflorescences reduced (+4-6<sup>0</sup> C for 2 days) and elevated (32<sup>0</sup> C for 1-days) temperatures, combined with the processing of inflorescences with silver nitrate (40 mg / L). Found that the presence in the medium Murashige and Skoog medium of NAA in a concentration 1 mg / l and Dropp - 0.01 mg / l stimulated the process of direct embryogenesis (4.2%). Further cultivation of embryoids led to the formation of regenerated plants, which were transferred to the open ground. Cytological analysis of regenerated plants (counting the quantity of chloroplasts in stomatal guard cells and chromosomes in root meristem) confirmed their haploid nature.

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА *FRITILLARIA DAGANA* И *F. SONNIKOVAE* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*****Кульханова Д.С., Эрст А.А., Новикова Т.И.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, Россия, Новосибирск, 630090, ул. Золотодолинская, 101, тел.: +7(383)330-41-01, факс: +7(383)334-44-33, e-mail: dinarakulhanova@yandex.ru, annaerst@yandex.ru, tin27@mail.ru

Эффективные системы регенерации *in vitro* с использованием клеточных и тканевых культур являются предпосылкой для биотехнологических программ по сохранению, размножению и улучшению свойств растений. Хотя целое растение может быть регенерировано различными путями из разных типов эксплантов, соматический эмбриогенез является наиболее полной морфогенетической схемой развития растения. Соматический эмбриогенез определяется как неполовое развитие, приводящее к формированию зиготических эмбриоподобных структур из соматических клеток растения. Преимущество соматического эмбриогенеза заключаются в возможности получения генетически идентичных соматических эмбриондов, поскольку отсутствует генетическая рекомбинация, происходящая во время мейоза при половом размножении. Кроме того, это быстрый, надежный, воспроизводимый метод для массового размножения растений.

*Fritillaria dagana* и *F. sonnikovae* – редкие многолетние растения, принадлежащие к сем. *Liliaceae*, большинство видов которого распространено в умеренной зоне северного полушария. Все виды рода *Fritillaria* содержат разнообразные алкалоиды и широко применяются в традиционной китайской медицине. *Fritillaria dagana* и *F. sonnikovae* высоко декоративны, обладают привлекательной окраской цветов и ранним цветением. Размножение этих видов традиционными способами ограничено из-за низкой всхожести семян и слабого вегетативного размножения. В связи с этим разрабатываются эффективные способы воспроизводства рябчиков, в том числе с использованием культуры тканей и органов растений *in vitro*.

Цель работы – индуцировать соматический эмбриогенез в тканях луковичных чешуй *Fritillaria dagana* и *F. sonnikovae*.

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* послужили луковичцы *Fritillaria dagana* и *F. sonnikovae*. Культивирование растительного материала проводили по общепринятым методикам Р.Г. Бутенко (1964), Ф.Л. Калинин и др. (1980). Развитие эмбриондов исследовали на постоянных микроскопических препаратах по методике З.П. Паушевой (1986). Полученные при культивировании *in vitro* морфогенные структуры и динамику их развития анализировали с помощью стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V 12 (с цветной цифровой программой AxioVision 4.8 для получения, обработки и анализа изображений) (Carl Zeiss, Germany).

В ходе работы установлено, что для изучаемых видов возможно развитие по пути соматического эмбриогенеза. При длительном культивировании *F. dagana* на среде Гамборга (B<sub>5</sub>) с 5 мкМ НУК формируется каллус, который проявляет морфогенную активность. В дальнейшем для развития соматических эмбриондов каллус необходимо культивировать на среде с 5,0 мкМ БАП. *F. sonnikovae* образует плотную каллусную культуру на среде Данстена и Шорта (BDS), характеризующуюся высокой эмбриогенной активностью, в том числе без регуляторов роста.

**FEATURES OF THE MORPHOGENESIS OF *FRITILLARIA DAGANA* AND  
*F. SONNIKOVAE* IN VITRO CULTURE**  
**Kulkhanova D.S., Erst A.A., Novikova T.I.**

Federal State Institution of Science Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch RAS, Russia, Novosibirsk, 630090, Zolotodolinskaya st., 101, tel.: +7(383)330-41-01, fax: +7(383)334-44-33, e-mail: dinarakulkhanova@yandex.ru, annaerst@yandex.ru, tin27@mail.ru

An efficient *in vitro* regeneration system with cell and tissue cultures is a prerequisite for biotechnological applications to plant improvement programs. Although whole plants can be regenerated by several ways from various species and explants, somatic embryogenesis is one of the most powerful morphogenetic of schemes plant development. Somatic embryogenesis is defined as a nonsexual developmental process resulting in differentiating of zygotic embryo-like structures from plant somatic cells. The advantage of somatic embryogenesis is to obtain genetically identical somatic embryos since there is no genetic recombination occurring during meiosis in sexual reproduction. Moreover, it is a fast, reliable, reproducible method for mass plant propagation.

*Fritillaria dagana* and *F. sonnikovae* are rare perennial plants, belonging to *Liliaceae* family mainly distributed throughout temperate climates of the Northern Hemisphere. All *Fritillaria* species contain variety of alkaloids with interesting phytochemical properties. They are widely used in traditional Chinese medicine. *Fritillaria dagana* and *F. sonnikovae* are highly ornamental and have attractive flowers which open in early spring. Plant propagation of this species by conventional methods is limited due to low germination of seeds and poor vegetative one. In connection with these effective methods of propagation of *Fritillaria* species have been developing, including using *in vitro* tissue culture and plant organs.

The aim of this work is to induce the somatic embryogenesis in bulb scale culture of *Fritillaria dagana* and *F. sonnikovae*.

The bulbs *Fritillaria dagana* and *F. sonnikovae* were starting material for the initiation of *in vitro* culture. The cultivation of the plant material was carried out by conventional methods, R.G. Butenko (1964), F.L. Kalinin et al (1980). The development of embryos was studied for permanent microscopic preparations by the method of Z.P. Pausheva (1986). The morphogenic structures have been obtained by *in vitro* culture and dynamics of their development has been analyzed with Carl Zeiss Stereo Discovery V 12 stereomicroscope with color digital AxioVision 4.8 software for taking, processing and analysis of images (Carl Zeiss, Germany).

The development along somatic embryogenesis concerning the species under study seems to have been established. Callus developing morphogenic activity can form under the long-term cultivation *F. dagana* on medium Gamborg (B5) with 5 mM NAA. Further for the development of somatic embryos callus needs to be cultivated in a medium with 5.0 mM BAP. *F. sonnikovae* forms a dense callus culture on medium Dunstan and Short (BDS), exhibiting high embryogenic activity, without growth regulators.



## ЭНДОГЕННЫЕ ОЛИГОСАХАРИНЫ, АКТИВИРУЮЩИЕ ИУК-ИНДУЦИРУЕМОЕ КОРНЕОБРАЗОВАНИЕ

Ларская И.А., Барышева Т.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, 420111, ул. Лобачевского, 2/31,  
факс: (843) 292-73-47, тел. (843) 231-90-39, e-mail: [pzl@mail.ru](mailto:pzl@mail.ru)

Процесс образования латеральных корней, которые в совокупности формируют архитектуру корня, представляет собой определенную последовательность событий, включающих деление инициальной клетки, развитие примордия и активной меристемы, из клеток которой продуцируется корень. На данный момент основное ограничение при исследовании корнеобразования остается плохая осведомленность об индукторах данного процесса. Ведущую роль в нем отводится ауксину. К настоящему времени выявлены ИУК-индуцируемые гены и получены мутанты по отдельным стадиям развития корня, однако инициация и регуляция ранних событий, таких как, например спецификация “founder cells” остаются самым интригующим моментом формирования боковых корней. Поиск эндогенных факторов, участвующих в активации инициальной клетки, является на данный момент наиболее актуальной проблемой при исследовании ризиогенеза. Такую роль могут выполнять фрагменты клеточной стенки, обладающие биологической активностью (олигосахарины), участие которых в процессах регуляции роста и развития растений уже не вызывает сомнения.

В нашей лаборатории была разработана методика получения эндогенных олигосахарinov из буферорастворимой фракции клеточной стенки проростков гороха, в основе которой лежит многоступенчатая хроматографическая очистка данной фракции. Объектом исследования служили экспланты, полученные из листьев и сегменты гипокотилей трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR1), содержащих репортерный ген *GUS* из *Escherichia coli* (ген, кодирующий фермент  $\beta$ -глюкуронидазу), под контролем ауксин-индуцируемого промотора гена *RolB* из *Agrobacterium rhizogenes*. Экспрессия *GUS* при обработке экзогенным ауксином вызывает образование фермента, гидролизующего субстрат (4-метилумбеллиферилглюкуронид) при расщеплении которого выделяются флуоресцирующие продукты. Следовательно, активность фермента, оцениваемая по интенсивности флуоресценции, фактически является детектором действия ауксина. Наличие маркерного гена позволило охарактеризовать как ранние (по *GUS*-активности), так и завершающие (по числу образованных корней) стадии ризиогенеза. Исследование динамики глюкуронидазной активности в процессе формирования корней на эксплантах выявило наличие двух пиков активности фермента при 3 мкМ ИУК. Гистологический анализ с использованием сегментов гипокотилей показал, что первый пик совпадает с образованием 5-6-слойных примордий, которые впоследствии не всегда развиваются до стадии зрелого корня. Второй пик, по всей вероятности, совпадает со стадией зрелой меристемы, которая сама является продуцентом ауксина. Полученный препарат олигосахарина повышал ИУК-индуцируемое количество корней, при одновременном внесении с гормоном в среду культивирования. Однако, наибольший эффект достигался при краткосрочной обработке эксплантов олигосахаринoм до добавления гормона. При этом отмечалось не только увеличение, но и ускорение ответной реакции по *GUS*-активности, а именно смещение первого пика влево, к началу культивирования эксплантов. Положение второго пика при этом не менялось. Таким образом, полученные данные указывают на то, что действие олигосахарина предшествует действию гормона на ранних этапах ризиогенеза.

Дальнейшие исследования, касающиеся определения состава и структуры полученного олигосахарина, а также гистологические и биохимические исследования с привлечением методов молекулярной биологии позволят лучше понять механизм ИУК-индуцируемого формирования корней и определить роль в этом процессе эндогенных олигосахаринoв.

**ENDOGENOUS OLIGOSACCHARINE ACTIVATING IAA-INDUCED  
ROOTING****Larskava I.A., Barisheva T.S.**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 420111, Lobachevsky str., 2/31, Kazan, Russia.  
fax: (843) 292-73-47, ph. (843) 231-90-39, e-mail: pzl@mail.ru

The process of lateral roots formation which in common form root architecture represents a certain sequence of events: initial cell division, primordia development and form an active meristem from which the root is produced. At present the main restriction at research of a rooting remains bad awareness about inductors of this process. The leading role in this process it is allocated for auxin. So far IAA-induced genes are revealed and mutants of different stages root developments are received, however initiation and regulation of early events, for example the "founder cells" specification remain the most intriguing moment of lateral root formation. Searching of the endogenous factors participating in initial cell activation is at present the most actual problem at research of rhizogenes. The fragments of a cell wall possessing biological activity (oligosaccharins) can carry out such role because their participation in processes of regulation of growth and development of plants doesn't raise doubts any more.

In our laboratory the technique of receiving endogenous oligosaccharins from buffer-dissolved fraction of a cell wall of pea shoots was development which is based on multistage chromatographic methodology of cleaning of this fraction. As object of research we use the leaf explants and hypocotyl segments of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR1) expressing the reporter gene GUS ( $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli*) under the control of auxin-inducible promoter rolB from *Agrobacterium rhizogenes*. Expression of GUS-protein induced by treatment with exogenous auxin can be estimate by cleaving fluorescent substrate (4-methylumbelliferylglucuronidase) and measuring the released fluorescence. Hence, the activity of auxin can be estimated by the amount of released fluorescence. Existence of a marker gene allowed to characterize both early (on GUS activity) and finishing (on roots number) stages of rooting. Research of dynamics of glucuronidase activity in the course of formation of roots on explants revealed existence of two peaks of activity of enzyme at 3 mkM IAA. The histological analysis with use of hypocotyl segments showed that the first peak coincides with formation of 5-6-layer primordia which not always develops subsequently to a stage of a mature root. The second peak, most likely, coincides with a stage of a mature meristem which itself is an auxin producer. The received oligosaccharin increased IAA-induced quantity of roots when add together with a hormone on medium of cultivation. However, the greatest effect was reached at short-term treatment of explants by oligosaccharin before hormone addition. Thus it was noted not only increase, but also acceleration the response on GUS activities, namely shift of the first peak to the left; by the beginning of cultivation of explants. The provision of the second peak thus didn't change. The obtained data specify that oligosaccharin action precedes hormone action at early stages of rhizogenes.

Further histological and biochemical researches with attraction of methods of molecular biology will allow to better understand mechanism of IAA-induced roots formation and to define a role in this process endogenous oligosaccharin.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ИЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ САДОВЫХ КУЛЬТУР

Муратова С.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, 393760, ул. Интернациональная, 101, факс (47545) 5-26-35, тел. (47545) 5-31-37, e-mail: [smuratova@yandex.ru](mailto:smuratova@yandex.ru)

Рассмотрены вопросы индукции морфогенеза из изолированных соматических тканей плодовых и ягодных культур. Анализ результатов исследований показал влияние на частоту регенерации адвентивных побегов генотипа, вида и концентрации регуляторов роста, углеводов, типа экспланта и его происхождения, ориентации на питательной среде и других факторов. В ходе изучения влияния минерального состава сред на частоту адвентивного морфогенеза установлено, что среда MS (Murashige, Skoog, 1962) является наиболее универсальной. На этой среде получены адвентивные побеги у всех включенных в наши исследования генотипов. Использовали пять углеводов – сахарозу, глюкозу, мальтозу, фруктозу, лактозу. Наиболее активно стимулировали образование и рост каллуса и дифференциацию адвентивных почек и побегов глюкоза и сахароза при концентрации углевода в среде 30 и 40 г/л. Изучали влияние на морфогенез ягодных и плодовых культур цитокининов и ауксинов в различных сочетаниях и соотношениях. Применение 6-БАП оказалось более эффективным, чем добавление в среду кинетина, зеатина или 2-иР. Для большинства видов и сортов представителей рода *Rubus* наибольшая частота морфогенеза из листовых эксплантов достигнута с применением 2,0-3,0 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,5 мг/л ИУК или ИМК. Максимальная частота прямой регенерации наблюдается на средах, содержащих ИМК. На средах с 2,4-Д, получили наибольшее число форм, несущих соматональные изменения. Наивысшая частота регенерации адвентивных побегов плодовых культур получена на средах, содержащих 6-БАП или ТДЗ в концентрации 4,0-5,0 мг/л в сочетании с одним из ауксинов. Оптимальное соотношение цитокинин : ауксин в питательной среде составляет не менее 10:1. Наибольшее число побегов-регенерантов на один эксплант образуется, если регенерация происходит с образованием значительных масс морфогенного каллуса как у сливы сорта Стартовая. В этом случае число адвентивных побегов-регенерантов на один листовой диск может доходить до 20 и более. При оптимальном возрасте листовой ткани максимальная частота регенерации адвентивных побегов сливы сорта Стартовая составляет 90-95% , клоновых подвоев яблони – 70-80%. Ризогенез легко проходит и при использовании каллусов, полученных из тканей растений, находящихся в культуре длительное время. На средах, содержащих 0,5-1,0 мг/л ауксина и 1,0-2,0 мг/л тиазурина или зеатина, корни формировались в массовом порядке. Например, на среде с 0,5 мг/л НУК и 2,0 мг/л зеатина, 100% эксплантов вишни сорта Жуковская формировали хорошо развитые корни с корешками второго и третьего порядка, количество их на эксплант доходило до 15-20. Изучали влияние типа исходного экспланта на частоту адвентивной регенерации. Листовые экспланты оказались лучшими при работе с плодовыми и ягодными культурами. Основания листьев с черешками с дистальной части побега были оптимальным типом эксплантов для регенерации побегов. По нашим данным, если использовать листовые ткани одной физиологической зрелости, нет существенной разницы с каких (укорененных или неукорененных) побегов они срезаны. В наших опытах использование листового материала, срезанного с растений открытого грунта, позволило значительно повысить частоту регенерации побегов сливы и абрикоса по сравнению с растениями, культивируемыми *in vitro*. Ориентация листьев на среде также важна. Лучшие результаты получены при помещении листовых эксплантов адаксиальной стороной к поверхности питательной среды.

**THE DEVELOPMENT OF PLANT REGENERATION METHODS FROM ISOLATED SOMATIC TISSUES OF HORTICULTURAL CROPS****Muratova S.A.**

Michurinsk State Agrarian University Michurinsk, Russia 393760 Internationalnaya str., 101, fax (47545) 5-26-35, tel. (47545) 5-25-07, e-mail: [smuratova@yandex.ru](mailto:smuratova@yandex.ru)

Methods of regeneration of isolated tissues are the basis of biotechnological methods aimed at increasing the genetic diversity of agricultural crops. Problems of morphogenesis' induction from isolated somatic tissues of fruit and berry cultures were studied. The analysis of experimental results showed the influence of genotype, type and concentration of the growth regulators, carbon, optimum explants' type and its origin, orientation on medium and other factors on the frequency of adventitious shoot regeneration.

In the course of studying the influence of the mineral composition of the media on the frequency of adventitious morphogenesis it has been found that the medium MS (Murashige, Skoog, 1962) is the most universal produced Adventitious shoots of all included in our study genotypes have been on this medium. Five carbohydrates are used sucrose, glucose, maltose, fructose, lactose. In our experiments, glucose and sucrose at a carbohydrate concentration of 30 and 40 g/l stimulated the formation and growth of callus and differentiation of adventitious buds and shoots the most actively. We conducted a study of the effect cytokinin and auxin in various combinations and proportions on the morphogenesis of the berry and fruit crops. Using 6-BAP was more effective than making a medium kinetin, zeatin or 2-izopentiladenin. For most species and varieties of genus *Rubus* highest frequency of leaf morphogenesis is achieved using 2.0 -3.0 mg/l 6-BAP in combination with 0.5 mg /l of IAA or IBA. The maximum frequency of direct regeneration is observed in the media containing IBA. On media containing 2,4-D there have been received by the maximum forms bearing somaclonal changes. The best regeneration for fruit crops was observed on media containing 6-BAP or TDZ at a concentration of 4.0-5.0 mg/l in combination with one of the auxin. The optimum ratio of cytokinin: auxin in the medium is at least 10:1. The highest mean number of shoots regenerated per explant formed if the recovery proceeds with the formation of large masses of morphogenic callus like a plum varieties "Startovaya". In this case the number of adventitious shoots regenerated per leaf disc may reach 20 and more. At the optimum age of leaf tissue maximum frequency of regeneration is 90-95% plum varieties "Startovaya" and 70-80% of clonal apple rootstocks. Rhizogenesis is easily held also using calli derived from plant tissues, which are culture for prolonged time. On media containing 0.5-1.0 mg/l auxin and 1.0-2.0 mg/l zeatin or thidiazuron, roots were formed en masse. For example, a medium with 0.5 mg/l NAA and 2.0 mg/l zeatin, 100% explants cherry varieties Zhukovskaja formed well developed roots, its number per explants' reached 15-20.

We studied the influence of explant source type the on frequency of adventitious shoots regeneration. Leaf explants were the best when working with fruit and berry cultures. The bases of leaves with petioles from distal part of the shoot were the optimal explants for shoot regeneration. According to our data, if you use the leaf tissue of the same physiological maturity, there is no significant difference from what kind of shoots (rooted or unrooted) they are cut off. In our experiments, the use of leaf material cut off from the plant in the open ground significantly increases the frequency of shoot regeneration of plum and pineapple varieties compared to plants cultivated in vitro. However the results were not consistently reproducible data, moreover, they are largely determined by the age of the leaf tissue, allowing the taking of leaves growing in vivo, only a short period of time. The position of the leaves in the culture medium was also impotent. The best results were obtained when the leaves were placed with their adaxial side in contact with the medium surface. Studying the influence of different factors on the efficiency of plant regeneration in vitro we obtained the data, which suggest that the appropriate optimization of the nutrient media, culturing conditions and selecting the correct explants allows achieving morphogenesis of almost any genotype.

**ВЛИЯНИЕ ЧУЖЕРОДНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА  
АНДРОГЕНЕЗ *IN VITRO* У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ****Осадчая Т.С., Першина Л.А., Девяткина Э.П.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090, пр. Академика Лаврентьева, 10, факс: +7(282)333-12-78;

тел: +7(383) 363-49-27, e-mail: kort\_t@mail.ru

Культивирование пыльников является наиболее распространенным методом получения дигаплоидных (гомозиготных) линий. У гомозиготных организмов действие рецессивных генов проявляется наряду с доминантными, поэтому при работе с ними значительно сокращается время отбора целевых генотипов. В этом отношении интерес для фундаментальных исследований и практических целей представляют дигаплоидные линии, носители чужеродного генетического материала с генами, определяющими устойчивость к биотическим и абиотическим факторам. В данной работе были изучены особенности андрогенеза у сортов и перспективных форм яровой мягкой пшеницы, созданных в Западной Сибири и несущих генетический материал, интрогрессированный от других видов злаков. В работу были включены генотипы с пшенично-ржаной транслокацией 1RS.1B (с кластерами генов *Lr26/Sr31/Yr9/Pm9*); сорта, сочетающие пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1B и пшенично-пырейную транслокацию 7DL-7Ai (носитель генов *Lr19/Sr25*); формы гибридного происхождения, имеющие помимо выше приведенных пшенично-чужеродных транслокаций, генетический материал от *T.timopheevii* и *T.tauschii*, и от *H.marinum* ssp. *gussoneanum*. Для разных генотипов подобраны условия предкультивирования и культивирования пыльников и эмбрио-подобных структур. Установлено, что реакция пыльников на условия культивирования, частота образования эмбрио-подобных структур и зеленых проростков определяется влиянием чужеродного генетического материала в зависимости от генотипической среды изученных генотипов пшеницы, а также условий выращивания растений-доноров. Спонтанное образование дигаплоидов в процессе культивирования эмбрио-подобных структур не зависит от генотипа. Выделены формы гибридного происхождения и сорта мягкой пшеницы с высоким потенциалом к андрогенезу в культуре пыльников. Получено многообразие дигаплоидных линий, включенных в селекционный процесс и используемых в качестве моделей для генетических исследований.

**THE EFFECT OF ALIEN GENETIC MATERIALS TO ANDROGENESIS IN VITRO OF COMMON WHEAT****Osadchaya T.S., Pershina L.A., Devyatkina E.P.**

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, 630090, Academic Lavrentiev Av. 10, fax +7(282)333-12-78; tel: +7(383) 363-49-27, e-mail: kort\_t@mail.ru

Anther culture is the most common method of obtaining doubled haploid (homozygous) lines. The effect of recessive genes in homozygous organisms manifests itself along with the dominant genes, so when you work with them significantly reduces the time of selection of target genotypes. In this regard, doubled haploid lines carrying alien genetic material with the genes that determine resistance to biotic and abiotic factors are of interest to fundamental research and practical purposes. In this work we have studied the characteristics of androgenesis in varieties and promising forms of spring wheat, created in Western Siberia and carrying an alien genetic material that has been transferred from other cereals. The genotypes with wheat-rye translocation 1RS.1B (with clusters of genes Lr26/Sr31/Yr9/Pm9), varieties with the wheat-rye translocation 1RS.1B and wheat-wheatgrass translocation 7DL-7Ai (the carrier of genes Lr19/Sr25); hybrid forms which in addition to the above mentioned wheat-alien translocation have a genetic material from *T.timopheevii*, *T.tauschii* and *H.marimum ssp.gussoneanum*. The conditions precedent to the cultivation of anthers, conditions of anther culture and embryo-like structures for the different genotypes were selected. It was found that the reaction of anther to the culture conditions, the frequency of formation of embryonic-like structure and green seedlings are influenced by alien genetic material depending on the background of wheat genotypes and the conditions of donor plant cultivation. It was shown that spontaneous formation of doubled haploids during cultivation of embryo-like structures is not dependent on genotype. The hybrid genotypes and varieties of common wheat with a high potential for androgenesis in anther culture were revealed. A number of doubled haploid lines received in this research were included in breeding and genetic investigation.

**ВЛИЯНИЕ ТИДИАЗУРОНА НА ОРГАНОГЕНЕЗ ПОБЕГОВ *DISANTHUS CERCIDIFOLIUS* MAXIM. (*HAMAMELIDACEAE*)****Новикова Т.И., Полубоярова Т.В.**

Федеральное государственное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Золотодолинская, 101, тел. +7(383)330-41-01, факс: +7(383)334-44-33, e-mail: [tin27@mail.ru](mailto:tin27@mail.ru)

*Disanthus cercidifolius* Maxim. декоративный листопадный вид из семейства *Hamamelidaceae*, природными местообитаниями которого являются леса Китая и Японии. Этот кустарник известен благодаря сердцевидной форме листьев, которые осенью становятся темно-малиновыми, пурпурными и оранжевыми.

*Disanthus cercidifolius* размножают черенками, изолированными в середине лета, и семенами. Однако, традиционные методы размножения не могут удовлетворить растущие потребности рынка в этом высоко декоративном растении. Технологии *in vitro* являются альтернативным подходом в решении задачи быстрого и массового размножения ценных растений. В то же время работы по микроразмножению *Disanthus cercidifolius* единичны.

В течение последних десятилетий было синтезировано несколько соединений для индукции регенерационного потенциала растительной клетки. Одно из них, тидиазурон (ТДЗ), исходно было синтезировано для дефолиации хлопка. ТДЗ, замещенное соединение фенилмочевины (N-фенил-1,2,3-тиадиазол-5-илмочевина), является эффективным биорегулятором, который проявляет цитокининовую активность в различных системах, включая как органогенез, так и соматический эмбриогенез из различных эксплантов широкого круга видов растений.

Данное исследование было предпринято с целью определения влияния различных концентраций и способов обработки ТДЗ на образование побегов *Disanthus cercidifolius* *in vitro*.

В качестве эксплантов использовали пазушные почки. После стерилизации экспланты были помещены на среду МС, содержащую 0.5 мг л<sup>-1</sup> БАП. Пролиферация побегов была достигнута на среде МС, дополненной 0.25, 0.5, 0.75 ТДЗ в течение 6 недель. Однако, продолжительное культивирование на средах содержащих ТДЗ индуцирует нарушения развития примордиев почек и побегов. Для преодоления мальформации экспланты предварительно обрабатывали 30 мкМ ТДЗ в течение 4 час и затем переносили на среду МС, содержащую 0.5 БАП. Гистологические и морфологические исследования выявили формирование множества примордиев адвентивных побегов. В результате был оптимизирован протокол регенерации побегов *Disanthus cercidifolius* с использованием предобработки ТДЗ. Обсуждаются последние достижения в области применения ТДЗ в культуре ткани растений.

**THIDIAZURON-INDUCED SHOOT ORGANOGENESIS OF DISANTHUS  
CERCIDIOFOLIUS MAXIM. (HAMAMELIDACEAE)****Novikova T.I., Poluboyarova T.V.**

Federal State Institution of Science Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch RAS, Russia, Novosibirsk, 630090, Zolotodolinskaya st., 101, tel.: +7(383)330-41-01, fax: +7(383)334-44-33, email:[tin27@mail.ru](mailto:tin27@mail.ru)

*Disanthus cercidifolius* Maxim. is an ornamental deciduous species that belongs to the family *Hamamelidaceae*, it's native to woodland habitats in China and Japan. This shrub is known for its heart-shaped leaves turning deep crimson, purple and orange in autumn.

*Disanthus cercidifolius* is propagated by cuttings isolated in the middle of summer or through seeds. However, the conventional methods cannot meet the increasing demand of this species as a highly ornamental plant. In vitro culture techniques are the alternative approach for a rapid and large-scale multiplication of valuable plants. At the same time very few studies have been carried out on micropropagation of *Disanthus cercidifolius*.

During the last decades several compounds have been synthesized to induce regeneration potential in plant cell. One of them is thidiazuron (TDZ) that was initially synthesized for defoliation of cotton. TDZ, a substituted phenylurea (N-phenyl-1, 2, 3 thidiazol-5-ylurea), is an effective bioregulant, which exhibits cytokinin like activity in various culture systems, including both organogenesis and somatic embryogenesis from different explants of a wide array of plant species.

This study has been performed to determine the effects of TDZ at various concentrations and methods of treatment on the in vitro shoot formation of *Disanthus cercidifolius*.

Axillary buds were used as explants. After sterilization explants were placed into MS medium supplemented with 0.5 mg.l<sup>-1</sup>BA. Proliferation of shoots was achieved on MS medium supplemented with 0.25, 0.5, 0.75 mg l<sup>-1</sup>TDZ. However, continuous culture on TDZ-containing media induced abnormal development of bud primordia and shoots. To avoid malformation the explants were pretreated with 30 µM TDZ for 4h before proliferation stage and transferred to an MS medium supplemented with 0.5 mg.l<sup>-1</sup> BA. Histological and morphological observations of explants revealed a numerous formation of adventitious shoots primordia. As the result we have successfully optimized shoot regeneration of *Disanthus cercidifolius* by TDZ pretreatment. Recent advancements in TDZ application in plant tissue culture are discussed.



**ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИТЕЛЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO ОБЛЕПИХИ (*HIPPORHAE RHAMNOIDES L.*)****Плаксина Т.В.**

Государственное научное учреждение Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко Россельхозакадемии, Барнаул, 656045, Змеиногорский тракт 49, факс: (7-3852) 68-50-65, тел. (3852) 68-45-75, e-mail: [tplaksina@mail.ru](mailto:tplaksina@mail.ru)

В культуре тканей для приготовления рабочих растворов регуляторов роста в качестве растворителей используют щелочи и кислоты, реже диметилсульфоксид (DMSO). Известно, что DMSO обладает способностью проникать через биологические мембраны, увеличивает и усиливает действие некоторых веществ и является мощным антисептиком.

Задача настоящего исследования – оценить влияние разных растворителей регуляторов роста – 0,1 N NaOH и DMSO на морфогенез у одиночных побегов, полученных из корней семян облепихи в результате прямого органогенеза. Регуляторы роста, бензиладенин (БА) 1,0 мг/л и ИУК 0,5 мг/л, растворенные в щелочи или в DMSO добавляли в питательную среду WPM после автоклавирования. Раствор, где в качестве растворителя использовали щёлочь, стерилизовали с помощью фильтра Millipore с размером пор 0,20µm.

В результате проведенного эксперимента было отмечено 100% образование адвентивных органов (почек и побегов) у эксплантов, где в качестве растворителя использовали DMSO. Ранжирование на группы по количеству адвентивных органов на один эксплант было следующим: 46,2% эксплантов сформировало более 50 адвентивных органов; 30,8% до 15 адвентивных органов и 23% от 15 до 30 адвентивных органов.

На питательной среде, где регуляторы роста были растворены в 0.1 N NaOH, 92,4% экспланта сформировали в основании адвентивные органы. При ранжировании на группы, в каждой группе было одинаковое количество эксплантов и составило 30,8% в каждой.

Полученные результаты могут свидетельствовать об усилении действия регуляторов роста на морфогенез при использовании в качестве растворителя DMSO

*Исследования выполнены при финансовой поддержке SI (Swedish Institute)*

**EFFECT SOLVENT OF HORMONES ON INDUCTION OF MORPHOGENESIS  
SEABUCKTHORN (*HIPPOPHAE RHAMNOIDES L.*) IN VITRO**

**Plaksina T.V.**

The M.A. Lisavenko Research Institute of Horticulture for Siberia 49, Zmeinogorskiy Tract, Barnaul, 656045, Russia, phone: (011-7-3852) 68-45-75,  
e-mail: tplaksina@mail.ru

A medium where growth regulators were dissolved in DMSO all explants (100%) formed the base clumps of adventitious buds and shoots. At 46.2% of explants formed more than 50 of adventitious buds and shoots per explant and 30.8% of explants formed upto 15 adventitious buds and shoots per explant and 23% of explants formed from 15 to 30 adventitious buds and shoots per explant A medium where growth regulators were dissolved in 0.1N NaOH 92.4% explants formed the base clumps of adventitious buds and shoots. Each group got the same number of explants that formed adventitious buds this on 30.8%.

*This issue was supported by Swedish Institute (SI).*

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА *ALLIUM KARATAVIENSE* КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*****Полубоярова Т.В., Новикова Т.И.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный Сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, г.Новосибирск, ул. Золотодолинская,101, факс: (383)330-19-86, тел. (383)339-98-29, e-mail: [tanita11@mail.ru](mailto:tanita11@mail.ru)

*Allium karataviense* Regel., лук каратавский, широко известен как высоко декоративное луковичное растение благодаря парным, широким, сизо-зеленым листьям с фиолетовым оттенком, особенно снизу, и звездчатым, розовато-белым цветкам, собранным в круглые соцветия. Этот вид является редким и эндемичным обитателем горных районов

Тянь Шаня и Памира. Высокая стоимость растительного материала, ограничивающая коммерческое использование этого вида, является следствием чрезвычайно низкой скорости размножения и слабым прорастанием семян. Культура *in vitro* имеет значительный потенциал как метод вегетативного размножения декоративных луковичных растений.

Цель настоящего исследования - проанализировать начальные стадии развития побегов *A. karataviense* из цветочных бутонов в культуре *in vitro*.

В качестве эксплантов использовали бутоны цветков на разных стадиях развития. Стерилизацию проводили с использованием в качестве стерилизующего агента 0,2% раствор хлорида ртути (II) (7 – 9 мин), после многократно промывали в стерильной воде. Затем бутоны высаживали на среду BDS с добавлением 2 мг/л БАП и 2 мг/л НУК. Для изучения процессов заложения побеговых структур бутоны и экспланты фиксировали в растворе FAA в течение месяца с промежутком в 1-3 дня, а затем готовили постоянные гистологические препараты по методике Паушевой (1986).

На 3-5 день культивирования бутонов на питательной среде отмечали распускание цветков. Морфологические изменения наблюдаемые как разрастание ткани в основании бутонов видны через две недели культивирования, в то время как гистологические срезы показывали клеточные изменения уже через 3 дня после введения в культуру. Гистологический анализ выявил наличие мелких эпидермальных клеток в месте срастания тычинок и листочков околоцветников, также как и между тычинками и завязью. К 3 дню эпидермальные клетки подвергались антиклинальным делениям, в то время как эпидермальные клетки листочка околоцветника не принимали участия в этом процессе. В результате этих клеточных делений появились меристематические центры, формирующие бугорки на поверхности цветочных эксплантов. Дальнейшее их развитие привело к появлению примордиев побегов.

Настоящее исследование морфогенеза *A. karataviense* из цветочных бутонов в культуре *in vitro* выявило, что новые побеги развиваются из эпидермальных слоев тычиночных нитей в области их срастания с листочками околоцветника.

**MORPHOGENESIS PECULIARITIES OF *ALLIUM KARATAVIENSE* IN VITRO CULTURE****Polubovarova T.V., Novikova T.I.**

Federal State Institution of Science Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch RAS, Russia, Novosibirsk, 630090, Zolotodolinskaya st., 101, tel.: (383) 339-98-29, fax: (383)330-19-86, e-mail: tanita11@mail.ru

*Allium karataviense* Regel. is commonly known as a highly ornamental bulbous plant due to the broad, paired, glaucous green leaves tinged with purple, especially beneath, and star-shaped, pinkish-white flowers in round inflorescences. This species is a rare and endemic inhabitant of the mountain regions of Tien Shan and Pamirs. The high price of planting material that restricts the commercial use of this species is a consequence of the extremely low multiplication rate and poor seed germination. In vitro cultures have a great potential as a method for vegetative propagation of ornamental bulbous plants.

The aim of the present study was to analyze the initial stages of *A. karataviense* shoot development from flower buds in vitro culture.

The flower buds at different stages of development were used as a source of explants. This material was surface sterilized for 7 -9 min with 0.2% mercuric chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) and rinsed with sterile distilled water 3 times. To induce the shoots the isolated buds were inoculated on the BDS medium, supplemented with 2.0 mg l<sup>-1</sup> BA (6-benzylaminopurine) and 2.0 mg l<sup>-1</sup> NAA ( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid). To study the initial stages of organogenesis the buds were fixed in the FAA solution during the month with an interval of 1-3 days. The permanent preparations were made according to standard cytological procedures method of Pausheva (1986).

Flower buds opening were observed at 3-5 days of culture on a nutrient medium.

Morphological changes observed in the tissues proliferation at the base of the buds were visible after two weeks of culture, while histological sections displayed cellular modifications as early as 3 days post culture. The histological analysis revealed the presence of small epidermal cells in the fusion of the stamens and tepals, as well as in the area between the stamens and ovary. By day 3 the epidermal cells of the filament underwent anticlinal divisions, whereas the epidermis of the tepal did not participate in the process. As a result of these cell divisions new meristematic centers appeared forming protuberances on the surface of flower explants. Their further development resulted in appearance of shoot primordia.

The present study of morphogenesis from flower buds of *A. karataviense* in vitro culture revealed that new shoots developed from the epidermal layers of the filaments in the area of their fusion with the tepals.

**ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИМК НА РИЗОГЕНЕЗ  
КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ IN VITRO****Пронина И.Н.**

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства им. И.В. Мичурина, 393774, г. Мичуринск, ул. Мичурина, 30, факс: (07545) 2-07-61, тел. (07545) 2-07-61, e-mail: [invitro82@yandex.ru](mailto:invitro82@yandex.ru)

Первостепенное значение на этапе ризогенеза в условиях *in vitro* отводится ауксину: типу, концентрации и способу его воздействия на микропобег. Наиболее простым и распространенным способом применения индуктора корнеобразования является введение его непосредственно в среду. Однако длительное воздействие ауксина может стимулировать образование каллуса, который ингибирует процессы ризогенеза.

В связи с этим целью наших исследований явилось изучение влияния длительности воздействия ИМК на ризогенную активность клоновых подвоев яблони.

Для индукции ризогенеза микропобеги подвоев яблони 54-118 и ММ 106 в течение 4, 7 и 10 дней выдерживали на агаризованной питательной среде 1/2МС с ИМК в концентрациях 2,0; 2,5 и 3,0 мг/л, после чего проводили их пересадку на среду свободную от гормонов, контроль – без пересадки. Начало корнеобразования отмечалось уже через 10 дней при 4-х дневном воздействии и всех концентрациях индуктора ризогенеза, а при 7 и 10-дневном – только лишь через 16 дней. Через 4 недели культивирования укореняемость достигала 83-100 %.

Лучшие результаты у подвоя 54-118 как по укореняемости (100 % через 2,5 недели культивирования), так и качеству корневой системы были получены в варианте с концентрацией ИМК 2,0 мг/л и 7-дневном воздействии, а у ММ 106 – при более высокой концентрации. Увеличение длительности содержания микропобегов на среде с ауксином до 10 дней снижало не только укореняемость (на 8,3-33,3 %), но и количество корней (в 1,5-3,1 раза). Постоянное присутствие ауксина в среде (контроль) способствовало каллусообразованию, особенно при высоких концентрациях ИМК, и укореняемость была ниже на 6,4-50,0 %, чем в опытных вариантах. Следует отметить, что при воздействии ИМК в течение 10 дней также наблюдалось каллусообразование, но очень слабое, что вероятно повлияло на некоторое снижение укореняемости подвоев.

Таким образом, анализ полученных результатов свидетельствует о том, что постоянное присутствие ауксина в питательной среде ингибирует корнеобразовательные процессы. Кратковременное воздействие ауксина на микропобеги предпочтительнее в связи с ускорением процесса ризогенеза, увеличением процента укореняемости, слабым каллусообразованием или его отсутствием.

**THE EFFECT OF DURATION OF IBA ON APPLE CLONAL ROOTSTOCK RHIZOGENESIS IN VITRO****Pronina I.N.**

I.V. Michurin Research Institute of Horticulture, Michurin street 30, Michurinsk 393774  
Fax: (07545) 2-07-61, phone: (07545) 2-07-61, e-mail: [invitro82@yandex.ru](mailto:invitro82@yandex.ru)

Auxin, its type, concentration and effect on microshoot is of prime importance at the rhizogenesis stage in vitro. Introduction of root formation inductor into medium is considered to be the most easy and widespread method of its application. However long-term application of auxin will stimulate callus formation inhibiting rhizogenesis formation.

Therefore our studies were aimed in determination of the effect of IBA duration effect on apple clonal rootstock rhizogenesis activity.

For induction of rhizogenesis apple rootstock 54-118 and MM106 microshoots were maintained on agar medium containing 1/2MC and IBA in concentrations 2,0; 2,5 and 3,0 mg l<sup>-1</sup> for 4, 7 and 10 days. Then the transfer followed on medium free of hormones, in control the transfer wasn't used. Shoot formation was observed in 10 days after 4 day exposure to rhizogenesis inductor applied in all concentrations. Shoot formation was revealed in 16 days after 7 and 10 day exposure. Four week cultivation resulted in 83-100 % rooting.

2,0 mg l<sup>-1</sup> IBA and 7 day exposure were the most efficient for rootstock 54-118 relatively bothrooting (100 % in 2.5 week cultivation) and root system quality, MM106 rootstock required more high concentration. Increase of duration of microshoot maintaining on agar medium up to 10 days reduced both rooting (by 8,3-33,3 %) and root quantity (in 1,5-3,1 times). Continuous auxine presence in medium (control) promoted callus formation, especially at IBA high concentrations, rooting being 6,4-50,0 % lower compared with experiment treatments. It should be mentioned that 10 day effect of IBA resulted in callus formation, but a very poor one that possibly was responsible for some reduction of rootstock rooting.

Therefore the analysis of the results obtained confirms that continuous presence of auxin in medium inhibits root formation processes. Short-term effect of auxin on microshoots is preferred due to advanced rhizogenesis process, increase of rooting per cent, poor callus formation or its lack.

## ВЛИЯНИЕ РАСПОЛОЖЕНИЯ ЭКСПЛАНТА В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ НА СПОСОБНОСТЬ К МИКРОРАЗМНОЖЕНИЮ

Сашенко М.Н.

Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова Россельхозакадемии; 396030, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 86, тел. 8(47340) 5-33-27, e-mail: samani84@mail.ru

К настоящему времени установлено, что необходимость получения высокопродуктивных, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам сортов и гибридов гороха требует использования современных методов биотехнологии, ускоряющих селекционный процесс и повышающих его эффективность. В процессе селекции отбор и сохранение ценных исходных и полученных форм затрудняется. Нередко гибель зародышей возникает на ранних стадиях развития. Поэтому трудности получения необходимых признаков затягивают всю селекционную работу.

С целью повышения результативности селекционных работ для размножения ценных селекционных номеров в настоящее время разрабатываются методы на основе культуры изолированных тканей. Биотехнологические методы дают возможность получать и сохранять генетически однородный материал и проводить направленные отборы.

Наши исследования были направлены на поиск оптимальных условий культивирования регенерантов гороха в культуре тканей. Исходным материалом для исследований служили сорта и линии гороха селекции ВНИИСС.

Анализ литературных источников показал, что для проведения биотехнологических исследований на горохе в качестве эксплантов для получения регенерантов использовали верхушки стеблей, междоузлия, корни и листовые пластинки. Для этого в опытах были исследованы питательные среды с большим содержанием гормонов.

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

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

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

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

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

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

**INFLUENCE OF THE EXPLANTS ORIENTATION IN TISSUE CULTURE ON  
ABILITY TO MICROPROPAGATION****Saschenko M.N.**

State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Sugar Beet. A.L. Mazlumov Agricultural 396030, Voronezh Region, Ramon Rayon, VNIISS, 86, tel. 8 (47340) 5-33-27, e-mail: [samani84@mail.ru](mailto:samani84@mail.ru)

It has been established that the need for highly resistant to biotic and abiotic factors of varieties and hybrids of peas requires the use of modern biotechnology methods that accelerate the breeding process and improve its effectiveness. In the process of selection and breeding conservation of valuable input and derived forms is difficult. Often the death of the embryo occurs in the early stages of development. Therefore, the difficulty of obtaining the necessary evidence tighten all breeding work.

In order to improve the efficiency of selection works for breeding stock selection numbers are being developed methods based on the culture of isolated tissues. Biotechnological methods enable us to obtain and maintain genetically homogeneous material and conduct directed selection.

Our research has focused on the search for optimal culture conditions of regenerated pea in tissue culture. The starting material for research were varieties and breeding lines of pea VNIISS.

Analysis of the literature showed that for biotechnology research on peas as explants for regenerants used tops of stems, internodes, roots and leaf blades. To do this, experiments were investigated nutrient media containing large amounts of hormones.

However, the use as explants of different parts aseptic pea seedlings - apical part of the stem, part of the stem with axillary bud, and their location in a nutrient medium (vertical or horizontal) yielded interesting data.

During the study it was observed that the cultivation of the apical parts of the plant in a horizontal position on nutrient media with moderate hormonal (BAP 0.5 + IMC / IAA 0.1) the multiplication factor is 2.

The study of higher concentrations of hormones positive results were achieved. The vertical arrangement of seedlings (partial immersion) on medium with BAP 0.5 + 0.1 ISB helped to improve output mikroklonov to 3 pieces with a single administration of explant and up to 4 load at elevated hormonal environment (BAP 5.0 + NAA 0.2).

Active growth and development of the explants was observed on the stem with axillary bud, placed horizontally on the surface of the culture medium (BAP 5.0 + NAA 0.2). Multiplication factor for this variant environment was 5, while in the medium with BAP 0.5 + 0.1 IMC does not exceed 2.

Cultivation parts of the stem with axillary bud vertically on the medium did not increase the multiplication factor. On media with increased hormonal stress observed hydration of tissues, but the death of explants was observed. Multiplication factor was at 2 regenerants from one entered.

Thus, micropropagation peas can lead to media with different hormone load, it should recognize the position of the explants on medium. For higher concentrations (BAP 5.0 + NAA 0.2) is optimal horizontal position, to moderate (BAP 0.5 + IBA 0.1) - vertical.



**УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЭМБРИОГЕННЫХ  
КЛЕТОЧНЫХ МАСС МОРКОВИ В СВЯЗИ С СОМАТИЧЕСКИМ  
ЭМБРИОГЕНЕЗОМ**

**Серебрякова В.Н., Моисеева Н.А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, 127276, ул. Ботаническая, 35, факс: (495)9778018, тел. (499)2318329, e-mail: [morphogenesis@mail.ru](mailto:morphogenesis@mail.ru)

В культуре клеток моркови развитие соматических зародышей из одиночных клеток сопряжено с формированием проэмбриогенных клеточных масс ( ПЭМ ), которые представляют собой небольшие клеточные агрегаты. Стимуляция их дальнейшего развития в соматические зародыши осуществляется удалением гормона из среды.

В качестве ПЭМ в работе использовали клеточную фракцию 100-38мкм, выделенную из 10 суточной эмбриогенной культуры, поддерживаемой на среде, содержащей 0,2мг/л 2,4D, и суспензионную культуру, которую получали после культивирования фракции 100-38мкм на среде без гормона в течение 2 суток. Фиксацию материала проводили по методу Хеплера в присутствии экзогенного кальция и последующей обработки феррицианидом калия, что позволяет получить селективное контрастирование внутриклеточных мембран. Для выявления полисахаридных и гликопротеидных включений клеточных стенок использовали конканавалин А.

Фракция 100-38мкм представлена одиночными клетками и клеточными агрегатами, состоящими из одних меристематических клеток. Кроме того встречаются агрегаты, в которых наряду с единичными меристематическими клетками обнаруживаются сильно вакуолизованные и мертвые клетки. Электронно-микроскопический анализ проводили на клеточных агрегатах, поскольку в используемых нами условиях регенерации соматических зародышей из одиночных клеток не происходит.

Цитоплазма меристематических клеток, образующих агрегаты, насыщена свободными рибосомами. Плазмалемма клеток без инвагинаций с редко встречающимися плазмалемматическими. Короткие ретикулярные тяжи имеют неравномерное распределение рибосом и немногочисленны. Цистерны диктиосом собраны в стопки по 3-4 и окружены везикулами. Структура митохондрий хорошо развита. Отмечается гетерогенность клеток по наполненности пластид крахмалом. Сильно вакуолизованные клетки, встречающиеся в составе агрегатов, характеризуются более скудной ультраструктурой.

Культивирование фракции 100-38мкм на среде без гормона в течение двух суток приводит к изменениям ультраструктуры клеточных агрегатов. В первую очередь отмечается повышение электронной плотности клеточных стенок и появление электронно-плотного материала фибриллярной структуры на поверхности наружных клеток агрегатов и в межклетниках. Кроме того, наблюдается увеличение извилистости плазматической мембраны, а также появление многочисленных везикул как в периплазматическом пространстве, так и цитоплазме вблизи плазмалеммы. Развитая система эндоплазматического ретикулюма и диктиосом активно формируют везикулярные структуры. Появление мультивезикулярных тел как в цитоплазме, так и в вакуолях, свидетельствуют об активации экзо- и эндоцитоза.

**ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS OF CARROT PROEMBRYOGENIC CELL MASSES RELATED WITH SOMATIC EMBRYOGENESIS**Serebryakova V.N., Moiseeva N.A.

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul.35, Moscow, 123276 Russia, fax: 7(495)9778018, tel. (499)2318329, e-mail: [morphogenesis@mail.ru](mailto:morphogenesis@mail.ru)

Intensive work has been conducted in defining the course of carrot somatic embryo development *in vitro*. Using the single cells as a source of somatic embryos, it was shown that proembryogenic cell masses i.e. small size cell clusters, could be considered as earliest development stage of carrot somatic embryos.

Our investigation was carried out on carrot embryogenic culture grown on the medium containing 0.2 mg/l 2.4D. Size-fractionation technique was applied for obtaining cell fraction 100-38 $\mu$ m from 10-day embryogenic culture. This fraction was cultivated for 2-day on hormone free medium to induce further development proembryogenic cell masses into somatic embryos. The Hepler fixation with the Ca supplement and following ferricyanide treatment increased the intracellular membrane contrast and made them visible. Concavalin A was applied to visualize the polysaccharide and glycoprotein inclusions in cell walls.

The 100-38  $\mu$ m cell fraction contained the isolated cells and cell aggregates composed of meristem cells only. We also found the aggregates containing both meristem cells with dense cytoplasm and vacuolated cells as well as dead cells localized on the surface or/and inside. We used only the cell aggregates for EM analysis, because the regeneration of somatic embryos from the isolated cells at our experimental conditions did not occur.

The cytoplasm of meristem cells contained the high concentration of free ribosomes, short granular ER tubes, stacks of 3 – 4 dictyosome cisternae, surrounded by Golgi vesicles, and well developed mitochondrion in our experiments. Starch grains in plastids varied in size. We observed no plasmalemma's invaginations and few plasmalemmasomes in the meristem cells. The vacuolated meristem cells had less developed membrane structures.

When the 100-38  $\mu$ m cell fraction was grown in the medium without the hormone for 2 days the electron density of the cell walls, both the plasmalemma undulations and the concentration of vesicles in the peripheral cytoplasm and in periplasmic space increased. We observed the fibrous electron-dense material on the surface of outer cells and in the intercellular space of cell aggregates. Appearance of numerous multivesicular bodies and vesicles in cytoplasm and in vacuoles evidenced the activation of exo and endocytosis.

## ИНДУЦИРОВАННЫЙ МОРФОГЕНЕЗ У *IRIS ENSATA* THUNB. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И ЕГО ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Тихомирова Л.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный университет», Барнаул, 656049, пр. Ленина, 61, 8-905-984-22-92, e-mail: [L-tichomirova@yandex.ru](mailto:L-tichomirova@yandex.ru)

Успешная разработка биотехнологии любой культуры не возможна без знания морфогенеза объекта исследования. Для этого необходимо изучение не только морфогенеза интактных растений, но и закономерностей формообразования у растений-регенерантов в культуре *in vitro*.

В биологии понятие онтогенеза традиционно подразумевает развитие индивидуального организма, в то время как понятие морфогенеза относится к образованию и дифференциации органов и тканей.

Цель работы – на основании морфологического и гистологического анализа изучить особенности морфогенез у гибридов *I. ensata* в культуре ткани на этапе собственно микроразмножения.

Объекты исследований – гибриды *I. ensata* селекции НИИСС им. М.А. Лисавенко.

Экспериментальные работы с использованием метода культуры тканей и гистологический анализ проведены по общепринятым методикам.

Для микроразмножения *I. ensata* готовили питательные среды на основе MS, содержащие 10, 15, 17,5, 20,0 мкМ БАП. На контрольной питательной среде (1,0 мкМ БАП) растения *I. ensata* гибрид 59-66-00 имели высоту 46,7 мм, что на 10,0 мм меньше среднего значения в пределах опыта. Среднее значение коэффициента размножения составляло 1,17. На анатомических срезах чётко просматривались все системы тканей. Отмечали геммо- и ризогенез.

На питательной среде, содержащей 10,0 мкМ БАП, побегообразовательная деятельность *I. ensata* была выражена в средней степени. Среднее значения коэффициента размножения у гибрида 59-66-00 было равно 1,55. При анатомическом исследовании на поперечном срезе просматривались все системы тканей. Адвентивные побеги формировались в центральном цилиндре у проводящих пучков материнского растения.

Использование высоких концентраций цитокинина (17,5-20,0 мкМ БАП) приводило к изменению морфологии у побегов *I. ensata*, вызывало их уродливость. Гистологический анализ выявил значительные изменения и в тканях корневищ. Основную площадь в сечении корневища занимал центральный цилиндр с гипертрофированной проводящей тканью. Вероятно, под влиянием токсического действия высоких концентраций гормонов происходило патологическое разрастание трахеальных элементов вокруг проводящих пучков, приводящее к угнетению последних и гибели клеток паренхимы центрального цилиндра. Первичная кора на сечении корневища у таких побегов была представлена в виде тонкого рыхлого слоя клеток.

**INDUCED MORPHOGENESIS OF IRIS ENSATA THUNB. IN CULTURE IN VITRO AND ITS HISTOLOGICAL ASPECTS****Tikhomirova L.I.**

Altai State University. 656049 Russia Barnaul 61 Lenina ave. 8-905-984-22-92,  
[L-tichomirova@yandex.ru](mailto:L-tichomirova@yandex.ru)

Successful development of biotechnology of any crop is impossible without knowledge of morphogenesis of investigation object. For this purpose, it is necessary to study not only morphogenesis of intact plants, but formation process of plants-regenerators in culture in vitro as well.

In biology the term ontogenesis traditionally means the development of individual organism, at the same time the term morphogenesis refers to formation and differentiation of organs and tissues.

The aim of the given work is on the base of morphological and histological analysis to study peculiarities of morphogenesis of hybrids *I. ensata* in tissue culture at the stage of private micro-propagation.

Investigation objects are hybrids *I. ensata* of M.A. Lisavenko RIHS breeding.

Experimental works with the application of tissue culture method and histological analysis have been performed according to generally accepted methods.

For micro-propagation of *I. ensata* we prepared nutritional media on the base of MS, containing 10, 15, 17.5, 200 mkM BAP. In control nutritional medium (1.0 mkM BAP) of *I. ensata*, hybrids 59-66-00 had the height 46.7 mm, that on 10.00 mm less than the average meaning in experiment. The average meaning of propagation coefficient was 1.17. All the tissue systems were looked through well in anatomic cuts. Hemmo-and rizogenesis were noticed.

In nutritional medium, containing 10.0 mkM BAP, shoot forming activity of *I.ensata* was expressed to the average degree. The average meaning of propagation coefficient of hybrid 59-66-00 was equal to 1.55. All the tissue systems were looked through on cross cut in anatomic investigation. Adventitious shoots were formed in a central cylinder of conducting bundles of a maternal plant.

Application of high cytokinin concentrations (17.5-20.0 mkM BAP) changed morphology of shoots of *I. ensata* and caused their ugliness. Histological analysis found out significant changes in tissue roots as well. Central cylinder with hypertrophic conducting tissue occupied the main area in a root section. Probably, under the influence of toxic action of high hormone concentrations, pathogenic spreading of tracheal elements around conducting bundles took place, leading to oppression of the last ones and death of parenchyma cells of a central cylinder. Primary bark in a root section of such shoots was represented as a thin loose layer of cells.

## ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ IN VITRO

Ткаченко О.В.<sup>1</sup>, Евсева Н.В.<sup>2</sup>, Спивак В.А.<sup>3</sup>, Матора Л.Ю.<sup>2</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>2</sup>,  
Лобачев Ю.В.<sup>1</sup>,  
Щеголев С.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, 410012, Театральная пл. 1, факс: (8452)26-27-83, тел.: (8452)23-46-97, e-mail: [oktkachenko@yandex.ru](mailto:oktkachenko@yandex.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049, пр. Энтузиастов, 13, факс: (8452) 970444, тел.: (8452)970474; e-mail: [evseeva@ibppm.sgu.ru](mailto:evseeva@ibppm.sgu.ru)

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Национальный исследовательский Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012, ул. Астраханская, 83, факс: (8452)210644, тел.: (8452)210636; e-mail: [spivac\\_VA@mail.ru](mailto:spivac_VA@mail.ru)

Исследовали изменение морфогенетических показателей соматических каллусов яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре in vitro под влиянием липополисахаридов (ЛПС) ассоциативных рост-стимулирующих бактерий штамма *Azospirillum brasilense* Sp245. Использовали генетическую модель, включающую две почти изогенные линии пшеницы сорта Саратовская 29, альтернативные по гену короткостебельности RhtB1c и контрастные по эмбрионной способности. В стандартную среду Линсмайера-Скуга с содержанием 2,4Д 2 мг/л вводили 10 мкг/мл ЛПС, выделенного из наружной мембраны бактерий. Полученные каллусы и растения-регенеранты анализировали с использованием морфометрического и морфоанатомического анализов.

Ранее было установлено, что короткостебельная почти изогенная линия пшеницы с геном Rht-B1c обладает более высоким морфогенным потенциалом в культуре соматических тканей in vitro по сравнению с ее высокорослым сестринским сибом, несущим аллель дикого типа Rht-B1a. Морфоанатомический анализ подтвердил установленный положительный эффект гена RhtB1c на всех этапах культивирования тканей in vitro.

Введение в состав среды ЛПС в целом повышало активность морфогенетических процессов. Особенно заметно было повышение выхода каллусов с очагами меристематической активности у высокорослой линии в присутствии в питательной среде ЛПС 10 мкг/мл. Следовательно, морфогенный потенциал каллусов исследуемых линий выравнивался.

Было показано, что ЛПС стимулировал процесс вторичной дифференциации клеток каллуса и формирование очагов морфогенеза уже на 7 сутки культивирования зародышей независимо от генотипа. Меристематическая активность, в основном, наблюдалась в зоне надальной пластинки, проводящих пучков щитка и колеоптиля.

Таким образом, установлено, что ЛПС ассоциативных бактерий *A. brasilense* Sp245 стимулирует процессы вторичной дифференциации и регенерационную способность каллусных клеток пшеницы, повышая тем самым эффективность культивирования генотипов с низким эмбрионным потенциалом. Наибольшей физиологической активностью в отношении каллусных клеток обладает концентрация ЛПС в питательной среде 10 мкг/мл.

Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию механизмов морфогенеза в культуре тканей и могут быть использованы для повышения эмбрионного потенциала растительных объектов, в частности пшеницы, в культуре in vitro.

**INFLUENCE OF BACTERIAL LIPOPOLISAKHARID ON MORPHOGENETIC POTENTIAL OF WHEAT CALLUS CELLS *IN VITRO*****Tkachenko O.V.<sup>1</sup>, Evseeva N.V.<sup>2</sup>, Spivak V.A.<sup>3</sup>, Matora L.Yu.<sup>2</sup>, Burygin G.L.<sup>2</sup>, Lobachev Yu.V.<sup>1</sup>, Shchyogolev S.Yu.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Vavilov Saratov State Agrarian University, 1 Teatralnaya Ploshchad, Saratov 410012, Russia. Fax: +7(8452)26-27-83, tel.: +7(8452)23-46-97; e-mail: [oktkachenko@yandex.ru](mailto:oktkachenko@yandex.ru),

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia. Fax: +7(8452) 970444, tel.: +7(8452) 970474; e-mail: [evseeva@ibppm.sgu.ru](mailto:evseeva@ibppm.sgu.ru),

<sup>3</sup>Chernyshevsky Saratov State University, 83 Ul. Astrakhanskaya, Saratov 410012, Russia. Fax: +7(8452)210644, tel.: +7(8452)210636; e-mail: [spivac\\_VA@mail.ru](mailto:spivac_VA@mail.ru)

Change of morphogenetic indicators of somatic calli of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in culture in vitro under the influence of lipopolysaccharides (LPS) of associative growth-promoting bacteria of *Azospirillum brasilense* Sp245 strain were studied. Genetic model including two near-isogenic lines of wheat cv. Saratovskaya 29 that differed in the short-stemmed RhtB1c gene and had contrasting embryogenic capacity was used. 10 mkg/ ml of LPS isolated from the bacterial outer membrane was injected to standard medium of Linsmaier–Skoog containing 2 mg/ l of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid ). The resultant calli and regenerated plants were analyzed by morphometric and morphological-anatomical analysis.

It was indicated before that the short-stemmed near-isogenic line of wheat with RhtB1c gene has higher morphogenic potential in culture of somatic tissues in vitro in comparison with its tall sister line having allelic RhtB1a gene of wild type. Morphological-anatomical analysis confirmed the positive effect of the RhtB1c gene at all stages of tissue culturing in vitro.

On the whole, the addition of LPS to the medium increased the activity of morphogenetic processes. The increase in the yield of calli with meristematic activity loci in the tall line in the presence of 10 mkg/ ml of LPS in the nutrient medium was especially noticeable. Consequently, the morphogenic potential of the calli of the lines under study leveled off.

LPS was found to promote the secondary differentiation of callus cells and the formation of morphogenesis loci as early as on day 7 of embryo culturing, regardless of the genotype. Meristematic activity was observed mostly in the nodal plate, vascular bundles of the scutellum, and coleoptile of the embryos.

Thus, on the basis of the obtained data, it has been established that the LPS of the associative bacterium *A. brasilense* Sp245 promotes the secondary differentiation and the regeneration capacity of wheat callus cells, thereby improving the effectiveness of culturing of genotypes with low embryogenic potential. A nutrient-medium concentration of LPS of 10 kg/ml has the greatest physiological activity toward callus cells.

The obtained results make it possible to understand deeper the mechanisms of morphogenesis in tissue culture and can be used to increase the embryogenic potential of plant objects, specifically wheat, in culture in vitro.

## ЭМБРИОГЕННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ И СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ IN VITRO У ВИДОВ ХВОЙНЫХ ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В СИБИРИ

**Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Иваницкая А.С., Пак М.Э. Шуваев Д.Н.**

Учреждение российской академии наук. Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск. 660036, Красноярск, Академгородок 50, стр. 28. Тел: (391)249-46-25; Факс: (391)243-36-86; [culture@ksc.krasn.ru](mailto:culture@ksc.krasn.ru)

Незрелые зиготические зародыши и мегагаметофиты, *Larix sibirica*, *Larix sukaczewii*, *Larix gmelinii*, *Pinus sibirica*, *Pinus pumila* и *Picea ajaiensis* культивировали на средах АИ ( патент № 2456344) и ½ LV, дополненных глютамином, гидролизат казеином, аскорбиновой кислотой и гормонами ( 2.4Д и 6-БАП). Образовавшаяся эмбрионально-суспензорная масса активно пролиферировала на этих средах с уменьшенным содержанием цитокининов. Соматические зародыши вызревали на базальных средах с АБА (60-120 мМ и ПЭГ). Прорастание соматических зародышей происходило на средах АИ и LV свободных от гормонов.

Несмотря на видовую специфику хвойных, эмбриональные процессы проходили одинаково: наблюдалось растяжение соматических клеток и их асимметричное деление с образованием инициалей и клеток-трубок ( культура зародышей) или образование ценоцита смещения ядре и образование инициалей ( культура мегагаметофитов). Затем клетки-инициалей последовательно делились и формировали мелкие эмбриональные клетки (эмбриональные глобулы). На одном из концов эмбриональных глобул развивались суспензороподобные структуры. Соматические зародыши вызревали при добавлении в среду АБК и ПЕГ. Длительно пролиферирующие клеточные линии были получены у *Larix sibirica*, *L. sukaczewii*, *Pinus pumila*. Эмбриогенные линии различались по пролиферативной активности. Эти линии продуцировали 400-800 штук соматических зародышей на 1г свежего веса каллуса. Уменьшения пролиферативной активности за три более лет культивирования не наблюдалось. Соматический эмбриогенез проходил под строгим генетическим контролем. Эмбриогенные клеточные линии и соматические зародыши были продуцированы только от деревьев- доноров с высоким репродуктивным потенциалом.

*Исследования были проведены в рамках выполнения работ по гранту РФФИ № 11-04-00281.*

**EMBRYOGENIC CELL LINES AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN VITRO  
OF COMIFEROUS SPECIES GROWING IN SIBERIA****Tretiakova I.N., Voroshilova E.V., Ivanitskya A.S., Park M.E., Shuvaev D.N.**

Institute of Forest Siberian Branch RAS, 660041, Krasnoyarsk, Akademgorodok 50, 28. Tel: (391)249-46-25; fax: (391)243-36-86; E-mail: [culture@ksc.krasn.ru](mailto:culture@ksc.krasn.ru)

Immature isolated embryos and megagametophytes of *Larix sibirica*, *Larix sukaczewii*, *Larix gmelinii*, *Pinus sibirica*, *Pinus pumila* and *Picea ajaiensis* were experimentally cultured on ½ LV modified and AI (patent №2456344) media added by L-glutamine, casein hydrolysate, ascorbic acid, and hormones (2,4-D and BA). The embryonal suspensory mass exhibited active proliferation on these media under a reduced concentration of cytokinins. The somatic embryos matured on the basal media with ABA (60-120 mM) and PEG. The germination of somatic embryos occurred on hormon-free ½ AI and LV medium.

Notwithstanding the differences between the conifer species of interest, the embryological processes went the same way: elongation of somatic cells and their asymmetric division with formation of initial and tube cells (embryo culture) and formation of coenocytes, nucleus migrate and initial formation (culture megagametophytes). Then embryo initial cells experienced sequential divisions and formed small embryonal cells (embryonic globules). Suspensor-like structures were developed from the edges of embryonic globules. Somatic embryos matured after addition of ABA and PEG into the media. Long-term proliferating cell lines and plantlets were obtained in *Larix sibirica*, *Larix sukaczewii* *Pinus pumila*. The embryogenic lines differed in proliferative activity. These lines produced 400-800 somatic embryos per 1g of callus fresh weight. No proliferation activity decrease was observed over the three year period of culturing. Embryogenic cell lines and somatic embryos were produced only from the donor tree genotypes having high reproductive potential.

*This work was supported by RFBR grants № 11-04-00281*



**ПАТОЛОГИИ МИТОЗА В ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ  
ЭМБРИОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ *PINUS PUMILA* (PALL.) REGEL****Шуваев Д. Н.**

Учреждение Российской академии наук Институт леса им. В. Н. Сукачева Сибирского отделения РАН, Красноярск, 660036, Академгородок №50, стр. 28, факс: (391) 243-36-86, тел. (391) 249-44-47, e-mail: [denis.shuvaev@gmail.com](mailto:denis.shuvaev@gmail.com)

Кедровый стланик относится к роду пятихвойных сосен и произрастает на северо-востоке России, занимая обширный ареал от северного Прибайкалья до полуострова Камчатка. Данный вид имеет большое экологическое и хозяйственное значение. Вместе с тем, огромные массивы зарослей стланика уничтожаются пожарами, а также нерациональной хозяйственной деятельностью человека. В связи с тем, что кедровый стланик медленно растет, его восстановление затягивается на 30-40 лет.

Метод регенерации кедрового стланика через соматический эмбриогенез дает возможность в малые сроки получать достаточное количество посадочного материала. Однако для культуры тканей растений характерны процессы, объединяемые термином соматическая изменчивость. Основными причинами данной изменчивости являются различные нарушения генетического материала. Эти нарушения могут быть вызваны различными патологиями митоза. Патологический митоз – один из способов возникновения мутаций и развития анеуплоидии, что в свою очередь способно влиять на качественный и количественный состав регенерантов стланика.

В 2011 году было получено 7 эмбриогенных клеточных линий (ЭКЛ) кедрового стланика, из которых 4 сохраняли длительную пролиферативную активность (3 года) на питательной среде 1/2LV2. Данные 4 ЭКЛ получили следующие обозначения: 21.11; 21.12; 21.4 и 22.9. ЭКЛ отличались по количеству соматических зародышей, продуцируемых на грамм эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ), а также по способности продуцировать зрелые соматические зародыши. ЭКЛ 21.11 и 21.12 продуцировали соматические зародыши в количестве 1055 и 1080 на грамм ЭСМ, соответственно. Из ЭСМ клеточной линии 21.11 было получено 36 зрелых соматических зародышей – из ЭСМ линии 21.12 – 63. Эмбриогенная клеточная линия 21.4 продуцировала соматические зародыши в количестве 1320 на грамм ЭСМ. Однако, из ЭСМ данной клеточной линии на стадии вызревания было получено всего 3 зрелых соматических зародыша. Эмбрионально-суспензорная масса клеточной линии 22.9 утратила способность продуцировать соматические зародыши и состояла в основном из каллусных клеток. Митотический индекс и процент патологических митозов в ЭСМ клеточной линии 21.11 составили 1,1% и 8,1%, соответственно. Для клеточной линии 21.12 митотический индекс составил 1,5%, процент патологических митозов – 1,6%. Среди форм патологий митоза были отмечены: отставание и фрагментация хромосом в метафазе, набухание и слипание хромосом. ЭСМ клеточной линии 21.4 характеризовалась наибольшим процентом патологических митозов – 20,5%, митотический индекс составил 1,6%. В ЭСМ данной клеточной линии встречалось множество различных патологий митоза, например, отставание хромосом в анафазе, хромосомные мосты, асимметричный митоз и др. Для ЭКЛ 22.9 митотический индекс составил 2,2% – процент патологических митозов – 8,2%.

Таким образом, эмбриогенные клеточные линии кедрового стланика показали варибельность по способности продуцировать соматические зародыши. На фоне имеющихся данных по проценту патологических митозов можно сделать предположение, что способность клеточных линий продуцировать зрелые соматические зародыши зависела от аномалий клеточного деления, которые могут происходить в течение эмбриогенеза.

**PATHOLOGIES OF MITOSIS IN LONG-TERM CULTURED EMBRYOGENIC CELL LINES OF *PINUS PUMILA* (PALL.) REGEL****Shuvaev D. N.**

Forest Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036, Akademgorodok №50, building 28, fax: (391) 243-36-86, phone number: (391) 249-44-47, e-mail: [denis.shuvaev@gmail.com](mailto:denis.shuvaev@gmail.com)

*Pinus pumila* grows on the north-east Russia and one covers area from the northern Baikal region to the pen. Kamchatka. This species plays important ecological role and economical one. At the same time, the huge areas of *Pinus pumila* are destroyed with the fires and irrational economical activity of human. In regard with that that *Pinus pumila* is characterized slow growth; its restoration is delayed on 30-40 years.

Regeneration of *Pinus pumila* by somatic embryogenesis enables to obtain the sufficient quantity plantlets in short time. However, it is known of the phenomenon' existence which was named somaclonal variation. The main reasons of this variation are different disturbances of the genetic material. These disturbances can be result of the pathological mitosis. Pathological mitosis is one of ways appearing of mutations and aneuploidy. These phenomena are able to affect on the produce of the plantlets.

In 2011, it was initiated seven embryogenic cell lines (ECL) of *Pinus pumila*. The four from them kept the long proliferated activity (three years) on a nutrient medium 1/2LV2. These four ECL were labelled as 21.11; 21.12; 21.4 и 22.9. ECL differed by the quantity of somatic embryos produced per one gram embryonal-suspensor masses (ESM), as well as the ability to produce mature somatic embryos. ECL 21.11 and 21.12 produced the somatic embryos in an amount 1055 and 1080 per gram of ESM, accordingly. From ESM of the cell line 21.11 was obtained 36 the mature somatic embryos – from ESM of the cell line 21.12 was 63. Embryogenic cell line 21.4 produced the somatic embryos in an amount 1320 per gram ESM. However, it was obtained only 3 the mature somatic embryos. ESM of cell line 22.9 lost the ability to produce the somatic embryos. This cell line consisted of the calli cells. The mitotic index (MI) and the percent of pathological mitosis in ESM of cell line 21.11 were 1.1% and 8.1%, accordingly. For cell line 21.12, MI was 1.5% and the percent of pathological mitosis was 1.6%. It were registered such pathologies of mitosis as lagging and fragmentation of chromosomes, their swelling and clumping. ESM of cell line 21.4 was characterized with the biggest percent of pathological mitosis which was 20.5%. The mitotic index was 1.6%. In ESM this cell line was observed a lot of pathological mitosis, for instance, lagging of chromosomes in anaphase, chromosome bridges, asymmetrical mitosis et al. For ECL 22.9, MI was 2.2% and the percent pathological mitosis was 8.2%.

Thus, the embryogenic cell lines of *Pinus pumila* showed the variation related with the ability to produce the somatic embryos. Taking into account the results about the percent of pathological mitosis it can be assumed that the ability of the cell lines to produce the mature somatic embryos depended on the pathologies of cell division, which can occur during embryogenesis.

**СЕКЦИЯ 3.**

**Культивирюемые клетки растений как  
модель для изучения механизмов  
фундаментальных клеточных  
процессов**

**SECTION 3.**

**Plant cell culture as a model systems for  
studying the basic mechanisms of  
fundamental cellular events**

**ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНА 1-ЦИС ПЕРОКСИРЕДОКСИНА В КУЛЬТУРЕ  
КЛЕТОК ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ****Акулов А.Н., Горшков О.В., Румянцева Н.И.**

Федеральное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики  
Казанского научного центра Российской академии наук  
E-mail: akulov-anton@mail.ru

1-Цис пероксиредоксин (1-Цис ПР) относится к группе тиоловых негемовых пероксидаз, катализирующих разрушение перекиси водорода, гидроперекисей липидов и пероксинитритов. Есть данные о его сигнальной и шапероноподобной функциях. У растений 1-Цис ПР экспрессируется в тканях семени, латеральных меристемах листьев, а также в ходе соматического эмбриогенеза в эмбрионных культурах клеток. 1-Цис ПР является стресс-реактивным белком, и его экспрессия усиливается в ответ на определенные абиотические стрессоры (понижение температуры, дегидратация).

Нами экспрессия 1-Цис ПР была выявлена только в клетках морфогенного каллуса гречихи татарской, в неморфогенных культурах экспрессии 1-Цис ПР ни на уровне мРНК, ни белка не было обнаружено. Сравнение нуклеотидной последовательности кДНК морфогенного и неморфогенного каллусов показало, что они не имели различий. Было сделано предположение, что отсутствие экспрессии 1-Цис ПР в неморфогенных культурах может быть обусловлено рядом причин: изменениями в первичной последовательности промоторного участка гена, эпигенетическими изменениями, например метилированием промоторной области гена, а также нарушением функционирования сигнальных каскадов, регулирующих транскрипцию этого гена. В ряде работ показана активация гена 1-Цис ПР стрессовым фитогормоном – абсцизовой кислотой (АБК). Нами обнаружено, что добавление АБК в среду культивирования как морфогенной, так и неморфогенной культур гречихи татарской приводило к снижению прироста биомассы, однако не вызывало массовой гибели клеток. К появлению мРНК гена 1-Цис ПР в неморфогенных культурах приводило их культивирование в течение 7 суток на среде с добавлением АБК в концентрации 20 мкМ. В морфогенных культурах экспрессия гена 1-Цис ПР наблюдалась в течение всего времени культивирования как на среде без АБК так и при ее добавлении.

Известно, что транскрипция гена 1-Цис ПР регулируется через цис-регуляторные элементы, чувствительные к уровню АБК в клетке. Мы предполагаем, что отсутствие экспрессии 1-Цис ПР в неморфогенных культурах гречихи татарской определяется меньшим содержанием АБК в неморфогенных культурах по сравнению с морфогенными, что характерно для неморфогенных культур других видов растений. В морфогенных культурах гречихи татарской конститутивная экспрессия гена 1-Цис ПР обусловлена достаточным уровнем внутриклеточной АБК и функционированием АБК-индуцированных сигнальных каскадов, вовлеченных в регуляцию соматического эмбриогенеза.

**TRANSCRIPTION OF 1-CYS PEROXIREDOXIN GENE IN TARTARY  
BUCKWHEAT CELL CULTURE****Akulov A.N., Gorshkov O.V., Rumyantseva N.I.**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of the Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.

E-mail: akulov\_anton@mail.ru

1-Cys peroxiredoxins (1-Cys Prxs) are the thiol heme-free peroxidases playing important roles in antioxidation and cell signalling. They catalyze degradation of various peroxides, including hydroperoxides of phospholipids and peroxinitrites. In plants, 1-Cys Prxs are expressed in seed tissues, lateral leaf meristems and during somatic embryogenesis in embryogenic cell cultures. 1-Cys Prxs are stress-reactive proteins and their expression increase in response to specific abiotic stressors (low temperature, desiccation).

In tartary buckwheat, both gene and protein expression of 1-Cys Prx were observed only in morphogenic callus and absent in non-morphogenic one when calli were cultured on maintenance medium. The comparison of the nucleotide sequence of cDNA of 1-Cys Prx gene, both in morphogenic and in non-morphogenic calli indicated that they did not have differences. It has been suggested that the absence of 1-Cys Prx expression in non-morphogenic callus could be due to a number of reasons: changes in the primary sequence of the gene promotor, epigenetic changes, such as the methylation, as well as the default of signal cascades regulating transcription of this gene. In a few papers, it was shown that 1-Cys Prx gene expression was activated by stress phytohormone abscisic acid (ABA). We found that ABA addition into cell medium led to decrease of callus fresh weight growth, but it was not accompanied by great cell death. The appearance of 1-Cys Prx mRNA in cells of non-morphogenic callus after its culture for 7 days on medium with the addition of 20  $\mu$ m ABA. In morphogenic callus, expression of 1-Cys Prx gene has been observed during passage, both on ABA-free and ABA- supplemented culture media.

1-Cys Prx gene transcription is known to be regulated via cis-elements which are sensitive to intracellular ABA content. We suppose that absence of 1-Cys Prx mRNA in non-morphogenic callus is caused by low level of ABA in contrast to morphogenic one. The low ABA level was observed also in non-morphogenic cell cultures of other plants. In morphogenic callus of tartary buckwheat, seems the constitutive expression of 1-Cys Prx gene due to an optimal content of intracellular ABA and normal functioning of signal pathways which are involved in somatic embryogenesis regulation.

**ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ФЕНИЛПРОПАНОИДОВ НА МОДУЛЯЦИЮ  
ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК  
ДИОСКОРЕИ ДЕЛЬТОВИДНОЙ И В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ IN VITRO**

**Волкова Л.А., Урманцева В.В., Бургутин А.Б., Носов А.М.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва,  
e-mail: la-volkova@yandex.ru

Исследовано влияние комплекса фенилпропаноидов (КФП), выделенного из экстракта корней родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), на культуру клеток диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea* Wall) и на растения картофеля *in vitro* с целью идентификации факторов, обуславливающих поддержание внутриклеточного редокс-гомеостаза. Обнаружено, что обработка растений КФП в концентрации 100 мкМ приводит к снижению пероксидазной активности как в клетках *D.d.*, так и в растениях картофеля, причем, в клетках *D.d.* данный эффект был более выражен. В присутствии НАДН, известного оксидазного субстрата пероксидаз (ПО), показано, что снижение пероксидазной активности связано с «переключением» пероксидазы на выполнение этим ферментом оксидазной функции. Этот эффект сопровождался как увеличением активности супероксиддисмутазы на 34%, так и повышением уровня ПОЛ также на 34%. После предварительной обработки растений дифенилен иодониумом, ингибитором НАДФН-оксидазы, стимуляция данных процессов под действием КФП снижалась на 14 и 24%, соответственно, что предположительно указывает на участие «тандема» ПО-НАДФН-оксидаза в генерации активных форм кислорода (АФК). Повышение уровня последних может быть результатом того, что действие экзогенного КФП опосредовано АФК, в свою очередь способными приводить к запуску адаптивных процессов в растительных клетках. Об этом свидетельствует обратимое увеличение уровня ПОЛ как в клетках *D.d.*, так и в растениях картофеля в условиях окислительного стресса, вызванного действием параквата. При действии КФП в концентрации 100 мкМ в клетках *D.d.* по сравнению с картофелем наблюдалось большее снижение пероксидазной активности (в 3 раза по сравнению с 26% у картофеля) и незначительное снижение активности СОД, вероятно, вследствие ингибирования фермента высоким уровнем АФК. Уменьшение концентрации КФП приводило к повышению в клетках *D.d.* активности СОД и меньшему (по сравнению с 100 мкМ КФП) снижению активности ПО, а в клетках картофеля даже способствовало усилению пероксидазной активности через 3 ч после действия КФП, что связано со способностью КФП переключать оксидазную / пероксидазную активности пероксидаз. Установлено, что наблюдаемые эффекты КФП включают в себя не только соответствующую модуляцию активностей антиоксидантных ферментов, но и прямое тушение активных радикалов кислорода. В отношении этого последнего эффекта, выявленного по интенсивности снижения в препаратах уровня супероксид-аниона, КФП значительно превосходил действие индивидуальных антиоксидантов – салидрозид и аскорбиновой кислоты, ингибирующая активность которых была в 5 раз меньше таковой КФП. Таким образом, КФП, обладая антирадикальной активностью и способностью участвовать в модуляции ферментов антиоксидантного комплекса, может регулировать уровень АФК, которые выступают как регулятор редокс-статуса растительной клетки.

## АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ У ГИБРИДОВ РИСА

Гончарова Ю.К., Бушман Н.Ю., Верещагина С.А.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт риса Российской академии сельскохозяйственных наук, 350921, Россия, Краснодар, п. Белозерный, ГНУВНИИ риса  
факс: (8612) 29-49-91, тел. 918 6295299, e-mail: [serggontchar@mail.ru](mailto:serggontchar@mail.ru)

Популяции дигаплоидных линий нашли широкое применение в молекулярно-генетических исследованиях при маркировании и локализации доусов генов хозяйственно ценных признаков. Культивирование пыльников является частью методик закрепления гетерозисного эффекта по методу Струнникова В.А. и методу, разработанному во ВНИИ риса. Получение популяции дигаплоидных линий риса применяют на нескольких этапах методик закрепления гетерозисного эффекта, для удаления полудетальных генов, а также гомозиготизации материала.

Состав питательных сред имеет важное значение для интенсификации процесса получения каллуса, и в конечном итоге дигаплоидных растений. Разные генотипы предъявляют разные требования к виду и концентрации в среде элементов питания, поэтому в каждом конкретном случае необходимо экспериментальным путем определять оптимальный состав среды для данного генотипа. Составы сред, рекомендуемых для подвидов риса *japonica* и *indica* значительно различаются. Для подвида риса *japonica* более эффективно использование сред N6, MS. Среда He 5, M 8, XM-2 лучшие результаты дает для сортов подвида *indica*. Для гибридов разработана среда SK<sub>3</sub>, но наилучшие результаты получены при использовании половины неорганических солей среды N6, в комбинации с органическими компонентами среды MS. Для сортов подвида *japonica* используют гормон роста 2,4-D -2 мг/л; при 10 мг/л этого вещества увеличивается процент образования каллуса, но снижается частота регенерации зеленых растений, более высокая концентрация эндогенных гормонов нужна для сортов подвида *indica*. Для культивирования пыльников риса предложено несколько новых сред.

В задачи нашего исследования входило изучение эффективности использования для индукции каллусообразования 6 питательных сред, четыре из которых являются производными среды N6, но отличаются от нее по содержанию гормонов, в средах C и RZ изменено также содержание солей. Для высадки на среду использовали пыльники 67 гибридных комбинаций: гибриды между дигаплоидными линиями одной гибридной комбинации, между российскими сортами, между российскими и зарубежными образцами, межподвидовые гибриды. Для высадки отбирали побеги с расстоянием между флажковым листом и предпоследним листом, у которых составляло 5-10 см. Холодовая обработка метелок проходила в течение 5-12 дней при температуре 7<sup>0</sup>C. Стерилизацию проводили в течение 20 минут 20% раствором промышленно выпускаемой «Белизны» (5,5 г, Cl/l).

Из рассматриваемых 6 вариантов сред, две (RZ и C) повышают каллусогенез в 7 раз по сравнению со средой N6 рекомендуемой международным институтом риса (IRRI). Среды RZ и C по выходу каллуса достоверно не различались, остальные значительно уступали им по данному признаку. Однако гормональный состав их различен. Если среда RZ содержит как нафтилуксусную кислоту так и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту, то среда C, только 2,4-D. 2,4-D. по сообщениям многих авторов повышает процент каллусообразования, но в последующем может привести к снижению количества получаемых регенерантов.

Таким образом, среды с повышенным содержанием солей KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, а также более высоким содержанием витаминов и регуляторов роста (Rz, C), обеспечивают более высокий выход каллуса в комбинациях с сортами российской селекции по сравнению с общепринятой для подвида *japonica* средой N6. Формула среды по содержанию гормонов Rz (мг/л): 2,4D ( 0,5) +НУК ( 2) +КИН ( 0,5); C: 2,4D ( 0,5) +КИН ( 0,5). Содержание солей в среде Rz (мг/л): KNO<sub>3</sub> (3134), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (540), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (370), MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (22,3), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (8,6), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(6,2), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (440)

**THE ANALYSIS OF EFFICIENCY OF NUTRIENT MEDIUMS FOR  
INDUCTION OF CALLUS FOR RICE HYBRIDS**

**Goncharova J.K., Bushman N.Y., Vereshchagina S.A.**

The state scientific institution the All-Russian scientific rice research institute of the Russian academy of agricultural sciences, 350921, Russia, Krasnodar, Belozernyi, ARRI.  
Fax: (861) 229-49-91, ph. 918 6295299, e-mail: [sergogontchar@mail.ru](mailto:sergogontchar@mail.ru)

Populations of double haploid have found wide application in molecular and genetic researches at marking and localisation of loci of genes of economic valuable traits. Anther culture is a part of techniques of fastening heterosis effect on Strunnikov V.A. method and a method developed in ARRI. Reception of population of double haploid lines of rice apply at several stages of techniques of fastening heterosis effect, to removal of semilethal genes, and also for homosigotisation of material.

The structure of nutrient mediums has great value for an intensification of process of callus reception, and finally double haploid plants. Different genotypes make different demands to a kind and concentration in the environment of food elements, therefore in each concrete case it is necessary experimental to define by optimum structure of environment for the given genotype. Structures of the environments recommended for subspecies of rice *japonica* and *indica* considerably differ. For rice subspecies *japonica* more an effective utilisation of N6 environments, MS. Environment He 5, M 8, XM-2 gives the best results for subspecies varieties *indica*. SK3 environment is developed for hybrids, but the best results are received at use of half of inorganic salts of N6 environment, in a combination with organic components of MS environment. For subspecies *japonica* use a growth hormone 2,4-D-2 mg/l; At 10 mg/l of this substance the formation percent callus increases, but frequency of regeneration of green plants, higher concentration hormones is necessary for subspecies grades *indica*. For rice anther culture are offered some new environments.

Problems of our research included studying of efficiency of use for callus induction 6 nutrient mediums, four of which are N6 media derivatives, but differ from it under the maintenance of hormones, in C and RZ medium the maintenance of salts is changed also. For anther culture used 67 hybrid combinations: hybrids between double haploid lines of one hybrid combination, between the Russian varieties, between the Russian and foreign samples, *indica/japonica* hybrids. For anther culture we used plant with distance between flag leaves sheet and penultimate sheet was 5-10 cm., cold treatment within 5-12 days at temperature 7°C. Sterilisation within 20 minutes of 20 % a solution of industrially made solution "Whiteness" (5,5 г. Cl/l).

From considered 6 variants of the media, two (RZ and C) raise callus induction in 7 times in comparison with N6 media recommended by the international rice research institute. RZ media and C on an callus induction statistically did not differ, the others considerably conceded to them to the given trait. However their hormonal structure is different. RZ media contains both HAA and 2,4-D; C- only 2,4-D. 2,4-D under messages of many authors raises callus induction percent, but in the subsequent can lead to decrease in quantity received plant.

Thus, media with the raised maintenance of salts  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , and also higher maintenance of vitamins and growth regulators (Rz, C), provide higher exit callus in combinations with Russian selection varieties in comparison with standard for subspecies *japonica* N6 media. The formula of media under the maintenance of hormones Rz (mg/l): 2,4D (0,5) +HAA (2) +KIN (0,5); With: 2,4D (0,5) +KIN (0,5). The maintenance of salts in the media of Rz (mg/l):  $\text{KNO}_3$  (3134),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (540),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (370),  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (22,3),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (8,6),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (6,2),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (440).



## ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Гончарук Е.А., Клейменова Ю.К., Загоскина Н.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им.К.А.Тимирязева РАН, Москва, ул.Ботаническая, 35, тел. (499)977-94-33 e-mail: [gongcharuk.ewgenia@ya.ru](mailto:gongcharuk.ewgenia@ya.ru)

Рост и развитие растений определяются постоянно изменяющимися условиями окружающей среды, подверженной действию различных стрессоров. Активные формы кислорода (АФК), образующиеся в этих условиях, могут оказывать повреждающее воздействие на клетки растений, вызывая окислительный стресс (ОС) и приводить к необратимым изменениям в растительном организме. Известно, что перекись водорода, как одна из наиболее длительно живущих форм АФК, может или непосредственно вызывать ОС или же являться сигнальной молекулой, способной посредством физиологических и биохимических реакций повышать устойчивость растений к стрессорам. К одной из групп веществ, образующихся в условиях ОС и являющихся защитными системами клеток растений, относятся такие низкомолекулярные антиоксиданты как фенольные соединения (ФС). Известно также, что присутствие в клетке именно этих вторичных метаболитов определяет устойчивость растений к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Изучение воздействия ранее установленной концентрации перекиси водорода  $10^{-4}$ М в экспозиции 30 мин. проводили на гетеротрофной каллусной культуре стебля чайного растения (*Camellia sinensis* L.). Каллусные культуры анализировали в течение пассажа через каждые 7 дней. Для анализа активности антиоксидантной системы клеток чайного растения в условиях индуцированного ОС необходимо было определить суммарное содержание фенольных соединений на протяжении всего пассажа, длительность которого составляла 45 дней. Из литературных источников известно, что длительно выращиваемые в условиях *in vitro* каллусные культуры чайного растения характеризуются высокой способностью к синтезу разнообразных соединений фенольной природы. В связи с этим в проводимом исследовании было важно выявить ответные реакции клеток чайного растения, обладающих нативно высоким уровнем содержания различных групп фенольных соединений, на воздействие стрессора.

В результате проведенного эксперимента нами было установлено, что воздействие стрессового фактора приводило к изменениям в уровне накопления ФС в разные периоды роста ткани. У 7-дневных растений содержание ФС в опытном варианте в несколько раз превышало таковое в контроле. На 14 день культивирования содержание ФС в опытном варианте возрастало на 15%. Содержание ФС во второй половине пассажа в опытных вариантах возрастало лишь на 5% относительно контрольных. Установленные изменения, вероятно, обусловлены физиологическим состоянием каллусной ткани разного возраста и ответной реакцией ее антиоксидантной системы на ОС. По-видимому, у каллусной культуры чайного растения молодые клетки, активно синтезирующие ФС, обладают наибольшей стресс устойчивостью. Не исключена также возможность участия в биохимических и физиологических процессах растительных клеток и самого стрессора, иногда выступающего в качестве сигнальной молекулы, и, способного, как известно, активировать антиоксидантную систему растений.

Способность к биосинтезу эндогенных ФС в контроле в течение пассажа носила «колебательный» характер, что скорее всего связано с гетерогенностью клеток каллусной культуры чая.

**FEATURES OF PHENOLIC COMPAUNDS ACCUMULATION IN CALLUS OF  
TEA PLANT IN THE CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS****Goncharuk E.A., Kleimenova Yu.K., Zagoskina N.V.**

The Institute of plants physiology named after K.A. Timiriazev, Russian Academy of Sciences (RAS), Botanicheskaya street, 35, phone number (499)977-94-33; e-mail: goncharuk.ewgenia@ya.ru

Plant growth and development are determined by the ever-changing environmental conditions, exposed to various stressors. Active oxygen forms (AOF) appearing under these conditions may hurt the plant cells, causing oxidative stress (OS) and leading to irreversible changes in plants. It is well known that hydrogen peroxide, as one of the most long-living AOF forms, can either cause OS by itself, or can act as a signaling molecule, able to improve plant resistance to stressors via physiological or biochemical reactions. To one group of substances, being formed under OS conditions and being defense system of plant cells, belong such low molecular weight antioxidants as phenolics. It is also known that existing in cell precisely these secondary metabolites determines the plants resistance to adverse environmental factors.

Studying the effects of the previously established concentration of hydrogen peroxide  $10^{-4}$ M exposure to 30 minutes was being held on heterotrophic callus culture of tea plant stems (*Camellia sinensis L.*). Callus cultures were being analyzed for passage every 7 days. To analyze the activity of antioxidant tea plant cells system in terms of induced OS it was necessary to determine the total content of phenolic compound during the entire passage that lasted for 45 days. It is known from the literature that long-term cultivated in vitro callus cultures of tea plant are characterized by high ability to the synthesis of a variety of phenolic compounds. In connection with that it was important to identify in this research tea plant cell response, natively possessing high levels of different groups of phenolic compounds, to stressors.

As the result of this experiment it was found that the influence of stress factor lead to changes in the accumulation level of phenolic compounds during different periods of tissue growth. The content of phenolic compounds in 7-day-old plants in the experimental variant is several times higher than those in the control one. On the 14<sup>th</sup> day of cultivation the phenolic component increased 15 per cent in the experimental variant. The content of the phenolic component in the second part of the passage in the experimental variants grew only 5% regarding the control ones. Probably the established changes can be explained by physiological state of callus tissue of different age and its antioxidant system response to the OS. The callus culture of the tea plant seem to have young cells actively synthesizing the phenolic compound, having the best stress resistance. We can't rule out the possible involvement in the biochemical and physiological processes of the plant cells and the stressor itself, sometimes acting as the signaling molecule and, as we know, able to activate the antioxidant plant system. The capacity for biosynthesis of endogenous phenolic compounds controlled during the passage had an *oscillatory* character, that seems to be mostly connected with callus tea culture cells heterogeneity.

**ВЛИЯНИЕ МЕТИЛЖАСМОНАТА НА ФЕНОЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ,  
РОСТОВУЮ И МОРФОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ СУСПЕНЗИОННОЙ  
КУЛЬТУРЫ ГРЕЧИХИ ТАТАРСКОЙ *F. TATARICUM* (L.) GAERTN.**

**Гумерова Е.А., Иванова А.С., Акулов А.Н., Румянцева Н.И.**

Казанский институт биохимии и биофизики, КазНЦ РАН, 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, тел. (843) 231 90 42, e-mail: gumeri@mail.ru

Активный синтез фенольных соединений (ФС) является характерной особенностью вторичного метаболизма гречихи татарской *F. tataricum* (L.) Gaertn. – вида, обладающего рядом ценных свойств и перспективного в селекционном плане. Как показали наши исследования, активный фенольный метаболизм сохраняется и при переводе тканей *F. tataricum* в культуру *in vitro*. Ранее методом ВЭЖХ нами было установлено, что эмбрионные культуры гречихи татарской, полученные из незрелых зародышей, синтезируют такие фенольные соединения, как галловая и феруловая к-ты, эпикатехин, кверцетин и его гликозильные производные – рутин и кверцитрин. Кроме того, в каллусных и суспензионных культурах гречихи татарской отмечено появление неидентифицированных пиков полифенолов, не характерных для зародышей и плодов гречихи.

Известно, что стрессовые воздействия способны стимулировать вторичный метаболизм культивируемых клеток. Элиситор метилжасмонат активирует транскрипцию генов, вовлеченных в реализацию комплекса защитных реакций растений на различные виды стрессоров. Цель нашей работы состояла в изучении влияния метилжасмоната (МеЖ) ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  М) на морфофизиологические характеристики морфогенной суспензионной культуры гречихи татарской, а также на содержание в ней фенольных соединений и их антиоксидантную активность (АА).

Показано, что внутриклеточных ФС в суспензионной культуре содержится почти в 2 раза больше, чем внеклеточных. В зависимости от концентрации МеЖ в среде культивирования наблюдали заметный рост содержания внутриклеточных ФС (10-65%) по сравнению с внеклеточными (до 10%). При этом для внутриклеточных ФС было характерно снижение антиоксидантной активности на 10-30%. Увеличение концентрации МеЖ незначительно стимулировало прирост биомассы к концу пассажа, но несколько снижало жизнеспособность культуры, а также содержание в ней белка (на 9-30%).

При культивировании суспензионной культуры на среде с  $10^{-5}$  М МеЖ уже в самом начале пассажа наблюдали потемнение клеток и изменение цвета среды. На 4-е сутки культивирования отмечали резкое снижение жизнеспособности культуры (на 60% от контроля), уменьшение содержания белка (на 30%), а также увеличение содержания на 31% внутриклеточных ФС с более низкой, чем в контроле АА. ВЭЖХ анализ показал, что МеЖ в концентрации  $10^{-5}$  М вызывает появление новых пиков ФС и усиливает синтез присутствующих в контроле ФС (например, эпикатехина). Эти изменения особенно заметны в начале пассажа. ВЭЖХ анализ выявил значительное увеличение содержания феруловой кислоты, характерное только для первых суток культивирования на среде с добавлением МеЖ. В ходе пассажа опытные показатели последовательно приближались к контрольным и к концу пассажа отличались друг от друга незначительно. Тем не менее, предкультивирование суспензионной культуры в течение пассажа на среде с  $10^{-5}$  М МеЖ приводило к почти полному подавлению ее эмбрионной активности на безгормональной среде МС.

Совокупность полученных нами данных может свидетельствовать о быстром развитии под действием МеЖ окислительного стресса в культуре и её постепенной к нему адаптации. Важно отметить, что активация защитных реакций при действии МеЖ коррелирует с почти полным подавлением эмбрионной способности суспензионной культуры.

**EFFECTS OF METHYL JASMONATE ON PHENOLIC METABOLISM,  
GROWTH AND MORPHOGENIC ACTIVITY IN SUSPENSION CULTURE OF  
TARTARY BUCKWHEAT *F. TATARICUM* (L.) GAERTN.**

**Gumerova E.A., Ivanova A.S., Akulov A.N., Rumyantseva N.I.**

Kazan Institute of biochemical and biophysics, RAS, Kazan, Lobachevskii str., 2/31,  
tel. (843) 231 90 42, e-mail: gumeri@mail.ru

Phenols intensive synthesis is the special feature of secondary methobolism of tartary buckwheat *F. tataricum* (L.) Gaertn., the species with valuable properties and important selection traits. Our studies showed that active phenolic methobolism remained the same when buckwheat tissues are transferred in *in vitro* culture. Earlier we established by the HPLC method that tartary buckwheat embriogenic cultures obtained from immature embryos synthesized such phenolics as gallic and ferulic acid, epicatechin, quercetine and its glycoside derivatives – rutin and quercetrine. Besides on the chromatograms of tartary buckwheat suspension and callus cultures unidentified peakes were detected indistinctive for the chromatograms of buckwheat embryos and seeds.

Stress factors are known to stimulate the cell culture secondary methobolism. Elicitor methyl jasmonate (MeJa) activates the transcription of genes involved in plant defence reactions against different kinds of stressors. The purpose of our work was to study methyl jasmonate ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M) effects on morpho-physiological characteristics of morphogenic buckwheat culture as well as their phenolic content and their antioxidant activity (AA).

It was shown that in suspension culture the intercellular phenolic compounds (PC) are two tomes more than extracellular ones. A significant increase of intercellular PC (10-65%) compared to extracellular (up to 10%) was observed depending on MeJa concentrations in culture medium. At the same time the 10-30% decrease of AA was specific for intercellular PC. Increasing the concentration of MeJa stimulated the biomass growth to the end of passage insignificantly but lowered slightly the culture viability and protein content (9-30%).

When grown with  $10^{-5}$  M MeJa darkened cells and medium colour changing were observed at the very beginning of the suspension passage. By 4 days of cultivation we remarked the sharp decline of the culture viability (60%), protein content reduction (30%) but the increasing of intercellular PC with AA lower than the control ones. HPLC analyses have shown that  $10^{-5}$  M MeJa caused new PC peaks and enhanced the synthesis of PC already existed in control (epicatechin). These changes were especially noticeable at the passage start. HPLC analyses have revealed the significant peak of ferulic acid essential only for the first days of cultivation with MeJa. During the passage the experiment data were consistently approached to the control ones and at the end of the passage differed slightly from each other. Nevertheless one passage precultivation of buckwheat suspension with  $10^{-5}$  M MeJa resulted to the almost total suppression of its embryogenic activity on the free-hormone medium.

Pooled data obtained may evidence of MeJa-induced oxidative stress increasing rapidly in buckwheat culture and subsequent gradual culture adaptation for it. It is important to note that defence mechanism activation under MeJa treatment correlated with almost total embryogenic ability suppression of culture.

**ВЫРАЩИВАНИЕ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *PANAX JAPONICUS* VAR. *REPENS* С ДОБАВЛЕНИЕМ РЕГУЛЯТОРА РОСТА МЕЛАФЕНА****Демидова Е.В.<sup>1</sup>, Решетняк О.В.<sup>1</sup>, Носов А.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва 127276, Ботаническая ул., 35, факс: (095) 9778018. (edemodova@newmail.ru)

<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы Горы, 1, корп. 19.

Женьшень ползучий (*Panax japonicus* var. *repens*) является эндемичным растением, произрастающим на Дальнем Востоке нашей страны. Суспензионная культура клеток этого растения поддерживается в Лаборатории Физиологии Культивируемых Клеток ИФР РАН с 1998 года и характеризуется стабильными ростовыми характеристиками. Культура клеток *P. japonicus* var. является продуцентом тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда(гинзенозидов)-наиболее ценных вторичных соединений женьшеня. Целью работы являлось проверить действие мелафена на ростовые и биосинтетические характеристики данной культуры. Мелафен – это гетероциклическое фосфорорганическое соединение, полученное в институте им. А.Е.Арбузова. Это регулятор роста растений, действующий при чрезвычайно низких концентрациях  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ .

В качестве объекта исследования использовали суспензионную культуру клеток *Panax japonicus* var. *repens* зарегистрированную в Российской коллекции культивируемых клеток высших растений (РККК ВР) под № 62. Выращивание проводили в колбах общим объемом 500 мл на среде MS с добавлением 2 мг/л  $\alpha$ -НУК и 1 г/л кинетина при температуре  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . Т.к. мелафен действует при низких концентрациях, было выбрано три варианта  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  и контрольный вариант без мелафена. Мелафен в питательную среду добавляли непосредственно перед автоклавированием. Содержание семи тритерпеновых гликозидов (Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Rf, Re, Rg<sub>1</sub>) определяли методом ВЭЖХ.

В результате проведенной работы показано, что добавление мелафена привело к увеличению накопления биомассы на 11-14% в варианте  $10^{-7}$  по сравнению с контролем (9,86г/л) и на 8% в варианте  $10^{-6}$ . Также наблюдали улучшение жизнеспособности культуры на 11% по сравнению с контрольным вариантом. При анализе содержания гинзенозидов в сухой массе клеток добавление мелафена не оказало существенное влияние на их общее содержание. Добавление мелафена в концентрации  $10^{-7}$  привело к снижению накопления гинзенозидов Rb группы, которые в этой культуре клеток обычно присутствуют в минорных количествах и не оказывают заметного влияния на общее количество. Содержание гинзенозидов Rg-группы было сопоставимо с контролем.

Таким образом, добавление мелафена позволяет стабилизировать рост культуры, улучшает жизнеспособность. Возможно, дальнейшая работа по изменению концентрации мелафена или способа его применения (добавление в середине цикла выращивания или кратковременная обработка высокой концентрацией) позволит существенно повлиять на биосинтез гинзенозидов.

**GROWING *P.JAPONICUS* VAR. *REPENS* CELL SUSPENSION WITH  
ADDITION MELEFEN****Demidova E.V<sup>1</sup>., Reshetnyak O.V<sup>1</sup>., Nosov A.M.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Timiriazev Plant Physiology Institute, Botanicheskaya 35, Moscow 127276, RussiaFax: (095)9778018, e-mail: [edemidova@newmail.ru](mailto:edemidova@newmail.ru)<sup>2</sup>Faculty of Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory 1, Moscow, 117234, Russia

*Panax japonicus* var. *repens* is an endemic plant found in the Far East of our country. A suspension culture cell of the plant is maintained in the Laboratory of Physiology of Cultured Cells in 1998 and is characterized by stable growth characteristics. Cell culture *P.japonicus* var. *repens* is a producer of triterpene glycosides (ginsenosides), the most valuable secondary compounds of ginseng. The purpose of our work was to test the effect of melafen on growth and biosynthetic characteristics of this culture. Melafen - is a heterocyclic organophosphorus compound obtained in the Institute A.E.Arbutov. This is a plant growth regulator, acting under the extremely low concentrations ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ).

The object of research used a cell suspension culture *Panax japonicus* var. *repens* registered under number 62. The culture was subcultured in shake flasks (250ml) at 26<sup>0</sup>c in darkness. Fresh and dry biomass, cell viability and cell number of the culture were determined. The production of ginsenosides by *P.japonicus* var. *repens* was analyzed by HPLC-method. Melafen three concentrations used  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , it was added autoclaving.

In experiments showed that adding melafen increased the biomass accumulation by 11-14% ( $10^{-7}$ ) compared with the control and by 8% ( $10^{-6}$ ). Culture viability was observed improved by 11% compared to the control. Melafen addition didn't significantly affect on the accumulation of ginsenosides. Adding a concentration of  $10^{-7}$  melafen reduced the accumulation of ginsenosides Rb. Ginsenosides Rb- group in this culture are found in minor amounts and have no impact on the total content. Content of Rg-group ginsenosides was about the same as in the control sample.

## КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ

Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Максимова Л.А., Нурминская Ю.В., Шафикова Т.Н., Гаманец Л.В., Швецов С.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Иркутск, 664033, ул. Лермонтова, 132, факс: (3952) 51-07-54, тел. (3952) 42-66-76, e-mail: [enikeev@sifibr.irk.ru](mailto:enikeev@sifibr.irk.ru)

Первое генно-модифицированное растение создано около 30 лет назад. Однако на сегодняшний день нет однозначного ответа на вопрос о том, что такое трансгенное растение с точки зрения физиолога, каковы его свойства и особенности. В свою очередь, отсутствие такой информации не позволяет решить проблему рисков ГМО, найти надежные пути их снижения. Попытки оценки вероятности рисков с помощью генетических (наличие мутаций или перестроек) и биохимических (сравнение метаболических профилей) методов оказались малоэффективными. Оценка физиологических последствий трансформации по всему спектру возможных изменений невозможна в силу огромной трудоемкости и взаимоналожения большого числа процессов метаболизма. Культуры клеток являются удобным объектом для изучения на клеточном уровне физиолого-биохимических свойств растений, а простота моделирования условий среды *in vitro* позволяет применять широкий экспериментальный диапазон. Использование культуры клеток трансформированных растений, в свою очередь, делает доступным исследование эффектов трансгеноза на клеточном уровне, в частности для изучения физиологических процессов, сопровождающих реакцию трансформированного организма на стресс. Исследовались реакции культур клеток табака (*Nicotiana tabacum* L. сорт Самсун), трансформированных разоруженным штаммом *Agrobacterium tumefaciens* A699 и конструкциями на основе штамма *A.t.* LBA 4400 с геном *hsp101* (белок теплового шока 101 kD) из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. в сенсовой и антисенсовой ориентации на воздействие биотических (бактериальный патоген *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) и абиотических (высокая температура, фторид калия) стрессирующих факторов. Анализ полученных результатов позволяет сделать следующие выводы и предположения: 1) Агробактериальную трансформацию следует рассматривать как комплексный биотический стрессирующий фактор, а трансгенное растение – организм в состоянии хронического стресса; 2) Последствия генетической трансформации в значительной степени определяются не только характеристиками целевого гена, но и степенью филогенетической удаленности донора и реципиента генов; 3) Изучение функций отдельных белков с использованием генно-инженерных методов (особенно с использованием антисенсовой стратегии) правомочно только при близком систематическом родстве донора и реципиента генов. В противном случае результаты могут быть сильно искажены наложением реакции на стресс.

**CELL CULTURES AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR THE STUDY OF  
PHYSIOLOGICAL CONSEQUENCES OF PLANT GENETIC TRANSFORMATIONS****Enikeev A.G., Kopytina T.V., Maksimova L.A., Nurminskaya Yu.V., Shafikova T.N.,  
Gamanets L.V., Shvetsov S.G.**

Federal state budget science institution Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry  
SB RAS, Irkutsk, 664033, Lermontov str., 132, fax: (3952) 51-07-54, tel. (3952) 42-66-76, e-  
mail: [enikeev@sifibr.irk.ru](mailto:enikeev@sifibr.irk.ru)

The first genetically modified plant was created about 30 years ago. However, there is still no unambiguous answer concerning the nature of transgenic plant, its properties and peculiarities from physiological viewpoint. Lack of such information hampers the search for GMO risks and reliable ways of their alleviation. Attempts to evaluate risk probability by genetic (facts of mutations or restructuring) and biochemical (comparison of metabolic profiles) methods proved to be of low efficiency. Assessment of physiological consequences of transformation throughout the whole spectrum of probable changes is impossible due to immense labor intensity and mutual superimposition of a large number of metabolic processes. Cell cultures are a suitable object for the study of physiological and biochemical properties of plants on cell level; the simplicity of modeling *in vitro* environment conditions allows to use a wide experimental range. The use of transformed plants cell cultures, in its turn, facilitates the research of transgenesis of the cell level, in particular for the study of physiological processes accompanying the response of transformed organism to stress. The study was based on the response of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. Samsun variety) cell cultures transformed by disarmed strain of *Agrobacterium tumefaciens* A699 and constructions on the basis of strain *A.t.* LBA 4400 with *hsp101* gene (heat shock protein 101 kD) from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. in sense and anti-sense orientation on the impact of biotic (bacterial pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) and abiotic (high temperature, potassium fluoride) stressors. The analysis of the results acquired allows to make the following conclusions and presumptions: 1) Agrobacterial transformation should be regarded as a complex biotic stress factor, and transgenic plant – as an organism under chronic stress; 2) Consequences of genetic transformation are to a considerable extent determined by not only characteristics of target gene, but also by the degree of phylogenetic remoteness of gene donor and recipient; 3) The study of individual proteins functions with the use of genetic engineering methods (particularly with the use of anti-sense strategy) is justified only in case of close systematic relation between gene donor and recipient. Otherwise, the results might be significantly distorted by superimposition of stress response.



## АДАПТАЦИЯ АНТАРКТИЧЕСКИХ МХОВ К ДЕЙСТВИЮ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ: ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИФРУКТАНОВ

Кваско О. Ю., Лучаковская Ю. С., Дробот Е.С., Чапкевич С.А., Матвеева Н. А.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 03680, ул. вк. Заболотного, 148,  
тел. +38(044) 522 17 87, e-mail: [kvasko.olena@gmail.com](mailto:kvasko.olena@gmail.com)

Действие абиотических стрессов на растительный организм может приводить к активизации процессов синтеза белка, активности антиоксидантной системы, а также изменение синтеза запасных соединений и вторичных метаболитов. Полифруктаны являются запасными соединениями некоторых видов растений и принимают участие в адаптации растений к действию стрессовых факторов. Относительно содержания этих соединений у антарктических растений данные отсутствуют. В связи с этим целью данной работы было проанализировать содержание полифруктанов в растениях Антарктики (на примере мохообразных) при действии некоторых абиотических стрессовых факторов – избытка азота, засоления, низких и высоких температур.

Объектами исследований были растения *Polytrichum juniperinum* и *Warnstorfia fontinaliopsis*, которые культивировались на агаризованных средах с различным содержанием нитрата аммония  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,84; 3,3; 6,6; 13,2 г/л), хлорида натрия  $\text{NaCl}$  (25; 50; 100; 200 мМ), а также при действии низких положительных температур (+4 °С) и высоких температур (+37 °С). Содержание ПФ определяли через 30 суток культивирования по методу Селиванова.

Результаты исследований показали, что при культивировании растений на средах, содержащих нитрат аммония, содержание ПФ отличалось у растений двух видов - *P. juniperinum* и *W. fontinaliopsis*. Так, количество ПФ у *P. juniperinum* составляло  $18,53 \pm 1,44$  мг/г массы, а в растениях *W. fontinaliopsis* –  $33,58 \pm 5,09$  мг/г массы (0,84 г/л  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). При увеличении концентрации нитрата аммония до 3,3 г/л наблюдалось увеличение содержания ПФ как в растениях *P. juniperinum*, так и у растений *W. fontinaliopsis* (до  $44,62 \pm 3,21$  и  $80,92 \pm 2,18$  мг/г влажной массы соответственно). Дальнейшее увеличение концентрации нитрата аммония в среде приводило к некоторому уменьшению содержания ПФ у растений двух видов.

При изучении влияния хлорида натрия показано, что присутствие 50 мМ  $\text{NaCl}$  у растений *W. fontinaliopsis* приводило к увеличению содержания ПФ в 2 раза по отношению к контролю. При увеличении концентрации  $\text{NaCl}$  до 100 и 200 мМ содержание ПФ в растениях этого вида мохообразных уменьшалось. У растений *P. juniperinum* при действии солевого стресса содержание ПФ достоверно не изменялось.

При действии на растения *W. fontinaliopsis* низких положительных температур (+4 °С) наблюдали повышение содержания ПФ в 2,5 раза по отношению к контролю при увеличении срока низкотемпературной экспозиции с 2 до 20 суток. В то же время у растений *P. juniperinum* содержание ПФ достоверно не изменялось. При действии высокой положительной температуры (+37 °С) отмечен аналогичный эффект. С увеличением срока экспозиции с 12 до 24 часов при температуре 37 °С содержание ПФ у растений *W. fontinaliopsis* существенно увеличивался (в 10-12 раз), а у растений *P. juniperinum* оставалось сравнимым с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение содержания фруктозосодержащих сахаров является одним из механизмов, обеспечивающих защиту клеток растений *W. fontinaliopsis* от последствий абиотических стрессов (избытка азота, засоления, низких положительных и высоких температур). В то же время у растений *P. Juniperinum*, вероятно, увеличение синтеза полифруктанов не является основным адаптивным механизмом, а устойчивость к абиотическим стрессам выражается у альтернативных способах защиты. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-НАН Украины 2012-2013.*

**ADAPTATION OF ANTARCTIC PLANTS TO ABIOTIC STRESSES:  
THE CHANGE OF POLYFRUCTAN CONTENT****Kvasko O. Yu., Luchakovskaya Yu. S., Drobot K. O., Chapkevych S.E.,  
Matvieieva N. A.**

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kiev, 03680, Ak. Zabolotny st., 148, tel. +38 (044) 522 17 87 e-mail: kvasko.olena@gmail.com

The abiotic stresses leads to activation of protein synthesis, the antioxidant activity, and change of the secondary metabolites synthesis and content of storage compounds. Polyfruktans (PF) are storage compounds of some plants and involved in the adaptation of plants to environment stresses. The data about content of these compounds in Antarctic plant are available. In this study adaptation reaction of Antarctic mosses under abiotic stress factors (nitrogen content, salinity, low and high temperatures) were analyzed including polyfruktans content.

The plant of two species of mosses - *Polytrichum juniperinum* and *Warnstorfia fontinaliopsis* – have been investigated. They were cultivated on solidify media with different ammonium nitrate  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,84; 3,3; 6,6; 13,2 g/l), sodium chloride, NaCl (25, 50, 100, 200 mM) content as well as the action of a low positive temperature (+4 °C) and high temperature (+37 °C). PF content was determined after 30 days of cultivation using Selivanov method.

The results showed that the cultivation of plants on media containing ammonium nitrate, PF content in plants of two species - *P. juniperinum* and *W. fontinaliopsis* differed. Thus, the PF content in *P. juniperinum* plants was  $18,53 \pm 1,44$  mg/g fresh weight, and in *W. fontinaliopsis* plants -  $33,58 \pm 5,09$  mg/g fresh weight (0.84 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). The increasing of ammonium nitrate concentration up to 3.3 g/l caused the increasing of the PF content of in *P. juniperinum* and *W. fontinaliopsis* plants (up to  $44,62 \pm 3,21$  and  $80,92 \pm 2,18$  mg/g fresh weight, respectively). A further increasing of ammonium nitrate concentration in the medium led to some reduction in PF content.

The studying of the effect of sodium chloride concentration showed that cultivation *W. fontinaliopsis* in the presence of 50 mM NaCl resulted in an increase of the PF content in 2 times as compared to the control. The increasing of NaCl concentration up to 100 and 200 mM led to decreasing of PF content. The PF content in *P. juniperinum* was not decreased under the salt stress.

The effect of low positive temperature (+4 °C) on the PF content in *W. fontinaliopsis* plants led to increasing the PF content in 2,5 times compared to control with the prolongation of cold exposition from 2 to 20 days. At the same time, the PF content in *P. juniperinum* was not significantly changed. The PF content in *W. fontinaliopsis* plants significantly increased (10-12 times) under prolongation of high temperature exposition (+37 °C) from 12 to 24 hours. PF content in the *P. juniperinum* plants was comparable to the PF content in control plants.

The results suggest that increasing the fructan content is one of the mechanisms that protect *W. fontinaliopsis* plants from the effects of abiotic stresses (nitrogen content, salinity, low positive and high temperatures). At the same time, in *P. juniperinum* plant increasing of polyfruktan content is not the main adaptive mechanisms and it is possible that tolerance to abiotic stress is expressed in alternative protective mechanisms.

*This work was supported by grant NAS of Ukraine- SFRR of Russia, 2012-2013*

**РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА РЕЗВЕРАТРОЛА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК  
ВИНОГРАДА *Vitis amurensis* RUPR. С ПОМОЩЬЮ ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-  
ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ.**

**Киселев К.В.<sup>1</sup>, Дубровина А.С.<sup>1</sup>, Шумакова О.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, 690022, пр. Столетия Владивостоку, 159, факс: 8(423)231-01-93, 8(423)231-07-18, e-mail: kiselev@biosoil.ru

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690090, ул. Октябрьская, 27, факс: 8(423)243-23-15, 8(423)245-76-87

Резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен) – это один из самых известных вторичных метаболитов растений, ценное биологически активное вещество, привлекающее значительный интерес исследователей. Резвератрол обладает превентивными свойствами против нескольких видов рака, положительно влияет на работу сердечно-сосудистой системы, а также обладает высоким фармакологическим потенциалом в лечении нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, резвератрол интересен как индуцибельное защитное соединение растений (фитоалексин), синтезируемое растением в ответ на ультрафиолетовое излучение, воздействие фитопатогенов и другие стрессовые воздействия окружающей среды. Резвератрол обнаружен во многих растениях, таких как тутовое дерево, арахис, клюква и голубика. Содержание резвератрола в винограде, в том числе в диком винограде *Vitis amurensis* Rupr., является наибольшим среди всех известных растений. В растениях содержание этого вещества невелико, поэтому получать резвератрол из растений невыгодно. Клеточные культуры винограда, при условии их высокой продуктивности, могли бы стать альтернативным источником резвератрола. Цель нашей работы – исследование биохимических и молекулярно-генетических механизмов, ведущих к активному биосинтезу резвератрола клетками растений.

Ранее нами было показано, что ингибиторы Ca<sup>2+</sup>-каналов способны блокировать накопление резвератрола в клетках винограда *V. amurensis*, а ионофоры Ca<sup>2+</sup>, напротив, увеличивают его продукцию. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что биосинтез резвератрола является Ca<sup>2+</sup>-зависимым процессом. Известно, что основными сенсорами цитоплазматического Ca<sup>2+</sup> в клетках растений являются Ca<sup>2+</sup>-зависимые протеинкиназы (CDPK), поэтому основное внимание в дальнейшей работе мы решили уделить изучению участия генов *CDPK* в регуляции биосинтеза резвератрола. В связи с развитием технологий рекомбинантных ДНК появилась возможность принципиально нового подхода в управлении метаболическим аппаратом клетки и исследованию функций исследуемых генов. Мы секвенировали полные последовательности кДНК некоторых генов *CDPK V. amurensis* и женьшеня *Panax ginseng* и клонировали в векторные конструкции под контроль двойного CaMV35s промотора. С помощью метода агробактериальной трансформации мы получили более десяти трансгенных каллусных клеточных культур *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих белок-кодирующие последовательности генов *CDPK*. Первые результаты показывают, что при трансформации *V. amurensis* геном *PgCDPK2d* из *P. ginseng* продукция резвератрола, по сравнению с нетрансгенными клетками, достоверно увеличилась до 30 мг/л, в то время как при трансформации *V. amurensis* геном *VaCDPK3a* продукция резвератрола трансформированными культурами оставалась на прежнем уровне. Полученные данные указывают на то, что только некоторые представители мультигенного семейства *CDPK* могут быть вовлечены в сигнальный путь, регулирующий биосинтез резвератрола. Основным направлением нашей дальнейшей экспериментальной работы является изучение молекулярных механизмов работы CDPK, обеспечивающих увеличение продукции резвератрола клетками винограда *V. amurensis*.

**REGULATION OF RESVERATROL BIOSYNTHESIS IN CELL CULTURES OF WILD-GROWING GRAPE *Vitis amurensis* RUPR. BY OVEREXPRESSING CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE GENES****Kiselev K.V.<sup>1</sup>, Dubrovina A.S.,<sup>1</sup> Shumakova O.A.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022, Stoletiya str., 159, fax: 8(423)231-01-93, 8(423)231-07-18, e-mail: kiselev@biosoil.ru

<sup>2</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690090, Oktyabrskaya str., 27, факс: 8(423)243-23-15, 8(423)245-76-87.

The polyphenol resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene) is one of the best known plant secondary metabolites. The number of articles devoted to resveratrol has been steadily increasing. Resveratrol is a molecule that is beneficial to human health; this explains the high level of interest in resveratrol among different research groups. It has been shown that *trans*-resveratrol, which possesses powerful antioxidant properties, interferes with oxidative modifications of lipids. Due to its antioxidant properties, resveratrol has been hypothesized to play a role in the prevention of cardiovascular diseases and may also provide some protection against certain types of cancer. Currently, resveratrol is primarily consumed in the form of numerous biological additives. The described valuable properties of resveratrol are promising to find application in pharmaceutical industries. The aim of our study was the investigation of the molecular mechanisms regulating resveratrol biosynthesis in wild-growing grapevine *Vitis amurensis*, which is a valuable natural source of resveratrol.

It has been shown that the calcium channel blockers (LaCl<sub>3</sub>, verapamil, niflumic acid) significantly reduced the accumulation of resveratrol in cell cultures of *V. amurensis*, while treatment of the calli with the calcium ionophore **A23187** significantly increased resveratrol production. The results indicated that biosynthesis of resveratrol is a Ca<sup>2+</sup>-dependent process. Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) are implicated as the major primary sensors of Ca<sup>2+</sup> flux in plants and play an essential role in plant defense responses, embryogenesis, germination, and seedling growth. Therefore, we aimed to investigate the role CDPKs in the regulation of resveratrol biosynthesis in *V. amurensis*. We used *Agrobacterium*-mediated transformation of a *V. amurensis* cell suspension culture to obtain several transgenic cell lines of *V. amurensis* overexpressing CDPK genes.

We obtained full cDNAs of some *V. amurensis* and *Panax ginseng* CDPKs and cloned them into the pZP-RCS-nptII vector for under the control of the double cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter. Using *Agrobacterium*-mediated transformation, we obtained more than 10 transgenic callus cell lines of *V. amurensis* overexpressing different CDPK genes. Our first results show that overexpression of the *PgCDPK2d* gene in *V. amurensis* considerably increased resveratrol production by the calli up to 30 mg/L (0.06% DW) compared with the empty vector-transformed grape cells. Overexpression of the *VaCDPK3a* gene in *V. amurensis* considerably increased cell growth but did not have an effect on resveratrol production. The data suggest that only certain CDPK genes from the multigene CDPK families have an effect on resveratrol production and may serve as positive regulators of resveratrol biosynthesis. One of the most important directions of further experimental work is to investigate the content of resveratrol in all of the obtained callus cell lines of *V. amurensis* overexpressing other CDPK genes.

## ФИТОГОРМОНЫ И ПОЛЯРНЫЙ РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Воронков А.С., Андреев И.М.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва-127276, Ботаническая ул. 35, тел: 8(499) 231-83-06 e-mail: [kovaleva\\_1@mail.ru](mailto:kovaleva_1@mail.ru)

В последние годы достигнут значительный прогресс в изучении механизмов, лежащих в основе полярного роста пыльцевой трубки, являющегося ключевым процессом прогамной фазы оплодотворения у высших растений. В настоящее время наиболее активная область исследований роста пыльцевой трубки включает в себя идентификацию в ней различных сигнальных путей, участвующих в регуляции этого процесса. Фитогормоны, основные регуляторы роста растений (ауксины (ИУК), гиббереллины (ГК), абсцизовая кислота (АБК) и цитокинины), как показали исследования, присутствуют в пыльцевых зернах растений. Однако только недавно стали накапливаться данные об их участии в апикальном росте пыльцевых трубок. В наших исследованиях было установлено, что прорастание и рост пыльцевых трубок петунии в условиях *in vivo* и *in vitro* сопровождаются изменением уровня в них эндогенных фитогормонов и обнаруживают чувствительность к экзогенным соединениям такого рода. Они, как выяснилось, способны оказывать также влияние на организацию актинового цитоскелета пыльцевой трубки. Это выражается в увеличении под действием ИУК и этилена общего содержания в ней F-актина или в перераспределении его в ее апикальную зону под влиянием АБК и ГК, эффектах, сопровождающих стимуляцию роста фитогормонами. Напротив, ингибирование роста пыльцевых трубок, сопровождаемое снижением общего количества актиновых филаментов, наблюдалось нами в присутствии в среде кинетина или латрункулина Б. Нами установлено, что стимулирующий эффект фитогормонов на рост мужского гаметофита может быть обусловлен стимуляцией активности  $H^+$ -АТФазы в плазматической мембране клеток пыльцы, предположительно опосредованной поступлением в них ионов  $Ca^{2+}$  из внеклеточной среды и генерацией АФК, вероятно, обусловленной активностью НАДФН-оксидазы. В целом все эти результаты позволяют заключить, что фитогормоны, и, прежде всего, ИУК и ГК, активным образом участвуют в регуляции полярного роста мужского гаметофита. Особую роль здесь играют этилен и его предшественник АЦК, которые, как полагают, включаются в передачу сигнала опыления от рыльца к другим органам цветка (столбику, завязи, лепесткам). Как показали наши исследования, этилен включается в регуляцию гаметофитно-спорофитных взаимодействий, в том числе в ходе развития, прорастания и роста мужского гаметофита петунии *in vivo* и образуется как в тканях пестика после опыления, так и в самих пыльцевых зернах на завершающих стадиях их созревания. Развитие мужского гаметофита у фертильных клонов петунии сопровождалось двумя максимумами содержания АЦК и выделения этилена в системе пыльник–мужской гаметофит в процессе развития микроспор, и созревания пыльцевых зерен. Прорастание мужского гаметофита петунии *in vitro* также сопровождается выделением этилена, образующегося из АЦК, накопленной на завершающих стадиях созревания пыльцевого зерна. Ингибитор действия этилена 2,5-норборнадиен (NBD) блокировал как развитие, так и прорастание мужского гаметофита. Согласно нашим предварительным данным, полученным на прорастающем *in vitro* гаметофите петунии, этилен участвует в регуляции полярного роста пыльцевых трубок, взаимодействуя с другими фитогормонами, такими как ИУК, АБК, ГК и цитокинины.

Поддержано грантом РФФИ (№ 10-04-0356).

**PHYTOHORMONES AND THE POLAR POLLEN TUBE GROWTH****Kovaleva L.V., Zakharova E.V., Voronkov A.S., Andreev I.M.**

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow-127276,  
Botanicheskaya st. 35

tel: 8(499)-231-83-06; E-mail: [kovaleva\\_l@mail.ru](mailto:kovaleva_l@mail.ru)

In recent years a significant progress was achieved in elucidating the mechanisms underlying polar pollen tube growth being a key process of the progame phase of higher plant fertilization and the most striking example of plant cell apical growth. At present, the most active branch of studies of pollen tube growth concerns identification in it of various signaling pathways involved in the regulation of the given process. One of putative regulators of the latter is phytohormones, basic regulators of plant growth (auxins (IAA), gibberellins (GA), abscisic acid (ABA) and cytokinins), that are present in pollen grains of plants as this follows from the available data. However, only very recently, some data on their possible participation in apical growth of pollen tubes growth became to be accumulated. In our studies, it was established that germination and growth of petunia pollen tubes both *in vivo* and *in vitro* were accompanied by changes in them of the level of endogenous phytohormones and at the same time appeared to be sensitive to exogenous such type compounds. In addition, it was found that these are able to exert a marked impact on organization of actin cytoskeleton of pollen tube. This is expressed in the increase in it of the total amount of F-actin under the action of IAA and ethylene or redistribution of this actin form into apical zone of pollen tube under the action of ABA and GA, with these two effects appeared to be related to the stimulation of pollen tube growth. In contrast, inhibition of the latter process accompanied by the decrease of total amount of filaments of pollen tubes was observed by us in the presence of kinetin or latrunculin B in the medium of their cultivation. According to our findings the stimulation of pollen tube growth by phytohormones may be result of enhancing by them the activity of H<sup>+</sup>-ATPase in the plasma membrane of pollen cells putatively mediated by entering into the cells of external Ca<sup>2+</sup> ions and generation in them of reactive oxygen species probably caused by the activity of NADP oxidase. All these results, taken together, allowed us to conclude that phytohormones are capable of involving in the regulation of polar growth of male gametophyte. Here, the ethylene plays a special role. The signal of pollination is apparently transmitted from the pollinated stigma surface to other floral organs (style, ovary, petals, etc.). Numerous data indicate that ethylene and its precursor ACC are involved in this process. As follows from our data, ethylene participates in the regulation of the gametophyte-sporophyte interactions including the events occurring during development, germination and growth of petunia male gametophyte *in vivo* and is produced in both stigma tissues after pollination and pollen grains themselves at final stages of their maturation. Besides, germination of petunia male gametophyte *in vitro* appeared to be accompanied by ethylene evolving as well, with this is synthesized here from ACC accumulated in pollen grains at final stages of their maturation. According to our preliminary results obtained on culture *in vitro* ethylene exerts its regulatory impact on polar growth of petunia pollen tubes on the base of its interaction with other phytohormones such as IAA, ABA, GA and cytokinins.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЛИХЕНОЛОГИЯ: КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И  
«КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ» ЛИШАЙНИКОВ**

Лобакова Е.С.

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, [elena.lobakova@rambler.ru](mailto:elena.lobakova@rambler.ru)

Лишайники (лихенизированные грибы) представляют собой сложную надорганизменную многокомпонентную систему, в которой триггерные механизмы, запускающие морфогенез, детали морфогенеза, а также способ взаимодействия партнеров (грибов цианобактерий и/или микроводорослей) особенности синтеза и накопления лишайниковых веществ до сих пор изучены не достаточно. Экспериментальная лихенология, как один из разделов современной науки, ставит перед собой следующие задачи: 1) реконструировать существующие в природе лишайники; 2) поддерживать в культуре *in vitro* фрагменты талломов лишайников и 3) культивировать природные и модельные системы - «культуры суспензионных и каллусных тканей» на основе грибов и фототрофных микроорганизмов. Успехи в области экспериментальной лихенологии позволят решить ряд как практических, так и теоретических задач. Практическим выходом такого рода работ может являться получение известных и новых биологически активных соединений – лишайниковых веществ, обладающих широким спектром действия. Работ по реконструированию и моделированию базидиолишайников до настоящего времени не проводилось (все работы в области экспериментальной лихенологии сделаны на основе лишайников, микобионтами которых являются аскомицеты), однако, легко культивируемые агарикоидные базидиомицеты, обладающие набором ценных вторичных метаболитов, могут служить основой для создания модельных ассоциаций и «культур тканей» лишайников и разработки новых биотехнологий.

**EXPERIMENTAL LICHENOLOGY: CULTIVATION OF AND 'TISSUE CULTURES' FROM LICHENS**

**Lobakova E.S.**

Biological Faculty of M.V. Lomonosov MSU, elena.lobakova@rambler.ru

The goals of experimental lichenology as a branch of contemporary science include i) reconstruction of natural lichens, ii) *in vitro* preservation of lichen thallus fragments, and iii) cultivation of natural and model systems—'suspension and callus tissue cultures' comprised by fungi and phototrophic microorganisms. Progress of experimental lichenology will solve a number of theoretical and practical problems *e.g.* will facilitate the discovery and production of bioactive lichen compounds exerting multifaceted effects.



**ОСОБЕННОСТИ ГИБЕЛИ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУРАХ  
ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. И САХАРНОГО ТРОСТНИКА  
*SACCHARUM OFFICINARUM* L., ВЫЗВАННОЙ ДЕЙСТВИЕМ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ  
ТЕМПЕРАТУРЫ**

**Любушкина И.В.<sup>1,2</sup>, Грабельных О.И.<sup>1,2</sup>, Федяева А.В.<sup>1</sup>, Побежимова Т.П.<sup>1</sup>,  
Степанов А.В.<sup>1</sup>, Федосеева И.В.<sup>1</sup>, Войников В.К.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033, ул. Лермонтова, 132, факс (3952) 51-07-54, тел. (3952) 42-46-59, e-mail: estel\_86@mail.ru

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение Иркутский государственный университет, Иркутск, 664003, ул. Карла-Маркса, 1, факс (3952) 24-22-38, тел. (3952) 24-22-38, e-mail: grolga@sifibr.irk.ru

В данной работе изучались особенности процесса гибели клеток, вызванной действием отрицательной температуры, в суспензионных культурах растений, обладающих разной степенью морозостойкости. В качестве объектов исследования были выбраны две суспензионных культуры: озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), полученной из зрелых зародышей, и сахарного тростника (*Saccharum officinarum*, сорт РОЈ2878, линия, устойчивая к аноксии). Данные культуры обладали разной скоростью роста: экспоненциальная фаза в суспензионной культуре озимой пшеницы длилась до 21-24-х суток культивирования, а в культуре сахарного тростника - до 12-х суток.

Разная степень морозостойкости данных культур проявилась уже на этапе подбора интенсивности и длительности обработки. Так, в суспензионной культуре озимой пшеницы наиболее подходящими температурами для активации длительного процесса гибели клеток явились температуры в диапазоне от -5 °С до -10 °С. Окончательный выбор был сделан в пользу температуры воздействия -8 °С, при этом период обработки был достаточно длительным и составил 6 ч. Такое воздействие вызывало длительный процесс гибели в суспензионной культуре озимой пшеницы, реализация которого продолжалась на протяжении 10 суток после перемещения культуры в контрольные условия. Процесс гибели сопровождался увеличением в культуре доли клеток с конденсированным протопластом. Данная обработка (-8 °С, 6 ч) оказалась слишком губительной для клеток суспензионной культуры сахарного тростника и приводила к гибели более чем 80% клеток в культуре уже во время воздействия. Уменьшение периода воздействия показало, что наиболее подходящим для обработки является период 2 ч. При данном воздействии погибало около 20% клеток культуры непосредственно во время обработки и еще 60% в течение последующих 24 ч после переноса культуры в контрольные условия.

Несмотря на различия в степени чувствительности клеток к отрицательной температуре и скорости развития гибели, вызываемой исследуемой температурой, реализация процесса гибели клеток в культурах озимой пшеницы и сахарного тростника осуществлялась сходным способом при участии митохондрий. Действие отрицательной температуры приводило к временной гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны в клетках исследуемых культур. При этом в культуре клеток озимой пшеницы на 6-е сутки, а в культуре клеток сахарного тростника через 4-6 ч наблюдался выход из митохондрий в цитозоль цитохрома *c* - белка, являющегося одним из ключевых в запуске и реализации процесса активной гибели.

Таким образом, можно сделать вывод, что отрицательная температура (-8 °С) вызывала процесс гибели клеток в суспензионной культуре озимой пшеницы и сахарного тростника, различавшийся по скорости, но сходный по способу реализации - с участием митохондрий.

*Работа была выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 8266.*

**FEATURES OF CELL DEATH, CAUSED BY THE FREEZING TEMPERATURE INFLUENCE, IN WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) AND SUGAR CANE (*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) SUSPENSION CULTURES**

**Lyubushkina I.V.<sup>1,2</sup>, Grabelnych O.I.<sup>1,2</sup>, Fedyaeva A.V.<sup>1</sup>, Pobezhimova T.P.<sup>1</sup>, Stepanov A.V.<sup>1</sup>, Fedoseeva I.V.<sup>1</sup>, Voinikov V.K.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Siberian institute of plant physiology and biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033, Lermontova st., 132, fax (3952) 51-07-54, phone (3952) 42-46-59, e-mail: estel\_86@mail.ru

<sup>2</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, 664003, Karla-Marksa st., 1, fax (3952) 24-22-38, phone (3952) 24-22-38, e-mail: grolga@sifibr.irk.ru

The features of cell death process caused by freezing temperature influence in suspension cultures of plants with different degrees of frost resistance have been studied in this work. The objects of investigation were two suspension culture: winter wheat suspension culture (*Triticum aestivum* L.), obtained from mature embryos, and sugar cane suspension culture (*Saccharum officinarum*, grade POJ2878, line, resistant to anoxia). The cultures had different growth rate: exponential phase in the suspension culture of winter wheat lasted to 21<sup>st</sup> - 24<sup>th</sup> days of cultivation, but in the culture of sugar cane - to 12<sup>nd</sup> days.

Different degrees of frost resistance of these cultures have already been shown at the stage of selection of the treatment intensity and duration. Thus, temperatures from -5 ° C to -10 ° C were the most suitable for activation of prolonged cell death process in the winter wheat suspension culture. The final choice was made in favor of the temperature -8 ° C, and the period of treatment was rather long and was 6 hours. This exposure has caused the prolonged cell death process in the winter wheat suspension culture, and its realization was lasting for 10 days after culture moving to the control condition. Death process was accompanied by an increase in the proportion of cells with shrinkage protoplast. It should be noted that the exposure was too destructive to the sugar cane suspension culture: treatment of the culture with the temperature -8 ° C for 6 hours has resulted in the death of more than 80% of the cells in the culture. Reducing the exposure period has shown that the most appropriate treatment was a 2 h-period. About 20% of the cells in the sugar cane suspension culture were dying during the treatment, and after moving the culture in the control condition - 60% of cells were dying for the next 24 hours.

Despite the differences in the sensitivity of cells to the negative temperature and rates of death execution, caused by the studied temperature, realization of the process of cell death in the winter wheat and sugar cane suspension cultures came to be by similar pathway involving mitochondria. In this work it has been shown that the influence of the negative temperature has resulted in a temporary inner mitochondrial membrane hyperpolarization in cells of the both investigated cell cultures. Release of cytochrome *c* from mitochondria to cytosol was observed in the cell culture of winter wheat on the 6<sup>th</sup> day, and in the cell culture of sugar cane after 4-6 hours after the treatment. It is known that it is the one of the key protein for the activation and realization of the active cell death process.

Thus, it can be concluded that the freezing temperature (-8 ° C) caused the cell death processes in the winter wheat and sugar cane suspension cultures, which were differ in speed, but similar in the manner of realization - with mitochondria participation.

*This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, the 8266 agreement.*

## КАЛЛУСНАЯ КУЛЬТУРА ОГУРЦА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРЕССОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ $Zn^{2+}$ И $Ni^{2+}$

Михайлова И. Д., Лукаткин А. С.

ФГБОУВПО «Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева» Россия, 430005, г. Саранск, ул. Большевикская, 68, Тел. +7(8342)322507 e-mail:kariglazayi@yandex.ru

Для получения каллусной культуры огурца высаживали обеззараженные семена огурца (*Cucumis sativus* L., сорт Единство) в пробирки со стерильной водой на мостики для получения стерильных растений. После 7 дней выращивания растения эксплантировали, делали насечки на эксплантах и помещали их в чашки Петри на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), содержащую 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) (в концентрации от 1 мг/л до 5 мг/л) и 6-бензиламинопури (6-БАП) (в концентрации от 0,5 мг/л до 2 мг/л), глицин, никотиновую кислоту и мезоинозит, для образования каллусной ткани. Полученную каллусную ткань пересаживали на среду МС, содержащую ионы  $Zn^{2+}$  в концентрациях 0,1 мМ и 1 мМ (контроль – среда МС, в состав которой изначально входит 2,8 мг  $Zn^{2+}$ ) или  $Ni^{2+}$  в концентрациях 10 мкМ, 0,1 мМ, 1 мМ.

Показано, что ионы цинка при высокой концентрации негативно влияли на каллусогенез огурца и вызывали отмирание каллусных клеток; при более низкой концентрации наблюдался очень незначительный рост культуры клеток огурца. При изучении окислительных проявлений в каллусах огурца, выращенных на среде с внесением ионов цинка, выявлена прямая зависимость между концентрацией  $Zn^{2+}$  и скоростью генерации  $O_2^-$ . Это свидетельствует о неблагоприятном воздействии на каллусную культуру ионов цинка, вызывающих усиление генерации  $O_2^-$ , следовательно, возникновение окислительного стресса. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в каллусных клетках огурца *in vitro* при действии ионов цинка незначительно превышала контроль во всех вариантах опыта, при этом с увеличением дозы  $Zn^{2+}$  в среде наблюдалась тенденция к возрастанию ПОЛ.

Ионы никеля не оказали токсического влияния на каллус огурца, как при низких, так и при высоких концентрациях. Не выявлено активирующего действия ионов никеля на скорость генерации супероксидного анион-радикала в каллусной культуре огурца, т.к. генерация  $O_2^-$  была ниже контроля, причем наименьшее значение (меньше контроля в 2 раза) наблюдалось при концентрации  $Ni^{2+}$  1 мМ. Интенсивность ПОЛ возрастала с увеличением дозы ионов никеля в среде, но ни в одной из концентраций не выявлено стимулирующего действия на данный показатель.

Таким образом, выявлена разнонаправленная реакция каллусных клеток огурца на длительное действие ионов  $Zn^{2+}$  и  $Ni^{2+}$ . По-видимому, в эквимоллярных концентрациях ионы  $Zn^{2+}$  более токсичны относительно ионов  $Ni^{2+}$  для каллусных клеток огурца. Вероятно, это связано с возникновением окислительного стресса в их клетках при внесении в среду МС больших количеств ионов  $Zn^{2+}$ , и с отсутствием таких окислительных явлений при внесении в среду ионов  $Ni^{2+}$ .

**CUCUMBER CALLUS AS A MODEL FOR STUDYING  $Zn^{2+}$  AND  $Ni^{2+}$  STRESS EFFECTS****Mikhailova I.D., Lukatkin A.S.**

N. P. Ogarev Mordovia State University. Russia, 430005, Saransk, Bolshevistskaja str., 68, Tel. +7(8342)322507,  
e-mail: kariglazayi@yandex.ru

Callus culture of cucumber was obtained carried disinfected seeds in tubes of sterile water on the bridge for sterile plants. 7 days-old seedling was explanted, were notched in the explants and placed in Petri dishes on MS culture medium containing 2,4-D (at a concentration of 1 mg / L to 5 mg / l) and 6-BAP (at a concentration of 0.5 mg/l to 2 mg/l), glycine, nicotinic acid and mezoinozit to form callus tissue. Callus tissue transplanted on MS medium containing ions  $Zn^{2+}$  at a concentration of 0.1 mM, 1 mM (control is medium of MS which contain 2,8 mg  $Zn^{2+}$ ) and  $Ni^{2+}$  (at a concentration of 10  $\mu$ M, 0.1 mM, 1 mM).

It is shown that zinc ions at high concentration negative effect on callus induction of cucumber and caused death of callus cells, with lower concentrations observed very slight increase of cell culture cucumber. In the study of oxidative manifestations in calluses cucumber grown in a medium with the introduction of zinc ions, found a direct correlation between the concentration of  $Zn^{2+}$  and the rate of generation of  $O_2^-$ . This is evidence of adverse effects on the callus culture of zinc ions, causing increased generation of  $O_2^-$ , therefore, the occurrence of oxidative stress. Lipid peroxidation (LPO) in the callus cells of cucumber *in vitro* by the action of zinc slightly exceeded the control in all variants of the experiment, while with increasing dose  $Zn^{2+}$  in the environment has seen an increase of lipid peroxidation.

Nickel ions did't have any toxic effects on callus cucumber, both at low and at high concentrations. There were no activating effect of nickel ions on the rate of generation of superoxide anion radical in callus culture of cucumber as generation of  $O_2^-$  was below the control and the lowest value (less than 2-fold of control) was observed at a concentration of 1 mM  $Ni^{2+}$ . LPO increased with increasing doses of nickel ions in the environment, but in none of the concentrations found no stimulatory effect on the figure.

Thus, the identified volatile reaction callus cells cucumber on the long-term effect of the ions  $Zn^{2+}$  and  $Ni^{2+}$ . Apparently, in equimolar concentrations of  $Zn^{2+}$  ions are relatively more toxic ions  $Ni^{2+}$  for callus cells of cucumber. This is probably related to the occurrence of oxidative stress in their cells when incorporated in MS medium large amounts of ions  $Zn^{2+}$ , and the absence of oxidative phenomena in making medium ions  $Ni^{2+}$ .

**СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ТАБАКА,  
КАК ИСТОЧНИК УНИКАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ****Мурсалимов С.Р., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, пр. ак. Лаврентьева, 10, факс: (8383) 333-12-78, тел. (8383) 363-49-26\*1109, e-mail: [mursalimovsr@gmail.com](mailto:mursalimovsr@gmail.com)

Нахождение растительных клеток и тканей в культуре *in vitro* неизбежно сопровождается соматической изменчивостью материала, возникающей в результате воздействия искусственных условий культивирования. Несмотря на очевидное негативное влияние, в некоторых случаях соматическая изменчивость может служить источником уникальных генотипов для проведения фундаментальных исследований. В лаборатории биоинженерии растений Института цитологии и генетики (Новосибирск) в ходе работ по агробактериальной трансформации и адрогенезу *in vitro*, была отобрана коллекция полиплоидных и анеуплоидных растений табака, возникших в результате соматической изменчивости и обладающих рядом уникальных свойств.

Указанные растения были использованы в качестве модельных объектов для целого ряда фундаментальных цитологических исследований. В первую очередь, для изучения феномена цитомиксиса в микроспорогенезе высших растений. Цитомиксис – это явление межклеточной миграции ядер в растительных тканях, которая происходит по прямым цитоплазматическим мостам (цитомиктическим каналам). Не смотря на то, что цитомиксис открыт более ста лет назад, наблюдается весьма слабый прогресс в изучении этого явления, в первую очередь, из-за отсутствия удобных моделей для изучения этого феномена. Все еще не получено однозначных ответов на многие важные вопросы относительно цитомиксиса. До сих пор остается неясным, какую роль играет это явление в жизни растения, является ли оно нормальным физиологическим процессом или это отклонение от нормы, вызванное какими-либо факторами. Неизвестно почему цитомиксис встречается чаще всего в клетках репродуктивной сферы и одинаково ли протекает этот процесс в различных тканях одного растения и у различных видов. А самое главное является ли цитомиксис эволюционным фактором, ведущим к видообразованию? Использование полиплоидных и анеуплоидных растений табака позволило детально изучить ультраструктурные особенности цитомиксиса, определить влияния уровня пloidности на частоту этого явления, проанализировать связь цитомиксиса и апоптоза при развитии микроспороцитов растений.

Помимо анализа цитомиксиса, на данных модельных растениях проводится активная работа по изучению аномалий цитокинеза и формирования тубулинового цитоскелета в микроспороцитах, а также гормональных нарушений при развитии цветка.

*Работа выполнена при поддержке ООО «ОПТЭК» и гранта РФФИ: 11-04-01192-а*

**SOMACLONAL VARIATION IN TOBACCO CELL CULTURE AS A SOURCE OF UNIQUE MODELS FOR CYTOLOGICAL STUDIES****Mursalimov S.R., Sidorchuk Y.V., Deineko E.V.**

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, Prospekt Lavrentyeva 10, fax: (8383) 333-12-78, tel. (8383) 363-49-26\*1109, e-mail: mursalimovsr@gmail.com

The presence of plant cells and tissues *in vitro* is accompanied by somaclonal variation. It is inevitable because of artificial culture conditions. Despite the obvious negative effects, somaclonal variation could be a source of unique genotypes for basic research. In laboratory of plants bioengineering of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk) during performing experiments on agrobacterium-mediated plant transformation and androgenesis *in vitro* was obtained a collection of polyploid and aneuploid tobacco plants. These plants have appeared as result of somaclonal variation and have a unique properties.

The plants have been used as model objects for a number of fundamental cytological research. First of all, for study a phenomenon of cytomixis in higher plants microsporogenesis. Cytomixis is a process of intercellular migration of nucleus in plant tissues through direct cytoplasmic connections (cytotoxic channels). Despite the fact that cytomixis was discovered over a century ago, there has been very little progress in the study of this phenomenon, primarily because of the lack of a suitable model system. Still there are not answers to many important questions regarding cytomixis. It is unclear - what is the role of this phenomenon in the life of the plant, whether it is normal physiological process or an aberration caused by any factors? It is unknown why cytomixis occurs mostly in generative cells and is the same process in different tissues of one plant and in various species or not. And the most important thing - is cytomixis evolutionary factor leading to speciation?

With using of polyploid and aneuploid tobacco plants was performed a detailed ultrastructural analysis of cytomixis, determined the influence of ploidy level on the frequency of this phenomenon, and analyzed the relationship between cytomixis and apoptosis in plant microsporocytes development.

Also on the model plants are studied abnormalities of cytokinesis and cytoskeleton formation in microsporocytes and hormonal disorders in the flower development.

*The work was supported by "OPTEC" LLC and the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 11-04-01192-a)*

## ИЗМЕНЕНИЯ В ФЕНОЛЬНОМ КОМПЛЕКСЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ, ВЫРАЩЕННОЙ НА СРЕДЕ С КАДМИЕМ

**Нечаева Т.Л.<sup>1</sup>, Храмова Е.П.<sup>2</sup>, Высочина Г.И.<sup>2</sup>, Загоскина Н.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276, ул. Ботаническая, 35  
факс: (499) 977-80-18, тел. (499) 977-94-33, e-mail: phenolic@iprgras.ru

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101  
факс: (383) 334-44-33, тел. (383) 334 44 68, e-mail: khramova@ngs.ru

Кадмий является одним из наиболее распространенных в природе поллютантов, для которого характерно быстрое поступление в клетки растений. В большинстве случаев это сопровождается развитием в них окислительного стресса, что, в свою очередь, приводит к изменениям в содержании фенольных соединений (ФС) являющихся важными компонентами антиоксидантной системы растений.

Удобным объектом для изучения различных аспектов фенольного метаболизма являются растения чая, а также инициированные из них каллусные культуры, для которых характерна высокая способность к образованию различных соединений фенольной природы. Ранее нами было показано, что выращивание каллусных культур чайного растения на средах с кадмием сопровождается повышением накопления в них ФС. Этот эффект зависит от концентрации поллютанта в среде, а также длительности его воздействия.

Целью данной работы являлось изучение изменений в составе ФС гетеротрофных каллусных культур чайного растения, подвергнутых действию кадмия.

Каллусные культуры, инициированные из стебля чайного растения (*Camellia sinensis* L., грузинская разновидность), выращивали в темноте на модифицированной питательной среде Хеллера. В опытных вариантах к ней добавляли кадмий (15 мг/л; в виде соли  $Cd(NO_3)_2$ ). Длительность пассажа составляла 40 дней. Материал для анализа брали на 25 и 40 дни культивирования. ФС экстрагировали 96%-ным этанолом. Этанольные экстракты пропускали через мембранный фильтр и анализировали методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1100 (США) с УФ-спектрофотометрическим детектором и программным обеспечением обработки хроматографических данных ChemStation.

При выращивании гетеротрофных каллусных тканей чая на основной питательной среде в составе их фенольного комплекса было обнаружено 12 соединений в первой половине цикла культивирования (25 день) и 11 - во второй (40 день). При этом к концу выращивания можно отметить незначительное увеличение содержания эпикатехина (на 10-15%), являющегося одним из характерных для чайного растения соединений флавановой природы.

В каллусных культурах, растущих на среде с кадмием, отмечено упрощение фенольного комплекса, что наиболее ярко проявлялось в конце пассажа, когда он был представлен только 6 соединениями, среди которых отсутствовал эпикатехин.

Все это свидетельствует об изменениях в метаболизме фенольных соединений, в том числе и флаванов, в культурах чайного растения при действии кадмия.

**CHANGES IN PHENOLIC COMPLEX OF CALLUS CULTURES THE TEA PLANTS GROWN IN THE MEDIA WITH CADMIUM****Nechaeva T.L.<sup>1</sup>, Chramova E.P.<sup>2</sup>, Vysochina G.I.<sup>2</sup>, Zagorskina N.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Timiriazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul., 35. Moscow. 127276 Russia; fax: (499) 977-80-18, tel. (499) 977-94-33, e-mail: phenolic@ippras.ru

<sup>2</sup>Central Siberian Botanical Garden, Russian Academy of Sciences Siberian Branch, 630090 Novosibirsk, Zolotodolinskaya st., 101, fax: (383)330-19-86, tel. (383) 334-44-68, e-mail: khramova@ngs.ru

Cadmium is one of the most common pollutants in nature, which is characterized by rapid receipt in plant cells. In most cases it is accompanied by the development of oxidative stress in them, which in turn leads to changes in the content of phenol compounds (PC) which are important components of the antioxidant system of the plants.

Tea plants and derived callus cultures are convenient objects for the study of various aspects of phenolic metabolism. They are characterized by high potential for the formation of various phenolic compounds. We have previously shown that the cultivation of the tea plant callus cultures in media containing cadmium is accompanied by an increase in the accumulation of PC. This effect depends on the concentration of the pollutant in the environment and duration of its action.

The aim of this work was to study the changes of PC in the heterotrophic callus cultures of tea plant subjected to the action of cadmium.

Callus cultures initiated from the stem of the tea plant (*Camellia sinensis* L., Georgian variety) were grown in the dark on the modified nutrient medium of Heller. In advanced variants the medium contained 15 mg / liter of cadmium (as a salt of Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Duration passage of 40 days. Material for analysis was taken at 25 and 40 days of culture. PC extracted with 96% ethanol. The ethanol extracts were passed through a membrane filter and analyzed by HPLC on an Agilent 1100 liquid chromatograph (USA), UV spectrophotometric detector and a software processing chromatographic data ChemStation.

In heterotrophic tissues tea callus growing on a basic nutrient medium, in the first half of the cultivation cycle (25 days) are 12 compounds and 11 - to the second (day 40). By the end of growth can be noted a slight increase in epicatechin (by 10 to 15%), one of the characteristic of the tea plant PC.

In callus cultures grown on a medium with cadmium, a number of phenolic compounds decreased, which is most evident at the end of the passage, when it was introduced only 6 compounds, including epicatechin was absent. All this shows changes in the metabolism of phenolic compounds, including flavans, in cultures of tea plant by the action of cadmium.



**ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ГЕНОМ  
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* КЛЕТОК *ARABIDOPSIS THALIANA* И *ZEA MAYS*  
Седов К.А., Долгих Ю.И., Соловьева А.И.**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276, ул. Ботаническая, 35, факс: (499) 977-80-18, тел. (499) 231-83-34, e-mail: [sedov\\_konstantin@bk.ru](mailto:sedov_konstantin@bk.ru)

Известно, что, не оказывая прямого мутагенного действия, стресс-факторы могут вызывать нарушение работы регуляторных и репарационных систем, изменения уровня метилирования оснований ДНК, структурную реорганизацию и нарушения репликации ДНК, активацию мобильных элементов. Все эти нарушения зачастую приводят к генетическим изменениям. Целью данной работы была оценка влияния стрессов на вариабельность RAPD и ISSR маркеров в культурах тканей *A. thaliana* и *Z. mays*. В качестве стрессоров были выбраны кратковременная инкубация при повышенной температуре (40–45°C), культивирование на среде с сульфатом меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), аноксия и окислительный стресс (культивирование на среде с паракватом). На первом этапе работы была определена сила стрессовых воздействий, ингибирующих рост клеток. Сублетальными воздействиями для культуры тканей *A. thaliana* было культивирование на среде со 150 мг/л меди, инкубация при температуре 40°C в течение 12 часов, в отсутствие кислорода в течение 14 часов или культивирование на среде с 3 мкМ параквата. Сублетальными воздействиями для культуры тканей *Z. mays* было культивирование на среде с 300 мг/л меди, инкубация при температуре 45°C в течение 22 часов, продолжительность аноксии 18 часов или культивирование на среде с 5 мкМ параквата. Для оценки уровня генетической изменчивости были выбраны 6 RAPD и 4 ISSR праймера, а также их попарные комбинации. Проведенные исследования показали, что все использованные праймеры и их попарные комбинации обеспечивали синтез фрагментов исследуемых ДНК. Количество амплифицируемых фрагментов в зависимости от праймера(ов) колебалось от 2 до 11, а их размеры варьировали от 200 до 2000 п.н. С использованием подобранных праймеров определили уровень генетической изменчивости при выращивании в обычных условиях клеток каллуса *A. thaliana* после шести месяцев культивирования и клеток суспензии, поддерживаемой в условиях *in vitro* на протяжении более шести лет. Всего было проанализировано 195 фрагментов ДНК. Ни одна из комбинаций праймеров не выявила отличий шестимесячной каллусной культуры от исходного растения. В ДНК, выделенной из суспензии, с четырьмя комбинациями праймеров в спектре ампликонов были обнаружены отличия от каллуса и растений. Доля полиморфных фрагментов составила 1,27%, их размер колебался от 400 до 700 п.н. Полученные результаты свидетельствуют о генетической стабильности культивируемых *in vitro* клеток *A. thaliana*. Проводится исследование вариабельности ДНК-маркеров в культивируемых клетках, подвергнутых действию стрессоров.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00950.*

**INFLUENCE OF STRESS ON THE GENOME OF CULTURED *IN VITRO*  
CELLS *ARABIDOPSIS THALIANA* AND *ZEA MAYS*****Sedov K.A., Dolgikh Yu.I., Solov'yova A.I.**

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, 127276, Botanicheskaya st., 35, fax: (499) 977-80-18, tel. (499) 231-83-34, e-mail: [sedov\\_konstantin@bk.ru](mailto:sedov_konstantin@bk.ru)

Stress factors can cause disruption of the regulatory and repair systems, changes in the level of methylation of DNA bases, restructure and abnormalities of DNA replication, the activation of transposable elements. All of these disorders often lead to changes in the genome. The aim of this work was to evaluate the effect of stress on the variability of RAPD and ISSR markers in tissue cultures of *A. thaliana* and *Z. mays*. As stress effects were chosen short incubation at elevated temperature (40-45°C), culturing in the medium with a copper sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), anoxia and oxidative stress (culturing in the medium with paraquat). At the first stage the degree of growth inhibition by stressors were determined. Cultivation in the medium with 150 mg/l of copper, incubation at 40°C for 12 hours, anoxia for 14 hours or cultivation in the medium supplemented with 3  $\mu\text{M}$  paraquat were sublethal for callus *A. thaliana*. Sublethal effects of tissue culture *Z. mays* were cultivation in the medium with 300 mg/l of copper, incubation at 45°C for 22 hours, anoxia for 18 hours or cultivation in the medium supplemented with 5  $\mu\text{M}$  paraquat. To assess of the level genetic variability 6 RAPD and 4 ISSR primers and their pairwise combinations were selected. Studies have shown that all of the primers used and their pairwise combinations synthesized of DNA fragments. Number amplified fragments depending on the primer(s) ranged from 2 to 11, and their size varied from 200 to 2000 bp. Using the selected primers of the level genetic variability in six-month callus and six-year suspension *A. thaliana* culturing under normal conditions were evaluated. Total 195 DNA fragments was analyzed. None of the primer combinations reveal differences between six-month callus and parent plants. In DNA extracted from the suspension, with four primer combinations in spectrum amplicons were detected differences from callus and plants. Proportion of polymorphic fragments was 1.27%, and their size varied from 400 to 700 bp. These results indicate the genetic stability of *A. thaliana* cells cultured *in vitro*. The variability of DNA markers in cultured cells exposed to the action of stressors is investigating.

*The work supported by grant RFBR № 13-04-0095.*

## ТЕСТ НА ПРОРАСТАНИЕ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ БИОМАССЫ КУЛЬТУР КЛЕТОК ПОЛИСЦИАСА.

Суханова Е.С.<sup>1,2</sup>, Кочкин Д.В.<sup>1,2</sup>, Титова М.В.<sup>1,2</sup>, Носов А.М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы, 1, стр. 12, [mushilda@mail.ru](mailto:mushilda@mail.ru)

<sup>2</sup>Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Культура клеток представляет собой популяцию дедифференцированных соматических клеток, в которой процессы образования биологически-активных веществ (вторичных метаболитов) значительно отличаются от таковых в интактных растениях. Одной из важнейших прикладных задач при промышленном выращивании культур клеток является выяснение промышленной ценности биомассы - определение продуктивности по целевым веществам и определение биологической активности. Растения рода *Polyscias* (сем. Araliaceae), полисциас папоротниколистый (*P.filicifolia*) и полисциас кустарниковый (*P.fruticosa*), издавна применяются в народной медицине.

Целью работы было разработать тест-системы для быстрого скрининга биологической активности растительных экстрактов.

Тест на прорастание пыльцевых зерен часто используют для оценки уровня токсичности веществ, в том числе в косметической и медицинской промышленности. Была проведена работа по оценке возможности использования этой тест системы для определения биологической активности растительных экстрактов. Для этого была взята биомасса культур клеток *P.filicifolia*, полученной в 1990-х гг., используемая для производства нутрицевтика «Витагмал» и не содержащая тритерпеновых соединений, а также биомасса культур клеток *P.filicifolia* и *P.fruticosa*, полученных в 2005 г. и содержащих тритерпеновые гликозиды, свойства которых также были исследованы в данной тест-системе.

В результате проведенных экспериментов было выявлено ингибирующее действие гликозидов культур клеток полисциаса на прорастание пыльцевых зерен, наибольшей активностью из них обладал самый низкомолекулярный гликозид – ладигнозид А: при наименьшей из выбранных концентраций (50 мкМ) происходило 100% подавление прорастания. Выявленная активность тритерпеновых гликозидов полисциаса коррелировала с результатами, полученными для экстрактов биомассы. Для экстракта, не содержащего этих соединений, было показано стимулирующее действие, возрастающее с увеличением концентрации экстракта. В то же время для экстракта из «молодой» линии *P.filicifolia*, содержащего полисциазиды, была показана стимулирующая активность (до 14%), которая снижалась с увеличением дозы препарата. Экстракт *P.fruticosa* проявил более высокую ингибирующую активность, чем экстракт культуры клеток *P.filicifolia*, полностью подавляя прорастание пыльцы, при концентрациях экстракта 12,5 мг/мл и выше, что согласуется с более высоким содержанием в нем тритерпеновых соединений (0,090 мг/мл для *P.fruticosa* и 0,053 мг/мл для *P.filicifolia*), причем мажорным среди них был наиболее активный – ладигнозид А (0,048 мг/мл *P.fruticosa* и 0,005 мг/мл для *P.filicifolia*).

Эти результаты свидетельствуют о наличии в экстрактах других биологически-активных компонентов, которые могут модулировать активность основных биологически-активных веществ. Это подтверждает необходимость исследования активности не только отдельных соединений, но и комплексного экстракта.

**POLLEN TUBE GROWTH TEST FOR BIOLOGICAL ACTIVITY OF  
POLYSCIAS PLANT CELL CULTURES BIOMASS EXTRACTS RESEARCH**  
**Sukhanova E.S.<sup>1,2</sup>, Titova M.V.<sup>1,2</sup>, Kochkin D.V.<sup>1,2</sup>, Nosov A.M.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Biology department of M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Vorobievsky gory, 1, 12, [mushilda@mail.ru](mailto:mushilda@mail.ru)

<sup>2</sup>K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of RAS, 127276, Moscow, Botanicheskaya, 35.

Plant cell culture is an experimentally created population of somatic cells, where processes of secondary metabolites formation differ significantly from original plants ones. One of the most important applied problems in industrial plant cell cultivation is the biomass value monitoring – secondary metabolites content and biological activity screening. Plants of *Polyscias* genus, *P.filicifolia* and *P.fruticosa* are favour among the tropical countries people as drug and additions for food for a long time.

The aim of our research was to find a test-system for quickly plant extracts biological activity screening.

Pollen tube growth test is frequently used for substances toxicity level estimation, including cosmetic and medical industry. The research aimed to analyze a possibility of its appropriateness for plant extracts biological activity determination was led. Obtained in 1990<sup>th</sup> and used as a source for biologically active additives “Vitagmal” production *P.filicifolia* plant cell culture together with obtained in 2005 *P.filicifolia* and *P.fruticosa* plant cell cultures were taken. Triterpene glycosides from the «new» strains were also examined in the test-system.

As a result of experiments an inhibitory effect of separated *Polyscias* glycosides in pollen tube growth test was displayed. The most effect was shown for ladyginoside A, the most low-molecular glycoside. This effect correlated with the results obtained for the biomass extracts. An extract without these compounds displayed a stimulating effect, increased along with the concentration. At the same time the stimulating effect of polysciasides contained «new» *P.filicifolia* strain biomass low-concentrated extracts (up to 14%) came to naught at high concentrations. The *P.fruticosa* biomass extract showed higher inhibitory effect than the *P.filicifolia* one, what is strongly correlate with bigger triterpene glycosides content in it (0,090 mg/ml for *P.fruticosa* and 0,053 mg/ml for *P.filicifolia*), and the most active ladyginoside A was the major one (0,048 mg/ml for *P.fruticosa* and 0,005 mg/ml for *P.filicifolia*)

These results give evidence of the presence in plant extracts other biological active compounds presence, which can modulate the principal biological active substances. It confirms the necessity of not only separated compound effect investigation but also the entire extract one.

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СУММАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ  
ПЕПТИДОВ  
В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ *IN VITRO***  
Терлецкая Н.В., Рысбекова А.Б., Мамонов Л.К.

*Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК, 050040, ул. Тимирязева, 45, Алматы, Казахстан, [teni02@mail.ru](mailto:teni02@mail.ru)*

К числу неспецифических физиолого-биохимических защитных реакций при адаптации растений к неблагоприятным условиям среды можно отнести изменения в балансе гормонов и гормоноподобных веществ, способствующие переклочению функциональной активности клеток на так называемые стрессовые подпрограммы. Гормоноподобные вещества, к которым можно отнести и пептиды, способны в крайне низких концентрациях с высокой эффективностью регулировать активность метаболических процессов, индуцируя при этом устойчивость растительных организмов к широкому спектру стрессовых воздействий, поэтому существует необходимость их изучения. В эксперименте препараты пептидов выделялись из гомогенизированных каллусных тканей различных видов пшениц, культивировавшихся в условиях моделируемых осмотического и солевого стрессов (среда Гамборга В5 + 20% ПЭГ6000 или +1,5% NaCl соответственно). Для оценки биологической активности суммарных препаратов пептидов в опытах нами была использована методика оценки скорости движения цитоплазмы в клетках тест-объекта – листьев элодеи (*Eloдея densa*) – в растворах суммарной фракции пептидов концентрации 0,01%, 0,001% и 0,0001%. Контролем служила скорость движения хлоропластов в клетках листьев элодеи (*Eloдея densa*) в водной среде. Установлено, что пептиды, выделенные из каллусных тканей изучаемых видов пшениц, выращенных при оптимальном водоснабжении, усиливают движение цитоплазмы. При этом отмечена дозозависимость воздействия суммарной фракции – при минимальной концентрации пептидов (0,0001%) – скорость движения хлоропластов элодеи была максимальной для всех изучаемых генотипов. Максимальная концентрация (0,01%) оказывала значительное ингибирующее действие. Наибольшей стимулирующей активностью характеризовались фракции пептидов, выделенные из каллусов *T. macha*. Осмотический и солевой стресс, созданные в наших экспериментах, в целом ингибировали скорость движения хлоропластов элодеи в растворах суммарной фракции пептидов, но отмечена видоспецифичность этого воздействия. Так, относительно высокая скорость движения хлоропластов после действия осмотического стресса отмечена на растворах пептидов, выделенных из каллусных тканей *T. aethiopicum* – вида, характеризующегося высокой засухоустойчивостью, засухоустойчивого сорта Саратовская-29 и вида *T. compactum*, характеризовавшегося хорошим приростом каллусной биомассы в условиях осмотического стресса. Наибольшую активность в эксперименте с воздействием солевого стресса показана у суммарных фракций пептидов, выделенных из каллусных тканей таких форм, как *T. compactum* и *T. macha*. При этом вид *T. compactum* показал себя как относительно солеустойчивая форма в ряде экспериментов *in vivo*, а вид *T. macha* характеризовался хорошим приростом каллусной биомассы и способностью к регенерации в условиях солевого стресса *in vitro*. Таким образом, можно заключить, что пептиды, выделенные из каллусных тканей пшеницы, выращенных при оптимальном водоснабжении, усиливают скорость движения цитоплазмы в клетках тест-объекта. При этом ярко проявляется дозозависимость воздействия суммарной фракции – при минимальной концентрации пептидов (0,0001%) – скорость движения хлоропластов элодеи максимальна, и наоборот. Дозозависимость сохраняется и в условиях воздействия стрессовых факторов. При этом формы, характеризующиеся большей засухо- и солеустойчивостью, отличаются и наибольшей активностью суммарной фракции пептидов, выделенных из каллусных тканей, подвергнутых осмотическому и солевому стрессам.

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF TOTAL DRUGS PEPTIDES IN ABIOTIC STRESS CONDITIONS *IN VITRO*****Terletskaya N.V., Rysbekova A.B., Mamonov L.K.**

*Institute of Plant Biology and Biotechnology, Timiryazev str., 45, Almaty 050040, Kazakhstan, [teni02@mail.ru](mailto:teni02@mail.ru)*

Among the non-specific physiological and biochemical defense responses in plant adaptation to adverse environmental conditions include changes in the balance of hormones and hormone-like substances that promote switching of the functional activity of cells in the so-called stressful routine. Hormone-like substances that can be attributed, and peptides are capable of extremely low concentrations with high efficiency to regulate metabolic activity, thus inducing resistance of plant organisms to a wide range of stressful influences, there is a need to study them. In the experiment, preparations of peptides isolated from homogenizing callus tissue different wheat species cultivated under simulated osmotic and salt stress (Gamborg B5 medium + 20% PEG6000 or +1,5% NaCl, respectively). To assess the biological activity of peptides of the total drug in the experiments, we used a method of estimating the speed of the cytoplasm in the cells of the test object - leaves elodea (*Elodea densa*) - in solutions of the total fraction of peptide concentration of 0.01%, 0.001% and 0.0001%. Served as control the speed of movement of chloroplasts in leaf cells of elodea in the aquatic environment. Found that the peptides isolated from the callus tissue is examined wheat species grown under optimum water supply, increase the movement of the cytoplasm. I want to mention a dose-dependent effects of total fraction - at a minimum concentration of peptides (0.0001%) - the velocity of elodea chloroplast was the highest for all genotypes studied. The maximum concentration (0.01%) had a significant inhibitory effect. Most stimulating activity characterized fraction of peptides derived from callus *T. macha*.

Osmotic and salt stress created in our experiments, in general, inhibited the rate of movement of elodea chloroplasts in solutions the total fraction of peptides but marked species specificity of the impact.

Thus, the relatively high speed of the chloroplasts after exposure to osmotic stress was studied in solutions of peptides isolated from callus tissue *T. aethiopicum* - a species characterized by high resistance to drought and drought-resistant varieties of Saratovskaya-29 and type *T. sompactum*, characterized by good growth of callus biomass under osmotic stress.

The greatest activity in the experiment with the impact of salt stress is shown in the total fraction of peptides isolated from callus tissue forms, such as *T. compactum* and *T. macha*. The form of *T. compactum* shown to be relatively salt-resistant form of a number of experiments *in vivo*, and the species *T. macha* characterized by good growth of callus biomass and ability to regenerate under salt stress *in vitro*.

Thus, we can conclude that the peptides isolated from the callus tissue of wheat grown under optimum water supply, increase the speed of the cytoplasm in the cells of the test object. In this case, pronounced dose-dependent effect of the total fraction - at a minimum concentration of peptides (0.0001%) - the velocity of elodea chloroplast maximum, and vice versa. Dose-dependent and maintained in conditions of stress factors. The forms with greater drought and salt tolerance is different and the most active fraction of the total peptides isolated from the callus tissues subjected to osmotic and salt stress.

**ВЛИЯНИЕ АБК НА НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОК  
СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ, НАХОДЯЩИХСЯ НА  
РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ**

**Трофимова О.И., Ларская И.А., Заботин А.И.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, 420111, ул. Лобачевского, 2/31,  
факс: (843) 292-73-47, тел. (843) 231-90-39, e-mail: [trofimova@mail.knc.ru](mailto:trofimova@mail.knc.ru)

Изменение скорости роста - самая быстрая реакция растительных организмов на любые изменения внешней среды. Замедление ростовых процессов, например, при действии низкой температуры необходимо для адаптивной перестройки метаболизма клеток, когда происходит переключение с простого накопления массы на образование веществ, требуемых для существования растительного организма в изменившихся условиях. Этот процесс контролируется с помощью различных сигнальных путей и с привлечением большого количества регуляторов, таких как, например, абсцизовая кислота (АБК), которая, как известно, вовлечена в реализацию многих адаптивных реакций в растениях, в том числе и в формирование морозостойчивости.

В работе была использована частично синхронизованная суспензионная культура озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. (РККК ВР, № 34) в процессе культивирования которой можно было выделить основные фазы развития: со 2 по 6 день, когда идёт интенсивное деление клеток без значительного увеличения их массы, фазу быстрого роста (от 7 до 12 дней), когда клетки переходят к росту растяжением и стационарную фазу (от 12 дня).

Были исследованы различные параметры, характеризующие развитие культуры, а также способность формировать морозостойчивое состояние при добавлении АБК (50 мкМ) на разных фазах кривой роста. Показано, что при внесении гормона в среду культивирования в начале пассажа (0 день) рост клеток, определяемый по нарастанию их сырой массы, подавлялся практически полностью и составлял 2-3% от контрольного варианта, когда клетки культивировали все время без добавления АБК. Это сопровождалось значительным падением митотического индекса (МИ) на 3 сутки культивирования (от 12% до 2.7%), а максимальная величина МИ (около 4%) в этом случае наблюдалась спустя сутки по сравнению с контролем. При внесении гормона на 3-й день культивирования нарастание сырой массы клеток составляло 65% от контроля, а митотический индекс снижался на ~30%.

Эксперименты по исследованию формирования морозостойкого состояния, индуцированного действием АБК при комнатной температуре показали, что если клетки подвергались действию гормона в самом начале пассажа, то они показывали высокий уровень морозостойчивости к третьим суткам культивирования. Внесение АБК в среду роста в момент интенсивного клеточного деления сокращало время формирования морозостойчивого состояния до 12 часов.

Обсуждается механизм запуска процесса адаптации клеток в контексте их избирательной чувствительности в зависимости от стадии развития и наличие интегрирующих механизмов в процессе образования морозостойчивости.

**ABA EFFECT ON SOME PARAMETERS OF WINTER WHEAT SUSPENSION-CULTURED CELLS AT DIFFERENT PHASES OF DEVELOPMENT****Trofimova O. I., Larskaya I.A., Zabotin A.I.**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics the Russian Academy of Science, 420111, Kazan, Lobachevsky, 2/31, fax: (843) 292-73-47, phone: (843) 231-90-39, e-mail: [trofimova@mail.knc.ru](mailto:trofimova@mail.knc.ru)

The change of growth rate is the fast reaction of the plant organisms to any environment changes. In the course of adaptation of winter plants to low temperature they use the growth inhibition for adaptive reorganization of a metabolism which, as we know, switches over from simple accumulation of weight of cells to formation of the substances which necessary for living in new conditions. This process is controlled by various signaling ways with involvement a lot of regulators, such as, abscisic acid (ABA) which, as we know, is involved in realization of many adaptive processes in plants including the freezing tolerance formation.

The partially synchronized suspension culture of winter wheat *Triticum timopheevii* Zhuk. was used in this work. There were three phases in the culture period, namely: the cell division phase (days 2–6), during which there is an intensive division of cells without significant increase of weight, cell elongation phase (days 7–12), when cells grow intensively and stationary phase (after day 12).

The various parameters characterizing of culture development as well as ability to form a freezing tolerance by exogenous ABA application (50  $\mu\text{M}$ ) in the different phases of culture were investigated. It was showed that by ABA treatment of cells at the beginning of a passage (0 day) growth of cells based in the cell fresh weight was suppressed almost completely and made 2-3% from control where cells all the time cultured without ABA. It was accompanied by considerable falling of the mitotic index (MI) for 3 days of culture (from 12% to 2.7%). In this case the maximum magnitude of MI (about 4%) was observed one day later in comparison with control. The increase of cell fresh weight made 65% from control, and the mitotic index decreased at ~30% by the hormone treatment applied on the third day.

The research of freezing tolerance formation induced by ABA at the room temperature showed if cells were exposed by hormone at the beginning of a passage, they showed high level of frost resistance on the third day of the subculture. The ABA treatment at the time of intensive cell division has been reduced time of freezing resistance appearance till 12 hours.

The mechanism of start of the cell adaptation processes, in a context of their selective sensitivity in the time of cell cycle as well as the existence of integrating mechanisms during of frost resistance formation are discussed.



**ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ СТИЛЬБЕН  
СИНТАЗ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ АМУРСКОГО ВИНОГРАДА*****VITIS AMURENSIS* RUPR.****Тюнин А.П., Киселев К.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения российской академии наук, Владивосток, 690022, пр-т. Столетия Владивостоку 159, факс: 8(423) 231-01-93, тел. 89502810346, e-mail: tyunin@biosoil.ru

Резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен) – является одним из наиболее изученных фенольных веществ растительного происхождения, обладающий широким спектром полезных биологических и фармакологических свойств. Показано, что резвератрол, обладая мощными антиоксидантными свойствами, препятствует окислительной модификации липидов и останавливает накопление окисленных липопротеинов низкой плотности в стенках сосудов. Показано, что резвератрол обладает противоопухолевой активностью на стадии возникновения, роста опухоли и образования метастазов. Поэтому резвератрол имеет большой потенциал для создания на его основе различных биологически активных добавок к пище, а также лекарственных средств. Однако регуляция биосинтеза резвератрола в клетках растений до сих пор детально не изучена.

Представители семейства Vitaceae (Виноградные), и в частности характерный для Приморского края России виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr., содержат наибольшее количество резвератрола в сравнении с другими растениями. В клетках растений биосинтез резвератрола идет фенилпропаноидным путем вторичного метаболизма. Стильбен синтаза или резвератрол синтаза (STS, EC 2.3.1.95) непосредственно катализирует реакцию образования резвератрола. В геноме большинства стильбен продуцирующих растений STS представлен мультигенным семейством.

Известно, что воздействие ультрафиолета, сигнальных молекул стресса растений (салициловая кислота), а также предшественников в биосинтезе фенольных соединений (фенилаланин, кумаровая кислота) способно индуцировать биосинтез резвератрола и изменять уровень экспрессии генов *STS* в клеточных культурах *V. amurensis*. Нам удалось установить участие системы цитозинового метилирования ДНК в регуляции экспрессии генов *STS* клеточных культурах *V. amurensis*. Кроме того, полученные нами результаты позволяют предположить, что все ранее изученные эффекты элиситоров, направленные на изменение экспрессии генов *STS* и увеличение уровня продукции резвератрола клеточными культурами *V. amurensis* обусловлены изменением статуса цитозинового метилирования генов некоторых *STS*. На данный момент отсутствует информация о роли *cis*-регуляторных элементов в транскрипционной регуляции генов стильбен синтаз в клетках *V. amurensis*. Наиболее изученной группой транскрипционных факторов контролирующей экспрессию генов вторичного метаболизма растений является группа R2R3-MYB транскрипционных факторов. Согласно литературным данным, представители данного семейства транскрипционных факторов регулируют экспрессию многих генов фенилпропаноидного пути вторичного метаболизма растений. При помощи базы данных PLACE нами были обнаружены сайты для связывания MYB транскрипционных факторов в составе промоторов генов *STS*. Указанные сайты связывания транскрипционных факторов изменяли уровень цитозинового метилирования при увеличении экспрессии генов *STS*. Нам удалось детектировать экспрессию двух генов R2R3-MYB транскрипционных факторов: *VTF1* и *VTF2*, экспрессия которых коррелировала с изменением экспрессии генов *STS* и содержанием резвератрола в клеточных культурах *V. amurensis*. Полученные данные свидетельствуют о комплексной регуляции биосинтеза резвератрола.

**INVESTIGATION OF STILBENE SYNTHASE GENES TRANSCRIPTIONAL REGULATION IN GRAPE CELL CULTURES OF *VITIS AMURENSIS* RUPR.****Tyunin A.P., Kiselev K.V.**

Institute of biology and soil sciences, Far Eastern branch of Russian academy of sciences, Vladivostok, 690022, pr.-t Stoletiya 159, fax: 8(423) 231-01-93, tel. 89502810346, e-mail: tyunin@biosoil.ru

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) – is one of the most well known plant-derived phenol compound that has been reported to exhibit a wide range of important biological and pharmacological properties. It has been shown that resveratrol, which possesses powerful antioxidant properties, interferes with oxidative modifications of lipids and play a role in the prevention of cardiovascular diseases. Resveratrol possesses antineoplastic activity at the stages of establishment and growth of a tumor and in the formation of metastases. Due to its' unique properties resveratrol is primarily consumed in the form of numerous biological additives and has a great potential to be used in drug industry. However, regulation of the resveratrol production *in vivo* seems not to be well-understood yet.

Vitaceae representatives including wild-growing grape *Vitis amurensis* Rupr., characterized with highest level of resveratrol content among other stilbenoid-producing plants. Resveratrol biosynthesis occurs via the phenylpropanoid pathway in plant cells. The stilbene synthase (STS, EC 2.3.1.95) directly catalyses resveratrol biosynthesis. It is known, that STS enzyme encoded by multigene family in stilbenoid-producing plants.

It was previously shown that UV irradiation, effect of stress signaling molecules including salicylic acid and addition of resveratrol precursors can significantly enhance the level of resveratrol content via modulation of *STS* genes expression in cell cultures of *V. amurensis*. Also we have demonstrated involvement of DNA methylation machinery in regulation of *STS* expression in *V. amurensis* cultured cells. According to data obtained we believe that all described upon effects of different elicitors on resveratrol biosynthesis determined by modulation of *STS* expression are governed by alternations of cytosine methylation status within *STS* genes. Moreover at the current moment data on impact of *cis*-regulatory elements of *STS* genes on resveratrol biosynthesis in grape cells is not well described. Currently, R2R3-MYB is the well studied group of plant transcription factors involved in regulation of plant secondary metabolism genes. According to literature data a great number of phenylpropanoid pathway genes are shown to be regulated by representatives of mentioned family of transcription factors *in vivo*. Using PLACE database we revealed MYB transcription factors binding sites within promoters of *STS* genes. Further analysis revealed alternation in cytosine methylation level connected to enhancement in certain *STS* genes expression. We detected expression of two candidate mRNA transcripts corresponding to R2R3-MYB family: *VTF1* and *VTF2*. Expression of mentioned transcripts correlated with expression of *STS* genes and level of resveratrol production in cell cultures of *V. amurensis*. Thus, all the data obtained reveal a complex manner of resveratrol biosynthesis regulation in grape cells of *V. amurensis*.

**РАЗЛИЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА НА ТИРОЗИНОВОЕ  
ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ МОРФОГЕННЫХ КАЛЛУСОВ ГРЕЧИХИ  
ТАТАРСКОЙ****Федина Е.О., Акулов А.Н., Румянцева Н.И., Каримова Ф.Г.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, 420111, ул. Лобачевского, 2/31,  
факс: (843) 292 -73-47, тел. (843) 231-90-47, e-mail: [solo\\_nika@mail.ru](mailto:solo_nika@mail.ru)

Известно, что фосфорилирование белков по тирозину является критичным для роста и дифференцировки клеток растений. Более того, выявлена существенная роль тирозинового фосфорилирования белков в регуляции ранних стадий клеточного роста. Показано, что этот вид фосфорилирования индуцируется фитогормонами. Например, после обработки каллуса некоторыми фитогормонами было выявлено повышение уровня тирозинового фосфорилирования различных белков, которое коррелировало с активацией промотора циклин-зависимой протеинкиназы CDK;1. Брассиностероиды (БС) – стероидные фитогормоны, экзогенные ростовые эффекты которых описаны во многих научных работах. Тем не менее, роль брассиностероид-индуцированного тирозинового фосфорилирования в регуляции ростовых процессов растений далека от понимания. Морфогенные каллусы - это удобная модель для изучения процессов роста растений. В этой связи, целью работы являлось изучение влияния 24-эпибрасинолида (ЭПБ), одного из физиологически активного БС, на тирозинное фосфорилирование белков морфогенного каллуса гречихи татарской.

В экспериментах 24-дневные каллусы гречихи, пересаженные на безгормональную ростовую среду с ЭПБ (0.001 -1  $\mu\text{M}$ ), культивировали на свету или в темноте в течение 4, 9 и 13 дней. Контрольными вариантами служили каллусы, культивированные на среде без фитогормона. Белки каллусов разделяли с помощью 1DE (6-16% ПААГ). Изменения в тирозинном фосфорилировании белков каллусов анализировали методом Western блоттинга с использованием моноклональных антител к фосфотирозину.

Результаты исследований показали наличие тирозинового фосфорилирования белков каллусов в диапазоне молекулярных масс от 14 до 31 кДа. Было выявлено, что максимальный уровень тирозинового фосфорилирования белков идентифицируется в контрольных каллусах, культивированных в течение 9 дней на свету. В каллусах, выращенных на среде с добавлением различных концентраций ЭПБ, мы наблюдали тенденцию к снижению уровня тирозинового фосфорилирования белков по сравнению с контролем. Эффект ЭПБ в концентрации 0.001  $\mu\text{M}$  являлся исключением из выявленной тенденции: ЭПБ увеличивал уровень тирозинового фосфорилирования белков каллусов, культивированных в течение 9 и 13 суток в темноте.

9-ый день роста морфогенных каллусов гречихи характеризуется пиком митотической активности клеток, таким образом, наши результаты подтверждают известные данные о регуляторной роли тирозинового фосфорилирования белков в процессах деления клеток. Кроме того, мы предполагаем, что ЭПБ в концентрации 0.001  $\mu\text{M}$  через регуляцию тирозинового фосфорилирования белков положительно влияет на деление морфогенных каллусов гречихи, культивированных в темноте.

**DIFFERENT EFFECTS OF 24-EPIBRASSINOLIDE ON TYROSINE PROTEIN PHOSPHORYLATION IN MORPHOGENIC CALLUS OF TATAR BUCKWHEAT****Fedina E.O., Akulov A.N., Rumyantseva N.I., Karimova F.G.**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Science Centre, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111, Lobachevsky st. 2/31,  
fax: (843) 292 -73-47, tel.(843) 231-90-47, e-mail: [solo\\_nika@mail.ru](mailto:solo_nika@mail.ru)

It is known, that the protein phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine residues are critical for the growth and differentiation of plant cells. Moreover, the data on the role of plant tyrosine protein phosphorylation show that this type of protein phosphorylation is also essential at the early stages of cell growth. It was shown that tyrosine protein phosphorylation is induced by phytohormones. For example, an increase in tyrosine phosphorylation of different proteins following treatment of callus with some phytohormones correlated with activation of the promoter of cyclin-dependent protein kinase CDK;1. Brassinosteroids (BS) are the steroid phytohormones discovered in all plant tissues. The effects of exogenous BS on the division, expansion and differentiation of plant cells have been described in numerous reports. Nevertheless, the role of brassinosteroid-induced tyrosine protein phosphorylation in regulation of the growth processes is far from clear. Morphogenic callus is a convenient model for the investigation of growth processes. In this connection, the aim of this study was the investigation of the influence of 24-epibrassinolide (EBR), one of the physiologically active BS, on the tyrosine protein phosphorylation of morphogenic callus of buckwheat *Fagopyrum tataricum*. In experiments, 24-day-old calluses of buckwheat were transferred to growth medium with or without EBR (0.001 -1  $\mu\text{M}$ ) and cultivated for 4, 9 and 13 days in the dark or on the light. The changes in the protein content and intensity of tyrosine protein phosphorylation were analyzed by IDE and Western blotting with using of monoclonal antibodies against phosphotyrosine.

The results of 1D electrophoresis and the subsequent immunoblotting revealed the presence of tyrosine phosphorylation of callus proteins with molecular weights from 14 to 31 kD. We detected the maximal level of tyrosine protein phosphorylation in the control calluses, which were grown on the light for 9 days. In the calluses treated by different concentrations of EBR, we noted the tendency to decrease the level of tyrosine protein phosphorylation as compared with the control. Effect of EBR in concentration of 0.001  $\mu\text{M}$  was the exception. 0.001  $\mu\text{M}$  EBR increased the level of tyrosine protein phosphorylation of calluses grown for 9 and 13 days in the dark. As 9th day of growth of buckwheat calluses characterize by the peak of the mitotic activity of cells then we can confirm the known data about the regulatory role of tyrosine protein phosphorylation in cell division. In addition, we assume that EBR in concentration of 0.001  $\mu\text{M}$  through activation of tyrosine phosphorylation of proteins positively affects on cell division of calluses, grown in dark.

**ВЛИЯНИЕ 2,4-Д НА ПОГЛОТИТЕЛЬНУЮ СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ СОИ В НАЧАЛЕ ЦИКЛА ВЫРАЩИВАНИЯ****Швецов С.Г., Еникеев А.Г.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, тел. (3952)42-67-21, факс: (3952)51-07-54, e-mail: shvetsov@sifibr.irk.ru

Изучалось поглощение  $^{14}\text{C}$ -2,4-Д и влияние этого ауксина на поглощение  $^{14}\text{C}$ -ИУК,  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислоты,  $^{14}\text{C}$ -яблочной кислоты,  $^3\text{H}$ -глюкозы,  $^{14}\text{C}$ -лейцина,  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{87}\text{Rb}^+$ ,  $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$  в суспензионной культуре клеток сои в течение первых 3-х часов накопительного цикла выращивания. В этот период  $^{14}\text{C}$ -2,4-Д сначала интенсивно поглощалась клетками, а затем значительная ее часть выделялась обратно в среду. В присутствии 2,4-Д за 45 минут инкубирования клетки поглощали большее количество  $^{14}\text{C}$ -ИУК,  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислоты,  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{86}\text{Rb}^+$  и меньшее количество  $^{14}\text{C}$ -яблочной кислоты,  $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$  и  $^{36}\text{Cl}^-$ , по сравнению с вариантом без этого ауксина. Количество поглощенных  $^3\text{H}$ -глюкозы и  $^{14}\text{C}$ -лейцина за тот же период в обоих вариантах было практически одинаковым.

В последующий период произошло уменьшение содержания  $^{14}\text{C}$ -ИУК в обоих вариантах, вероятно за счет ее общей деградации в культуре, причем в варианте без 2,4-Д значительно сильнее, чем при ее наличии. В присутствии 2,4-Д содержание  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислоты в клетках после 45 минут заметно уменьшалось (в среде соответственно увеличилось), то есть она выделялась обратно в среду. В среде без 2,4-Д содержание  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислоты только увеличивалось. Содержание  $^3\text{H}$ -глюкозы,  $^{14}\text{C}$ -лейцина,  $^{14}\text{C}$ -яблочной кислоты,  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{86}\text{Rb}^+$ ,  $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$  увеличивалось в обоих вариантах до конца периода наблюдения, однако интенсивность накопления этих веществ клетками в присутствии 2,4-Д была заметно ниже, чем без нее.

Анализируемые соединения по особенностям влияния 2,4-Д на их поглощение можно разделить их на четыре группы. Первую группу составляют  $^{14}\text{C}$ -ИУК и  $^{14}\text{C}$ -бензойная кислота, вторую –  $^3\text{H}$ -глюкоза и лейцин, третью группу – катионы  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{86}\text{Rb}^+$ , четвертую – анионы  $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$  и  $^{14}\text{C}$ -малат. Основные различия между ними проявлялись на первом этапе наблюдений (45 минут). Динамика поглощения  $^{14}\text{C}$ -2,4-Д,  $^{14}\text{C}$ -ИУК и  $^{14}\text{C}$ -бензойной кислоты, как слабых липофильных кислот, в клетках позволяет предполагать, что за первые 45 минут инкубации с 2,4-Д происходило увеличение рН цитоплазмы и соответствующая ему стимуляция поглощения, а последующее выделение было связано со снижением этого показателя. Такой характер изменения свойств цитоплазмы под влиянием 2,4-Д должен объяснить усиление поглощения катионов ( $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{86}\text{Rb}^+$ ) и уменьшение поглощения анионов ( $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$  и  $^{14}\text{C}$ -малат), не оказывая существенного влияния на другие соединения ( $^3\text{H}$ -глюкозу и  $^{14}\text{C}$ -лейцин). Последующее снижение поглощения всех испытанных соединений могло происходить в результате воздействия более кислой цитоплазматической среды на интенсивность процессов их транспорта и метаболизма.

Проведенное исследование показывает, что уже в самом начале цикла выращивания суспензионной культуры сои под влиянием 2,4-Д в клетках происходят существенные и разнонаправленные изменения их поглотительной способности в отношении компонентов питательной среды. Эти изменения характеризуют и, вероятно, определяют переход клеток новое состояние, способствующее их активной пролиферации.

## 2,4-D ACTION ON CELL ABSORPTING CAPACITY IN SOYBEAN SUSPENSION CULTURE AT THE BEGINNING OF GROWING CYCLE

Shvetsov S.G., Enikeev A.G.

Federal state budget institution of science Siberian Institute of plant physiology and biochemistry, SB RAS, Irkutsk, 664033 Lermontov Str. 132, fax: (3952)51-07-54, tel. (3952)42-67-21, e-mail: shvetsov@sifibr.irk.ru

The study was focused on  $^{14}\text{C}$ -2,4-D absorption and the action this auxin on absorption of  $^{14}\text{C}$ -IAA,  $^{14}\text{C}$ -benzoic acid,  $^{14}\text{C}$ -malic acid,  $^3\text{H}$ -glucose,  $^{14}\text{C}$ -leucine,  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{87}\text{Rb}$ ,  $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$  in soybean cell culture within the first 3 hours of accumulation growing cycle. During this period  $^{14}\text{C}$ -2,4-D was first intensively absorbed by cells, and then considerable part (2/3) was released back into environment. In the presence of 2,4-D over 45 minutes incubation cells absorbed a larger amount of  $^{14}\text{C}$ -IAA,  $^{14}\text{C}$ -benzoic acid,  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{87}\text{Rb}^+$  and a smaller amount of  $^{14}\text{C}$ -malic acid,  $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$ , as compared to variant without this auxin. The amount of  $^3\text{H}$ -glucose and  $^{14}\text{C}$ -leucine during the same period in two variants was virtually the same.

The following period was characterized by the decrease of  $^{14}\text{C}$ -IAA content in both variants, apparently, at the expense of its total degradation in the culture, and in the variant without 2,4-D considerably more intensively than with it. In the presence of 2,4-D the content of  $^{14}\text{C}$ -benzoic acid in the cells after 45 minutes significantly reduced (in the environment it respectively rose), that is it went back to the environment. In the environment without 2,4-D the content of  $^{14}\text{C}$ -benzoic acid went up. The content of  $^3\text{H}$ -glucose,  $^{14}\text{C}$ -leucine,  $^{14}\text{C}$ -malic acid,  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{86}\text{Rb}^+$ ,  $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$ . Increased in both variants by the end of the monitoring, however, the intensity of accumulation of these substances by the cells in the presence of 2,4-D was considerably lower than without it.

The compounds under analysis may be split into four groups by the peculiarities of 2,4-D impact on their absorption. The first group is comprised by  $^{14}\text{C}$ -IAA and  $^{14}\text{C}$ -benzoic acid, the second includes  $^3\text{H}$ -glucose and leucine, the third group is represented by the cations  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{86}\text{Rb}^+$ , and the fourth – by anions  $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$ , and  $^{14}\text{C}$ -malate. Major differences between them showed at the first stage of observation (45 minutes). Dynamics of adsorption of  $^{14}\text{C}$ -2,4-D  $^{14}\text{C}$ -IAA and  $^{14}\text{C}$ -benzoic acid as weak lipophilic acids in the cells allows to presume that over the first 45 minutes of incubation with 2,4-D cytoplasm pH increased, as well as corresponding absorption stimulation, and further release was linked to the reduction of this parameter. Such character of cytoplasm properties change under the impact of 2,4-D should account for cations adsorption ( $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ,  $^{86}\text{Rb}^+$ ) and reduction of anions adsorption ( $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4^-$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$ , and  $^{14}\text{C}$ -malate), not producing a significant impact on other compounds ( $^3\text{H}$ -glucose and  $^{14}\text{C}$ -leucine). Further reduction of absorption in all the compounds under study could be induced by more acid cytoplasmatic environment influence on the intensity of their transportation and metabolism processes.

The research conducted shows that in the very beginning of the cycle of soy suspense cultivar under the impact of 2,4-D in the cells there take place significant and diverse changes of the absorption ability in respect of nutrient medium constituents. These changes characterize, and, apparently, determine cells transfer into a new status fostering their active proliferation.

**ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *PgCDPK2DS* НА ЭМБРИОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЖЕНЬШЕНЯ *PANAX GINSENG* С.А. MEYER.****Шумакова О.А.<sup>1,2</sup> Киселев К.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, 690022, ул. пр-т 100-лет Владивостоку 159, факс: (423) 231 -01-93, тел. (914) 715-00-49, e-mail: [shumakova\\_olga91@mail.ru](mailto:shumakova_olga91@mail.ru)

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690090, ул. Суханова, 8, факс: (423) 243-23-15, тел. (423) 243-32-80

Женьшень настоящий *Panax ginseng* С.А. Meyer является одним из наиболее известных лекарственных растений. На протяжении тысячелетий женьшень используют в качестве растительного сырья для получения лекарственных препаратов в традиционной медицине стран Восточной Азии, где он известен своими адаптогенными свойствами и тонизирующим эффектом. Возросший интерес к препаратам на основе женьшеня ставит под вопрос возможность существования данного реликтового растения в дикой природе и создает проблему получения источника сырья. Помочь решить ее может биотехнологический способ размножения женьшеня, в основе которого лежит процесс образования соматических эмбрионов.

Соматический эмбриогенез у растений зависит от большого числа внешних и внутренних факторов. Ранее было показано, что  $Ca^{2+}$ -сигнальная система вовлечена в регуляцию соматического эмбриогенеза. Известно, что главными сенсорами  $Ca^{2+}$  в клетках растений являются  $Ca^{2+}$ -зависимые протеинкиназы (CDPK). Ранее нами было показано, что при воздействии ингибиторов  $Ca^{2+}$ -каналов и CDPK приводит к достоверному снижению количества соматических эмбрионов в эмбрионной культуре женьшеня 2с3. И напротив, добавление ионофора  $Ca^{2+}$  A23187 достоверно увеличивает количество соматических эмбрионов, это говорит об участии  $Ca^{2+}$ -сигнальной системы в регуляции соматического эмбриогенеза растений. Также ранее было показано, что в эмбрионной культуре клеток женьшеня 2с3 по сравнению с каллусной культурой женьшеня GV достоверно повышена экспрессия 4 генов CDPK (*PgCDPK1c*, *PgCDPK2b*, *PgCDPK2d*, *PgCDPK3b*). Также нами была проанализирована экспрессия генов CDPK на отдельных стадиях развития эмбрионов. На ранних стадиях развития эмбрионов достоверно увеличивалась экспрессия гена *PgCDPK2d*. При получении полной последовательности *PgCDPK2d* с помощью RACE PCR мы отметили, что данный ген имеет нестандартную структуру. В полученной последовательности гена *PgCDPK2d* отсутствовали последовательности соответствующие автоингибиторному домену и домену EF-руки. Так как гомология киназного домена *PgCDPK2d* была сверхвысокой с ранее описанными CDPK растений, но в структуре этого гена отсутствовали последовательности, кодирующие функционально значимые участки белка, решено было назвать его *PgCDPK2DS*.

Далее мы решили проанализировать влияние сверхэкспрессии гена *PgCDPK2DS* на соматический эмбриогенез в культуре клеток женьшеня *P. ginseng*. В качестве модельной системы мы использовали полученную в 2010 году эмбрионную культуру клеток PG и каллусную культуру клеток женьшеня 1с, которая была получена в 1988 году.

Полученные в ходе агробактериальной трансформации *PgCDPK2DS*-трансгенные клеточные линии эмбрионной культуры клеток PG теряли способность образовывать эмбрионные структуры. В то время как полученная векторная линия эмбрионной культуры клеток PG, несущая только ген устойчивости к канамицину *nptII*, имела эмбриониды как и культура PG. Интересно отметить, что на первых этапах культивирования полученная сверхэкспрессирующей ген *PgCDPK2DS* 1с культура женьшеня имела плотные образования, напоминающие эмбрионные структуры. Таким образом, впервые показано, что ген *PgCDPK2DS* вовлечен в регуляцию соматического эмбриогенеза в культуре клеток женьшеня.

**INFLUENCE OF EXPRESSION *PgCDPK2DS* GENE ON THE  
EMBRYOGENESIS IN THE GINSENG CELL CULTURES *PANAX GINSENG* C.A.  
MEYER.**

**Shumakova O.A.<sup>1,2</sup> Kiselev K.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Biology and Soil Sciences, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022, pr.-t Stoletiya 159, fax: (423) 231-01-93, phone: (914) 715-00-49, e-mail: shumakova\_olga91@mail.ru

<sup>2</sup>Far East Federal University, Vladivostok, 690090, str. Suhanova, 8, fax: (423) 243-23-15, phone. (423) 243-32-80

Ginseng *Panax ginseng* C.A. Meyer is one of the most known medical plants. Several thousands of years the ginseng use in traditional medicine in East Asia where ginseng is known for the adaptogenic properties and the tonic effect. The increased interest to drugs on the basis of a ginseng bring into question possibility of existence of this relic plant in the wild nature and creates a problem of receiving a source of raw materials. To help solve this problem can the biotechnological way of reproduction of a ginseng with microclonal propagation *in vitro*.

Somatic embryogenesis in plant depends of large number of external and internal factors. Earlier it was shown that Ca<sup>2+</sup> signaling system is regulating somatic embryogenesis. It is known that the main sensors of Ca<sup>2+</sup> in plant cell are Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases (CDPK). Earlier we showed that inhibitors of calcium channels and CDPK significantly decreased quantity of somatic embryos in embryogenic cell culture of ginseng 2c3. Furthermore, addition of Ca<sup>2+</sup> ionophor A23187 significantly increased the quantity of somatic embryos. This fact shows participation of Ca<sup>2+</sup> signaling system in regulation somatic embryogenesis in plants.

Earlier we showed that in ginseng embryogenic cell culture 2c3 significantly increased the expression of 4 CDPK genes (*PgCDPK1c*, *PgCDPK2b*, *PgCDPK2d*, *PgCDPK3b*) in comparison with calli cell culture GV. Also, we analyzed the expression of CDPK genes in the different embryo development stages. At early stages of embryo development the expression of *PgCDPK2d* gene significantly increased. Then, using RACE PCR we obtained the full sequence of the *PgCDPK2d* cDNA. We showed that this gene has non-standard structure: in the obtained sequence of *PgCDPK2d* gene there were no sequences corresponding to the autoinhibitory domain and the EF-hand domains. Because the homology of the kinases domain of *PgCDPK2d* was high with earlier described plant CDPKs, but in structure of this gene there were no the sequences coding functional sites of protein, we decided to use abbreviation *PgCDPK2DS* for this gene.

Further we decided to analyze influence of the overexpression of *PgCDPK2DS* gene on somatic embryogenesis in *P. ginseng* cell cultures. We used two model systems: the embriogenic cell culture PG which, was obtained in 2010 and ginseng callus culture 1c, which was obtained in 1988. For overexpression *PgCDPK2DS* gene we used agrobacterial pSAT1 vectors.

By transformation the PG embryogenic cell culture we obtained several *PgCDPK2DS*-transgene cell cultures. Those cultures lost ability to form embryogenic structures. While, obtained control vector cell culture with only *npIII* gene had embriogenic structures as in cell culture PG. Interesting to note, that at the first month of free Km cultivation in the *PgCDPK2DS*-transgene cell cultures 1c we detected some cell aggregates reminding embryogenic structures. Thus, for the first time was shown that the *PgCDPK2DS* gene is involved in regulation somatic embryogenesis in the ginseng cell cultures.



**СЕКЦИЯ 4.**

**Генетически трансформированные  
клетки, изолированные органы и  
растения**

**SECTION 4.**

**Genetically transformed plant cells,  
organs and plants**

**СОЗДАНИЕ РЕЦИПИЕНТНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО И ЛЮЦЕРНЫ**  
**Агафодорова М.Н., Солодкая Л.А., Лапотышкина Л.И., Клименко И.А.,  
Шамустакимова А.О.**

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт кормов им. В.Р. Вильямса Российской академии сельскохозяйственных наук, Моск. обл., г. Лобня, ул. Научный городок, корп. 1, факс (495) 577-71-07, тел.(495) 577-73-37, e-mail: vniikormov@nm.ru

С целью создания трансгенных растений клевера лугового с сохранением морфогенетических и хозяйственно-ценных признаков исходных генотипов была разработана следующая реципиентная система. В качестве исходного растительного материала использовали морфогенные культуры кислотоустойчивых клонов клевера лугового с высокой семенной продуктивностью, полученные методом прямой регенерации из гипокотильных эксплантов. Растения, выращенные из эпикотилей, служили в качестве контрольных для сравнительного изучения морфологических признаков исходных генотипов и полученных из них растений-трансформантов. Генетическую трансформацию проводили с целью повышения устойчивости выбранных клонов к возбудителям корневых гнилей. Использовали обезоруженный штамм *Agrobacterium tumefaciens* LGV3850, содержащий векторную плазмиду рК22ас (с геном дефензина амаранта), сконструированную во ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии.

В результате были получены растения-трансформанты при отборе на питательной среде с селективным фактором канамицином, образующие *in vitro* при 50 мг/л канамицина мощную корневую систему. Трансгенная природа была доказана с помощью ПЦР. Было также показано, что растения-трансформанты по морфобиологическим, физиологическим и цитогенетическим признакам не отличались от исходных генотипов и сохраняли признак кислотоустойчивости. У трансгенных растений-регенерантов LGVac2 при контролируемом переопылении между растениями внутри клона получено семенное потомство T<sub>1</sub>. Завязываемость семян варьировала в среднем от 12,4 до 40,1%. Начат опыт по изучению экспрессии генов канамицинустойчивости и дефензина (по устойчивости к возбудителям болезней) полученного семенного потомства.

Для люцерны используется метод разобленных доминирующих центров, разработанный нами ранее, при этом культивирование эксплантов (эпикотилей) осуществляется на питательной среде Гамборга с добавлением бензиламинопурина. Стадия каллусогенеза практически отсутствует, образуется морфогенная ткань, то есть мала вероятность возникновения соматоклональной изменчивости. Кроме того, появилась возможность проведения исследований по трансгеннозу с таким сложным в плане регенерации *in vitro* объектом, как люцерна хмелевидная, которая имеет диплоидный набор хромосом и является строгим самоопылителем.

С целью повышения устойчивости к возбудителям корневой гнили созданы трансгенные растения-регенеранты люцерны хмелевидной с геном синтеза дефензина гороха. Была также проведена генетическая трансформация люцерны изменчивой (кислотоустойчивый сорт Селена) с геном Fe-СОД для повышения устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Генетические конструкции, содержащие вышеназванные гены, получены от А.А. Гулевича (ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии). Трансгенная природа растений-трансформантов обоих видов люцерны доказана с помощью ПЦР-анализа. Изучается семенное потомство.

**CREATION OF RECIPIENT SYSTEMS FOR GENETIC TRANSFORMATION  
OF RED CLOVER AND ALFALFA****Agafodorova M.N., Solodkaya L.A., Lapotishkina L.I.,  
Klimenko I.A., Shamustakimova A.O.**

State Scientific Institution All-Russian Williams Fodder Research Institute (Russian Agricultural Academy), Moscow reg., Lobnya, Nauchniy gorodok Str., tel. (495) 577-73-37, fax (495) 577 71 07, e-mail: vniikormov@nm.ru

For maintenance of morphogenetic and agronomic important characteristics of initial genotypes in transgenic red clover plants a special recipient system was developed. Morphogenic cultures of acid tolerant clones with high seed productivity were used as initial plant material. These clones were obtained by straight regeneration from hypocotyls. The plants, regenerated of epicotyls, were used as a control samples for comparative study of morphological traits the starting genotypes and transformed plants. Genetic transformation was carried out for increase the resistance of selected clones to root rots. We have used the disarmed strain of *Agrobacterium tumefaciens* LGV3850, containing a vector-plasmid pK22ac with gene defensin of amaranth. The plasmid was constructed in Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology.

Putative transgenic plants with potent root system were selected after incubation on 50 mg/l kanamycine-containing medium. The transgenic nature of the red clover plants was confirmed by PCR analysis. It has been shown, that transformed plants had not differences on the morpho-biological, physiological and cytogenetic characteristics in comparison with initial genotypes and have retained the acid tolerance. Seed progeny T<sub>1</sub> from transgenic plants LGVac2 was obtained as a result of controlled intraclonal pollination. Seeds formation varied in average from 12,4 to 40,1 percents. Now expression of genes, responsible for tolerance to kanamycin and resistance to infectious (defensin gene) is studied in the seed progeny.

For genetic transformation of alfalfa we use the method of uncoupled dominating centers that we have developed formerly. Gamborg's B5-based media with benzylaminopurine was used for cultivation of explants material (epicotyls). Because of direct formation of morphogenic tissue from explants, almost without stage of callusogenesis, the somaclonal variability is rare event. Besides, we have now the possibility to carry out the study on transgenesis with *Medicago lupulina* L. This forage crop is strong self-pollinator, has diploid set of chromosomes and thus it is the difficult object for regeneration in vitro.

In order to improve resistance to root rots the transgenic plants of *Medicago lupulina* L. with gene synthesis of pea defensin were created. Genetic transformation of *M. varia* (variety Selena with high acid tolerance) with gene Fe-COD was performed to increase resistance of alfalfa to environmental stress. Genetic constructs, containing the targeted genes, was obtained from A.A. Gulevich (Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology). Expression of the transgenes in alfalfa plants of both species was confirmed by PCR analysis. At present we study the seed progeny of the transgenic plants.

**ОСОБЕННОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ СИНТЕЗА ЦИТОКИНИНОВ И АУКСИНОВ**  
**Алексеева В.В.<sup>1</sup>, Мудрик В.А.<sup>2</sup>, Рукавцова Е.Б.<sup>1</sup>, Голубчикова Ю.С.<sup>3</sup>, Ермошин А.А.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, 142290, Проспект Науки, 6, факс:(4967) 33-05-27, тел. (4967) 33 09-70, e-mail: lera@fibkh.serpukhov.su

<sup>2</sup>ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, 142290, ул. Институтская, д. 2, факс (4967) 33-05-32, тел. (4967) 73-24-48, e-mail: vilen\_mudrik@rambler.ru

<sup>3</sup>Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19, тел. (343) 261-66-85; e-mail: ermosh@e1.ru

Использование трансгенных растений с экспрессией агробактериальных генов *ipt* и *iaaM*, отвечающих за синтез цитокининов и ауксинов, расширяет возможности исследования функциональной роли этих фитогормонов в регуляции физиологических и биохимических процессов, а также в устойчивости растений к стрессовым факторам. Объектом исследования служили трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Самсун с генами *ipt* (*ipt*-растения) и *iaaM* (*iaaM*-растения) под одинарным и двойным промоторами 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, соответственно. Уровень свободных цитокининов в *ipt*-растениях возрастал в три раза по сравнению с контролем. Содержание активных ауксинов в *iaaM*-растениях было в 1.5-2 раза больше, чем в растениях дикого типа. Исследования проводили на полностью развитых молодых листьях табака, выращенных в условиях закрытого грунта на станции искусственного климата «Биотрон». Показано, что у *ipt*-растений площадь листьев уменьшилась на 84%, а скорость нет-фотосинтеза ( $P_N$ ) в расчете на хлорофилл при этом снизилась всего на 65%. У *iaaM*-растений снижение фотосинтеза соответствовало уменьшению площади листьев и составляло 40% от контроля. Во всех вариантах трансгенных растений увеличилась скорость темнового дыхания (36% для *ipt*-растений и 50% для *iaaM*-растений в расчете от нет-фотосинтеза против 23% в контроле). Относительная скорость электронного транспорта (ETR) снизилась на 29% (*ipt*-растения) и на 10% у *iaaM*-растений по сравнению с диким типом, а нефотохимическое тушение (NPQ), наоборот – увеличилось на 144% (*ipt*-растения) и на 69% (*iaaM*-растения). Ингибирование роста корней, вызванное суперсинтезом цитокининов, привело к нарушению водного режима *ipt*-растений и снижению фотосинтеза в этих растениях. У *iaaM*-растений это могло быть связано с появлением многочисленных придаточных корней на стеблях.

Известно, что понижение соотношения  $F_v/F_m$  обусловлено ингибированием ФСП, что делает этот показатель эффективным средством наблюдения за растениями под действием стресс-факторов. Влияние увеличения эндогенных фитогормонов в трансгенных растениях табака на их устойчивость к стрессам изучали на примере воздействия света высокой интенсивности на фотосинтез. После обработки растений 30 мин повреждающим светом 6000 мкМоль  $m^{-2} s^{-1}$  ФАР и последующей 30-минутной темновой адаптации, необратимое фотоингибирование у *ipt*-растений было ниже (45%), чем у контрольных растений (55%), что подтверждает защитное действие цитокининов в стрессовых условиях. У *iaaM*-растений необратимое фотоингибирование в этих условиях было больше, чем в контроле – 68% против 55%. Это указывает на сильное повреждающее действие эндогенных ауксинов в *iaaM*-растениях в условиях фотоингибирования и неспособность этих растений к восстановлению после стресса. Аналогичные выводы следуют из оценки коэффициента спада флуоресценции, характеризующего квантовую эффективность фотосинтеза - индекса жизнеспособности (Rfd). Величина Rfd для контрольных растений составляла 3.00 отн. ед. У *iaaM*-растений значение Rfd было на 47% ниже контрольного. Возможно, это связано с тем, что гиперпродукция ауксинов вызывает повышенное образование активных форм кислорода, оказывающих повреждающее действие на липиды.

## FEATURES OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS WITH CONSTITUTIVE EXPRESSION OF BACTERIAL GENES OF AUXIN AND CYTOKININ SYNTHESIS

Alekseeva V.V.<sup>1</sup>, Mudrik V.A.<sup>2</sup>, Rukavtsova E.B.<sup>1</sup>, Golubchikova Yu.S.<sup>3</sup>, Ermoshin A.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Science Avenue, 6, Fax: (4967) 27-05-33, tel. (4967) 33-09-70, e-mail: lera@fibkh.serpukhov.su

<sup>2</sup>Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Institutskaya str., 2, tel. (4967) 73-24-48, fax (4967) 33-05-32, e-mail: vilen\_mudrik@rambler.ru

<sup>3</sup>Ural Federal University named after First President of Russia B.N. Yeltsin, 620002, Ekaterinburg, ul. Mira, 19, tel. (343) 261-66-85, e-mail: ermosh@e1.ru

The use of the transgenic plants with expression of agrobacterial *ipt* and *iaaM* genes which are responsible for cytokinin and auxin synthesis, expands possibilities of research of a functional role of these phytohormones in regulation of physiological and biochemical processes, and also in resistance of plants to stressful factors. We studied the transgenic tobacco plants *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun with *ipt* gene (*ipt*-plants) and *iaaM* gene (*iaaM*-plants) under single and double promoters of 35S RNA cauliflower mosaic virus, respectively. The level of free cytokinins in *ipt*-plants increased three-fold compared to control. The content of active auxins in *iaaM*-plants was 1.5-2 times higher than in wild-type plants. The study was performed on a fully developed young leaves of tobacco plants grown in greenhouse "Biotron". It is shown that at *ipt*-plants the leaf area decreased by 84%, and the rate of the photosynthesis ( $P_N$ ), based on the chlorophyll, decreased by only 65%. In *iaaM*-plants the photosynthesis reduction corresponded to a decrease in leaf area and was 40% of the control. In all variants of transgenic plants dark respiration rate increased (36% for the *ipt*-plants and 50% for the *iaaM*-plants, based on the net-photosynthesis, versus 23% in controls). The relative rate of the electron transport (ETR) decreased by 29% (*ipt*-plants) and for 10% in *iaaM*-plants in comparison to wild-type, and non-photochemical quenching (NPQ), on the contrary, increased by 144% (*ipt*-plants) and for 69% (*iaaM*-plants). The root growth inhibition caused by cytokinin supersynthesis led to disruption of the water regime in *ipt*-plants and decrease in the photosynthesis in these plants. In *iaaM*-plants it could be due to the emergence of numerous additional roots on the stems.

It is known that lowering the ratio  $F_v/F_m$  is caused by the inhibition of PSII making this ratio the effective tool of monitoring for plants under the influence of stress factors. Influence of increase of endogenous phytohormones in transgenic tobacco plants on their resistance to stresses studied on the example of impact of high intensity light on the photosynthesis. After 30 min treatment on plants with damaging light  $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR and after subsequent 30-minute dark adaptation, the irreversible photoinhibition in *ipt*-plants was lower (45%), than in control plants (55%), that confirms the protective effect of cytokinins in stressful conditions. In *iaaM*-plants the irreversible photoinhibition under these conditions was greater, than in the control group - 68% versus 55%. It indicates strong damaging effect of endogenous auxin in *iaaM*-plants in photoinhibition conditions and inability of these plants to recover after the stress. Similar conclusions follow from the fluorescence decay rate, the coefficient characterizing the quantum efficiency of the photosynthesis - vitality index (Rfd). The Rfd value for control plants was 3.00 relative units. In *iaaM*-plants Rfd value was 47% lower than the control. Probably, this is due to the fact that auxin overproduction causes the increased formation of reactive oxygen species that have a damaging effect on lipids.

**LC AND LC-MS/MS STUDIES OF ANTHRAQUINONES IN GENETICALLY TRANSFORMED HAIRY ROOT CULTURES OF *RUBIA TINCTORUM* L.**Bányai P.<sup>1</sup>, Kursinszki L.<sup>1</sup>, Kuzovkina I.<sup>2</sup>, Szóke É.<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Pharmacognosy, Semmelweis University, Budapest, H-1085, Üllői str., 26<sup>2</sup>Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

*Rubia tinctorum* L. (european madder) is a perennial plant from the *Rubiaceae* family. It is a source of a natural dye; it produces a variety of anthraquinone pigments in its roots and rhizomes. The main components are di- and trihydroxy-anthraquinones, alizarin and purpurin and their derivatives, ruberythric acid, pseudopurpurin and lucidin-primeveroside. These substances show bactericidal, antifungal and spasmolytic activity and facilitate the loosening of kidney concretions. Some components show mutagenic activity (lucidin), but recent studies indicated that alizarin and purpurin have strong inhibitory effect on the genotoxicity of several carcinogens.

We have investigated the anthraquinone composition of the genetically modified hairy root cultures. Transformed root cultures of *R. tinctorum* were obtained by their inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* (strain R-1601). After the elimination of bacteria, the hairy roots were cultured on liquid or solid Gamborg B5 and ½NMS media [1-2].

For determination of anthraquinone glycosides, crude MeOH extracts of *Rubia tinctorum* hairy roots were purified by SPE (C-8) then investigated by HPLC method (Spectra Physics System, FOCUS scanning UV-VIS detector) on Luna C-8 (Phenomenex) column [4], using a 16:84 (v/v) isocratic mixture of acetonitrile:20 mM ammonium formate (pH 3.00) as eluent. Purified extracts were fractionated by flash chromatography method on FlashSil column (Jones Chromatography), using a step gradient elution (hexane:2-propanol:methanol 100:0:0→0:0:100). Fractions were screened by TLC and analysed by HPLC, using gradient elution (acetonitrile:0.1% TFA 10:90→100:0). Anthraquinone glycosides and aglycones were separated and 1,2-dihydroxy-anthraquinone-6-O-β-D-xylanopyranosyl-β-D-glucose (ruberythric acid), 1,3-dihydroxy-2-hydroxymethyl-anthraquinone-6-O-β-D-xylanopyranosyl-β-D-glucose (lucidin-primeveroside), 2-carboxyl-1,3-dihydroxy-anthraquinone (munjistin), 1,3-dihydroxy-2-methyl-anthraquinone (rubiadin), lucidin-glucoside and alizarin-glucoside were detected via UV spectrum and LC-MS/MS analysis (Agilent Triple Quadrupole System), using electrospray ionisation in negative mode.

## References:

- [1] Gamborg O.K., Miller R.A., Ojima K. (1968) Exptl. Cell Res. 50: 151-158.
- [2] Kuzovkina I.N., Mantrova O.V., Al'terman I.E., Yakimov S.A. (1996) Rus. J. of Pl. Phys. 43 (2): 291-298.
- [3] Mantrova O.V., Dunaeva M.V., Kuzovkina I.N., Schneider B., Müller-Uri F. (1999) Rus. J. of Pl. Phys. 46 (2): 248-251.
- [4] Bányai P., Kuzovkina I.N., Kursinszki L., Szóke É. (2006) Chromatographia 63 S111-S114.

**ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* С ИНТЕГРИРОВАННЫМ  
ГЕНОМ МИКРОБНОЙ ФИТАЗЫ****Валеева Л.Р.<sup>1\*</sup>, Нямсүрэн Ч.<sup>1\*</sup>, Шакиров Е.В.<sup>2</sup>, Шарипова М.Р.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, тел. (843) 233-78-56, e-mail: lia2107@yandex.ru.

<sup>2</sup>Техасский аграрно-технический университет, г. Колледж-Стейшен, Техас, США

\* - Равное авторство

В настоящее время одной из наиболее острых проблем для сельского хозяйства является недостаток фосфорного питания растений, связанный с тем, что почвенный фосфор в основном представлен труднодоступными для растений органическими соединениями. Дефицит фосфора неблагоприятно сказывается как на росте, так и на продуктивности культурных растений. Наиболее эффективным представляется решение данной проблемы с помощью современных методов генетической инженерии. Одно из развивающихся направлений – использование генов фитаз - специфических фосфатаз, высвобождающих неорганический фосфат из труднодоступного почвенного соединения мио-инозитол гексакисфосфата (фитата), широко распространенного в почве органического соединения фосфора. Экспрессия трансгенных фитаз в корнях растений с их последующая секрецией в ризосферу является перспективным методом повышения доступности фосфора для роста и жизнедеятельности растений.

Целью данной работы является получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* с интегрированными генами фитаз *Bacillus ginsengihumi* PhyCg и *Pantoea agglomerans* PaPhyC. Нами была осуществлена трансформация растений *Arabidopsis thaliana* бактериями *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. В качестве вектора использовались плазмиды pСВК05 с химерными последовательностями ex::phyCg и ex::parphyC, состоящие из гена фитазы и гена сигнальной последовательности экстенсина Ext3, находящиеся в одной рамке считывания под контролем специфического для корней *A. thaliana* промотора Pht1;2, активирующегося в условиях недостатка фосфора. В состав вектора также входил ген устойчивости к селективному гербициду BASTA. Трансформацию проводили методом макания цветов в суспензию агробактерий. Для получения трансгенных растений первого поколения проводили селекцию семян на среде MS с добавлением селективного гербицида. От каждой индивидуальной линии трансгенных растений первого поколения также были получены семена и проведена их селекция и анализ расщепления, что позволило отобрать линии растений с единичной копией гена. Наличие трансгенной вставки в геноме растений было также подтверждено с помощью ПЦР с использованием праймеров к гену фитазы и последовательности экстенсина.

В дальнейшем полученные нами трансгенные растения будут использованы для сравнения эффективности двух фитаз в обеспечении растений фосфором при росте на фитате как единственном источнике фосфора. Данная работа позволит разработать новые методы использования микробных фитаз для улучшения роста и урожайности сельскохозяйственных растений, выращиваемых на обедненных фосфором почвах.

Работа поддержана грантом ФЦП № 14.А18.21.0849.

**GENERATION OF TRANSGENIC *ARABIDOPSIS THALIANA* PLANTS WITH INTEGRATED MICROBIAL PHYTASE GENES****Valeeva L.<sup>1\*</sup>, Nyamsuren Ch.<sup>1\*</sup>, Shakirov E.V.<sup>2</sup>, Sharipova M.R.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Kazan (Volga River) Federal University, 420008, Kazan, 18, Kremlyovskaya St., tel. (843) 233 78 56, e-mail: lia2107@yandex.ru

<sup>2</sup>Texas A&M University, College Station, TX, USA

\* - Equal authorship

One of the major limiting factors in crop production is the deficit of phosphorus bioavailability, which stems from the inability of plants to utilize organic phosphorus compounds from the soil. Phosphorus deficiency severely limits plant growth and productivity throughout the world. An effective way to solve this problem is through integration of microbial phytase genes into the plant genome. Phytases are specific phosphatases hydrolyzing phytate (myo-inositol hexakisphosphate), the main organic phosphorus compound present in the soil. Expression of transgenic phytases in plant roots and their secretion to the rhizosphere is a promising approach to increase the bioavailability of phosphorus to the plants.

The major goal of this research is to obtain transgenic *Arabidopsis thaliana* plants that harbor phytase genes PhyCg from *Bacillus ginsengihumi* and PaPhyC from *Pantoea agglomerans*. We transformed *Arabidopsis thaliana* plants by the T-DNA integration method using bacteria *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 and pCBK05 plasmid as the transformation vector. The T-DNA constructs contained Ext3 extensin signal sequences and either PhyCg or PaPhyC cDNAs under the control of *Arabidopsis* Pht1;2 promoter, which is specifically activated in the root epithelium cells in the conditions of phosphorus starvation. T-DNA constructs also harbored the bar gene, which confers resistance to the herbicide BASTA.

Transformation was carried out by dipping flower buds into the *Agrobacterium tumefaciens* suspension culture. Selection of transformants was performed on MS agar plates supplemented with BASTA. Transgenic plants that showed resistance to BASTA were transferred to soil to obtain seeds for the next generation of plants. All individual transgenic lines were analyzed for several generations by the BASTA sensitivity assay to identify independent lines with a single T-DNA integration site. The presence of transgenes in the *Arabidopsis* genome was further verified by PCR using primers to the phytase gene sequences.

Future research will focus on the analysis of relative efficiency of the two microbial phytases in acquiring inorganic phosphorus from phytate when plants are grown in a synthetic medium with phytate as the only source of phosphorus in solution. This work will explore the possibility of utilizing microbial phytases as a new method in applied plant biotechnology to improve plant growth and productivity on marginal soils deficient in inorganic phosphorus.

This project is supported by FCP grant № 14.A18.21.0849.



**СОЗДАНИЕ НОВЫХ АССОЦИАТИВНЫХ СИМБИОЗОВ МЕЖДУ РАПСОМ И РИЗОБИЯМИ, ОБЛАДАЮЩИМИ ФУНГИСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**  
**Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Оркодашвили А.М., Баймиев А.Х.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, г. Уфа, Проспект Октября, д. 71, факс: (347) 235-61-00, тел. (347) 235-60-88, e-mail: zilyaver@mail.ru

С помощью дикого штамма *Agrobacterium rhizogenes* A4, трансформированного плазмидой pCAMBIA 1301-psl, содержащей в области T-ДНК ген gus с каталазным интроном и полноразмерный ген лектина гороха посевного psl, были получены трансгенные по гену лектина «бородатые корни» на рапсе *Brassica napus* L. var. napus сорта Ратник. В опытах по трансформации использовали свежую ночную культуру агробактерий, выращенную при 28 °С на шейкере (150 об/мин) в минимальной среде Min A, с добавлением 100 мг/л рифампицина и 50 мг/л канамицина. Перед инокуляцией культуру центрифугировали (3500 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в жидкой среде Min A с добавлением 100 мкМ ацетосирингона. Плотность суспензии агробактерий была доведена до 10<sup>2</sup> КОЭ/мл. В качестве эксплантов в экспериментах по трансформации использовали 1,5-недельные проростки рапса с отрезанной корневой системой, которые обмывали в суспензию агробактерий на 10 с и помещали в среду MS без антибиотиков для кокультивации. Через 2 суток совместного культивирования (и далее через каждые 2 недели) экспланты переносили на свежую среду того же состава, но с добавлением по 250 мг/л карбенициллина и цефотаксима. Первые «бородатые корни» начинали появляться через две недели после инокуляции агробактериями. Практически 80% всех «бородатых корней», полученных с помощью штамма *A. rhizogenes*, несущего конструкцию pCAMBIA1305.1-psl, оказались одновременно трансформированными и gus и psl, что подтвердили gus-анализ и ПЦР на наличие и конститутивную экспрессию на уровне мРНК гена лектина. В качестве контроля были использованы «бородатые корни», полученные с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*, и корни, полученные на эксплантах без инокуляции. Гистохимический и ПЦР анализы в этих случаях дали отрицательный результат. Композитные растения, состоящие из трансгенного по гену psl корня и нетрансгенной надземной части, и контрольные (без гена psl) композитные растения были пересажены в емкости диаметром 5 см и высотой 10 см со стерильным вермикулитом, смоченным 10% средой Хогланда-Арнона, и выращивались при температуре 25-28 °С (ночная и дневная температуры соответственно) и 14-часовом световом дне. Через месяц после пересадки растения были обработаны на ночь 5 мл суспензии (10<sup>3</sup> КОЭ/мл) *R. leguminosarum* 116 (флуоресцентной меченный микросимбионт гороха посевного, обладающий фунгистатической активностью по отношению к *Fusarium*). Численность адгезированных бактерий на трансформированных геном лектина корнях оказалась выше в 20 раз, по сравнению с контролем, что доказывало взаимодействие ризобий с лектином гороха на поверхности трансформированных корней. Опытные и контрольные растения, обработанные ризобиями, пересаживали в почву, содержащую споры гриба *F. oxysporum* (патоген рапса) и выращивали в течение трех суток. После окрашивания корней растений толуидиновым синим, проводили их микроскопический анализ. В результате проведенных экспериментов было выяснено, что предварительная обработка трансгенных по гену psl корней ризобиями уменьшает количество гиф патогена *F. oxysporum* в ризосфере рапса. Такой же эффект, но в гораздо меньшей степени, наблюдается на корнях контрольных растений, на которых адсорбция бактерий происходит менее эффективно.

Разработанный экспериментальный подход, основанный на симуляции процессов узнавания и ранних симбиотических взаимодействий с помощью лектинов бобовых растений, в перспективе может быть использован для получения стабильных ассоциаций экономически ценных несимбиотрофных видов растений с ризобиями, в том числе и обладающими фунгистатической активностью.

**ESTABLISHMENT NEW ASSOCIATIVE SYMBIOSIS BETWEEN RAPE AND RHIZOBIA WITH FUNGISTATIC ACTIVITY****Vershina Z.R., Blagova D.K., Nigmatullina L.R., Orkodashvili A.M., Baymiev A.Kh.**

Institute of biochemistry and genetics of Ufa science centre RAS, Department of Molecular Biology and Plant Physiology, 450054, Russia, Bashkortostan, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 71, tel. (347) 235 60-88, fax (347) 235 61-00, e-mail: zilyaver@mail.ru

Hairy roots transgenic on lectin gene were obtained in oil seed rape (*Brassica napus* L. var. *napus* cv. Ratnic) with the use of a wild strain of *Agrobacterium rhizogenes* A4 transformed with pCAMBIA1301 plasmid containing gene *gus* with the catalase intron and the full size lectin gene from the *Pisum sativum* (*psl*) in T-DNA. For the transformation experiments we used 1 day cultures of *A. rhizogenes* cultivated at 28°C on a shaker (150 rpm) in Min A liquid medium with 100 µg/ml rifampicin and 50 µg/ml kanamycin. Before inoculation, the cultures of agrobacteria were centrifuged (2054 g for 10 min) and resuspended in Min A liquid medium with 100 µM acetosyringone. The density of the bacterial suspension was conditioned to 10<sup>2</sup> CFU/ml. For the hairy root obtainment 1.5 week plants of oil seed rape were used. The cut end of the de-rooted hypocotyls of seedlings were stored for 10 s in the suspension of agrobacteria, and then inserted upright with the cut end into MS agar medium without antibiotics for co-cultivation. After 2 days of co-cultivation (thereafter every 2 weeks) the explants were transferred to fresh MS medium with the addition of carbenicillin and cefotaxime (250 µg/ml). First roots were visible within 2 weeks after inoculation. Practically 80% of all hairy roots obtained from the use of the *A. rhizogenes* A4 strain with pCAMBIA1301-*psl* were simultaneously transformed by both *gus* and *psl*, which was confirmed by the *gus*-analysis and PCR on the presence and constitutive expression of lectin gene of the level of mRNA. Hairy roots mediated by *A. rhizogenes* (carrying pCambia1301 without *psl*) and ordinary roots did not have any *gus* and *psl* activity. Composite plants consisting of *psl* transformed roots and nontransformed shoots and control (without *psl*) were transferred directly into test tubes which were 5 cm in diameter, 10 cm in height and contained sterilized vermiculite with 10% Hoagland and Arnon medium. Growth conditions were 14-h photoperiod and 28/25°C day/night cycle. One month after transferring to test tubes, roots under test were inoculated with 5 ml *R. leguminosarum* 116 suspension (10<sup>3</sup> CFU/ml) overnight. This bacterium is fluorescently labeled pea rhizobia with fungistatic activity against *Fusarium*. The number of adhered bacteria onto the roots transformed with lectin gene was 20 fold in comparison with the control; this confirms the interaction of *R. leguminosarum* with pea lectin at the surface of the transformed roots of oil seed rape. The test and control plants treated with rhizobia transferred into soil containing spores of *F. oxysporum* (oil seed rape pathogen) and cultivated for three days. Then we stained roots with toluidine blue and performed microscopic analysis. As a result of these experiments it was found that rhizobia pretreatment of roots transformed *psl* reduces pathogen hyphae in the rhizosphere of oil seed rape. The same effect, but to a much smaller extent, is observed on the roots of the control plants, that are poorly adsorbed by bacteria.

The developed experimental approach, based on the simulation of recognition processes and early symbiotic interactions with legume lectins, may, in perspective, be used for obtaining stable associations of economically valuable nonsymbiotic plant species with rhizobia, including bacteria with fungistatic activity.

## МОДИФИКАЦИЯ СВОЙСТВ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ ПУТЕМ СУПЕРЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ГЕНА КСИЛОГЛЮКАНАЗЫ *sp-Xeg*

Видягина Е.О., Ковалицкая Ю.А., Шестибратов К.А.

Филиал федерального бюджетного учреждения науки института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл. г. Пущино, проспект Науки, д. 6, телефон: (4967)330966, факс: (4967)330527, e-mail: vidyagina@mail.ru

Рост растительной клетки сопровождается растяжением клеточной стенки под действием внутриклеточного давления. Ксилоглюкан является полисахаридом гемицеллюлозы растительной клеточной стенки, который поперечно сшивает прилегающие микрофибриллы целлюлозы, обеспечивая формирование прочного каркаса. Разделение микрофибрилл при росте клетки растения обеспечивают ферменты, расщепляющие ксилоглюканы и ослабляющие связывание между микрофибриллами. Ксилоглюканаза – один из таких ферментов, относящийся к группе карбогидраз, который гидролизует ксилоглюканы разрушает поперечную «сшивку» целлюлозных микрофибрилл, способствуя тем самым растяжению клеточной стенки. Предполагается, что суперэкспрессия ксилоглюканаза может оказывать влияние на рост и развитие растений. Для доказательства этой гипотезы были созданы трансгенные растения осины с конститутивной экспрессией рекомбинантной ксилоглюканазы *sp-Xeg* из гриба *Penicillium canescens*. Используя агробактериальный перенос, были получены 25 трансгенных линий растений осины. Конститутивная экспрессия гена *sp-Xeg* на уровне транскрипции подтверждена методом ОТ-ПЦР.

Анализ свойств трансгенных клонов осины с рекомбинантным геном ксилоглюканазы *sp-Xeg* из *Penicillium canescens* показал наличие комплексных модификаций как в составе древесины, так и в фенотипе растений. Биометрический анализ выявил увеличение высоты трансгенных растений по сравнению с контролем. Увеличение высоты побега на 24,8%, 25% и 26% отмечено для линий PtXIVXeg1a, PtXVXeg1a, PtXVXeg1b, соответственно. Также отмечено повышение числа междоузлий у некоторых трансгенных клонов. Анализ морфологии листьев выявил увеличение длины черешка и сокращение длины главной жилки у трансгенных линий. Отношение длины черешка к длине главной жилки у растений контрольной группы равнялось 0,49, тогда как у трансгенных растений оно варьировало от 0,51 до 0,66. Кроме морфологических изменений растений было впервые показано изменение ризогенеза у растений с рекомбинантным геном ксилоглюканазы. У 10 линий из 25 эффективность укоренения в условиях *in vitro* превышала контрольное значение. Максимальное значение эффективности укоренения зафиксировано у линии PtXVXeg1a (в 2,5 раза выше контроля). Масса корневой системы 6 клонов из 25 в условиях защищенного грунта была выше контроля на 20%. У 16 из 25 проанализированных клонов отмечено повышение содержания целлюлозы. Наибольшее значение этого показателя у клона PtXIVXeg1c – 426 мг/г, когда как у контроля оно равнялось 348 мг/г. Анализ экстрактов из листьев тепличных растений показал увеличение активности ксилоглюканазы у клонов: PtXVXeg1c – на 92 %, PtXVXeg4c – на 51 %, PtXIVXeg1a на 35%, PtXIVXeg1b – на 21%. Активность фермента у других генотипов была приближена к контрольными значениям. Полученные данные ксилоглюканазной активности и целлюлозы в целом взаимосвязаны с модификациями фенотипа.

На основании проведенных анализов нами было выделено четыре наиболее перспективных клона: PtXIVXeg1a, PtXVXeg1a, PtXVXeg1b и PtXIVXeg1c.

**THE PROPERTIES MODIFICATION OF ASPEN PLANTS BY MEANS OF  
OVEREXPRESSION OF THE RECOMBINANT GENE OF XYLOGLUCANAS SP-XEG**  
Vidyagina E.O., Kovalitskaya Yu.A., Shestibratov K.A.

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, 142290, Moscow Region. Pushchino, Science av., 6, tel.(4967) 330966, fax 4967) 330527, e-mail: vidjagina@mail.ru

The growth of plant cells is accompanied by elongation of the cell wall by the action of intracellular pressure. Xyloglucan is a polysaccharide of plant cell wall hemicellulose, which joins adjacent cellulose microfibrilles, providing the formation of a solid frame. Separation of microfibrils in the growing plant cells is provided by enzymes that decompose xyloglucans and weaken the links between the microfibrilles. Xyloglucanases are one of these enzymes from the group of carbohydrases which hydrolyzes xyloglucans destroying transverse links of cellulose microfibrils, providing the stretching of the cell wall. It is supposed that xyloglucanases overexpression can effect plant growth and development. To prove this hypothesis transgenic aspen plants with constitutive expression of recombinant xyloglucanase sp-Xeg from the fungus *Penicillium canescens* were created. The 25 transgenic aspen plants were obtained by usage of agrobacterium transfer. Constitutive expression of the gene sp-Xeg at the transcriptional level was confirmed by RT-PCR.

Analysis of the properties of transgenic aspen clones with recombinant gene xyloglucanase sp-Xeg from *Penicillium canescens* revealed the presence of complex modifications in the wood, and the phenotype of plants. Biometric analysis revealed an increase in the height of transgenic plants as compared to the control group. Increasing the height of the sprout of 24.8%, 25% and 26% observed for the lines PtXIVXeg1a, PtXVXeg1a, PtXVXeg1b, accordingly. Also an increase in the number of internodes in some transgenic clones was observed. The leaf morphology analysis displays an increase in petiole length and shortening of the main vein in the transgenic lines. The ratio of length to the length of the petiole in the main vein of the control group of plants was equal to 0.49, whereas the transgenic plants, it ranged from 0.51 to 0.66. In addition to the morphological changes of plants rhizogenesis change in plants with recombinant gene of xyloglucanase was observed for the first time. In 10 of the 25 lines rooting efficiency *in vitro* was increased in comparison with the reference value. The maximum value of the rooting efficiency was noted in a fixed line PtXVXeg1a (2.5 times higher than the control). Root system mass of 6 of 25 clones in greenhouse was 20% higher than the control. In 16 of the 25 clones analyzed an increase in cellulose content was revealed. The highest value of this index is in clone PtXIVXeg1c - 426 mg / g, whereas in the control it was equal to 348 mg/g. Analysis of extracts from the leaves of greenhouse plants showed increased activity of xyloglucanase the clones: PtXVXeg1c - by 92%, PtXVXeg4c - by 51%, PtXIVXeg1a by 35%, PtXIVXeg1b - by 21%. The enzyme activity of other genotypes was close to the reference value. The obtained data of xyloglucanase activity and cellulose are generally correlated with phenotypic modifications.

Based on our analysis, we have identified four of the most promising clones: PtXIVXeg1a, PtXVXeg1a, PtXVXeg1b and PtXIVXeg1c.

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЯБЛОНИ,  
СОДЕРЖАЩИХ ШПИЛЕЧНУЮ КОНСТРУКЦИЮ  
КОМПЛИМЕНТАРНУЮ ВТОРОМУ ЭКЗОНУ ГЕНА АСО ЯБЛОНИ  
Власова А.А.<sup>1,2</sup>, Скляр Ю.А., Пушин А.С.<sup>2</sup>, Тимербаев В.Р.<sup>3</sup>, Долгов С.В.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Мичуринский государственный аграрный университет, г. Мичуринск, Тамбовская обл., 393760, ул. Интернациональная, д. 101, тел. (475 45) 5-34-71, e-mail: anutik.vlasowa@yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., Пущино, Проспект науки, д. 6, тел. (4967) 73-17-79;

<sup>3</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. (499) 976-90-05

Проведение генетических исследований на яблоне (*Malus domestica* L.) – трудоемкий и длительный процесс, что связано в первую очередь с продолжительным циклом воспроизведения. Однако, вскоре после первой успешной попытки трансформации яблони, она стала достаточно популярным объектом для исследования регуляции уровня биосинтеза этилена, прежде всего из-за своей экономической значимости и хорошо изученных физиологических аспектов процесса созревания плодов. Одним из направлений генетической трансформации яблони является модификация процесса созревания плодов с целью увеличения сроков их хранения.

Целью данной работы является определение уровня синтеза этилена в растениях яблони, содержащих шпилечную конструкцию комплиментарную 2-му экзону гена АСО яблони (самокомплементарные фрагменты гена АЦК-оксидазы яблони в различных ориентациях antisense-sense и sense-antisense).

В нашей лаборатории были получены линии с использованием шести векторных конструкций, содержащих самокомплементарные фрагменты генов АЦК-оксидазы: три из них содержали целевой ген под управлением CaMV35S промотора – рARTMdACOsa, рARTMdACOas, рCamMdACOsa; другие три вектора содержали плодоспецифичный промотор полигалактуроназы томата - рART PGMdACOas, рARTPGMdACOsa, рARTPGLeACOas. В экспериментах по генетической трансформации яблони использовали сорт Мелба.

На первом этапе нашей работы был проведен ПЦР-анализ полученных линий. В результате, были подтверждены вставки селективных генов nptII и hpt во всех образцах (всего 62). Наличие смысловой конструкции было подтверждено для 3 из 3 линий растений яблони, полученных с помощью вектора рARTMdACOsa, 9 из 16 линий, трансформированных конструкцией рCamMdACOsa, и 8 из 9 линий, полученных в результате трансформации конструкцией рARTMdACOas. А также для 18 из 20 линий, полученных при помощи рARTPGLeACOas, для 6 из 10 линий - рARTPGMdACOas и 4 из 4 линий, созданных при помощи вектора рARTPGMdACOsa. В растениях, трансформированных векторами рCam, наличие вставки целевых генов было подтверждено не во всех полученных линиях. Это может быть вызвано тем, что смысловой ген в конструкции следует за селективным геном. А также возможно происходит разрыв Т-ДНК при встраивании в растительный геном. На следующем этапе наших исследований планируется проведение оценки уровня экспрессии изоформ гена АСО, измерение уровня синтеза этилена в различных частях растения и оценка его влияния на рост и развитие трансгенных растений.

**GENETIC ANALYSIS OF TRANSGENIC APPLE PLANTS  
CONTAINING A COMPLIMENTARY HAIRPIN STRUCTURE  
TO THE SECOND EXON OF THE APPLE GENE ACO**

**Vlasova A.A.<sup>1,2</sup>, Sklyar Y.A., Pushin A.S.<sup>2</sup>, V.R. Timerbayev V.R.<sup>3</sup>, Dolgov S.V.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Michurinsky State Agrarian University, Michurinsk, Tambov Region, 393760, International str., 101, tel. (475 45) 5-34-71, e-mail: anutik.vlasowa@yandex.ru;

<sup>2</sup>Federal State Institution of Science Branch of Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290, Prospect of Science, 6, tel. (4967) 73 17-79

<sup>3</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550, Moscow, Timirjazevskaja str., 42, tel. (499) 976-90-05

Carrying out genetic research on apple (*Malus domestica* L.) is laborious and long process which is primarily due to the long cycle of reproduction. However, soon after the first successful attempt to transform apple it became quite popular object for research of regulation of the ethylene biosynthesis level, primarily because of its economic importance and well-studied physiological aspects of ripening process. One of the directions of genetic transformation is modification of apple fruit ripening process in order to increase the retention period.

The aim of this study is to determine the level of ethylene synthesis in apple plants containing the hairpin structure complementary to the second exon of the apple gene ACO (self-complementary gene fragments ACC oxidase of apple plants in different orientations of the antisense-sense and sense-antisense).

In our laboratory we were obtained using six lines of vector constructs containing self-complementary fragments of ACC oxidase genes, three of them contained the target gene under the control of CaMV35S promoter - pARTMdACOs, pARTMdACOas, pCamMdACOs; other three vectors contained the tomato fruit specificity polygalacturonase promoter - pARTPGMdACOas, pARTPGMdACOs, pARTPGLeACOas. Apple variety "Melba" was used in the experiments of the genetic transformation.

In the first step of our work PCR analysis of the lines was performed. As a result, inserts of selective nptII and hpt genes were confirmed in all samples (a total of 62 samples). The stable integration of the gene cassettes into the genome of plants was confirmed for 3 of 3 apple lines obtained with the vector pARTMdACOs, for 9 of 16 lines transformed by the vector pCamMdACOs, for 8 of 9 lines obtained by the construct pARTMdACOas and for 18 of 20 lines obtained by pARTPGLeACOas, for 6 of 10 lines - pARTPGMdACOas and for 4 of 4 lines developed using the vector pARTPGMdACOs. In plants transformed by the vectors pCamMdACOas the integration of the target gene was not confirmed in all the lines obtained. It may be due to the fact that the target gene in the vector follows the selective gene. And probably there is a rupture of T-DNA by inserting into the plant genome. In the next step of our research assessment of the level of expression of the gene isoforms ACO, measurement of ethylene synthesis level in different parts of the plant and assessment of its influence on the growth and development of transgenic plants are planned.

## СТАБИЛЬНОСТЬ НАСЛЕДОВАНИЯ ТРАНСГЕННОЙ ВСТАВКИ В ВЕГЕТАТИВНОМ И ГЕНЕРАТИВНОМ ПОТОМСТВЕ ГМ-КАРТОФЕЛЯ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К КОЛОРАДСКОМУ ЖУКУ

Воронкова Е.В., Лукша В.И., Подлюхович Ю.В., Свиточ О.В.,  
Ермишин А.П., Картель Н.А.

Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ГНУ ИГиЦ НАНБ), 220072, г. Минск, ул. Академическая, д. 27, тел. (37517) 263-53-26, факс (37517) 284-19-17, e-mail: E.Voronkova@igc.bas-net.by

Определение стабильности наследования трансгенной вставки при размножении ГМ-растений является одним из основных этапов оценки их селекционной ценности и биобезопасности. Для картофеля, как вегетативно-размножаемой культуры, изучение этого вопроса важно с точки зрения выяснения сохранения вставки в клубневом потомстве трансгенных клонов, а также определения ее копияности и возможности передачи в селекционный материал путем гибридизации. Целью настоящей работы было изучение наследования целевого гена *сгу3аМ* кристаллического инсектицидного белка (*Bt*-токсина) от *Bacillus thuringiensis* и репортерного гена *licB* лихеназы от *Clostridium thermocellum* при вегетативном и семенном размножении у четырех устойчивых к колорадскому жуку трансгенных клонов картофеля сорта Скарп.

Трансгенные растения были получены в лаборатории молекулярной генетики ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси [Исаенко и др., 2007]. О стабильности наследования трансгенной вставки судили по результатам ПЦР-анализа с использованием специально подобранных специфических праймеров к крупным фрагментам ДНК изучаемых генов, не имеющих аналогов в интактных растениях картофеля. Для детекции целевого гена это был фрагмент размером 675 п.н., а для выявления репортерного гена - 453 п.н. Для оценки вегетативного потомства изучали ДНК от четырех произвольно выбранных растений, выросших из клубней, взятых от каждого из трансгенных клонов (пятая клубневая репродукция). При изучении наследуемости трансгенной вставки в половом потомстве учитывали данные ПЦР-анализа ДНК 50 семян, полученных от каждого из трансгенных клонов при принудительном самоопылении.

В результате проведенных исследований выявлена высокая стабильность наследования целевого гена *сгу3аМ* синтеза *Bt*-токсина как при вегетативном, так и при половом размножении трансгенных клонов. Соответствующий фрагмент ДНК этого гена был обнаружен у всех проанализированных растений клубневых репродукций трансгенных клонов. При анализе их самоопыленного потомства только у одного из четырех клонов имело место расщепление, показавшее отсутствие специфического фрагмента у трех из 50 семян. Характер расщепления в потомстве этого клона и отсутствие расщепления у трех других клонов указывают на наличие у них, как минимум, двух копий целевого гена.

В отличие от целевого гена, наследование ПЦР-фрагмента, характерного для репортерного гена, как в вегетативном, так и в половом потомстве трансгенных клонов было нестабильным. Соответствующий фрагмент был выявлен в вегетативном потомстве двух клонов, в одном был представлен частично (у трех из четырех растений) и в одном отсутствовал полностью. В половом потомстве двух трансгенных клонов ПЦР-маркер полностью отсутствовал. Характер расщепления в потомстве двух других трансгенных клонов (соответствует 3:1) свидетельствует о присутствии у них лишь одной копии репортерного гена. Таким образом, встраивание этого гена, по-видимому, происходило с нарушениями, что привело к его утрате в отдельных копиях вставки и нестабильности его наследования при вегетативном и семенном размножении. Отсутствие стабильной наследуемости данного гена является фактором неопределенности, что нежелательно с точки зрения биобезопасности.

## INHERITANCE STABILITY OF TRANSGENE INSERTIONS IN VEGETATIVE AND GENERATIVELY PROPAGATED CLONES OF TRANSGENE POTATO WITH COLORADO BEETLE RESISTANCE

Voronkova E.V., Luksha V.I., Poliukchovich Yu.V., Svitoch O.V., Yermishin A.P., Kartel N.A.

State scientific organization Institute of Genetic and Cytology of Belorussian National Academy of Science (SSO IGC NAS of Belarus), Minsk, Akademicheskaja st., 27, tel. (37517) 263-53-26, fax (37517) 284-19-17, e-mail: [E.Voronkova@igc.bas-net.by](mailto:E.Voronkova@igc.bas-net.by)

Inheritance stability study of transgene insertion in progenies of transgene plants are the most important step of transgenic plants biosafety management. For potato inheritance of transgenic insertion analysis in sexual progenies is important in viewpoint 1) of insertion quantity clarification via hybridization analysis (by test of transgenes segregation in hybrids populations) and 2) definition of transgenic insertion transfer capacity by hybridization to new cultivars. Even importance for potato as a vegetative propagated plant have stable inheritance of transgene insertion in tuber propagated clones. In connection with foreside in frame of biosafety test the stability of transgenes inheritance analysis in vegetative and generative progenies of four transgenic clones of potato with transgenic construction including two new genes have been carried out. The construction have included specific-purpose gen cry3aM from *Bacillus thuringiensis* of crystalline Bt-toxin protein CryIII<sup>A</sup> synthesis with insecticide activity against coleopteran and reporter gen licB from *Clostridium thermocellum* of fermentative protein synthesis. All four transgenic clones were obtained in Institute of Genetic and Cytology of NAS of Belarus [Isaenko et al., 2007].

The stability of transgenic insertion inheritance via consequence of PCR-analysis with specific primers has been concluded. The primers were specially designed to reveal appropriate transgene in plants and don't have alignments with nontransgene potato sequence. The large-size fragments with 675 b.p for cry3aM and 453 b.p. for licB were detected. The estimation in vegetative propagated transgenic potato has been realized by DNA-analysis of four randomly picked up plants from tubers of every transgenic clone. The scrutiny of insertion inheritance in sexual progenies has been realized via PCR-analysis of DNA of 50 seedlings was obtained from every transgene clone by compulsory self-pollination.

The test has revealed high inheritance stability of specific-purpose gen cry3aM of Bt-protein synthesis us in vegetative so on in sexual propagated progenies of all four transgenic potato clones. The segregation of the specific fragment only in one clone progenies-population was detected with fragment-lack in three seedlings against 47 with fragment-presence. The segregation absence in three others populations us well segregation peculiarity of these population is evidence of at least two insertions of specific-purpose gens in all tested transgenic clones.

In contrast to specific-purpose gen, the instability of inheritance of specific PCR-fragment typical to reporter licB-gen was detected in vegetative and sexual propagated progenies of transgenic clones. The PCR-fragment presented in vegetative progenies of two clones, in progenies of one clone it partially attended (in three from four tuber-plantlets) and in one absented absolutely. In sexual propagated progenies specific PCR-fragment entirely absented in the cause of two transgenic clones. The segregation in progenies two others give evidence of presence reporter gene in parental transgene clones only in one copy and when in use integration this gene in transformants there were some genetic abnormalities that lead to instability of gene inheritance in progenies us well gene expression disturbance in transgene clones oneself.

Absence of inheritance stability and gene expression of reporter licB-gen is the factor of uncertainty. That is undesirable in point of view of biosafety in transgenic activity us well the presence in transgenic construction extra nonspecific-purpose gen. Substitution for reporter gene designed for revealing of cry-genes expressing activity may be ELISA-test using special kits for specific Bt-proteins quantity assay.



**ЭКСПРЕССИЯ ГИРУДИНА В РАСТЕНИЯХ РЯСКИ МАЛОЙ (*LEMNA MINOR* L.)****Гиляшова Н.В., Таранов А.И., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В.**

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, г. Пушкино, проспект Науки, д. 6, тел. +7(4967)731719, факс: +7(4967)330527, e-mail: [natashita-bios@yandex.ru](mailto:natashita-bios@yandex.ru)

Растительные системы синтеза белков в последнее время активно используются наряду с микробными культурами и дорогостоящими культурами клеток млекопитающих. Представители семейства Рясковых (*Lemnaceae*) и Ряска малая (*Lemna minor* L.) в частности рассматриваются, как перспективные объекты для использования в биотехнологии и биофарминге. Этому способствует ряд таких преимуществ, как преобладание вегетативного размножения, высокая скорость роста (время удвоение биомассы – от 36 часов) и высокое содержание белка (достигает 45%).

Целью данного исследования является проведение генетической трансформации Ряски малой вектором, содержащим ген гирудина. Гирудин – высокоспецифический прямой ингибитор тромбина, синтезируемый в слюнных железах медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*). В настоящее время препараты гирудина используются при лечении широкого спектра заболеваний, таких как: антикоагулянтная терапия при тромбозах, профилактика и лечение тромбозов после хирургических вмешательств и переломов и др.

На данный момент существует два источника получения гирудина – природный из слюнных желез пиявки и рекомбинантный из дрожжей. Оба этих способа дорогостоящие, кроме того, гирудин, синтезированный в дрожжах, обладает лишь 20–30% активности от природного. Это связано с недостаточной точностью процессинга молекул гирудина в дрожжах.

Преимуществами синтеза гирудина в растениях являются низкая стоимость конечного продукта, а также наличие в растениях биохимических систем, необходимых для формирования корректной вторичной структуры гирудина. Ранее был получен растительный экспрессионный вектор РВ121, содержащий последовательность гена гирудина. К N-концу в трансляционном слиянии был добавлен сигнальный пептид  $\alpha$ -амилазы риса. Кодонный состав кодирующей ДНК был оптимизирован для экспрессии в ряске.

Вектор был перенесен в штамм *Agrobacterium tumefaciens* СВЕ21, который был использован для трансформации каллусных тканей Ряски малой. В настоящее время получены листецы-регенеранты от нескольких линий трансформированного каллуса. В дальнейшем планируется завершение процесса селекции и проведение молекулярно-генетического анализа полученных клонов.

**EXPRESSION OF HIRUDIN IN DUCKWEED *LEMNA MINOR* L.**  
**Gilyashova N.V., Taranov A.I., Firsov A.P., Mitiouchkina T.U., Dolgov S.V.**

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov institute of bioorganic chemistry RAS, 142290, Pushchino, Science str., 6, tel. +7(4967)731719, fax +7(4967)330527, e-mail: [natashita-bios@yandex.ru](mailto:natashita-bios@yandex.ru)

At the present time plant-based protein production systems are widely used along with microbial and expensive mammalian cell culture systems. Members of the *Lemnaceae*, including *Lemna minor* L., are considered as promising subjects for application in biotechnology and biofarming. A number of advantages promotes it, such as prevalence of vegetative propagation, high growth rate (biomass doubling time is about 36 hours) and sizeable protein content (amounts to 45%).

The aim of present research is conducting genetic transformation of *Lemna minor* L. with the vector, which contains hirudin gene. Hirudin is high specific direct thrombin inhibitor synthesized in the peripharyngeal glands of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*). At present hirudin preparations use in a therapy a wide range of diseases, including anticoagulant therapy at thrombosis, prevention and therapy at thrombosis after surgical treatments and fractures.

Currently two hirudin sources exist, namely, native from peripharyngeal glands of the medicinal leech and recombinant from yeast. Both methods are very expensive, in addition recombinant hirudin possesses just 20-30% activity in comparison with native protein. Deficient processing accuracy of protein in yeast is the case of it.

Advantages of synthesis hirudin in plants are low cost of final product, as well as availability in plants biochemical system required for generation correct secondary structure of hirudin. Previously plant expression vector PBI121 that contains hirudin gene was obtained and  $\alpha$ -amilase signal peptide was added in translation fusion to N-end. Codon usage of coding DNA was optimized for expression in duckweed.

Vector was transferred into the strain *Agrobacterium tumefaciens* CBE21, which had been used for transformation of callus duckweed. At present time regenerated fronds had been obtained from several transformed callus lines. Completion of selection process and conducting molecular-genetic analysis obtained lines are planned later on.

## АГРОБАКТЕРИУМ-ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Гончарук А.Н., Бавол А.В., Дубровная О.В.

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, д. 31/17; e-mail: dubrovny@ ukr.net

Генетическая трансформация растений с использованием *Agrobacterium tumefaciens* характеризуется относительно высокой эффективностью, перенесением определенного дискретного сегмента ДНК, низкой частотой встраивания копий ДНК. Ожидается, что *Agrobacterium* будет использоваться в качестве надежного и эффективного вектора для доставки хозяйственно ценных генов в геном пшеницы. Использование этого метода осложнено тем, что для его результативного использования существующие методики требуют усовершенствования и адаптации для работы с конкретным растительным объектом. Кроме того, отдельные трудности связаны с тем, что клетки мягкой пшеницы слабо подвержены воздействию *A. tumefaciens*. Поэтому разработка эффективной методики трансформации пшеницы при помощи *A. tumefaciens* является актуальной проблемой.

Одним из основных факторов, определяющих эффективность *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений является выбор соответствующего экспланта. Использование в качестве эксплантов базальной части проростков пшеницы, содержащую апикальную меристему, имеет определенные преимущества по сравнению с традиционными типами эксплантов, такими как незрелые зародыши и эмбриогенный каллус. Во-первых, при использовании апикальной меристемы исключается необходимость индукции каллуса, и как следствие, не возникает эффект соматической изменчивости. Полученные трансгенные растения характеризуются нормальным развитием и полностью соответствуют исходному сорту. Этот метод позволяет использовать для трансформации широкий перечень сортов, в том числе и те, у которых усложнен процесс индукции и дифференциации каллуса. Во-вторых, данный тип экспланта характеризуется удобством использования, поскольку получение эксплантов не ограничено сезонами года и их подготовка к проведению трансформации проходит в короткий промежуток времени.

В эксперименте использовался современный высокопродуктивный сорт пшеницы Подолянка, селекции ИФРГ НАН Украины. Семена стерилизовали 2%-ным раствором гипохлорита натрия и трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Когда coleoptile достигал длины 2-4 см, его отрезали стерильным скальпелем под углом 45° к его продольной оси. Для трансформации на срез наносили 2-4 мкл ресуспендированной *A. tumefaciens*. Использовали штамм GV 2260 с плазмидой pCB002, которая содержит гены GUS – ген фермента β-глюкуронидазы и прtII – ген неомизинфосфотрансферазы II *E.coli*. После трансформации около 70% проростков выжили. Трансформированные растения были пассированы в стерильные чашки Петри. После того как растения окрепли они были адаптированы к условиям *in vivo* и пересажены в горшочки. Когда у растений было 3-7 листьев, была проведена инсуффляция семян раствором, который содержал 100 мг/л канамицина. После обработки антибиотиком 11,5% растений выжило, они нормально развивались и дали семена. Наследование устойчивости к канамицину определяли по всхожести полученных семян в присутствии антибиотика. - 200 мг/л. Всхожесть семян полученных с растений T1 составляла около 70%. При этом всхожесть контрольных семян не превышала 10%, что свидетельствует о приобретении трансформантами устойчивости к канамицину. В дальнейшем трансгенную природу полученных растений подтверждено методом ПЦР.

Полученные данные свидетельствуют о том, что инокулирование базальной части проростков пшеницы *A. tumefaciens*, штаммом GV 2260 с плазмидой pCB002 является надежным и высокоэффективным методом получения канамицин-устойчивых растений.

**AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF THE APICAL MERISTEM OF WHEAT SEEDLINGS****Goncharuk O.M., Baval A.V., Dubrovnaya O.V.**

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 03022, Ukraine, Kyiv, Vasilkovskaya str., 31/17; e-mail: dubrovnay@ukr.net

Genetic transformation of plants by using *Agrobacterium tumefaciens* is characterized by a relatively high efficiency, transferring certain discrete segments of DNA and a low frequency insertion of DNA copies. It is expected that *Agrobacterium* will be used as a reliable and efficient method for the delivery of significant genes in the wheat genome. This method is complicated by the fact that for a particular plant object the existing methods should be improved and adapted for its effective use. Certain difficulties arise from the fact that the cells of wheat poorly exposed to *A. tumefaciens*. Therefore the development of effective methods of wheat transformation by *A. tumefaciens* is an actual problem.

One of the main factors which determine the efficiency of *Agrobacterium*-mediated plant transformation is a kind of explant. The basal part of wheat seedlings, that include the apical meristem, has certain advantages comparing with traditional types of explants such as immature embryos and embryogenic callus. Using of the apical meristem eliminates the need for callus induction and occurs in the absence of somaclonal variation subsequently.

The resulting transgenic plants are characterized by normal development and fully conformed to original cultivar. This method can be used to transform a wide range of varieties, including those that have problems with the process of induction and differentiation of callus. This type of explant allows to work all the year round and preparations for the transformation take a short period of time.

For the experiment was taken modern high-yielding cultivar of wheat Podolyanka, which was derived in Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine. Seeds were sterilized with 2% sodium hypochlorite solution and washed three times with sterile distilled water. When coleoptiles reached 2-4 cm in length, it was cut at an angle of 45 degrees. For the transformation we applied resuspended *A. tumefaciens* to basal part of wheat seedlings. The strain GV 2260 with plasmid pCB002, which contains GUS - gene of the enzyme  $\beta$ -glucuronidase and nptII - gene neomycin phosphotransferase II of *E. coli*. After transformation survived about 70% of seedlings. The transformed plants were passaged into sterile Petri dishes. Large plants have been adapted in vivo and planted into pots. Plants with 3-7 leaves were sprayed by kanamycin solution (100 mg/l). There are 11,5% of plants which survived, increased and gave seeds. Obtained seeds were immersed to kanamycin solution (200 mg/l). Germination in such environment indicates inheritance of kanamycin resistance genes, it was about 70%. Germination of check sample seeds (without transformation) was approximately 10%. The nature of the transgenic plants was confirmed by PCR.

The results indicate that inoculation of wheat seedlings by *A. tumefaciens* strain GV 2260 with plasmid pCB002 is an effective method for obtaining of the transformation plants.

**СОЗДАНИЕ ВЕКТОРОВ, СОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ГЕН *codA* ИЗ *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS* ДЛЯ ИНТЕГРАЦИИ В ЯДЕРНЫЙ И ПЛАСТИДНЫЙ ГЕНОМ ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ**

**Гулевич А.А.<sup>1</sup>, Кунакова Е.А.<sup>2</sup>, Данилова С.А.<sup>2</sup>, Баранова Е.Н.<sup>1</sup>, Ралдугина Г.Н.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Москва, Тимирязевская, д. 42, тел. (499)977-09-47, факс: (499)977-09-47, e-mail: a\_gulevich@mail.ru

<sup>2</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Ботаническая ул., д. 35, тел. (499)231-83-44, факс (495)977-80-18, e-mail: galina ifr@fromru.com

Для оценки эффективности двух альтернативных стратегий адресной экспрессии и защитных функций бактериального гена, кодирующего ключевой фермент синтеза не характерного для растений семейства *Solanaceae* осмопротектанта глицин-бетаина – холиноксидазу произведен дизайн двух генно-инженерные конструкций.

Первая – на основе стандартного экспрессионного вектора pBI, применяемого в агробактериальной трансформации растений. T-область содержит целевой ген *codA* из почвенной бактерии *Arthrobacter globiformis*, кодирующий фермент холиноксидазу под контролем CaMV35S конститутивного вирусного промотора и NOS-терминатора. В данной конструкции ген *codA* будет трансляционно слит с сигнальной последовательностью из гена малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы томата, которая кодирует транзитный пептид, направляющей белковый продукт в хлоропласт. Кроме того, в T-области находится придающий устойчивость к антибиотику канамицину маркерный ген *nptII* под контролем NOS-промотора и NOS-терминатора. Данный вектор предназначен для трансформации ядер в растительных клетках.

Вторая конструкция на основе плазмиды pKMS8 (предоставленная P.Maliga, США) предназначена для трансформации пластид в растительных клетках. Эта конструкция содержит целевой ген *codA* под контролем хлоропластных промотора и терминатора, а также придающий устойчивость к антибиотику спектиномицину маркерный ген *aadA* под контролем хлоропластного гибридного Prrn/clpP промотора и терминатора большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (*rbcL*).

В дальнейшем планируется проведение агробактериальной трансформация табака сорта *Petit Havana* и трансформация хлоропластов в клетках табака посредством биолистического метода.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-08-01323-а.

**CREATION OF EXPRESSION CASSETTES CONTAINING THE BACTERIAL GENE  
codA OF *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS* FOR INTEGRATION INTO THE  
NUCLEAR AND PLASTID GENOME OF DICOTYLEDONOUS PLANTS**

**Gulevich A.A.<sup>1</sup>, Kunakova E.A.<sup>2</sup>, Danilova S.A.<sup>2</sup>, Baranova E.N.<sup>1</sup>, Raldugina G.N.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Timiryasevskaya str., 42, tel. (499)977-09-47, fax (499)977-09-47, e-mail: a\_gulevich@mail.ru

<sup>2</sup>K.A. Timiryasev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Science, Botanicheskaya str., 35, tel. (499)231-83-44, fax: (495) 977-80-18, e-mail: galina ifr@fromru.com

To evaluate the efficiency of two alternative strategies of the targeted expression and the protective functions of the bacterial gene the design of two genetic constructs was performed. The gene of interest encodes the choline oxidase, that a key enzyme in the synthesis of osmoprotectant glycine betaine is that is not characteristic for plants of Solanaceae.

First construct - based on a standard expression vector pBI, used in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. T-region contains a target gene codA from the soil bacterium *Arthrobacter globiformis* under control of the viral constitutive CaMV35S promoter and NOS-terminator. In this cassette a codA gene is translationally fused to the signal sequence of the small subunit ribulose biphosphate carboxylase gene of tomato which encodes a transit peptide targeting the protein product to the chloroplast. In addition, the T-region harbours also the resistance to antibiotic kanamycin that is conditioned by marker gene nptII under control of NOS-promoter and NOS-terminator. The vector is intended for transformation of plant cells nuclei.

The second construct based on pKMS8 plasmid (provided P.Maliga, USA) is intended for plastid transformation in plant cells. This vector comprises a target gene codA under the control of chloroplast promoter and terminator, and contains also aadA marker gene conferring the resistance to the antibiotic spectinomycin under the control of chloroplast hybrid Prm/clpP promoter and terminator from the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase gene (rbcL).

In the future we plan to perform *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco variety Petit Havana and chloroplast transformation in tobacco cells by the biolistic method.

This work was supported by RFBR grant 13-08-01323-a.

**ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ.****Данилова С.А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; 127276, г. Москва ул. Ботаническая, д. 35, тел.: (495) 2318334, факс: (495) 9778018, e-mail: svdan@yandex.ru

Развитие генетической инженерии растений позволяет изменять геном растений за счет переноса в них «полезных» генов чтобы получать растения нового поколения. Особое место в трансгенной инженерии растений занимают транспластные растения. Хлоропласты, имеют собственный геном и являются обязательным компонентом растительной клетки. Технология экспрессии генов хлоропластов основывается на способности этих клеточных органелл эффективно синтезировать и накапливать белки. Эта технология позволяет получать различные белки в больших количествах при меньших затратах, что чрезвычайно важно для коммерческого использования. Кроме того, генетическая информация передается от пластид главным образом по материнской линии, что практически исключает перенос при помощи пыльцы любых генов, введенных в хлоропласты. Поэтому, использование таких растений приносит наименьший вред окружающей среде, и они являются экологически более безопасными.

Хлоропласты имеют собственный генетический аппарат и белоксинтезирующую систему и способны делиться внутри клетки. В отличие от линейных молекул ДНК в хромосомах ядра, хлоропластная ДНК представляет собой замкнутую кольцевую молекулу. Ее размеры варьируют у разных видов растений большей частью в интервале от 130 до 160 тыс. пар оснований. Наиболее широко используемый метод введения ДНК в хлоропластный геном растительной клетки это бомбардировка микрочастицами, или био-баллистика. В нашей работе используется пушка Biolistic PDS-1000/He фирмы Bio-RAD (USA). Метод бомбардировки микрочастицами позволяет трансформировать растения самых разных видов. Однако, у нас к настоящему времени эффективная технология трансформации пластид отработана на растениях табака. Техника получения геномных и транспластомных трансформированных растений значительно различается. Отличие касается не только применяемых векторов, методов трансформации, но и отбора стабильных трансформантов.

Большие перспективы пластидной трансформации растений побуждают к поискам новых методических подходов и расширению круга объектов для трансформации хлоропластов. Трансплантомные растения перспективны как для фундаментальной науки, так и для коммерческой биотехнологии.

Работа частично поддержана грантом РФФИ 13-08-01323/13

**PRODUCING OF TRANSPLASTOMIC PLANTS.****Danilova S.A.**

Federal State Institution of Science KA Timirjazev Institute of Plant Physiology, 127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35, tel.: (495) 2318334, fax: (495) 9778018, e-mail: svdan@yandex.ru

The development of plant genetic engineering allows to modify the genome of plants by transfer of "useful" genes to produce plants of new generation. A transplastomic plants attract a particular attention in plant genetic transformation. The plastids (chloroplasts) have their own genome and are an obligatory compartment of the plant cell. Technology of transgene expression in chloroplasts is based on the ability of these organelles to effectively synthesize and accumulate proteins. This technology permits to receive a variety of proteins in large quantities at a lower cost, which is extremely important for commercial use. [1] In addition, the genetic information is transferred from the plastid mainly through the maternal line, which virtually eliminates the transfer of pollen by any genes introduced into chloroplasts. Therefore, the use of such plants brings less injury to the environment, and they are environmentally safer.

Chloroplasts have their own genetic machinery and protein synthesis system and are able to divide within the cell. Unlike linear DNA molecules in nuclear chromosomes the chloroplast DNA is a closed circular molecule. Its size varies for different plant species predominantly in the range of from 130 to 160 thousands base pairs. The most widely used method of introducing DNA into the chloroplast genome of a plant cell is a microprojectile bombardment, or bio-ballistics. In our experiments, we use the gun Biolistic PDS-1000/He of Bio-RAD (USA). Microprojectile bombardment method allows transforming many different species of plants. However, to date, an effective technology for transforming plastids was performed on tobacco plants. Technique for obtaining genomic and transplastomic transformed plants varies considerably. The difference does not consist in used vectors and methods of transformation only, but in the selection of stable transformants.

Great prospects of plastid transformation of plants prompt to the search for new methodological approaches and the expanding of the range of facilities for chloroplast transformation. Transplastomic plants are promising for both fundamental science and practical biotechnology.

This work was partially supported by the RFBR 13-08-01323/13.



## ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ СПЛАЙСИРОВАННЫХ ФОРМ ГЕНА *VaCDPK3a* НА РОСТ И МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ВИНОГРАДА АМУРСКОГО *VITIS AMURENSIS* RUPR.

Дубровина А.С.<sup>1</sup>, Шумакова О.А.<sup>1,2</sup>, Христенко В.С.<sup>1,2</sup>, Киселев К.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, 690022, пр. Столетия Владивостоку, 159, факс: (423) 231-01-93, (423) 231-07-18, e-mail: [dubrovina@biosoil.ru](mailto:dubrovina@biosoil.ru)

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690090, ул. Октябрьская, 27, факс: (423) 243-23-15, (423) 245-76-87

Недавние исследования показали, что альтернативный сплайсинг пре-мРНК растений – это намного более распространенное и важное явление, чем считалось ранее. Установлено, что ~42-61% интрон-содержащих генов арабидопсиса подвергаются альтернативному сплайсингу, что во многих случаях вносит значительный вклад в способность растений своевременно отвечать на различные стрессовые условия или сигналы к развитию. В литературе не представлена информация о распространенности альтернативного сплайсинга для генов протеинкиназ растений, а также том, как альтернативный сплайсинг регулирует активность и функции этих ферментов.

В настоящем исследовании нами были детектированы необычные последовательности мРНК транскриптов гена  $Ca^{2+}$ -зависимой протеинкиназы *VaCDPK3a* в каллусных культурах клеток и растениях винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. В последовательностях этих транскриптов отсутствовали обширные участки киназного, автоингибиторного и/или  $Ca^{2+}$ -связывающего доменов. С помощью ОТ-ПЦР и секвенирования нами были получены и проанализированы полные белок-кодирующие последовательности необычных транскриптов *VaCDPK3a*. В полученных последовательностях отсутствовали обширные участки, вследствие чего в большинстве случаев изменялась рамка считывания и появлялись преждевременные стоп-кодоны. При выведении аминокислотных последовательностей оказалось, что соответствующие белки содержат только N-терминальный вариабельный домен и часть киназного домена (*VaCDPK3aSF1*), только N-терминальный вариабельный домен и полную последовательность киназного домена (*VaCDPK3aSF2*), или содержат все домены, кроме автоингибиторного (*VaCDPK3aSF3*). Мы предположили, что обнаруженные необычные транскрипты гена *CDPK3a* из *V. amurensis* подвергались альтернативному сплайсингу, либо другим необычным посттранскрипционным модификациям.

Для изучения функциональной роли и свойств коротких белков *VaCDPK3aSF1*, *VaCDPK3aSF2* и *VaCDPK3aSF3* нами была поставлена задача получить каллусные культуры *V. amurensis*, сверхэкспрессирующие полные последовательности кДНК транскриптов *VaCDPK3aSF1*, *VaCDPK3aSF2* и *VaCDPK3aSF3*. Последовательности кДНК были перенесены в бинарные вектора для агробактериальной трансформации под контроль двойного *CaMV35S* промотора. Проведено семь попыток агробактериальной трансформации. В течение первых двух месяцев селекции в присутствии селективного маркера наблюдался активный рост трансгенных клеточных агрегатов, однако на второй месяц культивирования наблюдалось резкое ингибирование пролиферации трансгенных клеток, что впоследствии приводило к гибели клеток. Только после семи повторов трансформации нами были получены трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие целевые последовательности. Полученные линии активно аккумулировали биомассу и представляли собой рыхлую активно растущую гомогенную каллусную ткань, не проявляющую тенденции к дифференциации. В настоящее время нами проводится изучение устойчивости полученных трансгенных клеточных линий к абиотическому стрессу, а также определение содержания биологически активных веществ полифенольной природы.

**THE EFFECT OF *VACDPK3A* SPLICE VARIANT OVEREXPRESSION ON THE GROWTH AND MORPHOLOGY OF *VITIS AMURENSIS* CELL CULTURES.****Dubrovina A.S.<sup>1</sup>, Shumakova O.A.<sup>1,2</sup>, Khristenko V.S.<sup>1,2</sup>,  
Kiselev K.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022, Stoletiya str., 159, fax: (423) 231-01-93, (423) 231-07-18, e-mail: [dubrovina@biosoil.ru](mailto:dubrovina@biosoil.ru)

<sup>2</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690090, Oktyabrskaya str., 27, факс: (423) 243-23-15, (423) 245-76-87.

Recent genome-wide studies have demonstrated that alternative splicing in plants is far more prevalent and important than previously thought and contributes to the high transcriptome and proteome complexity. It has been shown that ~42-61% of intron-containing genes in *Arabidopsis* are alternatively spliced. It becomes clear that alternative splicing contributes to plant responsiveness to various stress and developmental signals. While it is well established that alternative splicing significantly impacts on the expression of protein kinases in mammals and changes their functions, little is known how alternative splicing regulates activities and functions of plant protein kinases, which are known to be the key regulators of plant signal transduction.

In the present study, we detected unusual mRNA transcripts of the Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase gene *VaCDPK3a* in callus cultures and vines of *Vitis amurensis* Rupr. The *VaCDPK3a* transcripts lacked extensive sequences in the kinase, autoinhibitory, and/or Ca<sup>2+</sup>-binding domains. Using RT-PCR and DNA sequencing, we obtained and analyzed full-length protein-coding cDNA sequences of the unusual *VaCDPK3a* transcripts. The deletions have led to frameshifts and incorporation of in-frame premature stop-codons in most cases. The deduced amino acid sequences of the *VaCDPK3a* transcript variants contained only the N-terminal variable domain and a part of the kinase domain (*VaCDPK3aSF1*); the N-terminal variable domain and the full-length kinase domain (*VaCDPK3aSF2*); or all domains, except for the autoinhibitory domain (*VaCDPK3aSF3*). We proposed that the unusual *VaCDPK3a* transcripts resulted from an unusual posttranscriptional mRNA processing resembling alternative splicing.

In order to investigate the functions and properties of the short *VaCDPK3aSF1*, *VaCDPK3aSF2*, and *VaCDPK3aSF3* proteins, we aimed to establish callus cultures of *V. amurensis* overexpressing full-length cDNA sequences of the putative *VaCDPK3aSF1*, *VaCDPK3aSF2*, and *VaCDPK3aSF3* transcripts. The cDNA sequences have been transferred to a binary vector under the control of the double CaMV35S promoter for the following *Agrobacterium*-mediated transformation of *V. amurensis*. Seven transformation experiments have been conducted. Unexpectedly, selection of the transformed *V. amurensis* calli for two months after transformation in the presence of the selective marker resulted in an abrupt growth inhibition and cell death. Only after seven transformation experiments we were capable to establish transgenic cell cultures overexpressing the unusual *VaCDPK3a* transcript variants. The transformed calli actively accumulated cell biomass and exhibited friable homogenous phenotype without signs of cell differentiation. At present, we are analyzing abiotic stress tolerance of the transformed calli and the content of bioactive phenolic compounds in the calli.

## ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИУК И ВЫЯВЛЕНИЕ FZY-ГЕНОВ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Загорская А.А., Розов С.М., Дейнеко Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 10, тел. (383)363-49-26, факс (383)333-12-78, e-mail: zagorska@bionet.nsc.ru

Основной эндогенный ауксин – индол-3-уксусная кислота (ИУК) принимает участие практически во всех процессах роста и развития растений и относится к ключевым растительным гормонам. Однако биохимические пути биосинтеза ИУК и соответственно гены, контролирующие эти процессы, до сих пор изучены слабо. На сегодняшний день ничего не известно о генах, обеспечивающих биосинтез ауксина у такого важного модельного объекта, как табак (*Nicotiana tabacum* L.). Данную работу проводили в рамках изучения проблем функционирования трансгенов и собственных генов, затронутых инсерцией, с использованием двух линий *N. tabacum*: линии SR1 в качестве контроля и полученной на ее основе трансгенной линии IF4/11 с лонгостильным фенотипом. Известно, что изменение морфологии цветка может быть связано с нарушениями в соотношении фитогормонов, с их инактивацией, а также с нарушением их транспорта. В связи с этим представляло интерес провести анализ содержания ИУК в тканях цветков в процессе его формирования. Данный анализ выявил более низкое по сравнению с контролем содержание ауксина в цветках трансгенной линии с лонгостильным фенотипом на всех стадиях развития за исключением завершающей стадии XII. Формирование лонгостильного фенотипа происходило на стадиях развития с VIII по XII. Необходимо отметить, что именно на этих этапах наблюдалось возрастание содержания ИУК в тканях цветков растений линии IF4/11. В контрольной же линии SR1 динамика ИУК характеризовалась снижением концентрации, начиная со стадии I и до стадии XII.

Молекулярный механизм, регулирующий биосинтез ИУК у *N. tabacum* остается неизвестным. Поэтому мы предприняли попытку обнаружить гены, ортологичные FZY-генам томатов. Для выявления генов NtFZY-семейства использовали ПЦР-анализ экстрактов ДНК, выделенных из тканей цветков линий IF4/11 и SR1. С применением набора праймеров, комплементарных последовательностям генов ToFZY мультигенного семейства томатов, в геноме *N. tabacum* обнаружены четыре неизвестные ранее гена.

Обнаруженные нами NtFZY1–NtFZY4 гены являются первыми выявленными генами табака, принимающими участие в триптаминовом пути биосинтеза ауксина и кодирующими флавин-монооксигеназоподобные белки, функционирующие на начальных стадиях триптофанзависимого пути биосинтеза ауксина. Выявление данных генов у табака является перспективным с точки зрения расширения возможностей детального изучения триптаминового пути биосинтеза ИУК у растений.

Дальнейшее развитие работы предполагает сравнительное изучение уровня экспрессии NtFZY-генов у табака в линии SR1 и трансгенной линии IF4/11 с мутантным фенотипом методом ПЦР в реальном времени.

**THE STUDY OF THE DYNAMICS OF IAA AND IDENTIFY FZY-GENES IN  
TRANSGENIC TOBACCO PLANTS****Zagorskaya A.A., Rozov S.M., Deineko E.V.**

Federal State Institution of Science Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev av., 10, tel. (383) 363-49-26, fax (383) 333-12-78, e-mail: zagorska@bionet.nsc.ru

The key plant endogenous hormone indole-3-acetic acid (IAA) is involved in almost all processes of plant growth and development. However biochemical pathways of the IAA biosynthesis and genes controlling these processes are still poorly understood. Nothing is known about the genes that ensure auxin biosynthesis in such an important model system, as tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). This work was carried out within the studying of functioning of own plant genes and transgenes affected by the insertion using two lines of *N. tabacum*: line SR1 as control and transgenic line IF4/11 with longostily phenotype obtained on its basis. It is well known that modifying the flower morphology may be due to abnormalities in the ratio phytohormones, their inactivation, as well as disturbance of their transport. In this regard, it was of interest to analyze the IAA content in flower's tissues during the formation of the flower. This analysis revealed a lower auxin content in the flowers of the transgenic line with longostily phenotype at all developmental stages with the exception of the final stage XII as compared with the control line SR1. Formation of longostily phenotype occurred at the developmental stages from VIII to XII. It should be noted that it is during these phases observed increasing of the IAA content in flowers tissues of line IF4/11. Dynamics of IAA concentration in the control line SR1 in the course of flower formation was characterized by a decrease from the stage I to stage XII.

The molecular mechanism that regulates the IAA biosynthesis in *N. tabacum* is still unknown. Therefore, we attempted to detect tobacco genes orthologous to FZY-genes of tomatoes. For this purpose we used PCR analysis of DNA extracts isolated from tissue of flowers of lines IF4/11 and SR1. Using a set of primers complementary to gene sequences of ToFZY-multigene family of tomato four previously unknown genes were found.

Discovered NtFZY1-NtFZY4-genes are the first identified tobacco genes involved in the tryptamine pathway of auxin biosynthesis and encode flavin monooxygenase-like proteins functioning at the initial stages of the tryptophan biosynthetic pathway of auxin biosynthesis. The identification of these genes in tobacco is promising in terms of empowering a detailed study of the tryptamine IAA biosynthesis pathway in plants in general.

Further development of this study suggests comparative analysis of expression level of NtFZY-genes in tobacco lines SR1 and transgenic line IF4/11 with longostily phenotype using real-time PCR.

## ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ ПОДХОД К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ.

Ибрагимов С.М., Кочетов А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 10, факс: (383) 333-12-78, тел.: (383) 363-49-80, e-mail: [isola@bionet.nsc.ru](mailto:isola@bionet.nsc.ru)

Неблагоприятные факторы окружающей среды негативно влияют на рост и развитие растений, снижая их продуктивность. Засуха, низкие температуры и засоленность почв вызывают у растений осмотический стресс. В ответ на осмотический стресс растения накапливают низкомолекулярные органические соединения, получившие названия осмопротектантов или совместимых осмолитов. Аминокислота пролин - известный осмолит, играет важную роль в жизнедеятельности растения и как структурный компонент белков и как свободная аминокислота. Накопление пролина наблюдали у видов различной таксономической принадлежности в ответ на абиотический стресс. Модификация экспрессии генов метаболизма пролина с помощью современных методов генной инженерии является одним из перспективных направлений повышения стрессоустойчивости у растений.

Методом агробактериальной трансформации, получены трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L. сорт Havana Petit SR1) и картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Никулинский), несущие антисмысловой супрессор гена ПДГ (фрагмент гена пролиндегидрогеназы арабидопсиса, помещенный под управление 35S промотора вируса мозаики цветной капусты). Для получения трансгенных растений были использованы различные типы эксплантов: высежки листа табака и междоузлия картофеля. Уровень пролина у полученных трансгенных линий табака и картофеля в нестрессовых условиях превышал таковой у контрольных в 1.5-2 раза

Оценка полученных трансгенных линий картофеля в культуре *in vitro* на среде, содержащей стрессовые агенты: 180 мМ NaCl и 300 мМ маннитола, показала устойчивость трансгенных линий, по сравнению с контролем, в накоплении биомассы, в высоте растения и длине корней.

Проростки трансгенных линий табака культивируемые на средах содержащих повышенные концентрации NaCl (200- 300 мМ) и агара (14 г/л) также проявляли повышенную устойчивость, по сравнению с нетрансформированными контрольными растениями. В условиях солевого стресса (200 мМ) скорость роста корней проростков трансгенных линий табака была достоверно выше по сравнению с контролем. Дефицит влаги, имитированный повышенным содержанием агара в питательной среде, снижал скорость накопления биомассы проростка у контрольных растений по сравнению с растениями трансгенных линий.

Взрослые растения трансгенных линий табака, выращенные в горшочках с вермакулитно-перлитной смесью характеризовались повышенной устойчивостью к дефициту влаги и низким температурам (-2).

Таким образом, частичная супрессия гена ПДГ привела к увеличению уровня пролина у трансгенных растений табака и картофеля, и сопровождалась повышенной стрессоустойчивостью растений к таким факторам абиотического стресса как, засоление, засуха, пониженные температуры.

**GENETIC ENGINEERING FOR ABIOTIC STRESS RESISTANCE IN PLANTS****Ibragimova S. M., Kochetov A.V.**

The Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Branch of The Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Lavrentyev ave, 10, tel. +7(383) 363 49 80, fax: (383) 333-12-78, e-mail: [isola@bionet.nsc.ru](mailto:isola@bionet.nsc.ru)

Abiotic environment stress, such as drought, salinity, low temperatures, is a major limitation for plant growth and crop productivity. Accumulation of certain organic solutes (called osmoprotectants) is a common metabolic adaptation means found in different taxa. Proline accumulates in many plant species in response to environmental stress. It plays a role in cellular osmoregulation and exhibits many protective effects. The induction of proline accumulation in response to environmental stress suggests that overproduction of this one in agriculturally important crop by genetic engineering might increase overall environmental tolerance and enhance productivity.

We obtained transgenic tobacco and potato plants are bearing a fragment of arabidopsis proline dehydrogenase gene (PDH) in antisense orientation. For obtaining transgenic plants in tobacco and potato, different types of explants have been used: leaf explants for tobacco, while interstices in case of potato. Transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Havana Petit SR1) and potato plants (*Solanum tuberosum* L. cv. Nikulinsky) were developed via Agrobacterium mediated transformation. The usage of heterologous antisense suppressor resulted in mild increase in proline content in non-stressed transgenic plants. The higher proline level shown by transgenic plants was associated with better biomass production and growth performance under the stress conditions.

In vitro grown shoots of potato transgenic lines on MS medium supplemented with high concentration of NaCl (180 mM) showed enhanced tolerance to NaCl compared to control untransformed plants. Treatment with NaCl caused reduction in the shoot and root length in both transgenic and control plants. But transgenic potato lines at high salt concentration exhibited a significantly higher shoot and root length as compared with untransformed control plants. Mannitol (300 mM) under in vitro conditions reduces roots development and biomass production in control untransformed plants unlike transgenic lines.

The seedlings of transgenic tobacco lines cultured on MS medium supplemented with stress agents were resistant to high NaCl concentrations (200–300 mM) and water deficit simulated by increasing agar content in the medium (14 g/L) as compared to the control seedlings of cv. Havana Petit SR1. Mature plants of transgenic lines grown in pots also manifest the higher resistance to water deficit and low temperatures (2° C and –2° C) than the control (untransformed plants).

Thus, the partial PDH suppression leads to proline accumulation in plants and correlate with an increase in nonspecific resistance to different types of abiotic stress, including salinity, water deficit, and low temperatures.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ КЛЕТОК ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM L.*

Киняйкин В.И., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 10, тел. (383) 363-49-80, e-mail: kinyaykin@bionet.nsc.ru

Клеточные механизмы, обеспечивающие перемещение цитоплазмы и органелл, в том числе и таких крупных как ядро, между мейоцитами у растений при цитомиксисе, все еще остаются невыясненными. Вероятнее всего, что в этом процессе задействованы элементы цитоскелета, микротрубочки и микрофиламенты. Так как на основе результатов иммуно-флуоресцентного анализа тубулинового цитоскелета в мейозе растений табака с высоким уровнем цитомиксиса не выявлено каких-либо особенностей его динамики или организации, которые позволили бы связать их с межклеточными перемещениями ядер, логично предположить, что основную роль в миграции ядер при цитомиксисе играет актиновая часть цитоскелета растительной клетки.

В настоящее время для визуализации актинового цитоскелета у растений применяется метод окрашивания родамином-фаллоидином, однако этот метод не позволяет использовать живые растительные клетки. Для мечения актина в живых растительных клетках предложены другие подходы, основанные на применении гибридных флуоресцентных белков, слитых с актин-связывающими белками. Использование таких гибридных белков дает возможность выявить актиновую составляющую цитоскелета (радиальные и кортикальные пучки актиновых микрофибрилл, веретено деления) в различных типах растительных клеток.

Целью данной работы является сравнительная визуализация актинового цитоскелета в различных типах клеток трансгенных растений *Nicotiana tabacum* cv Petite Havana линии SR1 с использованием генетических конструкций GFP-ABD2-GFP и Lifeact-GFP. Конструкция GFP-ABD2-GFP включает актин-связывающий домен высоко консервативного белка фимбрин, выделенного из *Arabidopsis thaliana* и осуществляющего объединение одиночных актиновых микрофибрилл в пучки. Конструкция Lifeact-GFP включает актин-связывающий домен белка Abp140, выделенного из дрожжей.

В лаборатории биоинженерии растений получены трансгенные растения табака с вышеперечисленными типами генетических конструкций. Проведен сравнительный анализ степени визуализации актинового цитоскелета в различных типах клеток (микроспороциты, трихомы, клетки эпидермиса листа, корневые волоски и пыльцевые трубки). Несмотря на то, что во всех типах используемых генетических конструкций в качестве регуляторного элемента был включен конститутивный 35S-промотор, актиновый цитоскелет (радиальный и кортикальный) хорошо визуализовался только в трихомах и клетках эпидермиса листа. В остальных типах клеток (микроспороциты, корневые волоски и пыльцевые трубки) актиновый цитоскелет нами не выявлен. Однако особый интерес для нас представляла визуализация актинового цитоскелета в мейоцитах табака при цитомиксисе.

Для этих целей в конструкциях GFP-ABD2-GFP и Lifeact-GFP планируется замена конститутивного 35S-промотора на тканеспецифичный. В качестве тканеспецифичных промоторов, экспрессирующихся в мейоцитах, будут использованы pZm13 и pAtDMC1, являющиеся промоторами генов белков микроспорогенеза. Белок Zm13 выявлен среди специфических белков микроспорогенеза у кукурузы. Белок DMC1 является мейоз-специфичным белком рекомбинации и репарации ДНК. Созданные конструкции, включающие тканеспецифичные промоторы, будут использованы для создания трансгенных растений *Nicotiana tabacum L* cv. Petite Havana SR1 с целью визуализации актинового цитоскелета в мейоцитах табака при цитомиксисе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-01192-а.

**COMPARATIVE ACTIN CYTOSKELETON VISUALIZATION IN VARIOUS CELL TYPES OF TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM* L.****Kinajikin V.I., Sidorchuk Yu.V., Deineko E.V.**

Institute of cytology and genetics The Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences  
Russian Federation, 630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva, 10, tel. (383) 363-49-80,  
e-mail: kinayakin@bionet.nsc.ru

Cellular mechanisms of the cytoplasm and organelles movement, including such big as the nucleus, between meiocytes cytomixis in plants, are still unclarified. Most probably, this process involved elements of the cytoskeleton, microtubules and microfilaments. According to results of immuno-fluorescence analysis, tubulin cytoskeleton doesn't reveal any features of its dynamics or organization that would link them to the intracellular movement of the nuclei. Under that logic we assume, that the main role in the migration of the nuclei during cytomixis is played by actin cytoskeleton.

Staining with rhodamine-phalloidin is now used for actin cytoskeleton visualization in plants, but this method is not applicable to live plant cells. For labeling of actin in living plant cells, is proposed another approach based on the use of hybrid fluorescent protein fused to the actin-binding proteins. Using of such fused proteins permits to reveal the actin cytoskeleton components (radial and cortical actin bundles of microfibrils division spindle) in different types of plant cells.

The aim of this work is the comparative visualization of the actin cytoskeleton in various cell types of transgenic plants *Nicotiana tabacum* cv Petite Havana line SR1 using genetic constructs GFP-ABD2-GFP and Lifeact-GFP. The design of GFP-ABD2-GFP involves actin-binding domain of highly conserved protein fimbrin, isolated from *Arabidopsis thaliana* that merge single actin microfibrils in bunches. Lifeact-GFP construction includes actin-binding domain of the Abp140 protein, isolated from yeast.

In the laboratory of plant bioengineering number of transgenic tobacco plants with types of genetic constructs listed above was obtained. A comparative analysis of visualization level of the actin cytoskeleton was performed in various cell types (microsporocytes, trichomes, leaf epidermal cells, root hairs and pollen tubes). Despite the fact that in all types of genetic constructs constitutive 35S-promoter was included as a regulatory element, actin cytoskeleton (radial and cortical) is well visualized only in trichomes and leaf epidermal cells. In other cell types (microsporocytes, root hairs and pollen tubes), the actin cytoskeleton was not detected by us. However, visualization of actin cytoskeleton in tobacco meiocytes during cytomixis is of special interest.

For these purposes, it is planned to replace constitutive 35S-tissue-specific promoter in GFP-ABD2-GFP and Lifeact-GFP constructions. Promoters of microsporogenesis genes pZm13 and pAtDMC1 will be used, as a tissue-specific promoters expressed in meiocytes. Zm13 protein was found among specific microsporogenesis proteins in maize. DMC1 protein is a meiosis-specific protein of recombination and DNA repair. Constructs obtained, including tissue-specific promoters, will be used to create transgenic plants *Nicotiana tabacum* L cv. Petite Havana SR1 to visualize the actin cytoskeleton in tobacco meiocytes during cytomixis.

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 11-04-01192-a).



**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА Lac ИЗ ГРИБА *TRAMETES HIRSUTA* В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ОСИНЫ**

**Ковалицкая Ю.А.<sup>1,2</sup>, Филлипов М.В.<sup>1,2</sup>, Васина Д.В.<sup>2,3</sup>, Даянова Л.К.<sup>1,2</sup>, Логинов Д.С.<sup>2,3</sup>, Королева О.В.<sup>2,3</sup>, Шестибратов К.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Филиал ФГБУН института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, д. 6, тел. / факс: 8(4967) 33-09-66, e-mail: kovalitskaya@inbox.ru

<sup>2</sup>Пушинский государственный естественно-научный институт, 142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, д. 3, тел. / факс: (4967) 73-26-77, 73-18-57, 73-27-11.

<sup>3</sup>ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, г. Москва, Ленинский пр., д. 33, стр. 2, тел. / факс: (495) 954-5283/(495)-954-2732.

Лигнификация растений – сложный процесс, в регуляции которого участвует множество генов. Если основные гены, управляющие биосинтезом лигнина известны, то о регуляции этого процесса известно очень мало. Считается, что в процессе полимеризации монолигнолов при образовании лигнина участвуют не только ферменты лигазы, редуктазы, дегидрогеназы, но и пероксидазы и лакказы. Однако однозначного мнения, о том, какой из этих ферментов, играет главную роль в лигнификации растений, пока нет.

Известно, что наиболее эффективными деструкторами лигнина являются грибы белой гнили, обладающие уникальным ферментным комплексом, ключевое место в котором отводится лакказам.

Целью данной работы являлось получение трансгенных растений осины, содержащих ген высоко редокс потенциальной лакказы из гриба *Trametes hirsuta*.

На основе вектора рВИ нами была создана конструкция, содержащая ген лакказы из гриба *T. hirsuta* под контролем 35S промотора и нопаинсинтетазного терминатора nos. В качестве селективного гена был использован ген устойчивости к канамицину - nptII. Полученный плазмидный вектор рВИ-Lac был перенесен в *Agrobacterium tumefaciens* (штамм СВЕ21). Для трансформации осины (*Populus tremula*) использовали междоузлия растений, полученных в условиях *in vitro*. Селекцию трансгенных тканей проводили на питательных средах с содержанием канамицина 30 мг/л. Из всех полученных линий была выделена геномная ДНК и проанализирована методом ПЦР-анализа на присутствие селективного гена nptII и целевого гена Lac. Чтобы подтвердить отсутствие агробактериальной контаминации в анализируемом растительном материале, ДНК всех линий одновременно анализировалась на наличие агробактериального гена VirB. Проведенный ПЦР-анализ подтвердил трансгенный статус 33 линий из 52 проанализированных.

Исследование активности рекомбинантной лакказы в растительном материале *in vitro* трансгенных линий осины показало увеличение активности фермента в 4 клонах в 2 раза по сравнению с контролем, в 10 клонах от 50 до 80%, в остальных клонах активность фермента была на уровне контроля или ниже. В растениях с высокими показателями активности лакказы экспрессия рекомбинантного белка подтверждена методом Вестерн-блота. Оценка активности лакказы в листьях тепличных растений показала снижение общей активности фермента по сравнению с показателями *in vitro*, но в высокопродуктивных клонах эти показатели также были выше контрольных. Измерение высоты растений с повышенной активностью рекомбинантной лакказы показало достоверное снижение высоты по сравнению с контролем, на 40-60%, кроме растений генотипа PtXVIIIac24, высота растений которого была сравнима с контрольными показателями. На данный момент растения, трансформированные геном Lac, находятся на стадии вегетации в условиях защищенного грунта. По результатам дальнейшего анализа химического состава древесины можно будет судить о влиянии рекомбинантной лакказы на процесс лигнификации растений. Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП №14.В37.21.1915 и стипендии президента РФ 2013-2015.

**THE EXPRESSION OF Lac GENE FROM THE FUNGUS *TRAMETES HIRSUTA* IN ASPEN TRANSGENIC PLANTS****Kovalitskaya Yu.A.<sup>1,2</sup>, Filippov M.V.<sup>1,2</sup>, Vasina D.V.<sup>2,3</sup>, Dayanova L.K.<sup>1,2</sup>, Loginov D.S.<sup>2,3</sup>, Koroleva O.V.<sup>2,3</sup>, Shestibratov K.A.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, 142290, Moscow region, Pushchino, Science avenue, 6, tel / fax: 8 (4967) 33-09-66, kovalitskaya@inbox.ru

<sup>2</sup>Pushchino State Naturally and Research Institute, 142290, Moscow region, Pushchino, Science av., 3. tel / fax: (4967) 73-26-77, 73-18-57, 73-27-11.

<sup>3</sup>Institute of Biochemistry, RAS, 119071, Moscow, Lenin Prospect, 33, building 2, tel / fax: (495) 954-5283 / (495) -954-2732.

Lignification of plants is a complex process, which regulated by many genes. The major of genes controlling the biosynthesis of lignin are known, but the regulation of this process is very little investigated. It is believed that in process of monolignol polymerization to formation of lignin are involved not only the enzymes ligase, reductase, dehydrogenase, but peroxidase and laccase. Until the present, it is not a clear opinion about which of these enzymes plays a major role in the plant lignification.

It is known that the most effective lignin destructors are white-rot fungi, which have a unique enzyme complex, the key place where play laccase.

The aim of this work was to obtain transgenic aspen containing gene highly redox potential laccase from the fungus *Trametes hirsuta*.

On the basis of the vector pBI we created construct containing laccase gene from the fungus *T. hirsuta* under the control of the 35S promoter and nopalinsintetase terminator nos. As the selection gene was used kanamycin resistance gene - nptII. The resulting plasmid vector pBI-Lac was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* (strain CBE21). For the transformation was used internode in vitro plants (*Populus tremula*). Selection of transgenic tissue was performed on nutrient media containing kanamycin 30 mg / l. Genomic DNA from all transgenic lines was isolated and analyzed by PCR for the presence of nptII selection gene and the target gene Lac. To confirm the absence of *Agrobacterium* contamination in the analyzed plant material, the DNA of all lines simultaneously analyzed for the presence of agrobacterial gene VirB. PCR analysis confirmed tetra-transgenic status of the transgenic lines, 33 of the 52 analyzed.

Investigation of the activity of the recombinant laccase in the plant material in vitro transgenic aspens showed increased activity of the enzyme in the four clones in the 2-fold compared with the control, 10 clones from 50 to 80%, in other clones of the enzyme activity was at the level of control or lower. In plants with high levels of activity of laccase expression of recombinant protein was confirmed by Western blot. Evaluation of activity of laccase in the leaves of greenhouse plants showed a decrease in the total activity of the enzyme as compared with in vitro, but in high-clones, these figures were higher than the control.

Measurement of plant height with increased activity of the recombinant Lacase showed significant reduction in height compared to the control, by 40-60%, except for one plant genotype, PtXVIIIac24, plant height which was comparable with controls.

At the moment the plants transformed with the gene Lac, are in the process of vegetation in a greenhouse. According to the results of further analysis of the chemical composition of the wood will be judged on the effect of recombinant laccase on lignification process in plants.

This work was supported by grant from the Federal Program № 14.B37.21.1915 and Presidential Scholarship 2013-2015.

**AGROBACTERIUM-ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ  
ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) IN PLANTA, С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА LBA4404, НЕСУЩЕГО pBi2E С  
ДВУХЦЕПОЧНЫМ РНК-СУПРЕССОРОМ ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Сергеева Л.Е, Тищенко Е.Н.**

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Украина, 03022, г. Киев,  
ул. Васильковская, д. 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com

Перспективной методологией повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам является генетическая инженерия, одно из направлений которой связано с манипуляциями генами, контролирующими метаболизм L-пролина (Pro). В частности, представляет интерес ген катаболизма Pro – пролиндегидрогеназа (ProDH). Частичная супрессия этого гена может приводить к увеличению содержания пролина и повышению уровня стресс-устойчивости растений.

При разработке системы методов генетической трансформации подсолнечника внимание исследователей главным образом сконцентрировано на Agrobacterium-опосредованной трансформации как направлении молекулярной биотехнологии, при котором наиболее часто наблюдается стабильная экспрессия трансгенов.

Анализ результатов генетической трансформации ряда видов однодольных и двудольных растений показал, что трудоёмкие и экономически затратные процедуры культивирования *in vitro* можно заменять, применяя метод Agrobacterium-опосредованной трансформации растений *in planta*. Особую актуальность это направление имеет для подсолнечника в связи с проблемами, связанными с преждевременным цветением и укоренением побегов *in vitro*.

При разработке способа Agrobacterium-опосредованной трансформации подсолнечника *in planta* использовали инбредные линии подсолнечника 96А/3, 16А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института, УААН), VK-121 (селекции Института масличных культур НААН Украины). Agrobacterium-опосредованную трансформацию проводили штаммом LBA4404, содержащим бинарный вектор pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, полученным на основе гена арабидопсиса ProDH1, а также селективный ген неомицинфосфотрансферазы (*nptII*) *E. coli*. Векторная конструкция любезно предоставлена к.б.н. Кочетовым А.В. (Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск).

При оптимизации условий генетической трансформации анализировали эффективность использования различных сред инокуляции, способов нанесения суспензии агробактериальных клеток на рыльце пестика в период опыления и их концентраций. При этом корзинки изолировали до полного созревания семян.

Наличие T-ДНК оценивали по первому экзону гена ProDH. Показана генотипическая зависимость частоты интеграции трансгена в геном подсолнечника. Получено семенное поколение трансформированных T0-растений (T1 и T2), которое по морфологическим показателям не отличалось от контроля. Около 80% растений T2-поколения содержали ген интереса.

Трансформанты T1 испытывали в условиях моделированного водного стресса. Растения отличались повышенным уровнем устойчивости, на фоне увеличения количества свободного пролина.

**AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION IN PLANTA OF  
SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) USING LBA4404 HARBORING pBi2E  
WITH DOUBLE SEQUENCES RNA-SUPPRESSOR OF GENE ProDH.**

**Komisarenko A.G., Mykhalskaya S.I., Sergeeva L.E., Tishchenko E.N.**

Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv,  
e-mail: oltyko@gmail.com

Genetic engineering is advanced method of the elevation of plant abiotic stress tolerance. One trend is related to procedures with genes connected with L-proline metabolism. The gene of the L-proline catabolism (proline dehydrogenase, ProDH) is the object of particular interest. This gene part suppression ought to enhance plant proline level and stress tolerance.

Agrobacterium-mediated transformation of sunflower attracts attention due to the fact that demonstrated the maximum frequency of stable expression of transgenes.

The results of the genetic transformation of various monocotyledon and dicotyledons exhibited expensive and complicated components of in vitro cultivation. The premature flowering and rhizogenesis problems of sunflower are the key difficulties of sunflower in vitro culture. In planta sunflower Agrobacterium-mediated transformation challenges these obstacles.

Inbred lines of sunflower 96A/3, 16A/3 (Odessa Institute of Selection and Genetics NAAS) and VK -121 (Institute of Oil Cultures NAAS) were used for Agrobacterium-mediated transformation. The transformation procedure was created by LBA4404 harboring pBi2E with double sequences RNA-suppressor of gene ProDH and gene npt II *E.coli*. Vector construction kindly was given by Kochetov A.V. (Institute of Cytology and Genetics RAS, Novosibirsk).

The improvement of transformation conditions were estimated via: effectiveness of various inoculation media; concentration of cell suspension, alterations of agrobacterial cell suspension inoculation into pistil stigma during fertilization. The heads were isolated before seed ripening.

The integration of T-DNA were detected using the first exon of arabidopsis ProDH gene. The genotype-dependent frequency of genetic transformed T0-plants were obtained. T1 and T2 plants contained the transgene.

T1- plants were tested under simulating water stress (lethal dose of mannitol). These plants had the higher level of stress resistance which combined with elevation of free proline content.

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И НАКОПЛЕНИЕ  $\text{Na}^+$  И  $\text{K}^+$   
ТРАНСГЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ КАРТОФЕЛЯ, НЕСУЩИМИ ГЕН  $\text{HvNHX2}$ ,  
НА ФОНЕ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ  $\text{NaCl}$   
Кривошеева А.Б.<sup>1</sup>, Юрьева Н.О.<sup>1</sup>, Беляев Д.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35; тел.: (495) 2318334, факс: (495) 9778018, e-mail: Positive.Melody@mail.ru (Кривошеевой А.Б.)

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

Исследование засоления почв приобретает все большее значение в сельском хозяйстве, поскольку засоление негативно влияет на рост и развитие сельскохозяйственных культур, приводя к потере урожая. Устойчивость растений к засолению зависит главным образом от способности регулировать ионный транспорт через мембрану для поддержания оптимального ионного состава в цитозоле и внутриклеточных компартментах, а также для поддержания водного потенциала клеток растений при солевом стрессе.

В настоящей работе изучали влияние экспрессии гена  $\text{HvNHX2}$  вакуолярного  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+/\text{H}^+$  антипортера ячменя в трансгенных растениях картофеля на их устойчивость к засолению. Пять независимых трансгенных линий культивировали в колбах (300мл) со средой, содержащей 150 мМ  $\text{NaCl}$  в течение трех недель, затем определяли сырую и сухую массу листьев, стеблей и корней, а также содержание  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  в этих органах.

Анализ экспериментальных данных показал, что сырая масса листьев и стеблей трансгенных линий не изменились под действием 150 мМ  $\text{NaCl}$ , в то же время повышенное содержание  $\text{NaCl}$  существенно снизило эти параметры у контрольных нетрансформированных растений. В случае присутствия в среде 150 мМ  $\text{NaCl}$  содержание  $\text{K}^+$  в побегах и корнях всех трансгенных линий существенно увеличилось по сравнению с нетрансформированными растениями, при этом наибольшее накопление  $\text{K}^+$  наблюдали в стеблях растений. У трех трансгенных линий, выращенных в присутствии соли, отмечали повышенный уровень  $\text{Na}^+$  по сравнению с контрольными растениями, у двух других линий наблюдался противоположный эффект. При росте на среде с 150 мМ  $\text{NaCl}$  все трансгенные линии были более обводнены.

Это исследование показало, что устойчивость трансгенных растений к засолению не обязательно сопровождается повышенным содержанием  $\text{Na}^+$ . В то же время во всех исследованных линиях, экспрессирующих  $\text{HvNHX2}$ , было выше накопление  $\text{K}^+$  по сравнению с нетрансформированными растениями.

**GROWTH PARAMETERS AND ACCUMULATION OF Na<sup>+</sup> AND K<sup>+</sup> IN TRANSGENIC POTATO PLANTS EXPRESSING THE HVNHX2 GENE UNDER SALT STRESS****Krivosheeva A. B.<sup>1</sup>, Yur'eva N. O.<sup>1</sup>, Belyaev D. V.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35, e-mail: Positive.Melody@mail.ru (Krivosheeva A. B.)

<sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, 141700, Dolgoprudny

Studies on soil salinity are gaining importance in agriculture because salinity has negative effects on growth and development of crops resulting in yield loss. Salinity tolerance of plants depends primarily on the regulation of ions transport across cellular membranes for maintenance of optimal ion composition of cytosol and intracellular compartments, as well as for maintenance of the water potential of plant cells under salt stress.

In the present work salinity tolerance of transgenic potato plants expressing HvNHX2, a vacuolar Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from barley, was studied. Five independent transgenic lines were cultured for 3 weeks in flasks (300 ml) with medium containing 150 mM NaCl. The plantlet leaves', stems' and roots' fresh and dry weights and the tissue contents of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> were determined.

The plantlet leaves' and stems' fresh weights of the transgenic lines were not affected by 150 mM NaCl, while the salt stress significantly reduced these parameters of control wild type plants. When the medium contained 150 mM NaCl, the K<sup>+</sup> content of stems and roots of all transgenic lines increased significantly in comparison with control plants and was highest in plantlet stems. Three transgenic lines grown in the presence of salt accumulated elevated levels of Na<sup>+</sup> in shoots as compared with control plants, but two lines demonstrated the opposite effect. When grown on medium containing 150 mM NaCl the transgenic lines had higher water content.

This study demonstrated that salt tolerance of transgenic plants was not necessarily accompanied by the increase of their Na<sup>+</sup> content, but the plants K<sup>+</sup> content was higher than in wildtype plants.

**ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ ПРИ ПОМОЩИ  
*AGROBACTERIUM RHIZOGENES* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОЧАСТИЦ  
КАРБИДА КРЕМНИЯ  
Кулчев Б.Р., Князев А.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, Уфа, проспект Октября, д. 71, факс: (347) 2356100, тел. (347) 2356088, e-mail: kuluev@bk.ru.

Получение трансгенных древесных растений с увеличенным размером ствола является одной из актуальных направлений современной лесной биотехнологии. Однако перечень известных генов, которые могут быть применены для этих целей, пока весьма скуден. В связи с этим существует необходимость в поиске новых генов, участвующих в регуляции роста деревьев и получении на их основе трансгенных растений с повышенным или пониженным уровнем экспрессии целевого гена. Из древесных растений одним из первых геном полностью был секвенирован у тополя *Populus trichocarpa*, что позволяет изучать функции любых его генов путем получения трансгенных растений. В то же время из представителей рода *Populus* наиболее легко поддающейся агробактериальной трансформации и наименее требовательной к составу регенерационной среды является осина (*Populus tremula* L.). Исходя из этого, с целью получения трансгенных древесных растений с увеличенными размерами органов, нами на среде WPM (woody plant medium) из весенних побегов была получена культура *in vitro* осины. Из генома тополя черного (*Populus nigra* L.) были выделены гены, кодирующие транскрипционные факторы подкласса AP2 (PnANTL1 и PnANTL2) и экспансины (PnEXPA1 и PnEXPA3). Кроме того, из генома тополя черного нами было впервые выделен гомолог гена ARGOS, которому было дано название PnARGOS-like (JQ955606). Целевые гены были амплифицированы при помощи полимераз с редактирующей активностью и клонированы в бинарном векторе pCambia 1301 под контролем 35S промотора. Полученные генно-инженерные конструкции были внедрены в электрокомпетентные клетки *Agrobacterium rhizogenes* штаммов 15834 и A4. Культуры *in vitro* осины выращивали на среде WPM с 2% гелеритом без добавления фитогормонов. Для проведения агробактериальной трансформации части стеблей осины с удаленными листьями с одной почкой предварительно культивировали двое суток на среде для каллусообразования (среда MS с MES и агаром, с добавлением 2 мг/л НУК и 1 мг/л 2-изопентиладенаина). Для первого опыта была использована конструкция гена экспансина AtEXPA10 A. thaliana с 35S промотором. Культуру *A. rhizogenes* штамма 15834 центрифугировали и ресуспендировали в 3 мл среды MinA, добавляли раствор ацетосирингона до концентрации 50 мкМ и ставили на орбитальный шейкер качаться при 28°C на 1 час. Затем смешивали подготовленные экспланты с агробактериями и добавляли заранее подготовленную суспензию карбида кремния (до 1%). Полученную смесь встряхивали на вортексе и проводили дальнейшую инокуляцию в течение 30-ти минут на чашке со средой MinA. Затем промывали экспланты на фильтровальной бумаге и ставили их на совместное культивирование с агробактериями на среде для каллусообразования. После трех суток экспланты переносили на среду MS с 3% сахарозой, агаром с добавлением 250 мг/л цефотаксима и 250 мг/л карбенициллина и культивировали их в темноте при 25°C в течение 1.5 месяцев. Полученные в ходе эксперимента бородачатые корни осины проверяли на наличие экспрессии репортерного гена GUS. Окрашивающиеся в синий цвет корни отбирали и пересаживали на новую среду MS и культивировали их в климатической камеры Binder (Германия) при 25°C. Через 2.5 месяца на культуре бородачатых корней спонтанно начали появляться побеги. Гистохимический анализ показал наличие экспрессии в этих побегах репортерного гена GUS. Таким образом, нами при помощи *A. rhizogenes* были получены трансгенные растения осины, экспрессирующие ген AtEXPA10 A. thaliana. Были также получены бородачатые корни осины, сверхэкспрессирующие ген PnARGOS-like *Populus nigra* L.

**CREATION A TRANSGENIC PLANTS OF ASPEN WITH *ARGOBACTERIUM RHIZOGENES* USING MICROPARTICLES OF SILICON CARBIDE****Kuluev B.R., Knyazev A.V.**

Institute of biochemistry and genetics of Ufa scientific centre of RAS, 450054, Ufa, prospekt Oktyabrya, 71, fax (347)2356100, tel. (347)2356088, e-mail: kuluev@bk.ru

Creation of transgenic woody plants with the increased size of the trunk is one of the important directions of modern forest biotechnology. But the number of known genes that may be used for these purposes are still very poor. In this regard, there is a need to find new genes involved in the regulation of the growth of trees and their delivery through transgenic plants with an increased or reduced level of expression of the target gene. Of woody plants one of the first genome was completely sequenced in poplar *Populus trichocarpa*, which allows us to study the function of any of its genes by producing transgenic plants. At the same time, from the genus *Populus* most easily amenable to *Agrobacterium*-mediated transformation and the least demanding to the composition of the regeneration medium is aspen (*Populus tremula* L.). Therefore, in order to obtain transgenic plants with increased wood size of organs we on WPM from spring shoots was obtained culture in vitro of aspen. From the genome of black poplar (*Populus nigra* L.) have been isolated genes encoding transcription factors AP2 subfamily (PnANTL1 and PnANTL2) and expansins (PnEXPA1 and PnEXPA3). In addition, the genome of the black poplar we was first isolate homolog of the gene ARGOS, which was given the name PnARGOS-like (JQ955606). Target genes were amplified using the polymerase with proofreading activity and cloned into the binary vector pCambia 1301 under the control of 35S promoter. The obtained genetic engineering constructs were introduced into electrocompetent cells of *Agrobacterium rhizogenes* of strains A4 and 15834. in vitro cultures of aspen were grown on WPM with 2% gelrite without the addition of phytohormones. For *Agrobacterium*-mediated transformation of aspen a portion of the stems with removed leaves with one kidney pre-cultured for two days on the medium for callusogenesis (MS medium with MES, agar, 2 mg/l NAA and 1 mg/l 2iP). For the first experiment was used construction of gene AtEXPA10 of *A. thaliana* with the 35S promoter. The culture of *A. rhizogenes* strain 15834 was centrifuged and resuspended in 3 ml of MinA, acetosyringone was added to a solution concentration of 50 mM and placed on an orbital shaker to swing at 28°C for 1 hour. Then mixed explants with *Agrobacterium* and added to the prepared suspension of silicon carbide (up to 1%). The resulting mixture was vortexed and were further inoculated within 30 minutes on the cup with a medium MinA. Explants were then dried on a filter paper and placed them in the co-cultivation with *Agrobacterium* in a medium for callusogenesis. After three days the explants are transferred to MS medium with 3% sucrose and agar supplemented with 250 mg/l cefotaxime and 250 mg/l carbenicillin and cultured in the dark at 25°C for 1.5 months. Obtained in the experiment hairy aspen roots examined for expression of the reporter gene GUS. Stained blue were picked and the roots were transplanted to a new MS medium and cultured in a climatic chamber Binder (Germany) at 25°C. After 2.5 months on the culture of hairy roots began to emerge spontaneously shoots. Histochemical analysis revealed expression in these shoots of reporter gene GUS. Thus, using the *A. rhizogenes* we were obtained transgenic aspens, expressing gene AtEXPA10 of *A. thaliana*. Were also obtained hairy roots of aspen overexpressing the gene PnARGOS-like of *Populus nigra* L.



**РОСТ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ И БЕРЕЗЫ  
С МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТАБОЛИЗМОМ АЗОТА****Лебедев В.Г.<sup>1</sup>, Салмова М.А.<sup>1</sup>, Розова Х.А.<sup>2</sup>, Ларионова А.А.<sup>3</sup>, Шестибратов К.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Филиал Федерального государственного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, д. 6, тел. / факс (4967) 33-09-66, e-mail: vglebedev@mail.ru

<sup>2</sup>Филиал МГУ им. М.В. Ломоносова в г. Пущино, 142292, Московская обл., г. Пущино, мкрн «В», д. 20А, тел. (4967) 73-36-01, факс (4967) 73-04-52

<sup>3</sup>Федеральное государственное учреждение науки Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 2, тел. (4967) 31-81-55, факс (4967) 33-05-95

Азот является одним из основных элементов минерального питания растений. Доступность его неорганических форм часто является лимитирующим фактором их роста и развития, особенно на бедных лесных почвах. Изучение метаболизма азота в древесных растениях имеет большое значение как для фундаментальной науки, так и для практического применения. С целью повышения продуктивности лесных пород мы клонировали цитозольную форму гена глутамин синтетазы GS1 из сосны обыкновенной и путем агробактериальной трансформации перенесли его в растения осины (*Populus tremula* L.) и березы (*Betula pubescens* Ehrh.). Полученные трансгенные растения были высажены в сосуды с природной почвой и оценивались в течение трех лет в условиях теплицы (2009-2010) и открытой площадки (2011). У осины с геном GS1 наблюдалось увеличение высоты растений до 23%, а объема древесины – до 41% относительно контроля. Среди растений березы было идентифицировано две линии с ослабленным (на 25-31%) и одна линия с усиленным (на 41%) ростом. Объем древесины этих линий был на 26-49% ниже или на 74% выше по сравнению с контролем. Содержание общего азота во флоэме растений осины коррелировало с их высотой. Измерение клеток ксилемы выявило значительное утолщение (до 2,5 раз) клеточной стенки у трансгенных растений осины, но не у березы. Анализ листьев с помощью программы LAMINA не показал существенных различий между трансгенными растениями и контролем по таким параметрам, как площадь листьев, их длина, ширина, горизонтальная или вертикальная симметрия. Для определения возможного влияния трансгенных растений на почвенную экосистему в конце каждого вегетационного сезона мы оценивали активность почвенных ферментов. Была проанализирована активность ряда ферментов, включенных в циклы углерода, азота, фосфора и серы – дегидрогеназы, нитратредуктазы, щелочной и кислой фосфатазы, арилсульфатазы и др. Различия между трансгенными растениями и контролем были незначительными, за исключением нескольких линий, однако обнаруженные отклонения не воспроизводились в последующие годы. Возможность воздействия растительных остатков на экосистему мы определяли через скорость разложения различных тканей (листьев, стеблей, корней) трансгенных растений. Анализы проводили путем определения эмиссии CO<sub>2</sub> и потери массы в условиях различных температур (22, 12 или 2°C) и влажности (80, 50 или 20%). Было обнаружено, что растения с ускоренным ростом отличались и повышенной скоростью разложения древесины.

**GROWTH AND BIOSAFETY OF ASPEN AND BIRCH TRANSGENIC PLANTS WITH MODIFIED NITROGEN METABOLISM****Lebedev V.G.<sup>1</sup>, Salmova M.A.<sup>1</sup>, Rosova C.A.<sup>2</sup>, Larionova A.A.<sup>3</sup>, Schestibratov K.A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, 142290, Moscow Region, Pushchino, Science avenue, 6, tel. / fax +7(4967) 33-09-66, e-mail: vglebedev@mail.ru

<sup>2</sup>Pushchino Lomonosov Moscow State University campus, 142292, Moscow Region, Pushchino, 20A, tel. +7(4967) 73-36-01, fax +7(4967) 73-04-52

<sup>3</sup>Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science RAS, 142290, Moscow Region, Pushchino, tel.+7(4967) 31-81-55, fax +7(4967) 33-05-95

Nitrogen is one of the most essential nutrients for plants. Availability of inorganic nitrogen is often a significant factor limiting plant growth and development especially in poor forest soils. The study of nitrogen metabolism in woody plants is particular significance both for the understanding of fundamental tree biology and for practical applications. To improve productivity of forest trees we cloned the gene of cytosol glutamine synthetase from Scots pine and transferred it into aspen (*Populus tremula*) and birch (*Betula pubescens*) plants by agrobacterial transformation. Three-year trial was performed for evaluation of transgenic plants. Six lines (nontransgenic control and five lines with GS gene) were grown in pots with natural soil under greenhouse (2009-2010) and open air (2011) conditions. Transgenic aspen plants were similar to each other. Its height varied from 91 to 123% and volume of wood varied from 114 to 141% to control plants. Two lines with decreased growth and one line with highly enhanced growth were identified within birch plants. Compared with the control plants, the height were reduced by 25-31% (2b and 2c lines) or increased by 41% (8b line), respectively. The wood volumes of these lines were 26-49% smaller or 74% greater than control plants. Total nitrogen content in phloem of aspen lines was correlated with its height. To evaluate the impact of glutamine synthetase activity on xylem cell expansion the lengths, diameters and wall thickness of fibers were measured. Fiber parameters were not significantly affected by overexpression of GS1 gene in birch plants. In contrast, fibers of aspen were significantly wider (up to 3.1-fold) in the transgenic lines than in the wild-type controls. Cell wall of fibers was also thicker up to 2.5-fold. Analysis of aspen and birch leaves by LAMINA program showed no differences between plants of leaf-shape parameters such as leaf area, perimeter, length, width, horizontal and vertical symmetry. Enzyme activities in soil for evaluation the potential risk of transgenic trees were analyzed annually at the end of the growing season. Results of analysis did not differ significantly between transgenic and control plants. The possible effect of plant residues on the ecosystem was studied through the decomposition rate of different tissues (leaves, stems, roots) of transgenic plants. The emission of CO<sub>2</sub> and the weight loss under different temperature (22, 12, or 2 °C) and humidity (80, 50 or 20%) conditions were analyzed. We observed correlation between the accelerated growth and increased decomposition of wood.

**ТРАНСФОРМАЦИЯ *DIGITALIS PURPUREA* L. РАЗНЫМИ ШТАММАМИ  
*AGROBACTERIUM RHIZOGENES* ВЫЗЫВАЕТ РАЗЛИЧНЫЕ  
ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ**  
**Лёшина Л.Г.<sup>1</sup>, Булко О.В.<sup>1</sup>, Егоров О.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, 02160, г. Киев, Харьковское шоссе, д. 50, факс: (044) 559-98-00, тел. (044) 559-05-95, e-mail: lioshina@ukr.net

<sup>2</sup>Химическая компания «СПОЛУКА», Украина, Киев, ул. Мурманская, д. 5, e-mail: Oleg.Iegorov@gmail.com

Нами проведено сравнительное изучение изменений морфологических и биохимических показателей наперстянки пурпурной в результате трансформации двумя штаммами почвенной агробактерии *Agrobacterium rhizogenes*.

Наперстянка пурпурная (*Digitalis purpurea* L.) – декоративное и лекарственное растение из семейства Норичниковые (Scrophulariaceae), содержащее множественные гликозиды сердечной группы, ряд стероидных сапонинов, флавоноиды и др. Многочисленные галеновые препараты, получаемые из листьев наперстянки, являются классическими лекарственными средствами, применяемыми при нарушении деятельности сердца.

Растение было введено нами в культуру *in vitro*, инициирована каллусная культура и культуры трансгенных корней, полученных в результате трансформации листовых эксплантов двумя штаммами *A.rhizogenes* - R-1601 и 15834 (любезно предоставленных нам Кузовкиной И.Н., ИФР им. К.А.Тимирязева РАН, Россия).

Частота трансформации штаммом R-1601 составила 85-100%, а штаммом 15834 - от 35 до 45%. Трансгенные корни имели различную морфологию при выращивании как на твердой, так и в жидкой средах. Они отличались по цвету, длине, толщине корешков и количеству корневых волосков. Трансформация наперстянки штаммом R-1601 инициировала появление светло-коричневых корешков с большим количеством корневых волосков. Штамм 15834 давал образование более тонких, длинных, светло-желтых корней.

При дальнейшем культивировании на безгормональной среде наблюдалось светозависимое спонтанное побегообразование. 60% корней образовывали побеги в результате прямой регенерации. Остальная часть дедифференцировалась в желто-коричневый рыхлый каллус, из клеток которого при дальнейшем пассировании на свету также образовывались побеги. Ростки, перенесенные на среду для корнеобразования (МС +0,1 мг/л НУК) через 30-45 дней развивались в полноценные растения.

Полученные растения-регенеранты отличались от интактных и имели ряд признаков, характерных для R1-трансформантов, а именно активный рост латеральных корней, сужение листовой пластины, множественное первичное побегообразование. Регенеранты, трансформированные разными штаммами агробактерии (штамм R1601 - регенерант P1; штаммом 15834 - регенерант P2), отличались по коэффициенту размножения, который у P1 составлял 1:1, а у P2 – 1:3. Интересным фактом, требующим дальнейшего изучения, стало образование на корнях трансформанта P1 утолщений, расположенных с некоторым интервалом по всей длине корня. Под микроскопом эти образования представляли собой сильно разросшиеся клетки эпилеммы.

Методом ВЭЖХ-МС был проведен количественный анализ спектра биологически активных соединений, содержащихся в кислотных экстрактах культур клеток и растений наперстянки. Результаты показали, что по сравнению с контролем (нетрансформированные растения), количество веществ в котором взято за 100%, в клеточных культурах синтез вторичных метаболитов был меньше на 80-90%. У растений-регенерантов этот показатель зависел от трансформирующего штамма. У P1-растений он превысил контрольные на 81%, а у P2 – на 56%. Производство веществ в различных линиях одного и того же трансформанта практически не отличалось.

**TRANSFORMATION OF *DIGITALIS PURPUREA* L. USING DIFFERENT STRAINS OF *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* CAUSES VARIOUS PHENOTYPIC AND BIOCHEMICAL MANIFESTATIONS**

**Lioshina<sup>1</sup> L.G., Bulko<sup>1</sup> O.V., Iegorov<sup>2</sup> O.A.**

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine, Ukraine, Kiev, Kharkovskoe sh., 50, fax: (044) 559-98-00, tel. (044) 559-05-95, e-mail: llioshina@ukr.net

<sup>2</sup>Chemical company "SPOLUKA", Ukraine, Kiev, Murmanskaja str., 5, e-mail: Oleg.Iegorov@gmail.com

We conducted a comparative study of changes in the morphological and biochemical parameters of *Digitalis purpurea* as a result of transformation using two strains of soil *Agrobacterium rhizogenes*.

Purple foxglove (*Digitalis purpurea* L., (*Scrophulariaceae*)) is an ornamental and medicinal plant, which contains multiple glycosides of cardiac group, a number of steroidal saponins, flavonoids, etc. Numerous herbal drugs derived from leaves of *D. purpurea* are commonly used for patients with cardiac performance abnormalities.

The plant was introduced to the culture in vitro, there were initiated callus culture and hairy roots resulting from transformation of leaf explants using two strains of *A. rhizogenes*: R-1601 and 15834 (kindly provided by Kuzovkina I.N., Timiryazev Institute of Plant Physiology of RAS).

Frequency of transformation using strain R-1601 was 85-100%, while using strain 15834 - 35-45%. Transgenic roots had different morphologies when grown in either solid or liquid media. They differed in color, length, thickness and number of root hairs. The transformation of *D. purpurea* using strain R-1601 initiated the appearance of a light-brown roots with big amount of root hairs. Strain 15834 initiated formation of more subtle, long, pale yellow roots.

During further cultivation in the media without hormones it was observed light-dependent spontaneous shoot formation. 60% of the roots formed shoots as a result of direct regeneration. The rest was dedifferentiated into yellow-brown friable callus, and its' cells after further passaging in the light also formed shoots. The shoots which were transferred to rooting medium (MS +0.1 mg / l NAA) for 30-45 days germinated into full-grown plants.

The resulting regenerated plants were different from the intact ones and had a number of features specific to Ri-transformants, which were the rapid growth of lateral roots, narrowing of the leaf blade, multiple primary shoot formation. Regenerants which were transformed with different *agrobacterium* strains (strain R1601 - regenerant P1, strain 15834 - regenerant P2) differed in the rate of reproduction, which was 1:1 for P1 and 1:3 for P2. An interesting fact for further study was the formation condense roots of transformant P1 which were located with certain interval along the entire length of the root. In microscope these structures were overgrown cells of epibema.

Using HPLC-MS a quantitative analysis of a range of biologically active compounds in acidic extracts of plant and cell cultures of *D. purpurea* was performed. It was shown that compared to control sample (untransformed plant) in which content of investigated compounds was taken as 100% in the cell cultures the synthesis of secondary metabolites was reduced by 80-90%. For the regenerated plants this parameter depended on transforming strain. For P1 it exceeded control by 81%, and for P2 - by 56%. Production of compounds in different lines of the same transformant did not differ.

**TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR SUCCESSFUL GENETIC TRANSFORMATION OF COMMON WHEAT****Miroshnichenko D.N.,<sup>1,2</sup> Dolgov S.V.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Botron, Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 142290, Moscow Region, Pushchino, Science Av., 6, tel: (84967) 73-13-79, email: miroshnichenko@fibkh.serpukhov.su

<sup>2</sup>All-Russian Agricultural Biotechnology Research Institute, 127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 42, Tel: (8499) 976-90-05

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the world's most important cereal crops. Since the mid 1990s, genetic engineering of cereals has provided a novel field of opportunities for faster and more directed modification or introduction of agronomically useful traits. For wheat, the prerequisite for genetic manipulation is the establishment of a routine and simple plant regeneration system through tissue culture. Historically, monocots have proven to be less responsive to in vitro regeneration techniques than dicots. Cereal crops are hardly able to regenerate plants from leaf tissue and only immature tissues of a limited age range can be induced to regenerate efficiently. Last decade our research is being directed toward the speeding up the process of identification of transgenic tissue and the reducing the time and the amount of work involved in the production of primary transgenic lines. Various tissue culture factors that influence the DNA delivery and in vitro regeneration of wheat plants have been investigated. Based on empirical studies through manipulation of culture medium components, such as growth regulators and carbohydrates, the successful biolistic transformation of common wheat is reported. The combined effects of explant type, the stage of embryogenic callus development and the osmotic pre-treatment were studied. Here we review in vitro dual selection system based on the combination of gfp as vital reporter gene and bar gene for transgene recovery and provide a complete protocol that was used to produce over hundred transgenic plants in Russian spring wheat varieties.

**СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA* L.)  
ПРОДУЦЕНТОВ ИММУНОГЕННЫХ БЕЛКОВ *M. TUBERCULOSIS*****Пермякова Н. В., Уварова Е.А., Дейнеко Е.В.**

Институт Цитологии и Генетики СО РАН, 630090, г. Новосибирск, Россия, пр. академика Лаврентьева, д. 10, e-mail: puh@bionet.nsc.ru; uvarova@bionet.nsc.ru

Создание новых вакцин против туберкулеза является одним из актуальнейших направлений современной биотехнологии и медицины.

В качестве основных антигенов для кандидатной вакцины нами выбраны два секреторных белка *M. Tuberculosis* CFP10 ESAT6. Данные белки являются ключевыми факторами вирулентности *M. Tuberculosis*, они индуцируют сильный Т-клеточный иммунный ответ, и вероятно, вовлечены в лизис мембраны клетки хозяина или лизис самой клетки хозяина. В то же время район RD1 генома *M.tuberculosis*, в котором закодированы эти белки, делегирован у *M. bovis* БЦЖ и при использовании вакцины БЦЖ иммунный ответ на эти антигены не образуется. Таким образом, эти белки, являются хорошими кандидатами на роль вакцинальных антигенов в бустерной вакцине против туберкулеза.

Последовательности генов *cfp10* и *esat6* и слитая последовательность *esat6-cfp10-dIFN* были клонированы в экспрессирующем бактериальном векторе и затем в бинарной плазмиде *Agrobacterium tumefaciens*. Последовательность химерной конструкции *esat6-cfp10-dIFN* состоит из двух отдельных генов *esat6* и *cfp10* и рекомбинантного  $\gamma$ -IFN человека в одной рамке трансляции, между которыми нет стоп-кодонов, но присутствует «шарнир» из трех аминокислотных остатков – «gly-ala-gly» для гибкой связи между доменами гибридного белка. С помощью агробактериального переноса эти три рекомбинантные последовательности были перенесены в растения *Daucus carota* L. Наличие последовательностей целевых генов в геноме моркови было доказано при помощи ПЦР, продукция белка в корнеплодах показана методами Вестерн блот и Дот блот. Содержание слитого белка *esat6-cfp10-dIFN* в корнеплодах составило 0.056 % от ОРБ.

Иммуногенность рекомбинантных белков оценивали в опытах на мышах. При оральной иммунизации мышей корнеплодами, содержащими антиген rCFP10, впервые было показано, что у животных возникает, как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. Также клеточный и гуморальный ответ были обнаружены при оральной иммунизации мышей морковью содержащей антиген rESAT6. Однако белки rESAT6 и rCFP10 в опытах с инъекционным и пероральным введением проявляли токсичность в отношении мононуклеаров периферической крови. В тоже время рекомбинантный химерный белок rCFP10-ESAT6-dIFN также вызвал клеточный и гуморальный эффект, но было показано, что он не токсичен для организма. Кроме того, химерный белок, по-видимому, менее токсичен и для растений, корнеплоды трансгенной моркови несущей химерный ген в среднем имеют большую массу и лучше хранятся, чем корнеплоды растений с индивидуальными генами *esat-6* или *cfp-10*.

Полученный нами рекомбинантный химерный белок rCFP10-ESAT6-dIFN безусловно представляет интерес для дальнейших исследований и проведения доклинических испытаний терапевтической эффективности и безопасности иммунопрофилактического препарата. Следующим этапом нашей работы являются дополнительные исследования по разработке и совершенствованию генетической конструкции для повышения уровня экспрессии химерного рекомбинантного белка в тканях трансгенных растений. Конечной целью данной работы является разработка новой безопасной и эффективной кандидатной вакцины от туберкулеза, которая могла бы заменить или дополнить вакцину БЦЖ для интактных или привитых штаммом БЦЖ детей, взрослых и животных.

**PRODUCTION OF TRANSGENIC CARROT PLANTS (*DAUCUS CAROTA* L.)  
PRODUCERS OF IMMUNOGENIC PROTEINS OF *M. TUBERCULOSIS*  
Permyakova N.V., Uvarova E.A., Deineko E.V.**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 630090, Novosibirsk, Ak. avrentiev av., 10,  
e-mail: puh@bionet.nsc.ru; uvarova@bionet.nsc.ru

The production of new vaccines against tuberculosis is one of the most pressing issues of modern biotechnology and medicine.

The main antigens for candidate vaccine that we chose were two secretory proteins of *M. tuberculosis* - CFP10 and ESAT6. These proteins are key virulence of *M. tuberculosis* they induce strong T-cell immune response, and are probably involved in the lysis of the host cell membrane and the cell lysis of the host. At the same time, region RD1 of the *M. tuberculosis* genome, which encode these proteins is absent in the attenuated *M. bovis* BCG and the use of BCG vaccine does not form immune response to these antigens. Thus, these proteins are good candidates for the role of vaccine antigens in a booster vaccine against tuberculosis.

Gene sequences of cfp10, esat6 and fusion gene esat6-cfp10-dIFN, were cloned in the bacterial expression vector, and then in the binary plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. The sequence of chimeric construct esat6-cfp10-dIFN consists of two separate genes esat6 and cfp10 and recombinant human  $\gamma$ -IFN in the same frame of translation, between genes there is no stop codons, but there is a "hinge" of three amino acids - «gly-ala-gly» for flexible connection between the domains of fusion protein. Stable transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants were generated using agrobacterial transformation. The presence of sequences of the target genes in the carrot genome was proved by PCR reaction, protein expression in the roots is shown by Western blot and Dot blot analysis. The content of the fusion protein esat6-cfp10-dIFN in the roots was 0.056% of the TSP.

Immunogenicity of recombinant proteins was evaluated in tests on mice. It was shown for the first time that oral immunization of mice with carrots, containing rCFP10 antigen, induces in animals, both cellular and humoral immune response. Cellular and humoral immune responses were also detected in oral immunization of mice with carrots containing antigen rESAT6. However, in experiments with injection and oral administration proteins rESAT6 and rCFP10 showed toxicity to peripheral blood mononuclear cells. At the same time, a recombinant fusion protein rCFP10-ESAT6-dIFN also induces cell-mediated and humoral immunity, but it is not toxic to the organism. In addition, the fusion protein appears to be less toxic for plants, transgenic carrot roots carrying chimeric gene on the average have larger mass and are stored better than the roots of plants with individual genes esat-6 and cfp-10.

Obtained recombinant fusion protein rCFP10-ESAT6-dIFN obviously is of interest for further research and preclinical testing of therapeutic efficacy and safety of immunoprophylactic drug. The next step of our work is further research on the development and improvement of the genetic construction to increase expression level of a chimeric recombinant protein in the transgenic plants tissues. The long-term goal of this work is to provide a flexible, tuberculosis vaccine that is safe and effective for naive or BCG immunized children, adults and animals.

**ТРАНСГЕННЫЕ СИМБИОТИЧЕСКИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ-ГИПЕРАКУМУЛЯТОРЫ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ****Постригань Б.Н., Благова Д.К., Чемерис А.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, 450054, г. Уфа, пр. Октября, д. 71, тел. (347) 235-60-88, факс: (347) 235-61-00, e-mail: postriган@bk.ru

Белки, участвующие в детоксикации тяжелых металлов обнаружены как у про-, так и у эукариот. У растений такими соединениями являются короткие, богатые цистеином пептиды – фитохелатины с общей структурой  $[\gamma\text{-Glu(Cys)}]_n\text{-Gly}$ , где  $n = 2-11$ . Звенья  $\gamma\text{-Glu-Cys}$  связывают ТМ, образуя с ними комплексы. Фитохелатины синтезируются не напрямую через мРНК, а в ходе ферментативных реакций. Псевдофитохелатины со структурой  $\text{Met}[(\alpha\text{Glu(Cys)})_n\text{Gly}]$ , кодируемые синтетическими “псевдофитохелатиновыми” генами, также способны к комплексообразованию с ТМ. Благодаря матричной природе их синтеза представляется перспективным использовать псевдофитохелатины для создания, как растений, так и бактерий, накапливающих ТМ и способных выживать при их высоких концентрациях. При введении в ризобии псевдофитохелатинового гена, в зависимости от локализации образующихся соединений «псевдофитохелатин-кадмий» на поверхности или внутри клетки, прикрепление трансформированных ризобий к корням растений, таким образом, могло увеличить поступление в них кадмия или, наоборот, уменьшить поглощение тяжелого металла выполняя при этом защитную функцию. Нами были получены бактерии, трансформированные генетической конструкцией, содержащей псевдофитохелатиновый ген, кодирующий пептид, в составе которого 10 металл-связывающих звеньев  $[(\alpha\text{Glu(Cys)})]$  на основе вектора pTurboGFP-B. Данной конструкцией методом электропорации трансформировали бактерии *R. leguminosarum* 1078. ПЦР-анализ показал наличие псевдофитохелатинового гена в трансформированных бактериях. Затем в ходе эксперимента выращивали трансформированные и контрольные бактерии в среде, содержащей различные концентрации кадмия (0, 100, 200, 300, 400 мкМ/л). Было показано, что ризобии, несущие псевдофитохелатиновый ген более устойчивы к высоким концентрациям данного тяжелого металла. Они были способны расти на среде с концентрацией кадмия до 400 мкМ/л, в отличие от контрольных бактерий, которые практически переставали расти уже на концентрации 200 мкМ/л. В ходе дальнейших исследований трансгенных ризобий с помощью атомно-силовой микроскопии нами было обнаружено, что при выращивании на высоких концентрациях кадмия, 300 мкМ, такие бактерии активно экскретируют на поверхность клеточной стенки достаточно крупные гранулы в больших количествах. В контрольных экспериментах без обработки кадмием трансгенных бактерий и при умеренной обработке нетрансгенных (в силу их слабой устойчивости к токсическому действию кадмия) образования таких гранул и чехлов не наблюдалось, поверхности клеточных стенок были чистыми. В связи с этим мы предположили что бактерии, экспрессирующие псевдофитохелатиновый ген образовавшиеся комплексы с кадмием выводят на поверхность клеточных стенок, тем самым защищая себя от токсического воздействия тяжелых металлов. Это подтверждает и эксперимент по качественному определению кадмия в клеточном дебрисе, после мягкого лизиса трансгенных бактерий, обработанных кадмием. В целом полученные нами данные согласуются с ранее полученными результатами по устойчивости к воздействию тяжелых металлов, в частности кадмия, и накопительным свойствам трансгенных растений табака, экспрессирующих псевдофитохелатиновый ген, кодирующий пептид, в составе которого 6 металл-связывающих звеньев  $[(\alpha\text{Glu(Cys)})]$ .



**TRANSGENIC SYMBIOTICAL MICROORGANISMS HEAVY METALS  
HYPERACCUMULATORS****Postrigan B.N., Blagova D.K., Chemeris A.V.**

Institute of biochemistry and genetics of Ufa science centre RAS, Department of Molecular Biology and Plant Physiology, 450054, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 71, tel.: (347) 235-60-88, fax: (347) 235-61-00, e-mail: postrigan@bk.ru

Proteins involved in detoxification of heavy metals found in both pro-and eukaryotes. In plants these compounds are short, cysteine-rich peptides - phytochelatins the general structure [ $\gamma$ -Glu (Cys)]<sub>n</sub>-Gly, where n = 2-11. Links  $\gamma$ -Glu-Cys TM linked to form complexes with them. Phytochelatins synthesized indirectly via mRNA, but during the enzymatic reaction. Pseudophytochelatins with the structure of Met [( $\alpha$ Glu (Cys))<sub>n</sub>Gly, encoded by the synthetic "pseudofitohelatinovymi" genes are also able to form complexes with TM. Due to the nature of their matrix synthesis is promising to use pseudofitohelatinovy to create, both plants and bacteria that accumulate heavy metals and capable survive when their concentrations is high. When the pseudofitohelatinovy gene is introduced in rhizobia depending on the location of the resulting compounds "pseudofitohelatin-cadmium" on the surface or inside the cells attach to the Rhizobium transformant plant roots, thus, may increase the flow in them cadmium, or vice versa, reduce the absorption of heavy metal while performing a protective function. The bacteria transformed with a genetic construct containing pseudofitohelatinovy gene encoding the peptide, which included 10 parts of metal-binding [( $\alpha$ Glu (Cys))] based on the vector pTurboGFP-B, we have obtained. This design Bacteria transformed by electroporation. *R. leguminosarum* 1078. The presence of pseudofitohelatinovy gene in transformed bacteria showed by PCR analysis. Then during the experiment and control were grown transformed bacteria in a medium containing various concentrations of cadmium (0, 100, 200, 300, 400  $\mu$ M) was shown that rhizobia carrying pseudofitohelatinovy gene are more resistant to high concentrations of heavy metal. They were able to grow on a medium at a concentration of cadmium to 400  $\mu$ M, in contrast to the control bacteria, which are practically stopped growing at a concentration of 200  $\mu$ M. During further research transgenic rhizobia using atomic force microscopy, we have found that when growing at higher concentrations of cadmium, 300  $\mu$ M actively excrete such bacteria on the surface of the cell wall are large enough granules in large amounts. In control experiments, no treatment cadmium transgenic bacteria and moderate processing nontransgenic (due to their poor resistance to the toxic effects of cadmium) forming such granules were not observed and covers the surfaces of the cell walls were clean. Therefore we hypothesized that bacteria expressing the gene pseudofitohelatinovy formed complexes with cadmium output on the surface of the cell walls, thus protecting themselves from the toxic effects of heavy metals. This experiment confirms the qualitative determination of cadmium in the cell pellet, after mild lysis of transgenic bacteria treated with cadmium. Overall, our findings are consistent with previous results on the resistance to Heavy metals, particularly cadmium and accumulating properties of transgenic tobacco plants expressing pseudofitohelatinovy gene encoding the peptide, which included six metal binding units [( $\alpha$ Glu (Cys))].

**СРАВНЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ САХАРОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ОХЛАЖДЕНИЯ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА, СОДЕРЖАЩИХ ГЕН ТРАНСФАКТОРНОГО БЕЛКА****Ралдугина Г.Н., Бурмистрова Н.А., Гомаа А.А., Марей М.М., Букарев Р.В., Шумкова Г.А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35, факс: (499) 977-80-18, тел. (499) 231-83- 02, e-mail: galina\_ifr@fromru.com

Сравнивали накопление растворимых сахаров и пролина под действием пониженной температуры и солей тяжелых металлов (ТМ) трансгенными растениями рапса, содержащими выделенный из генома растений риса встроенный ген *Osmyb4*. Белок, кодируемый этим геном, является транскрипционным фактором, отвечающим за различные биохимические изменения, происходящие с растениями во время адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды. Исследования проводили на трансгенных растениях (ТР) второго поколения, размножаемых вегетативно *in vitro*. В качестве контролей использовали нетрансформированные растения рапса (НТР) сорта Westar, полученные через регенерацию. Размноженные черенкованием трансгенные и нетрансформированные растения были высажены в сосуды с жидкой средой Хогланда-Снайдерс. При достижении растениями размера 5-6 листьев на растения воздействовали различными стрессовыми факторами: солями  $ZnSO_4$  (1 и 3 мМ) или  $CuSO_4$  (100 мкМ), а также пониженной температурой +4°C. Содержание в растениях растворимых сахаров и пролина при действии охлаждения определяли на 5-е сут., а при действии сульфата меди и цинка определения проводили на 7-е сут. Для анализов брали 3-й или 4-й лист сверху. Было показано, что у НТР содержание сахаров и пролина в процессе адаптации нетрансгенных растений к холоду (4°C) через 2 сут. изменялось в значительной степени: количество сахарозы увеличивалось в 8 раз, фруктозы в 10 раз и глюкозы в 20 раз. На 5-е сутки адаптации растений к 4°C количество сахарозы начинало уменьшаться, тогда как содержание моносахаров возрастало. По-другому происходит накопление сахаров у нетрансформированных растений при добавлении солей ТМ. Под воздействием  $CuSO_4$  количество сахарозы и фруктозы к 7 суткам увеличивалось на 10-15%, тогда как содержание глюкозы оставалось постоянным. При действии  $ZnSO_4$  содержание глюкозы и сахарозы снижалось незначительно (на 10-15%), тогда как количество фруктозы уменьшалось, примерно, в 2 раза. ТР, в отличие от растений дикого типа, обнаруживали на холоде менее выраженные изменения в содержании растворимых сахаров. Содержание сахарозы изменялось в 3 раза, фруктозы – в 4 раза и глюкозы – в 5 раз. При действии  $CuSO_4$  количество сахарозы и глюкозы уменьшалось примерно в 2 раза, тогда как содержание фруктозы примерно в 2 раза увеличивалось. Накопление пролина подчинялось другим закономерностям. Если на холоде у НТР его накопление было незначительным, составляя на 5 сутки 200% по сравнению с растениями, находившимися при 24°C, то у ТР накопление составило 1000-1200%. При действии на растения  $ZnSO_4$  количество пролина увеличивалось в 4 раза с увеличением концентрации соли в растворе до 1 мМ одинаково у НТР и ТР растений. При возрастании концентрации  $ZnSO_4$  до 3 мМ количество пролина увеличивалось значительно (в 15-20 раз), со значительным превышением у ТР растений (на 50-70%). Более сильное воздействие оказывало добавление  $CuSO_4$ . Содержание пролина увеличивалось у НТР в 27 раз, тогда как у ТР наблюдали увеличение в 37 раз, по сравнению с растениями, росшими без воздействия солей ТМ. Таким образом, и воздействие охлаждения и воздействие солей ТМ вызывают у ТР с геном трансфакторного белка похожий эффект – снижается способность аккумулировать растворимые сахара, но интенсивно аккумулируется пролин, который подобно сахарам обладает осморегуляторным и множественным стресс-протекторным действием.

Работа частично поддержана грантами РФФИ 13-08-01323 и 13-04-01001.

**COMPARISON OF THE ACCUMULATION OF SUGARS UNDER HEAVY METALS  
AND COOLING IN TRANSGENIC PLANTS OF RAPE CONTAINING THE GENE OF  
TRANSCRIPTION FACTOR**

**Raldugina G.N., Burmistrova N.A., Gomaa A.M., Mareay M.M., Bukarev R.V.,  
Shumkova G.A.**

Federal State Institution of Science Institute of Plant Physiology K.A. Timirjazev Academy of Sciences, 127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35, fax: (499) 977-80-18, tel. (499) 231-83-02, e-mail: galina\_ifr@fromru.com

The accumulation of soluble sugars and proline under the influence of low temperatures and heavy metals (TM) was evaluated in transgenic rape (*Brassica napus* L.) plants transformed by rice *Osmyb4* gene. The protein encoded by this gene is a transcription factor that is responsible for a variety of biochemical changes that occur in plants during adaptation to adverse environmental conditions. Investigations were carried out on vegetatively propagated *in vitro* transgenic plants (TP) of the second generation. As a control, non-transformed rape plants (NTP) variety Westar obtained through regeneration *in vitro*. Propagated by cuttings, TP and NTP were planted in containers filled with a Hoagland-Snyder solution. When the plants have developed 5-6 leaves on accession, the various stress factors such as salts  $ZnSO_4$  (1 and 3 mM) and  $CuSO_4$  (100  $\mu$ M) salts and low temperature (+4°C) were applied to plants. The content of soluble sugars and proline in plants under the action of cooling was determined on the 5-th day, and under the action of copper sulfate and zinc sulfate the assays were performed on the 7-th day. For assays the 3-rd or 4-th leaf from top were picked out. It was shown that the content of sugars and proline in NTP during adaptation to cold (4°C) after 2 days varied largely: the sucrose content has increased by 8 times, 10 times the fructose content – by 10 times, and the glucose content - by 20 times. On the 5-th day of plant adaptation to 4°C, the amount of sucrose began to decrease, while the content of monosaccharides increased. An accumulation of sugars in NTP has occurred by another way at heavy metal salts supplying. Under the influence of  $CuSO_4$  the content of sucrose and fructose is increased to 7 days to 10-15%, while the glucose content remains constant. When exposed to  $ZnSO_4$  the content of glucose and sucrose is decreased significantly (by 10-15%), whereas the fructose content is reduced approximately 2-fold. TP in contrast to wild type plants have showed less pronounced alterations in the content of soluble sugars in cold conditions. Sucrose content changed by 3 times, fructose – by 4 times and glucose – by 5 times. The action of  $CuSO_4$  caused the decrease of the sucrose and glucose content about two fold, whereas the fructose content has increased about 2 times. The accumulation of proline was changed by another way. If in NTP the accumulation of proline was negligible in cold conditions, amounting to 5 days of 200% compared with plants that were growing at 24°C, whereas its accumulation in TP was reached 1000-1200%. The action of  $ZnSO_4$  on plants caused the increasing of proline content by 4-fold in the salt concentration in solution equal to 1 mM in transgenic and non-transgenic plants. When concentration of  $ZnSO_4$  has increased to 3 mM the content of proline increased considerably (15-20 times) with a large excess in transgenic plants (50-70%). More severe influence was caused by the addition of  $CuSO_4$ . Proline content has increased in NTP by 27 times, while the proline content in transgenic plants has enlarged by 37 times in compare with plants growing without heavy metal salts affecting. Thus, the cooling effect and the effect of heavy metal salts cause the similar effect in plants transformed by trans-factor gene - reduced ability to accumulate soluble sugars but intensively accumulated proline which like sugars has osmoregulatory and multiple stress-protective effects.

This work was partially supported by grants RFBR 13-08-01323 and 13-04-01001.

**ПОВЫШЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ГЕНОМ  
СТИЛЬБЕНСИНТАЗЫ К ФИТОПАТОГЕНАМ****Руквацова Е.Б.<sup>1</sup>, Захарченко Н.С.<sup>1</sup>, Алексеева В.В.<sup>1</sup>, Лазарева Н.В.<sup>2</sup>, Бурьянов Я.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 142290, г. Пущино, проспект Науки, д. 6; факс: (4967)330527, тел.: (4967)330970, e-mail: ruk@fibkh.serpukhov.su

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, д 19, тел. (343) 375-44-44; e-mail: ThuVaeRLo@yandex.ru

Целью исследований было получение трансгенных растений с геном стильбенсинтазы винограда. Такие растения могут служить источником фитоалексина резвератрола, что перспективно для сельскохозяйственной биотехнологии и фармакологии. Резвератрол обладает противоопухолевым действием, а также положительно влияет на сердечно-сосудистую и нервную системы человека и проявляет гепатопротекторные свойства. Кроме того, синтез резвератрола в клетках растений может придавать им устойчивость к ряду фитопатогенов.

Нами получены и проанализированы растения табака *Nicotiana tabacum* L. с геном стильбенсинтазы *vinst1* винограда *Vitis vinifera* (GenBank AB046375.1). Этот ген встраивали в вектор для трансформации растений pSS под контроль сильного конститутивного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты CaMV 35SS. Полученными рекомбинантными плазмидами трансформировали штаммы агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* СВЕ21 и А281(pTiBo542). Эти агробактерии использовали для трансформации листовых эксплантов растений и инфильтрации семян. Показано наличие гена *vinst1* в ДНК нескольких линий трансгенных растений табака. Проведено тестирование полученных растений на устойчивость к фитопатогенам. Показана устойчивость листьев отдельных линий растений к ряду фитопатогенных бактерий и грибов. Планируется получение безмаркерных растений с геном стильбенсинтазы и их отбор с помощью новых разрабатываемых нами биотестов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (гранты №11-08-00413 и 12-08-00131).

**THE INCREASED RESISTANCE OF TRANSGENIC PLANTS WITH STILBENE SYNTHASE GENE TO PHYTOPATHOGENS****Rukavtsova E.B.<sup>1</sup>, Zakharchenko N.S.<sup>1</sup>, Alekseeva V.V.<sup>1</sup>, Lazareva N.V.<sup>2</sup>, Buryanov Ya.I.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Science Avenue, 6, tel. (4967) 33-09-70, fax: (4967) 27-05-33, e-mail: ruk@fibkh.serpukhov.su

<sup>2</sup>Ural Federal University named after First President of Russia B.N. Yeltsin, 620002, Ekaterinburg, Mira str., 19, tel. (343) 375-44-44; e-mail: ThuVaeRLo@yandex.ru

The aim of research was obtaining of transgenic plants with grape stilbene synthase gene. Such plants can be a source of phytoalexin resveratrol that is promising for agricultural biotechnology and pharmacology. Resveratrol possesses antitumour effect, and also positively influences on human cardiovascular and nervous systems and shows hepatoprotective properties. Furthermore, the synthesis of resveratrol in plant cells can give them resistance to several plant pathogens.

We obtained and analyzed tobacco plants *Nicotiana tabacum* L. with stilbene synthase gene *vinst1* from grape *Vitis vinifera* (GenBank AB046375.1). This gene was inserted into plant transformation vector pSS under control of strong constitutive promoter of 35S RNA of cauliflower mosaic virus CaMV 35SS. *Agrobacterium tumefaciens* CBE21 и A281(pTiBo542) strains were transformed with obtained plasmids. These agrobacteria were used to transform plant leaf explants and for infiltration of seeds. The *vinst1* gene presence in DNA of several lines of transgenic tobacco plants was shown. Resistance of leaves of certain lines of plants to a number of phytopathogenic bacteria and fungi was shown. The obtaining of marker-free plants with stilbene synthase gene and their selection by means of new bioassays developed by us is planned.

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project №11-08-00413 and 12-08-00131.

**РАПС С ТРАНСГЕНОМ DESC ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCOCCUS VULCANUS*:  
ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ****Сахно Л.А.<sup>1</sup>, Сливец М.С.<sup>1,3</sup>, Остапчук А.Н.<sup>2</sup>, Король Н.А.<sup>2</sup>, Шелудько Ю.В.<sup>1</sup>,  
Голденкова-Павлова И.В.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Д 03680, г. Киев, МСП, ул. академика Заболотного, д. 148, тел. /факс (044) 526-71-04, e-mail: sakhno@icbge.org.ua

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Заболотного НАН Украины, Д 03680, г. Киев, МСП, ул. академика Заболотного, д. 154, тел. (044) 526-11-79, факс (044) 526-23-79

<sup>3</sup>Национальный технический университет Украины «Киевский Политехнический Институт», 03056, г. Киев, пр. Победы, д. 37, тел. (044) 236-69-13, факс (044) 236-59-32

<sup>4</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, тел. (499) 135-62-13, факс (499) 132-89-62

Одним из механизмов адаптации растений к стрессам (холоду, фитопатогенным грибам) является увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в липидах клеточных мембран. С использованием биотехнологических подходов благодаря введению гетерологичных десатураз различного происхождения к настоящему времени получен ряд растений с повышенным количеством моно- и полиненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов, что приводило как к повышению устойчивости к пониженным температурам, так и к меньшему повреждению фитопатогенными микроорганизмами.

Ранее нами были созданы растения рапса с трансгеном *desC* *Synechococcus vulcanus*. Ген  $\Delta 9$  десатуразы цианобактерии был слит в одной рамке считывания с репортерным геном термостабильной лихеназы (*licM3*) *Clostridium thermocellum*. Наличие последовательности гена *licM3* в составе гибридного продукта позволило качественно (с помощью чашечного теста) и количественно (фотометрически) оценить экспрессию слитого с ним гена десатуразы.

Целью данной работы было изучение состава жирных кислот листьев этих растений для последующей оценки устойчивости к изменениям температурных режимов выращивания.

В ходе экспериментов анализировали размноженные черенкованием в асептических условиях контрольные (*Vn18*, сорт Обрий) и экспрессирующие ген *desC* линии рапса (*18a*, *18в* – первичные трансформанты; *Vn18a/6*, *Vn18в/25* – растения первого поколения, полученные в результате самоопыления). Растения выращивались в условиях термальной комнаты (16/8 фотопериод, +23°C) в течение четырех недель в пробирках *Sigma* 25×150 мм (*Sigmawave*<sup>TM</sup>) с 15мл агаризованной безгормональной среды МС.

В результате анализа газо-хроматографических данных было выявлено, что экспрессия *DesC* цианобактерии *Synechococcus vulcanus* не изменяла качественный состав жирных кислот листьев рапса. Показано, что введение гена  $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы в ядерный геном растений рапса приводило к уменьшению содержания насыщенных (C16:0) и увеличению количества триеновых (C16:3 и C18:3) жирных кислот, увеличению содержания липидов (до 48%) и индекса ненасыщенности (до 0,07%) в листьях некоторых трансгенных растений (*18b* и *18a/6*). Увеличение индекса ненасыщенности коррелировало с изменениями в содержании липидов у анализируемых растений. Отмеченные линии рапса могут быть более устойчивыми к холодовому повреждению в сравнении с контрольными.

Работа выполнялась при поддержке гранта Национальной Академии Наук Украины № 01110U006062.

**CANOLA WITH CYANOBACTERIUM  
SYNECHOCOCCUS VULCANUS DESC TRANSGENE:  
LEAF FATTY ACID COMPOSITION**

**Sakhno L.O.<sup>1</sup>, Slyvets M.S.<sup>1,3</sup>, Ostapchuk A.M.<sup>2</sup>, Korol N.A.<sup>2</sup>, Sheludko Y.V.<sup>1</sup>, Goldenkova-Pavlova I.V.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine, 03680, Kyiv, DSP-22, Zabolotnoho str., 148, tel. / fax: (044) 526-71-04, e-mail: sakhno@icbge.org.ua

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, 03680, Kyiv, DSP-22, Zabolotnoho str., 154, tel. (044)526-11-79, fax (044) 526-23-79

<sup>3</sup>National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”, 03056, Kyiv, Prospect Peremogy, 37, tel (044) 236-69-13, fax 236-59-32

<sup>4</sup>Vavilov Institute of General Genetics RAS, 119991, Moskow, Gubkina str., 3, tel. (499) 135-62-13, fax (499) 132-89-62

One of the adaptation mechanisms of plants to stresses (chilling or phytopathogenic fungi) is the increase in the unsaturation of fatty acid residues in lipids of cellular membranes. The application of biotechnological approaches allowed for obtaining of plants with the increased content of mono- and polyunsaturated fatty acids in the membrane lipids. The introduction of heterologous desaturases of various origins led to comparable results both in increase of cold tolerance as well as in less damage by the phytopathogenic microorganisms.

Earlier we created canola plants carrying *Synechococcus vulcanus desC* transgene. This gene was fused with the reporter gene *licBM3* (thermostable lichenase) of *Clostridium thermocellum* in one reading frame. The determination of *licBM3* gene product activity as a part of the hybrid protein allowed for qualitative (by using lichenase plate test) and quantitative (photometric) evaluation of the expression of the desaturase gene, fused with it.

This work was aimed at investigation of leaf fatty acid composition of *desC* transgenic canola for further testing of transgenic lines for resistance to temperature regime changes.

During experiments control (Bn18, cv Obreey) and *desC* expressing canola lines (primary transformants 18a, 18b and plants of first generation Bn18a/6, Bn18b/25) propagated by cutting under aseptic conditions were analysed. Plants were grown during four weeks in termal room (16/8 photoperiod, +23°C) in Sigma 25×150 мм (Sigmaxwave™) tubes containing 15 ml agar solidified MS medium without hormones.

Gas-chromatographic data revealed that cyanobacterium *Synechococcus vulcanus DesC* expression did not lead to qualitative changes in canola leaf fatty acid composition. It was shown that introduction of  $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturase gene into canola nuclear genome resulted in decrease in saturated (C16:0) and increase in trienoic (C16:3 and C18:3) fatty acid content, in increase in the lipid content (up 48%) and in the unsaturation index (up 0.07%) in leaves of some transgenic plants (18b and 18a/6). Increase in the unsaturation index was correlated with changes in the lipid content in analysed plants. The described transgenic lines might be more resistant to chilling damage in comparison with control ones.

The work was supported with the grant of National Academy of Science of Ukraine №0110U006062.

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ Fe-ЗАВИСИМУЮ СУПЕРОКСИДИДИСМУТАЗУ**

**Серенко Е.К., Аканов Э.Н., Чеботарева И.Б., Куренина Л.В., Гулевич А.А., Баранова Е.Н.**

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. (499) 977-09-47, факс (499) 977-09-47, e-mail: greenpro2007@rambler.ru

Для отработки методики использовали как полученные нами ранее трансгенные по FeSOD1, так и контрольные растения томата. Ген, внедренный в трансгенные растения, был снабжен сигнальной последовательностью, которая перенаправляет цитоплазматическую Fe-зависимую супероксиддисмутазу в пластиды. Предпосылкой для данной работы послужило обнаружение нами значительных ультраструктурных изменений митохондрий в трансгенных линиях как в контроле, так и при действии разных типов засоления. Для более достоверной интерпретации результатов нам необходимо понимание, связаны ли отмеченные нами изменения структуры с активацией или с подавлением дыхания, так как данные литературы в этом вопросе неоднозначны. Для оценки интенсивности дыхания трансгенные укорененные регенеранты томата линий № 8 и № 19 поколений T0, T1 и T2, а также T0-трансгенных линий № 4, № 6 (не давшие семян при самоопылении), экспрессирующих ген Fe-SOD1, помещали в пробирки с агаризованной средой, составленной по прописи МС, с добавлением хлорида и сульфата натрия, оказывающих осмотическое давление, соответствующее 400 кПа. Контрольные регенеранты культивировали на питательной среде МС как в присутствии хлорида или сульфата натрия, так и без их добавления. Каждый вариант опыта включал по 10 растений. Повторность трехкратная. При этом учитывалось, что в исследовании использовались регенеранты одинаковые по габитусу и размеру. Интенсивность дыхания определяли как отношение количества мкг CO<sub>2</sub>/в час к сухому весу (г). Для измерения дыхания в маленьких объемах была модифицирована и апробирована система измерения в небольших вегетационных сосудах *in vitro*.

Установлено, что все изученные трансгенные линии были более устойчивы к воздействию сульфата натрия, однако отличались по чувствительности к хлориду натрия в сравнении с контрольными, нетрансгенными растениями, кроме того по этому показателю отмечено наличие аналогичных реакций между исходными трансгенными линиями и растениями поколения T1 и T2. Также, можно утверждать, что существенные отличия в ультраструктуре митохондрий различных линий имеют существенную корреляцию с измерениями темного дыхания произведенного данным методом. После проведения корреляционных исследований с другими методами исследования дыхания метод может быть полезным для первичной оценки трансгенных растений на устойчивость к абиотическим факторам *in vitro*, так как при достаточном обеспечении стерильности и совпадении параметров размера растений возможно применение его без уничтожения растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-04-31508 мол\_а.



**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF TRANSGENIC TOMATO PLANTS EXPRESSING THE Fe-DEPENDENT SUPEROXIDE DISMUTASE****Serenko E.K., Akanov E.N., Chebotareva I.B., Kurenina L.V., Gulevich A.A.,  
Baranova E.N.**

All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, Timiryasevskaya str, 42, fax: (499)977-09-47, tel. (499)977-09-47, e-mail: greenpro2007@rambler.ru

For processing techniques were used as our earlier transgenic FeSOD1, and control tomato plants. The design used in the preparation of transgenic plants was supplied with a signal sequence that targets the cytoplasmic Fe-dependent superoxide dismutase into the plastids. The prerequisite for this work was the founding of significant ultrastructural changes of mitochondria in transgenic lines in the control and under the influence of different types of salinity. For a more accurate interpretation of the results, we need to understand, we are connected to the marked change in the structure with the activation or inhibition of respiration, since the literature on this issue is mixed. To estimate the rate of respiration, transgenic tomato lines rooted regenerated number 8 and number 19 generations T0, T1 and T2, and T0-transgenic line number 4, № 6 (have not given seed in self-pollination), expressing the gene Fe-SOD1, was placed in a test tube with agar, prepared according to the recipe MS supplemented with sodium chloride and sulfate providing an osmotic pressure corresponding to 400 kPa. Control regenerants were cultured on MS medium in the presence of sodium chloride or sulphate, with or without their addition. Each variant of the experiment consisted of 10 plants. When taken into account that the study used the same regenerated by habit and size. The respiration rate is defined as the ratio of CO<sub>2</sub> g / hour to the dry weight (g). To measure breathing in small volumes have been modified and approved measurement system in small pots in vitro.

Found that all transgenic lines were studied more resistant to sodium sulfate, but differed in their sensitivity to sodium chloride in comparison with control, non-transgenic plants, in addition to the presence of this indicator noted analogous reactions between source lines and transgenic plants, T1 and T2 generation. Also, it can be argued that the significant differences in the ultrastructure of mitochondria of different lines have a significant correlation with measurements of dark respiration produced by this method. After correlation studies with other methods of investigation breathing method can be useful for initial evaluation of transgenic plants tolerance to abiotic factors in vitro, as a sufficient coincidence ensuring sterility and size parameters it is possible to use plant without killing the plants.

This work was supported by RFBR grant number 12-04-31508 mol\_a.

**КЛОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНОВ В МЕРИСТЕМАХ РАСТЕНИЙ****Сидорчук Ю.В.<sup>1</sup>, Герасименко И.М.<sup>2</sup>, Казанцев А.А.<sup>2</sup>, Шелудько Ю.В.<sup>2</sup>, Дейнеко Е.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, д. 10, тел.: (383) 363-49-80, e-mail: sidorch@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, д. 148, тел. / факс: +7(380) 44 526-7104, e-mail: ysheludko@ukr.net

Методы генетической инженерии и экспериментального трансгеноза позволяют значительно ускорить процесс создания растений с новыми полезными признаками, например, более устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды, что особенно актуально в условиях быстрых климатических изменений. Однако использование для экспрессии чужеродных генов конститутивных промоторов не всегда отвечает задачам эксперимента, особенно когда продукт имеет физиологическую активность. Применение промоторов, обеспечивающих тканеспецифическую экспрессию трансгенов, позволяет накапливать чужеродные белки преимущественно в целевых тканях-мишенях, что снижает риск неблагоприятного воздействия этих белков на растение, человека и окружающую среду.

Поскольку развивающиеся цветы и другие меристематические зоны растений часто являются тканями-мишенями при действии стрессовых факторов (в частности, низких температур), представляется целесообразной экспрессия в этих тканях трансгенов, повышающих устойчивость к неблагоприятному воздействию. Для проведения тканеспецифической экспрессии трансгенов в цветочных и вегетативных меристемах растений были созданы генетические конструкции, несущие целевой ген под контролем промоторов *apetala3* и *prs4A* *Arabidopsis thaliana*. Ген *apetala3* экспрессируется в цветочных меристемах и кодирует фактор транскрипции группы В, регулирующий развитие цветка. Ген *prs4A*, кодирующий одну из субъединиц протеасомы, экспрессируется преимущественно в апикальных меристемах корня и стебля.

Промотор гена *apetala3* (длиной 641 п.н. от точки старта транскрипции) и промотор и 5'-НТР гена *prs4A* (длиной 1667 п.н. от стартового кодона) были амплифицированы из геномной ДНК *A. thaliana* и включены в векторные конструкции для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений на основе *pBIN19* для контроля экспрессии гена  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS). С помощью полученных генетических конструкций, введенных в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, была проведена трансформация табака (*Nicotiana tabacum* линия SR1). Гистохимическое определение активности  $\beta$ -глюкуронидазы в первичных трансформантах подтвердило экспрессию трансгена преимущественно в меристематических зонах растений.

Созданные генетические конструкции предусматривают возможность замены репортерного гена на другие последовательности. Это позволит использовать их для создания растений, которые экспрессируют рекомбинантные белки, участвующие в защите от стрессов, преимущественно в меристемах.

Работа выполняется при поддержке гранта НАНУ УкрИНТЭИ № 0110U006061 и УкрИНТЭИ № 0110U006062.

**CLONING AND CHARACTERIZATION OF REGULATORY ELEMENTS FOR SPECIFIC TRANSGENE EXPRESSION IN PLANT MERISTEMS****Sidorchuk Y.<sup>1</sup>, Gerasyenko I.<sup>2</sup>, Kazantsev A.<sup>2</sup>, Sheludko Y.<sup>2</sup>, Deineko E.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>The Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 630090, Novosibirsk, Lavrentyev av., 10, tel.: +7(383) 363-49-80, e-mail: sidorch@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of The National Academy of Sciences of Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho St., 148, tel. / fax: +7(380) 44 526-7104, e-mail: ysheludko@ukr.net

Methods of genetic engineering and experimental transgenesis promote the production of plants with new useful traits for example resistance to unfavorable environmental aspects that is especially actual in the conditions of fast climatic changes. However the application of constitutive promoters for foreign gene expression sometimes is not suitable especially when the expression product has a physiological activity. The usage of tissue-specific promoters for transgenesis permits accumulating of foreign proteins mainly in target tissues and reduces risk of adverse effects of these proteins on plants, humans and environment.

So far as the developing flower buds and other plant meristems are the target tissues for stresses, for instance low temperature, therefore expression of transgenes improving resistance to adverse effects in these tissues is very reasonable. Two genetic constructs with the gene of interest regulated by *apetala3* and *prs4A* promoters of *Arabidopsis thaliana* were produced for specific transgene expression in floral and vegetative meristems.

The *apetala3* gene encoding transcription factor of B group controls flower development and its expression is detected in floral meristems. The *prs4A* gene encodes one of the proteasome subunit and its expression is mainly detected in apical meristems of root and stem.

The *apetala3* gene promoter (641 bp region up-stream of the transcription start point) and the *prs4A* gene promoter (1667 bp region up-stream of the start codon) were amplified from genomic DNA of *A. thaliana* and cloned into pBIN19-based vector to provide tissue-specific *gus*-gene expression. Produced genetic constructs were used for transformation of tobacco plants (*Nicotiana tabacum*, line SR1) by GV3101 strain of *Agrobacterium tumefaciens*. Histochemical detection of  $\beta$ -glucuronidase in the primary transformants confirms the transgene expression mainly in plant meristems.

Developed genetic constructs provide for replacement of the reporter *gus*-gene by other sequences. That allows us to use them for production of transgenic plants expressing recombinant stress protection proteins in the meristems.

The work was supported by the grants of NASU (UkrISTEI № 0110U006061 and № 0110U006062).

**КУЛЬТУРА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ ИЗ *FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH**

**Ситар О.<sup>1,2</sup>, Габр А.М.<sup>2,3</sup>, Таран Н.<sup>1</sup>, Сметанская И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Кафедра физиологии и экологии растений, Киевский национальный университет Тараса Шевченка, 01601, Украина, г. Киев, Владимирская ул., д. 64, e-mail: tarantul@univ.kiev.ua

<sup>2</sup>Кафедра методов пищевой биотехнологии, Институт пищевой технологии и пищевой химии, Берлинский технический университет, 14195, Германия, Берлин, ул. Кьонигин-Луизе, д. 22, e-mail: iryna.m.smetanska@tu-berlin.de

<sup>3</sup>Кафедра биотехнологии растений, Национальный опытный центр, Египет, г. Каир, e-mail: a\_m\_gabr2@yahoo.com

Исследована возможность получения культуры трансформированных корней из различных источников эксплантов (корни, листья и стебли) из гречихи обыкновенной *Fagopyrum esculentum* Moench. Молекулярный анализ ПЦР подтвердил факт внедрения гена rol В в трансформированных корнях в растениях гречихи, передаваемого в трансгенные корни R-плазмидой *Agrobacterium rhizogenes*. Выбор оптимальных источников эксплантов в культуре трансформированных корней является важным фактором для улучшения содержания вторичных метаболитов для продукции в условиях *in vitro*. При культивировании в жидкой среде трансформированные корни показали стабильный рост и накопление большого количества биомассы. Кроме того, культура трансформированных корней производит фенольные кислоты и характеризуется повышенным содержанием общей фракции фенолов. В исследуемых культурах было идентифицировано высокое содержание хлорогеновой, р-гидроксibenзойной, р-анисовой и кофейной кислот. Культура трансформированных корней является ценным альтернативным средством получения данных фенольных кислот из *F. esculentum*.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ *PLEUROTUS OSTREATUS* КАК ОДИН ИЗ МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ И ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ЕЁ ГЕНОФОНДА

Смирнова Ю.В., Лавлинский А.В., Попов В.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования "Воронежский государственный университет", 394006, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1, тел. 8(473)2–208–876, факс 8(473) 2–208–755, e-mail: Petka7@yandex.ru

В настоящее время довольно ограничены сведения о биологии культуры макромицетов *in vitro*. Также о возможности сохранения генофонда различных видов ксилотрофных базидиомицетов в качестве мицелиальных культур. В тоже время ксилотрофные базидиомицеты заняли одно из ведущих мест в качестве объектов биотехнологии.

В процессе интродукции макромицетов происходит селекция по наиболее важным адаптивным признакам в новых условиях их существования. Для ускорения процесса их адаптации используется метод агробактериальной трансформации. В последнее десятилетие было выявлено, что помимо растительных объектов, трансформации подвергаются и мицелиальные грибы.

Метод АТМТ (*Agrobacterium tumefaciens*-ediated transformation) – промежуточная агробактериальная трансформация имеет некоторые преимущества перед другими методами трансформации: 1) -техническая простота проводимых операций; 2) -высокая частота трансформации (от 50 до 75%).

Объектами исследования являлись:

- штамм вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus* Черный принц;
- для трансформации использовался штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 с геном резистентности к канамицину (предоставлен Центром "Биоинженерия" РАН, г. Москва).
- антибиотики – канамицин, гентамицин, ивермектин.

В качестве подготовительного этапа по трансформации *Pleurotus ostreatus* был проведен опыт по совместному культивированию мобилизованных клеток агробактерий и мицелиальных клеток вешенки на стадии её экспоненциального роста (5-суточная культура). В ходе эксперимента было выявлено, что культура агробактерий не проявляет патогенеза в отношении мицелиальной культуры на всех стадиях развития гриба.

Для выявления антагонистического характера воздействия минимальных концентраций антибиотика на мицелиальную культуру, нами были протестированы разные концентрации (25, 50, 100, 150 мкг/мл) трёх антибиотиков – канамицина, гентамицина и ивермектина. В дальнейшем была подобрана минимальная концентрация антибиотика ивермектина с ингибирующим действием, которая составила 50 мкг/мл.

Для морфологического наблюдения за процессом совместного культивирования мицелия вешенки и агробактерий на субмикроскопическом уровне, нами применялся метод сканирующей электронной микроскопии. Изучаемый процесс наблюдали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380 (Япония), с применением методики вакуумного напыления золотом. Изучались морфологические особенности поверхности культуры мицелия вешенки обыкновенной в контроле и опыте (совместно с культурой агробактерий). В контрольном варианте на гифах мицелия вешенки наблюдали большое количество анаморф и бластоконидий, что свидетельствует о его активном развитии. Также мы наблюдали преимущественное расположение агробактериальных клеток на концах гиф молодого мицелия.

Таким образом, нами было выявлено, что для более успешного проведения агробактериальной трансформации предпочтительнее использовать монокультуру мицелия вешенки обыкновенной – отдельно расположенные гифы молодого мицелия.

**GENETIC ENGINEERING *PLEUROTUS OSTREATUS*  
AS ONE OF THE METHODS TO MAINTAIN AND REPRODUCE ITS GENE POOL  
Smirnova U.V., Lavlinskiy A.V, Popov V.N.**

Federal State Institution of Higher Professional Education "Voronezh State University",  
394006, Voronezh, University Square, 1, fax 8(473) 2-208-755, tel. 8(473)2-208-876,  
e-mail: Petka7@yandex.ru

At present, information on the biology of macromycetes culture in vitro are limited. In particular of various types of xylotrophic basidiomycetes as mycelial cultures. At the same time xylotrophic basidiomycetes have occupied a leading position as objects of biotechnology.

In the process of introduction of macromycetes selection is the most important adaptive features in the new conditions of their existence. To speed up the process of adaptation the method of *Agrobacterium*-mediated transformation is used. In the last decades, it was revealed that besides plant objects filamentous fungi are subjected to transformation.

ATMT method (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) – is an intermediate one, which has some advantages over other methods of transformation: 1) - the technical simplicity of operations, 2) - a high frequency of transformation (50 to 75%).

The objects of the research were:

- strain of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* (the Black Prince);
- the strain *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) is used for transformation with the help of canamycin resistance gene (provided by the Centre "Bioengineering", Russian Academy of Sciences, Moscow);
- antibiotics - kanamycin, gentamycin, ivermectin.

As a preliminary step the transformation of *Pleurotus ostreatus* experiment was carried out by co-culturing cells mobilized by agrobacteria and oyster mushroom mycelium cells at the stage of exponential growth (5 day culture). During the experiment, it was found that the culture of agrobacteria does not show pathogenesis of the mycelial culture at all stages of development of the fungus.

To detect antagonistic affects of minimum concentrations of antibiotic on mycelial culture, we have tested various concentrations (25, 50, 100, 150 µg/ml) of antibiotics - kanamycin, gentamicin and ivermectin. Further minimum of antibiotic concentration ivermectin (50 µg/ml) was chosen.

For morphological observation of the process of co-culture cultivation of oyster mushroom mycelium and agrobacteria on submicroscopic level, we used the method of scanning electron microscopy. The process under study was observed using scanning electron microscope JSM-6380 (Japan), by using the method of vacuum gold deposition.

The morphological peculiarities of the surface of mycelium *Pleurotus ostreatus* under control and in the experiment (together with culture of agrobacterium) were studied. A lot of anamorphae and blastokонидии were found on hyphae of oyster mycelium, which indicates to its active development.

Also, the preferential location of agrobacteria cells at the hyphae ends of young mycelium was observed.

Thus, it was revealed that for more preferable process of agrobacterial transformation it is much better to use the monoculture of mycelium *Pleurotus ostreatus*, separately disposed hyphae of young mycelium.

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ:  
НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ****Тюрин А.А.,<sup>1,2</sup> Бердичевец И.Н.<sup>1</sup>, Мустафаев О.<sup>1</sup>, Никифорова Х.Р.<sup>1</sup>, Фадеев В.С.,<sup>1</sup>  
Голденкова-Павлова И.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35; тел. (499) 231-83-15, факс (499) 977-80-18, e-mail: irengold58@gmail.com

<sup>2</sup>Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, e-mail: alexjofar@gmail.com

Создание экспериментальных моделей трансгенных растений для функциональной геномики, как и успех в создании новых форм растений с заданными свойствами или использовании их в качестве продуцентов, зависят от эффективности работы перенесенных генов. Эффективность экспрессии генов регулируется на разных уровнях: транскрипции, трансляции, и стабильности белкового продукта переносимого гена. Несмотря на бурное развитие генной инженерии растений доступных и охарактеризованных растительных регуляторных элементов невелико, поэтому поиск регуляторных элементов, а также генетических детерминант, важных для оптимальной экспрессии переносимого гена в растениях является актуальным направлением исследований.

Нами предложен новый подход для конструирования экспериментальных моделей с целью дальнейшего создания трансгенных растений, как для фундаментальных исследований, так и перспективных для биотехнологии. Этот подход основан на поиске, анализе, конструировании и апробировании генетических детерминант, которые обуславливали бы не только эффективную, но и оптимальную экспрессию целевых генов в растениях, а также стабильность их белковых продуктов. Для поиска и анализа генетических детерминант, важных для оптимальной экспрессии переносимого гена в растениях, нами создана база данных FlowGene, которая имеет программное обеспечение, позволяющее формировать произвольные выборки нуклеотидных последовательностей генов с целью их дальнейшего анализа по различным параметрам.

Экспериментальная верификация функциональной значимости генетических детерминант, потенциально влияющих на уровень экспрессии гетерологичных генов, показала, что оптимальное окружение иницирующего кодона, размер и состав 5'-нетранслируемой области, а также кодоновый состав гетерологичного гена вносят значимый вклад в оптимизацию уровня экспрессии гетерологичных генов в растениях.

Предложенный подход был успешно апробирован в растительных системах с использованием репортерного и целевых генов, таких как: ген *gox* и *goxmod*, кодирующие бактериальную глюкозооксидазу; ген *CYP11A1*, продукт которого кодирует митохондриальный цитохром P450<sub>SCC</sub>; ген *inf-2*, кодирующий интерферон-альфа2A; ген *ero* и *ероM*, кодирующий эритропоэтин.

Полученные результаты продемонстрировали, что такой подход позволяет разработать оптимальные системы экспрессии гетерологичных генов в растениях и создать оптимальные экспериментальные модели трансгенных растений, перспективные для фундаментальных исследований и биотехнологии.

**HETEROLOGOUS GENE EXPRESSION IN PLANT SYSTEMS: NEW OPPORTUNITIES****Turin A.A.,<sup>1,2</sup> Berdichevats I.N.<sup>1</sup>, Mustafaev O.<sup>1</sup>, Nikiforova Ch.R.<sup>1</sup>, Fadeev V.S.,<sup>1</sup>  
Goldenkova-Pavlova I.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, 127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35; fax (499) 977-80-18, tel. (499) 231-83-15, e-mail: irengold58@gmail.com

<sup>2</sup>Russian State Agrarian University – MTAА named after K.A. Timiryazev, Moscow, e-mail: alexjofar@gmail.com

Creation of transgenic plants as models for functional genomics, as well as success in creating new forms of plants with desired properties or use them as producers depend on the efficiency of the transferred genes. Efficiency of gene expression is regulated at different levels: transcription, translation, and stability of the protein product of the gene. Despite the rapid development of plant genetic engineering and characterized available plant regulatory elements is small, so the search of regulatory elements, as well as genetic determinant important for optimal expression of the transferred gene in plants is the actual area of research.

Нами предложен новый подход для конструирования экспериментальных моделей с целью дальнейшего создания трансгенных растений, как для фундаментальных исследований, так и перспективных для биотехнологии. Этот подход основан на поиске, анализе, конструировании и апробировании генетических детерминант, которые обуславливали бы не только эффективную, но и оптимальную экспрессию целевых генов в растениях, а также стабильность их белковых продуктов. Для поиска и анализа генетических детерминант, важных для оптимальной экспрессии переносимого гена в растениях, нами создана база данных FlowGene, которая имеет программное обеспечение, позволяющее формировать произвольные выборки нуклеотидных последовательностей генов с целью их дальнейшего анализа по различным параметрам.

We have proposed a new approach for the design of experimental models to further the generation of transgenic plants, both for basic research and looking to biotechnology. This approach is based on the search, analysis, design and testing of genetic determinants that cause not only effective, but also the optimal expression of target genes in plants, as well as the stability of their protein products. To search for and analysis of genetic determinants that are important for optimal expression of the transferred gene in plants, we have created a database FlowGene, which has software to generate random sample of nucleotide sequences of the genes for the purpose of further analysis of the various options.

Experimental verification of the functional significance of the genetic determinants potentially influencing the level of expression of heterologous genes, showed that the optimal ATG codon environment, size and composition of the 5'-untranslated region and a heterologous gene codon composition contribute significantly to the optimization of the expression level of heterologous genes in plants.

The proposed approach has been successfully tested in plant systems using a reporter and target genes, such as gene *gox* and *goxmod*, encoding bacterial glucoseoxidase; gene *CYP11A1*, which encodes a product mitochondrial cytochrome P450<sub>SCC</sub>, *inf-2* gene encoding *IFN-alpha2A*; *epo* and *epoM* gene, encoding erythropoietin.

The results showed that this approach allows the development of optimal systems of heterologous gene expression in plants and create the optimal experimental models of transgenic plants promising for basic research and biotechnology.



**АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СОРГО *IN PLANTA*  
И В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ  
С ИЗМЕНЕННЫМ СОСТАВОМ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ**

Эльконин Л.А.<sup>1</sup>, Итальянская Ю.В.<sup>1</sup>, Баранкова И.В.<sup>1</sup>, Носова О.Н.<sup>1</sup>, Ракитин А.Л.<sup>2</sup>,  
Равин Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии, 410010, г. Саратов, ул. Тулайкова, д. 7, факс (845) 264-76-88, тел. (845) 264-83-38, e-mail: lelkonin@gmail.com

<sup>2</sup>Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, д. 7, корп.1, факс (499) 135-05-71, тел. (499) 783-32-64, e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Одним из наиболее перспективных направлений использования генной инженерии является создание трансгенных растений с измененным составом запасных белков эндосперма. Для решения этих задач активно используются технологии РНК-интерференции, позволяющие строго специфическим образом «выключать» экспрессию отдельных генов. За последние годы эти технологии стали активно использоваться не только у двудольных растений, но и у злаков, составляющих основу питания человека и кормовой базы животноводства. Особую актуальность эти исследования приобретают для сорго – высокоурожайной засухоустойчивой культуры, существенным недостатком которой является сниженная, по сравнению с другими злаками, перевариваемость запасных белков и крахмала. Однако высокоэффективная генетическая трансформация у сорго является серьезной проблемой. Основными препятствиями являются низкая частота регенерации трансгенных растений и интенсивный сайленсинг трансгенов.

Нами в течение ряда лет разрабатывались различные подходы для агробактериальной трансформации растений зернового сорго, основанные на использовании методов культуры *in vitro*, или инокуляции цветущих изолированных метелок в условиях *in planta*. С использованием штамма *A. tumefaciens* AGL0/p35SGIB, несущего в составе Т-ДНК маркерный ген *bar*, у линий Желтозерное 10 (Ж10) и КВВ-45 были получены трансгенные растения. При этом частота незрелых зародышей, продуцировавших каллусы, из которых были регенерированы ПЦР-положительные растения, составляла 6.6-9.1%. Важнейшими факторами, повышающими частоту регенерации трансгенных растений, являются условия выращивания агробактериальной суспензии перед инокуляцией, а также приемы, усиливающие эмбриогенные потенции культивируемых тканей: культивирование зародышей на разработанной нами ранее питательной среде М11, модификация условий сокультивирования, удаление селективного агента (глюофосината аммония) из среды для регенерации. У линии КВВ-114, не способной к формированию эмбриогенного каллуса из незрелых зародышей, трансгенные растения, несущие ген *bar*, были получены с помощью агробактериальной трансформации цветущих метелок. Частота трансгенных растений в потомстве каждой из инокулированных метелок составляла 1%. ПЦР-анализ показал, что введенные трансгены наследовались в самоопыленном потомстве в течение 2 поколений. Экспрессия трансгенов в генотипах Ж10 и КВВ-45 носила, как правило, рецессивный характер; у КВВ-114 наблюдался сайленсинг.

Разработанные методы были использованы нами для получения трансгенных растений сорго, несущих генетическую конструкцию, способную к индукции РНК-сайленсинга гена гамма-кафирина. Этот белок, расположенный по периферии белковых телец клеток эндосперма, отличается устойчивостью к протеолитическому расщеплению и снижает питательную ценность зерна сорго. У линии Ж10 получены трансгенные растения, несущие эту конструкцию. У одного из растений в поколении Т1 обнаружены зерновки с измененным спектром запасных белков и структурой эндосперма, в котором происходила редукция стекловидного слоя, замещавшегося мучнистым, характеризующимся более высокой перевариваемостью белков и крахмала.

Работа поддержана РФФИ, гранты 10-04-00475, 13-04-01404.

**AGROBACTERIUM-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF SORGHUM IN  
IN PLANTA AND IN VITRO CONDITIONS AND OBTAINING OF TRANSGENIC  
PLANTS WITH MODIFIED COMPOSITION OF SEED STORAGE PROTEINS****Elkonin L.A.<sup>1</sup>, Italianskaya J.V.<sup>1</sup>, Barankova I.V.<sup>1</sup>, Nosova O.N.<sup>1</sup>, Rakitin A.L.<sup>2</sup>,  
Ravin N.V.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Agricultural Research Institute for South-East Region, Russian Academy of Agricultural Sciences, 410010, Saratov, Tulaikov str., 7, fax (845) 264-76-88, tel. (845) 264-83-38, e-mail: lelkonin@gmail.com

<sup>2</sup>Centre "Bioengineering", RAS, Russia, 117312, Moscow, Prospekt 60-Letiya Oktyabrya, 7/1, tel. (499) 783-32-64, fax (499) 135-05-71, e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Development of transgenic plants with modified content of seed storage proteins is one of the most important applications of genetic engineering. To solve these problems RNA interference technology is widely used. This technology allows strictly specific down-regulation of expression of individual genes. With the development of genetic transformation methods, it is efficiently used not only for dicotyledonous species but also for cereals that are the basic source of mankind nutrition and livestock forage. These investigations are especially important for sorghum, a unique drought-tolerant highly-productive crop species, significant drawback of which is relatively low, in comparison with other cereals, digestibility of starch and storage proteins. However, high-throughput genetic transformation of sorghum is a major problem. The main obstacles are the low frequency of transgenic plant regeneration and intense silencing of transgenes.

For several years we have developed a variety of approaches for Agrobacterium-mediated genetic transformation of grain sorghum based on the *in vitro* culture methods, and on the inoculation of flowering panicles in *in planta* conditions. Using the *A. tumefaciens* strain AGL0p35SGIB with the bar gene under the nos-promoter in the T-DNA region, we have obtained transgenic plants in the grain sorghum lines Zheltozymoe-10 (Zh10) and KVV-45. The frequency of immature embryos that produced calluses, from which PCR-positive plants were regenerated, was 6.6-9.1% that exceeds reported frequencies for Agrobacterium-mediated genetic transformation for sorghum in *in vitro* culture. The most important factors affecting regeneration of transgenic plants were conditions of growing of agrobacterial suspension before inoculation, and techniques increasing embryogenic potentials of cultured tissues, such as cultivation of immature embryos on the M11 medium, modification of co-cultivation conditions, omitting selective agent (ammonium glufosinate) from the regeneration medium. Immature embryos of KVV-114 did not produce embryogenic callus, and in this line transgenic plants were obtained by inoculation of flowering panicles. In the progeny of each inoculated panicle the frequency of fertile PCR-positive transgenic plants survived BASTA application was approx. 1%. PCR analysis confirmed inheritance of the transgene (bar) for two generations. In the Zh10 and KVV-45, as a rule, recessive mode of transgene expression was observed; in KVV-114 silencing was found.

The elaborated methods of Agrobacterium-mediated genetic transformation have been used for the obtaining of transgenic sorghum plants carrying the genetic construct capable of inducing RNA silencing of the gamma-kafirin gene. This protein located on the periphery of the protein bodies of endosperm cells, is characterized by high resistance to proteolytic digestion and reduces the nutritional value of sorghum grain. In the line Zh10, the transgenic plants carrying this genetic construct were obtained. In one of plants studied from T1 generation, the kernels with modified endosperm structure and storage protein composition were found. Total protein electrophoretic spectrum in these kernels differed significantly from original line: the bands corresponding to gamma-kafirin and, possibly, kafirin dimers were absent; while a few new bands appeared. In these kernels, peripheral vitreous layer was absent or was significantly reduced and replaced by the floury endosperm that is known to be characterized by higher level of protein and starch digestibility.

This work was funded partly by the Russian Foundation for Basic Researches, grants 10-04-00475, 13-04-01404.

**Секция 5.**  
**Коллекции культур клеток и**  
**тканей растений и методы**  
**сохранения генофонда**

**SECTION 5.**  
**Collections of plant cell and tissue**  
**cultures; the methods of gene pool**  
**preservation**

## КРИОСОХРАНЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ЗЕМЛЯНИКИ *FRAGARIA L.*

<sup>1</sup>Балекин А.Ю., <sup>2</sup>Высоцкая О.Н.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, И-276,  
ул. Ботаническая, д. 35, e-mail: <sup>1</sup>balekin\_a@zelnet.ru, <sup>2</sup>cryostyle@rambler.ru

В настоящее время генетическое разнообразие растений постоянно снижается из-за антропогенного влияния. Поэтому важно сохранять коллекции различных видов и сортов растений для будущего. Известно, что криосохранение семян, пыльцы, изолированных тканей и клеток растений является наиболее экономически эффективным способом длительного хранения растительного материала. Это возможно потому, что при криогенных температурах, ниже  $-132^{\circ}\text{C}$  вода переходит в стекловидное состояние и обменные процессы в живых клетках останавливаются. Мы полагаем, что устойчивый к криогенному замораживанию растительный материал земляники (частично дегидратированные образцы пыльцы, семян и апексов, изолированных из растений, культивированных *in vitro*) можно сохранять при криогенных температурах без снижения его жизнеспособности. Для того, чтобы проверить это предположение, мы протестировали фертильность пыльцы, всхожесть семян и жизнеспособность апикальных меристем после криосохранения. Семена земляники (*Fragaria vesca* L., сорт Rujana) мы сохраняли при комнатной температуре и в жидком азоте. Всхожесть семян анализировали через месяц проращивания в теплице. После криосохранения 85% семян дали всходы. Этот показатель существенно не отличался от всхожести семян, которые хранили при комнатной температуре. Хорошо известно, что селекционных целей часто используют пыльцу, которую хранят в холодильнике ( $0-10^{\circ}\text{C}$ ). Однако при таких условиях хранения пыльцевые зерна быстро теряют фертильность. Для того чтобы проверить можно ли пыльцу земляники использовать после криосохранения мы оценили её устойчивость к криогенному замораживанию и хранению в жидком азоте. Цветки земляники (*F. x ananassa* Duch., cv. Clatter Star ) собрали в открытом грунте. Пыльцу извлекали из пыльников и 4 часа подсушивали на полосках фильтровальной бумаги над силикагелем. Затем полоски с пыльцой помещали в криоампулы и погружали в жидкий азот. После криосохранения образцы пыльцы оттаивали при комнатной температуре. Фертильность пыльцы оценивали после опыления цветков земляники с редуцированными пыльниками (*F. x ananassa* Duch., cv. Mizee Schindler ). В нашем эксперименте все опыленные цветки дали плоды с жизнеспособными семенами. Таким образом, показано, что пыльца земляники после хранения в жидком азоте оставалась фертильной. Кроме того, мы замораживали в жидком азоте дегидратированные апексы земляники (*F. x ananassa* Duch., cv. Clatter Star ) и использовали для этого метод, разработанный в Институте Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева (Патент № 2302107, RF). Для криосохранения растения выращивали *in vitro* в течение 2-4 недель ( $20-25^{\circ}\text{C}$ , 16-ч день, освещённость: 5-8 клк), а затем переносили в холодную камеру ( $4-10^{\circ}\text{C}$ , 4-х часовой день, освещённость: 1 клк) для адаптации. Через месяц из этих растений выделяли апексы (1-2 мм) и помещали их на модифицированную среду МС, дополненную 0,8 М сахарозы. Спустя два дня, апексы переносили на фильтровальную бумагу и 4 часа подсушивали в потоке воздуха ламинар-бокса. Криоампулы с апексами погружали в жидкий азот на срок не менее часа. Затем апексы оттаивали и помещали на агаризованную среду, дополненную 2% сахарозы, 1% глюкозы и 0,5 мг/л 6-бензиламинопурином. После криосохранения оказалось, что некоторые криоампулы заполнены жидким азотом. Однако, все апексы из криоампул, как заполненных, так и не заполненных азотом, восстановили свой рост ( $18-20^{\circ}\text{C}$ , 16-ч день, освещённость 1 клк). Растения после образования листьев и корней высаживали в теплицу, а затем в открытый грунт, где они цвели и плодоносили. Таким образом, нами показано, что для криосохранения растительного материала земляники можно использовать методы, не требующие программируемых замораживателей. Работа выполнена при поддержке проекта фундаментальных исследований Российской Академии Наук: "Живая природа".

**CRYOPRESERVATION OF STRAWBERRY PLANT MATERIAL (*FRAGARIA* L.)****<sup>1</sup>Balekin A.Y., <sup>2</sup>Vysotskaya O.N.**

Timiriazev Institute of Plant Physiology of Russian Academy of Science, 127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35, tel. (499) 977-93-63, fax. (499) 977-80-18, e-mail:

<sup>1</sup>balekin\_a@zelnet.ru, <sup>2</sup>cryostyle@rambler.ru

In our time, plant diversity decrease due to anthropogenic impact constantly. Therefore it is important preserve a collections of different species and varieties of plants for the future. It is known, that cryopreservation of seeds, pollen, isolated tissues and cells is the most cost-effective way to long-term storage of plant material. This is possible because, that at cryogenic temperatures (below -132 °C) water transform to glass state and the metabolic processes in living cells are terminated. We were expected that cryoresistance plant material of strawberry (partially dehydrated specimens of pollen, seeds and of apices, isolated from in vitro plantlets) may be stored at liquid nitrogen temperatures without decrease of viability. In order to verify of this opinion, we tested the pollen fertility, seed germination and viability of meristem apices after they cryopreservation.

Seed of strawberry (*Fragaria vesca* L., var. Rujana) were stored in room temperature and in liquid nitrogen. Their germination was analyzed after one month's sprouting in greenhouse. After cryopreservation, 85% of the seeds sprouted. This rate was not significantly different from the germination of seeds which were stored in room.

Well-know that pollen of different crops, which use for plant breeding, often, is kept in the refrigerator (0-10 °C). However, under these conditions, storing pollen grains quickly lose viability. In order to test the possibility of using strawberry pollen after cryopreservation, we investigated its resistance to cryogenic freezing and storage in liquid nitrogen. The flowers of strawberry (*F. x ananassa* Duch., cv. Clatter Star) harvested on plantations. Pollen isolated from anther and dried on filter paper strips over silica gel 4 hour. Dehydrated pollen is placed in cryoampoules and immersed in liquid nitrogen. After cryopreservation pollen specimens were thawed at room temperature. Pollen fertility was determined by pollination of strawberry flowers with reduced anthers *F. x ananassa* Duch., cv. Mieke Schindler). As a result, all pollinated flowers were given fruit with viable seeds. It is shown that pollen strawberries after storage in liquid nitrogen remained fertile.

In addition, we carried experiments to freeze of dehydrated apices of strawberry (*F. x ananassa* Duch., cv. Clatter Star) in liquid nitrogen and for this, we used the method developed at Timiriazev Institute of Plant Physiology (Patent № 2302107, RF). For cryopreservation plants were cultured in vitro 2-4 weeks (20-25 °C, 16-hr day, 5-8 klx brightness), then transferred to a cold room (4-10 °C, 4-hr day, 1 klx brightness) for adaptation. A month later apices (1-2 mm) of these plants was isolated and placed on modified MS medium supplemented with 0.8 M sucrose. After two days, apices transferred onto filter paper and dried during 4 hours under air flow of laminar-box. Cryotubes with dehydrated apices immersed in liquid nitrogen for a period of not less than one hour. After cryopreservation apices were thawed and placed on agar medium with 2% sucrose, 1% glucose and 0.5 mg/l 6-benzylaminopurine. After cryopreservation some cryotubes contained the liquid nitrogen, in addition to apices. We observed that growth of 100% apices, which taken out from cryotubes with liquid nitrogen and without it, was recovered (18-20 °C, 16-hr day in 1 klx). Plants after the formation leaves and roots were cultivation ex vitro in the greenhouse. Adapted plants were transferred to field conditions, where they formed flowers and fruits. Thereby our experimental data showed that for freezing in liquid nitrogen of strawberry plant material may be use cryopreservation methods that do not require programmed freezers.

Work was supported by Project of Fundamental Researches of the Russian Academy of Sciences: "Living Nature".

## ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА

Х.И.Бободжанова, Абдулалишоева С.Ф., Ясаулова Ш.К., Бабаева С.Х.

Центр биотехнологии Таджикского национального университета, 734025, Таджикистан, г. Душанбе, пр. Рудаки, д. 25, тел. (992-37) 221-79-11, e-mail: bobojankh\_7@bk.ru

Одной из основных отраслей агропромышленного комплекса Республики Таджикистан являются садоводство и виноградарство, которые играют достаточно важную роль в обеспечении населения продовольствием, увеличении экспортного потенциала страны и создании постоянных рабочих мест для населения. В стране возделываются самые разнообразные сорта винограда, среди них также можно встретить сорта, представленные несколькими кустами на коллекционных виноградниках или одним-двумя на приусадебных участках у виноградарей любителей, часть из них находится на грани исчезновения.

Недостаток посадочного материала является одной из главной причин медленного внедрения сортов в производство. Низкокачественный и зараженный патогенами посадочный материал как правило становится источником распространения опасных болезней и вредителей.

Метод микрочлониального размножения *in vitro* наиболее эффективный путь ускоренного получения посадочного материала ценных сортов винограда. В то же время, способность растений к размножению в условиях *in vitro* зависит от индивидуальных особенностей сорта. Выявление оптимальных условий роста и развития растений в культуре *in vitro* позволяет реализовать высокие коэффициенты размножения, получить адаптированные к условиям *in vivo* растения-регенеранты, снизить материальные затраты на химические реактивы, гормоны, питательные среды.

Данный метод нашел широкое применение в мире, в то же время разработанные технологии не являются универсальными для всех групп сортов и видов растений. Имеющиеся в литературе сведения противоречивы, не выявлены общие закономерности развития близких групп и видов.

В Таджикистане метод культуры изолированных тканей винограда до последнего времени не применялся. Исследования, проводимые в центре биотехнологии, направлены на выявление оптимальных условий и состава питательных сред для оздоровления и выращивания регенерантов с целью получения оздоровленного посадочного материала. С этой целью сформирована рабочая коллекция разнообразных сортообразцов винограда, собранная из различных регионов Таджикистана. Результаты исследований внесут вклад в решении задач Целевой Государственной программы развития садоводства и виноградарства, выращивания саженцев плодов и винограда в Республике Таджикистан.

**GROWING TECHNOLOGY OF  
SOME VARIETIES OF GRAPE *IN VITRO***

**Bobodzhanova Kh.I., Abdulalishoeva S.F., Yasaulova Sh. K., Babaeva S. Kh.**

Center of Biotechnology of the Tajik National University, 734025, Tajikistan, Dushanbe, Rudaki Str., 17, tel. (992-37) 221-79-11, e-mail: bobojankh\_7@bk.ru

One of the main sectors of agriculture of the Republic of Tajikistan are the horticulture and viticulture, which play a fairly important role in the provision of food, increase the export potential of the country and the creation of permanent jobs for the population. The country has cultivated a wide variety of grape. Some of the varieties of the grape can be found only on farmers' vineyards or home gardens. Most of them are critically endangered.

The lack of planting material is one of the main reasons of the slow implementation of varieties in production. Low quality and infected planting material with pathogens usually becomes the source of the spread of dangerous diseases and pests.

*In vitro* method is the most effective way of obtaining the seedlings of grape varieties. At the same time, the ability of plants to reproduce in condition of *in vitro* depends on the individual species. Revealing the optimal conditions of growth and development of plants in method *in vitro* allows high rates of reproduction, gets plants adapted to the *in vivo* conditions and reduces costs for chemicals, hormones, and growth media.

While developed technology is not universal for all groups of varieties and species this method is widely used in the world. Available research data is contradictory. There are no identified common patterns of development and related groups of species.

The method of tissue culture on grapes has not been applied in Tajikistan until recently. Studies conducted in the Center of Biotechnology aimed to identify the optimal conditions of growth media for the recovery and growth of plants to produce improved planting material. For this purpose has been formed a collection of various grape variety samples collected from different regions of Tajikistan. The research results will contribute on solving the problems of state programs for the development of horticulture and viticulture, growing seedlings of fruit and grapes in Tajikistan.

**ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА НА РАЗВИТИЕ  
МИКРОРАСТЕНИЙ ЖИМОЛОСТИ  
ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ**

**Валиков В.А.**

НПЦ биотехнологии «Фитогенетика», Россия, г. Тула, тел. (4872) 41216,  
факс (4872) 413116, e-mail: pbfitogenetika.ru,

Изучали влияние света различного спектрального состава, на рост и развитие растений жимолости при микроразмножении *in vitro*.

Испытывали различные источники освещения: люминесцентные лампы белого свечения ЛБ–40 (контроль); люминесцентные лампы ЛФ 40-5 (преобладание синего света); люминесцентные лампы ЛФ 40-4 (преобладание красного света).

Опыты проводили на сортах жимолости съедобной: Волшебница, Волхова, Мальвина, Амфора, Алтайр.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что микрорастения практически всех испытанных сортов жимолости развивались более интенсивно при освещении светом с преобладанием в спектре синих лучей. При таком освещении у микропобегов жимолости в отличие от красного и белого света развивались более длинные корни. Исключение составляли только микрорастения сорта Мальвина, у которых развитие корневой системы не зависело от спектрального состава света.



## ДЛИТЕЛЬНОЕ БЕСПЕРЕСАДОЧНОЕ ХРАНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ОСИНЫ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

**Видягина Е.О., Филиппов М.В., Шестибратов К.А.**

Филиал федерального бюджетного учреждения науки института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл. г. Пушкино, проспект Науки, д. 6, тел. (4967) 330966, факс (4967) 330527, e-mail: vidyagina@mail.ru

Осина (*Populus tremula*) и её гибриды широко используется в биотехнологии как модель для изучения различных аспектов генетики лесных древесных растений. Это связано с рядом причин: относительно небольшой размер генома и возможность его эффективной трансформации, быстрый рост, простота клонального микроразмножения и выращивания *in vitro*. Однако длительное культивирование в условиях *in vitro* может привести к появлению соматических изменений растений, а также требует больших расходов по сохранению в условиях *in vitro* в фазе активного роста. В настоящее время длительное беспересадочное депонирование *in vitro* культур и создание банка генотипов рассматривается как способ сохранения растений, обладающих ценными свойствами. В этой связи нами были разработаны две методики сохранения *in vitro* культур с использованием таких приемов как депонирование при положительных температурах (+4 °С) и криоконсервация (-190 °С). Основопологающим принципом для разработанных методик длительного хранения микропобегов *in vitro* является снижение содержания воды в тканях растения. Обе методики были апробированы на 63 различных генотипах осины и подходят для хранения растений с рекомбинантными генами и ценных нетрансформированных генотипов.

В основе хранения при низких положительных температурах лежит изменение состава сахаров в питательной среде: вместе с легко метаболизируемой сахарозой добавляются такие осмолитики как сорбитол и маннитол. Кроме изменения состава питательной среды использовался короткий световой период – 8ч день/16ч ночь. Подобный метод депонирования позволяет хранить растения без пересадок сроком до года. Выживаемость микропобегов у всех 63 генотипов трансформированных и нетрансформированных линий осины после года депонирования достигала 99%.

Криоконсервация в жидком азоте позволяет увеличить время хранения до нескольких лет. Однако известно, что криоконсервация органов растений является трудоёмким процессом и процент выживания очень низок. При замерзании клеток образующиеся кристаллы воды из вакуолей нарушают целостность клеточной стенки, что приводит к гибели клеток. Разработанная нами методика опирается на использование меристемной ткани почек с низким содержанием воды, что позволяет увеличить выживаемость растительных клеток и обеспечивает быстрое восстановление культуры. Также нами использовались среды с осмолпротекторами, такими как DMSO, глицерол, ПЭГ и сахара. Замораживанию подвергались пазушные почки, обезвоженные раствором, включающим 2 М глицерола и 0,4 М сахарозы. Почки переносились в среду для замораживания с 30% глицеролом, 15% DMSO и 15% ПЭГ. Использовалась шоковая заморозка – непосредственное погружение в жидкий азот. Размораживание культуры обеспечивалось быстрым нагреванием до 45 °С, отмывкой от осмолпротекторов, переносом эксплантов на среды для регенерации и восстановления. Выживание эксплантов всех генотипов после года криоконсервации было достаточно высоким и достигало 53%. Статистически значимых отличий в выживаемости у трансгенных и нетрансгенных клонов обнаружено не было.

Таким образом, разработанные нами методики хранения являются достаточно эффективными для успешного депонирования различных генотипов осины. В дальнейшем нами планируется разработать технологии для длительного беспересадочного хранения других видов растений.

**LONG-TERM OF DIFFERENT ASPEN GENOTYPES *IN VITRO* WITHOUT REPOTTING****Vidvagina E.O., Filippov M.V., Shestibratov K.A.**

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, 142290 Moscow Region, Pushchino, Avenue of Science, 6, tel. (4967) 330966, fax (4967) 330527, e-mail: vidjagina@mail.ru

Aspen (*Populus tremula*) and its hybrids are widely used in biotechnology as a model of studying of various aspects of forest trees genetics. This is due to several reasons: the relatively small size of the genome and the possibility of its effective transformation, rapid growth, ease of cultivation and clonal microreproduction *in vitro*. However, prolonged cultivation *in vitro* may cause somaclonal changes in plants, and is expensive to preserve them *in vitro* in a phase of active growth. Currently, long-term deposit of cultures *in vitro* without repotting and the creation of a bank of genotypes considered as a way to save the plants with valuable properties. Due to this information, we have developed two methods of preservation cultures *in vitro* using such techniques as deposit at positive temperatures (+4 °C) and cryopreservation (-190 °C). The fundamental principle of the developed techniques for long-term storage of microshoots *in vitro* is the water content reduction in the plant tissue. Both methods were tested on 63 different genotypes of aspen and they fit for storing plants with recombinant genes and valuable untransformed genotypes.

The base of storage at low temperatures is change in the composition of sugars of nutrient medium: easily metabolizable sucrose and such osmolytic agents as sorbitol and mannitol are added. In addition to changing the composition of the nutrient medium short light period - 8h day/16h night was used. Such method of deposit allows storing the plants up to one year. Microshoots survival level in all 63 genotypes of transformed and non-transformed lines of aspen after a year of deposit reached 99%.

Cryopreservation in liquid nitrogen allows increasing the storage time up to several years. However, we know that the cryopreservation of plant is labor-intensive process and the level of survival is very low. The crystals of ice from the water of vacuoles damage the cell wall, which leads to the cell death. We have developed a technique based on the use of buds' meristem tissue with low water content, which allows increasing the survival rate of plant cells and provides fast culture recovery. Also, we used the medium with osmoprotectors such as DMSO, glycerol, PEG, and sugar. Axillary buds were frozen, dehydrated by the solution which includes 2 M of glycerol and 0,4 M of sucrose. The buds were transferred into the medium for freezing containing 30% glycerol, 15% DMSO and 15% PEG. The shock freezing was used – the direct immersion into liquid nitrogen. Defrosting of culture was provided by rapid heating up to 45 °C, washing off the osmoprotectors, transfer of explants on medium for regeneration and recovery. The survival level of the explants of all genotypes after a year of cryopreservation was high enough and reached 53%. Statistically significant difference in survival rate of transgenic and non-transgenic clones were not found.

Thus, we have developed techniques that are quite effective for successful storage of different genotypes of aspen. In the future we plan to develop technologies for long-term storage of other species of plants without repotting.

## СОХРАНЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЛЮЦЕРНЫ ПОСЛЕ КРИОХРАНЕНИЯ В ТЕЧЕНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВРЕМЕНИ.

Волкова Л.А., Урманцева В.В., Носов А.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва, e-mail: la-volkova@yandex.ru

Культивируемые в суспензии клетки могут использоваться в качестве продуцентов ценных биологически активных веществ, а также источников для производства ферментов, в том числе пероксидаз. Интерес к изучению и использованию последних не ослабевает, поскольку появление пероксидаз с повышенной стабильностью и отличной субстратной специфичностью, могло бы повысить качество фермент-содержащих наборов и стимулировать разработку новых аналитических методов и промышленных процессов. Клетки суспензионной культуры люцерны, характеризующиеся высокой активностью пероксидазы, были возобновлены после хранения в жидком азоте (-196 °С) 27 лет. Несмотря на низкий уровень выживаемости (18-20%) клетки сохранили способность к делению, жизнеспособность к 16-му циклу роста увеличилась до 80-90% и ростовые показатели по числу клеток, сухой и сырой биомассе, а также уровню активности пероксидазы были близки к исходным (до криохранения). Аналогично исходной, в возобновленной суспензионной культуре наблюдались 2 пика активности пероксидазы. Первый пик с максимальной активностью (3000-3500 ммоль/г сухой массы) приходился на 14 сутки в стационарную фазу роста, а второй – на 26 сутки в фазу деградации. Клетки люцерны после криохранения сохранили высокую чувствительность к осмотическому стрессу, также как и клетки до замораживания. Эта чувствительность выражалась в резком снижении выживаемости до 20%. После процедуры замораживания-оттаивания число выживших клеток было также на уровне 20%, что указывает на действие осмотического стресса в качестве основного повреждения клеток. Наряду с сохранением ряда показателей наблюдали также и изменение некоторых параметров. Так, цитогенетический анализ показал, что в цикле роста на 14-е сутки превалировали клетки с гаплоидным и диплоидным набором хромосом, и только на 21-е сутки увеличилась частота полиплоидных клеток (до 65%). В исходной суспензионной культуре уменьшение диплоидных и увеличение высокоплоидных клеток наблюдали уже на 7-е сутки, а на 12-14-е сутки уровень последних составил 80%. Успех низкотемпературного криоконсервирования зависит от целого ряда факторов: генетических и морфологических особенностей клеток, состава среды консервирования, вида и концентрации криопротектора, режима охлаждения и условий оттаивания. В наших экспериментах при глубоком замораживании клетки подвергались двухступенчатому режиму охлаждения. Первая ступень включала охлаждение до -5 °С с низкой скоростью (0,5 °С/мин) и последующей инициацией кристаллизации; дальнейшее охлаждение до -70 °С производилось с большей скоростью и после этого ампулы с клетками быстро переносили в жидкий азот. Защита клеток осуществлялась с помощью 7% диметилсульфоксида (ДМСО). Известно не только криопротекторное свойство ДМСО, а также его антиоксидантное действие в условиях гипотермии. Наряду с действием ДМСО одной из причин возобновления суспензионной культуры люцерны при низком уровне выживаемости может быть высокая активность гваякол-зависимой пероксидазы и альтернативной (цианрезистентной) оксидазы у исходных клеток, у которых наблюдалось резкое повышение активности пероксидазы при действии низкой температуры.

**ОСОБЕННОСТИ КРИОГЕННОГО ХРАНЕНИЯ ДЕГИДРАТИРОВАННЫХ  
АПЕКСОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ (*FRAGARIA L.*)  
КУЛЬТИВИРОВАННЫХ *IN VITRO***

**Высоцкая О.Н.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, 127276, ул. Ботаническая, д. 35, тел. (499) 977-93-63, факс (499) 977-80-18, e-mail: [cryostyle@rambler.ru](mailto:cryostyle@rambler.ru)

Сохранение в полевых и коллекциях *in vitro* видов и сортов растений, размножаемых вегетативно, требует значительных материальных затрат. С помощью криогенного хранения можно значительно снизить затраты на содержание живых коллекций растений. Устойчивый к замораживанию растительный материал, в том числе размноженный *in vitro*, сохраняется при криогенных температурах без существенной потери жизнеспособности на протяжении десятилетий. Современные методы криосохранения растительного материала, культивированного *in vitro*, совмещают в себе последовательно сменяющие друг друга этапы. После культивирования на специальных питательных средах клеток, тканей или побегов растений их адаптируют к низким положительным температурам. Насыщенные сахарами растительные ткани, постепенно освобождают от "свободной" воды, молекулы которой, кристаллизуясь при замораживании, могут разрушать мембраны и вызвать гибель клеток. Для этого непосредственно перед замораживанием образцы дегидратируют либо в гипертонических растворах различных веществ, либо с помощью подсушивания над поглощающими молекулы воды веществами или в осушающем потоке воздуха. Дегидратированные клетки растений успешно восстанавливаются в благоприятных условиях, если остаются жизнеспособными после замораживания, криогенного хранения и регидратации. В Институте физиологии растений Российской академии наук (ИФР РАН) был разработан способ криосохранения (Патент № 2302107, РФ) для дегидратированных апексов земляники, изолированных из растений *in vitro*. Этот метод позволил сформировать первую в Российской Федерации экспериментальную криоколлекцию земляники (49 сортов *Fragaria x ananassa* Duch., 1 сорт *F. vesca* L.), предназначенную для долговременного хранения. Однако наши эксперименты показали, что, восстановление растительного материала после жидкого азота может зависеть не только от его криоустойчивости, но и от режима криогенного хранения. Известно, что использование стандартных криогенных контейнеров приводит к неизбежным варьированиям температуры в криопробирках с образцами в ходе многочисленных операций погружения в жидкий азот, и извлечения из него, практикуемых при длительном хранении коллекций образцов. Такие манипуляции с ортодоксальными семенами не снижали их посткриогенной всхожести. Однако эти воздействия приводили к достоверному снижению жизнеспособности дегидратированных апексов земляники, изолированных из растений *in vitro*, и сокращали количество меристем восстанавливавших свой рост после жидкого азота. Полученные данные мы планируем использовать для оптимизации условий сохранения коллекций растений в криобанке ИФР РАН.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа» и межгосударственной программой ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» («Развитие национальных коллекций культур клеток растений для развития методов современной селекции и сохранения редких генотипов», Госконтракт №16.M04.12.0003).

**CRYOSTORAGE PARTICULARS OF DEHYDRATED APICES ISOLATED FROM STRAWBERRY (*FRAGARIA L.*) PLANTLETS CULTIVATED *IN VITRO*****Vysotskaya O.N.**

Timiriachev Institute of Plant Physiology of Russian Academy of Science, 127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35, tel. (499) 977-93-63, fax (499) 977 80 18, e-mail: cryostyle@rambler.ru

Collection preservation in field and *in vitro* of vegetatively propagated plants requires significant material spending. Using cryogenic storage can significantly reduce the cost of maintaining the living plant collections. For decades at cryogenic temperatures, freeze-resistant plant material preserves viability without significant loss. Modern techniques, which employ for cryopreservation of plant material from *in vitro* culture, consist of several stages consecutive. Usually the cells, tissues and shoot apices of plants adapt to low positive temperatures and then dehydrate after cultivation *in vitro* with using special of nutrient media. After sugar saturation, material gradually exempt from "free" water molecules, which can form crystals destroying cell membranes by freezing. For this purpose, plant specimens partially dehydrate by means of hypertonic solutions of various substances, the water-absorbing materials or by the use of the dry air stream directly before the freezing. Dehydrated plant cells are recovered in favorable conditions successfully if they were remained viable after freezing, of cryogenic storage and rehydration. Timiriachev Institute of Plant Physiology of Russian Academy of Science (IPP RAS) possesses of method which was developed for cryopreservation of dehydrated apices from strawberry plants, which were cultured *in vitro* (Patent № 2302107, RF). This method was used for forming of the first Russian cryocollection of strawberry (49 cvs. *Fragaria x ananassa* Duch., 1 cv. *F. vesca* L.), which is intended to long-term experimental storage. However, our experiments have been shown that recovery plant material after liquid nitrogen can depend not only on its cryoresistance but also from the conditions of cryostorage. It is known that the use of standard cryogenic containers does not exclude of unfavorable variation temperature into cryotubes with samples in the course of multiple operations of immersions into liquid nitrogen, and extractions theirs from it. Such manipulations with orthodox seeds did not changed characteristics of their germination. But, in our experiments, these actions led to decrease of the viability of dehydrated apices, which were isolated from plantlets cultured *in vitro*. We plan to use the obtained data to optimize the conditions for plant collection preservation in the IPP RAS cryobank.

Work was supported by Project of Fundamental Researches of the Russian Academy of Sciences: "Living Nature" and Eurasian Economic Community interstate target program: "Innovative Biotechnology" ("The development of the national collections of plant cell cultures for the development of the techniques of modern plant breeding and conservation of rare genotypes", State contract number 16.M04.12.0003).

**СОХРАНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ  
ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАЕМЫХ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ  
В КОНТРОЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ СРЕДЫ В ВИРе**

**Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Антонова О.Ю., Швачко Н.А.,  
Шувалова А.Р., Крылова Е.А., Овчинникова А.Б., Пендинен Г.И., Шувалова Л.Е.,  
Черепко М.М., Волкова Н.Н.**

Государственное научное учреждение Всероссийский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии (ВИР), 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42-44, тел. (812) 466-44-04, <http://vir.nw.ru/biot/indexe.php>, e-mail: [t.a.gavrilenko@vir.nw.ru](mailto:t.a.gavrilenko@vir.nw.ru)

ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР) сохраняет одну из крупнейших и старейших в мире коллекцию генетических ресурсов растений (культурные растения и родственные дикие виды), включающую более 320 000 образцов. Основная часть коллекции ВИР представлена видами растений, размножаемых семенами. Для долгосрочного сохранения этих коллекций используются методы низкотемпературного хранения семян. Однако коллекции таких важных сельскохозяйственных культур, как плодовые, ягодные, декоративные, некоторые овощные, картофель, можно стабильно воспроизводить только при вегетативном размножении. Хранение их генофонда в виде семян невозможно, поскольку половое размножение разрушает генетическую структуру сортов, представленных высоко гетерозиготными генотипами. В ВИРе вегетативно размножаемые культуры поддерживают в основном в виде полевых коллекций.

Актуальность проблемы сохранения генофонда вегетативно размножаемых культурных растений постоянно возрастает, что связано с угрозой сокращения их генетического разнообразия в результате воздействия экстремальных абиотических факторов, заболеваний и вредителей.

В докладе приводится обзор современных технологий сохранения генофонда вегетативно размножаемых культурных растений в контролируемых условиях среды - *in vitro* и криохранения. Эти технологии включают: введение в культуру *in vitro* различных типов экплантов, оздоровление растений от вирусных и бактериальных инфекций, микроразмножение, мониторинг фитосанитарного статуса микрорастений, генотипирование, среднесрочное *in vitro* хранение, криоконсервацию и долгосрочное криохранение.

В докладе особое внимание уделено исследованиям, проводимым в этих направлениях в институте растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР). В ВИРе в условиях *in vitro* сохраняется коллекция вегетативно размножаемых растений (представителей родов: *Solanum*, *Rubus*, *Ribes*, *Lonicera*, *Fragaria*, *Allium*), включающая около 700 образцов. Проведена успешная криоконсервация 80 местных сортов картофеля. Тестирование растений на наличие вирусных инфекций проводится с использованием методов ELISA и ОТ-ПЦР. Для оздоровления микрорастений картофеля от вирусных инфекций используется модифицированный метод комплексной химио- и термотерапии. Местные сорта картофеля и большинство селекционных сортов малины генотипированы с использованием SSR маркеров.

**MAINTENANCE OF GENETIC DIVERSITY OF VEGETATIVELY PROPAGATED PLANT CROPS UNDER CONTROLLED ENVIRONMENT IN VIR**

**Gavrilenko T.A., Dunaeva S.E., Antonova O.Y., Shvachko N.A., Shuvalova A.R., Krylova E.A., Ovchinnikova A.B., Pendinen G.I., Cherepko M.M., Shuvalova L.E., Volkova N.N.**

N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry RAAS, 190000, St. Petersburg, Bolshaja Morskaja str., 42-44, tel. (812) 466-44-04, <http://vir.nw.ru/biot/indexe.php>, e-mail: [t.a.gavrilenko@vir.nw.ru](mailto:t.a.gavrilenko@vir.nw.ru)

The N.I.Vavilov Institute of Plant Industry (VIR) holds one of the biggest and oldest germplasm collections worldwide. Its collection represents plant genetic resources (diversity of crop species and their wild relatives) encompassing more than 320 000 accessions. Long-term storage of seeds at low temperature is the most convenient, traditional method for plant germplasm conservation. However, this method is not applicable for vegetatively propagated species like fruits, small berry crops, potato.

Most germplasm of the vegetatively propagated crops at VIR is maintained in field collections. However, the collections are endangered by diseases, pests and abiotic stress. To avoid the possible loss of these germplasm collections, new strategies, technologies and information are needed.

Modern technologies of *in vitro* and cryopreservation provide the opportunity to create safe duplicates conserved under controlled conditions. These technologies include: the establishment of *in vitro* culture, elimination of viral and bacterial infections, micropropagation, monitoring of phytosanitary status of microplants, genotyping, medium-term *in vitro* storage, cryoconservation and long-term storage of cryocollections.

Detail information about current stay of *in vitro* and cryopreservation programs at VIR will be provided. At present, about 700 of clonally propagated stocks (representatives of *Solanum*, *Rubus*, *Ribes*, *Lonicera*, *Fragaria*, *Allium* genera) are stored under *in vitro* conditions at VIR. About 80 potato landraces are cryopreserved. ELISA and RT-PCR methods are used for testing of viral infections in microplants. Modified method based on chemo- and thermotherapy is applied for virus eradication of potato microplants. Potato landraces and raspberry varieties were genotyped using SSR markers.

**СОХРАНЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ МАЛИН И ЕЖЕВИК В КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO*  
ВНИИР ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА (ВИР)****Дунаева С. Е., Шувалова Л. Е., Гавриленко Т. А.**

Государственное научное учреждение Всероссийский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии, 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42-44, тел. (812) 466-44-05, факс (812) 466-43-61, e-mail: dunaevase@mail.ru

Генетические ресурсы вегетативно размножаемых растений в генетических банках сохраняют в полевых и крио коллекциях, предназначенных для длительного хранения, и в *in vitro* коллекциях, используемых для восстановления, размножения и среднесрочного хранения генотипов. Каждая из них может служить в качестве дублетной коллекции, повышающей степень надежности сохранения генофонда. *In vitro* коллекции предназначены для оздоровления растений от патогенов, микроклонального размножения и сохранности генотипов растений в контролируемых условиях среды, для обмена сертифицированным растительным материалом с другими генбанками и для создания криоколлекций.

Наша работа ориентирована на формирование и сохранение в ВИРе *in vitro* коллекции преимущественно тех представителей рода *Rubus* L. (*Rosaceae* Adans.), которые присутствуют в природной флоре на территории России или получены отечественными селекционерами и отсутствуют (или незначительно представлены) в других генетических банках). В мировой флоре видовое разнообразие рода *Rubus* насчитывает 750 видов, распределенных по 16 под родам. Наибольшее число видов сосредоточено в под родах *Rubus* (ежевика) – 132, *Idaeobatus* (малины) – 117, *Malachobatus* – (115) (Красовская, 2002). Виды двух первых под родов широко вовлекаются в современную селекцию. На территории России зарегистрировано 6 дикорастущих видов малин (Синькова, 1980) и около 80 видов ежевик (Синькова, 1983). Среди лесных малин самый обширный ареал распространения имеет малина обыкновенная (европейская) *R. idaeus* L. subsp. *idaeus* (один из родичей культурной малины). Среди дикорастущих видов ежевик наибольшее видовое разнообразие (46 видов, из них 31 вид – эндемики) отмечено в дикорастущей флоре Кавказа и Закавказья (Неронова, 1973).

Для формирования *in vitro* коллекции дикорастущих видов малин и ежевик преимущественно был использован растительный материал, собранный в экспедициях ВИР и Ботанического института им. В.Л. Комарова на территории России. Большинство собранных видеобразцов малин морфологически описаны, гербаризованы и сохраняются в Гербарии Ботанического института им. В.Л. Комарова (LE). Видообразцы ежевик, собранные на территории Кавказа и Закавказья сотрудниками экспедиций ВИР (1937-1999гг.), поддерживаются в живом виде (22 вида, 32 экотипа) в полевой коллекции Майкопской опытной станции ВИР (Семенова и др., 2007). Этот материал, изученный по многим признакам (Грюнер, 1993, Добренков, 2007), гербаризован и сохраняется в Гербарии ВИР (WIR).

Селекционный материал малины в коллекции *in vitro*, представлен, в основном, сортами отечественной селекции, большинство из которых сохраняются в полевой коллекции Павловской опытной станции ВИР. Эти сорта были генотипированы с использованием ISSR и SSR маркеров (Lamouge et al., 2011). Сорта ежевики в коллекции *in vitro* имеют зарубежное происхождение, поскольку селекция ежевики в России и странах СНГ практически не проводится.

Таким образом, *in vitro* коллекция представителей рода *Rubus* в ВИРе включает 182 образца (генотипа). Из них 12 дикорастущих видеобразцов малин (включая 35 экотипов европейской лесной малины), 22 дикорастущих видеобразца ежевик, 89 сортов малины (из них 64 сорта российской селекции) и 25 сортов ежевики. Сорта ежевики в коллекции *in vitro* паспортизованны с помощью изоферментных маркеров (Дунаева и др., 2005).



**IN VITRO PRESERVATION OF RASPBERRY AND BLACKBERRY DIVERSITY AT THE VIR****Dunaeva S. E., Shuvalova L. E., Gavrilenko T. A.**

N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry RAAS, 190000, St. Petersburg, Bolshaja Morskaja str., 42-44, tel. (812) 466-44-05, fax (812) 466 43 61, e-mail: dunaevase@mail.ru

In genebanks the genetic resources of vegetatively propagated plants are preserved in field and cryo collections, aimed for long term storage and in *in vitro* collections, used for recovery, reproduction and medium-term storage of genotypes. Each of them can serve as a doublet collection, which increases the reliability of the conservation of the gene pool. *In vitro* collection serves for the eradication of field growing plants from pathogens, micropropagation and conservation plant genotypes under controlled environmental conditions, for the exchange of certified plant material with other genebanks and for the establishment of cryocollections. Our work is directed on conservation under *in vitro* condition the representatives of genus *Rubus* L. (*Rosaceae* Adans.) which are present in natural flora of Russian Federation.

Genus *Rubus* is divided into 16 subgenera which include about 750 species (Krasovskaja, 2002), most of them are concentrated in the subgenus *Rubus* (blackberry, 132 species) and *Idaeobatus* (raspberry, 117 species). In flora of Russia 6 species of raspberry are noted (Sinjkova, 1980), of which european raspberry *R. idaeus* L. subsp. *idaeus* has the vast area of distribution in Russia. Of the 80 species of blackberries found in Russian Federation, 46 species are described in the Caucasus, which is one of the centers of origin of blackberries (Neronova, 1973); 31 species from them are endemics.

For establishing VIR' *in vitro* collection of wild species accessions we used mainly plant material collected by expeditions of VIR and the Komarov Botanical Institute. Most of wild species accessions of raspberries were morphologically described; their herbarium samples are stored in the herbarium of the Komarov Botanical Institute (LE). Accessions wild species of blackberries were collected in the Caucasus region during the VIR expeditions (1937-1999). These samples studied in many aspects (Gruner, 1993; Dobrenkov, 2007) are presented in the herbarium of the VIR (WIR). The living accessions are also maintained in the field collection of the Maikop experimental station of VIR (Semenova et al, 2007).

*In vitro* collection of raspberry varieties was initiated on the basis of genotyped plants (ISSR and SSR markers, Lamourex et al., 2011) from the field collection of Pavlovsk Experimental Station of VIR. The vast majority of blackberry varieties stored *in vitro* were developed in the U.S., because blackberries' breeding is practically absent in Russia. Blackberry varieties in the *in vitro* collection were genotyped by isozyme markers (Dunaeva et al., 2005).

Thus, *in vitro* collection of representatives of *Rubus* genus at VIR includes 182 accessions (genotypes). There are 89 varieties of raspberry and 25 varieties of blackberries and 34 wild species accessions.

**ПОДБОР ИНФОРМАТИВНЫХ ПРАЙМЕРОВ К ПОЛИМОРФНЫМ  
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КАРТОФЕЛЯ**  
Есимситова А.К., Шустов А.В., Какимжанова А.А.

РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана

В настоящее время картофель является одной из важнейших сельскохозяйственных овощных культур, возделываемых практически во всех регионах Казахстана. Большое значение для современных биотехнологических исследований, а также селекции хозяйственно-ценных культур и семеноводства имеет разработка методов паспортизации сортов растений на основе молекулярных маркеров.

Одна из наиболее информативных ДНК-систем молекулярного маркирования сельскохозяйственных культур являются микросателлитные последовательности ДНК (SSR).

К преимуществу метода микросателлитного анализа можно отнести возможность создания на его основе эффективной универсальной технологии, пригодной для контроля интрогрессии генетического материала при отдаленных скрещиваниях, для различения и идентификации источников, доноров, гибридов и сортов сельскохозяйственных растений.

Целью исследований являлось оптимизация условий амплификации ДНК и подбор, наиболее информативных микросателлитных праймеров для идентификации и паспортизации сортов и гибридов картофеля.

В качестве материала исследовани использовали 34 отечественных и зарубежных сортов картофеля, возделываемых в Казахстане и 17 гибридов. Для идентификации генотипов картофеля применяли 23 SSR-праймеров.

ДНК выделяли из пророщенных ростков картофеля с использованием модифицированной методики Edwards (1991). Качество и количество полученных препаратов ДНК определялось спектрофотометрическим методом при длине волны 260 нм на «Nanodrop 1000». Условия ПЦР соответствовали рекомендациям разработчиков праймеров, в ряде случаев условия ПЦР были оптимизированы (Ghislain M. et al., 2009).

Для SSR-анализа полимеразную цепную реакцию проводили в объеме реакционной смеси 30 мкл содержащей: 10x Tag буфер,  $MgCl_2$  (25 mM), смесь 4 dNTPs (2 mM), прямой и обратный праймеры (10 pM), Tag ДНК полимеразы (2 ед/мкл), ДНК (15 нг/мкл).

В результате исследований подобрали режим амплификации ДНК – предварительная денатурация при 94 °С в течение 5 минут, следующие 30 циклов: денатурация при 94 °С – 30 секунд, отжиг 30 секунд с подобранной температурой в зависимости от праймера, синтез при 72 °С – 30 секунд, конечная элонгация при 72 °С в течение 5 минут. Амплификацию ДНК при использовании SSR маркера проводили в амплификаторе Eppendorf Mastercycler pro.

На следующем этапе выполняли электрофоретическое разделение продуктов амплификации с SSR праймерами в полиакриламидном геле с использованием камеры для вертикального электрофореза с 1xTAE-буфером. Готовый гель окрашивали бромистым этидием, фрагменты ДНК анализировали в трансиллюминаторе и фотографировали с использованием компьютерной программы QuantityOne.

Таким образом, для идентификации и паспортизации генотипов картофеля была подобрана температура отжига – 50, 53, 55, 57, 58 и 60°С в зависимости от праймера. Подбор оптимальных условий амплификации ДНК и эффективных SSR-праймеров к полиморфным микросателлитным локусам позволит нам в дальнейшем идентифицировать и различить сорта и гибриды картофеля.

## SELECTION OF INFORMATIVE PRIMERS TO MICROSATELLITE LOCI FOR IDENTIFICATION OF POTATO GENOTYPES

**Esimseitova A.K., Shustov A.V., Kakimzhanova A.A.**

RSE "National Center for Biotechnology", Kazakhstan, Astana

Currently, potato is one of the most important agricultural crops cultivated in almost all regions in Kazakhstan. Of great importance for the modern biotechnology research, crops breeding and seed production is the development of methods for certification of plant varieties on the basis of molecular markers.

One of the most informative DNA molecular markers for crop plants are the microsatellite DNA sequences (SSR).

Among the advantages of the method of microsatellite analysis are the ability to develop widely applicable technology utilized to control the introgression of genetic material from distant crosses, to distinguish and identify the sources, donors, hybrids and varieties of plants.

The aim of this study was to optimize the conditions of DNA amplification and selection of the most informative microsatellite primers for the identification and certification of potato varieties and hybrids.

The material for the study was 34 domestic and foreign varieties of potato grown in Kazakhstan and 17 hybrids. To identify potato genotypes we used 23 SSR primers. DNA was extracted from germinated potato sprouts using a modified procedure of Edwards (1991). The quality and quantity of the DNA preparations were determined spectrophotometrically at 260 nm with the Nanodrop 1000. The PCR conditions corresponded to those recommended by the vendors of SSR primers; in some cases PCR conditions were optimized (Ghislain M. et al., 2009).

The SSR-polymerase chain reaction analysis was done in 30  $\mu$ l reaction mixtures containing: 10xTag buffer,  $MgCl_2$  (25 mM), a mixture of four dNTPs (2 mM), forward and reverse primers (10 pM), Tag DNA polymerase (2 un/ $\mu$ l), and a matrix DNA (15 ng/ $\mu$ l).

Preliminary studies allowed selection of the most efficient PCR conditions: pre-denature at 94 °C for 5 min, following 30 cycles of 30 sec at 94 °C (denaturation), 30 sec at annealing temperature selected depending on the primers' properties and 30 sec at 72 °C, with the final extension at 72 °C for 5 min. DNA amplification for SSR markers was performed in the Eppendorf Mastercycler Pro.

The following step for SSR analysis was electrophoretic separation of the amplification products in the polyacrylamide gels using vertical chamber and 1xTAE electrophoresis buffer system. Gels were stained with ethidium bromide, DNA fragments were analyzed on a transilluminator, photographed and analyzed using the QuantityOne software.

This work resulted in selection of the optimal annealing temperatures (50, 53, 55, 57, 58 or 60 °C) for the set of SSR primers, and development of the protocol for identification and certification of potato genotypes for mentioned varieties. The developed protocol for SSR analysis of the polymorphic microsatellite loci in potato will further enable us to identify and distinguish varieties and hybrids of potato in the Kazakhstan.

**ТЕХНОЛОГИЯ ПРОРАЩИВАНИЯ СЕМЯН *NITRARIA SIBIRICA* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*****Железниченко Т. В., Новикова Т. И., Банаев Е. В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, г. Новосибирск, ул. Золотогорная, д. 101, тел. (383) 330-41-01, факс (383) 334-44-33, e-mail: zhelez05@mail.ru

Селитрянка – это галофитный засухоустойчивый кустарник, произрастающий на солонцеватых грунтах. Благодаря своим биологическим особенностям она перспективна в защитном лесоразведении, может использоваться для укрепления песков, снижения засоленности почв. Представители этого рода произрастают в жестких климатических условиях и их семена обладают высокой степенью покоя. Органический покой связан с анатомическим строением покровов семени и, вероятно, со свойствами зародыша. Биология прорастания семян видов рода *Nitraria* L. мало изучена. Использование биотехнологических приемов позволяет не только исследовать некоторые аспекты данной проблемы, но также и преодолевать покой в условиях *in vitro*.

Цель работы заключалась в оптимизации режима прорастивания семян *Nitraria sibirica* Pall. в условиях культуры ткани. Материалом для исследования служили зрелые семена из четырех популяций Алтайского края, Республики Алтай и провинции Внутренняя Монголия (КНР), находящихся в условиях с разным уровнем засоления почвы. Стерилизацию материала проводили ступенчато при помощи 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Промытые семена оставляли на сутки при комнатной температуре, затем повторяли стерилизацию. Выход стерильного материала составлял около 75%. Для выведения семян из состояния покоя применяли стратификацию при низких положительных температурах, обработку гибберелловой кислотой (ГК<sub>3</sub>), скарификацию при помощи горячей воды и серной кислоты, а также метод эмбриокультуры. Контролем служили интактные семена.

При используемых методах обработки семян наблюдалась разная динамика появления всходов. В контрольных образцах появление проростков отмечали на 27-е сут., а общая всхожесть составила 4%. Температурное воздействие не дало положительных результатов. При химической скарификации проростки появлялись через неделю инкубации, а всхожесть была 11,5%. Обработка семян ГК<sub>3</sub> оказалась неэффективной: появление первых проростков зафиксировано на 8-е сут., всхожесть – на 7,1%. При сочетании химической скарификации с обработкой ГК<sub>3</sub> проростки появлялись через неделю инкубации, всхожесть повысилась до 27,5%.

Культивирование изолированных зародышей значительно увеличило энергию прорастания и всхожесть. Появление первых проростков отмечено на 2-3 сут., всхожесть в зависимости от места сбора варьировала от 70,2% до 94,5%. Проростки, в основном, имели нормально развитый гипокотиль, эпикотиль, две семядоли, неповрежденную точку роста, но корешок присутствовал только у 45,4-68,5%, в зависимости от популяции. Это может свидетельствовать о неглубоком физиологическом покое зародыша. Для семян из китайской популяции была характерна более низкая всхожесть (39,2%), по сравнению с другими популяциями, и отсутствие корешка у 91% проростков.

Таким образом, для ускорения прорастания и увеличения всхожести семян *N. sibirica* в культуре *in vitro* наиболее эффективным является применение метода эмбриокультуры. Показано, что у семян *N. sibirica* преобладает экзогенный тип покоя. Удаление околоплодника *in vitro* приводит к снятию экзогенного покоя, а скорость выхода из него при полной доступности влаги определяется только коротким периодом покоя зародыша и составляет не более 4-х суток.

**GERMINATION TECHNOLOGY OF *NITRARIA SIBIRICA* IN  
*IN VITRO* CULTURE****Zheleznichenko T. V., Novikova, T. I. , Banaev E. V.**

Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, tel. (383) 339-98-29, fax (383) 330-19-86, e-mail: zhelez05@mail.ru

*Nitraria* – is salt-tolerant and drought-resistant shrub growing on saline ground. Due to biological peculiarities, it is promising plant for use in protective afforestation, sand consolidation and soil salinity reduction. Members of this genus grow in severe climatic conditions and have a high degree of seed dormancy. The dormancy is associated with anatomical structure of the seed covers, and probably with the embryo properties. Seed germination biology of the genus *Nitraria* L. has not been studied enough. The use of biotechnological techniques allows not only to explore some aspects of the problem, but also to overcome *in vitro* dormancy.

The aim of the work was to optimize the germination conditions of *Nitraria sibirica* Pall. in tissue culture. The material under study was mature seeds of four populations from the Altai Krai, Altai Republic and Inner Mongolia (China), growing in the environments with varying level of soil salinity. Sterilization of the material was performed stepwise with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Washed seeds were stored for 24 h at room temperature and then again sterilized. Sterile material output was approximately 75%. Stratification at low positive temperatures, treatment with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), scarification by hot-water and sulfuric acid and embryo culture were applied for dormancy-breaking. Intact seeds were used as a control.

Distinct dynamics of seedling emergence was observed under technique applied of seed treatment. In control samples seedling emergence was marked on the 27th day and germination accounted for 4%. The temperature effect did not produce positive results. At chemical scarification plantlets appeared after a week of incubation and the germination was 11,5%. Seed treatment with GA<sub>3</sub> proved to be ineffective: seedling emergence was recorded on the 8th day, and germination ability was 7,1%. Combination of chemical scarification with GA<sub>3</sub> treatment resulted in plantlets sprouting after a week of incubation, and the germination increased to 27,5%.

Germinative energy and viability were significantly increased in cultivation of isolated embryo. The first seedlings emerged on the 2-nd-3-d day and total germination ranged from 70,2% to 94,5% depending on place of collection. Plantlets were mainly with normally developed hypocotyl, epicotyl, two cotyledons, non-damaged growing point, but only 45,4-68,5% were of a rootlet depending on the population. This can testify to non-deep physiological dormancy of the embryo. Seeds from the Chinese population were characterized by lower germination (39,2%) compared to the other populations, and absence of the rootlet in 91% of seedlings.

Thus, embryo culture is the most effective for acceleration of sprouting and increase in seed germination of *N. sibirica* tissue culture. Exogenous type of dormancy is shown to dominate in *N. sibirica* seeds. *In vitro* pericarp removal results in the dormancy-breaking, and the overcome rate at full availability of moisture is determined by only a short dormancy period of the embryo and is not more than 4 days.

**ВЛИЯНИЕ ОСВЕЩЕНИЯ НА МОРФОГЕНЕЗ *POTENTILLA RECTA* L. SUBSP. LACINIOSA (WALDST. ET KIT. EX NESTLER) NYMAN В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*****Заяц А.Ю., Митрофанова И.В.**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, НААН Украины, 98648, Украина, АР Крым, г. Ялта, пгт. Никита, тел. (0654) 33-68-59, факс 33538, e-mail: in\_vitro@ukr.net

В последнее время активно исследуются представители рода *Potentilla*. Многие из них используются в качестве декоративных растений, а также нашли свое применение в народной медицине. Например, *Potentilla recta* оказывает вяжущее, закрепляющее, бактерицидное, противовоспалительное и гемостатическое действие, благодаря высокому содержанию дубильных веществ, флавоноидов и тритерпеноидов. Однако принадлежность растений к исчезающим видам и проблема получения высококачественного лекарственного сырья часто ограничивает получение вторичных метаболитов в достаточном количестве. Альтернативным источником получения растительной биомассы, содержащей биологически активные вещества, является культура *in vitro*. В этой связи целью данного исследования было изучение влияния освещения на морфогенез *P. recta* subsp. *laciniosa* в условиях *in vitro*.

Материалом для исследования служили высечки листьев и сегменты черешков асептической культуры *P. recta*, которые культивировали на модифицированной питательной среде Пирика (Pierik, 1976), дополненной 0,93–2,79 мМ кинетина и 4,30–5,88 мМ НУК. Культивирование эксплантов проводили в термостате, в темноте при 26±1 °С или в культуральной комнате при 26±1 °С и освещенности 2–3 клк.

На модифицированной среде Пирика показана возможность корне- и каллусообразования из сегментов черешка и высечек листа. Выявлено влияние размещения эксплантов к питательной среде на частоту каллусообразования и ризогенеза на свету и в темноте. При культивировании сегментов черешка на свету и в темноте частота каллусообразования достигала 100%. Вместе с тем, на свету у 28,57% эксплантов формировались адвентивные корни. В темноте для высечек листа, помещенных адаксиально и абаксиально к поверхности питательной среды, наблюдали 100% частоту каллусообразования. На свету для высечек листа, расположенных на среде адаксиально и абаксиально, частота каллусообразования составила соответственно 66,7% и 25%. В случае культивирования высечек листа адаксиальной стороной к среде 16,7% эксплантов образовывали адвентивные корни.

Таким образом, в результате проведенного эксперимента были отобраны штаммы, которые отличаются светло-коричневой окраской, плотной консистенцией, низким уровнем оводненности (сухой вес/сырой вес >10%) и высокими ростовыми индексами (РИ). Найдены достоверные различия в количественных характеристиках полученных штаммов (накоплении сырой и сухой биомассы, РИ) в зависимости от типа экспланта, размещения его к питательной среде и физических факторов культивирования (наличия или отсутствия освещения). Показано, что оптимальным типом экспланта являются высечки листа, помещенные на питательную среду абаксиально и культивируемые в темноте.

**THE EFFECT OF ILLUMINATION ON MORPHOGENESIS *IN VITRO* OF  
*POTENTILLA RECTA* L. SUBSP. *LACINIOSA* (WALDST. ET KIT. EX NESTLER)  
NYMAN**

**Zaiats A., Mitrofanova I.**

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center, 98648, Ukraine, Yalta, Nikita,  
tel. (0654) 33-68-59, fax: 33538, e-mail: in\_vitro@ukr.net

Recently the plants of genus *Potentilla* L. have been actively investigated. Many *Potentilla*'s species are used as decorative plants and drugs in folk medicine. For example, *Potentilla recta* contains tannins, flavonoids and triterpenoids and has the fixing, bactericidal, anti-inflammatory, hemostatic effect. The possibility of the secondary metabolites extraction from plants is often limited for several reasons: rare plants, endemic or endangered species, and also the poor quality of the medicinal raw materials. The *in vitro* cell and tissue culture could be an alternative source to obtain the biologically active substances. The purpose of this work was the investigation of the effect of illumination on morphogenetic capacity *in vitro* of *P. recta* subsp. *laciniosa*.

The research objects were leaf pieces and petiole segments obtained from aseptic culture of *P. recta*. Isolated explants were transplanted on a modified Pierik (1976) solid media supplemented by 0,93–2,79  $\mu\text{M}$  kinetin and 4,30–5,88  $\mu\text{M}$  NAA. Cultures were maintained either in darkness or under a 16-h light photoperiod at 30–40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  provided by cool white fluorescent lamps at  $26 \pm 1$  °C.

The possibility of root and callus formation by the petiole segments and leaf pieces on the modified Pierik media has been demonstrated. The dependence of explants surface orientation on the frequency of callus formation and rhizogenesis at light and darkness has been shown. When the petiole segments were cultivated under the light and dark conditions, the frequency of callus formation reached 100%. However, it has been studied that 28,57% explants formed adventitious roots. Under the dark conditions, frequency of callus formation of leaf pieces, placed adaxial and abaxial on the culture medium, was 100%. In the case of leaf pieces being placed adaxial and abaxial on the medium the frequency of callus formation was 66,7% and 25% respectively. Moreover, while cultivating leaf pieces with adaxial side to the media, 16,7% of explants formed adventitious roots.

Thus, strains that differ by light-brown color, compact texture, low water content (dry weight/fresh weight >10%) and high growth index (GI) were selected during the experiment. There were found significant discrepancies in the quantitative characteristics of the obtained strains (accumulation of fresh and dry biomass, GI) according to the type of explants, its placing on the media and physical factors (darkness or light). It should be noticed that the optimum type of explants are leaf pieces, which have been placed on the culture medium and cultivated in the darkness.

## РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ФЕЙХОА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Иванова Н.Н., Митрофанова И.В.

Никитский ботанический сад - Национальный научный центр, 98648, Украина, АР Крым, г. Ялта, Никита, тел. (0654) 33-68-59, факс (0654) 33-53-86, e-mail: in\_vitro@ukr.net

Субтропические плодовые культуры являются источником наиболее важных компонентов питания человека. Климатические условия юга Украины позволяют выращивать различные ценные субтропические культуры, среди которых вечнозеленое субтропическое растение фейхоа, занимающее особое место. Плоды фейхоа употребляются в свежем и переработанном виде, они богаты пектинами, углеводами, витаминами С, Р, активными веществами, полифенольными соединениями с преобладанием катехинов. Традиционные методы вегетативного размножения имеют ряд ограничений, особенно когда необходимо получить в короткие сроки большое количество посадочного материала. В последние годы методы культуры изолированных клеток, тканей и органов *in vitro* все чаще используют при размножении древесных культур. Это позволяет освободить растения от вирусной инфекции, а также решить проблему массового тиражирования ценных видов и сортов для пополнения генофонда и создания медленно растущих коллекций в условиях *in vitro*. Однако до настоящего времени не разработаны системы прямой и непрямой регенерации растений *in vitro* большинства сортов субтропических плодовых культур отечественной селекции.

Целью нашего исследования было выявление возможных методов регенерации растений *Feijoa sellowiana* Berg. сорта Никитская Ароматная из коллекции НБС–ННЦ в условиях *in vitro*. В ходе исследования определены сроки отбора эксплантов, способ стерилизации, модифицирован состав питательной среды, подобраны оптимальные концентрации регуляторов роста для индукции морфогенетических процессов. Установлено, что морфогенез в условиях *in vitro* реализовался путем прямой и непрямой регенерации микропобегов. При изучении процесса прямой регенерации стерильные сегменты побега с почкой культивировали на питательной среде МС, дополненной 0,91-1,85 мкМ зеатина. На 20 сутки культивирования на данной среде наблюдали формирование кроме основного адвентивных побегов. Последующие пассажи на питательную среду МС, содержащую 2,28-2,73 мкМ зеатина, позволили увеличить количество полученных микропобегов до 3 шт./эксплант. Дальнейшее увеличение концентрации цитокинина практически не отражалось на количестве микропобегов, но вызывало их оводненность, а в дальнейшем и гибель. Наряду с зеатином введение в питательную среду БАП оказалось менее эффективным. Количество микропобегов не превышало 1-2 шт./эксплант. При культивировании сегментов побега и высечек листа на модифицированных питательных средах, дополненных регуляторами роста (НУК, ИУК, БАП) в различных концентрациях и сочетаниях, через 7-9 суток культивирования на месте среза во всех вариантах опыта формировался рыхлый каллус. На 12-14 сутки на поверхности каллуса побегового происхождения на питательной среде, дополненной ИУК и БАП, происходила дифференциация вегетативных почек, из которых через 5-7 суток развивались единичные микропобеги. В ходе дальнейшего культивирования наблюдали только рост микропобегов. При использовании в качестве исходных эксплантов высечек листа отмечено формирование каллуса в вариантах опыта НУК и БАП, ИУК и БАП. Однако в процессе культивирования происходило постепенное отмирание каллуса. Образования адвентивных почек и микропобегов не отмечено ни в одном из вариантов опыта с культивируемым каллусом.



## DIFFERENT WAYS OF FEIJOAS PLANTS REGENERATION *IN VITRO* Ivanova N.N., Mitrofanova I.V.

Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center, 98648, Ukraine, Crimea, Yalta, Nikita, tel. 38 (0654) 336859, fax 38 (0654) 335386, e-mail: in\_vitro@ukr.net

Subtropical fruit cultures are the source of the most potent nutrition components for human diet. Climate conditions of the South of Ukraine give possibility to cultivate various valuable subtropical cultures among which the evergreen subtropical plant feijoa takes a special place. Feijoa fruits are eaten fresh and in the form of preserves. They are rich in pectins, carbohydrates, vitamin C, vitamin P, active substances and polyphenol compounds with predominant catechins. Traditional methods of propagation have number of limits especially when it is necessary to get the great number of plants in a short time. During the last years methods of cell, tissues and organs culture *in vitro* are used more often for tree plants propagation. These methods give possibility to obtain virus-free plants and to solve the problem of mass multiplication of valuable plant species and varieties for genofund increasing and to form the slow-growing plant collections *in vitro*. However, protocols for direct and indirect *in vitro* plant regeneration for most Ukrainian varieties of subtropical fruit cultures haven't been developed till now.

The aim of our research was to determine possible methods for *in vitro* regeneration of *Feijoa sellowiana* Berg. variety Nikitskaja Aromatnaja plants from Nikitsky Botanical Gardens (NBG-NSC) collection. During the research the terms for explants selection and the most acceptable regimen of sterilization have been determined; culture medium composition has been modified and optimal concentrations of growth regulators for morphogenetic processes induction have been found. It has been determined that morphogenesis *in vitro* was realized by the ways of microshoots` direct and indirect regeneration. For the study of direct regeneration process aseptic shoots` segments with bud have been cultivated on MS culture medium supplemented with 0,91-1,85  $\mu\text{M}$  zeatin. After 20 days of cultivation on this medium besides the main shoot formation adventitious shoots regeneration has been observed. Further subculture on MS culture medium supplemented with 2,28-2,73  $\mu\text{M}$  zeatin let us to increase the number of regenerated microshoots up to 3 per explant. Following increase of cytokinins didn't influence on the number of microshoots but caused their high water content and further death. Getting BAP into the culture medium together with zeatin was less effective. Number of microshoots wasn't more than 1-2 per explant. Under the shoot segments and leaf parts cultivation on the culture medium with growth regulators (NAA, IAA, BAP) in various concentrations and compositions after 7-9 days of the culture friable callus formed in the cut place. After 12-14 days of cultivation on the culture medium supplemented with IAA and BAP on the shoot callus surface vegetative buds differentiation took place and after 5-7 days they give rise to the single microshoots. During further culture only microshoots growth has been noted. In the experiments with leaf pieces explants callus formation has been noted in the variants with NAA and BAP, IAA and BAP. But during the following culture gradual degeneration of the callus took place. Adventitious buds and microshoots formation hasn't been noted in any variant of the callus culture experiment.

## ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЭКСПЛАНТОВ КЛЕМАТИСА РАЗНЫХ САДОВЫХ ГРУПП НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *INVITRO*

Корзина Н.В., Митрофанова И.В.

Никитский ботанический сад - Национальный научный центр, 98648, Украина, АР Крым, г. Ялта, Никита, тел. (0654) 33-68-59, факс (0654) 33-53-86, e-mail: in\_vitro@ukr.net

Род клематис (*Clematis* L.) относится к семейству Лютиковые (*Ranunculaceae* Juss.) и насчитывает более 300 видов, представленных в садах и парках Японии, стран Европы, Америки. В декоративном садоводстве им отведено особое место благодаря необычайному разнообразию окраски цветов, обильному и длительному цветению. Одна из крупнейших коллекций была создана в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре, которая включает 80 сортов и форм, из них 42 – сорта Украины, 32 – сорта зарубежной селекции и 16 природных видов и форм. В НБС-ННЦ биотехнологические исследования по размножению сортов клематиса были начаты в 90-х годах прошлого столетия. Впервые для растений клематиса И.В. Митрофановой была показана возможность их регенерации путем прямого и непрямого соматического эмбриогенеза (Митрофанова, 2011). В настоящее время продолжены исследования культуры клематиса в условиях *in vitro* на примере 13 сортов разных садовых групп.

Целью данной работы являлось выяснение особенностей регенерационного потенциала эксплантов клематиса на этапе введения в культуру *in vitro*. Как исходные экспланты использовали сегменты побегов с вегетативными почками и верхушки побегов следующих сортов:

Была установлена зависимость морфогенетических реакций первичных эксплантов от генотипа исходного растения, сроков их отбора, режимов стерилизации. Так, нами отмечено, что сегменты побегов сортов Asao, Sunset, Лютер Бербанк, Dr. Ruppel, Юбилейный-70 были наиболее чувствительными к действию антисептика независимо от сроков их отбора; наименее повреждался сорт Аленушка.

Экспериментальным путем установлено, что высоким морфогенетическим потенциалом обладали сорта групп Интегрифолия и Ланугиноза. Из сегментов побегов растений клематиса, изолированных в весенние месяцы, развилось до 95-100% почек. Так, введенные в апреле в условия *in vitro* сегменты побега сорта Mrs. Cholmondeley в течение 15-22 суток регенерировали в полноценные микропобеги, которые успешно размножались. Однако введение эксплантов этого же сорта в другие месяцы было малорезультативным. В последующие сроки отбора (на протяжении года) выявлена низкая частота регенерации эксплантов. Например, у сегментов побегов, помещенных в стерильные условия в сентябре – ноябре, наблюдали незначительное набухание вегетативных почек, однако визуальных признаков развития не отмечено. Дальнейшее (3-4) субкультивирование было малоэффективным, поскольку морфологических изменений у эксплантов не происходило, и постепенно от 33 до 90% (в зависимости от сорта) полностью темнели. Необходимо отметить, что только экспланты сорта Asao, введенные в культуру *invitro* в декабре, в течение 14-20 суток увеличивались, происходило раздвижение почечных покровных чешуй и появление ярко-зеленых листьев. Вместе с тем эксплантов других (12) исследуемых сортов процессов регенерации не наблюдали.

Таким образом, результаты исследования показали, что для успешного развития первичных эксплантов исследуемых сортов клематиса лучшим сроком отбора является период вегетации растений, что согласуется с исследованиями других авторов (Коротков и др., 2012; Митрофанова и др., 2007; Guan-Kaietal. 2002). Высокой регенерационной способностью обладали экспланты сортов, относящихся к группам Интегрифолия (Аленушка) и Ланугиноза (Алеша).

## ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ЛАПЧАТКИ ВОЛЖСКОЙ (*POTENTILLA VOLGARICA* JUZ.)

Крицкая Т.А., Кашин А.С.

УНЦ «Ботанический сад» Саратовского госуниверситета им. Н.Г. Чернышевского,  
410010, г. Саратов, ул. Навашина, тел. (845-2) 64-71-20, e-mail: kriczkaya.tatyana@mail.ru

В качестве эксплантов брали зрелые семена с интактных растений. Погружали их в раствор синтетического моющего средства «Pril» («Хенкель-ЭРА», Тосно) и экспонировали на шейкере 30 мин. Многократно промывали дистиллированной водой. Затем обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом 5 мин, переносили в 25%-ный раствор (1:3) отбеливателя «Белизна» («Электра», Волгоград) с добавлением 2-3 капель детергента «Tween 80» («Panreac Quimics», ES) и экспонировали 20-30 мин на шейкере. Семена повторно пятикратно промывали стерильной дистиллированной водой. В условиях ламинарного бокса переносили на питательную среду и проращивали 30 дней при 23-25 °С, 16-часовом фотопериоде, освещении 3000 люкс. Проростки, отделённые от корней и нижних листьев, переносили на питательную среду с различными комбинациями фитогормонов - БАП («Alfa Aesar», Германия), зеатин («Duchefa Biochemie», Нидерланды), кинетин («Alfa Aesar», Германия), 2-изопентил аденин (2ip, «Santa Cruz Biotechnology», США).

Питательная среда содержала макро- и микроэлементы по прописи Мурагиде и Скуга (МС), а также сахарозу (30 г/л), мезоинозит (100 мг/л), тиамин (0,5 мг/л), пиридоксин (0,5 мг/л), никотиновую (0,5 мг/л) и аскорбиновую (1,0 мг/л) кислоты («Panreac Quimics», ES). Концентрация агар-агара («Panreac Quimics», ES) была 5-6 г/л для инициальной среды и 8 г/л – для остальных этапов культивирования. В качестве дополнительного варианта использовали среду В<sub>5</sub>, дополненную БАП 0,1 мг/л. Для получения безвирусных проростков применили метод хемотерапии, дополнив инициальную среду для проращивания семян виразолом (2 мг/л) без фитогормонов при pH среды 5,8-6,1. Процент стерильности семян составил 100%. Проростки развивались на 6-21 сутки культивирования. Процент нежизнеспособных семян составил 8%.

Через 30 суток культивирования проростки пересаживали на среду МС с добавлением БАП 0,50 мг/л, кинетина 0,50 мг/л, зеатина 0,50 мг/л или 2ip 0,50 мг/л. Контролем служила безгормональная среда МС. Через три недели производили подсчет коэффициента размножения и визуальную оценку общего состояния растений. Увеличение длительности пассажа приводило к некрозу прикорневых листьев и оводнению части регенерировавших микропобегов (до 20%). Максимальный коэффициент размножения был отмечен на среде, содержащей БАП (10,30±2,50 микропобегов/эксплант). Использование кинетина, зеатина и 2ip было малоэффективным. На питательной среде с зеатином размножение практически отсутствовало (1,00±0,17 адвентивных побегов/эксплант), но обращало на себя внимание качество побегов – в отличие от вариантов с БАП, кинетином и 2ip, формировалась плотная розетка с максимальными длиной черешков и развитым листьям. Исходя из этого, в последующем взяли сочетание зеатина 0,5 мг/л, и БАП с концентрацией, уменьшенной вдвое (0,25 мг/л) в целях снижения мутагенного эффекта. Этот вариант был лучшим для роста и регенерации эксплантов. При коэффициенте размножения 8,14±3,24 микропобегов/эксплант микроклоны легко отделялись от общей розетки и морфологически были более близки к нативным растениям. В контрольном варианте микроразмножение отсутствовало, но в отличие от всех остальных вариантов, был отмечен ризогенез. Использование питательной среды В<sub>3</sub> с БАП 0,1 мг/л привело к снижению коэффициента размножения (1:2-1:4), миниатюризации размеров регенерантов, увеличению длительности пассажа до 40 суток.

Таким образом, получена стерильная, стабильно растущая культура *Potentilla vulgarica*. Установлено, что оптимальным для регенерации пазушных меристем является сочетание зеатина и БАП. Полученные результаты могут служить основой для дальнейших работ по сохранению вида в условиях депонирования и созданию генетического банка *in vitro*.

**FEATURES OF THE INTRODUCTION OF  
*POTENTILLA VOLGARICA* JUZ. TO THE CULTURE *IN VITRO***

**Kriczkaya T.A., Kashin A.S.**

Botanical Garden of Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, 410010, Saratov, Navashin str., tel. (845-2) 64-71-20, e-mail: kriczkaya.tatyana@mail.ru

Mature seeds of intact plants were taken as explants. They were immersed in a solution of synthetic detergent «Pril» («Henkel-ERA" Tosno) and exposed on a shaker for 30 minutes, then repeatedly washed with distilled water. They were treated with 70% ethanol for 5 min, transferred to a 25% solution (1:3) bleach "White" ("Electra", Volgograd) with the addition of 2-3 drops of detergent «Tween 80» («PanreacQuimics», UK) and exposed 20-30 min on a shaker. The seeds were washed again five times with sterile distilled water. In the laminar flow hood the explants were transferred to a culture medium and germinated for 30 days at 23-25 °C, 16-hour photoperiod, 3000 lux illumination. Seedlings were separated from the roots and lower leaves, were transferred to culture medium with different combinations of plant hormones - BAP («Alfa Aesar», Germany), zeatin («DuchefaBiochemie», The Netherlands), kinetin («Alfa Aesar», Germany), 2-isopentyl adenine (2ip, «Santa Cruz Biotechnology», USA).

The growth medium contained macro- and micronutrients by the prescription Murashige and Skoog (MS), and sucrose (30 g/l), mezoiozitol (100 mg/l), thiamine (0,5 mg/l), pyridoxine (0,5 mg/l), nicotine (0,5 mg/l) and ascorbic (1,0 mg/l) acid («PanreacQuimics», ES). Concentration of agar («PanreacQuimics», ES) was 5-6 g/l for the initial environment, and 8 g/l - for the remaining stages of cultivation. As a supplementing option, B5 medium with BAP 0,1 mg/l was used. To obtain virus-free seedlings we used the method of chemotherapy, adding initial environment for germination virazolom (2 mg/l) without phytohormones with medium pH 5,8-6,1. The percentage of sterile seeds constituted 100%. Seedlings developed by the 6th-21th day of cultivation. The percentage of non-viable seeds constituted 8%.

After 30 days of cultivation seedlings were transplanted on MS medium supplemented with BAP 0,50 mg/l, kinetin 0,50 mg/l, zeatin 0,50 mg/l or 2ip 0,50 mg/l. MS medium without hormones served as a controller. Three weeks later the multiplication factor and the overall visual condition of the plants were assessed. Increasing of the duration of the passage led to necrosis of basal leaves and water content of the regenerated microshoots (up to 20%). Maximum multiplication factor was observed in the medium containing BAP (10,30±2,50 microshoots/explant). The use of kinetin, zeatin and 2ip was not effective. On medium with zeatin reproduction were almost absent (1,00±0,17 adventitious shoots / explant), but shoots quality was remarkable—unlike on options with BAP, kinetin and 2ip, a dense rosette with a maximum length of stem and leaf development formed. Based on this, we took a combination of zeatin 0,5 mg/l BAP with concentration, reduced by half (0,25 mg/l) in order to reduce the mutagenic effect. This option was the best for the growth and regeneration of the explants. When using multiplication factor of 8,14±3,24 microshoots/explant mikrokloniy were easily separated from the common outlet and morphology were more similar to the native plants. Micropropagation in the control was missing, but unlike all the other options, there has been rhizogenesis. Use of B<sub>5</sub> medium with BAP 0,1 mg/l reduced the multiplication factor (1:2-1:4), miniaturization of regenerated explants, it also increased the duration of passage up to 40 days.

Thus a sterile, stable growing culture *Potentilla vulgarica* was obtained. The optimal regeneration of axillary meristems is a combination of zeatin and BAP. These results provide a basis for the further work on the preservation of the species in the deposit and the creation of a genetic bank *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ВИДОВ СЕМЕЙСТВА *CUPRESSACEAE*Курицкая Е.В., Вржосек Э.В., Болтенков Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад-институт ДВО РАН, 690024, Владивосток, ул. Маковского, д. 142, тел. (8423) 238-86-11, факс (8423) 238-80-41, e-mail: kuritskaya.ya.2202@yandex.ru

Метод культуры органов и тканей растений является альтернативным способом вегетативного размножения редких и хозяйственно ценных видов. Объектом исследования явились представители семейства *Cupressaceae* Bartl.: *Microbiota decussata* Kom., *Juniperus chinensis* var. *sargentii* A. Henry. Эти растения обладают ценными биологическими и декоративными свойствами, их относят к категории редких видов.

Для введения в культуру *in vitro* в качестве эксплантов использовали побеги первого года развития (2–4 см длиной). Растительный материал собирали в августе–сентябре и стерилизовали по разработанной нами методике. Побеги высаживали на среду Мурасиге-Скуга с добавлением фитогормонов: индолилмасляной кислоты (ИВА), индолилуксусной кислоты (IAA), нафтилукусная кислота (NAA), трифодобензойная кислота (ТИВА), 2-изопентениладенина (2iP), 6-бензиламинопурина (BAP).

Исследовали влияние фитогормонов на рост и развитие побегов. Оптимальным фитогормоном для роста и развития побегов в культуре *in vitro* является ИВА в концентрации 0,1–1,0 мг/л. Установлено, что для эффективного роста побегов *Juniperus chinensis* var. *sargentii* необходима ИВА в концентрации 0,1 мг/л, а для *Microbiota decussata* – 1,0 мг/л. В присутствии других фитогормонов наблюдали различную реакцию побегов. При добавлении NAA в сочетании с BAP наблюдали хлороз и гибель побегов. Добавление 2iP на начальном этапе культивирования способствовало развитию пазушных почек, однако в дальнейшем побеги утолщались и погибали. В присутствии ТИВА отмечали слабый рост побегов и некроз тканей. На средах с IAA наблюдали либо гибель отдельных побегов, либо рост и развитие. В присутствии NAA рост побегов был замедленным. Влияние фитогормонов на морфогенез побегов исследованных видов в культуре *in vitro* было сходным. Выявлено, что у *Microbiota decussata* развитие побегов происходит из придаточных почек, а у *Juniperus sargentii* этот процесс преобладает. Установлено, что развитие адвентивных корней у *Microbiota decussata* происходит в присутствии ИВА (0,1 мг/л) на четвёртом месяце культивирования.

**CULTIVATION OF CUPRESSACEAE IN VITRO**  
**Kuritskaya E.V., Wrjhosek E.V., Boltakov E.V.**

Botanical Garden-Institute FEB RAS, 690024, Vladovostok, Makovskii str., 142, tel. / fax: (8423) 238-80-41 e-mail: kuritskaya.ya.2202@yandex.ru

Cultivation method of plant organs and tissues is an alternative way of cloning rare and valuable species. Object of studies is presented by *Cupressaceae* Bartl.: *Microbiota decussata* Kom., *Juniperus chinensis* var. *sargentii* A. Henry. These plants possess valuable biological and ornamental properties.

To cultivate them *in vitro* we used first year sprouts (2-4 sm length) as explants. Vegetative material was collected in august and September and sterilized according to our developed method. The sprouts were planted in Murashige and Skoog medium with adding phytohormones: indolebutyric acid (IBA), indoleacetic acid (IAA), naphthylacetic acid (NAA), triiodobenzoic acid (TIBA), 2- isopentenyladenine (2iP), 6-benzylaminopurine (BAP). We studied the impact of phytohormones on growth and development of sprouts.

The most optimal phytohormone for growth and development of sprouts in cultivating *in vitro* is IBA with tonicity of 0,1–1,0 mg/l. It was determined that for effective growth of sprouts of *Juniperus chinensis* var. *Sargentii* we need IBA with tonicity of 0,1 mg/l and for *Microbiota decussata* 1,0 mg/l. We observed different reaction of sprouts using other phytohormones. We observed chlorosis and sprouts death when used BAP. Addition of 2iP in the beginning of cultivation led to development of axillary buds, but then sprouts thickened and died. We observed poor growth of sprouts and death of tissues when we've been using TIBA. There were growth, development or deaths of some sprouts in the mediums with IAA. Sprouts growth was slowed-down with NAA. The impact of phytohormones on morphogenesis of sprouts of studied species was similar. It was observed that the development of sprouts of *Microbiota decussata* occurs in accessory buds and if talking about *Juniperus sargentii*, this process is prevailed. It was determined that the development of adventitious roots of *Microbiota decussata* occurs with IBA (0,1 mg/l) on the fourth month of cultivating.

## СОЗДАНИЕ БАНКА ГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* И КРИОСОХРАНЕНИЯ

Магзумова Г.К., Какимжанова А.А.

РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана

В республике Казахстан генофонд картофеля отечественной и зарубежной селекции представлен преимущественно полевыми коллекциями. В связи с этим, разработка комплексной технологии по сохранению генофонда картофеля с использованием полевых условий, условий *in vitro*, криоконсервации будет способствовать расширению агробиоразнообразия, повышению эффективности селекционных работ, ускоренному клональному размножению элитного посадочного материала.

Целью исследований являлось создание банка генов картофеля с использованием культуры *in vitro* и криосохранения.

В качестве объектов исследований использовали в основном 32 сорта и 15 гибридов казахстанской селекции, 8 регенерантов картофеля, полученные биотехнологическими методами. Использовали следующие методы: проращивание клубней, тестирование на вирусные инфекции, стерилизация и вычленение апикальных меристем, культивирование апикальных меристем, микроклональное размножение, подбор криопротектора, криоконсервация в жидком азоте, регенерация и адаптация растений.

В результате исследований для введения в культуру *in vitro* образцов картофеля подобрали оптимальные режимы поверхностной стерилизации апикальных меристем, выделенных из глазков клубней картофеля. Для этого использовали 8 вариантов поверхностной стерилизации, которые отличались между собой в зависимости от концентрации стерилизующего агента и времени экспозиции - 7, 10 минут. Использовали следующие дезинфицирующие реагенты: Твин 20 (вязкая жидкость, монолаурат полиоксиэтиленсорбитана) и раствор коммерческого хлорсодержащего реагента «Белизна» (активный хлор 2,8%, гидроксид натрия 2,0%) в различных концентрациях - 20%; 70%; 100%.

При подборе режимов стерилизации для введения в культуру апикальных меристем картофеля наибольшее количество выживших меристем (95,7%) наблюдали при обработке раствором 20% Белизны+Tween (10 минут), при снижении времени экспозиции до 7 минут составил 91,3%. При стерилизации раствором Белизна 100% (10 минут) апикальные меристемы темнели и теряли способность к росту, процент выживших меристем составил только 59,1%. Таким образом, для введения апикальных меристем в культуру *in vitro* рекомендуется использовать поверхностную стерилизацию в растворах 20% Белизны+Tween с экспозицией 7-10 минут.

Для культивирования апикальных меристем применяли четыре варианта питательной среды Мурасиге-Скуга (МС) с использованием различных комбинаций фитогормонов: гибберелловая кислота (2 мг/л), кинетин (2 мг/л), 2,4-Д (1 мг/л), БАП (1 мг/л), ИУК (1-2 мг/л). В результате сравнительного анализа не было выявлено влияние концентрации фитогормонов на рост и развития апикальных меристем. Следовательно, при введении апикальных меристем картофеля в культуру *in vitro* можно использовать четыре варианта среды.

Таким образом, создали коллекцию пробирочных растений образцов картофеля в культуре *in vitro* и в качестве растительного материала для криосохранения. В настоящее время проводится оптимизация условий криоконсервации образцов картофеля и микроклональное размножение пробирочных растений для создания банка генов в культуре *in vitro* и криоконсервации.

**CREATION OF POTATO GENE BANK  
USING *IN VITRO* CULTURES AND CRYOPRESERVATION  
Magzumova G.K., Kakimzhanova A.A.**

RSE "National Center for Biotechnology", Kazakhstan, Astana

In the Republic of Kazakhstan gene pool of potato varieties of domestic and foreign selection is represented mainly by field collections. In this regard, the development of comprehensive complex technology to preserve the gene pool of potato with the use of growing in a field, *in vitro* cultures and cryopreservation will promote agro-biodiversity, improve the efficiency of breeding, and accelerate clonal propagation of the elite planting material.

The aim of this study was to create a gene bank of potato using the *in vitro* cultures and cryopreservation.

The objects of the study were mainly 32 varieties and 15 hybrids of Kazakhstan selection, and 8 regenerated potato genotypes produced by biotechnological methods. We utilized the following methods: sprouting of tubers, testing for viral infections, sterilization and isolation of the apical meristem cultures, micropropagation, selection of cryoprotectant, cryopreservation in liquid nitrogen, regeneration and adaptation of plants.

The introduction of plants into the *in vitro* cultures resulted in development of the protocol for surface sterilization of the apical meristems isolated from potato tuber eyes. For this purpose, 8 options of surface sterilization were tested which differed in the concentration of sterilization agent and exposure time - 7, 10 minutes. Tested reagents were: Tween 20 (viscous liquid polyoxyethylene sorbitan monolaurate) and a solution of commercial chlorine reagent "Belizna" (2,8% active chlorine, 2,0% sodium hydroxide), which were applied at different concentrations - 20%, 70%, 100%. The best survival of meristems (95,7%) was observed in the sterilizing solution 20% "Belizna" + Tween (10 minutes). Reduction in the exposure time to seven minutes resulted in 91,3% survival. When sterilizing solution was 100% "Whiteness" (10 min) apical meristem turned dark and lost the ability to grow, the percentage of surviving meristems was only 59,1%. Thus, for administration to the apical meristems in the *in vitro* cultures it is recommended to use surface sterilization with 20% "Belizna"+Tween with exposure 7-10 minutes.

For the cultivation of apical meristems four different media were tested based on the Murashige-Skoog (MS) recipe with addition of combinations of plant hormones: gibberelic acid (2 mg/l), kinetin (2 mg/l), 2,4-D (1 mg/l), BAP (1 mg/l), IAA (1,2 mg/l). Comparative analysis revealed no effect of the concentration of plant hormones on the growth and development of the potato apical meristems. Therefore, for introduction of potato apical meristem into the *in vitro* cultures, all four different media may be used.

Thus, we developed a collection of test tube potato plants and *in vitro* cultures, which will be utilized as starting material for the cryopreservation. Currently, the optimization of the conditions of cryopreservation and micropropagation of test-tube potato plants is performed to produce a potato gene bank in a form of the *in vitro* cultures and cryopreserved samples.



**ВЛИЯНИЕ ТИПА ЭКСПЛАНТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КРЫЖОВНИКА *IN VITRO*****Матушкин С.А.**

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства им. И.В. Мичурина, 393774, г. Мичуринск, ул. Мичурина, д 30, тел. (07545) 2 07-61, факс: (07545) 2-07-61, e-mail: invitro82@yandex.ru

В настоящее время метод клонального микроразмножения является наиболее перспективным в современном сельском хозяйстве. Преимущества данного метода, по сравнению с традиционными способами размножения, заключаются в возможности получения оздоровленного посадочного материала, быстром размножении ценных клонов, в получении вегетативного потомства у трудноразмножаемых форм.

Крыжовник является одной из ведущих ягодных культур наряду с земляникой, малиной и смородиной. Одной из основных проблем при размножении крыжовника *in vitro* является гибель единичных побегов на стадии собственно микроразмножения.

Целью наших исследований было изучить влияния типа эксплантов на пролиферацию перспективных сортов крыжовника селекции ВНИИС им. И.В. Мичурина: Казачок и Серенада. В качестве эксплантов использовали единичные побеги и клубки, состоящие из двух–трёх побегов.

В ходе проведённых исследований были получены следующие результаты. Наибольший процент гибели отмечен в варианте с единичными побегами у сортов Казачок – 90,0% и Серенада - 45,8%, что нельзя сказать о клубках, где процент был значительно меньше, на 12,5 и 10,0 % соответственно.

Коэффициент размножения в варианте с клубками составил у Серенады 12,5, а у Казачка 13,7 шт./эксплант, что в 2,3–6,9 раз больше, чем у единичных побегов. У сорта Серенада отмечались единичные побеги, пригодные к укоренению.

Таким образом, наилучшими для размножения *in vitro* сортов крыжовника Серенада и Казачок являются экспланты в виде клубков, которые по коэффициенту размножения и сохранности превосходят единичные побеги.

---

**THE EFFECT OF EXPLANT TYPE ON GOOSEBERRY PROLIFERATION *IN VITRO***  
**Matushkin S.A.**

I.V. Michurin Research Institute of Horticulture, 393774, Michurinsk, Michurin str., 30,  
tel. (07545) 2-07-61, fax (07545) 2-07-61, e-mail: invitro82@yandex.ru

At present the method of clonal micropropagation is the most promising in agriculture. The potential of production of sanitized planting material and short-term propagation of valuable clones and obtaining a vegetative progeny in hard-to propagate selections confirm the advantages of the given method compared with conventional methods of propagation.

Gooseberry similar to strawberry, raspberry and currant is one of the promising small fruit crops.

Mortality of individual shoots at the stage of proliferation is one of the main problems during gooseberry propagation *in vitro*.

The experiments were aimed at study on the effect of explants type on proliferation of promising gooseberry cvs Kazachok and Serenada bred at VNIIS named after I.V. Michurin. Individual shoots and knots consisting of two–three shoots were used as explants. The highest percent of mortality (90,0% and 45,8%) was observed in the treatment with individual shoots in cvs Kazachok and Serenada respectively compared with much lower percent (12,5 and 10,0%) in knots correspondingly.

Propagation coefficient in the treatment with knots was 12,5 and 13,7 piece/explants in Serenada and Kazachok correspondingly which in 2,3–6,9 times exceeds the values in individual shoots. The individual shoots in Serenada were suitable for rooting. Therefore explants in the form of knots are the most suitable for propagation *in vitro* of gooseberry cvs Serenada and Kazachok exceeding individual shoots in propagation coefficient and level of survival.

## ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ЯБЛОНИ И ГРУШИ *IN VITRO*

Матушкина О.В.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства им. И.В. Мичурина, 393774, г. Мичуринск, ул. Мичурина, д 30, тел. (07545) 2 07 61, факс: (07545) 2-07-61, e-mail: invitro82@yandex.ru

В основе клонального микроразмножения растений лежит регуляция морфогенеза с помощью биологически активных веществ. Наиболее важны среди них цитокинины, ауксины, гиббереллины.

Культивирование клоновых подвоев яблони 62-396, 57-491 на этапе введения в культуру *in vitro* на средах, содержащих не только БАП (0,5 мг/л), но и в сочетании с ИМК (0,02 мг/л) и ГК (0,02 мг/л) показало, что лучше регенерация меристематических верхушек проходила на среде, содержащей лишь БАП. Совместное введение на фоне БАП ИМК или ИМК и ГК не стимулировало морфогенез. Через 6 недель культивирования на среде с 0,5 мг/л БАП образовывалось как максимальное количество эксплантов, достигших фаз развития розетки (62,5%), так и количество побегов на эксплант (до 5,5 шт.). На средах с ИМК наблюдалось формирование незначительного каллуса, а при добавлении к среде помимо ИМК и ГК образование каллусной ткани было значительным.

Прибавление к среде с БАП 1,0 и 2,0 мг/л 0,2 мг/л ГК и 0,1 мг/л ИМК на этапе пролиферации у клоновых подвоев и сортов яблони: Р59, 57-195, 3-17-38, 62-396, Вишневое, Орлик, и груши: ПГ 12, Осенняя Яковлева и Пхорун не позволило увеличить количество побегов пригодных для укоренения и коэффициент размножения. У всех форм и сортов максимальное количество побегов оптимальной для укоренения длины отмечено только на среде с БАП 1,0 мг/л. При этом количество побегов, пригодных для укоренения, варьировало от 28,8 до 100,0% в зависимости от генотипа и превосходило более чем в 2 раза вариант с БАП 2,0 мг/л. На среде с БАП 1,0 мг/л наблюдалось снижение коэффициента размножения, которое было особенно значительным у подвоя яблони Р59 (в 1,7 раза по сравнению со средой, содержащей БАП 2,0 мг/л). Введение ГК и ИМК совместно с БАП 2,0 мг/л не оказывало существенного влияния на коэффициент размножения и даже приводило к его незначительному снижению по сравнению с контролем (БАП 2,0 мг/л). Коэффициент размножения при этом больше зависел от генотипа, чем от содержания регуляторов роста. У сортов он варьировал от 1,1 у яблони Вишневое до 7,3 у груши Пхорун, а у подвоев от 3,9 у подвоя яблони 62-396 до 13,4 у Р59. Кроме того, это также способствовало снижению количества микрочеренков оптимальной для укоренения длины у большинства генотипов.

Таким образом, введение в состав питательной среды, содержащей БАП, ГК и ИМК на этапах введения в культуру *in vitro* и собственно микроразмножения яблони и груши является нецелесообразным.

**THE EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON  
APPLE AND PEAR REGENERATION *IN VITRO*****Matushkina O.V.**

I.V. Michurin Research Institute of Horticulture, 393774, Michurinsk, Michurin str., 30,  
tel. (07545) 2-07-61, fax (07545) 2-07-61, e-mail: invitro82@yandex.ru

Morphogenesis control by means of biologically active substances is a background for clonal micropropagation of plants. Cytokinins, auxins and gibberellins are the most important ones. Apple clonal rootstocks 62-396, 57-491 were cultivated at the stage of introduction into *in vitro* culture on medium containing not only BAP (0,5 mg l<sup>-1</sup>) but also a combination of IBA (0,02 mg l<sup>-1</sup>) and GA (0,02 mg l<sup>-1</sup>). Only BAP containing medium resulted in the highest level of regeneration of meristematic tips. Lack of morphogenesis stimulation was recorded on medium containing combination of BAP and IBA or IBA and GA. In 6 weeks of cultivation on medium with 0,5 mg l<sup>-1</sup> BAP both maximum number of explants achieving rosette phase of development (62,5%) and amount of shoots per explant (up to 5,5 pieces) were produced. Reduced callus formation was observed on media containing IBA. Supplementation of IBA together with GA resulted in increased callus tissue formation.

Supplying BAP containing medium with 1,0 and 2,0 mg l<sup>-1</sup> GA and 0,1 mg l<sup>-1</sup> IBA at the stage of proliferation in apple clonal rootstocks P59, 57-195, 3-17-38, 62-396 and cvs Vishnyovoe, Orlik and pear PG 12, Osennaya Yakovleva and Pkhorun wasn't efficient in increase of shoot number suitable for rooting and propagation coefficient also. Maximum number of shoots with length optimum for rooting was found out in all selections and cultivars only on medium containing BAP (1,0 mg l<sup>-1</sup>). Amount of shoots suitable for rooting varied in the range of 28,8-100% depending on genotype and exceeded twice the results of the treatment with BAP in concentration 2,0 mg l<sup>-1</sup>. The reduction of propagation coefficient especially significant in apple rootstock P59 (1,7 fold compared with medium containing 2,0 mg l<sup>-1</sup> BAP) was observed on medium with BAP in concentration 1,0 mg l<sup>-1</sup>. Introduction of GA and IBA together with BAP (2,0 mg l<sup>-1</sup>) resulted in no significant effect on propagation coefficient and even insignificant decrease compared with control (BAP 2,0 mg l<sup>-1</sup>). The dependence of propagation coefficient on genotype rather than on growth regulator content was shown. Its variation determined in apple Vishnyovoe (1,1), pear Pkhorun (7,3) in apple rootstock 62-396 (3,9) and P59 (13,4) resulted in reduction of number of microcultivings with length optimum for rotting the most genotypes. Therefore at stages of introduction into *in vitro* culture and proliferation of apple and pear on BAP containing medium supplements of GA and IBA can't be recommended.

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
КОЛЛЕКЦИИ ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ БЕРЕЗЫ, ДЛИТЕЛЬНО  
КУЛЬТИВИРУЕМОЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

**Машкина О.С.<sup>1,2</sup>, Табацкая Т.М.<sup>2</sup>, Баранов О.Ю.<sup>3</sup>, Зеленина Е.А.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, 94006, Воронеж, Университетская пл., д. 1; тел. (473) 220-88-76, e-mail: olga\_mashkina@yahoo.com

<sup>2</sup>ФГУП НИИ лесной генетики и селекции, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105; тел. (473)253-94-36, факс (473)253-71-89, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

<sup>3</sup>Институт леса НАН Беларуси, 240001, Беларусь, Гомель, ул. Пролетарская, д. 71; тел. (375232) 74-69-02, e-mail: betula-belarus@mail.ru

Депонирование коллекции микрорастений в культуре *in vitro* – современный подход сохранения *ex situ* представителей ценного генофонда лесных древесных растений. Ранее нами был предложен метод (Машкина, Табацкая, Стародубцева, 1999), уменьшающий вероятность возникновения соматональной изменчивости при многолетнем культивировании (полное исключение фитогормонов из состава питательных сред и редкое (раз в 6-8 месяцев) субкультивирование). Это может обеспечить генетическую стабильность коллекции и способствовать сохранению ценных признаков исходных генотипов. Коллекция ценных генотипов карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) с узорчатой текстурой древесины и декоративных расщепленных форм березы далекарлийской (*B. pendula* “dalecarlica”(L.f.)) поддерживается нами таким способом свыше 10-20 лет с периодической высадкой растений в питомник.

В процессе длительного культивирования все клоны сохраняли высокую жизнеспособность, свои морфологические особенности, плоидность (диплоиды -  $2n=2x=28$ , или полиплоиды -  $2n=3x=42$ ,  $2n=4x=56$ ), а клоны карельской березы еще и характерную для нее миксоплоидную природу. Полевые испытания растений одних и тех же клонов карельской березы, высаженных в питомник после длительного (от года до 11 лет) культивирования *in vitro*, выявили их внутрикловую однородность и идентичность исходным экземплярам по особенностям роста, габитусу, качеству древесины и молекулярно-генетическим особенностям. У клонов каллусного происхождения узорчатость древесины положительно коррелировала со степенью миксоплоидии ее соматической ткани, которая была сильнее выражена у растений, полученных в первые годы культивирования. Это позволило нам предположить миксоплоидно-эпигенетический характер проявления узорчатости древесины у карельской березы (Машкина, Буторина, Табацкая, 2011).

На основе длительного культивирования *in vitro* нами получены и поддерживаются в коллекции клоны с аномальным фенотипом. Среди них мутантный клон J1 карельской березы, характеризующийся комплексом измененных морфологических признаков и полным отсутствием способности к укоренению (формирующий каллусоподобную структуру вместо корней). Проведенный молекулярно-генетический анализ с использованием SSR-маркеров показал у него наличие явления «потери гетерозиготности», что может быть вызвано хромосомными (делеции или дупликации фрагментов хромосом) или геномными (наличием гетероплоидных клеток) мутациями, а проведенный цитогенетический анализ выявил маркерную хромосому с сильно суженным районом плеча одной из 28-ми хромосом. У ревертирующего к нормальному фенотипу (цельный лист) клона березы далекарлийской расщепленной формы выявлено существенное увеличение количества высокоактивных компактных ядрышек в интерфазных ядрах (в 3-4 раза по сравнению с расщепленными клонами) и остаточных ядрышек на стадиях метафазы-телофазы митоза (в 5-6 раз), что, по нашему мнению, является цитологическим проявлением эпигенетической изменчивости. Подобные генетические модели с измененной программой развития признаков представляют значительный интерес для изучения генетики морфогенеза.

**CYTOGENETIC AND MOLECULAR-GENETIC FEATURES OF VALUABLE BIRCH  
GENOTYPES COLLECTION, LONG-TERM CULTURED *IN VITRO*  
Mashkina O.S.<sup>1,2</sup>, Tabatskaya T.M.<sup>2</sup>, Baranov O.Yu.<sup>3</sup>, Zelenina E.A.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, 394006, Voronezh, Universitetskaya square, 1, tel. (473)220-88-76, e-mail: olga\_mashkina@yahoo.com

<sup>2</sup>Research Institute of Forest Genetics and Breeding, 394087, Voronezh, Lomonosova str., 105, tel. (473)253-94-36, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

<sup>3</sup>Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, 240001, Belarus, Gomel, Proletarskaya str., 71, tel. (375 232) 74-69-02, e-mail: [betula-belarus@mail.ru](mailto:betula-belarus@mail.ru)

Deposition of microplant collection *in vitro* is a modern approach to *ex situ* conservation of valuable forest tree species gene pool. We have previously proposed an approach (Mashkina, Tabatskaya, Starodubtseva, 1999), which reduces the risk of somaclonal variation in long-term cultivation (total exclusion of phytohormones from the culture media and rare (every 6-8 months) subculturing). This approach can provide genetic stability of collection and promote to preserve valuable traits of initial genotypes. We support the collection of valuable genotypes of Karelian birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) with patterned wood grain and decorative forms of birch with dissected leaves (*B. pendula* "dalekarlica" (Lf)) more than 10-20 years with periodically planting trees in nursery.

During long-term cultivation all clones have been maintained high viability, their morphological features, ploidy (diploids -  $2n = 2x = 28$ , or polyploids -  $2n = 3x = 42$ ,  $2n = 4x = 56$ ), clones of Karelian birch kept their mixoploidy nature. Field tests of ramet of Karelian birch clones after prolonged (from one year to 11 years) *in vitro* cultivation revealed their intracolonial homogeneity and identity to the original samples (on the specifics of growth, habit, wood quality, ploidy, cytogenetic and molecular genetic characteristics). Figure wood of clones derived from callus culture was positively correlated with the degree of mixoploidy of somatic tissues, which more pronounced in plants obtained in the first years of cultivation. This fact allows us to suggest an mixoploidy-epigenetic character of Karelian birch figured wood (Mashkina, Butorina, Tabatskaya, 2011).

Based on long-term culturing *in vitro*, we obtained and maintained in the collection of clones with an abnormal phenotype. Among them there are the mutant clone L of Karelian birch, characterized by complex changes in the morphological characteristics and the complete absence of ability to take root (forming callus-like structure instead of the roots). The molecular-genetic analysis using SSR-markers showed presence of the phenomenon of "loss of heterozygosity", which can be caused by a chromosomal (deletions or duplications of chromosome fragments) or genomic (presence heteroploid cells) mutations. Cytogenetic analysis revealed a marker chromosome with highly constricted arm area of the one of the 28 chromosomes. The clone of cut-leaved birch reverted to a normal phenotype (plain leaf) revealed a significant increase in the number of highly compact nucleoli in interphase nuclei (3-4 times compared to cut-leaved clones) and residual nucleoli at metaphase-telophase of mitosis (5-6 time), which, in our opinion, is a cytological display of epigenetic variability. These genetic models with altered development program are interesting to study the genetics of morphogenesis.

## ИНДУКТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Митрофанова И.В.<sup>1,2</sup>, Митрофанова О.В.<sup>2</sup>, Лесникова-Седошенко Н.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Учебно-научный центр биологии и экологии субтропических растений и ландшафтоведения Национального университета биоресурсов и природопользования Украины, 98648, Украина, АР Крым, Ялта, Никита, д. 52, тел. / факс: 38 (0654) 336-446, e-mail: nikita@nauu.kiev.ua

<sup>2</sup>Никитский ботанический сад - Национальный научный центр, 98648, Украина, АР Крым, г. Ялта, Никита, тел. (0654) 33-68-59, факс (0654) 33-53-86, e-mail: in\_vitro@ukr.net

Известно, что различные экспланты (меристемы, вегетативные почки, зиготические и соматические зародыши, листья, побеги и корни) исследуемых многолетних садовых культур культивируются в условиях *in vitro* на ряде питательных сред, таких как Уайта, Нитча, Гамборга (B5), Мурасиге и Скута (МС), WPM, DKW и др. Среда МС обычно используется в половинной концентрации макро- и микролей и является базовой питательной средой для многих культурных и диких видов растений (Бутенко, 1962; 1999; Калинин и др., 1992; Митрофанова, 1997, 2011; Dunstan et al., 1995; Merkle, 1997, 2000). Для каждого этапа морфогенеза *in vitro* применяются соответствующие питательные среды. Это могут быть одна, две или три среды, которые содержат как ингибиторы, так и индукторы определенных процессов. Особое место в этих процессах занимают регуляторы роста, витамины и осмотики. Часто лимитирующее или избыточное содержание этих веществ в среде вызывает гибель культивируемых органов и тканей. Так, для культур, которые регенерируют из дифференцированной ткани, необходимо добавление в питательную среду экзогенных регуляторов роста. Пределы эффективных концентраций ауксинов составляют 1,1 – 22,6 мкМ для 2,4-Д и 0,5 – 1,7 мкМ для НУК. Форма поступления азота в растения и его оптимальная концентрация зависит также от концентрации таких ауксинов, как пиклорам и дикамба. В случае использования зиготических зародышей определяющими факторами могут быть питательные среды, низкие положительные температуры и продолжительность стратификации. Субкультивирование соматических зародышей со среды, содержащей ауксин, на среду без ауксинов способствует дифференциации их органов. Цитокинины БАП и БА применяют на этапах пролиферации соматических зародышей и регенерации эмбрионидов в полноценные растения. Вместе с тем для индукции прямого соматического эмбриогенеза и органогенеза из генеративных и вегетативных тканей растений широко используют тиадазурон (ТДЗ). У трудно размножаемых видов растений применение ТДЗ повышает частоту регенерации до 90 – 100%. Добавление в среду АБК обеспечивает нормальное развитие соматических зародышей *in vitro*, стимулируя накопление запасных веществ и ингибируя их раннее прорастание. Важнейшими факторами регулирования морфогенеза растений *in vitro* являются также освещение и температура. Оба эти фактора могут ингибировать и индуцировать процессы регенерации растений в условиях *in vitro*. Так низкая освещенность (500–1000 лк) ингибирует процесс образования фенолов у эксплантов введенных в условия *in vitro*. Температура 21±1 °С ингибирует процессы индукции регенерации у субтропических растений, при этом активизирует рост и развитие эксплантов, представителей умеренного климата.

Особую роль в сохранении *in vitro* растительных объектов играют ретарданты, осмотики и физические факторы культивирования (температура и освещенность). Эти факторы ингибируют ростовые процессы и при этом позволяют длительный период сохранять декоративные, субтропические и косточковые плодовые, эфиромасличные и лекарственные культуры. Продолжительность сохранения значительно различается у различных видов и сортов растений. Часть ретардантов кроме ингибирующего эффекта оказывают индуцирующее действие на образование и рост корней. Такой эффект был отмечен у большинства сортов клематиса, розы и сливы. Наряду с эффектом сохранения ценных растительных объектов комплексное воздействие осмотиков, ретардантов, низкой позитивной температуры и освещенности способствует последующей активной регенерации при перенесении в стандартные условия культивирования.

**IDUCTORS AND INHIBITORS OF BIOTECHNOLOGY PROCESS OF PLANT PROPAGATION AND CONSERVATION****Mitrofanova I.V.<sup>1,2</sup>, Mitrofanova O.V.<sup>2</sup>, Lesnikova-Sedoshenko N.P.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Educational Scientific Center of Biology and Ecology of Subtropical Plants and Landscape Management of National University of Life and Environmental Science of Ukraine, 98648, Ukraine, Crimea, Yalta, Nikita, 52, tel. / fax 8 (0654) 336-446, e-mail: nikita@nauu.kiev.ua

<sup>2</sup>Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center, 98648, Ukraine, Crimea, Yalta, Nikita, tel. 38 (0654) 336859, fax 38 (0654) 335386, e-mail: in\_vitro@ ukr.net

It is known that different explants (meristem, vegetative buds, zygotic and somatic embryos, leaves, stems and roots) of investigated perennial horticultural plants cultivated in vitro on such culture medium, as White, Nitsch, Gamborg (B5), Murashige and Skoog (MS), WPM, DKW, etc. MS media typically used in half concentration of macro- and microelements and is a basic culture medium for many cultivated and wild plant species (Butenko, 1962, 1999; Kalinin et al, 1992; Mitrofanova, 1997, 2011; Dunstan et al., 1995; Merkle, 1997, 2000). For each stage of morphogenesis in vitro appropriate medium have been applied. This may be one, two or three medium supplemented both inhibitors and inducers of certain processes. Special places in these processes take growth regulators, vitamins and osmotics. Often the limited or excess amount of these substances in the medium causes the death of cultured organs and tissues. Thus, for plants regeneration from differentiated tissue the exogenous growth regulators must be added to the culture medium. The limits of effective concentrations of auxin are 1,1 – 22,6  $\mu\text{M}$  for 2,4-D and 0,5 – 1,7  $\mu\text{M}$  for NAA. The form of nitrogen in the plant and its optimum concentration also depends on the concentration of auxin such as dicamba and picloram. In the case of zygotic embryos using in experiments the determinants should be culture media, low positive temperatures and the duration of stratification. Subculture of somatic embryos from medium containing auxins to medium without auxins promotes differentiation of organs. BAP and BA applied at the stages of proliferation of somatic embryos and regeneration of the embryos into plants. However, for the induction of direct somatic embryogenesis and organogenesis from generative and vegetative tissues of plants, thidiazuron (TDZ) has been widely used. For difficult-propagated plant species application of TDZ increased the frequency of regeneration up to 90-100%. The addition of ABA provides the normal development of somatic embryos in vitro, stimulating the accumulation of reserve substances and inhibiting their early germination. The most important factors regulated of plant morphogenesis in vitro are also light intensity and temperature. Both of those factors inhibit and induce plant regeneration in vitro. Low light intensity (500-1000 lx) inhibits the phenols formation during the time of explants introduction in vitro. Temperature  $21 \pm 1$  °C inhibits the induction of subtropical plants regeneration, while stepping up the growth and development of explants in temperate plants.

Special roles in plants conservation in vitro play retardants, osmotics and physical factors of cultivation (temperature and light intensity). Those factors inhibit the growth processes and thus allow us to maintain during a longer period ornamental, subtropical and stone fruits, essential oil and medical plants. Duration of in vitro conservation considerably depend on different plant species and cultivars. It was found that retardants simultaneously have the inhibitory effect on explants development and inducing effect on the formation and growth of roots. This effect was seen in most cultivars of clematis, roses and plums. Alongside with the effect of valuable plants conservation combined effect of osmotics, retardants, low positive temperature and light intensity promotes the subsequent active plants regeneration after transferring of explants to standard culture conditions.



## СОХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОЕ ВОСПРОИЗВОДСТВО ГЕНОФОНДА ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

Молканова О.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 4, тел. 8(495)619-53-41, факс: 8(495)977-91-72, e-mail: [molkanova@mail.ru](mailto:molkanova@mail.ru)

Наряду с традиционными методами сохранения растений *ex situ* применение культуры изолированных тканей и органов становится все более и более актуальным.

Цель наших исследований – совершенствование технологии клонального микроразмножения, изучение морфогенетических процессов и создание банка *in vitro* редких и ценных видов растений.

Разработка эффективных методов устойчивого воспроизводства растений является основой работ по сохранению генофонда.

На основе массового скрининга разработаны высокоэффективные технологии клонального микроразмножения растений различных таксономических групп для более 1200 генотипов, 144 видов, 57 семейств, включающих 64 вида занесенных в Красную книгу РФ. На основе этих исследований создана крупнейшая в России коллекция *in vitro* ценных видов и сортов растений. Редкие, ценные гибриды лекарственных, декоративных, мало распространенных культурных и декоративных видов растений представлены более репрезентативно и комплексно.

Особое внимание уделяется применению биотехнологических методов для сохранения редких и исчезающих видов растений. Наиболее представительными в банке меристем редких видов являются семейства: *Orchidaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae*, *Paeoniaceae*, *Rosaceae*, *Amaryllidaceae*, *Araliaceae*.

Способность к органогенезу *in vitro* существенно отличается между семействами, видами и сортами растений. Для устойчивого воспроизводства растений определены компетентные экспланты (апикальная меристема с листовыми примордиями).

Подобраны оптимальные условия для длительного хранения меристем в генетическом банке культур *in vitro* ( $t=3-5^{\circ}\text{C}$ ). Установлены важнейшие факторы, влияющие на длительность сохранения в условиях *in vitro*.

Первостепенное значение при создании генетического банка *in vitro* уделяется репрезентативности и сохранению генетической чистоты.

На модельных объектах, для оценки стабильности образцов хранящихся в банке *in vitro*, проведен RAPD-анализ. Предложен метод проверки *in vitro* коллекций, основанный на анализе относительных генетических расстояний между проверяемыми микроклонами и известными таксонами.

Хранение *in vitro* ценных форм растений является высокоэффективным способом для содержания коллекций растений и сохранения биологического разнообразия.

**PRESERVATION AND SUSTAINABLE REPRODUCTION OF THE GENE POOL OF HIGHER PLANTS WITH BIOTECHNOLOGICAL METHODS****Molkanova O.I.**

Federal State Institution of Science Botanical Garden. named after N.V. Tsitsin of the Russian Academy of Sciences, 127276, Moscow, Botanical str., 4, tel. 8 (495) 619-53-41, fax 8 (495) 977-91-72, e-mail: [molkanova@mail.ru](mailto:molkanova@mail.ru)

Equally with traditional methods of plant preservation *ex situ* application of isolated tissue and organ cultures has become more and more actual.

The purpose of our research is to improve the clonal micropropagation technology, to investigate the morphogenetic processes in the course of propagation and to create the bank and of cultures *in vitro* of valuable and rare plant species.

The development of sustainable reproduction plants methods to constitute the basis for the work on preserving the plant gene bank.

The highly efficient technologies of clonal micropropagation of various taxonomic group of plants have been elaborated and improved on the basis of mass screening for more than 1200 plant genotypes attributed to 144 genera and 57 families, including, 64 species listed the Russian Federation Red list. On the basis of these researches the largest in Russia genepoll collection *in vitro* of valuable species and cultivars plants was created.

Rare, valuable hybrids of medicinal, decorative culture and wild form of plant species have been represented most complex.

Application of biotechnological methods for preservation of rare plant species the special attention is given. *Orchidaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae*, *Paeniaceae*, *Rosaceae*, *Amaryllidaceae*, *Araliaceae* families are the most representative in bank of rare plant species.

The ability for organogenesis plant differed essentially between families, species and cultivars of plants. Were developed competent explants for sustainable reproduction of plants (apical meristem with leaf primordial).

The optimum storage conditions in the genetics bank of aseptic cultures have been found for 3-5 °C. The major factors influencing on duration of explants of plants in condition *in vitro* were established.

At creation of gene bank *in vitro* primary importance is given to representative and preservation of genetic stability.

For model species RAPD-analysis has been carried out to control the genetic stability of the items kept in bank *in vitro*. Evaluation of relative genetic distance between microclones and known taxa is proposed as method to verify *in vitro* germplasm collections.

Hence the storage *in vitro* of valuable plant forms is a highly efficient way for maintenance of plant collections and conservation of plant biodiversity.

***DACTYLORHIZA BALTICA (ORCHIDACEAE)* В КРИОКОЛЛЕКЦИИ СЕМЯН ИФР РАН**Никишина Т.В.<sup>1</sup>, Козлова О.Н.<sup>2</sup>, Левицкая Г.Е.<sup>3</sup>, Высоцкая О.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35, тел. 8(499) 231-83-22, e-mail: orchidcryo@mail.ru, cryoclone@ippras.ru

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», 220012, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Сурганова, д. 2в, тел. (017) 284-14-84, e-mail: kozlova\_o@yahoo.com

<sup>3</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3, тел. (495) 925-59-84, факс (4967) 33 0 -09, e-mail: levitskaya\_g@mail.ru

Пальчатокоренник длиннолистный (*Dactylorhiza baltica*), принадлежит к семейству Орхидных (*Orchidaceae*). Это одно из самых многочисленных, но, одновременно, и самых уязвимых семейств растений. Цветки пальчатокоренника длиннолистного очень декоративны. Корневища этого растения обладают лекарственными свойствами. Из высушенных клубней пальчатокоренника готовят порошок (салеп), который применяют при лечении болезней пищеварительной системы. Из-за антропогенного воздействия (уничтожение мест обитания вследствие мелиоративных работ, сбора растений на букеты и др.) постоянно сокращаются численность и площади обитания данного вида. В связи с этим *D.baltica* занесен в Красную книгу РФ. Редкие и исчезающие растения сохраняют *in situ* в национальных парках, заповедниках, а также *ex situ* в коллекциях ботанических садов, генетических банков и криобанков.

Важную роль в сохранении биоразнообразия растений выполняет метод криосохранения. С его помощью коллекционные образцы можно длительное время хранить без потери жизнеспособности при температуре ниже -132 °С (температура перехода воды в стекловидное состояние).

В ИФР РАН криоколлекция семян орхидей существует с 2001 года и постоянно пополняется новыми видами и образцами семян из различных регионов Российской Федерации и сопредельных государств.

Образцы семян *D.baltica*, представленные в нашей коллекции, были собраны в Московской области (Российская Федерация), Витебской и Минской областях (Республика Беларусь) в разные годы. Жизнеспособность этих образцов оценивали с помощью окрашивания трифенилтетразолием хлористым (ТТХ) и теста на всхожесть *in vitro* до и после хранения при различных условиях: при низких положительных температурах (5±1 °С, в холодильнике) и при температуре жидкого азота (-196 °С).

Всхожесть свежесобранных семян *D.baltica* была высокой и достигала 70-80%. Семена, после 16 месяцев хранения в холодильнике, имели всхожесть 73%. Криогенное замораживание также не приводило к существенному снижению их всхожести (63-74%).

Таким образом, наши результаты показали, что образцы семян *D.baltica*, можно успешно хранить в холодильнике (5±1 °С) в течение 16 месяцев и при температуре жидкого азота – длительное время. Мы планируем использовать оба апробированных метода хранения семян орхидей в работе по пополнению криобанка ИФР РАН различными образцами семян орхидей.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа».

**DACTYLORHIZA BALTICA IN ORCHID SEED CRYOCOLLECTION OF IPP RAS**Nikishina T.V.<sup>1</sup>, Kozlova O.N.<sup>2</sup>, Levitskaya G.E.<sup>3</sup>, Vysotskaya O.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, 127276, Moscow, Botanicheskaya str., 35, tel. 8(499) 231-83-22, e-mail: orchidcryo@mail.ru, cryoclone@ippras.ru

<sup>2</sup>State Scientific Institution of Central Botanical Garden, NAS, 220012, Republic of Belarus, Minsk, Surganov str., 2B, tel. (017) 284-14-84, e-mail: kozlova\_o@yahoo.com

<sup>3</sup>Institute of Cell Biophysics, RAS, 142290, Moscow region, Pushchino, Institutskaya str., 3, tel. (495) 925-59-84, fax (4967) 33-05-09, e-mail: levitskaya\_g@mail.ru

*Dactylorhiza baltica* (Klinge) Orlova belongs to the most numerous plant family (*Orchidaceae*). Plants of this orchid species have highly decorative flowers. Obtained from its tubers salep uses at therapy of digestive system diseases. Quantity and population size of *D.baltica* decrease constantly by reason of anthropogenic actions. In connection with this *D.baltica* is included in the Red List Russian Federation.

Collections of rare and endangered plants are preserved in national park, nature reserve, botanical gardens, gene banks and also in cryobanks. Cryopreservation of seeds is very economical and simple method for long term storage of plant collections. It is one of reliable protective method of plant biodiversity, which are widely used in the world. In liquid nitrogen the samples are stored without loss of quality long term because their metabolism stops at temperature below – 132 °C (water transition in glassy condition).

Cryocollection of orchid seeds was based at Timiryazev Institute of Plant Physiology of Russian Academy of Sciences in 2001. This collection is constantly replenished with new varieties and species orchids. Seed specimens of *D. baltica* were collected in the nature ecotypes of the Moscow region (Russian Federation), Vitebsk and Minsk areas (Republic of Belarus) in different years. Viability of seeds from the harvested specimens was evaluated by TTC staining and germination-test *in vitro* before and after they were preserved under different conditions: at low positive temperature (5±1 °C) and at liquid nitrogen temperature (-196 °C). Germination of fresh seed varied from 70 to 80%. After 16 months of storage in the refrigerator (5±1 °C) 73% of seeds is germinate. Cryogenic storage no resulted to significant change of seed germination (63-74%).

Thereby, our results showed possibility of reliable storage of *D. baltica* seeds in the refrigerator at low positive temperature during 16 months without significantly decrease viability. Moreover it has been shown, that *D. baltica* seeds remain viability and germinating after freezing in liquid nitrogen. Such a way we plan to use two different methods to replenish of IPP RAS cryobank by different specimens of orchid seeds.

This work was supported by Project of Fundamental Researches of the Russian Academy of Sciences: “Living Nature”.

**КУЛЬТУРА КРЕСТОВНИКОВ *IN VITRO* ДЛЯ МОРФОМЕТРИИ ПОБЕГОВЫХ МЕРИСТЕМ**Озерова Л.В.<sup>1</sup>, Бургутин А.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 4, тел. (495)619-40-66, e-mail: lyozeroval@yandex.ru

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений имени К.А.Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35, тел. (495) 31-83-86, e-mail: burgutin@yahoo.com

*Senecio meuselii* Rauh и *S. crassissimus* Humb. (*Asteraceae*)– эндемики Мадагаскара (Rowley, 2002), где они произрастают в южных районах острова на песчаниках и гранитных скалах, часто на большой высоте. Материал в виде нескольких зеленых черенков получен ГБС РАН из Zurich Succulent Plant Collection, укоренен в почвенной культуре и растения вегетировали в оранжерее ГБС. Указанные таксоны интересны как модель для анализа развития субунифациальной листовой пластинки. При этом, латерально уплощенные семисуккулентные листья этих крестовников очень декоративны. Для изучения морфогенеза листьев необходимо иметь многочисленные апексы, но семена этих видов недоступны. Поэтому предпринята попытка микроразмножения этих редких растений. Первичными эксплантами послужили верхушки растений 2-3 см длиной с 2-3 развитыми листьями. При введении в культуру *in vitro* ни один эксплант не был контаминирован бактериальной, либо грибной инфекцией. Этот маленький успех легко объясним – побеги и листья этих видов голые и гладкие, поэтому стерилизат (этанол > гипохлорит натрия) действовал эффективно. В нулевом пассаже применили два варианта питательной среды: с цитокинином (БАП 1 мг/л) и ауксином (ИМК 0,5 мк/л). Побеги развивались в обоих вариантах, но на среде с цитокинином они были аномальны, что могло отрицательно сказаться при анализе апексов на сканирующем электронном микроскопе и сравнении полученных картин с нативным материалом. Поэтому от варианта с цитокинином пришлось отказаться и для исследования апексов растения размножали рутинным черенкованием в условиях *in vitro* с применением ауксина для эффективного укоренения. Интересным оказалось способность растений переносить длительный пассаж (до 2-х лет без пересадки; температура +25-26 °С, фотопериод-16/8, освещенность 3,5-5,0 кл) с последующим возобновлением роста при добавлении среды или субкультивировании черенкованием. Растение оставалось жизнеспособным до почти полного высыхания агаровой среды – проявилась адаптация суккулентов к преодолению обезвоживания.

Меристемы верхушек побегов, взятые от выращенных *in vitro* растений, проанализированы при сканировании на электронном микроскопе; и эти результаты были аналогичны тем, которые были получены ранее от нативных (почвенных) растений.

**РАЗМНОЖЕНИЕ СЕЯНЦЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО *IN VITRO*  
В СВЕТЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ МАТЕРИНСКИХ РАСТЕНИЙ**  
Полякова Л.В.

Украинский НИИ лесного хозяйства и агролесомелиорации, 31024, Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, д. 86, тел. (057) 707-80-90, email: polyakova\_lv@mail.ru

Наблюдаемая в последние десятилетия деградация насаждений дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) усиливает интерес к микрклональному размножению *in vitro* лучших генотипов вида. Однако из-за трудности достичь укоренения эксплантов, получаемых от взрослых деревьев, основные работы выполняются, как правило, размножением ювенильного материала – семянцев 2-10 месячного возраста. Несмотря на широкий размах этих работ, предварительное биохимическое изучение материнских растений, как правило, не проводится. В этом плане может представлять интерес изучение веществ вторичного обмена, так как широко известны не только антиоксидантная активность некоторых групп вторичных веществ, но и их ингибирующее влияние на транспорт ауксина в растении.

В листьях 4-х месячных семянцев определяли содержание свободного агликона кверцетина (Кв) и гликозилированных флавонолов (ФЛ), среди которых идентифицированы – кверцитрин, авикулярин, робинин и некот.др. Экспериментальные данные показали, что пониженный уровень Кв в листьях клонируемых семянцев приводит к более активному росту стеблевой части эксплантов и их облиственности. Повышение уровня Кв в 1,5-2 раза проявляется в слабой ростовой активности и отсутствии листьев на побеге экспланта. Уровень содержания ФЛ не оказывал влияния на развитие побега, но отмечена связь с активностью развития корневой системы. Ингибирующее влияние ФЛ на развитие корней было отмечено не только в условиях *in vitro*, но и после перевода пробирочных растений в грунт, а также на массе корней 1,5 летних семянцев. Оказалось, что в случае повышенного в 1,5-2 раза содержания гликозидов ФЛ в листьях (по сравнению со средним содержанием в выборке из 30 растений), масса образованных сеянцами корней достоверно снижалась на 30%. Это совпадает с данными американских исследователей для линий культуры *Arabidopsis* с редуцированным синтезом ФЛ (среди гликозидов ФЛ отмечено присутствие кверцитрина). Влияние свободного агликона на особенности развития стеблевой и корневой частей культур в доступной литературе, не встречается.

Помимо клонирования семянцев, проводилась работа с побегами деревьев 10-летнего возраста (естественное возобновление). Листья восьми деревьев были проанализированы на содержание следующих групп веществ: содержание белка (Б), гидролизуемых танинов (ГТ), конденсированных танинов (КТ), Кв, ФЛ. Влияние уровня содержания разных групп веществ при клонировании пазушных почек побегов проявилось следующим образом: 1 – более высокий выход стерильных эксплантов (60-65%) оказался характерным для деревьев, в листьях которых было отмечено максимальное (в 2 раза выше среднего для выборки) содержание либо ГТ, либо КТ; 2 – повышенная морфогенетическая активность в условиях *in vitro* оказалась характерной для деревьев с максимально высоким (для данной выборки) содержанием Б (на 6-7%), при этом содержание либо ГТ, либо КТ было не выше среднего уровня. Повышенная ростовая активность была характерна для двух деревьев, при этом содержание свободного Кв был ниже среднего для данной выборки уровня.

Таким образом, биохимическая оценка материала, используемого для микрклонального размножения *in vitro*, может быть полезной для оптимизации отбора наиболее перспективных растений. При этом следует учитывать, что пониженный уровень содержания ФЛ как в гликозилированной форме, так и свободных агликонов, может быть благоприятным показателем для активности развития эксплантов *in vitro*, но при этом может проявиться в дальнейшем снижением уровня антиоксидантной защиты, особенно существенной для многолетних растений.

## MIROPROPAGATION OF QUERCUS ROBUR SEEDLINGS WITH THE HELP OF BIOCHEMICAL TRAITS

Polyakova L.V.

Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration, Ukraine, Kharkov, Pushinskaya, 86, email: polyakova\_lv@mail.ru.

Common oak trees degradation enhances the interest to microclonal propagation of the best genotypes. Because of difficulties with rooting ability of explants received from mature trees, the most popular material for micropropagation *in vitro* are seedlings of 2-10 months old.

As a rule the biochemical properties of mother plants are not studied. At the same time, antioxidant activity of flavonoids and their influence on the auxin transport in plant are well known.

We examined the leaves of 4-months old oak seedlings on the content of the most important for root development group of second metabolites – flavonol glycosids (FL). In oak leaves the main compounds are – quecitrin, avicularin, robinin and some others. The content of free aglycon quercetin (Qe) was determined also.

It was found that free Qe and FL glycosids influences the development of explants, but on different parts of developing *in vitro* plants. The enhanced level of free Qe in leaves of mother seedlings appeared as little growth activity of explants in tubes. But its lower level, on the contrary, enhanced explants growth. As for FL glycosids - was noticed their influence on root system ability. The peculiarity of FL action was the same as above – the lower content of FL influenced more active root development. Later we examined root development in *ex vitro* conditions (in soil) and root weight of 1,5-year old seedlings with determined earlier FL content in leaves. In both cases the higher was FL content the weaker was root system development (lowering near 30%). The last observation is supported by results on some lines of *Arabidopsis* culture with reduced FL syntheses in leaves.

The influence of FL, Qe and some other groups of second metabolites was examined for microclonal activity of nodal buds received from shoots of 10-year old oak trees (natural selection). In leaves of eight trees were determined the content of next compounds: protein (Pr), hydrolysable tannins (HT), condensed tannins (CT). Obtained dates showed: 1 – the enhanced level of sterile explants (near 60%) were found for trees with highest content of HT or CT in leaves (two trees from eight); 2 – the enhanced growth activity was found for explants from trees with the highest content of Pr (7% above middle level) and simultaneously low level of Qe.

Therefore the biochemical evaluation of mother plants for following micropropagation can help to optimize the selection of the material for their potential development activity *in vitro* condition and to evaluate potential antioxidant activity of future woody plants.

**ГЕНОФОНД КОЛЛЕКЦИИ АСЕПТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР КАК ИСТОЧНИК  
МАТЕРИАЛА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ И КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ**  
**Решетников В.Н., Фоменко Т.И., Спиридович Е.В., Козлова О.Н., Филиппа В.Л.,**  
**Брель Н.Г., Бердичевец Л.Г.**

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 270012,  
Минск, ул. Сурганова, д. 2В, тел. (017) 284-14-73, факс (017) 284-14-61,  
e-mail: fomenko\_ti@mail.ru

Сохранение биоразнообразия растений – одна из актуальнейших задач ботанических садов. Наиболее эффективным путем сохранения, обогащения и рационального использования генетического разнообразия является создание коллекций живых растений. В странах СНГ, в том числе и Беларуси, коллекции растений рассматриваются, прежде всего, как источник исходного материала для селекции и как банк сохранения растительного материала, где образцы генофонда подобраны по степени фенотипического проявления отдельных признаков и их сочетаний. В основе методологического подхода изучения коллекций лежит принцип максимального охвата генетического разнообразия, включая дикорастущие виды и интродуцированные растения *in situ*, а также коллекционный фонд растений, культивируемых *in vitro*. Для выявления генетического родства отдельных генотипов, сортов и популяций особое значение приобретает паспортизация ценных генотипов, идентификация сортов, построение генетических карт, решение спорных вопросов таксономии.

В 2005 г. Центральный ботанический сад НАН Беларуси получил Свидетельство Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь на коллекцию асептических культур хозяйственно-полезных растений. Коллекция представляет огромный интерес, как с практической, так и с научной точки зрения. Образцы из состава коллекции используются в качестве модельных объектов для изучения морфогенетических и регенерационных процессов, протекающих у эксплантов на стандартных и модифицированных питательных средах, генетической и эпигенетической стабильности/вариабельности регенерантов, получения трансгенных растений с новыми ценными свойствами и для обеспечения потребительского спроса на качественный посадочный материал.

В настоящее время наша коллекция содержит 180 наименований растений, относящихся к 15 семействам, в том числе 45 видов природной флоры и 135 сортов и гибридов. Более 65% таксонов в ее составе – это фиторесурсные виды. Наиболее полно представлены семейства *Ericaceae* Juss., *Oleaceae* Hoffmanns & Link и *Orchideaceae* Juss. (включая виды, внесенные в Красную Книгу Республики Беларусь). В состав коллекции включен ряд ценных лекарственных растений, таких как лобант морщинистый (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze), кадило сарматское (*Melitis sarmatica* Klok), наперстянки (*Digitalis purpurea* L., *D. lanata* Ehrh., *D. grandiflora* Mill.), рута душистая (*Ruta graveolens* L.), шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi), синоха голубая (*Polemonium coeruleum* L.), шалфей (*Salvia officinalis* L., *Salvia sclarea* L.), воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.), стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni), зверобой кустарниковый (*Hipericum Hidcote*), полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca* M. Bieb. ex Bess.), расторопша пятнистая (*Silybum marianum* L), а также виды и сорта сирени (*Syringa* L.), рододендрона (*Rhododendron* L.), голубики (*Vaccinium x covilleanum* Butkus et Pliszka), брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.), клюквы крупноплодной (*Vaccinium macrocarpon* Ait.), пальчатокоренника (*Dactylorhiza* Neck.). На современном этапе основные исследования направлены на разработку методов культивирования тканей и клеток растений-продуцентов биологически активных веществ, поддержания и пополнения *in vitro* коллекций клеток лекарственных растений. Особое внимание уделяется вопросам получения асептических культур редких и исчезающих видов природной флоры Беларуси с целью их дальнейшей реинтродукции.



**GENOFUND OF THE COLLECTION OF ASEPTIC CULTURES  
AS THE MATERIAL SOURCE FOR SELECTION AND KLONAL  
MIKROPROPAGATION**

**Reshetnikov V. N., Fomenko T.L., Spiridovich E.V., Kozlova O. N., Filipenia V.L.,  
Brel N.G., Berdichevets L.G.**

SSI "The central botanical garden of National academy of Sciences of Belarus", 270012,  
Minsk, Surganov str., 2B, tel. (017) 284-14-73, fax (017) 284-14-61, e-  
mail: fomenko\_ti@mail.ru

Conservation of plants biodiversity is one of the most actual problems of botanical gardens. The most effective way of preservation, beneficitation and sustainable exploitation of genetic diversity – is the formation of living plants collection. In CIS countries, including Belarus, plant collections are considered to be a source of initial material for plant breeding and as a bank for plant material conservation, where genofond samples are selected according to phenotypic character and its combinations. The basis of the methodological approach is the collections studying is the principle of genetic diversity maximum coverage, including wild species and introduced plants *in situ*, as well as the collection fund of *in vitro* cultivated plants. To identify the genetic relationship of the individual genotypes, cultivars and populations the certification of valuable genotypes, identification of plant varieties, the genetic maps construction, the taxonomy point of issue are very important.

In 2005, the CBG of NAS of Belarus received the Certificate of the Ministry of Natural Resources and Environmental Protection of the Republic of Belarus to the collection of aseptic cultures of economically useful plants. The collection is of great interest, both of practical and scientific point of view. The collection samples are used as a model systems for studying of regeneration and morphogenetic processes in explants on standard and modified nutrient media, genetic and epigenetic stability/variability of regenerated plant, the production of transgenic plants with new and useful properties and to ensure the consumer demand for qualitative planting material.

At present our collection contains 180 titles of plants belonging to 15 families (blood lines), including 45 species of natural flora and 135 varieties and hybrids. More than 65% of collection taxons – are the spesies of phytoresources. The family of *Ericaceae* Juss., *Oleaceae* Hoffmanns & Link and *Orchideaceae* Juss. (including species listed in the Red Data Book of the Republic of Belarus) are the most complete represented. The collection includes a number of valuable medicinal plants such as *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze, *Melitis sarmatica* Klok, *Digitalis purpurea* L., *D. lanata* Ehrh., *D. grandiflora* Mill., *Ruta graveolens* L., *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Polemonium coeruleum* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia sclarea* L., *Lithospermum officinale* L., *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Hipericum Hidcote*, *Artemisia hololeuca* M. Bieb. ex Bess., *Silybum marianum* L., and the types and varieties of *Syringa* L., *Rhododendron* L., *Vaccinium x covilleianum* Butkus et Pliszka, *Vaccinium vitis-idaea* L., *Vaccinium macrocarpon* Ait., *Dactylorhiza* Neck. Nowadays the main investigations are aimed to elaboration of plants-producers of biologically active substances cells and tissues cultivation methods, the maintenance and recruitment of *in vitro* cells collections of medicinal plants. Particular attention is paid to aseptic cultures of rare and endangered species of the native flora of Belarus obtaining in order to their reintroduction.

**СОХРАНЕНИЕ ОЗДОРОВЛЕННЫХ ОТ ВИРУСОВ КОЛЛЕКЦИЙ  
ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР *IN VITRO***Самусь В.А., Кухарчик Н.В., Кастрницкая М.С.

РУП «Институт плодводства», 223013, Беларусь, Минский район, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, д. 2, тел. / факс: (375) 17 50 66 009, e-mail: Kuchnately@rambler.ru

Важнейшим результатом микроразмножения и оздоровления в культуре *in vitro* плодовых и ягодных растений является создание коллекций, свободных от вирусных патогенов. На основании разработанных и модифицированных нами методик размножения в культуре *in vitro* и оздоровления плодовых и ягодных растений от вирусных патогенов, выделены растения земляники садовой, смородины черной, красной, крыжовника, малины летней и ремонтантной, аронии черноплодной, клоновых подвоев яблони, вишни и сливы свободные от вирусов в соответствии с нормативами ЕРРО.

Наибольшее количество свободных от вирусов растений получено по итогам оздоровления с использованием апикальных меристем, хемотерапия использована для оздоровления сортов смородины, клоновых подвоев яблони и вишни. Использование разработанных методик дает возможность работы с большим количеством материала, ежегодного возобновления и пополнения маточных насаждений в открытом и защищенном грунте.

Важным аспектом формирования безвирусных коллекций является их содержание в условиях минимизирующих повторное инфицирование. Как показали исследования, безвирусные коллекции, полученные в результате оздоровления *in vitro*, следует сохранять в различных условиях. Во-первых – в культуре *in vitro*, во-вторых – в условиях защищенного грунта, в-третьих – в открытом грунте. Наиболее рациональным является именно такой, множественный способ хранения безвирусных коллекций.

В культуре *in vitro* нами изучено хранение растений-регенерантов при температурах, обеспечивающих нормальную вегетацию растений (+20 – +25 °С) и хранение при пониженных температурах, обеспечивающих минимальную вегетацию (+5 – +8 °С). Культивирование регенерантов вишни, яблони, земляники *in vitro* без замедления вегетации возможно, без ухудшения качества культивируемых гибридов, в течение 16 – 17 месяцев. При более длительном хранении растений в состоянии нормальной вегетации, отмечается замедление роста регенерантов, невозможность их укоренения и последующей адаптации, затем остановка роста и усыхание растений.

Хранение коллекций в условиях минимальной вегетации *in vitro* (температура +5 – 8 °С, без освещения) характеризуется сведением к минимуму числа пассажей, снижением темпов роста и старения культуры. Несмотря на минимизацию всех физиологических процессов у депонируемых растений, они, тем не менее, выделяли продукты распада, которые, накапливались в питательных средах в ограниченном объеме культуральной пробирки. Использование промежуточных пассажей при депонировании значительно увеличило возможный срок хранения регенерантов. Оптимальные результаты при длительном хранении регенерантов *in vitro* получены при сочетании двух типов хранения: нормального вегетирующих растений (30 дней) и минимально вегетирующих (до 16 месяцев). Такой режим хранения позволил сохранять и использовать для размножения коллекцию регенерантов в культуре *in vitro* в течение 5 – 6 лет.

Ежегодно в культуре *in vitro* депонируется, пополняется и размножается коллекция форм и сортов плодовых и ягодных культур, в том числе, на настоящий момент: подвой яблони – 6 форм, подвой груши – 2 формы, подвой сливы и алычи – 4 формы, подвой вишни и черешни – 7 форм, смородина черная – 14 сортов, смородина красная – 4 сорта, крыжовник – 4 сорта, малина – 4 сорта, ежевика – 1 сорт, арония черноплодная – 2 сорта, земляника садовая – 24 сорта.

**MAINTENANCE OF VIRUS FREE COLLECTION  
OF HORTICULTURAL CROPS *IN VITRO*****Samus V.A., Kukharchyk N.V., Kastritskaya M.S.**

Institute For Fruit Growing, 223013, Belarus, Minsk region, Kovalyov str., 2, tel. (375) 17 5 66 009, e-mail: Kychnataly@rambler.ru

The most important result of micropropagation and viral elimination due to *in vitro* culture is the creation of virus free collection of horticultural crops. On the ground of modified techniques of micropropagation and viral elimination the virus free plants of strawberry, black currant, red currant, gooseberry, red and autumn raspberry, Aronia melanocarpa, dwarf rootstocks of apple, cherry and plum were obtained and tested according to EPPO certification program.

The apical meristem culture was the most efficient to obtain virus free plant material. Chemotherapy was used to eliminate viruses from current and dwarf rootstocks of apple and cherry as well. The modified techniques permitted to deal with great value of plant material, to resume and add plant stock in a glasshouse and field every year.

The important aspect of virus free plant collection maintenance was special conditions of growing to minimize the rate of reinfection. The studies showed the obtained healthy stock plants were to be kept in several conditions, which were *in vitro*, in a glasshouse and a field. Such multiple ways to maintain plant material was considered to be more rational.

The maintenance *in vitro* was investigated at temperature of normal vegetation (+20 – +25 °C) and at low temperature for minimal vegetation (+5 – +8°C). It was possible to keep *in vitro* the explants of cherry, apple and strawberry during 16-17 months at normal vegetation rate and good quality of plant material. The more durable maintenance in such conditions leads to inhibition of growth, low root and adaptation rate and consequent death of plants.

The collection keeping in conditions of minimal vegetation *in vitro* (+5 – 8 °C, no light) was characterized by less quantity of replanting, delay of growth rate and culture ageing. The additional transferring of plant explants to fresh media prevented accumulation of metabolites and prolonged the duration of maintenance. The most efficient keeping of collection was observed when two ways were combined (vegetation at normal temperature for 30 days and at low temperature for up to 16 months). That technique allowed keeping the collection of plant material *in vitro* during 5-6 years.

The collection of plant stock is resumed and enriched every year. There are 6 genotypes of apple rootstock, 2 - pear rootstock, 4 - plum rootstock, 7 - cherry rootstock, 14 cultivars of black currant, 4 - red currant, 4 - gooseberry, 4 - raspberry, 1 - blackberry, 2 - Aronia melanocarpa, 24 - strawberry in our collection *in vitro* now.

**ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ДЕГИДРАТАЦИИ НА МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ ЛЕСНОЙ, ВОССТАНОВЛЕННЫХ ПОСЛЕ КРИОСОХРАНЕНИЯ****Соловьева А.И., Высоцкая О.Н., Долгих Ю.И.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35, тел. (499) 231-83-34, факс: (499) 977-80-18, e-mail: [slvjova.aleksandra@rambler.ru](mailto:slvjova.aleksandra@rambler.ru)

Ранее нами было показано, что основным дестабилизирующим фактором криосохранения растительных тканей методом дегидратации является именно их подсушивание. Новое исследование направлено на изучение влияния продолжительности дегидратации на физиологическую и генетическую стабильность растительного материала. В качестве объекта исследования использовали апексы, изолированные из растений земляники (*Fragaria vesca* L., сорта Reine des Valles), культивируемых *in vitro* в течение 25 лет. Перед замораживанием апексы дегидратировали в стерильном потоке воздуха ламинар-бокса в течение 3, 4 или 5 часов, каждая группа включала в себя 10-16 образцов, опыт проводили в двукратной повторности. Достоверно показано, что продолжительность дегидратации не влияла на жизнеспособность апексов земляники, восстановленных после процедуры криосохранения. Однако растения, полученные, из апексов, которые дегидратировали в течение трех, четырех или пяти часов, значительно различались друг от друга по коэффициенту размножения, причем он был максимальным у растений, принадлежащих к последней группе. Оценку влияния длительности дегидратации на стабильность ДНК-маркеров восстановленного растительного материала проводили с помощью RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequences Repeat) и REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism) методов. Для этого отбирали пробы листьев отдельно с каждого из растений после их закаливания, затем выделенные апексы подвергали дегидратации и замораживанию, после их восстановления снова отбирали пробы листьев. В качестве контроля использовали смесь листьев растений, отобранных до закаливания растений. Проанализированные образцы ДНК были однородны по большинству исследуемых ДНК-маркеров. Один из RAPD-праймеров позволил выявить наличие единичных изменений у одного из растений в каждой из групп, по сравнению с контролем. Кроме того, у одного из растений, восстановленных после пяти часов дегидратации и последующего замораживания в жидком азоте, также отмечено отсутствие амплифицированного фрагмента в REMAP-профиле. Таким образом, увеличение продолжительности дегидратации до 5 часов оказывает влияние на коэффициент размножения растений, а также может вызывать небольшие генетические отклонения.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа».

**EFFECT OF DEHYDRATATION DURATION ON MOLECULAR AND  
PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF WILD ALPINE STRAWBERRY PLANTS  
RECOVERED FROM CRYOPRESERVATION**

**Solov'yova A.I., Vysockaya O.N., Dolgih Yu.I.**

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 127276, Moscow,  
Botanicheskaya str., 35, tel. (495) 903-93-32, fax (495) 977-80-18,  
e-mail: [slvjova.aleksandra@rambler.ru](mailto:slvjova.aleksandra@rambler.ru)

We have previously shown that the main damaging factor in plant tissues cryopreservation by dehydration method is precisely the desiccation. A new study aimed at examining the effect of the dehydration duration on the physiological and genetic stability of the recovered plants. Shoot tips used in this study were isolated from strawberry plants (*Fragaria vesca* L., cv. Reine des Valles) had been maintained *in vitro* for 25 years. Before freezing shoot tips dehydrated in the airflow of a laminar flow cabinet for 3, 4 or 5 h, each group of shoot tips included 10-16 samples, the experiment was repeated twice. It is revealed that the dehydration duration did not significantly affect the viability of the strawberry shoot tips, recovered after whole cryopreservation procedures. However, the plants obtained from the apices, which were dehydrated for three, four or five hours, were significantly different at a rate of propagation. Maximum of propagation rate was observed in the latter experimental group of plants. RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repet) and REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism) has been used to examine the effect of the dehydration duration on the DNA-markers stability in recovered plant material. For DNA analysis leaves sampled separately from each plant after their hardening and them after plant recovering from shoot tips that had been hardened, dehydrated and cryopreserved. Control was a mixture of leaves collected from the plants before their hardening. Analyzed DNA samples were similar on most of banding pattern. Only one RAPD primer revealed single polymorphic bands in one of the plants in each experimental group. Furthermore, was observed the band absence in REMAP profile of one of the plants recovered after dehydration by 5 h and subsequent freezing in liquid nitrogen. Thus, increasing the dehydration time to 5 h affects the plants propagation rate, and can also induced a small genetic changes.

The study supported by Project of Fundamental Researches of the RAS "Wildlife".

**МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЛЬНА  
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

**Сперанская А.С.<sup>1</sup>, Криницына А.А.<sup>1</sup>, Мельникова Н.В.<sup>2</sup>, Беленикин М.С.<sup>2</sup>, Большева Н.Л.<sup>2</sup>, Зеленин А.В.<sup>2</sup>, Муравенко О.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова", 119234, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, тел. (495) 939-40-83, e-mail: hanna.s.939@gmail.com, krinitsina@mail.ru

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д. 32., тел. 8(499)135-23-11, факс 8(499) 135-14-05, e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

Лен является одной из важнейших технических культур. Льняное волокно находит применение в текстильной промышленности. Льняное масло является источником пищевых растительных жиров, применяется в фармацевтике, а также используется для производства олифы и красок. Помимо прикладного значения, лен интересен для фундаментальной науки, так как у данного вида действие факторов окружающей среды может приводить к быстрым и наследуемым генетическим изменениям. Линии с наследуемыми генетическими изменениями такого характера получили название генотрофы. Однако механизмы возникновения таких изменений на настоящее время изучены мало. В настоящее время показано, что генотрофы отличаются размерами растений, у них изменяется экспрессия генов, количество генов рибосомальной ДНК. В определенном сайте генома появляется инсерция LIS-1 (Linum insertion sequence 1). Возможными причинами формирования генотрофов могут быть количественные изменения фракции повторяющейся ДНК, метилирование, активация транспозонов, генные изменения, ацетилирование гистонов, факторы транскрипции, а также микроРНК.

Одним из факторов, влияющим на появление генотрофов льна является уровень питания при росте и развитии растений. Выращивание и размножение льна в культуре *in vitro* позволяет не только обеспечить полностью контролируемую среду обитания для растений, но и возможность получить идентичные копии от одного сеянца, которые впоследствии можно помещать в различные условия и изучать изменения одного и того же генотипа. Для отработки условий размножения в культуре *in vitro* были выбраны *Linum austriacum* и *L. usitatissimum* сорта «Stormont Cirrus».

Семена *L. austriacum* и *L. usitatissimum* сорта «Stormont Cirrus» после поверхностной стерилизации 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH помещали в темноту на среду MS без добавок. Через 3 суток проростки переносили на свет и через 7 дней культивирования побег растения выше семядолей делили на 3 (*L. austriacum*) или 4 (*L. usitatissimum*) черенка: фрагмент побега с листом. Черенки высаживали на среды с нормальным (MS), обедненным (½ MS (по макро- и микро- солям)) и обогащенным (1,5 MS (по макросолям)) составом с добавлением 1 мг/л ИУК и культивировали при стандартном фотопериоде (16 часов день/8 часов ночь) и 24 °С. Через 3 недели культивирования на всех типах сред были получены укорененные растения, с одним основным побегом, развившимся из пазушной почки листа микрочеренка.

Таким образом, исходный генотип *L. austriacum* и *L. usitatissimum* сорта «Stormont Cirrus» возможно помещать одновременно минимум в три различных варианта стрессовых ситуаций с последующей возможностью получения достаточного количества ДНК и микроРНК для анализа генетических изменений.

**MICROPROPAGATION OF SOME SPECIES OF FLAX *IN VITRO*.**

**Speranskaya A.S.<sup>1</sup>, Krinitsina A.A.<sup>1</sup>, Melnikova N.V.<sup>2</sup>, Belenikin M.S.<sup>2</sup>, Bolsheva N.L.<sup>2</sup>, Zelenin A.V.<sup>2</sup>, Muravenko O.V.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Federal State Educational Institution of Higher Professional Education M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234, Moscow, 1-12, Leninskie Gory, tel. 8(495) 939-40-83, e-mail: hanna.s.939@gmail.com, krinitsina@mail.ru

<sup>2</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Vavilov str., 32, tel. 8(499) 135-23-11, fax 8(499)135-14-05, e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

Flax is one of economic important crop – source of fiber and oil. Flax fibers used in textile industry. Flax seed oil used as a nutritional supplement (source of omega-3 fatty acids) and in the production of the paints and drying oil. Furthermore, *Linum* species served like model system for research factors, which cause rapid and inheritable genomic changes. Lines of plant with stable in progeny phenotypical, biochemical and molecular-biological alternations are called genotrophs. Characterization of genotrophs are correlate with size of plants, genes expression, number of RNA genes etc. A large number of genotrophs has LIS-1 (*Linum* insertion sequence 1) insertion in specific area in genome. Methylation, activation of transposons, transcription factors, acetylation of histones and microRNA are the possible cause of genotrophs appearance.

Heritable genomic changes depend on nutrient condition during growth and development of plants. Micropropagation some species *Linum in vitro* allows to provide fully controlled growth conditions, get plants with identical genome and investigate genomic changes on one and the same plant.

*Linum austriacum* and *L. usitatissimum* cv. «Stormont Cirrus» seeds after surface sterilization 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH were placed in cultural vessels with MS growth medium in the dark on three days. After that seedlings transferred from dark to 16 day/8 night photoperiod. Plant cutting conducted after 7 days cultivation on the light. Cuttings (part of stem with one leave) placed on normal (MS) impoverished (½ MS) and enriched (1,5 MS) growth medium with IAA (1 mg/l) and cultivated during 21 days in 16 day/8 night photoperiod and 24°C. Plants with roots and one stem were received in all type of growth medium.

So, *Linum austriacum* and *L. usitatissimum* cv. «Stormont Cirrus» genotypes possible at the same time place in different stress condition and get sufficiency number of DNA and RNA for genetic changes investigation.

**СОХРАНЕНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* ГЕНОФОНДА СИРЕНИ  
СЕЛЕКЦИЙ ЦБС НАН БЕЛАРУСИ****Спиридович Е.В., Брель Н.Г., Фоменко Т.И., Власова А.Б., Юхимук А.Н.**

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 270012, г. Минск, ул. Сурганова, д. 2В, тел. (017) 284-14-73, факс (017) 284-14-61, e-mail: A\_Spiridovich@cbg.org.by

Наряду с традиционными методами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает применение клеточных биотехнологий, которые обеспечивают ускоренное получение новых ценных форм и линий декоративных культур, используемых в селекции на устойчивость, продуктивность и качество, сохранение селекционных образцов прошлых лет. При микроклональном размножении наиболее полно реализуется регенерационный потенциал первичных меристем. Это особенно важно для размножения генотипов декоративных форм растений, ценные характеристики которых нельзя поддержать при семенном воспроизведении. В настоящее время коллекция рода *Syringa in vitro* ЦБС НАНБ состоит из 67 сортов *S. vulgaris* L., на стадии получения стерильной культуры находится еще два вида, сорта селекции Л.А. Колесникова и некоторые новинки американской селекции. Сегодня все сорта собственной селекции ЦБС введены в культуру *in vitro*, как ценный материал, представляющий национальное наследие в историческом и генетическом отношении.

Для стабильного поддержания коллекции *in vitro* наряду с подбором оптимального состава питательных сред, используемого гормонального баланса, немаловажным условием является сохранение исходного генотипа у полученных микропобегов. Изменчивость среди растений-регенерантов *in vitro* бывает очень высокой. Наиболее вероятными источниками генетической вариабельности могут являться мутации, хромосомные нарушения, а также возникновение полиплоидных клеток. Эти изменения накапливаются, главным образом, при культивировании каллусных тканей. Следует отметить, что при создании *in vitro* коллекции генотипов *Syringa* spp. в ЦБС микропобеги сирени получали прямым органогенезом из апикальных и аксиллярных почек, без образования каллуса. Таким образом, этап при котором наиболее часто наблюдается накопление генетических отклонений – культивирование каллуса отсутствует в разработанной нами технологии.

Для подтверждения генетической идентичности полученных клонов с исходными генотипами проведен сравнительный анализ RAPD-PCR клонов и исходных генотипов. Для анализа использовали подобранные ранее праймеры, выявляющие полиморфизм на внутривидовом уровне и таким образом дифференцирующие различные сорта сирени. Для этих целей адаптирован метод RAPD-анализа для паспортизации сирени на всех этапах анализа. Примененный метод показал, что *in vitro* популяции различных генотипов различаются по степени генетической вариабельности их представителей, которая проявлялась в обнаружении уникальных для некоторых растений полиморфных локусов ДНК (качественные различия), а также различной количественной интенсивности гомологичных для генотипа фрагментов. Примененный метод позволяет с высокой достоверностью контролировать процесс воспроизводства исходного генотипа.

Коллекция сирени ЦБС НАН Беларуси является уникальным фондом для селекционной работы. Инвентаризация имеющегося материала, осуществляемая в рамках проектов, позволила создать компьютерную базу данных, которая объединяет сведения по систематике, фенотипическим признакам, геоботаническим показателям, условиям культивирования, биохимическим характеристикам, а также генотипические сертификаты и рекомендации по использованию растений сирени коллекции в различных отраслях народного хозяйства Республики Беларусь.



**IN VITRO CONSERVATION OF GENETIC POOL OF LILAC COLLECTION  
OF CENTRAL BOTANICAL GARDENS OF BELARUS SELECTION****Spiridovich E.V., Brel N.G., Fomenko T.I., Vlasova N.B, Yukhimuk A.N.**

SSI "Central Botanical Gardens of the National Academy of Sciences of Belarus", 270012, Minsk, Surganov str., 2B, tel. (017) 284-14-73, fax (017) 284-14-61, e-mail: A\_Spiridovich@cbg.org.by

Along with traditional methods of *ex situ* plant conservation application of cellular biotechnology techniques is becoming increasingly important, as could provide rapid obtaining of valuable new forms and lines of ornamental plants for the purposes of breeding for traits of resistance, productivity and quality, conservation of historical breeding specimens. During micropropagation potential of regenerative primary meristems is realized in a most entire extent. This is particularly important for breeding genotypes of ornamental plant forms, which valuable features cannot be reproduced by seed reproduction. Today's *in vitro* collection of *Syringa* spp. of CBG NASB includes 67 cultivars of *S. vulgaris* L., at the stage of sterile culture are two more species, cultivars of L.A. Kolesnikov selection, and some novelties of American selection. To date all cultivars of CBG breeding are introduced *in vitro*, as a valuable historic and genetic material of national heritage.

For the stable maintaining of *in vitro* collections it is important to select the optimal composition of culture media and hormonal balance, along with requirement to keep the original genotype of obtained microclones. Variability among plants regenerated *in vitro* can be very high. The most likely source of genetic variability may be a mutations, chromosomal disorders and occurrence of polyploid cells. These changes accumulate mainly during cultivation of callus tissue. It should be noted *in vitro* collection of genotypes of *Syringa* spp. in CBG was created by direct organogenesis of apical and axillary buds, without the formation of callus, thus reducing the possibility of accumulation of genetic abnormalities.

To confirm the genetic identity of the obtained clones with the original genotypes comparative RAPD-PCR analysis of clones and initial genotypes was carried out. For the analysis primers selected earlier for detection of polymorphism at the intraspecific level, and thus differentiating different cultivars of lilacs were applied. For these purposes method of RAPD-analysis was adapted for genetic certification of lilac genotypes at all stages. The method used showed that *in vitro* populations of different genotypes differ by the degree of genetic variability of their representatives, which was manifested in the detection of some unique polymorphic DNA loci to some plants (qualitative differences), as well as various quantitative intensity of homologous fragments for genotype. The method used allows high reliability control the reproduction of the original genotype of *Syringa* spp.

Lilac collection of CBG NAS is a unique basis for breeding, a source for future propagation of rare cultivars, model for plant genetic pool conservation. Inventory of existing material realized allow creating a computer database, which combines information on the taxonomy, phenotypic traits, geobotanical indicators, cultivation conditions, biochemical characteristics, as well as genotypic certificates and recommendations for the lilac collection application in various sectors of national economy.

## ПОДБОР МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ДНК ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ЦЕЛЬЮ ИХ ПАСПОРТИЗАЦИИ

Тагиманова Д.С., Хапилина О.Н., Турганбаева А.К., Райзер О.Б., Ергалиева А. Ж.

РГП «Национальный центр Биотехнологии», 010000, г. Астана,  
ул. Валиханова, д. 13/1, тел. (8712) 20-07-91, факс (8712) 21-46-33, e-mail: lbps@biocenter.kz

Мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. представляет собой одну из основных сельскохозяйственных культур мира. Исследование генетического разнообразия в этом виде может предоставить существенную информацию относительно их потенциала в селекционных целях. В настоящее время в области генетики пшеницы интенсивно проводятся эксперименты с использованием молекулярных маркеров. Молекулярное маркирование (ММ) или генотипирование основано на полиморфизме, свойственным белкам и нуклеиновым кислотам. В результате таких исследований либо строятся практически лишённые функциональных генов карты, либо проводится "сравнительная привязка" того или иного гена разных видов к одним и тем же молекулярным маркерам.

Использование ДНК-маркерных технологий привлекает исследователей, прежде всего возможностью работать с самим носителем наследственной информации. В работах многих исследователей последних лет справедливо отмечается, что разные ДНК-маркерные системы достаточно широко и эффективно используются для выяснения степени родства (или генетических связей) на внутривидовом и межвидовом уровнях.

Подбор молекулярно-генетических маркеров для создания генетического паспорта, выяснения генеалогических взаимоотношений между сортами, а также маркирования главных генов хозяйственно ценных признаков является актуальной задачей селекции растений.

Целью настоящей работы являлось подбор молекулярно-генетических маркеров для изучения полиморфизма ДНК яровой мягкой пшеницы с целью их генетической паспортизации. В ходе работы мы анализировали исходные формы и линии-регенерантов различных поколений, полученных методами селекции *in vitro*. Для изучения полиморфизма ДНК пшеницы были использованы IRAP, REMAP и RAPD маркеры.

Проведенный нами анализ показал отличия используемых праймеров по выявляемому проценту полиморфизма. При проведении RAPD-метода были использованы OPA 17, OPD 17, OPN15, OPN 8 праймеры. Все изученные генотипы различались между собой по рисунку выявленных спектров, только 2 праймера OPA17 и OPN8 оказались не полиморфными.

Из используемых IRAP-праймеров достаточно информативной была амплификация с RawS 11, идентифицировано 5 ампликонов, из которых все 5 были полиморфными. Процент выявляемого полиморфизма составил 100%. Так же амплификация с праймером LTR7286(4') позволила идентифицировать 199 ампликонов, процент полиморфизма так же составил 100%. Уровень полиморфизма праймеров LTR-варьировал от 61,4 до 100% (в зависимости от праймера). Общий процент полиморфизма, выявляемый с использованием IRAP-праймеров, составил 78,8%.

При использовании REMAP-метода процент выявляемого полиморфизма увеличился до 88,0%. Общее количество ампликонов, идентифицируемых с использованием IRAP и REMAP-методов составило 1073, при этом процент полиморфизма составил 89,6. Высокий уровень полиморфизма, выявленный в результате данного исследования, позволяет говорить о перспективности использования IRAP- и REMAP, RAPD методов для генетической дифференциации и паспортизации генотипов растений.

**SELECTION OF MOLECULAR GENETIC MARKERS TO STUDY SPRING WHEAT DNA POLYMORPHISM TO THEIR CERTIFICATION****Tagimanova D.S., Khapilina O.N., Turganbaeva A.K., Reizer O.B., Ergalieva A.J.**

"National Center for Biotechnology", 010000, Astana, Valikhanov str., 13/1, tel. (8712) 20-07-91, fax (8712) 21-46-33, e-mail: lbps@biocenter.kz

Soft wheat of *Triticum aestivum* L. is one of basic agricultural cultures of the world. Research of genetic variety in this kind can give substantial information on their potential in plant-breedings. Currently in the field of genetics of wheat intensively experimented with the use of molecular markers. Molecular marking (MM) or genotyping are based on polymorphism that are inherent to proteins and nucleic acids. As a result of such studies will be constructed substantially nonfunctional genes map or performed "Comparative binding" of a gene for different species with the same molecular markers.

The use of DNA-marker technologies attracts researchers, foremost by possibility of work with the carrier of the inherited data. In last year scientists' researches widely and successfully used DNA-marker system for finding out genetic connections on intraspecific and interspecific levels.

Selection of molecular-genetic markers for creation genetic passport, finding out of genealogical mutual relations between sorts, also marking of main genes economic valuable is the actual task in plants selection.

The purpose of the work was selection of molecular-genetic markers to study DNA polymorphism of spring soft wheat with the purpose of their genetic passport system. During the work had been analyzed the original forms and lines regenerated from different generations, obtained by the methods of selection *in vitro*. To study the DNA polymorphism of wheat were used IRAP, REMAP and RAPD markers.

This analysis shows primers differences that are used for identity of the polymorphism percentage. In conducting RAPD-method were used in OPA 17, OPD 17, OPN15, OPN 8 primers. Studied genotypes were differentiated from the gel analysis; only 2 primers OPA17 and OPN8 were not polymorphic.

In the use of REMAP method for percentage identification detectable polymorphisms increased up to 88,0%. The total number of amplicons identified with the use of IRAP was 1073 and REMAP-method shows the percentage of polymorphism was 89,6. Detected high level of polymorphism shows the perceptivity of use of IRAP-and REMAP, RAPD methods for genetic differentiation and certification of plant genotypes.

## КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ *TAXUS BACCATA L. IN VITRO* Теплицкая Л.М., Сидякин А.И.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, 95007, Украина, АР Крым, г. Симферополь, пр. академика Вернадского, д. 4, тел. +38(0652)608465, e-mail: lm\_tepitskaya@ukr.net

Достижения последних лет продемонстрировали огромные возможности клеточных технологий как для размножения ценных генотипов культурных растений и получения ценных веществ вторичного метаболизма, так и для сохранения биологического разнообразия дикой флоры.

Представителя сем. Тисовые (*Taxaceae*) привлекают к себе внимание благодаря способности синтезировать таксол – уникальный дитерпеновый алкалоид, обладающий антимитотическим действием, и использующимся в химиотерапии. Актуальность стратегии получения таксола из клеточных и тканевых культур определяется как ежегодно возрастающим количеством онкологических заболеваний, так и сокращением природных источников данного алкалоида.

В результате проведенных исследований получена культура тканей тиса ягодного (*T. baccata*). Определены оптимальные экспланты (фрагменты молодых побегов, изолированные семяпочки с зародышем), у которых наблюдалась высокая частота каллусообразования (68,9-84,0 %). Для индукции каллусообразования и длительного культивирования каллусов модифицированы питательные среды Мурасиге и Скуга, и Гамборга и Эвелге (В5) по концентрациям фитогормонов (4,0 мг/л ИУК, 2,0 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л БАП). Изучено влияние фитогормонов на частоту каллусообразования, ростовой индекс культуры и ее цитоморфологические особенности. Показана высокая гетерогенность клеток каллусов, выращиваемых на различных питательных средах в сравнении с контролем, выделены морфогенные и неморфогенные штаммы. Установлена прямая корреляция между количеством определенных морфологических типов клеток, ростовыми параметрами культуры, накоплением вторичных метаболитов.

**CALLUS FORMATION IN CALLUS CELL CULTURE  
OF *TAXUS BACCATA* L. *IN VITRO*  
Teplitskaya L.M., Sidiakin A.I.**

National Taurida V.I. Vernadsky University, 95007, Ukraine, Crimea, Simferopol,  
Vernadsky av., 4, tel. +38(0652) 608465, e-mail: lm\_teplitskaya@ukr.net

Advances in recent years have demonstrated the enormous possibilities of cellular technologies for propagation of valuable genotypes of crops and produce valuable compounds of secondary metabolism, and for the conservation of biological diversity of wild flora.

Representatives of the *Taxaceae* family attracted attention for its ability to synthesize taxol – a unique diterpene alkaloid, which has an antimitotic effect, and is used in chemotherapy. Relevance of strategies to get taxol from cell and tissue culture is defined as the yearly increasing number of cancers, and the reduction of natural sources of the alkaloid.

The studies obtained cell tissue culture yew (*T. baccata*). Optimal explants, in which supported is a high frequency of callus formation (68,9-84,0%) was determined. For the induction of callus culture formation and long-term culture of cell callus culture were modified Murashige and Skoog and Gamborg and Eveleigh (B5) callus induction medium consider 4,0 mg/l IAA, 2,0 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l BAP. The effect of growth factor on the frequency of cell callus formation, the growth index of the culture and its cytomorphological features were shown. The high heterogeneity of callus cells grown in different culture media in comparison with the control, and marked morphogenic non morphogenic strains was done. A direct correlation between the number of certain types of cell morphology, growth parameters of culture, the accumulation of secondary metabolites was shown.

**КРИОКОНСЕРВАЦИЯ МЕСТНЫХ ЮЖНО-АМЕРИКАНСКИХ СОРТОВ  
КАРТОФЕЛЯ ИЗ *IN VITRO* КОЛЛЕКЦИИ ВИР  
Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А.**

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н. И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук, 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42-44, тел. (812) 466-44-05, факс (812) 466-43-61, e-mail: n\_shvachko@mail.ru

При криохранении все метаболические процессы в клетках растений останавливаются и теоретически можно бессрочно долго сохранять генетически стабильный растительный материал при сверхнизких температурах. Тем не менее, условия криоконсервирования, а также условия размораживания эксплантов являются стрессовыми (Reed, 2008). В настоящее время для многих объектов, включая картофель, разработаны методы криоконсервации (Menuhr., 1996; Panis et al., 2005), однако они нуждаются в модификациях с целью повышения регенерационной способности материала после криоразмораживания и снижения стоимости работ при создании больших криоколлекций. В настоящей работе мы исследовали жизнеспособность и регенерационную способность почек после криоразмораживания образцов картофеля из *in vitro* коллекции ВИР.

Материалом исследования служили диплоидные и тетраплоидные местные сорта картофеля из различных экспедиционных сборов ВИР в Южной Америке, предположительно отличающиеся по своей устойчивости к низким температурам. Материал, включенный в изучение (21 образец), был разбит на три группы: (1) образцы, собранные в Чили (около 100 метров н.у.м.); (2) образцы, собранные на высотах от 2200 до 2850 метров н.у.м.; (3) образцы, собранные на высоте более 3800 метров н.у.м. (~верхний предел возделывания картофеля).. В данной работе для криоконсервации использован метод Droplet vitrification (Panis et al., 2005) с модификацией, позволяющей наряду с апикальными использовать и пазушные почки микрорастений в качестве эксплантов (Shvachko and Gavrilenko, 2011; Дунаева и др., 2011). Данная модификация значительно экономит время и материальные затраты в экспериментах по криоконсервации. Итоговый подсчет жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов проводили на 3, 6 и 8 неделях после криоразмораживания. Опыты проведены в трехкратной повторности. Получены следующие результаты.

Для образцов группы (1) значения жизнеспособности почек варьировали от  $21,0 \pm 2,5\%$  до  $84,8 \pm 4,1\%$ , значения регенерационной способности – от  $15,1 \pm 2,5\%$  до  $84,8 \pm 4,1\%$ ; средние значения жизнеспособности и регенерационной способности образцов для данной группы составили 53,0% и 50,8%, соответственно.

Для образцов группы (2) значения жизнеспособности почек варьировали от  $25,0 \pm 2,5\%$  до  $93,3 \pm 2,7\%$ , значения регенерационной способности – от  $22,5 \pm 1,4\%$  до  $91,7 \pm 1,5\%$ ; средние значения жизнеспособности и регенерационной способности образцов для данной группы составили 56,2% и 53,4%, соответственно.

Для образцов группы (3) значения жизнеспособности почек варьировали от  $48,3 \pm 3,1\%$  до  $81,7 \pm 1,5\%$ , значения регенерационной способности – от  $36,7 \pm 4,9\%$  до  $66,7 \pm 10,5\%$ ; средние значения жизнеспособности и регенерационной способности образцов для данной группы составили 58,2% и 51,3%, соответственно.

Таким образом, значения жизнеспособности и регенерационной способности почек после криоразмораживания были достаточно высокими и фактически одинаковыми во всех трех группах образцов. Однако в пределах каждой группы выявлено существенное влияние генотипа, как на жизнеспособность, так и на регенерационную способность почек после криоразмораживания. Изученные образцы были заложены на длительное хранение в криобанк ВИР.

**CRYOPRESERVATION OF POTATO LANDRACES  
FROM *IN VITRO* COLLECTION OF VIR****Shvachko N., Volkova N., Gavrilenko T.**

N.I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), Russian Academy of Agricultural Sciences, 190000, St.-Petersburg, Bolshaya Morskaya str., 42-44, tel. (812) 466-44-05, fax (812) 466-43-61, e-mail: n\_shvachko@mail.ru

At cryopreservation all metabolic processes in plant cells stop and it is theoretically possible to maintain genetically stable plant materials in the long term. Nevertheless, conditions of cryoconservation and rewarming of explants are stressful (Reed, 2008). Now for many objects, including potatoes, cryopreservation methods were developed (Menuhr, 1996; Panis et al., 2005), however they need modifications for the increase of survival and regeneration rates and routinely applied to build up cryopreserved potato collections. In our work we investigated survival and regeneration rates of potato buds after rewarming of samples from *in vitro* potato collection of VIR.

The plant material used consisted of 21 diploid and tetraploid accessions of South America potato landraces with presumably different resistance to low temperatures. The material was divided into three groups: (1) the samples collected in Chile (about 100 meters above sea level); (2) samples collected at altitudes from 2200 to 2850 meters; and (3) samples collected at an altitude of 3800 meters above sea level (upper limit of cultivation of potatoes). For cryopreservation we used the droplet-vitrification method of Panis et al. (2005) with modification: we use two types of explants: apical and axillar buds (Shvachko and Gavrilenko, 2011; Dunaeva et al, 2011). This modification saves time and material costs in experiments on cryopreservation. Survival and regeneration rates were determined for this material on week 3, 6 and 8 after rewarming. Three repetitions were executed. The following results were obtained.

For samples of group (1) values of survival rate varied from  $21,0 \pm 2,5\%$  to  $84,8 \pm 4,1\%$ , values of regeneration rate – from  $15,1 \pm 2,5\%$  to  $84,8 \pm 4,1\%$ ; the medium values of survival and regeneration rates of samples for this group were 53,0% and 50,8%, respectively.

For samples of group (2) values of survival rate varied from  $25,0 \pm 2,5\%$  to  $93,3 \pm 2,7\%$ , values of regeneration rate – from  $22,5 \pm 1,4\%$  to  $91,7 \pm 1,5\%$ ; the medium values of survival and regeneration rates of samples for this group were 56,2% and 53,4%, respectively.

For samples of group (3) values of survival rate varied from  $48,3 \pm 3,1\%$  to  $81,7 \pm 1,5\%$ , values of regeneration rate – from  $36,7 \pm 4,9\%$  to  $66,7 \pm 10,5\%$ ; the medium values of survival and regeneration rates of samples for this group were 58,2% and 51,3%, respectively.

No statistical differences in regeneration rate were found between three groups of potato landraces. However survival and regeneration rates were depended on genotype. The studied samples were left in cryotank on the long-term storage in the VIR Cryobank.

**РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ МАЛИНЫ НА  
ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*****Ярмоленко Л.В.**

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства им. И.В. Мичурина, 393774, г. Мичуринск, ул. Мичурина, д. 30, тел. (07545) 2 07 61, факс (07545) 2-07-61, e-mail: invitro82@yandex.ru

Способность растений к размножению *in vitro* зависит от индивидуальных особенностей сорта. Среди представителей одного вида растений могут выделяться сорта с различным регенерационным потенциалом.

Была проведена сравнительная оценка способности к размножению 10 перспективных сортов малины: Яркая, Клеопатра, Шахзада, Суламифь, Оранжевое чудо, Золотая осень, Лимонная, Полка, Полана, Кумберленд.

Практически у всех исследуемых сортов через 4 недели культивирования регенерационная способность меристематических верхушек, изолированных в фазу активного роста побегов, находилась в пределах от 92,9 до 100%, за исключением сорта Суламифь (77,5%). По фазам развития меристем отмечено, что сорта Шахзада и Яркая через месяц культивирования лучше развивались и процент растений, достигших фазы образования розетки в 2-3 раза выше, по сравнению с другими сортами и составлял 38,5 и 65,0% соответственно. Среди ремонтантных сортов более высокий показатель развития наблюдался у сорта Золотая осень (16,7%), в отличие от сорта Оранжевое чудо, у которого он был в 3 раза ниже. У сортов Яркая и Шахзада уже во втором пассаже отмечено образование дополнительных пазушных почек. После трехкратного субкультивирования у сортов Золотая осень и Суламифь количество готовых к клонированию эксплантов составило 36,4% и 40,0% соответственно, в отличие от сортов Лимонная, Яркая, Шахзада, Клеопатра, Оранжевое чудо, имеющий данный показатель в 2,3-2,5 раза выше. У сортов Полка, Полана, Кумберленд пролиферация побегов наблюдалась только после четвертого пассажа. В результате исследований выявлены сорта с достаточно высоким коэффициентом размножения, шт./эксплант – Клеопатра(5,0), Оранжевое чудо(5,4), Шахзада(5,9), Яркая (6,4) и низким - Суламифь(1,7), Золотая осень(2,0), Лимонная(3,4).

Таким образом, из многих факторов клонального микроразмножения наибольшее значение имеет генотип исходного растения, определяющий регенерационную способность *in vitro*.



**THE REGENERATIVE ABILITY OF PROMISING RASPBERRY CULTIVARS  
AT THE STAGE OF INTRODUCTION INTO *IN VITRO* CULTURE****Yarmolenko L.V.**

I.V. Michurin Research Institute of Horticulture, 393774, Michurinsk, Michurin str., 30,  
tel. (07545) 2-07-61, fax (07545) 2-07-61, e-mail: invitro82@yandex.ru

Plant ability for *in vitro* propagation depends on cultivar characteristics. Among representatives of the same plant species there are cultivars with various regenerative potential.

Ten promising raspberry cultivars such as Yarkaj, Kleopatra, Shakhrazada, Sulamif', Oranzhevoe chudo, Zolotaja osen', Limonnaja, Polka, Polana, Cumberlend were estimated for their ability to propagation.

Trom 92,9 up to 100% regenerative ability of apical meristems excised at the stage of active shoot growth was revealed in approximately all tested cultivars following 4 week cultivation excluding Sulamif' (77,5%). Considering meristem phase growth in one month of cultivation Shakhrazada and Jarkaj have shown increased growth and 2-3 fold increment of plant share with developed rosette estimated as 38,5 and 65,0% respectively compared with other cultivars. Among ever-bearing cvs Zolotaja osen' with 16,7% in 3 times exceeded the level of development of Oranzhevoe chudo. At the second passage in additional axillary buds were developed in cvs Yarkaj, Zolotaja osen' and Shakhrazada. Three subculturings of Zolotaja osen' and Sulamif' resulted in 36,4% and 40,0% development of ready-to clone explants respectively compared with 2,3-2,5 fold increase in Limonnaja, Jarkaj, Shakhrazada, Kleopatra, Oranzhevoe chudo. In Polka, Polana, Cumberlend shoots proliferated only after the fourth passage. The studies allowed revealing cvs with a rather high propagation coefficient (piece/explants) such as 5,0 in Kleopatra; 5,4 in Oranzhevoe chudo; 5,9 in Shakhrazada; 6,4 in Jarkaj and a low one in Sulamif'(1,7), Zolotaja osen'(2,0), Limonnaja (3,4).

Therefore the genotype of initial plant determining regenerative ability *in vitro* is considered to be the most important one out of other factors of clonal micropropagation.



**СЕКЦИЯ 6.**

**Использование культур клеток  
растений в промышленной и  
сельскохозяйственной биотехнологии**

**SECTION 6.**

**Application of plant cell cultures in  
industry and agricultural biotechnology**

## ГАПЛОИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ ПЫЛЬНИКОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФОРМ, УСТОЙЧИВЫХ К ВОДНОМУ ДЕФИЦИТУ

С.С.Беккужина<sup>1</sup>, И. Рахимбаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина  
Факс 8 (7172) 316072 8 (7172) 38 39 01 sara-bek@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт биологии и биотехнологии rakhim\_10@mail.ru

В ближайшие 20 лет для удовлетворения потребностей растущего населения планеты производство пшеницы должно вырасти на 1.6-2.6% в год и достигнуть к 2020 году 1.050 млн. тонн, а средняя урожайность должна подняться с нынешних 25 до 38 ц/га.

Урожайность яровой пшеницы в Казахстане за последние 10 лет не превышает 1 тонну с гектара, что значительно ниже средних мировых показателей. Это обусловлено особенностями резко континентальных, климатических условий Казахстана, прежде всего недостаточной водообеспеченностью, которые являются сдерживающими факторами повышения продуктивности пшеницы.

В современных условиях селекционные программы многих регионов нацелены на создание форм устойчивых к абиотическим факторам среды и одним из альтернативных методов селекции на стрессоустойчивость является селекция на уровне гамет.

Известно, что значительная часть генов экспрессируется во время роста мужского гаметофита и геном гаплоидной пыльцы может служить уникальной моделью для отбора на стрессоустойчивость в мужской гаплоидной фазе. Участие гаметофита в адаптивном процессе и эффективность гаметной селекции обсуждается в работах по культуре пыльников томатов. В пользу использования селекции на уровне гамет приводится положение об уникальном способе эволюции покрытосеменных растений, связанного с адаптивным преимуществом селекции на гаплоидном уровне между спорофитным и гаметофитным поколениями.

В Республике Казахстан перспективные ДН-линий пшеницы внедрены в производство, в программы традиционной селекции включаются гомозиготные формы с целью создания сортов, устойчивых к стрессорам.

В Казахском агротехническом университете создана схема селекции на уровне репродуктивных и соматических клеток, позволяющая отбирать клеточные линии, устойчивые к засухе используя АБК, как фактор, моделирующий водный дефицит.

Растения, подверженные недостатку влаги, претерпевают определённые биохимические изменения. Известны работы по изучению генных локусов у *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, ответственных за устойчивость к обезвоживанию. Одним из биохимических путей, включающих ответ на уровне генов к недостатку влаги, является метаболизм, зависимый от концентрации абсцизовой кислоты (АБК).

Известны работы по использованию АБК в исследованиях на засухоустойчивость на клеточном уровне. Экспрессия генов, кодирующих пролин, возрастает при водном стрессе, включая сигнал АБК-зависимых и АБК-независимых реакций.

В связи с тем, что АБК включает систему ответной реакции растений на стресс, проведен отбор на засухоустойчивость, где в качестве селективного фактора использовали АБК в культуре изолированных пыльников пшеницы.

Многолетние полевые испытания подтвердили наличие морфофизиологических показателей устойчивости растений, отобранных в результате селекции на уровне гамет, к засухе и полеганию. Засухоустойчивость линии подтверждена не только полевой визуальной оценкой, но и способностью растений формировать большое количество узловых корней и продуктивных побегов кушения в условиях острой засухи (Научно-производственный центр зернового хозяйства им.А.И. Бараева, Карабалыкский селекцентр).

## HAPLOIN TECHNOLOGIES AND POSSIBILITIES OF USING ANTHR CULTURE FOR CREATING FORMS RESISTANT TO WATER DEFICIT

S.S.Bekkuzhina, I. Rahimbaev

<sup>1</sup> S. Seifullin Kazah Agro Technical University

Fax: +7 7172 31 60 72, +7 7172 38 39 01 e-mail:sara-bek@yandex.ru

<sup>2</sup> Institute of Biology and Biotechnology e-mail:rakhim\_10@mail.ru

In the next 20 years wheat production is expected to increase by 1.6-2.6% per year and in 2020 reach 1.050 million tones, while the average yield has to rise from the current 25 to 38 kg / ha to meet the needs of a growing world population.

Yield of spring wheat in Kazakhstan over the past 10 years doesn't exceed 1 ton per hectare, which below the world average. This is stipulated by the peculiarities of sharply continental climate in Kazakhstan, primarily insufficient water availability, which are limiting factors increasing the productivity of wheat.

In modern conditions, breeding programs in many regions aim to create a form resistant to environmental factors and one of the alternative methods of breeding for resistance to stress is the selection at the level of gametes.

It is known that a significant proportion of genes expressed during the growth of the male gametophyte and pollen haploid genome can serve as a unique model for selection for resistance to stress in male haploid phase. Gametophyte participation in adaptive process and the effectiveness of gamete selection is discussed in for anther culture of tomatoes. In favor of the use of selection at the level of gametes is the position of the unique way the evolution of angiosperms associated with the adaptive advantage of selection on the haploid level between sporophytic and gametophytic generations.

In Kazakhstan, perspective DH-wheat lines were introduced into production, homozygous form with the aim of creating varieties resistant to stressors are included to conventional breeding programs.

Selection scheme at the level of reproductive and somatic cells allowing to select cell lines that are resistant to drought using ABA as a factor in modeling the water deficit is established at S. Seifullin Kazah Agro Technical University.

Plants exposed to lack of moisture, undergo certain biochemical changes. It is known works on studying gene loci in *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale* responsible for the resistance to dehydration. One of the biochemical ways including reaction on the level of genes to moisture deficit is metabolism, dependent on the concentration of abscisic acid (ABA).

It is known works on the use of ABA in drought tolerance studies on the cellular expression levels of genes encoding proline, increases in water stress, including signal ABA-dependent and ABA-independent reactions.

Due to the fact that the ABA includes a system response of plants to stress, selection for drought tolerance, where ABA in isolated anther culture of wheat was used as a selective factor, was conducted.

Long term field tests confirmed the presence of morphological indicators of plant resistance, selected from selection at the level of gametes to drought and lodging. Drought resistance line is confirmed not only a visual assessment of the field, but also the ability of plants to form a large number of nodal roots and productive tillers under severe drought. Obtained perspective lines of spring wheat were introduced into production (A.I. Baraeyev Scientific Research Production Center of Grain Growing and selection center Karabaluk).

**СОЗДАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАТИВНОГО СИМБИОЗА *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* И *SOLANUM TUBEROSUM* IN VITRO И EX VITRO**

Бойкова Н.В.<sup>1</sup>, Ткаченко О.В.<sup>1</sup>, Евсеева Н.В.<sup>2</sup>, Матора Л.Ю.<sup>2</sup>, Бурыгин Г.Л.<sup>2</sup>, Щеголев С.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, 410012, Театральная пл. 1, факс: (8452)26-27-83, тел.: (8452)23-46-97, e-mail: n.boikova.ya@yandex.ru, otkachenko@yandex.ru

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049, пр. Энтузиастов, 13, факс: (8452) 970444, тел.: (8452)970474; e-mail: evseeva@ibppm.sgu.ru

Бактерии рода *Azospirillum brasilense* относятся к ростостимулирующим ризобактериям и являются одним из наиболее интенсивно исследуемых ассоциативных партнеров растений. Известно, что ризосферные бактерии, в том числе азоспириллы, в естественных условиях *in vivo* могут оказывать положительное влияние на рост и развитие растений. Азоспириллы способны фиксировать молекулярный азот и передавать его связанные формы растению, улучшая его азотное питание, способствуют повышению доступности фосфора в ризосфере, продуцируют фитогормоны и подавляют (контролируют) заболеваемость растений, обусловленную фитопатогенными микроорганизмами. Имеются сведения о положительном влиянии некоторых ассоциативных бактерий на растения в условиях *in vitro*.

Целью данного исследования являлось создание активной ассоциации бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 с мериклонами картофеля в культуре *in vitro* и изучение ее влияния на дальнейшую адаптацию растений к условиям *ex vitro*.

Были разработаны оптимальные параметры создания растительно-микробной ассоциации в условиях культивирования *in vitro*. Определено влияние состава питательной среды и способа инокуляции на эффективность взаимодействия бактерий и микроклонов картофеля. Установлено, что в культуре *in vitro* бактерии не только акцептируются на поверхности корня, но и проникают в ткани, образуя активные скопления. Обнаружено существенное повышение митотического индекса у опытных растений, темпа формирования и роста корней.

Отмечено, что ответная реакция растений на инокуляцию бактериями имеет генотипическую зависимость. Под действием инокуляции бактериями *in vitro* побеги всех сортов в меньшей степени были подвержены вытягиванию и формировали более развитую корневую систему, но степень проявления воздействия у разных генотипов отличалась.

После высадки растений в почву обнаружено существенное повышение способности к адаптации у бактеризованных микроклонов большинства изученных сортов картофеля. Установлено влияние ассоциативного взаимодействия на темпы роста побегов, прохождение фаз и урожай миниклубней картофеля.

Полученные данные могут быть использованы для повышения эффективности технологии микроклонального размножения картофеля на основе улучшения качества микроклонов и их адаптационной способности, что может способствовать повышению рентабельности и экономической эффективности технологии семеноводства растений на оздоровленной основе.

**CREATION AND STUDY OF ASSOCIATIVE SYMBIOSIS OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* AND *SOLANUM TUBEROSUM* IN VITRO AND EX VITRO****Boykova N.V.<sup>1</sup>, Tkachenko O.V.<sup>1</sup>, Evseeva N.V.<sup>2</sup>, Matora L.Yu.<sup>2</sup>, Burygin G.L.<sup>2</sup>, Shchyogolev S.Yu.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov, 410012, 1 Teatralnaya Ploshchad, fax: (8452)26-27-83, tel.: (8452)23-46-97, e-mail: [n.boikova.ya@yandex.ru](mailto:n.boikova.ya@yandex.ru), [oktkachenko@yandex.ru](mailto:oktkachenko@yandex.ru)

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov 410049, 13 Prospekt Entusiastov, fax: (8452) 970444, tel.: (8452)970474; e-mail: [evseeva@ibppm.sgu.ru](mailto:evseeva@ibppm.sgu.ru)

*Azospirillum brasilense* bacteria belong to plant growth-promoting rhizobacteria and are one of the most intensively studied plants associative partners. It is known that rhizosphere bacteria, including azospirilla, in natural conditions *in vivo* can have positive impact on growth and development of plants. Azospirilla are capable to fix molecular nitrogen and transfer its associated forms to a plant, improving its nitric nutrition, promote increase of phosphorus availability in rhizosphere, produce phytohormones and suppress (control) plant diseases caused by phytopathogenic microorganisms. There are data on positive influence of some associative bacteria on plants in the conditions *in vitro*.

The aim of this research was the creation of active association of *Azospirillum brasilense* Sp245 bacteria with potato mericlones in culture *in vitro* and studying its influence to subsequent adaptation of plants to conditions *ex vitro*.

Optimum parameters of plant-microbe association creation in the conditions *in vitro* cultivation were developed. Influence of basal medium structure and the method of inoculation on interaction efficiency of bacteria and potato microclones was defined. It is determined that bacteria in culture *in vitro* are not only accepted on a root surface but get into tissues, forming active congestions. Essential increase of mitotic index, formation rate and roots growth is revealed at control plants.

It is marked that plants feedback to bacteria inoculation has genotypic dependence. Under the influence of bacteria inoculation *in vitro* shoots of all varieties were subjected to elongation to a lesser extent and formed more developed root system, but different genotypes had various influence intensity.

Essential increase of adaptation ability at the bacterized microclones of the majority of potato varieties in study is revealed after planting. Influence of associative interaction on shoots growth rates, phenophases performance and productivity of potato minitubers was determined.

The obtained data can be used to increase the technology efficiency of potato microclonal reproduction using microclones quality improvement and their adaptation ability that can promote increase of profitability and economic efficiency of seed breeding technology at health-improving basis.

## МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ В СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВЕ КАРТОФЕЛЯ

Гизатуллина А.Т., Сташевски З., Гимаева Е.А.

Государственное научное учреждение Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Казань, 420059, Оренбургский тракт, 48  
тел.: (843) 277-81-17, факс. (843) 277-56-00: e-mail: [gizatyllina.a@mail.ru](mailto:gizatyllina.a@mail.ru)

Процесс селекции картофеля от скрещивания до начала промышленного использования нового сорта занимает не менее 12 лет. Самое трудоемкое в этом процессе является получение микроклубней из гибридных семян, так называемых «одноклубневых комбинаций», требующее много ручного труда и тщательного ухода за растениями. Использование биотехнологических методов может повысить эффективность получения вегетативного потомства из гибридных семян картофеля.

Объектом исследования служили гибридные комбинации Виктория x 50-03, Нора x 50-03, Тениз x 50-03, 95-26-2 x Инноватор, Бакша x 50-03, 50-03 x Виктория. Гибридные семена проращивали на питательной среде Мурасиге-Скуга с 0,5% агаром. Всхожесть в среднем составила 43%. Полученные микрорастения размножали и переносили на питательную среду для клубнеобразования. Для индукции микроклубней использовали питательные среды с высоким содержанием сахарозы (8%) и добавлением разных фитогормонов: цитокинина (6-БАП 5 и 10 мг/л), кинетина (2,5 и 5 мг/л) и ретарданта XXX (150 и 200 мг/л). Культивировали при 2-х режимах освещения: полное отсутствие освещения и 8/16 ч свеговой фотопериод. Лучшие результаты были получены в условиях 8/16 ч фотопериода на питательной среде с 6-БАП (5 мг/л), масса микроклубней варьировалась от 19 до 150 мг, и с кинетином (2,5 мг/л) от 20-130 мг. В условиях отсутствия освещения микроклубни были мельче.

Оптимизация питательных сред и условий инкубирования *in vitro*, режимов хранения и пробуждения микроклубней, позволило существенно повысить эффективность биотехнологических методов для использования в селекционном процессе и семеноводстве сортов картофеля.



**PLANT TISSUE CULTURE METHODS IN BREEDING AND SEED POTATO PRODUCTION**

Gizatullina A.T., Stasevski Z., Gimaeva E.A.

State Scientific Institution Tatar Agriculture Research Institute of Russian Academy of Agricultural Sciences, Kazan, 420059, Orenburg tract, 48  
tel.: (843) 277-81-17, fax. (843) 277-56-00: e-mail: gizatullina.a@mail.ru

Potato breeding from crosses prior to industrial use of a new variety takes at least 12 years. The most difficult in this process is to obtain minitubers from hybrid seeds, so-called "one tuber combinations", which requires a lot of manual labor and careful maintenance of the plants. Biotechnology techniques can improve efficiency of vegetative progeny obtaining from potatoes hybrid true seed.

We studied hybrid combinations Victoria x 50-03, 50-03 x Nora, Teniz x 50-03, 95-26-2 x Innovator, Baksha x 50-03, 50-03 x Victoria. Hybrid seeds were germinated on Murashige-Skoog culture medium with 0.5% agar. Germination rate averaged at 43%. Obtained microplants were propagated and transferred to tuberization culture medium. For microtuber induction culture medium with a high content of sucrose (8%) and adding different phytohormones: cytokinin (6-BAP 5 and 10 mg / L), kinetin (2.5 and 5 mg / l) and XXX retardant (150 + 200 mg / l) was used. At 2 modes of lighting: the complete absence of lighting and 8/16 h light photoperiod were cultured. Best results were obtained in 8/16 hr photoperiod in a culture medium with 6-BAP (5 mg/l), microtubers weight ranged from 19 to 150 mg, and kinetin (2.5 mg/l) from 20-130 mg. In the absence of light microtubers were smaller.

Optimization of culture media and *in vitro* incubation conditions, microtubers storage modes and revival, has significantly increased the efficiency biotechnology techniques for use in the potato cultivars breeding and seed production.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ ГОРОДОВ

Гладков Е.А., Долгих Ю.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН; 127276, Москва, ул.  
Ботаническая, 35, тел. 8 (499) 231-83-34, e-mail: gladkovu@mail.ru

Газоны - важная часть городского ландшафта, в противоположность неживым компонентам вносит природный колорит, несколько смягчающий жесткость окружающих зданий. Однако, городские условия крайне неблагоприятны для произрастания газонных трав, из-за высокого уровня загрязнения тяжелыми металлами. Неблагоприятная экологическая обстановка в крупных городах заставляет думать о необходимости новой стратегии озеленения, в которой важное значение имеет использование технологий, способных повысить устойчивость растений к городским условиям.

Технологии клеточной селекции хорошо зарекомендовали себя при получении растений, толерантных к различным экологическим стрессовым факторам: засухе, низким и высоким температурам, засолению, однако работ по получению однодольных растений, толерантных к тяжелым металлам практически нет. Поэтому, нами были разработаны технологии получения растений газонной травы полевицы побегоносной (*Agrostis Stolonifera* L.), толерантных к различным тяжелым металлам.

Для получения растений, устойчивых к меди была использована схема селекции, включающая в себя культивирование каллуса в течение 2 пассажей на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с 150 мг/л меди, регенерацию и укоренение растений на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с 150 мг/л меди. Получены растения, толерантные к меди, устойчивость сохраняется в следующих поколениях.

Получены растения, толерантные к солям кадмия и к комплексному воздействию цинка, свинца и кадмия.

Следовательно, с помощью клеточной селекции можно повысить предел толерантности к данным токсикантам и частично решить важнейшую экологическую проблему городского озеленения – потерю декоративности, при относительно невысоком уровне загрязнения, а в некоторых случаях предотвратить деградацию городских газонов при повышенном уровне тяжелых металлов в почвенном покрове.

**USE OF CELL SELECTION FOR RECEIVING THE PLANTS RESISTANT AGAINST  
ADVERSE CONDITIONS OF CITIES****Gladkov E.A., Dolgikh Yu.I.**

Institute of Plant Physiology. K.A. Timirjazeva RAS, 127276, Moscow, Botanichiskay str, 35, 8  
(499) 231-83-34, e-mail:gladkovu@mail.ru

Lawn grasses the important part of a city landscape, contrary to lifeless components brings the natural color which is a little softening rigidity of surrounding buildings.

However, the urban conditions are extremely unfavorable for the growth of lawn grass, because of the high level of contamination with heavy metals.

The adverse ecological situation in the large cities, forces to think of need of a new strategy of gardening in which, importance have use of technologies capable to increase resistance of plants to city conditions.

Cell selection technologies have proven themselves in the preparation of plants tolerant to different environmental stressors: drought, low and high temperatures, salinity, but works on obtaining monocots, tolerable to heavy metals virtually none.

Therefore, we developed technologies of receiving plants of a lawn grass of *a Agrostis Stolonifera L.*, tolerant to various heavy metals.

Plants resistant to copper were obtained using a direct selection scheme. Resistant cells were selected after passing callus through two passages of cultivation on modified Murashige-Skoog medium with 150 mg / l copper added. Regeneration and root formation were performed on Murashige-Skoog medium containing 150 mg / l copper. Receiving the plants tolerant to copper, stability is preserved in the next generation.

Plants, tolerant to cadmium and complex influence are received.

Therefore, by means of cell selection it is possible to raise a tolerance limit to these toxicants and partially to solve the most important environmental problem of city gardening – decorative effect loss, at rather low level of pollution, and in certain cases degradation of city lawns at the raised level of heavy metals in a soil cover.

**КУЛЬТУРА КЛЕТОК В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ**

Дьячук Т.И., Акинина В.Н., Поминов А.В., Кибкало И.А., Итальянская Ю.В., Сафронова Н.Ф.

ГНУ НИИСХ Юго-Востока Россельхозакадемии, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7.  
Факс (8452)64-76-88; E-mail: cell\_selection@list.ru

Гаплоидные биотехнологии, основанные на использовании различных методов *in vitro* и обеспечивающие массовое получение растений-регенерантов, наиболее востребованы в селекционной практике. На сегодняшний день достигнут значительный прогресс в улучшении сортов с использованием гаплоидных биотехнологий (в подавляющем большинстве случаев – культуры пыльников), и в различных лабораториях мира создано около 300 сортов наиболее экономически значимых культур, из которых 150 – это сорта пшеницы, ячменя, риса и тритикале (<http://www.scri.sari.ac.uk.assos/COST851/Default.htm>).

Практическое применение в селекции злаков в НИИСХ Юго-Востока нашли два метода получения гаплоидных спорофитов и гомозиготных линий на их основе – культура пыльников и отдаленная гибридизация с последующей селективной элиминацией хромосом вида-опылителя.

Гаплоидия в культуре пыльников индуцирована у различных видов Poaceae – мягкой (*Triticum aestivum* L.) и твердой (*Triticum durum* Desf.) пшеницы, тритикале (*X Triticosecale* Wittm.) и проса посевного *Panicum milaceum* L. Выход альбиносных растений, как один из главных ограничивающих факторов, составил в среднем по различным генотипам 23,4% у мягкой пшеницы, 79,1% - у твердой, 87,5% - у ячменя, у межвидовых гибридов мягкой пшеницы с тетраплоидами – более 80%, у тритикале – 74%. Оптимизация технологии достигнута за счет использования жидких питательных сред, содержащих Фиколл-400 и замены сахарозы на мальтозу в индукционных питательных средах.

Для сохранения и размножения стерильных растений (отдаленных гибридов и неудвоенных гаплоидов) разработана биотехнология микрклонального размножения на основе соматического эмбриогенеза *in vitro*, включающая использование фрагментов незрелых колосьев в качестве эксплантов (у стерильных растений отсутствует зародыш – эксплант, традиционно используемый для получения эмбрионного каллуса).

Засушливые условия Поволжья специфичны для гаплопродукции в культуре зародышей. Степень проявления обратимых и необратимых нарушений эмбриологических процессов, проявляющихся при отдаленной гибридизации, усиливается под действием засухи и жары. Обнаружены особенности протекания отдельных этапов гаплопродукции пшеницы и ячменя. При скрещивании *Nordeum vulgare* L. × *Nordeum bulbosum* L. частота сформированных зародышей может достигать 80%, однако низкая степень их дифференцированности резко снижает конечный выход регенерантов. В скрещиваниях *Triticum aestivum* L. × *Zea mays* L. высокий процент партенокарпических зерновок (как одна из форм проявления постгамной несовместимости) снижает эффективность метода уже на самых ранних этапах.

На основе комплексного использования гаплоидной и традиционной селекции за короткие сроки создан коммерческий засухоустойчивый сорт яровой мягкой пшеницы Саратовская 64. В 2010 г. на Государственное сортоиспытание передан засухоустойчивый сорт озимого гексаплоидного тритикале Святозар, элитное растение которого получено в культуре пыльников. Получены перспективные линии тритикале хлебопекарного назначения, которые испытываются на различных этапах селекционного процесса.

**CELL CULTURE IN WHEAT AND TRITICALE BREEDING**

Dyatchouk T.I., Akinina V.N., Pominov A.V., Kibkalo I.A., Italianskaya Ju.V.,  
Safronova N.F.

ARISER of Russian Academy of Agricultural Science, Saratov, Toulaiikova Str., 7. Fax  
(8452)64-76-88, E-mail: cell\_selection@list.ru

Haploid biotechnologies that are based on the different tissue culture methods and ensure the mass-scale haploid plants production are the most useful in plant breeding. In the present time the considerable progress in the improvement of varieties with using of haploid biotechnologies has been achieved and in a number of laboratories of the world about 300 varieties were produced by different DH-production methods, 150 from these varieties are the wheat, barley, rice and triticale ones ([http://www.scri.sari.ac.uk.assos/COST 851/Default.htm](http://www.scri.sari.ac.uk.assos/COST_851/Default.htm)).

There are two methods of haploid sporophytes and homozygous lines production for practical purposes in the Poaceae breeding in ARISER: anther culture and wide crossing followed by elimination of male parent chromosomes.

Haploidy in anther culture was induced in different Poaceae species – *Triticum aestivum* L., *Triticum durum* Desf., *Triticosecale* Wittm. and *Panicum milaceum* L. The output of albino plants (one of the limited factors) averages in different genotypes was 23,4% in *Triticum aestivum* L., 79,1% in *Triticum durum* Desf, 87,5% in *Hordeum vulgare* and 74% in *Triticale*. The technology optimization was achieved by using of liquid Ficoll-containing medium and replacement of sucrose by maltose in the induction nutrient medium.

The biotechnology of microclonal propagation via somatic embryogenesis was elaborated for saving of sterile plants (distant hybrids and undoubled haloids) with using of young ears fragments as explants (the embryos – the most acceptable explants for embryogenic callus obtaining – are absent in sterile plants).

Arid Povolzhye region conditions are unfavorable for haploid production by embryo culture method. The convertible and unconvertible disturbances of embryological processes (manifested itself in distant crosses) are increased by drought and heat. There are peculiarity in proceeding of the individual steps of haploid production in wheat and barley. In crosses *Hordeum vulgare* L. x *Hordeum bulbosum* L. the frequency of embryos formation can reach 80%, their weak differentiation decrease plant regeneration. The high frequency of parthenocarpic ovules as one of forms of incompatibility in crosses *Triticum aestivum* L. x *Zea mays* L. sharp decrease the haploid production effectiveness in early stages.

The commercial drought resistant spring wheat variety Saratovskaya 64 was developed in the short time by combining conventional and haploid breeding. In 2010 Sviatosar – a new winter triticale variety with doubled haploid elite line was submitted to the state variety test. The advanced lines triticale for bread making purpose were created in the short time. The lines developed are tested at the different stages of selection.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ *IN VITRO* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ ФОРМ ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Егорова Н.А., Ставцева И.В.

Институт сельского хозяйства Крыма НААНУ, Украина,  
Симферополь, 95493, ул. Киевская, 150; тел (0652) 560007; e-mail: [yegorova.na@mail.ru](mailto:yegorova.na@mail.ru)

Устойчивость к абиотическим стрессовым факторам среды (засухе, засолению, экстремальным температурам) является одной из важнейших проблем в селекции растений, особенно в связи с глобальными изменениями климата на планете. Для создания разнообразного исходного селекционного материала в последние годы успешно применяются биотехнологические методы, в частности, клеточная селекция, позволяющая проводить направленный отбор устойчивых генотипов *in vitro*. Для эфиромасличных растений, выращиваемых на юге Украины, очень актуально создание сортов с повышенной засухоустойчивостью. При моделировании действия этого стрессового фактора обычно в питательную среду вводят неионные осмотики (маннит, полиэтиленгликоль, сорбит) или ионный осмотик NaCl, позволяющий также получить и солеустойчивые генотипы.

Целью данной работы было изучение действия осмотического стресса на развитие различных биотехнологических объектов *in vitro* и разработка методов отбора устойчивых форм у некоторых эфиромасличных растений. В качестве материала для исследований были использованы ткани и органы лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) – сорта ‘Степная’, ‘Синева’, ‘Вдала’; шалфея (*Salvia sclarea* L.) – сорта ‘С-785’, ‘Ай-Тодор’, ‘Тайган’; кориандра (*Coriandrum sativum* L.) – сорта ‘Янтарь’, ‘Ранний’, ‘Нектар’, ‘Медун’; эфиромасличной герани (*Pelargonium* spp.) – сорта ‘Розовая’, ‘Аист’, ‘Крунк’, ‘Рерар’.

В результате проведенных исследований были оптимизированы сублетальные концентрации и экспозиции селективных факторов, биотехнологические объекты и схемы селекции *in vitro*. У изученных видов растений при использовании для отбора неморфогенного каллуса полученные линии чаще всего демонстрировали значительное снижение частоты регенерации по сравнению с контролем. Для лаванды и кориандра были разработаны методики, позволяющие в течение 2-3 пассажей проводить селекцию из морфогенных каллусных тканей. Это позволило увеличить сублетальные концентрации осмотиков (0,8-0,9% NaCl и 8-10% маннита) и отобрать устойчивые каллусные линии, способные к регенерации. Полученные из них растения показали более высокую устойчивость к осмотическому стрессу по сравнению с контролем при культивировании изолированных меристем. При получении солеустойчивых форм герани была показана эффективность использования ступенчатого отбора, а также введения NaCl в питательную среду для индукции морфогенеза, на которую переносили каллусные ткани. У шалфея при изучении действия осмотически активных веществ на развитие изолированных зиготических зародышей была выявлена корреляция между засухоустойчивостью сортов в полевых условиях и основными показателями развития эмбриокультур на стрессовом фоне *in vitro*. Разработана 2-х этапная схема селекции, и при сублетальных концентрациях NaCl (0,7-1,0 %) и маннита (4-8%) отобраны устойчивые к стрессу формы. Анализ ряда регенерантов шалфея, полученных в эмбриокультуре на селективном фоне, показал их более высокую устойчивость к осмотическому стрессу по сравнению с исходными сортами, как на уровне изолированных зародышей, так и на уровне целых растений. При полевой оценке были выделены ценные образцы, отличающиеся повышенными коэффициентами засухоустойчивости, урожайностью и сбором эфирного масла, которые включены в селекционный процесс.

**DEVELOPMENT OF SELECTION IN VITRO METHODS FOR OBTAINING OSMOTIC STRESS RESISTANT FORMS OF ESSENTIAL OIL PLANTS****Yegorova N.A., Stavtzeva I.V.**

Institute of Agriculture of Crimea of National Academy of Agriculture Sciences of Ukraine, Ukraine; Simferopol, 95493, Kievskaya st., 150, tel (0652) 560007; e-mail: yegorova.na@mail.ru

The resistance to abiotic stress factors of environment (drought, salinity, extreme temperature) is one of the major problems in plant breeding, especially in connection with the global climate changes on the planet. In order to creation various initial breeding material, in recent years biotechnological methods are successfully applied, particularly, the cell selection which allowed to carry out the directional choice of resistant genotypes *in vitro*. As to essential oil plants cultivated in Southern Ukraine, it is topical problem to create varieties with increased drought resistance. When modeling the effect of this stress factor as usual to nutrient medium are added nonionic osmotics (mannitol, polyethylenglycol, sorbitol) or ionic osmotic NaCl, which also allowed to obtain salt resistant genotypes.

The aim of the present work was investigation an effect of osmotic stress action on development of different biotechnological objects *in vitro* and the development of methods for selection the resistant forms of some essential oil plants. As research material tissues and organs were used taken from lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) – varieties ‘Stepnaya’, ‘Sineva’, ‘Vdala’; sage (*Salvia sclarea* L.) – varieties ‘C-785’, ‘Ay-Todor’, ‘Taygan’; coriander (*Coriandrum sativum* L.) – varieties ‘Yantar’, ‘Ranniy’, ‘Nectar’, ‘Medun’; essential oil geraniums (*Pelargonium* spp.) – varieties ‘Rozovaya’, ‘Aist’, ‘Krunk’, ‘Regar’.

As a results of research sublethal concentrations and expositions of selective factors, biotechnological objects and schemes of selection *in vitro* were optimized. When we used for selection callus without morphogenesis the obtained lines of studied plant species often demonstrated the significant reduction regeneration frequency in comparison with control. Methods that were worked out for lavender and coriander allowed to carry out the selection during 2-3 passages from callus tissues with morphogenesis. That permitted to increase sublethal concentrations of osmotics (0,8-0,9% NaCl and 8-10% mannitol) and to choose resistant callus lines with regeneration capability. Plants received from such lines revealed more high resistance to osmotic stress in comparison with control during cultivation of isolated meristems. When received salt resistant geranium forms it was shown the efficiency of stepped selection and also addition of NaCl in the nutrient medium for the morphogenesis induction, on which the callus tissues were transferred. When studying an effect of osmotic active substances on the development of isolated zygotic sage embryos, the correlation between variety drought resistance in field conditions and main embryoculture characteristics under stress *in vitro* was revealed. The 2-stage scheme of selection has been elaborated, using sublethal concentrations of NaCl (0,7-1,0 %) and mannitol (4-8%) stress resistant forms have been picked out. The analysis of a number of sage regenerants, obtained in embryoculture under selective background, was carried out with showing their more high resistance to osmotic stress comparing to initial varieties both on the level of isolated embryo culture and whole plants. During field study the valuable samples with increased coefficients of drought resistance, yield and essential oil production were revealed and included in breeding process.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕЛЕНА НА *SOLANUM TUBEROSUM* СОПТА ЛУГОВСКОЙ *IN VITRO*.

**Живетьев М.А., Папкина А.В., Перфильева А.И., Турская А.Л., Маркова Ю.А., Граскова И.А., Боровский Г.Б., Сухов Б.Г.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии Сибирского отделения РАН, Иркутск, 664033, ул. Лермонтова, 132, факс: (3952)510754, тел. (3952)42-67-21, e-mail: nik.19@mail.ru

Ранее нами на возбудителе кольцевой гнили картофеля был показан бактерицидный эффект Se-арабиногалактановых нанокмпозитов. В связи с возможностью практического использования этих селенсодержащих нанокмпозитов, целесообразно было изучить их влияние на само растение картофеля.

Первый нанокмпозит (с содержанием Se 1,23 %) был получен путем полимеризации арабиногалактана в присутствии оксида селена SeO<sub>2</sub>. Второй – в присутствии бис(2фенилэтил)диселенофосфината натрия (PhCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PSe<sub>2</sub>Na. В обоих случаях использовались особые специально подобранные физико-химические условия полимеризации, при которых селен из селенита или оксида селена включался в арабиногалактановую решетку с определенной концентрацией и с образованием определенной пространственной структуры Se-арабиногалактанового полимера. В этой связи, наряду с контролем и нанокмпозитами, рассматривали влияние соединений, служащих предшественниками изучаемых нанокмпозитов: арабиногалактан, диселенофосфинат натрия и оксид селена. Все концентрации растворов использованных веществ были выровнены по концентрации селена, за эталон брался 0,05 % раствор первого нанокмпозита. Двухнедельные растения картофеля *in vitro* инкубировали в течение десяти дней, отслеживая прирост стеблей и активность пероксидазы листьев через каждые два дня.

Арабиногалактан не оказывал существенного влияния на прирост стеблей и активность пероксидазы картофеля, в то время как оксид селена и бис(2фенилэтил)диселенофосфинат полностью останавливали рост растений. Кроме того, инкубирование картофеля в присутствии оксида селена приводило к стойкому подавлению активности пероксидазы. Фосфинат натрия сильно увеличивал активность фермента в течение первых четырех дней наблюдений с последующим снижением активности пероксидазы почти до контрольного уровня. При включении в арабиногалактановую решетку, соединения селена значительно уменьшали свое токсическое воздействие на растения. При чем нанокмпозит №2 практически не влиял на прирост стебля и незначительно стимулировал активность пероксидазы, в то время как при воздействии первого нанокмпозита наблюдалось угнетение роста в два раза и сильное увеличение активности пероксидазы в течение первых шести дней. На основании полученных данных перспективным в применении для обеззараживания картофеля является образец №2. Зато нанокмпозит №1 потребовал более детальных исследований. По-этому в дальнейшем изучали влияние этого нанокмпозита на активность пероксидазы и продукцию АФК корнями. Определяли содержание АФК в среде инкубирования на 5, 30, 60, 90, 120, 150 и 270 минутах в контроле, с нанокмпозитом, при заражении возбудителем кольцевой гнили картофеля без нанокмпозита и в его присутствии, после чего измеряли активность пероксидазы в листьях, корнях и стеблях. Нанокмпозит слабо усиливал продукцию АФК и подавлял активность пероксидазы в корнях во время первых часов коинкубирования. В листьях, наоборот, активность этого фермента возрастала. Заражение бактерией приводило к спаду активности пероксидазы в корнях, сопровождавшейся сильным увеличением содержания АФК. Добавление нанокмпозита при заражении смягчало отрицательный эффект возбудителя, что выразилось в сохранении активности пероксидазы в корнях на уровне близком к контролю и более слабом увеличении уровня АФК, что говорит о благоприятном действии первого нанокмпозита на первых часах взаимодействия растения и возбудителя кольцевой гнили картофеля.



**STUDY OF SELENIUM NANOCOMPOSITES ON *SOLANUM TUBEROSUM* OF LUGOVSKOY VARIETY *IN VITRO*.**

**Zhivet'ev M.A., Papkina A.V., Perfilyeva A.I. Turskaya A.L., Markova YuA., Graskova I.A., Borovsky G.B., Sukhov B.G.**

Federal state budget science institution Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, 664033, Lermontov str., 132, fax: (3952) 51-07-54, tel. (3952) 42-67-21, e-mail: nik.19@mail.ru

In the previous studies we demonstrated bactericide effect of Se-arabinogalactan nanocomposites on potato ring rot pathogen. As these selenium-containing nanocomposites may be used in practice, we found it efficient to analyze their impact on the potato plant itself.

The first nanocomposite (with Se content of 1.23 %) was acquired through polymerization of arabinogalactan in the presence of selenium oxide  $\text{SeO}_2$ . The second one - in the presence of sodium bis(2phenylethyl)diseleniumphosphinate  $(\text{PhCH}_2\text{CH}_2)_2\text{PSe}_2\text{Na}$ . In both cases we used specifically selected physical-chemical conditions of polymerization, under which selenium from selenite of selenium oxide was incorporated into arabinogalactan lattice with certain concentration and formation of certain spatial structure of Se- arabinogalactan polymer. With this in view, along with control and nanocomposites we studied the impact of compounds acting as predecessors of the nanocomposites studied: arabinogalactan, sodium diseleniumphosphinate and selenium oxide. All the concentrations of solutions of the substances studied were equalized by selenium concentration, with 0.05 % solution of the first nanocomposite taken as reference. Two-weeks old potato plants were incubated for 10 days *in vitro*, with stem increment and leaves peroxidase activity monitored every two days.

Arabinogalactan did not produce a considerable impact stem increment potato peroxidase activity, while selenium oxide and bis(2phenylethyl)diseleniumphosphinate completely stopped the growth of plants. Besides, potato incubation in the presence of selenium oxide resulted in stable suppression of peroxidase activity. Sodium phosphinate drastically enhanced the enzyme activity within the first four days of monitoring with further reduction of peroxidase activity almost down to the control level. Being introduced into arabinogalactan lattice, selenium compounds considerably decreased their toxic impact on the plants. With nanocomposite №2 practically not affecting stem increment and insignificantly stimulating peroxidase activity, the impact of the first nanocomposite caused growth suppression by two times and intense increase in peroxidase activity within the first 6 days. Based on the data acquired it can be concluded that sample № 2 is promising in respect of sanitizing potato. But nanocomposite №1 required more detailed studies. Therefore, further research was focused on the impact of this nanocomposite on peroxidase activity and ROS production by roots. ROS content was determined in incubation medium on the 5, 30, 60, 90, 120, 150 and 270 minutes in control, with nanocomposite, under ring rot pathogen infection without nanocomposite and with its present, then peroxidase activity was measured in leaves, stems and roots in the first hours of co-incubation. Nanocomposite slightly enhanced ROS generation and suppressed peroxidase activity in the roots in the first co-incubation hours. On the reverse, the activity of this enzyme in the leaves increased. Bacterial infection resulted in the drop of peroxidase activity in the roots accompanied by intense rise of ROS content. Addition of nanocomposite during infection mitigated the pathogen negative effect, which was manifested by maintenance of peroxidase activity in the roots at close-to-control level and weaker rise of ROS level; this proves favorable impact of the first nanocomposite during the first hours of interaction between the plant and potato ring rot pathogen.

## МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ВОДНОМУ ДЕФИЦИТУ

Зинченко М. А., Бавол А. В., Дубровная О. В.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины ул. Васильковская, 31/17, г. Киев, 03022, Украина, тел. (+38)066-991-63-17, e-mail: [maria.zinch@gmail.com](mailto:maria.zinch@gmail.com)

Известно, что культивирование *in vitro* может быть мощным стрессовым фактором, и способно вызывать активацию мобильных генетических элементов, что может приводить к возникновению мутаций или изменению уровня экспрессии других генов. С другой стороны показано повышение активности ретротранспозонов в условиях биотического/абиотического стресса и доказана их транскрипционная активность. Повышение активности ретротранспозонов при стрессах свидетельствует о значительной роли этих элементов в формировании ответа на действие экстремальных факторов. Таким образом, при клеточной селекции может возникать генетическая изменчивость, связанная как с условиями культивирования, так и действием стрессового фактора. Однако на сегодня данных об изменчивости в процессе отбора устойчивых форм на молекулярно-генетическом уровне недостаточно.

Нами впервые методом клеточной селекции получены каллусные линии пшеницы устойчивые к метаболитам возбудителя офиоболлэза (*G. graminis* var. *tritici*). Целью нашей работы было проанализировать уровень полиморфизма участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами LTR ретротранспозона *Cassandra*, у полученных клеточных линий в процессе отбора на комплексную устойчивость к осмотическому стрессу и индуцированных из них растений-регенерантов используя IRAP-метод.

Материалом для исследования были каллусные линии, полученные из эксплантатов верхушки побега 3-суточных стерильных проростков растений мягкой пшеницы сорта Зимоярка и растения R2 соматоклональной линии этого же сорта, устойчивые к возбудителю офиоболлэзной корневой гнили. Для отбора устойчивых форм применяли прямую и ступенчатую клеточную селекцию. В качестве стрессового фактора использовали манит в концентрации 0,4-0,8М. Для IRAP-PCR использовали праймеры 5'-GGTGTGTCCGGGGCGTTACA-3' и 5'-CCGGGAGCCCATTCGAAC-3' комплементарные к инвертированным последовательностям LTR ретротранспозона *Cassandra*. Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 1,6% агарозном геле. Размер продуктов ПЦР определяли с помощью пакета прикладных программ TotalLab v.2.01. Генетические дистанции вычисляли с помощью программы POPGEN v.1.31.

На первом этапе исследования анализировали образцы ДНК 10 произвольных растений R2 соматоклональной линии. Всего у исходных растений спектр продуктов амплификации ДНК состоял из 11 фрагментов, размером от 154 до 581 п.н. Аналогичные спектры продуктов амплификации наблюдали и в первичном каллусе. Полученные данные свидетельствуют, что в исходном материале (растениях и первичных каллусах) отсутствует природный и/или спонтанный полиморфизм по исследуемому локусу. Нами, при использовании IRAP-метода выявлены различия в полинуклеотидных последовательностях ДНК возникающие при прямой и ступенчатой клеточной селекции. Оценка уровня генетической дивергенции показала, что каллусы, полученные при прямой селекции, а также каллусы на поздних этапах ступенчатого отбора наиболее генетически удалены от исходных форм (DNL=0,4855), т.е. при действии сублетальной дозы (0,8 М манита) селективного фактора наблюдаются наиболее значительные изменения в геноме исследуемых объектов. В отличие от исходных форм в спектрах продуктов амплификации ДНК каллуса и регенерантов отмечено появление ампликона длиной около 638 п.н., что может свидетельствовать о активации ретротранспозона *Cassandra* при культивировании *in vitro*.

## MOLECULAR POLYMORPHISM OF WHEAT CELLULAR LINES AND REGENERATED PLANTS AT THE CELL SELECTION FOR RESISTANCE TO DROUGHT TOLERANCE

Zinchenko M. O. Bivol A. V., Dubrovna O. V.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine,  
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasilkovskaya str 31/17, e-mail: maria.zinch@gmail.com*

It is known that *in vitro* culturing can be a powerful stressor, and it can cause the activation of mobile genetic elements, which can lead to mutations or changes in the level of expression of other genes. On the other hand it was shown increasing activity of retrotransposons at the biotic/abiotic stress and proved their transcriptional activity. Increased activity of retrotransposons under stress shows a significant role of these elements in a response to the action of extreme factors. Thus, cell selection can occur genetic variability associated with both culturing conditions and the influence of stress factors. However, today is not enough data about the variability at the selection of resistant forms on the molecular - genetic level.

For the first time we have obtained wheat cellular lines resistant to the metabolites of *G. graminis* var. *tritici* (the infectious agent of ophiobolus root rot) by cell selection method. The purpose of this study was to analyze the level of DNA polymorphism of DNA locuses, flanked by inverted repeats of LTR *Cassandra* retrotransposon, in the cell lines obtained at the selection process for complex resistance to osmotic stress and induced plant-regenerants by using the IRAP-method.

Material of studies were callus lines derived from shoot apex explants of 3-day-old sterile seedlings of wheat cultivar Zimoyarka and plants of R2 somaclonal lines of the same cultivar that are resistant to the pathogen of ophiobolus root rot. For the selection of resistant forms we applied direct and step cell selection. It was used mannitol as a selective agent in concentrations 0.4 - 0.8 M for simulation of the water deficit. For IRAP-PCR we used primers 5'-GGTGTGTCCGGGGCGTTACA-3' and 5'-CCGGGAGCCCATTCGAAC-3' complementary to the invert sequences of LTR of *Cassandra* retrotransposon. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.6% agarose gel. The size of the PCR products were determined by the application package TotalLab v.2.01. Genetic distances were calculated by using POPGEN v.1.31.

In the first phase of the study we analyzed DNA samples from 10 random plants of R2 somaclonal lines. In the original plants range of DNA amplification products consisted of 11 fragments ranging in size from 154 to 581 bp. In the primary callus was observed the similar spectra of the amplification products. The data indicate that is none natural and/or spontaneous polymorphism in studied loci of the source material (plants and primary calluses). We have used IRAP-method and revealed differences in the polynucleotide sequences of DNA arisen at the direct and stepwise cell selection. Assessment of the of genetic divergence level showed that calluses obtained from direct selection and calluses at the later stages of step selection are the most genetically distant from the original forms (DNL = 0,4855), i.e. the most significant changes in the object genome was observed under the influence of a sublethal dose (0.8 M mannitol) of selective factor. While cellular lines and regenerated plants were cultured *in vitro*, in the spectra of the DNA amplification products noted the appearance of amplicon approximately 638 bp. length, which is absent in original forms. This amplicon is proportional to the total length of retrotransposon *Cassandra*.

**РАЗРАБОТКА ГАПЛОИДНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ РИСА (*ORYZA SATIVA L.*) НА ОСНОВЕ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР IN VITRO****Искакова К.М.<sup>1</sup>, Анапияев Б.Б.<sup>1</sup>, Бейсенбек Е.Б.<sup>1</sup>, Жанбырбаен Е.А.<sup>2</sup>, Казкеев Д.Т.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт высоких технологии и устойчивого развития КазНТУ им. К.И. Сатпаева МОН РК, Алматы, 050013; ул. Сатпаева 22, Казахстан, E-mail: [bak\\_anapiyayev@mail.ru](mailto:bak_anapiyayev@mail.ru)

<sup>2</sup>Институт биологии и биотехнологии растений МОН РК, Алматы, 050013, ул. Тимирязева, 45

Рис является одним из основных продуктов питания и его потребляет 3/1 часть населения Земли. Если объем собранного урожая риса в мире в 1990 г. составил более 500 млн. тонн, то в 2004 г. данный объем составил более 610 млн. тонн. Одним из стран возделывающих рис является Казахстан где более 80 % риса возделывается в Кызылординской области, остальная часть в Алматинской и Южно-Казахстанской областях. Общий объем собранного урожая риса в Казахстане за 2004 г. составил более 350 тыс. тонн. Основой получения высоких урожаев риса является совершенствование агротехники и использование высокопродуктивных сортов. Поэтому необходимо продолжить исследования по выведению высокопродуктивных сортов устойчивых к неблагоприятным биотическим и абиотическим стрессовым факторам окружающей среды. Для создания сорта традиционными селекционными методами необходимо в среднем 12-15 лет. За это время многие сорта теряют свои ценные свойства, особенно такие как иммунитет ко многим болезням. Для сокращения селекционного процесса самым эффективным является использование гаплоидной биотехнологии. Использование гаплоидной биотехнологии позволяет создать генетически стабилизированные, гомозиготные константные дигаплоидные линии всего за 1-2 года. Также очень важным является то, что у полученных дигаплоидных линий проявляются и рецессивные гены, многие из которых могут нести ценные признаки. Обычно, при использовании традиционных методов селекции, доминантные и рецессивные гены расщепляются по закону Менделя (3:1) и поэтому не проявляются. При использовании гаплоидной биотехнологии для генетической стабилизации доминантные и рецессивные гены распределяются и закрепляются в пропорции 1:1. Это является очень важным преимуществом гаплоидной биотехнологии поскольку позволяет экспрессироваться рецессивным генам наравне с доминантными генами.

Поэтому нами впервые в Казахстане и Центральной Азии начаты исследования по разработке гаплоидной биотехнологии риса (*Oriza sativa L.*) на основе культуры изолированных микроспор in vitro. В качестве объектов исследования были использованы возделываемые в Алматинской области сорта и линий (любезно предоставлен д.б.н., проф. Л.К. Мамоновым и О.Н. Тарановым.), а также сорта и гибриды созданные в Приаральском НИИ агроэкологии и сельского хозяйства (любезно предоставлен к.с.-х.н. Байбосыновой С.М.). Донорные растения были выращены в условиях фитотрона Института биологии и биотехнологии растений. Для культуры изолированных микроспор in vitro были использованы модифицированные нами питательные среды Мурасиге-Скуга, Гамборга-B5 и N6. В первой серии экспериментов были изучены генотипические особенности эмбриогенеза, каллусогенеза и регенерации растений из андроклинных структур полученных в культуре изолированных микроспор риса in vitro. Всего было проскринировано 24 генотипов, включая сорта, гибриды и коллекционные материалы.

В работе обсуждаются результаты изучения влияния генотипа и состава питательных сред на образование эмбрионов, морфогенных каллусов и растений-регенерантов в культуре изолированных микроспор риса (*Oriza sativa L.*) in vitro а также возможность использования разрабатываемой нами гаплоидной биотехнологии в практической селекции риса в Казахстане и в государствах Центральной Азии возделывающих рис.

**DEVELOPMENT OF HAPLOID BIOTECHNOLOGY OF RICE (*ORYZA SATIVA L.*) ON  
BASE OF ISOLATED MICROSPORES CULTURE IN VITRO****Iskakova K.M.<sup>1</sup>, Anapiyayev B.B.<sup>1</sup>, Beisenbek B.B.<sup>1</sup>, Zanbirbayev E.A.<sup>2</sup>, Kazkeev D.T.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of High Technologies & Sustainable Development KazNTU, Kazakhstan, Almaty, 050013, Satpayev str, 22, E-mail: bak\_anapiyayev@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, 050013, Timiryazev str., 45

Rice is one of the main food products and 1/3 population of Earth consume it. A volume of harvest of rice in Earth in 1990 was more 500 mln. tons and in 2004 – more 610 mln. tons. One of the countries cultivating rice is Kazakhstan where more 80 % of rice cultivates in Kyzylorda region and 20 % - in Almaty and Zhambyl regions. The common volume of harvest of rice in 2004 consisted more 350 000 tons. Base for the high yields of rice is development of agro technique and use the highly productive cultivars. Therefore it is need to continue researches for production of highly productive cultivars tolerant to unfavorable biotic and abiotic stress factors of environment.

On average 12-15 years are necessary to create a cultivar by means of traditional breeding methods. For this period many cultivars lose their valuable properties, especially such as immunity to many diseases. For reduction of breeding process the most effective way is to use haploid biotechnology. Use of haploid biotechnology allows creating genetic stabilized, homozygotic constant dihaploid lines for 1-2 years. The very important moment is that the received dihaploid lines may have recessive genes, many of which can control very valuable traits. Usually, when using traditional breeding methods, dominant and recessive genes split under Mendel's law (3:1) and consequently do not express. When using haploid biotechnology for genetic stabilization dominant and recessive genes are distributed and fixed in a proportion 1:1. It is very important advantage of haploid biotechnology as it allows expressing recessive genes on a level with dominant genes.

In addition by use of the haploid biotechnology it exists unique possibility for realizing of recessive genes that can carry useful traits. Therefore researches for development of haploid biotechnology of rice (*Oryza sativa L.*) on base of isolated microspores culture *in vitro* started first time in Kazakhstan and Central Asia by us. As objects of research were used cultivars and lines cultivated in Almaty region (kindly presented by Dr of biological sciences, professor Mamonov L.K. and Taranov O.N.) and cultivars and hybrids created in Aral Scientific Research Institute of agro ecology and agriculture (generously presented by Dr. of agricultural sciences Baibosynova S.M.). Donor plants were grown in conditions of green house on Institute of Plant Biology and Biotechnology. Nutrient media Murashigie and Skoog, Gamborg B5 and N6 modified by us were used for isolated microspores culture *in vitro* it. In first series of experiments genotypic particulars of embryoid genesis, callus genesis and plant regeneration from androclinic structures obtained in rice isolated microspores culture *in vitro* were investigated. A total 24 genotypes were screened including cultivars, hybrids and material of collection.

In the work it is discussed the results of investigation of influence of genotype and content of nutrient media for formation of embryoids, morphogenic calli and plants-regenerants in rice (*Oryza sativa L.*) isolated microspores culture *in vitro* and possibility of use of the haploid biotechnology developed by us in practical selection of rice in Kazakhstan and countries of Central Asia cultivating rice.

**ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ КАК МАРКЕРЫ АДАПТАЦИОННОГО  
ПОТЕНЦИАЛА И ПРОДУКТИВНОСТИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ  
(*BETA VULGARIS L.*)**

**Кляченко О.Л., Крыловская С.А.**

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 03041,  
ул. Героев Обороны, 15,  
тел. +38 (098) 288 12 99, e-mail: [krylovskaya.sv@mail.ru](mailto:krylovskaya.sv@mail.ru)

Сахарная свекла (*Beta vulgaris L.*) содержит сапонины тритерпеноидного типа. В состав агликона сапонинов сахарной свеклы входят производные олеаноловой кислоты. Их распределение в тканях вегетативных органов свеклы неравномерно. Наибольшее количество сапонинов сахарной свеклы сосредоточено в наружной части корнеплодов, однако относительно большое количество тритерпеновых гликозидов обнаруживается также и в листьях.

Учитывая важную роль вторичных метаболитов в реализации адаптационных реакций, целью наших исследований было изучение особенностей состава тритерпеновых гликозидов в тканях вегетативных органов сахарной свеклы в культуре *in vitro* и установить возможную взаимосвязь их синтеза с адаптационным потенциалом и продуктивностью.

В исследованиях использовали сорт Ялтушковская односемянная 64, диплоидные гибриды Уладово-Верхняцкий МС 37, Украинский МС 70, Уладово-Веселоподолянский МС 84, Атаманша и триплоидный Александрия украинской селекции. Растения-регенеранты сахарной свеклы культивировали на модифицированной среде Мурашиг-Скуга. Идентификацию вторичных метаболитов в тканях растений-регенерантов сахарной свеклы производили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ): пластинки 100×150 мм; сорбент – Кизельгель 60 F254 (Merck); системы растворителей: хлороформ - метанол - вода (70 : 30 : 4) и хлороформ - ледяная уксусная кислота - метанол - вода (60 : 32 : 12 : 8). Для усиления свечения веществ в ультрафиолетовом свете УФ (365 нм) пластинки с хроматограммами обрабатывали 5% EtOH раствором  $AlCl_3$  с последующим нагреванием (5 мин при 105°C). Сапонины выявляли методом последовательной обработки пластин спиртовым раствором серной кислоты и ванилина. Хроматограмму выдерживали 7-10 мин при температуре 110°C до появления характерных пятен. В результате исследований были получены данные относительно качественного и количественного состава тритерпеновых сапонинов в листьях сахарной свеклы при культивировании растений *in vitro* в условиях одинаковых фото- и терморегима (25-26°C, относительная влажность 70-80%, фотопериод). Было показано, что качественный состав и количественные показатели тритерпеновых гликозидов сахарной свеклы исследованных сортов и гибридов имеет сортовую специфичность, что обусловлено особенностями их метаболизма. Нами было установлено, что на этапе формирования растений-регенерантов сахарной свеклы в культуре *in vitro* важными диагностическими маркерами, определяющими их потенциально высокую продуктивность и адаптивность, могут быть тритерпеновые сапонины с показателями  $R_f = 0,56$  и  $0,62$  в системе растворителей: хлороформ - ледяная уксусная кислота - метанол - вода (60 : 32 : 12 : 8). Таким образом, есть основание считать целесообразными дальнейшие исследования по использованию выделенных нами соединений в первичной диагностике и селекционном отборе растений-регенерантов с хозяйственно-ценными признаками, в том числе потенциально высокой засухоустойчивостью.

**TRITERPENE GLYCOSIDES AS MARKERS OF THE SUGAR BEET'S (*BETA VULGARIS* L.) ADAPTIVE POTENTIAL AND PRODUCTIVITY****Klyachenko O.L., Krylovskaya S.A.**

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev, 03041, Heroiv Oboronu st., 15,  
tel. +38 (098) 288 12 99, e-mail: [krylovskaya.sv@mail.ru](mailto:krylovskaya.sv@mail.ru)

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) contains saponins of triterpenoid type. Derivatives of oleanolic acid are included into the structure of sugar beet aglycone saponins. Their allocation in tissues of sugar beet vegetative organs is unequal. The largest number of sugar beet saponins concentrated in the outer part of a beet-root, but a relatively large amount of triterpene glycosides is also found in leaves.

Taking into account the important role of secondary metabolites in the implementation of adaptation responses, the aim of our research was investigation of triterpene glycosides' composition peculiarities in tissues of sugar beet vegetative organs *in vitro* culture and to establish the possible relationship of their synthesis with adaptive capacity and productivity.

In investigation sort Yaltushkivskiy single-seeded 64, diploid hybrids Ukrainskiy MS 70, Uladovo-Verhnyatskiy MS 37, Uladovo-Veselopodolyanskiy MS 84, Atamansha and triploid Alexandriya of Ukrainian selection were used. Plant regenerants were cultivated on the modified Murashige-Skoog medium.

Identification of secondary metabolites in plant regenerants tissues was made by TLC method: plates with the size 100×150 mm; sorbent – Kieselgel 60 F254 (Merck); solvent systems: chloroform - methanol - water (70 : 30 : 4) and chloroform - glacial acetic acid - methanol - water (60 : 32 : 12 : 8). To enhance the fluorescence of substances in ultraviolet light UV (365 nm) plates with chromatograms were treated with 5% EtOH solution of AlCl<sub>3</sub> with following heating (5 min at 105°C). Saponins were detected by the sequential treatment of plates with alcoholic solution of sulfuric acid and vanillin. Chromatogram was held for 7-10 minutes at 110°C until the indicative spots appearance.

As a result of research data about qualitative and quantitative composition of triterpene saponins content in leaves of sugar beet plants cultivated *in vitro* at the same photo- and thermal regime (25-26°C, relative humidity 70-80%, photoperiod).

It was shown that the qualitative composition and quantitative indexes of triterpene saponins content in leaves of sugar beet plants of investigated sugar beet sorts and hybrids has varietal specificity, which is due to metabolism peculiarities.

It was determined that at the stage of sugar beet plant regenerants formation *in vitro* culture, triterpene saponosides with  $R_f = 0.56$  and  $0.62$  can be an important diagnostic markers in the solvent system: chloroform - glacial acetic acid - methanol - water (60 : 32 : 12 : 8).

Thus, there is a reason to consider reasonable researches on usage of isolated by us compounds in primary diagnostics and plant regenerants breeding on valuable agronomic character, including potentially high drought tolerance.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОГО РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.)****Кляченко О.Л., Никифорова Н.В.**

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 03041, ул. Героев Оборона 13, тел. +38(067)6624672, e-mail: [nikiforova.n.v@mail.ru](mailto:nikiforova.n.v@mail.ru)

Рапс (*Brassica napus* L.) – урожайная масличная культура с высоким содержанием жира (до 52,1%) и белка (до 28,2%) в семенах. По валовому производству масла в мире за последние 30 лет рапс переместился с пятого на третье место. При этом рапсовое масло используется как в пищевых, так и в технических целях. Однако сорта украинской селекции, ещё не полностью соответствуют требованиям производства по качеству масла и шрота, а зарубежные – недостаточно адаптированы к почвенно-климатическим условиям Украины. Поэтому важной задачей остаётся получение засухоустойчивых форм озимого рапса с помощью метода клеточной селекции. Для решения этой задачи целесообразным является использование методов *in vitro*, в частности культуры каллусов и соматональной изменчивости.

Объектом исследований были сорта озимого рапса (*Brassica napus* L.) украинской селекции – «Антария» и «Алиот». В качестве базовой питательной среды для индукции каллусогенеза использовали среду по прописи Мурасиге и Скуга (МС). Для разных целей были подобраны его модификации: аденина – 10 мг/л, гибереловой кислоты (ГК) – 0,05 мг/л, 6-бензиламинопурина (6-БАП) – 0,5 мг/л и нафтилуксусной кислоты (НОК) – 0,5 мг/л; МС + 0,25 мг/л с различными сублетальными концентрациями полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Индукцированный каллус получали после 2-3 недель культивирования при рассеянном свете и температуре +24-26°C. суспензионную культуру выращивали на протяжении четырёх дней в темноте в жидкой питательной среде (2-4 г каллусной ткани в 60 мл среды) при постоянном перемешивании на шейкере (90-110 об./мин) и температуре 25-27°C.

Для получения устойчивых к ПЭГ клеток озимого рапса суспензионную культуру в логарифмической фазе роста высевали на агаризованную среду с разными концентрациями ПЭГ. После инкубации подсчитывали колонии размером более 1 мм в диаметре. Массу каллусной ткани в процессе культивирования определяли по методу Кучеренко. В процессе органогенеза экспериментальный материал выращивали при 16-часовым фотопериодом при постоянной температуре +25±1°C. Правильно сформированные микророзетки подсчитывали через 4-8 недель после начала эксперимента. Математически результаты обрабатывали по Г.Ф. Лакину.

Таким образом, с помощью методов клеточной селекции получено четыре засухоустойчивые каллусные линии озимого рапса сорта «Антария» и две каллусные линии сорта «Алиот». При этом каллусные линии полученные из эксплантов сорта «Антария» более устойчивые к засухе, чем каллусные линии сорта «Алиот». Из резистентных каллусных линий регенерировали растения с хорошо развитой корневой системой.



## ОСОБЕННОСТИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА *HYPERICUM PERFORATUM* L. И *HYPERICUM MACULATUM* Crantz. *IN VITRO*

Коваль О. С.<sup>1</sup>, Дробык Н. М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского, Украина, Тернополь, 46000, майдан Воли, 1, тел. +38(0352)51-45-89, e-mail: koval\_o\_s@mail.ru

<sup>2</sup>Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка, Украина, Тернополь, 46027, ул. М. Кривоноса, 2, тел. +38(0352)43-61-29, e-mail: drobyk.n@gmail.com

Растения семейства *Hypericaceae* широко используются в прикладной медицине как продуценты биологически активных веществ. Надземная часть *Hypericum perforatum* L. и *Hypericum maculatum* Crantz. содержит флавоноиды (рутин, гиперозид), нафтодиантроны (гиперин, псевдогиперин), флороглюцины (гиперфорин), дубильные вещества, эфирное масло и др. Преимуществом применения биотехнологических методов является не только получение экологически чистого растительного сырья, но и возможность регуляции синтеза вторичных метаболитов в культуре *in vitro*.

Целью работы было изучение особенностей каллусогенеза и получение каллусных тканей *H. perforatum* и *H. maculatum* *in vitro*.

В эксперименте использовали асептические растения *H. perforatum* и *H. maculatum*, полученные из семян. Для индукции каллусообразования тестировали питательную среду Мурашиге, Скуга с половинным содержанием макро- и микросолей (МС/2), дополненную 0,1–2,0 мг/л бензиламинопурина (БАП), а также ауксинами – 0,05–1,0 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) или 0,5–1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д). Для получения каллусной ткани использовали листовые (площадь 0,16–0,25 см<sup>2</sup>), стеблевые и корневые (длиной 5-6 мм) экспланты асептических растений обоих исследуемых видов. Процент каллусообразования (ПК) оценивали через три недели.

Установлено, что питательные среды, дополненные БАП и разными ауксинами, отличались за способностью индуцировать каллусогенез. Присутствие этих регуляторов роста, кроме каллусогенеза, почти во всех случаях стимулировало побегообразование. Дополнение среды 0,1 мг/л БАП и 0,05 мг/л ИУК в наибольшей мере обеспечивало формирование каллуса. При этом существенных различий между способностью к дедифференциации разных типов эксплантов обоих видов не обнаружено. ПК во всех изученных вариантах составлял 100 %. Увеличение концентрации БАП (до 1,0–2 мг/л) существенно не влияло на образование каллуса с разных типов эксплантов *H. perforatum*, однако оказывало ингибирующее влияние на каллусогенез *H. maculatum*.

На средах с добавлением ИУК, кроме каллусогенеза, наблюдали интенсивный гемогенез на всех тестируемых эксплантах. Увеличении концентрации ИУК в питательной среде с 0,05 мг/л до 0,5 мг/л по-разному влияло на регенерацию побегов: способствовало повышению эффективности гемогенеза у *H. perforatum* (среднее количество побегов на эксплант увеличивалось до 5,5-10,7) и снижало регенерационную способность *H. maculatum* (среднее количество побегов на эксплант уменьшалось до 0,1-0,8). Замена в питательной среде ауксина ИУК на 2,4-Д (1,0 мг/л) также стимулировала образование каллуса. При этом, каллусная ткань более активно образовывалась на листовых и стеблевых эксплантах – 100%, а на корневых ПК был ниже и составлял 90% (*H. perforatum*) и 75% (*H. maculatum*). Снижение концентрации 2,4-Д до 0,5 мг/л способствовало не только каллусообразованию со всех типов эксплантов *H. perforatum*, но и незначительному гемогенезу (0,3–0,8 побег/эксплант). Формирование каллуса с эксплантов *H. maculatum* на этой среде не происходило.

Таким образом, нами изучено влияние регуляторов роста БАП, ИУК и 2,4-Д на формирование каллуса с разных типов эксплантов растений *H. perforatum* и *H. maculatum*. Получены пролиферативно активные каллусные культуры стеблевого, корневого и листового происхождения растений этих видов. Установлено, что дополнение питательной среды, содержащей цитокинин БАП, ауксинами ИУК или 2,4-Д, кроме процесса каллусообразования, индуцировало регенерацию побегов.

**PECULIARITIES OF *HYPERICUM PERFORATUM* L. AND *HYPERICUM MACULATUM* CRANTZ. CALLUS FORMATION IN VITRO****Koval O. S.,<sup>1</sup> Drobyk N.M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ukraine, Ternopil, 46000, Will maidan, 1 tel. +38 (035 2) 51-45-89, e-mail: koval\_o\_s@mail.ru

<sup>2</sup>Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine, Ternopil, 46027, M. Kryvonis str., 2, tel. +38 (0352) 43-61-29, e-mail: drobyk.n@gmail.com

Plants of the *Hypericaceae* family are widely used in applied medicine as producers of biologically active substances. The aerial parts of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum maculatum* Crantz contain flavonoids (rutin, hyperoside), naphthodianthrones (hypericin, pseudohypericin), phloroglucinol (hyperforin, adhyperforin), tannins, essential oils etc. The advantage of using biotechnological methods is not only in producing ecologically pure vegetable raw materials, but also in a possibility of regulating the synthesis of secondary metabolites in the culture in vitro.

The objective was to study the features of callus formation and obtaining *H. perforatum* and *H. maculatum* callus in vitro.

Axenic *H. perforatum* and *H. maculatum* plants, obtained from the seeds, were used in the experiment. For the induction of callus formation we tested Murashige and Skoog nutrient medium with twice decreased macro- and micro-salts concentrations (MS/2) supplemented with 0.1-2.0 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP), and auxins – 0.05-1.0 mg/l indoleacetic acid (IAA) or 0.5-1.0 mg /l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). To obtain callus tissue we used leaf (with the area of 0.16-0.25 cm<sup>2</sup>), stem and root (with the length of 5-6 mm) explants of axenic plants of both investigated species. The percentage of callus formation (PC) was estimated after three weeks' period.

It was established that the nutrient media supplemented with BAP and various auxins differed by the ability to induce callus formation. Almost in all cases the presence of these growth regulators, alongside with callusogenesis, stimulated the formation of shoots. The supplementation of the medium with 0.1 mg /l of BAP and 0.05 mg /l of IAA greatly ensured the callus formation. At the same time, no significant distinctions between the ability for dedifferentiation of different types of explants of both species were discovered. PC in all the studied cases was 100%. Though increased concentrations of BAP (up to 1.0-2 mg/l) had no significant influence on callus formation from different types of *H. perforatum* explants, however, had an inhibitory effect on *H. maculatum* callus formation.

On the media supplemented with IAA, alongside with callusogenesis, intense shoot formation on all tested explants was observed. The IAA concentration increase from 0.05 mg/l to 0.5 mg/l in the nutrient medium had different effects on the regeneration of shoots: it improved the efficiency of *H. perforatum* shoot production (the average number of shoots per explant increased to 5,5-10,7) and reduced *H. maculatum* regenerative capacity (an average number of sprouts per explant was reduced to 0.1-0.8). The replacement of IAA auxin for 2,4-D (1.0 mg/l) in the nutrient medium also stimulated callus formation. At the same time, callus tissue was actively formed on the leaf and stem explants – 100%, and on the root explants PC was lower and equalled 90% (*H. perforatum*) and 75% (*H. maculatum*). The reduction of 2,4-D concentration to 0.5 mg/l promoted not only callus formation from all types of *H. perforatum* explants, but also insignificant shoot formation (0.3-0.8 shoot/explant). There was no formation of callus from *H. maculatum* explants on this medium.

Thus, we have studied the effect of growth regulators BAP, IAA and 2,4-D on the callus formation from different types of *H. perforatum* and *H. maculatum* explants. Proliferatively active callus cultures of stem, root and leaf origin of these species have been obtained. It has been determined that the supplementation of nutrient medium containing BAP cytokinin and IAA or 2,4-D auxins, alongside with callus formation, induces shoot regeneration.

## ИНИЦИАЦИЯ АСЕПТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР СПОНТАННЫХ ГИБРИДОВ БЕРЕЗЫ (*BETULA PUBESCENS* ENRH × *BETULA PENDULA* ROTH) ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛОНОВ ФОРМ С ИЗМЕНЕННОЙ ПЛОИДНОСТЬЮ

**Константинов А.В., Кулагин Д.В., Богинская Л.А.**

Государственное научное учреждение Институт леса НАН Беларуси, Гомель, 246001, ул. Пролетарская, 71, тел/факс: (0232) 74-73-73, e-mail: [avkonstantinof@mail.ru](mailto:avkonstantinof@mail.ru)

Полиплоидные растения представляют особый интерес для селекции, что связано с рядом их морфофизиологических особенностей (быстрый рост, крупные размеры и высокая продуктивность). Традиционные селекционные подходы к полиплоидии древесных видов имеют ряд ограничений обусловленных длительностью их жизненного цикла и сложностью отбора по различным признакам. В то же время использование методов лесной биотехнологии позволяет интенсифицировать работу в данном направлении за счет скорости проведения анализов и получения большого количества материала для скрещивания. Среди древесных растений перспективной является работа с представителями рода *Betula* sp., характеризующимися возможностью получения потомства с различной ploидностью вследствие межвидовой гибридизации.

В связи с вышесказанным, целью нашей работы было получение клонов березы с разным уровнем ploидности в результате введения в культуру тканей гибридного потомства от свободного скрещивания березы пушистой и повислой.

Семенной материал березы, собранный в июле 2012 года с березы пушистой хранили в стеклянной таре в течение шести месяцев при температуре 5°C. Семена высевали в смесь торфа и песка (3:1) в январе 2013 г. в лабораторных условиях. Материалом для введения в культуру служили одноузловые фрагменты 1-2 месячных сеянцев. Стерилизацию эксплантов проводили 10% перекисью водорода (2 мин.), 70% этиловым спиртом и сулемой (1 мин. и 3 мин. соответственно). Экспланты переносили в культуральные пробирки на среду для древесных растений WPM без добавления регуляторов роста. Длительность пассажа составляла 4-6 недель, после чего полученные стерильные побеги разделяли на 4-5 одноузловых эксплантов и субкультивировали на свежие питательные среды аналогичного состава для мультипликации, одновременно отбирая материал (фрагменты побегов с листьями) с целью проведения генетического анализа. С материнского дерева также отбирали материал (почки) для анализа. Общее количество образцов составило 22 шт.

Молекулярно-генетический анализ исследуемого материала березы состоял из следующих этапов: выделения суммарной ДНК из растительных тканей СТАВ-методом; видовой идентификации на основании секвенирования фрагментов 2-6 экзонов гена *Adh*; определения ploидности путем анализа полиморфных локусов пяти SSR-маркеров – L2.2, L5.5, L7.8, L10.1, L52. Среди проанализированных образцов выявлено 5 тетраплоидных и 2 диплоидные формы, большинство (15 шт.) клонов являлось триплоидными, один из которых по изученным локусам определен как вероятный миксоплоид. После 1 месяца культивирования сравнили биометрические показатели полученных клонов с клонами березы пушистой и повислой. Культуры *in vitro* гибридных растений характеризовались специфическими морфологическими признаками, в большинстве случаев соотносящимися с показателем ploидности и превосходящими показатели модельных клонов березы пушистой и повислой. Так триплоидные растения березы отличались наибольшими показателями средней длины побега:  $61,0 \pm 9,9$  мм и превышали показатели растений березы пушистой ( $24,0 \pm 5,3$  мм) и повислой ( $22,6 \pm 15,8$  мм) в 2,5-2,7 раза. Кроме того они формировали в среднем  $1,7 \pm 0,6$ - $3,6 \pm 1,6$  боковых побегов на регенерант, в то время как растения модельных клонов их практически не образовывали. В результате нами был выделен ряд клонов гибридных форм березы, различающихся как по уровню ploидности, так и по характеру роста в культуре тканей. Отобраны триплоидные формы для дальнейшего анализа по различным селекционным критериям

**INITIATION OF ASEPTIC CULTURES OF SPONTANEOUS HYBRIDS OF BIRCH (*BETULA PUBESCENS* EHRH × *BETULA PENDULA* ROTH) TO PRODUCE CLONAL FORMS WITH ALTERED PLOIDY**

**Konstantinov A.V., Kulagin D.V., Boginskaya L.A.**

Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, BY-246001, Proletarskaya str. 71, Tel/Fax: (0232) 74-73-73, Belarus, e-mail: [avkonstantinof@mail.ru](mailto:avkonstantinof@mail.ru)

Polyloid plants are of special interest for breeding, due to the presence of a number of morphophysiological traits (rapid growth, large size and high productivity). Traditional approaches to the use of polyploidy for tree species breeding have limitations due to the duration of the woody plants life cycle and the complexity of selection for traits. At the same time, the utilization of forest biotechnology methods allows to intensify work in this direction due to the acceleration of analysis and obtaining a large amount of material for the crossing. Breeding work with the members of the genus *Betula* sp. is promising because of their different ploidy levels and the ability to produce offspring with various chromosome sets as a result of interspecific hybridization.

In view of the above, the purpose of our work was to obtain birch *in vitro* clones with different levels of ploidy as a result of hybrid offspring of white birch and silver birch culture initiation.

Birch seeds collected in July 2012 stored in a glass container for six months at temperature of 5°C. The seeds were sown in a mixture of peat and sand (3:1) in January 2013. Seedlings were grown in the climate chamber conditions. Single-node fragments from 1-2 month old birch plants were used for the initiation of tissue culture. Sterilization was carried by explant treatment with 10% hydrogen peroxide for 2 min, 70% ethanol for 1 min and mercuric chloride for 3 min. The explants were placed individually into culture tubes containing medium WPM without addition of growth regulators. The first passage duration was 4-6 weeks. Shoots obtained were divided into 4-5 single-node explants and subcultured to fresh culture medium of similar composition. Simultaneously the material for genetic analysis (fragments of shoots and leaves from *in vitro* culture and from maternal tree) were collected. The total number of samples was 22. Molecular genetic analysis of birch material consisted of the following stages: isolation of total DNA from plant tissue by means of CTAB-method; species identification based on sequencing of exons 2-6 of the *Adh* gene; determination of ploidy through analysis of polymorphic loci of five SSR-markers (L2.2, L5.5, L7.8, L10.1, L52).

Five tetraploid and two diploid forms were revealed among the analyzed samples. The majority of clonal forms (15) had triploid set of chromosomes. One of triploids in accordance with the loci studied demonstrated signs of a mixoploid.

The comparison of biometrics between *in vitro* shoots of newly obtained clones, white birch and silver birch clones were performed after one month. *In vitro* clones of hybrid plants were characterized by specific morphological features, in most cases correlated with the level of ploidy, and exceeded indexes of model clones of white and silver birches. Since, triploid shoots possessed the highest value of average length ( $61,0 \pm 9,9$  mm versus  $24,0 \pm 5,3$  mm in silver birch and  $22,6 \pm 15,8$  mm in white birch). In addition, hybrid plants formed on the average from  $3,6 \pm 1,6$  to  $1,7 \pm 0,6$  suckers per shoot. While model clones didn't demonstrate such feature. As a result of our research a number of hybrid clones of birch, differing both in the level of ploidy, and the growth characteristics in tissue culture were highlighted.

Thus, the research led to select triploid forms that could possible be characterized by various valuable traits (growth rate, resistance to pathogens and pests, etc.).

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
АНТИТЕРАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ БИОМАССЫ *POLYSCIAS  
FILICIFOLIA* («ВИТАГМАЛА»), ПОЛУЧАЕМОЙ МЕТОДАМИ КУЛЬТУРЫ  
КЛЕТОК: ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

**Котин А.М.**

(ООО «БИОФАРМОС»)

Обзор эффективности использования экстрактов *Polyscias* в период беременности для предотвращения различной патологии, связанной с тератогенными рисками: от этноботанических данных до результатов современных исследований. Приведены экспериментальные и клинические данные о предотвращении последствий для потомства, экстрактами биотехнологического полисциас таких распространенных тератогенноактивных воздействий как алкоголь, железодефицитная анемия, грипп, промышленные вредности и др. Дается представление о тератологии (тератогеномике) поведения и эмбриональной детерминации заболеваний взрослого организма. На примере собственных данных об увеличении предрасположенности к потреблению алкоголя у потомства после разнородных воздействий в период активного органогенеза и возможности ее предотвращения и/или купирования. Рассматриваются некоторые биохимические механизмы антитератогенного действия экстрактов полисциас и связанные с ними перспективы направленной модификации способов биотехнологического наращивания и клеточной инженерии различных растений для оптимизации свойств растительных антитератогенных средств, препятствующих росту числа заболеваний и их трансгенерационной передаче в современном обществе.

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ЦИТОКИНИНОВ НА  
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ СИРЕНИ СОРТА «ВЕЛИКАЯ ПОБЕДА».****Креницына А.А., Чурикова О.А.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова", Москва, 119234, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, тел. (495) 939-40-83, e-mail: krinitsina@mail.ru

Различные виды и сорта сирени с давних пор широко используются в декоративном садоводстве. Для сохранения декоративных свойств сорта сирени размножают только вегетативным путем: прививкой, черенкованием, отводками или корневыми отпрысками, причем последнее возможно только в случае корнесобственных растений. Применение биотехнологических методов позволяет получить большое количество качественного корнесобственного посадочного материала. Как известно, на успешное размножение путем черенкования микропобегов влияют, прежде всего, генетические особенности сорта, тип используемых фитогормонов и концентрации веществ в питательной среде. Наибольшей популярностью при размножении сирени в культуре *in vitro* пользуются цитокинины 6-бензиламинопурин (6-БАП) и 2-изопентиладенин (2-иР). Наряду с ними применяется и тидизаурон (TDZ), низкие концентрации которого стимулируют развитие пазушных почек. У некоторых сортов интенсивное развитие почек наблюдается при увеличении концентрации макросолей в питательной среде в 1,5 раза. Наибольший эффект при размножении ряда сортов был получен при использовании TDZ (0,1 мг/л) в сочетании с 1,5 концентрацией макросолей. Для оптимизации размножения сирени были опробованы сочетания TDZ (0,1 мг/л) и 2-иР (1,5 мг/л) с повышенной концентрацией макросолей в питательной среде MS. В качестве исходного материала были взяты побеги сирени сорта «Великая победа», культивируемого *in vitro* с 2011 года на среде MS с добавлением 2-иР (1,5 мг/л) и 20 г/л сахарозы. Для черенкования выбирали побеги с 4-5 хорошо развитыми междоузлиями. Черенки, состоящие из одного узла с парой листьев и небольшим участком побега, помещали на питательную среду MS с 1,5 концентрацией макросолей с добавлением 1,5 мг/л 2-иР или 0,1 мг/л TDZ. Культивирование проводили при стандартном фотопериоде (16 часов день/ 8 часов ночь), температуре 22-23°C в течение 19 дней. Для характеристики ростовых процессов определяли число развившихся из пазушных почек побегов и их длину.

В результате, при применении TDZ в сочетании с повышенной концентрацией макросолей индукция развития обеих пазушных почек наблюдается чаще, по сравнению с использованием 2-иР. В то же время, на среде с TDZ в 38% случаев пазушные почки вообще не развивались. Наблюдалось доминирование одного из двух пазушных побегов. Однако, в целом, наибольшее число формирующихся побегов было получено на среде MS (1,5 макро)+2-иР. Различий же по длине между наиболее развитыми и только трогающимися в рост побегами на обоих типах сред обнаружено не было.

Таким образом, для сорта сирени «Великая победа» при микрочеренковании для индукции развития пазушных почек предпочтительнее применять среду MS с 1,5 концентрацией макросолей и 2-иР (1,5 мг/л).

**THE INFLUENCE OF DIFFERENT TYPES OF CYTOKININES ON THE MICROPROPAGATION OF LILAC CV. "VELIKAYA POBIEDA".****Krinitcina A.A., Churikova O.A.**

Federal State Educational Institution of Higher Professional Education M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Russia, Moscow, 119234, 1-12 Leninskie Gory phone. (495) 939-40-83, e-mail: [krinitcina@mail.ru](mailto:krinitcina@mail.ru)

The different species and cultivars of lilac are widely applied in the ornamental gardening. For the save of the ornamental features the lilac cultivars are propagated only by vegetative way: by grafting, by cuttings, by rootstocks, while the latter is possible only for the own-rooted plants. The application of biotechnological methods make it possible to get the great number of high-quality own-rooted plant material. It's known that genetic peculiarities of cultivars, at first of all, have the affect on the successful propagation of microshoots by the cuttings as well as the type of using phytohormones and concentration of substances in the culture medium. The most popular cytokinines while lilac propagation *in vitro* are 6-benzylaminopurine (6-BAP) and 2-isopenthyladenine (2-iP). At the same time thidiazuron (TDZ) also is used, it's low concentrations stimulate the axillary buds development. At some cultivars the intense bud development is occurred while increasing of macrosalts concentrations in the culture medium half as much again. The greatest effect while propagation of some lilac cultivars was turned out when TDZ (0,1 mg/l) in combination with one and a half macrosalts concentration was used. In order to improve the lilac propagation we try the combinations of TDZ (0,1 mg/l) and 2-iP (1,5 mg/l) with the increased macrosalts concentration in MS culture medium. The shoots of lilac cv. "Velikaya Pobieda" were used as the initial material. They have been cultured *in vitro* since 2011 on MS culture medium supplemented with 2-iP (1,5 mg/l) and 20 g/l sucrose. For the cuttings the shoots with 4-5 well developed internodes were chosen. The cuttings (one node with couple of leaves and a little part of shoot) were placed to MS culture medium with one and a half concentration of macrosalts and 1,5 mg/l 2-iP or 0,1 mg/l TDZ as well. The cultivation was carried out at standard conditions (photoperiod 16h day/ 8h night, 22-23°C during 19 days. For the description of growth patterns the number of axillar shoots and their length were observed. So, while using TDZ with the combination of increased macrosalts concentration the induction of both axillar buds development was more often by comparison with the 2-iP application. At the same time, in 38% cases the axillar buds didn't develop on the MS culture medium with TDZ. We observed the predominant development of one axillar shoot over the other. Nevertheless, at whole, the most number of developing shoots were turned out on MS culture medium (1,5 macro) + 2- iP. The differences in the length between the most developed shoots and shoots at an early stage of its development weren't found. So, the MS culture medium with one and a half macrosalts concentration is preferable for the induction of axillar buds development during lilac cv. "Velikaya Pobieda" microcutting.

**ПРЕДПОСЫЛКИ РЕАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ  
ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ ШЛЕМНИКА В МЕДИЦИНСКОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

**Кузовкина И.Н.<sup>1</sup>, Гусева А.В.<sup>1</sup>, Прокофьева М.Ю.<sup>1</sup>, Умралина А.Р.<sup>2</sup>, Чернышева Т.П.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва 127276, Ботаническая ул. 35, факс:(499)977 80 18; тел.(499)977 92 11; e-mail: [ikuz@mail.ru](mailto:ikuz@mail.ru); <sup>2</sup>Институт биотехнологии НАН КР, Бишкек 720071, пр. Чуй 265; тел.: (312) 64 63 31; e-mail:[umralina@gmail.com](mailto:umralina@gmail.com)

Бурное развитие и совершенствование метода генетической трансформации растений с помощью *Agrobacterium rhizogenes*, наблюдавшееся в течение последних десяти лет, существенно приблизило вероятность практического использования результатов культивирования в условиях *in vitro* изолированно растущих корней (hairy roots) растений в медицинской промышленности. Это связано с тем, что для hairy roots характерны такие ценные свойства, как генетическая стабильность и способность быстро расти на безгормональных питательных средах, а также с тем, что в них возможно проявление некоторых вариаций в количественном составе вторичных метаболитов. Изменение количественного соотношения вторичных соединений в hairy roots может оказаться весьма полезным свойством, что экспериментально доказано нами на примере длительно растущих в условиях *in vitro* корней растений шлемника двух видов – *Scutellaria baicalensis* Georgi и *Sc. andrachnoides* Vved ex Juz. Результаты ВЭЖХ показали, что спиртовые экстракты культивируемых *in vitro* корней шлемников содержат основные флавоны, характерные для корней целых растений, которые обладают высокой физиологической активностью. Это байкалеин, вогонин и соответствующие им глюкурониды байкалин и вогонозид. Содержание суммы флавонов в hairy roots несколько ниже их содержания в корнях интактных растений, но этот недостаток компенсируется быстрым и интенсивным ростом культивируемых *in vitro* корней, которые не имеют вторичного утолщения, так же, как и корни ювенильных растений. Результаты анализа показали, что в hairy roots обоих видов шлемников наблюдается несколько иное количественное соотношение основных флавонов, чем в корнях целых дифференцированных растений. В них доминирующими флавонами являются не байкалин и байкалеин, как в корнях интактных растений, а вогонозид и вогонин, которые до недавних пор считались не столь важной физиологически активной группой флавонов и рассматривались в основном как адъютанты первой группы соединений. Однако в 2007 году было установлено, что вогонин, содержание которого в корнях целых растений не превышает 0,3%, обладает четко выраженной селективной цитотоксической активностью и вызывает апоптоз исключительно онкогенных клеток, не затрагивая при этом обычные клетки. Тестирование экстрактов hairy roots шлемника байкальского, проведенное в Институте фармакологии ТНЦ СО РАМН, показало, что они по своей физиологической активности сопоставимы с корнями целых растений, и по ряду показателей даже опережают их. Апробация выращивания hairy roots шлемника в биореакторе швейцарской фирмы ROOTec доказала вероятность и перспективность крупно масштабного культивирования корней шлемника, сохраняющих преимущественное содержание флавонов группы вогонина. Это дает возможность рассматривать изолированно растущие корни двух видов шлемников как альтернативное и при этом экологически чистое лекарственное сырье, которое в состоянии компенсировать полное отсутствие естественного растительного сырья, получаемого от исчезающих и эндемичных растений. Работа выполнена при поддержке Швейцарского фонда научных исследований (грант № IZ7320\_1/27969) и фонда Александра фон Гумбольдта (И.К.)



**BACKGROUND FOR REAL USING OF GENETICALLY TRANSFORMED  
SKULLCAP ROOTS IN THE MEDICAL INDUSTRY****Kuzovkina I.N.<sup>1</sup>, Guseva A.V.<sup>2</sup>, Prokofieva M.Yu.<sup>1</sup>, Umralina A.R.<sup>3</sup>, Chernyshova N.P.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Plant Physiology of RAS, Moscow 127275, Botanicheskaya ul. 35; fax: (499) 977 80 18; tel.: (499) 977 92 11; e-mail: ikuz@mail.ru ; <sup>2</sup>Agricultural Institute of NSAU, Tomsk 634009, K.Marksa str. 19, tel.: (3822)51 72 99; e-mail: woodword@mail.ru; <sup>3</sup>Institute of Biotechnology of NAS of KR, Bishkek 720071, pr. Chui 265; tel.: (312) 64 63 31; e-mail: umralina@gmail.com

Vigorous development and improvement of methods plant genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*, observed over the last decade, significantly make closer the probability of practical using the results of in vitro cultivation isolated growing roots (hairy roots) of plants in the medical industry. This is related to the fact that the hairy roots are characterized by such valuable properties as genetic stability and the ability to grow rapidly on hormon-free nutrient media, as well as opportunity to display some variation in the quantitative composition of secondary metabolites. The change of quantitative ratio secondary compounds in the hairy roots can be a very useful property that has been experimentally proved on the example of our long-term growing in vitro roots of two skullcap species - *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Sc. andrachnoides* Vved ex Juz. Results of HPLC showed that alcoholic extracts of cultured in vitro skullcap roots contain the same main flavones as roots of whole plants that possess high physiological activity. These flavones are baicalein, wogonin and theirs glucuronides baicalin and wogonoside. The level of total flavones in the hairy roots is slightly lower than in the roots of intact plants, but this disadvantage is compensated by rapid and intensive growth cultured in vitro roots which have no secondary thickening, as well as the roots of juvenile plants. The results of our work have been showed that in hairy root cultures of both skullcap species exhibits several other ratios of major flavones than in roots of whole differentiated plants. The dominant flavones in hairy roots are wogonoside and wogonin instead of baicalin and baicalein in the roots of intact plants. Until recently wogonoside and wogonin were considered less important physiologically active group of flavones and viewed largely as a concomitants compounds of baicalin and baicalein. But in 2007 it was found that wogonin, the content of which in the roots of whole plants does not exceed 0.3%, has a clearly expressed selective cytotoxic activity and induce apoptosis exclusively malignant cells without affecting the normal cells. Testing of *Scutellaria baicalensis* hairy roots extracts in the Institute of Pharmacology, Tomsk Scientific Center, Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, showed that their physiological activity was comparable with the same of whole plant roots, and a number of indicators, even ahead of them. Preliminary cultivation of skullcap hairy roots in bioreactor of Swiss commercially company (ROOTec) demonstrated the credibility and prospects of large-scale cultivation of skullcap roots preserving preferential content of wogonin. This fact makes it possible to consider isolated growing roots of the two skullcap species as alternative and ecologically pure medicinal raw material, which is able to compensate the absence of natural plant material derived from endangered and endemic plants.

This work was supported by the Swiss Foundation for Scientific Research (grant # IZ73Z01/27969) and the Alexander von Humboldt Foundation (IK)

## ПРОБЛЕМА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК ЛЬНА ДЕКОРАТИВНОГО Литвинова И.И., Гладков Е.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН; 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, тел. 8 (499) 231-83-34, e-mail: [ilina-15@ya.ru](mailto:ilina-15@ya.ru)

Лен декоративный – однолетние и двулетние красивоцветущие растения, используемые в декоративном садоводстве: озеленении садовых участков, клумб, мавританских газонов, а так же выращивается на срезку. В отличие от льна обыкновенного, широко используемого в сельском хозяйстве и промышленности, лен крупноцветковый имеет более крупные цветки.

Работ по введению в культуру клеток декоративного льна нет.

Вводили в культуру клеток: лен крупноцветковый (*Linum grandiflorum L.*) сорт Голубой, сорт Рубрум, сорт Шарм и лен многолетний (*Linum perenne L.*) сорт Синий Шелк.

В качестве эксплантов использовали семена растений, предварительно стерилизованные раствором содержащим гипохлорит натрия (0,5% активного хлора) в течение 15-20 минут (в зависимости от растения). Оптимальное время стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и зараженности.

Семена высаживали на модифицированные агаризованные питательные среды Мурасиге-Скуга (МС) и Гамборга (В5) с содержанием 2,4-Д, кинетина, БАП, НУК, ИУК. Наибольшее каллусообразование было на среде с добавлением 2,4-Д. При сочетании БАП и НУК, БАП и ИУК процент образования каллусов был ниже 20% у всех сортов льна декоративного. Наибольшее количество каллусов образовывалось на средах В5, с высоким содержанием регуляторов роста в среде.

Оптимальными концентрациями для каллусообразования были выбраны среды В5 с содержанием 2 мг/л (29,4%) и 4 мг/л (56,4%) 2,4-Д. При данных концентрациях, количество морфогенных каллусов было больше, чем при 6 и 8 мг/л 2,4-Д, что, видимо, обусловлено блокированием процесса регенерации при увеличении содержания 2,4-Д в питательной среде. Работа со льном декоративным оказалась очень сложной, на стадии регенерации и укоренения возникли трудности по подбору питательной среды и фитогормонов. Литературные данные по питательным средам для регенерации и укоренения льна-долгунца и льна масличного оказались малоэффективными для льна декоративного. Введение аминокислот и увеличение концентрации некоторых микроэлементов не позволило повысить частоту регенерации льна. Поэтому, для регенерации всех исследуемых видов растений нами было рассмотрено сочетание НУК (0,1-1 мг/л) и БАП (1-2 мг/л). Наибольший процент образования регенерантов льна крупноцветкового наблюдали на среде В5 с 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК (65,2%). Для льна декоративного, так же как и у льна-долгунца чрезвычайно трудоемким оказался процесс укоренения регенерантов. Регенеранты с корневой системой удалось получить на жидкой питательной среде МС с половинным содержанием всех минеральных компонентов и добавлением 0,1 мг/л НУК. Данная схема введения в культуру клеток, регенерации и укоренения позволило в дальнейшем получить растения-регенеранты, которые затем были высажены в почву.

Таким образом, нами разработана технология введения в культуру клеток и регенерации льна крупноцветкового и льна многолетнего.

**INTRODUCTION PROBLEMS INTO THE CELL CULTURE OF *LINUM GRANDIFLORUM L.* AND *LINUM PERENNE L.*****Litvinova I.I., Gladkov E.A.**

Institute of Plant Physiology. K.A. Timirjazeva RAS, 127276, Moscow, Botanichiskay str, 35, 8 (499) 231-83-34, e-mail: [ilina-15@ya.ru](mailto:ilina-15@ya.ru)

Decorative flax – annual and perennial flowering plants. This plants used in ornamental horticulture: landscaping of gardens, flower beds, in lawns, and also grown for cut flower production. Unlike *Linum usitatissimum*L., which used widely in agriculture and industry, decorative flax has larger flowers. There are not any works by introducing into the cell culture decorative flax.

Was injected into the cell culture: *Linum grandiflorum L.* sort Blue, Rubrum, Charm and *Linum perenne L.* sort Blue Silk.

Seeds of *Linum grandiflorum L.* and *Linum perenne L.* were surface sterilized with solution containing sodium hypochlorite (0.5% active chlorine) for 15-20 minutes (depending on the plant).

The explants were cultured on basal Murashige-Skoog (MS) and Gamborg (B5) medium containing different combinations of 2,4-D, kinetin, BAP, NAA, IAA. With the combination of BAP and NAA, BAP and IAA callus formation was below 20% for all sorts of flax. Most callus formed on the B5 medium.

Optimal concentrations were B5 medium with 2 mg/l (29.4%) and 4 mg/l (56.4%) of 2,4-D. At these concentrations of morphogenic callus was greater than the medium with 6 and 8 mg/l 2,4-D, which is apparently caused by blocking the regeneration by increasing the content of 2,4-D in the medium. Working with decorative flax was very difficult. Published data on the medium for regeneration and rooting of *Linum usitatissimum L.* were ineffective for decorative flax. For regeneration it was used the MS medium with combination of NAA (0.1-1 mg/liter) and BAP (1-2 mg/l). The highest percentage of regenerants *Linum grandiflorum L.* was observed on B5 medium with 1 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA (65.2%). Regenerants with good root system unable to obtain a liquid MS medium with half the content of mineral components and adding 0.1 mg/l NAA. This dosing regimen in cell culture and regeneration rooting further possible to obtain regenerants were then planted in the soil. Thus we have developed a technology introduction into the cell culture and regeneration of *Linum grandiflorum L.* and *Linum perenne L.*

**ПОЛУЧЕНИЕ ХРИЗАНТЕМЫ КИЛЕВАТОЙ (*CHRYSANTHEMUM CARINATUM L.*) УСТОЙЧИВОЙ К ИОНАМ МЕДИ****Литвинова И.И., Гладков Е.А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН; 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, тел. 8 (499) 231-83-34, e-mail: [ilina-15@ya.ru](mailto:ilina-15@ya.ru)

Хризантема килеватая (*Chrysanthemum carinatum L.*) — однолетнее растение, представитель семейства Сложноцветных (Астровых). Это высокодекоративное растение отличается большой продолжительностью цветения (с конца июня по сентябрь) и различной цветовой гаммой соцветий (диаметр 5-7 см). Хризантема килеватая в сочетании с другими красивоцветущими растениями играет важную роль в создании архитектурно-художественного облика города и в декоративном садоводстве. Однако хризантема килеватая обладает высокой чувствительностью к различным стрессовым факторам, в том числе к меди, что ограничивает её применение в городском озеленении. Для получения стресс-устойчивых растений необходимо ввести хризантему килеватую в культуру клеток, к сожалению, ранее это сделано не было.

Нами была разработана технология введения в культуру клеток и регенерации растений хризантемы килеватой. Затем, для разработки схемы клеточной селекции необходимо было оценить фитотоксичность ионов меди в условиях *in vitro* и определить селективную концентрацию. Полученные каллусы из семян хризантемы килеватой сортов Эльдorado и Радость культивировали на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением различных концентраций меди (10-100 мг/л, в перерасчете на чистый металл), в течение 2 пассажей по 30 суток. Каллусы хризантемы оказались очень чувствительны к действию этого металла. Ингибирующие действие меди проявлялось уже при относительно невысокой концентрации - 10 мг/л (процент выживших каллусов – 64,9% сорт Радость, 72,8% сорт Эльдorado, после первого пассажа). При концентрации меди 30 мг/л, значительная часть каллусов (76,4%) темнела и погибала через 14 суток, после второго пассажа.

В качестве селективной была выбрана концентрация меди 20 мг/л. При данной концентрации в первом пассаже выживало 63,8% каллусов, а после второго пассажа 36,1%, при этом часть каллусов сохраняли способность к морфогенезу.

Была выбрана следующая схема селекции, включающая в себя: получение каллуса из семян растения; короткий период культивирования на среде МС с медью 20 мг/л (3 пассажа по 14 -18 суток), затем регенерация и укоренение на средах без токсиканта: среда МС с добавлением 0,5 мг/л БАП и жидкая питательная среда ½МС с 0,1 мг/л НУК соответственно. Непродолжительное культивирование и использование прямой схемы клеточной селекции позволило получить нам растения-регенеранты и затем семена хризантемы килеватой.

---

**GETTING CHRYSANTHEMUM CARINATUM L. RESISTENT TO COOPER IONS**  
**Litvinova I.I., Gladkov E.A.**

Institute of Plant Physiology. K.A. Timirjazeva RAS, 127276, Moscow, Botanichiskay str, 35, 8  
(499) 231-83-34, e-mail: [ilina-15@ya.ru](mailto:ilina-15@ya.ru)

*Chrysanthemum carinatum* L. - an annual plant of the family Asteraceae. This is a highly decorative plant different long duration of flowering (from June till September) and different color spectrum. *Chrysanthemum carinatum* in combination with other flowering plants plays an important role planting of greenery in the city and in ornamental horticulture. However, *Chrysanthemum carinatum* is highly sensitive to various stress factors, including the copper, which limits its use in public green spaces. For stress-resistant plants must enter *Chrysanthemum carinatum* in cell culture, unfortunately, before it was made.

We have got cell culture and plant regeneration of *Chrysanthemum carinatum* L. Then, to develop cell selection scheme was necessary to assess the phytotoxicity of copper ions to cell and determination of selective concentration. Callus pieces of *Chrysanthemum carinatum* L. sort Radost and Eldorado were cultured on MS medium with different concentrations of copper (10-100 mg/l, based on the pure metal) for two passages to 30 days. Calluses of chrysanthemum were very sensitive to this metal. Inhibitory effect of copper was shown already at a low concentration - 10 mg/l (the survival rate of calluses - 64.9% sort Radost, 72.8% sort Eldorado). A considerable part of tissue darkened and died after 14 days on the copper concentration - 30 mg/l (76.4%), after second cultur. As selective copper concentration was selected 20 mg/l. At this concentration in the first culture callus survived 63.8% and after the second culture - 36.1%, with some ability to retain morphogenesis.

Scheme selection: obtaining callus from the seeds; short cultivation period on MS medium with copper 20 mg/l (3 culture for 14 -18 days), and then regeneration and rooting without cooper. Short cultivation and use of direct cell selection scheme has allowed us to get regenerated and then to get seeds of *Chrysanthemum carinatum* L.

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАЛАНХОЭ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

**Майсурия А.Н., Садирмекова К.Г., Овчинникова В.Н., Варламова Н.В., Харченко П.Н.**

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва, 127550, Тимирязевская, 42, +7 (499) 976-65-44, факс +7 (499) 977-09-47, e-mail: [maisuryan@yandex.ru](mailto:maisuryan@yandex.ru), [kurasiva15@mail.ru](mailto:kurasiva15@mail.ru)

Каланхоэ (*Kalanchoe daigremontianum*, сем. Толстянковых) широко известно как лекарственное, обладающее антисептическими и противовоспалительными свойствами растение. Сок каланхоэ используется также для лечения сосудистых заболеваний и в качестве обезболивающего средства. Особенно интересна способность этого растения быстро размножаться, образуя на материнском растении между зубчиками по краям листьев ряд многочисленных «деток» - растений с корнями и листьями. В условиях *in vitro* каланхоэ легко регенерирует из листового экспланта и минуя стадию каллуса (на среде, не содержащей 2,4-D) образует корни, листья и дочерние растения. Регенерация происходит по краю отреза листового сегмента и может осуществляться одновременно с размножением (образованием «деток» на сохранившемся у сегмента внешнем крае листа. Пересадка «деток» и регенерантов на свежую среду МС приводит к быстрому укоренению, нормальному росту и приобретению вида, присущего взрослому растению, или даже к скорому образованию нового вегетативного поколения. Такие поколения *in vitro* могут быстро следовать одно за другим даже в зимний период покоя, что не происходит в естественных условиях. Таким образом, популяция каланхоэ может быстро наращиваться, что является ценным свойством этой культуры как перспективного биотехнологического объекта, а также в качестве модели для изучения фундаментальных физиологических процессов. Возникновение нового вегетативного поколения у каланхоэ – это фактически создание клона, «самоклонирование» - во многих случаях удобный биотехнологический прием, позволяющий проверить, например, однородность клона или наличие трансформантов.

Каланхоэ при культивировании в жидкой среде легко наращивает популяцию, что позволяет рассчитывать на возможность использования этой культуры в качестве нового объекта биотехнологии, перспективного продуцента, обладающего рядом преимуществ и прежде всего: самостоятельный синтез углеводов и фитогормонов. Последнее свойство особенно ценно, т.к. отсутствие в среде экзогенных регуляторов роста придает дополнительную экологическую чистоту получаемому продукту.

**PHYSIOLOGICAL PECULIARITIES OF *IN VITRO* CULTURING OF KALANCHOE**  
**Maisuryan A.N., Sadirmekova K.G., Ovchinnikova V.N., Varlamova N.V.,**  
**Kharchenko P.N.**

All-Russian Research Institute on Agricultural Biotechnology of Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 127550, Timiryazevskaya str. 42, tel. +7 (499) 976-65-44, faks +7 (499) 977-09-47, e-mail: maisuryan@yandex.ru, kurasiva15@mail.ru

*Kalanchoe daigremontiana* (from the *Crassulaceae* family) is widely known as a medicine plant with antiseptic and anti-inflammation properties. Kalanchoe juice is used also for curing of blood-vessel diseases and as an anesthetic. The most interesting is the ability of kalanchoe plants to propagate quickly by producing many plantlets with roots and leaves on the edges of the mother plant's leaves. *In vitro* kalanchoe easily regenerates from a leaf explant, without a callus stage (on a medium without 2,4-D), and generates roots, leaves and daughter plants. The regeneration takes place on the cut edge of the leaf segment and can proceed simultaneously with propagation via plantlets. Transferring the plantlets and regenerants onto a fresh MS medium results a rapid rooting, normal growth and achieving the shape of a mature plant, or to a quick appearing of a new vegetative generation. Such *in vitro* generations can quickly follow each other even in the winter period of rest, unlike the natural life. This way, a population of kalanchoe can increase fast, that is an appreciable property of this culture as a promising biotechnological object, as well as a model for exploring fundamental physiological processes.

Appearing of a new vegetative generation of kalanchoe is in fact creating a clone ("self-cloning"), in many cases this is a convenient biotechnological means, that enables e.g. to check whether a population of clones is homogenic or contains transformants. Kalanchoe cultured in a liquid medium easily increases its population, allowing to rely on a possibility to use this culture as a new object of biotechnology, a promising producent having many advantages, e.g. independent synthesis of carbohydrates and phitohormones. The latter property is the most appreciable since the absence of exogenic growth-regulators in the medium makes the product we get more ecologically pure.

**СОДЕРЖАНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КЛЕТОЧНОЙ И ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ *HEDYSARUM THEINUM* KRASNOB.****Новикова Т.И.<sup>1</sup>, Кузовкова А.А.<sup>2</sup>, Эрст А.А.<sup>1</sup>, Банаев Е.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, 630090, ул. Золотодолинская, 101, факс: +7 (383) 334-44-33, тел.: +7 (383) 330-41-01, e-mail: [tjn27@mail.ru](mailto:tjn27@mail.ru)

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, 220012, ул. Сурганова, 2В, факс: +375-17-2840666, тел.: +375-17-2841461, e-mail: [floraia@nm.ru](mailto:floraia@nm.ru)

Культура тканей и клеток растений является потенциальной системой для продуцирования множества вторичных метаболитов, имеющих лекарственное значение. Однако следует указать, что в большинстве случаев биосинтез соединений в культуре *in vitro* протекает не так активно, как в исходных растениях. Используют несколько стратегий усиления продукции вторичных метаболитов – усовершенствование исходных сортов растений, отбор высокопродуктивных клеточных линий, оптимизация сред культивирования и, наконец, направленная регуляция биосинтеза в клеточных культурах растений желаемых соединений. Разработке последней стратегии мешает недостаточность фундаментальных знаний о биосинтетических циклах и механизмах продуцирования растительных метаболитов. Применение современных подходов к исследованию биологических процессов при переходе клеток растений от дифференцированного к дедифференцированному состоянию на основе сочетания протеомного и метаболомного анализов могут открыть пути прогнозирования уровней накопления ценных вторичных метаболитов и сделать возможным подбор веществ, позволяющих направленно регулировать накопление БАВ.

*Hedysarum theinum* (копеечник чайный, красный корень) обладает уникальным фитохимическим составом, что обуславливает широкий спектр его лекарственного действия: противовоспалительного, бактерицидного, спазмолитического, иммунопротекторного, антиоксидантного и др. В результате практики массовой заготовки сырья копеечник чайный находится на грани исчезновения, а чрезвычайно медленный рост делает этот вид особенно уязвимым. Ценные целебные свойства копеечника, ограниченность распространения и биологические особенности являются предпосылками для разработки биотехнологических приемов его культивирования.

Основная задача исследования - провести сравнительный анализ протеомного и метаболомного статуса дифференцированных тканей копеечника чайного из природных популяций и полученных *in vitro* растений, а также дедифференцированных (калусных) клеток, с целью идентифицировать ключевые белки, ответственные за биосинтез биологически активных веществ, и разработать подходы к направленной регуляции метаболизма данного лекарственного растения.

В настоящее время получены и адаптированы растения-регенеранты *H. theinum*, иницированы калусные культуры стеблевого и корневого происхождения. Проведен биохимический анализ различных типов эксплантов копеечника чайного из двух ценопопуляций.

Работа выполнена при поддержке проекта фундаментальных исследований НАН Беларуси и СО РАН (№ Гос. регистрации 01201282772).



**CONTENT OF SECONDARY METABOLITES IN CELL AND TISSUE CULTURE OF  
*HEDYSARUM THEINUM* KRASNOB.****Novikova T.I.<sup>1</sup>, Kuzovkova A.A.<sup>2</sup>, Erst A.A.<sup>1</sup>, Banaev E.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Federal State Institution of Science Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch RAS, Russia, Novosibirsk, 630090, Zolotodolinskaya st., 101, tel.: +7(383)330-41-01, fax: +7(383)334-44-33, e-mail: tin27@mail.ru

<sup>2</sup>State Scientific Institution Central Botanical Garden, NAN of Belarus, Belarus, Minsk, 220012, Surganov st., 2V, fax: +375-17-2840666, tel.: +375-17-2841461, e-mail: fioraia@nm.ru

Cell and tissue culture of plants is a potential system for producing a set of the secondary metabolites of medicinal value. However, it is worth noting that in most cases biosynthesis of compounds in culture *in vitro* proceeds not so actively, as in initial plants. Some strategies of strengthening production of secondary metabolites – improvement of initial plant cultivars, selection of highly productive cellular lines, optimization of cultivation media and, at last, directed regulation of biosynthesis in cell cultures of plants of desirable compounds are used. Insufficiency of fundamental knowledge of biosynthetic cycles and mechanisms of producing plant metabolites prevents development of the last strategy. The application of currently available approaches to study of biological processes at transition of plant cells from a differentiated to a dedifferentiated status on the basis of a combination of proteomic and metabolomic analyses may open ways of forecasting levels of accumulation of valuable secondary metabolites and make possible selection of substances allowing to regulate BAC accumulation.

*Hedysarum theinum* (red root) possesses a unique phytochemical composition that determines a wide range of its medicinal activities: anti-inflammatory, antibacterial, spasmolytic, immunoprotective, antioxidant, etc. As a result of mass harvesting, *H. theinum* is an endangered species, its extremely slow growth makes this species especially vulnerable. Valuable curative properties of *H. theinum*, limited distribution and biological peculiarities are preconditions for development of biotechnological methods of its cultivation.

The main objective is a comparative analysis of the proteomic and metabolomic states of the differentiated tissues of *H. theinum* from natural populations and *in vitro* plants obtained, as well as dedifferentiated (callus) cells to identify the key proteins responsible for biosynthesis of biologically active agents and to develop approaches to the directed regulation of metabolism of this medicinal plant.

To date, *H. theinum* plants have been developed and adapted, callus cultures of the stem and root origin have been initiated. The biochemical analysis of various types of *H. theinum* explants of two populations has been performed.

The research was conducted with support of the project of basic research of NAN of Belarus and the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (State registration № 01201282772).

**МОРФОГЕНЕЗ И КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ *in vitro* СКОРЦОНЕРЫ (*Scorzonera hispanica* L.)****Овчинникова В.Н., Варламова Н.В., Майсурян А.Н., Садирмекова К.Г., Харченко П.Н.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Москва, ул.Тимирязевская, 42; тел.: (499)9771636, факс:(499)9766544  
E-male: [veronica@iab.ru](mailto:veronica@iab.ru) (Овчинниковой В.Н.), [maisuryan@yandex.ru](mailto:maisuryan@yandex.ru), (Майсуряну А.Н.)

*Scorzonera hispanica* L. (сладкий испанский корень, черная морковь, черный корень) – двулетнее растение из семейства сложноцветные (*Compositae*) с давних времен была популярна в странах Средиземноморья. Это растение весьма ценилось за свои высокие вкусовые качества и лекарственные свойства. Однако, в нашей стране скорцонера еще не нашла широкого применения. Даже овощеводы-любители малознакомы с этим интересным растением.

Целебные свойства растения известны с давних времен и обусловлены наличием в составе скорцонере более ста биологически активных веществ. Корнеплоды содержат много белков, до 20 % сахаров, до 2 % пектиновых веществ, а также широкий спектр витаминов, соли калия, марганца, железа, меди, цинка, фосфора, кальция. Кроме того, это растение является источником различных алкалоидов, эфирных масел, смол и дубильных веществ. Корень этого растения предохраняет от радиации и обладает противораковой активностью. Но главное достоинство скорцонеры – высокое (до 10%) содержание инулина. Это соединение крайне важно для нормализации обмена веществ и диетического питания при заболеваниях органов пищеварения, снижения уровня сахара в крови при сахарном диабете, укрепления иммунной системы и быстрого восстановления сил после болезней и операций. Применение корня улучшает обмен веществ и оздоравливает организм. В последнее время появились сведения, что скорцонера способствует выведению из организма радиоактивных элементов. Кроме того, тибетские монахи используют его при приготовлении противораковых препаратов.

Целью наших исследований явилось введение в культуру *in vitro*, изучение морфогенетического потенциала и разработка методики клонального микроразмножения скорцонеры.

Для введения в культуру *in vitro* скорцонеры использовали семена, которые стерилизовали 0,1%-ным раствором диазида в течение 10 минут. Через 30 суток культивирования на среде, содержащей ½ концентрации минеральных солей по Мурасиге-Скуту отмечали прорастание 30 % семян.

Для клонального микроразмножения скорцонеры использовали метод индукции образования адвентивных побегов. Культивирование листовых эксплантов проводили на средах МС с полным минеральным составом, содержащих различные концентрации 6-БАП (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л). Отмечали множественное побегообразование на эксплантах, причем с увеличением концентрации цитокинина в культуральной среде увеличивалось число образовавшихся побегов.

В дальнейшем побеги разделяли и последующее культивирование скорцонеры проводили на среде ½ МС с добавлением ИМК в концентрации 0,2 мг/л обеспечивало 100 %-ное укоренение растений. Такой подход к культивированию скорцонеры способствовал ускоренному размножению этого растения в условиях *in vitro*.

Использование биотехнологических подходов может способствовать созданию растений скорцонера с повышенным содержанием биологически активных веществ.

**MORPHOGENESIS AND MICROCLONAL PROPAGATION OF SCORZONERA**  
**(*Scorzonera hispanica L.*), CULTURED *in vitro***  
**Ovchinnikova V.N., Varlamova N.V., Sadirmekova K.G., Maisuryan A.N.,**  
**Kharchenko P.N.**

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology Russian Academy of Agricultural Sciences ARRIAS. Moscow, Timiryazevskay str., 42 ; tel.: (499)9771636, fax:(499)9766544  
E-mail: [veronica@iab.ru](mailto:veronica@iab.ru) (Ovchinnikova V.N.), [maisuryan@yandex.ru](mailto:maisuryan@yandex.ru), (Maisuryan A.N.)

*Scorzonera hispanica L.* or scorzonera (black salsify or Spanish salsify, also known as black oyster plant, serpent root) is a biennial plant from the aster family (Compositae), which is popular in Mediterranean area down the ages. This plant was high valued for its taste qualities and medicinal properties. However in our country, scorzonera is not widely used yet. Even amateur gardeners are still unfamiliar with this interesting plant.

The medicinal properties of scorzonera are known since ancient times and are due to the presence of more than hundred biologically active substances. Carrots of this plant are rich in proteins, contain up to 20% of sugars, up to 2 % of pectin and a wide range of vitamins, salts of potassium, manganese, iron, copper, zinc, phosphorus and calcium. In addition, this plant is a source of various alkaloids, essential oils, resins and tannins. The roots of this plant protects from radiation and possesses anti-cancer activity. But the real merit of scorzonera is high concentration of inulin in its root. This compound is extremely important for metabolism normalization and diet for those, who suffer from diseases of the digestive system. Inulin reduces blood sugar levels during diabetes, reinforces the immune system and promotes recovery after diseases and surgical operations. Application of the root improves the metabolism and makes the organism healthier. From recent reports it has been known that scorzonera promotes decorporation of radionuclides from the human body. There is information that Tibetan monks use scorzonera in anti-cancer drugs preparation.

The aim of our research was to develop the *in vitro* culture of scorzonera, to study the morphogenetic potential of the plant and to develop the micropropagation techniques.

To grow scorzonera *in vitro*, we used seeds that were sterilized with 0,1 % solution of Diocidum for 10 minutes. 30 % of seeds germinated after 30 days of cultivation in a half-strength Murashige-Skoog medium.

We used the method of adventitious shoots induction for clonal micropropagation of scorzonera. Leaf explants cultivation was carried out on MS medium with complete mineral composition and different concentrations of 6-benzyl adenine (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l). Multiple shoots formation was registered on the explants, and the number of shoots formed increased proportionally to concentration of cytokinin in the culture medium.

Further, shoots were separated and the subsequent cultivation of scorzonera was carried out in ½ MS medium, supplemented with indole butyric acid at concentration of 0,2 mg/l, which insured 100 % rooting of the plants. The approach of scorzonera cultivation in conditions of *in vitro* culture has contributed to the rapid multiplication of plants.

Furthermore, biotechnological approaches can help create the plants with an increased content of biologically active substances.

**МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* В ОСНОВЕ ХРОМОСОМНОЙ ИНЖЕНЕРИИ ПРИ СОЗДАНИИ НОВЫХ ГЕНОТИПОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ**

**Першина Л.А.<sup>1</sup>, Осадчая Т.С.<sup>1</sup>, Трубачеева Н.В.<sup>1</sup>, Кравцова Л.А.<sup>1</sup>,  
Белан И.А.<sup>2</sup>, Россеева Л.П.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090, пр. Академика Лаврентьева, 10, факс: +7(282)333-12-78; тел: +7(383) 363-49-27, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>Сибирский Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Омск, e-mail: belan\_skg@mail.ru

В наших работах показано, что использование методов *in vitro* увеличивает эффективность хромосомной инженерии, направленной на расширение генетического разнообразия мягкой пшеницы. Для получения новых генотипов мягкой пшеницы, несущих чужеродный генетический материал и представляющих интерес для селекции, важными являются методы *in vitro* для преодоления эмбриональной несовместимости при скрещивании растений разных видов между собой, вегетативного размножения уникальных генотипов гибридного происхождения, индукции соматональной изменчивости, ускоренного получения гомозиготных интрогрессивных и рекомбинантных линий. Использование культуры зародышей, культивирование молодых соцветий и пыльников способствовало получению новых гибридных комбинаций мягкой пшеницы и переносу генетического материала дикорастущего ячменя *H. marinum* ssp. *gussoneanum* в геном мягкой пшеницы; созданию серии аллоплазматических интрогрессивных и рекомбинантных линий мягкой пшеницы, несущих цитоплазму видов ячменя *H. vulgare* и *H. marinum* ssp. *gussoneanum*; получению гомозиготных линий с комбинацией чужеродных генов, определяющих устойчивость к стрессовым факторам и проявление хозяйственно-ценных признаков. Многие из полученных линий успешно используются в селекции. Так, в результате экспериментальных работ и селекции получен новый сорт яровой мягкой пшеницы 'Сигма' и многообразие перспективных линий с пирамидой генов, ответственных за устойчивость к грибным патогенам.

**METHODS IN VITRO IN BASIC OF CHROMOSOME ENGINEERING FOR DEVELOPMENT OF NEW COMMON WHEAT GENOTYPES**

**Pershina L.A.,<sup>1</sup> Osadchaya T.S.,<sup>1</sup> Trubacheeva N.V.,<sup>1</sup> Kravtsova L.A.<sup>1</sup>, Belan I.A.,<sup>2</sup> Rosseeva L.P.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, 630090, Academic Lavrentiev Av. 10, факс: +7(282)333-12-78; тел: +7(383) 363-49-27, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>Siberian Agricultural Research Institute, SB RAAS, Omsk, e-mail: belan\_skg@mail.ru

In our studies show that using of method *in vitro* promotes increase the efficiency of chromosome engineering aimed an increase in genetic diversity of common wheat. Methods *in vitro* to overcome an embryonic incompatibility in crosses between plants of different species, to reproduce unique genotypes of hybrid origin, to induce somaclonal variation, to accelerate the production of homozygous introgression and recombinant lines are important when developing new genotypes of common wheat carrying alien genetic material and which are of interest for breeding. Using embryo culture, cultivations of young inflorescences and anther culture made it possible to produce new hybrid combinations of common wheat and introduce a genetic material of wild barley *H.marinum* ssp.*gussoneanum* in the genome of common wheat, to create a series of alloplasmic introgressive and recombinant lines of common wheat carrying the cytoplasm of barley *H.vulgare* and *H.marinum* ssp.*gussoneanum*, to produce homozygous lines combining alien genes, determining resistance to stress factors and the expression of valuable agronomic traits. Many of these lines have been successfully used in the breeding. As a result of these experimental investigation and breeding the variety of spring common wheat 'Sigma' and a number of promising lines with pyramiding genes determined resistance to fungal pathogens were developed.

## МОЛЕКУЛЯРНО -ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИНИЙ РЕГЕНЕРАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ

Райзер О.Б., Хапилина О.Н.

Республиканское государственное предприятие Национальный центр биотехнологии,  
Астана, 010000, ул. Валиханова 13/1,  
факс: (7172) 21 -46-33, тел. (7172) 20-07-91, e-mail: [lbps@biocenter.kz](mailto:lbps@biocenter.kz)

Методы селекции *in vitro* в сочетании с традиционной селекцией позволяют получать селекционный материал, сочетающий устойчивость к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам среды с высокой продуктивностью и качеством. ДНК-технологии довольно широко используются для оценки внутривидового разнообразия растений, для идентификации генетической оригинальности соматональных вариантов и защиты прав селекционеров. Многие методы ДНК-анализа являются высокоинформативными, хорошо воспроизводятся, надежны при установлении индивидуальных особенностей генотипа. Основной проблемой исследования соматональной вариабельности является необходимость разработки методов детекции для выявления значительных генетических различий между регенерантами и оригинальными формами. Идентичность или оригинальность клонов имеет большое значение для коммерческого размножения растений-регенерантов. Маркерные системы на основе ретротранспозонов - IRAP (*Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism*) и REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) были использованы для детекции соматональной вариабельности, индуцируемой селективными агентами в культуре тканей. Основной чертой многих ретротранспозонов является их активация под воздействием биохимического или абиотического стресса. Многие изученные ретротранспозоны растений повреждаются в процессе культивирования клеток и тканей *in vitro*, поэтому они могут быть использованы в качестве маркеров для изучения полиморфизма соматональной вариабельности растений (Bradley C. Campbell et al, 2012).

Целью исследований являлась идентификация генетической оригинальности 11 линий регенерантов яровой мягкой пшеницы, созданных различными методами селекции *in vitro* с использованием NaCl, PEG-6000 и культуральных фильтратов патогенных грибов (*F. graminearum*, *A. alternata*). Линии регенерантов были получены на основе константной линии 285/94-1.

Эстракция геномной ДНК проводилась с использованием СТАВ-метода, в соответствии с протоколом Doyle & Doyle (1987). Для IRAP и REMAP амплификации использовали LTR-праймеры, сконструированные для консервативного региона ретротранспозонов *BARE-1*, характерного для ячменя (*Hordeum vulgare*). Условия IRAP- и REMAP- амплификации и электрофоретической детекции продуктов амплификации были в соответствии с Kalendar R. & Schulman AN (1999, 2006). Все реакции проводились дважды. По результатам анализа было амплифицировано достаточно много бендов – 892, из которых 437 были полиморфны. Размеры фрагментов варьировали от 150 до 4000 бп. Полиморфизм, детектируемый IRAP-методом, составил 53,5%, что гораздо ниже этого показателя при REMAP-анализе -72,5%. Количество фрагментов, детектируемых на 1 праймер, варьировало от 3 до 16. Для дальнейших исследований были выбраны 2 праймера IRAP (*Sukkula* and *Nikita*), и 2 комбинации REMAP-праймеров (*Sukkula*+8081, *Sukkula*+8082) с наибольшим уровнем полиморфизма. Регенеранты, полученные с использованием культуральных фильтратов, имели более вариабельные спектры амплификации и, соответственно, более высокое значение полиморфизма - 94,7%. Этот показатель у линий, полученных на средах с абиотическими стрессорами, был гораздо ниже и составил 55,4%. Результат амплификации был представлен в виде формулы, характеризующей полиморфизм каждой линией. Каждому праймеру присвоено буквенное кодирование, с соответствующей индексацией локусов. Данные формулы могут быть использованы для разработки молекулярно-генетических паспортов линий и сортов пшеницы.

## MOLECULAR -GENETIC IDENTIFICATION OF REGENERANTS OF SPRING WHEAT USING RETROTRANSPOSONS

**Raiser O.B., Hapilina O. N.**

Republican State Enterprise National Center for Biotechnology  
Astana, 010000, st. Valikhanova 13/1,  
fax: (7172) 21-46-33, tel. (7172) 20-07-91, e-mail: lbps@biocenter.kz

The methods of selection *in vitro* in combination with traditional breeding allow to get plant-breeding material combining resistance to the unfavorable abiotic and biotic factors of the environment with high productivity and quality. DNA technology quite widely used to assess the intraspecific diversity of plants, to identify the genetic originality of somaclonal variants and protection of breeders' rights. Many methods of DNA analysis are highly informative, well-played, and reliable in determining the individual characteristics of the genotype.

A major problem with studies of somaclonal variants is the necessity to develop reliable methods for determining significant genetic differences between regenerants and original forms.

Identity or originality of clones is important for the commercial reproduction of regenerated plants. The retrotransposon-based marker system, inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP), and retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) were used to detect somaclonal variation induced by selective agents in tissue culture. A general feature of many retrotransposons is their activation by biotic and abiotic stress. Many well characterised plant retrotransposons are particularly affected by protoplast isolation or *in vitro* cell or tissue culture because they can be used as markers for studying polymorphism somaclonal variants plants (Bradley C. Campbell et al, 2012).

The aim of the research was to identify the genetic originality 11 lines of regenerants of spring wheat, created using different methods of selection *in vitro* with use NaCl, PEG-6000 and cultural filtrate of pathogenic fungi (*F. graminearum*, *A. alternata*). These lines obtained based on the constant line of spring wheat N 285/94-1.

DNA extraction was based on the hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) technique, as described by Doyle & Doyle (1987). For IRAP and REMAP amplifications, we used LTR primers designed to the conserved regions of the *Hordeum vulgare* RTN BARE-1. The PCR reaction mixtures, the conditions of amplification, electrophoresis and detection of the amplified products were the same for IRAP and REMAP, following Kalendar R. & Schulman AH (1999, 2006). All reactions were repeated twice.

The both methods amplified the highest number of bands (892) and 437 of them were polymorphic. Size of amplified fragments varied from 150 to 4000 bp. The IRAP average percentage of polymorphism (53,5%) was quite lower than that of REMAP (72,5%). The number of amplified fragments was varied for each primer and ranged from 3 to 16. Four most informative primers - 2 IRAP (*Sukkula* and *Nikita*), and also two combinations of REMAP primers of (*Sukkula*+8081, *Sukkula*+8082) whose spectra were maximally saturated with high level of polymorphism were as a result selected. Regenerants which were obtained using the cultural filtrate of pathogenic fungi had the most variable amplification spectrums. The overall level of polymorphism in these lines was 94,7%. This index at the lines which were obtained on media with abiotic stressors was much lower - 55,4%.

The result of amplification was presented as a formula that characterizes polymorphism of every line on the studied IRAP- and REMAP- markers. Each primer was given the letter coding. The amplified loci have been indexed in accordance with the size of the fragments. These formulas can be used for development of molecular-genetic passports of lines and sorts of wheat.

## ПОЛУЧЕНИЕ ЦЕННЫХ ФОРМ ПШЕНИЦЫ НА ОСНОВЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ДЛИТЕЛЬНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ

Рахимбаев И.Р., Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Парменова А.К., Шилманова А., Касымхан К., М.К. Карабаев

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» МОН РК, г. Алматы, ул. Тимирязева, 45, тел./факс: 8(727)3947562, e-mail:

Из-за важного продовольственного и экспортного значения пшеницы, настороженного отношения общественности к генетически модифицированным объектам использование методов генетической инженерии для улучшения этой культуры в Казахстане ограничено. В связи с этим, одним из основных дополнительных биотехнологических инструментов повышения генетического разнообразия отечественной пшеницы считается изменчивость, накапливаемая клетками в процессе культивирования *in vitro* и передающаяся полученным из них растениям-регенерантам (Larkin, Scowcroft, 1981; Сидоров, 1990). Нами разработана генотип-независимая клеточная технология длительной регенерации растений, которая позволяет преодолеть различия между сортами и линиями пшеницы в способности к регенерации растений. Это позволяет многократно получать растения-регенеранты у любых коммерчески важных сортов и перспективных линий по заказу селекционеров. Ранее существующие методы клеточной и генетической инженерии реализовывались с использованием генотипов, обладающих высокой регенерационной способностью, но не всегда коммерчески ценных. В настоящее время данная технология используется нами для изучения изменчивости *in vitro*. В результате, выявлен широкий спектр генетической изменчивости у соматоклональных линий по количественным признакам (высота растений, длина главного колоса, число зерен в колосе, масса зерен с колоса) и качественным признакам (окраска зерен, размер, окраска и форма колосковых чешуй, остистость). Необходимо отметить, что характер изменений признаков у изученных нами соматоклонов находится в существенной зависимости от исходного генотипа и значительно различается у разных сортов и гибридов, что согласуется с литературными данными. Так, у соматоклонов с. Отан наблюдалась тенденция к выщеплению короткостебельных и карликовых форм. У соматоклонов с. Целинная-3С, напротив обнаружены высокорослые линии, которые характеризовались скороспелостью. У с. Казахстанская-25 получены соматоклоны с антоциановой окраской ушка. У гибридной линии Г-4 выщепились остистые формы. Общей тенденцией было появление соматоклональных вариантов с крупным и озерненным колосом, с изменением формы окраски зерна, и колосковых чешуй.

На основе разработанной нами клеточной технологии получены скороспелые формы с комплексом хозяйственно-ценных признаков (повышенная продуктивность, устойчивость к полеганию и т.д.) на основе нескольких генотипов яровой пшеницы. Предварительные экологические испытания в Центральном и Северном Казахстане показали, что скороспелые СЛ сорта Целинная-3С можно отнести к разряду среднераннеспелых и перспективных с точки зрения районирования в этих регионах. Положительным моментом является сохранение ранее выявленного превышения биологической урожайности у скороспелых форм по сравнению с значениями данного показателя у исходных сортов, и сохранение у соматоклонов высоких показателей качества зерна характерных для «сильных пшениц». В данное время с целью получения новых форм с ценными признаками получены растения-регенеранты двадцати шести коммерчески важных сортов, возделываемых в Казахстане.

Перспектива – использование технологии длительной регенерации в гаплоидии для получения гаметоклональных вариантов с улучшенными признаками.



**OBTAINING OF VALUABLE WHEAT FORMS BY THE USE OF LONG-TERM PLANT REGENERATION CELL TECHNOLOGY****Rakhimbayev I.R., Bishimbayeva N.K., Amirova A.K., Parmenova A.K., Shilmanova A.A., Kasymkhan K., Karabayev M.K.**

Republican State Enterprises "Institute of Plant Biology and Biotechnology"  
Almaty, Timiryazeva street, 45, tel./fax: 8 (727) 3947562, e-mail: [gen\\_jan@mail.ru](mailto:gen_jan@mail.ru)

For the reason of the significance of wheat as important domestic export product as well as because of the awareness of society against the genetically modified objects, implementation of genetic engineering methods for wheat improvement in Kazakhstan is limited. In this regard, the one of the basic biotechnological instruments that allows to increase genetic diversity of domestic wheat is variability, gained by cells in the process of cultivation *in vitro* and inherited to regenerated plants (Larkin, Scowcroft, 1981; Сидоров, 1990).

We have developed genotype-independent system of plant regeneration during long-term subcultivation that allows to overcome the differences in plant regeneration capabilities between the wheat varieties and lines. This allows to obtain plant-regenerants repeatedly from any commercially valuable cultivars and perspective lines according to the breeders order. Earlier existent methods of cell and genetic engineering have been fulfilled with the use of genotypes with high regeneration capabilities but not always commercially valuable. Currently, long-term *in vitro* plant regeneration technology has been successfully used in our research targeted to genetic improvement of wheat. In our research we identified the wide spectrum of genetic variability in somaclonal lines on their quantitative traits (height of plants, length of main ear, quantity of grains in ear, mass of grains per ear) and qualitative traits (colour of seeds, size, colour and form of spicate scales, awnity). It is important to point out, that the changes of traits in studied somaclonal lines are significantly depend from the initial genotype and significantly differs in different varieties and hybrids, that is in accordance to the data suggested in literature. Thus, somaclonal lines of Otan cv. were observed to have a tendency to arising of short stem and carlic forms. In contrast, somaclonal lines of v. Celinnaya-3C were found to have high stem lines characterized by precocity. Somaclonal lines of Kazakhstanskaya-25 cv. were characterized with antocian coloured ear. From hybrid line G4 awned somaclonal forms of have been developed.. The general tendency in all varieties has become the appearance of somaclonal lines with large and high yield grained ear, with changes in grain's and spicate scale's shape and colour. On the basis of developed long-term regeneration cell technology we obtained precocious forms with the complex of agriculturally valuable traits (high productivity, resistance to lodging, etc.) on several genotypes of the spring wheat. Preliminary ecological trial in Central and North Kazakhstan revealed that precocious lines of Celinnaya 3 variety can be classified as medium precocious lines with high perspective in terms of zoning in this regions. The main achievement that was revealed is that previously determined escalation of biological yield and "strong wheat" quality characteristics remains at the same high level in precocious forms in comparison with initial forms during this trial. Now, in order to obtain new forms with valuable traits we obtained regenerated plants of twenty six commercially important cultivars, grown in Kazakhstan.

The use of long-term regeneration technology opens the perspective to be implemented in haploid technology for obtainment of hametoclinal lines with improved traits.

## ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ СХЕМ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИТОФТОРОЗУ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ ГИБРИДОВ КАРТОФЕЛЯ

Сарсекова А.Н., Измагамбетова А.Ж., Нечай Н.Л., Есимсентова А.К.,

Какимжанова А.А.

РГП «Национальный центр биотехнологии», (Казахстан, г. Астана)

Фитофтороз картофеля, или картофельная гниль, считается самым вредоносным заболеванием этой овощной культуры в большинстве стран мира. В самых сложных случаях недобор урожая может достигать 70%. Болезнь поражает листья и клубни. Главная опасность заболевания заключается в огромной скорости ее развития. Как и в предыдущие годы, проявление фитофтороза отмечалось практически во всех регионах Республики Казахстан, как на производственных посадках, так и в частном секторе.

Фитофтороз картофеля распространен во всех областях страны, где возделывают картофель. Оно вызывается грибом *Phytophthora infestans*. В связи с этим, исследования были направлены на изучение возможности создания форм картофеля, устойчивых к данному заболеванию.

Целью исследований являлось оптимизация метода селективного отбора устойчивых к фитофторозу форм картофеля с использованием биотехнологических методов. Схема эксперимента состояла в индукции каллусогенеза гибридов картофеля и последующего отбора, устойчивых каллусных линий на средах Мурасиге и Скуга с культуральным фильтратом (КФ) гриба *P. infestans*, который использовали в качестве селективного фактора. Также для получения устойчивых каллусных линий картофеля использовали двойной слой питательной среды. Первый слой среды состоял из овсяной среды с растущим на нем штаммом гриба *P. infestans*, второй слой состоял из питательной среды МС.

В качестве объектов исследований служили 21 гибридов картофеля казахстанской селекции. С помощью методов вычленения и культивирования апикальных меристем были получены пробирочные стерильные растения гибридов, которые использовали в качестве экплантов для дальнейших работ.

В результате исследований подобраны питательные среды для индукции каллусов гибридов картофеля. Использовали восемь вариантов сред с различным соотношением гормонов, витаминов, антиоксидантов. На всех питательных средах наблюдали формирование каллусной ткани, но наиболее оптимальной для быстрого роста морфогенных структур была среда с содержанием фитогормонов 2-4 Д - 1 мг/л и БАП - 0,5 мг/л.

Проведена оптимизация схем клеточной селекции на устойчивость к фитофторозу для получения устойчивых каллусных линий картофеля, для этого пассировали полученные первичные каллусы на селективные среды с КФ - 5, 10, 20, 30 и 50%. Процент образования устойчивых каллусных линий в среднем по шести неустойчивым к фитофторозу гибридам картофеля варьировал от 6,25% до 85,7%. Высокий процент роста устойчивых каллусных линий к КФ гриба *Phytophthora infestans* выявлено на среде МС+5% КФ, что составило 85,7%.

Низкий процент формирования устойчивых каллусов наблюдали при использовании концентрации 50% КФ - 6,25%, 30% КФ - 20,9%. Оптимальными концентрациями для клеточной селекции на устойчивость к фитофторозу являются 10%, 20%, 30% КФ. Для получения растений-регенерантов гибридов картофеля, с селективных сред с КФ гриба *Ph. infestans* каллусные линии были пассированы на питательную среду МС для регенерации. В настоящее время полученные пробирочные растения-регенеранты гибридов картофеля с селективных сред микроклонально размножаются и будут высажены в пленочную теплицу.

Использование местных штаммов гриба *Phytophthora infestans* позволит получить ценные формы картофеля, устойчивые к фитофторозу для Казахстана, которые будут идентифицированы и паспортизированы с помощью молекулярно-генетического анализа.

**SELECTION OF THE OPTIMAL SELECTION SCHEME FOR RESISTANCE TO LATE BLIGHT IN POTATO****Sarsekova A.N., Izmagambetova A., Nechay N.L., Esimseitova A.K., Kakimzhanova A.A.**

RSE "National Center for Biotechnology" (Kazakhstan, Astana)

Potatoes late blight, or potato rot, is one the most harmful disease of this crop in majority of the world countries. In severe cases, loss of potato crop due to late blight can be up to 70%. The disease affects leaves and tubers. The main danger of the disease is the tremendous speed of its dissemination. For years, manifestation of late blight disease has been noted in almost all regions of the Republic of Kazakhstan, both in the industrial crop production and in the private farmers fields.

Potato late blight is prevalent in all areas of the country where the potato is cultivated. It is caused by a fungus *Phytophthora infestans*. Therefore, much effort has focused on the development of potato forms resistant to the disease.

Aim of this study was to optimize the selection of the forms of potato resistant to the late blight using biotechnological methods. The experimental scheme implied induction of callus formation from tissues of potato hybrids and subsequent selection of resistant calluses on medium (Murashige and Skoog, MS) containing additions of the culture filtrate (CF) of *P. infestans*, the latter being a phytotoxic selective factor. Also, for sustainable potato callus lines we used a double layered medium. The first layer was the oatmeal medium with a growing *P. infestans*, the second layer was MS medium.

We studied 21 potato hybrids of Kazakhstan selection. Using the methods of isolation and culturing of the apical meristems we obtained sterile test tube plants, which were used for explants for further work.

As a result, the nutrient medium to induce potatoes callus generation was chosen. We used eight variants of media with different compositions of plant hormones, vitamins and antioxidants. All culture media were tested for the effectiveness of the callus formation, the selected medium optimal for rapid growth of morphogenic structures contained phytohormones - 2,4 D- 1 mg/l, BAP - 0.5 mg/l.

Protocols for cell selection of callus lines for resistance to late blight were optimized, for this purpose the primary calluses were passaged on selective medium with 5, 10, 20, 30 and 50% of CF.

Percentage of callus formation for the six potato lines susceptible to late blight varied from 6.25% to 85.7%. High percentage of stable growth of callus lines was found on MS medium +5% CF, which resulted in 85.7% efficiency of formation of calluses resistant to *P. infestans*.

Low percentage of formation of resistant calluses was observed using a concentration of CF 50% (6.25% efficiency of callus formation) and 30% of CF (20.9% efficiency). Optimal concentrations of CF for cell selection are 10%, 20%, 30%. The regenerated plants of potato hybrids were obtained on the MS medium for regeneration with addition of CF. Currently, the obtained test-tube plants of potato hybrids are subjected to selective breeding and micropropagation and further will be planted in the greenhouse.

The use of local strains of the fungus *P. infestans* will allow selection of valuable forms of potato resistant to late blight in Kazakhstan, the forms will be identified and certified by molecular genetic analysis.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК РАСТЕНИЙ ПРИ СОЗДАНИИ ПЛАНТАЦИЙ С КОРОТКИМ ЦИКЛОМ РОТАЦИИ

Сергеев Р.В., Новиков П.С., Большакова Е.Е., Шургин А.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Поволжский государственный технологический университет», 424000, Республика Марий Эл, г. Йошкар-Ола, пл. Ленина, дом 3., факс: (836) 268-78-80, тел (836) 268-78-80, e-mail: rsergeyev@yahoo.com

Выращивание ценных генотипов *Populus tremula* L. – один из путей повышения продуктивности лесных насаждений. Осина формирует высокопродуктивные древостои в 2 -2,5 раза быстрее деревьев хвойных пород. Качественная древесина *P. tremula* имеет большой спрос в различных отраслях деревообрабатывающей и деревоперерабатывающей промышленности [1]. Существуют формы триплоидной осины, устойчивые к болезням и вредителям. Кроме того, такие деревья характеризуются полнодревесностью стволов и высокой продуктивностью [2].

В связи с этим, выращивание триплоидной осины, является очень перспективным и необходимым направлением, особенно в свете все возрастающей потребности общества в качественной древесине [1]. С целью оптимизации гормонального состава среды для культивирования триплоидной осины, осуществлялся подбор оптимальных концентраций ауксинов и цитокининов. Изучалось влияние регуляторов роста на динамику развития регенерантов, коэффициент размножения и ризогенез. Экспланты *P. tremula* культивировали на питательной среде MS, различающейся по содержанию регуляторов роста.

В эксперименте было заложено 48 вариантов сред с различным содержанием фитогормонов ИМК, ИУК, БАП и Кин.

Через 5 недель культивирования была проведена оценка влияния ИМК, ИУК, БАП и Кин на мультипликацию побегов и ризогенез в культуре ткани *Populus tremula* L.

Обобщив полученные данные, можно сказать, что для интенсивной пролиферации побегов *Populus tremula* в культуре *in vitro* необходимо использовать питательную среду MS дополненную 0,1 мл/л ИМК и 0,1 или 0,5 мл/л БАП. Для интенсивного ризогенеза *Populus tremula* в культуре *in vitro* необходимо использовать питательную среду MS, дополненную 0,3 мл/л ИМК.

### Литература

1. Газизулин А.Х., Чернов В.И., Гарипов Н.Р., Исмагилов Р.И. Формы осины в лесах республики Татарстан // Аграрная Россия – М., 2009 – спец. выпуск – С. 19-20.
2. Петрова Г.А. Использование методов биотехнологии для получения здорового посадочного материала осины (*populus tremula* l.) в условиях республики Татарстан: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. - М., 2011. – 25 с.

## СУСПЕНЗИОННЫЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ

Сидорчук Ю.В., Загорская А.А., Дейнеко Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 10, тел.: +7(383) 363-49-80, e-mail: [sidorch@bionet.nsc.ru](mailto:sidorch@bionet.nsc.ru)

Суспензионные культуры генетически модифицированных клеток растений привлекают внимание исследователей как перспективные системы для продукции фармацевтических белков. В сравнении с целым растением клеточные культуры имеют значительное преимущество, поскольку дают возможность стандартизировать их по ростовым характеристикам, размерам и типам клеток. Культивирование в строго контролируемых условиях позволяет поддерживать стабильную скорость накопления продукта. В связи с этим создание клеточных линий с высоким биосинтетическим потенциалом и возможностью культивирования в биореакторах является весьма актуальной задачей.

В настоящей работе проводилось введение в культуру тканей различных видов двудольных растений, индукция и отбор каллусов по способности к максимальной пролиферации, введение каллусных культур в суспензию, оценка ростовых параметров суспензии, генетическая трансформация клеточных культур с использованием созданного вектора и оценка уровня экспрессии гетерологичного гена на примере репортерного гена *gfp*. В качестве исходного материала использовали 12 сортов и форм культурных растений, принадлежащих к 7 видам (*Glycine max*, *Glycine soja*, *Medicago varia*, *Lupinus angustifolius*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota*), отобранные по уровню накопления общего белка *in vivo*. Для введения в культуру *in vitro* в качестве эксплантов использовали котиленоны, гипокотили, эпикотили, семядольные узлы, семядоли, листья, стеблевые диски, черешки и зрелые зародыши. Индукцию и отбор активно пролиферирующих каллусных культур проводили с использованием двух базовых сред (Мурашиге и Скуга, а также среду Гамборга) с 19 вариантами фитогормонов.

Согласно оценке ростовых характеристик каллусных линий, индуцированных из различных типов эксплантов, были отобраны линии табака, амаранта и моркови, характеризовавшиеся максимально высокой скоростью пролиферации. Каллусные линии данных видов были переведены в суспензионные культуры. Полученные суспензионные культуры изучали по следующим параметрам: ростовой индекс, плотность суспензии и жизнеспособность клеток. Установлено, что при одинаковой с прочими культурами жизнеспособности клеток, наибольшим ростовым индексом характеризовалась суспензионная культура амаранта, биомасса которой на 15-й день культивирования увеличивалась в 10 раз по отношению к исходной массе клеток. Биомасса клеточных культур моркови и табака в эти же сроки увеличивалась в 6 и 7 раз, соответственно.

Показано, что содержание общего растворимого белка в клетках амаранта составляло  $1,010 \pm 0,071$  мг/г сырой массы, что втрое превышало его содержание в клетках моркови и табака ( $0,310 \pm 0,025$  мг/г и  $0,3596 \pm 0,042$  мг/г, соответственно). Анализ накопления гетерологичного белка GFP после проведения агробактериальной трансформации клеточных линий моркови, табака и амаранта выявил аналогичную закономерность. Наибольшим накоплением GFP-белка характеризовались суспензионная культура клеток амаранта,  $1,145 \pm 0,0047$  мг/г сырой массы. В клетках суспензии моркови и табака накопление GFP-белка достигало лишь  $0,412 \pm 0,004$  мг/г и  $0,6513 \pm 0,0024$  мг/г сырой массы, соответственно. На основании сравнительного анализа трех отобранных видов растений установлено, что клеточная суспензия амаранта существенно превосходит клеточные суспензии табака и моркови по ростовым характеристикам, а также способности накапливать общий и гетерологичный белок, и может быть рассмотрена как кандидат для создания на ее основе линии-биопродукента.

**SUSPENSION CULTURES OF PLANT CELLS AS PERSPECTIVE SYSTEMS FOR PRODUCTION OF HETEROLOGOUS PROTEINS****Sidorchuk Yu.V., Zagorskaya A.A., Deineko E.V.**

The Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 630090, Novosibirsk, Lavrentyev av., 10, tel.: +7(383) 363-49-80, e-mail: [sidorch@bionet.nsc.ru](mailto:sidorch@bionet.nsc.ru)

Suspension cultures of genetically modified plant cells are very attractive to the researchers as perspective systems for pharmaceutical proteins production. In comparison with the whole plant the suspension cultures have significant advantage. They can be standardized by growing parameters, cell types and sizes. Strictly controlled conditions allow to maintain a stable accumulation rate of the product. Thereby production of the cell lines with the high biosynthetic capacity and suitable for bioreactors is highly actual problem.

In this work 12 varieties and forms of different crops (*Glycine max*, *Glycine soja*, *Medicago varia*, *Lupinus angustifolius*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota*) selected by total protein accumulation *in vivo* were used as initial materials for *in vitro* culture induction. Cotyledons, hypocotyls, epicotyls, cotyledonary nodes, leaves, stem disks, petioles and mature embryos were used as explants. MS and B-5 media supplied by 19 variants of phytohormones were used for induction and selection of actively proliferating calluses.

Callus lines induced from different explants were estimated according their growth characteristics and the lines of tobacco, amaranth and carrot characterized by maximal proliferation value were selected. Suspension cultures were developed on the basis of these lines. Such parameters as growth index, suspension density and cell vitality were explored in obtained suspensions. Moreover qualitative composition of cell populations were described in suspension cultures by differential interference contrast (DIC) microscopy.

It is ascertained that for the same with the other cultures cell viability, amaranth suspension culture was characterized by the highest grow index. Its biomass increased 10-fold in relation to initial mass of the cell at day 15 of cultivation. The biomass of carrot and tobacco cell cultures increased in 6 and 7 times respectively for the same period.

It is shown that the content of total soluble proteins in amaranth cells was  $1,010 \pm 0,071$  mg/g of fresh weight that was three times more than the same parameter at carrot and tobacco cells ( $0,310 \pm 0,025$  mg/g and  $0,3596 \pm 0,042$  mg/g respectively). The same pattern of accumulation of recombinant GFP protein was detected in carrot, tobacco and amaranth transgenic cell lines developed by agrobacterium-mediated transformation. Suspension cell culture of amaranth were characterized by the highest level of GFP accumulation ( $1,145 \pm 0,0047$  mg/g of fresh weight). Accumulation of the GFP protein in suspension cell culture of carrot and tobacco reached the level of  $0,412 \pm 0,004$  mg/g and  $0,6513 \pm 0,0024$  mg/g of fresh weight respectively.

Based on a comparative analysis of three selected plant species it is established that the cell suspension of amaranth exceeds the cell suspensions of carrot and tobacco by grow characteristics and accumulation of total and heterologous proteins. Thus, the cell suspension of amaranth can be considered as candidate for developing bioproducer line.

## ШТАММЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ – МОДЕЛЬ ИННОВАЦИОННЫХ ФИТОБИОТЕХНОЛОГИЙ

Слепян Л.И., Каухова И.Е., Кириллова Н.В., Громова О.Н., Н.С. Пивоварова.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия Минздрава РФ, Санкт-Петербург, 197376, ул. проф. Попова, 14, факс: (812) 234-60-44, тел. (812) 234-90-34, e-mail: [larisa.slepyan@pharminnotech.com](mailto:larisa.slepyan@pharminnotech.com)

В 1963-1965 гг в Санкт - Петербургской государственной химико - фармацевтической академии (СПХФА) был создан банк штаммов ценных и редких лекарственных растений не произрастающих, или имеющих ограниченный ареал в России. Это: женьшень *Panax ginseng C.F. Mey*, панакс пятилистный *Panax quinquefolius L.*, японский женьшень *P.japonicus L.*, тропическое растение раувольфия *Rauwolfia serpentina Benth.* источник аймалина и других ценных алкалоидов. В дальнейшем в культуре *in vitro* были получены штаммы полисициаса папоротниколистного *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey и штамм юкки великолепной *Yucca gloriosa L.*, как источник стероидных гликозидов. В настоящее время в банке клеточных культур СПХФА находится 17 штаммов ценных лекарственных растений, среди которых есть три селективных штамма, содержащих микроэлемент германий, как индуктор гамма-интерферона одного из первых защитных иммуномодуляторов при любых инфекциях.

В СПХФА впервые из биомассы селективного с Ge штамма женьшеня был получен препарат ПАНАКСЕЛ<sup>®</sup> и проведены его доклинические и клинические испытания, которые подтвердили, что ПАНАКСЕЛ<sup>®</sup> помимо свойств, характерных для корня женьшеня, обладал высокой иммуномодулирующей, противораковой и гепатопротекторной активностью. Учитывая особенности технологии и свойства шрота из биомассы этого штамма, был разработан растительный энтеросорбент ПАНАСОРБ<sup>®</sup>, способный выводить из организма не только радиоактивный стронций, но также свинец и ртуть.

Особый интерес представляет “красный” женьшень, обладающий большей биологической активностью особенно в профилактике онкологических заболеваний. В СПХФА получены препараты из “красной” биомассы женьшеня, американского женьшеня и других штаммов и показана их высокая биологическая активность. Препараты из “красной” биомассы, обладая большей биодоступностью, действовали в 1000 раз меньших дозах по сравнению с препаратами из исходного штамма и оказывали высокий антиметаболический эффект.

Штаммы культур клеток растений являются прекрасной моделью биосистемы, на которой можно моделировать новые технологии и получать клетки, которых нет в природе. Так, впервые были получены клетки женьшеня, которые содержали одновременно и биологически активные вещества березы, солодки, календулы и исландского мха. Показано, что в клетках биомассы женьшеня и других штаммов содержится один из активных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД), которую ранее получали только из животного сырья. Сегодня в лаборатории разрабатываются новые технологии культивирования штаммов и новые методы экстракции биологически активных веществ (БАВ) с помощью СВЧ и УЗ также с учетом безопасной экологии и безотходной технологии. Проводятся исследования по конструированию новых медицинских конструкций и лекарственных форм: трансплантатов, трансдермальных пленок, жевательных конфет, биогелей и шовного материала, как средств доставки лекарственных препаратов с пролонгированным спектром действия. Штаммы растительных клеток как модель биосистемы, используются для исследований влияния на них магнитных полей, а также для оценки экологической и медицинской безопасности в случаях применения различных наноматериалов, в частности, углеродных нанотрубок - наночастиц от 50 - 150 нм. Таким образом, банк клеток лекарственных растений это прекрасная модель живой биологической системы, которая может служить базой для инноваций в фитобиотехнологии.

**THE STRAINS OF MEDICINAL PLANT TISSUE CULTURES AS A MODEL OF INNOVATIVE PHYTOBIOTECHNOLOGY****Slepyan L.I., Kauxova I.E., Kirilova N.V., Gromova O.N., Pivovarova N.S.**

The Saint-Petersburg State Chemical- Pharmaceutical Academy, 197376 Saint–Petersburg, Popova street, 14. E- mail. [larisa.slepyan@pharminnotech.com](mailto:larisa.slepyan@pharminnotech.com)

In 1963-1965years in the St. Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy different strains of rare and valuable plant species that do not grow or have a limited geographical range in our country such as: *Panax ginseng* C.A. Mey., *P. quinquefolius* L. and *P. japonicus* L. and tropical *Rauwolfia serpentina* Benth. known as a source of ajmaline and other valuable alkaloids. Subsequently strains of another tropical plants *Polyscias filicifolia* ( Moore ex Fournier) Baily and *Yucca gloriosa* L. were obtained in vitro. At present time there are 17 strains of valuable medicinal plants in the cell bank. These strains are being used as a biological model for receiving new medicinal substances.

There are three selective lines, containing minor nutrient element Ge, the inducer of endogenic gamma interferon that is one of the first immunomodulators in case of any infective disease. From the biomass of the selective *Panax* strain with Ge a new medicinal remedy Panaxel® was obtained. Pre-clinical and clinical studies have proved that Panaxel® possesses not only those activities that are specific for *Radix Ginseng* but also exerts high immunomodulating, anticancerogenic and hepatoprotective actions also. Taking into account the specifics of the technology and the characteristics of the biomass meal a new plant enterosorbent Panasorb® was prepared. It is able to excrete from human bodies not only radioactive Sr, but also Pb and Hg.

The “red” of Ginseng’s biomass is of particular interest and has a high biological activity especially in the prevention on oncological diseases. Same medical products from these “red biomass” and other strains of Araliaceae were obtained and their biological activity was proved. The bioactivity these medical products having in 1000 times lower doses and showed high anti-metastatic effect.

The plant cell strains appear as a good biological model, in which one can imitate new technologies and obtain those cells that are not present in nature. Thus, there were derived *Panax* cells, producing biologically active substances of birch, liquorice, marigold and Iceland moss simultaneously. It was shown that strain of Ginseng and other strains produce one of active antioxidative enzymes – superoxide dismutase (SOD), which had been formerly obtained only from animal raw materials.

Nowadays in SPCPA laboratory we develop new technologies of cultivating and new extraction methods using super – high frequencies and ultra sound, taking into account environmental safety and non-waste technology. We carry out investigations on the development of new medical devices and drug forms such as: transplantats, biodissolved films, chewing sweets, biogel and sutural materials as drug delivery systems with prolonged release.

The plant cell strains as a model of biological system are used for environmental effects of a permanent magnetic field on cells and medicinal security evaluation in cases of application of different nanomaterials, in particular carbon nanotubes- nanoparticles with dimensions of 50-150 nm.

To summarize, the bank of medical plant cells is a good model of living system forming the basis of innovations phytobiotechnology.



## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ СИСТЕМ *IN VITRO* В СЕЛЕКЦИИ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.) НА ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Соболева Г.В.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур Россельхозакадемии, п/о Стрелецкое 302502, Орел, факс: (4862) 403130, тел. (4862) 403224, e-mail: [alniksobolev@rambler.ru](mailto:alniksobolev@rambler.ru)

Горох принадлежит к числу мезофитов и сравнительно легко переносит избыток влаги, но резко снижает урожайность в условиях ее недостатка. Целенаправленная селекция гороха на засухоустойчивость ограничена отсутствием доноров засухоустойчивости, сложностью совмещения в сорте высокой продуктивности и засухоустойчивости. Существующие методы отбора засухоустойчивых вариантов в большинстве случаев позволяют осуществлять только тестирование генотипов.

Цель исследований заключалась в получении нового селекционного материала гороха, устойчивого к засухе с использованием селекции *in vitro*. Материалом для проведения исследований служили каллусы разного возраста пассирования *in vitro* 7 генотипов гороха, представленные различными морфотипами. В качестве селективного фактора использовали ПЭГ-6000.

Установлено, что длительно пассируемые ткани более чувствительны к осмотическому стрессу. Прирост молодой (120-135 суток *in vitro*) культуры тканей на селективной среде с ПЭГ варьировал от 5,1 до 82,4% от контроля, в длительно культивируемой культуре каллусов данный показатель был в пределах 4,9-30,9%. Тем не менее ранжирование генотипов, по осмоустойчивости, проведенное в культуре молодого каллуса, сохранялось и при длительном пассировании. Регенерацию растений гороха проводили на средах без селективного фактора. Установлено, что длительно культивируемые (1500 – 1900 суток *in vitro*) каллусы отселектированные на средах с ПЭГ резко снижают способность к регенерации побегов. При этом у всех исследованных сортов и линий не наблюдалось угнетения недефференцированного роста каллусных тканей, формировались меристематические очаги с многочисленными зачаточными почками, часто образовавшиеся микропобеги так и оставались в зачаточном состоянии, не развиваясь дальше. Большая часть полученных из каллусных клонов побегов имела нормальную морфологию, однако встречались побеги с высоким уровнем витрификации. Не установлена взаимосвязь между индукцией побегообразования в каллусах гороха и морфотипом исследуемых генотипов. Установлена зависимость морфогенеза от исходного генотипа и селективной нагрузки.

Выявлено преимущество регенерантных линий гороха, отселектированных на осмоустойчивость в каллусной культуре по ряду физиологических показателей характеризующих засухоустойчивость. На стадии бутонизации у абсолютного большинства регенерантных линий общее содержание воды (ОСВ) в тканях растений, позволяющее опосредованно оценить работу корневой системы, было выше, чем у исходных генотипов. По способности удерживать воду срезанными растениями в процессе завядания (6 часов) большинство линий также превосходили исходные генотипы. Установлено, что между критериями засухоустойчивости (общим содержанием воды в тканях и потерями воды в процессе завядания) существует довольно тесная положительная корреляция ( $r=0,65$ ).

В результате проведенных исследований выделены перспективные линии, совмещающие повышенную засухоустойчивость и урожайность, одна из которых как сорт Смолянка передана на Государственное сортоиспытание.

**USE OF *IN VITRO* SELECTIVE SYSTEMS IN BREEDING OF PEA (*PISUM SATIVUM* L.) FOR RESISTANCE TO DROUGHT****Galina Soboleva**

All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, p/b Streletskoye, 302502, Orel, fax: (4862)403130, phone. (4862)403224, e-mail: [alniksobolev@rambler.ru](mailto:alniksobolev@rambler.ru)

Pea belongs to *mesophits and* has resistance to wet excess but sharply decreases yield under water deficiency. Pea breeding for drought resistance is limited by absence of donors and difficulty to combine high yield with resistance to drought. Existing methods of selection allow to test genotypes only.

The aim of research was focused on obtaining of new breeding material resistant to drought with use of selection *in vitro*. The initial materials were calli of 7 genotypes cultivated *in vitro* for different time. PEG-6000 was used as a selective factor.

It was established that long term cultivated calli were more sensitive to osmotic stress. Increase of young callus mass (120-135 days *in vitro*) on selective medium with PEG was 5.1-82.4% as compare to control. This trait in long term culture was varied from 4.9 to 30.9%. Regeneration of pea plants was conducted on media without selective factor. It was determined that calli cultivated in the presence of PEG for long term (1500 – 1900 days *in vitro*) had decreased ability to shoot regeneration. Among all studied varieties and lines proliferation of tissues, formation of meristematic sites with numerous buds were not depressed. But small shoots often did not development until mature stage. Majority of shoots had normal morphology but part of them was with high level of vitrification. A relation between regeneration and morphotype of plants was not observed. But dependence of morphogenesis from genotype and selective factor was determined.

Preference of plant lines selected in presence of PEG on physiological traits of resistance to drought was revealed. On the stage of bud formation total water content in tissues of regenerated plant was higher than in initial genotypes. A large part of regenerated lines had preference on ability to retain water in cut plants. Positive correlation ( $r=+0.65$ ) between total water content and waste of water in cut plants was determined.

As a result high yielding perspective pea lines with resistance to drought were obtained. One line named as variety Smolyanka was submitted to the State testing.

**РЕГЕНЕРАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ SYRINGA VULGARIS L. В КУЛЬТУРЕ IN VITRO****Соловьева В.В., Тихомирова Л.И.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049, пр. Ленина, 61  
тел.: (3852)36-86-39, e-mail: werasolo@mail.ru

Сирень как исключительно декоративный кустарник находит широкое применение в озеленении и ландшафтной архитектуре. Высокая востребованность культуры требует большого количества посадочного материала. Современные сорта плохо размножаются вегетативно. Для целей размножения применяют биотехнологические методы, разработанные на основе изучения регенерационной способности сирени в культуре in vitro.

Целью работы – изучить регенерационный потенциал сортов *Syringa vulgaris* L. на этапе собственно микроразмножения.

Объектами исследований являлись 2 сорта (Сенсация, Огни Донбасса) и 1 форма сирени обыкновенной из коллекции НИИСС Россельхозакадемии. Экспериментальные работы с использованием метода культуры тканей и гистологический анализ проводили по общепринятым методикам.

В процессе исследований было изучено влияние разных концентраций БАП, способа культивирования, основанного на чередования сред с относительно низким и высоким содержанием БАП, а также содержание НУК и негормональных стимуляторов роста на регенерационную способность *S. vulgaris* в культуре ткани. Показаны изменения коэффициента размножения и высоты побегов в зависимости от состава питательных сред, проведены анатомо-морфологические исследования образцов. По результатам экспериментов были отобраны эффективные среды и схемы культивирования *S. vulgaris*, которые позволяют максимально использовать регенерационный потенциал растений на этапе собственно размножения без снижения качества регенерантов.

**REGENERATION POTENTIAL OF SYRINGA VULGARIS L. IN CULTURE IN VITRO****Solovjeva V.V., Tikhomirova L.I.**

Altay state university, Barnaul , 656049, p. Lenina, 61  
tel.: (3852) 36-86-39, e-mail: werasolo@mail.ru

Lilac is an ornamental shrub that is widely used in gardening and landscaping. The high demand of culture requires a large amount of planting material. Modern varieties propagate poorly vegetatively. For the purposes of breeding are applied biotechnological techniques that are developed through the study of the regenerative capacity of lilac in culture in vitro.

The aim of the work is to study the regeneration potential of the varieties of *Syrnga vulgaris* L. at the stage of actually micropropagation.

The objects of the investigations were two grades (Sensation, Lights of Donbass) and one form of the common lilac collection of the Siberian Horticultural Research Institute (SHRI). Experimental work with the method of tissue culture and histologic analyzes were performed by standard methods.

During the study, we studied the effect of different concentrations of BAP, cultivation method, based on the alternation of media with low and high BAP and NAA content and non-hormonal growth promoters on the regenerative capacity of *S. vulgaris* in tissue culture. We demonstrated the changes of the multiplication of shoots and their elongation depending on the composition of the culture media, conducted anatomical and morphological studies of samples. According to the results of experiments were selected effective media and cultivation schemes *S. vulgaris*, that maximize the regeneration potential of plants at the stage of actual reproduction without compromising the quality of regenerates.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ЧЕЧЕВИЦЫ

Суворова Г.Н., Иконников А.В.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур Российской академии сельскохозяйственных наук, факс: (4862)403130, тел.: (4862)403751, e-mail: [galina@vniizbk.ru](mailto:galina@vniizbk.ru)

Известны 7 видов рода *Lens* Mill., культурным из которых является чечевица тарелочная *L. culinaris* Medik., остальные виды дикорастущие. В процессе селекции местные популяции чечевицы заменяются улучшенными сортами, вследствие чего происходит сужение генетического разнообразия культурного вида. Дикорастущие сородичи чечевицы, обладая рядом полезных признаков, в частности устойчивостью ко многим грибным болезням, могут стать источником дополнительной изменчивости для культурной чечевицы.

Среди возможных комбинаций скрещивания в роде *Lens* нами получены межвидовые гибриды чечевицы *L. culinaris* с видами *L. orientalis* (Boiss) Schmalh. (ILWL 7) и *L. tomentosus* Ladizinsky (ILWL 90, ILWL 120).

В комбинации *L. culinaris* x *L. orientalis* гибридные семена получены в результате обычных скрещиваний. Для преодоления покоя семян использовался метод прорастивания семян F<sub>1</sub> на питательной среде MS, содержащей индолил-3-масляную кислоту (ИМК) в концентрации 1 мг/мл. Метод прорастивания семян *in vitro* повышал их выживаемость, соответственно повышался выход гибридных растений. В результате последовательного многократного индивидуального отбора в течение нескольких поколений в гибридных популяциях *L. culinaris* x *L. orientalis* были сформированы рекомбинантные по признакам окраски цветка, семенной кожуры, семядолей, селекционные линии чечевицы. Высокий уровень рекомбинаций был показан RAPD анализом.

В комбинации *L. culinaris* x *L. tomentosus* для получения гибридных растений использовали метод культуры изолированных семяпочек. Гибридные семяпочки в возрасте 7...20 дней после опыления доращивали на питательных средах MS или B5, содержащих 1...2,25 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) в сочетании с индол-3-илуксусной или  $\alpha$ -нафтилуксусной кислотой (0,2...1 мг/мл). Иногда БАП заменяли зеатином. Развитие зародышей происходило как в направлении прямого эмбриогенеза, чаще на средах с зеатином, так и с формированием многочисленных побегов и почек на средах с БАП. В случае прямого эмбриогенеза проросток извлекали из среды и высаживали в сосуды с почвой. Если формировалась морфогенная ткань, процесс получения гибридных растений занимал более длительное время. Морфогенную ткань периодически пассировали на среды содержащие 0,6 мг/л БАП, отросшие побеги декапитировали и переносили на ризогенные среды с ИМК. Для повышения эффективности ризогенеза использовали метод культивирования побегов в обратной ориентации. В культуре тканей чечевицы *in vitro* наблюдался феномен цветения и формирования бобов, в том числе и жизнеспособных семян. Из 296 гибридных семяпочек данной комбинации начали развиваться *in vitro* 27, но получить растения-регенеранты удалось только из 3 семяпочек. Более жизнеспособным оказалось семенное потомство комбинации *L. culinaris* x *L. tomentosus* ILWL 120. В процессе отбора лучших по продуктивности и крупности семян растений в ряде поколений были сформированы рекомбинантные селекционные линии.

Урожайность лучших селекционных линий полученных в результате межвидовой гибридизации чечевицы в 2012 году в конкурсном сортоиспытании составила 1,8...2 т/га, что не уступало или превосходило стандартный сорт Рауза с урожайностью 1,9 т/га.

*Исследования поддержаны грантом Управления промышленности Орловской области № 12-04-97500.*

## USE OF BIOECHOLOGICAL APPROACHES IN INTERSPECIFIC HYBRIDISATION OF LENTIL

Galina Suvorova, Alexander Ikonnikov

All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, p/b Streletskoye, 302502, Orel, fax: (4862)403130, phone. (4862)403224, e-mail: [galina@vniizbk.ru](mailto:galina@vniizbk.ru)

There are seven known species of the genus *Lens* Mill. where only *L. culinaris* Medik. is a cultivated one while others are wild species. In the breeding process local populations of lentil are replaced by advanced varieties, that leads to a narrowing of genetic diversity of cultivated species. Wild relatives of lentil possessing a number of useful traits, in particular resistance to fungi diseases, could be source of additional variability for the cultivated lentil.

Among all possible cross combinations in the genus *Lens* we obtained interspecific lentil hybrids in crossing *L. culinaris* with *L. orientalis* (Boiss) Schmalh. (ILWL 7) and *L. tomentosus* Ladizinsky (ILWL 90, ILWL 120).

In a combination *L. culinaris* x *L. orientalis* hybrid seeds were obtained by means of conventional crossing. In order to overcome seed dormancy F<sub>1</sub> seeds were germinated on a nutrient media MS with 1 mg/l indole-3-butyric acid. *In vitro* germination increased seed survival and output of hybrid plants. As a result of regular multiple selection within a few generations of hybrid populations *L. culinaris* x *L. orientalis* there were developed breeding lines recombinant in flower, seed coat and cotyledon coloring. High level of recombination was demonstrated by RAPD analysis.

In a combination *L. culinaris* x *L. tomentosus* ovule rescue technique was used to recover interspecific hybrids. Hybrid ovules of 7 – 20 days after pollination old were cultured on nutrient media, containing mineral salts of MS or B5, 1...2,25 mg/l of 6-benzylaminopurine (BAP) in combination with 0,2...1 mg/l of indole-3-acetic acid or  $\alpha$ -naphthylacetic acid. Sometimes BAP was replaced by zeatin. Embryos developed in way of direct embryogenesis as well as in way of multiple shoot formation. In case of direct embryogenesis seedling was taken out from medium and transferred into pot with soil. When morphogenic tissue was formed, period of hybrid recovery took a longer time. Morphogenic tissue was periodically passed to fresh media containing 0,6 mg/l BAP, shoots were detrunated and passed to rooting media containing indole-3-butyric acid. To optimize rooting procedure of lentil shoots a method of soot culture in inverted orientation was applied. Phenomena of flowering and pod setting *in vitro* was observed. From 296 hybrid ovules being planted 27 explants began to grow and 3 hybrids were recovered. Seed progenies of cross *L. culinaris* x *L. tomentosus* ILWL 120 were more viable. As a result of selection of productive large-seeded plants in a few generations there were developed recombinant breeding lines of lentil.

Seed yield of the best recombinant lines in 2012 field trial was at the level of 1,8...2,0 t/ha, whereas yield of standard variety Rausa was 1.9 t/ha.

*The reported study was supported by grant of Industry department of Orel region, research project No.12-04-97500.*

**ВЛИЯНИЕ СМЕНЫ СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *DIOSCOREA DELTOIDEA* WALL.**

Титова М.В.<sup>1,2</sup>, Шумило Н.Ан.<sup>1</sup>, Куличенко И.Е.<sup>1</sup>, Горшкова Е.Н.<sup>1</sup>, Носов А.М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений РАН, 127276, Ботаническая 35, Москва

<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы Горы, 1, корп. 19.

E-mail: titomirez@mail.ru

При масштабировании аппаратного выращивания культур клеток до промышленных объемов важной задачей является мониторинг физиологического состояния клеток. В работе проводили оценку возможности использования в качестве подобного экспресс-теста анализ активности клеточного дыхательного метаболизма. Кроме того, поскольку кислород является одним из лимитирующих факторов при глубинном выращивании клеток *in vitro*, представлялось актуальным изучить влияние массообменных характеристик используемых биореакторов на дыхательную активность штаммов. Исследования проводили на примере штамма-продуцента *Dioscorea deltoidea* – продуцента фураностаноловых гликозидов, для которого при полупроточном выращивании в барботажных биореакторах (20 л и 630 л) в экспоненциальной фазе роста измеряли общую скорость поглощения кислорода и долю АО в этом процессе, а также содержание фураностаноловых гликозидов. Для каждого аппарата измерения проводили на протяжении 3-4 циклов субкультивирования, начиная со 2-ого цикла от момента инокуляции. Значения коэффициентов массопередачи по кислороду ( $K_{La}$ ,  $ч^{-1}$ ) для биореакторов определяли при режимах перемешивания и аэрации, оптимальных для выращивания штамма.

Полученные результаты показали, что максимальная доля цианидрезистентного дыхания наблюдалась при выращивании в 20 л барботажном биореакторе с точечным аэрирующим устройством (до 60-65 % от общей интенсивности дыхания). Для этого же аппарата были получены минимальные значения  $K_{La}$  (2.0 – 2.4  $ч^{-1}$ ), а также был отмечен более низкий уровень содержания фураностаноловых гликозидов (4.2 – 8.0 % к сухой массе клеток). Минимальная активность АО (в пределах 15-25 %) была отмечена для системы с более интенсивным массообменом по кислороду – 630 л барботажного биореактора с кольцевым аэратором ( $K_{La}$  7.1 – 8.0  $ч^{-1}$ ). Для этого же биореактора отмечали более высокие биосинтетические показатели (7.7 – 13.9 % к сухой массе клеток).

Таким образом, на примере аппаратного культивирования клеток *D. deltoidea* была показана зависимость активности цианидрезистентного дыхания от условий выращивания, в частности - от массообменных характеристик систем культивирования. Показана возможность использования этого показателя для мониторинга физиологического состояния культуры при масштабировании процесса выращивания.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ РОСТА И БИОСИНТЕЗА В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *TAXUS BACCATA* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В КОЛБАХ И БИОРЕАКТОРАХ

Титова М.В.<sup>1,2</sup>, Черняк Н.Д.<sup>1</sup>, Соловьева Л.<sup>1</sup>, Кочкин Д.В.<sup>1,2</sup>, Суханова Е.С.<sup>1</sup>,  
Спринчану Е.К.<sup>1</sup>, Носов А.М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений РАН, 127276, Ботаническая 35, Москва

<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы Горы, 1, корп. 19.

E-mail: titomirez@mail.ru

Отсутствие в нашей стране естественного растительного сырья для производства лекарственных препаратов влечет за собой необходимость получения и выращивания соответствующих культур клеток высших растений – продуцентов целевых вторичных метаболитов. Значительный интерес для медицины представляют растения рода *Taxus* – продуценты таксоидов или таксанов (дитерпеноидов сложного строения), которые являются ценнейшими противоопухолевыми агентами.

В ИФР РАН в 2008-2009 годах был получен ряд культур клеток разных видов *Taxus* [Глоба, Демидова, 2009], с различными ростовыми и биосинтетическими характеристиками.

В работе была использована суспензионная культура клеток *T. baccata* (линия 107ПВП) инициированная из каллусных культур клеток *T. baccata* в 2009 году научными сотрудниками лаборатории физиологии культивируемых клеток ИФР РАН Е.Б. Глобой и Н.Д. Черняк. Культивирование клеточной суспензии проводили в колбах на качалке при стандартных условиях и в барботажном биореакторе (рабочий объем 2 л) в режиме «отъем суспензии-долив среды» Химический анализ сухой клеточной биомассы проводили с применением ВЭЖХ. Для адекватной оценки результатов использовали два хроматографа - «Adgilent» серии 1200 (США) и «Perkin Elmer» серии 200 (США).

В результате проведенных экспериментов были исследованы цитологические и ростовые характеристики суспензионной культуры *T.baccata* при выращивании в колбах. Показано, что она обладает удовлетворительными ростовыми характеристиками (максимальное накопление биомассы клеток по сухому весу достигало 8-10 г/л, жизнеспособность - 93-95 % , индекс роста - 3.50). Был проведен скрининг на содержание таксоидов экстрактов биомассы линии 107ПВП. Обнаружено вещество, по хроматографической подвижности соответствующее паклитакселу. Проведенный с использованием диодноматричного детектора анализ спектров поглощения пиков соответствующих соединений подтвердил принадлежность исследуемых веществ к группе таксоидов. При выращивании суспензионной культуры *T.baccata* в барботажном биореакторе было проведено 5 циклов выращивания в режиме полупотока, общая продолжительность выращивания составила 109 суток. Показано, что при переходе к аппаратному культивированию ухудшение ростовых характеристик не происходит (максимальное накопление биомассы клеток по сухому весу в конце каждого из циклов субкультивирования достигало 12-16 г/л при жизнеспособности на уровне 80-93 % , индекс роста варьировал в пределах 3.50-5.50). В ходе фитохимического анализа экстрактов биомассы клеток *T.baccata* (линия 107ПВП), выращенной в биореакторе, также обнаружены вещества, по хроматографической подвижности и спектрам поглощения соответствующие баккатинолу III и паклитакселу.



## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИСКУССТВЕННОГО ЗАРАЖЕНИЯ ХРИЗАНТЕМ *CHRYSANTHEMUM VIRUS B (CVB)*

Титова С.М.<sup>1</sup>, Фирсов А.П.<sup>1,2</sup>, Митюшкина Т. Ю.<sup>1,2</sup>, Долгов С.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. (499) 977 95 13, e-mail: [fofonchik@mail.ru](mailto:fofonchik@mail.ru)

<sup>2</sup> Филиал Института биоорганической химии РАН, Россия, 142290, Московская обл. г. Пушкино, проспект Науки, д. 6, тел. (4967) 731 779, e-mail: [mitiouchkina@rambler.ru](mailto:mitiouchkina@rambler.ru)

Вирус *B* хризантем относится к роду карлавирусов, получивших свое название от латентного вируса гвоздики (*Carnation latent virus*). Вирус *B* хризантем представляет собой палочку диаметром 12 нм и длиной 680 нм. Коэффициент седиментации 168 S. Содержит одноцепочечную РНК, длиной 7500 нуклеотидов. Вирусную РНК покрывает белок оболочки (31-36 кДа). Проявления симптомов вирусного заболевания различны и зависят от условий выращивания и сорта растения. На листовых пластинках у одних сортов появляются желто-зеленые кольца и пятнистость, некротические пятна, едва видимая мозаика, у других – изменение окраски цветков, деформация листьев и т.д. Иногда симптомы могут отсутствовать. Согласно литературным данным, *CVB* передается механической инокуляцией, прививкой или некоторыми видами тлей (*Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Coloradoa rufomaculata*, *Macrosiphoniella sanborni*, *Rhopalosiphum rufomaculatum*) непersistентным образом.

Целью нашей работы является тестирование устойчивых линий трансгенных хризантем к вирусу *B*, ранее полученных на станции искусственного климата «Биотрон». Поэтому, на данном этапе наших исследований мы разрабатывали практический протокол искусственного заражения растений хризантем вирусом *B* хризантем.

Мы использовали здоровые растения хризантем сорта *White Snowdon* и инфицированные коммерческие селекционные линии хризантем, любезно предоставленные ГНУ Всероссийским научно-исследовательским институтом цветоводства и субтропических культур РАСХН (ВНИИЦиСК Россельхозакадемии). Были протестированы 2 способа инфицирования растений вирусом *B* хризантем – механическая инокуляция вируса и прививка. В первом случае, здоровые растения хризантем инфицировали втиранием, растительного сока содержащего *CVB*, на заранее поврежденную поверхность листовой пластинки, а также производили инфильтрацию препарата вируса в межклеточное пространство при помощи шприца. Во втором случае – инфицированные черенки селекционных линий хризантем прививали на здоровые растения хризантем *White Snowdon*. Анализировали привой, подвой и непривитый черенок, взятые с каждого растения инокулированной хризантемы. Затем исследуемые растения были проанализированы 2 способами – иммуноферментным и вестерн-блот анализами.

В результате эксперимента, визуальных симптомов проявления вируса не наблюдалось. ИФА и вестерн-блот анализы не детектировали наличие вируса *B* хризантем при механической инокуляции, однако метод прививки оказался более эффективным, что было подтверждено как ИФА так и вестерн-блот анализом, то есть, вирус *B* хризантем присутствовал в исследуемых образцах. Вестерн-блот показал наличие полосы, соответствующей белку оболочки *CVB* (~37 кДа), которая не наблюдалась в контрольных растениях. В результате наших исследований показано, что метод прививки является более эффективным, чем метод инфильтрации. Таким образом, в дальнейшем планируется проведение искусственного заражения и тестирование трансгенных хризантем с различными конструкциями, содержащими ген белка оболочки вируса *B*.

**DEVELOPMENT OF ARTIFICIAL INFECTION OF CHRYSANTHEMUM VIRUS B (CVB) IN CHRYSANTHEMUM****Titova S. M.<sup>1</sup>, Firsov A. P.<sup>1,2</sup>, Mitiouchkina T. Yu.<sup>1,2</sup>, Dolgov S.V.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, RAAS, Russia, 127550, Moscow, Timirjazevakaja street, 42, tel. (499) 977 95 13, e-mail: [f0t0nchik@mail.ru](mailto:f0t0nchik@mail.ru)

<sup>2</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Russia, 142290, Moscow Region, Puschino, Prospect of Science, 6, tel. (4967) 731 779, e-mail: [mitiouchkina@rambler.ru](mailto:mitiouchkina@rambler.ru)

Chrysanthemum virus B belongs to the genus carlavirus has received its name from the Carnation latent virus. Particles of CVB are filamentous, slightly flexuous, 680 nm in length and 12 nm in diameter. The sedimentation coefficient of 168 S. The carlavirus genome is a positive-sense, single-strand RNA. The genome of CVB is 7500 nucleotides long. The nucleic acid is encapsulated in a single coat protein of around 31-36 kDa. Chrysanthemums infected with CVB have various symptoms from mild leaf-mottling or vein-clearing to severe mosaic or flower-malformation, but sometimes they show no symptoms. According to published data, CVB is transmitted in a non-persistent manner by several aphid species such as *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Coloradoa rufomaculata*, *Macrosiphoniella sanborni* and *Rhopalosiphum ruformaculatum*. It could also be transmitted by grafting, and mechanical inoculation.

The aim of our research is to test the stable lines of transgenic chrysanthemums to the virus *B* in the previously obtained at the station artificial climate "Biotron". Therefore, at this stage of our research, we have developed a practical protocol artificial plant infection by a CVB in chrysanthemums.

We used a variety of healthy plants chrysanthemums 'White Snowdon' and infected commercial breeding lines chrysanthemums kindly provided by All-Russian Scientific Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops Agricultural Sciences (RAAS VNIITsiSK). We tested two methods by a virus infection of chrysanthemum plants - mechanical inoculation of the virus and the grafting. In the first case, chrysanthemums healthy plants infected by rubbing, sap extract containing CVB, to in advance the damaged surface of leaf blade, as well as infiltration of virus preparation produced in the extracellular space by a syringe. In the second case - the infected breeding lines of chrysanthemum cuttings grafted onto healthy chrysanthemum 'White Snowdon'. Analyzed graft, rootstock and unvaccinated stalk taken from each plant were inoculated with chrysanthemums. Then, the test plants were analyzed in 2 ways - ELISA and Western blot analyzes.

Consequently of the experiment, the visual display the symptoms of the virus were observed. ELISA and Western blot analysis detected no presence of Chrysanthemum virus B in the mechanical inoculation, but the method is more effective grafting has been confirmed as ELISA and Western blot analysis, i.e., of Chrysanthemum virus B present in the samples. Western blot showed the presence of the band corresponding to the coat protein CVB (~ 37 kDa), which was not observed in control plants. As a result of our studies have shown that grafting method is more efficient than the method of infiltration. Thus, after artificial infection is planned to hold and testing of transgenic chrysanthemums with different constructs containing the virus coat protein gene of B.

**ОСОБЕННОСТИ ГАМЕТОКЛОНАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ У ГЕНОТИПОВ  
МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ГИБРИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**  
**Трубачева Н.В., Осадчая Т.С., Кравцова Л.А., Першина Л.А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090, пр. Академика Лаврентьева, 10, факс: +7(282)333-12-78; тел: +7(383) 363-49-27\*2117, e-mail: natas@bionet.nsc.ru

Культивирование пыльников (широко используемый метод для получения дигаметоидных линий мягкой пшеницы, востребованных для исследований по генетике, функциональной геномике, селекции. Одним из ограничений этого метода является проявление гаметоидной изменчивости у развивающихся андрогенных растений. Наиболее распространенное ее проявление – альбинизм, связанный с делециями в хлоропластном геноме. В данной работе были поставлены задачи: 1) изучить возможное проявление гаметоидной изменчивости при культивировании пыльников мягкой пшеницы гибридного происхождения; 2) изучить характер передачи отдельных генов чужеродного происхождения, определяющих признаки устойчивости растений к грибным патогенам. В работу были включены сорта и линии яровой мягкой пшеницы, полученные в результате интрогрессивной гибридизации и несущие в ядерном геноме хромосомы (или их сегменты) чужеродного происхождения, а также аллоплазматические интрогрессивные линии мягкой пшеницы – носители цитоплазмы отдельных видов ячменя и отдельные хромосомы ржи посевной *S.cereale* или дикорастущего ячменя *H.marimum* ssp. *gussoneanum*. Растения-доноры выращивали в гидропонной теплице. Пыльники культивировали на среде Р-II с модификациями, а эмбрио-подобные структуры – на среде Гамборга В-5 без фитогормонов или с добавлением ИУК (ИАА) и кинетина. Хлорофилдефектные проростки и зеленые растения изучали с применением следующих методов: цитогенетические (поведение хромосом и анализ числа хромосом), геномной *in situ* гибридизации (идентификация хромосом и их сегментов чужеродного происхождения), ПЦР-анализ (выявление отдельных генов в ядерном геноме и анализ определенных последовательностей хлоропластной и митохондриальной ДНК у андрогенных растений, полученных при культивировании пыльников аллоплазматических линий). Среди жизнеспособных гаметоидов с измененным числом хромосом наиболее часто встречались анеуплоиды с  $2n=41$  и  $2n=43$ . У аллоплазматических генотипов, несущих цитоплазму ячменя и хромосомы ржи, цитогенетическая нестабильность характеризовала не только растения  $R_0$ , но и их самоопыленные потомки. Так, выявлены растения  $R_1$  и  $R_2$ -поколений с  $2n=42$  и  $2n=43$ , у которых в митозе наблюдали разрывы хромосом по центромере с последующим образованием телоцентрических хромосом. Обнаружены гаметоиды, у которых произошла элиминация пшенично-чужеродных транслокаций или определенных маркерных генов, ответственных за устойчивость к грибным патогенам. Изменений в структуре митохондриальной ДНК, ни у зеленых растений, ни у альбиносов отмечено не было, независимо от цитогенетической стабильности, или цитогенетической изменчивости этих растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (No11-04-00806).

**GAMETOCLONAL VARIATION IN GERMPLASM OF HYBRID COMMON WHEAT**  
**Trubacheeva N.V., Osadhaya T.S., Kravtsova L.A., Pershina L.A.**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090, Lavrent'ev av. 10, fax:  
+7(282)333-12-78; tel: +7(383) 363-49-27\*2117, e-mail: natas@bionet.nsc.ru

Anther culture is a wide used method for production of common wheat doubled lines, which are useful for genetics, functional genomics and breeding. One of the restrictions of this method is a gametoclinal variation in androgenic plants. The most common manifestation of it is an albinism determined by deletions in chloroplast genome. The aim of this work were: 1) to study the probable manifestation of gametoclinal variation in anther culture of hybrid common wheat; 2) to study the transmission of some alien genes determined the resistance to fungal pathogens. The plant material were: cultivars and lines of spring common wheat produced by introgressive hybridization, carrying alien chromosomes or their fragments, alloplasmic introgressive lines of common wheat with cytoplasm of barley species and rye or wild barley *H.marimum* ssp. *gussoneanum* chromosomes. Donor plants were grown in greenhouse. Anthers were cultivated on P-II medium with modifications, embryo-like structures on Gamborg B-5 medium without phytohormones or with additions of IAA and kinetin. Chlorophyll-defective seedlings and green plants were studied by following methods: cytogenetic (chromosome behavior and number), genomic in situ hybridization (alien chromosomes or their segments detection), PCR (detection of genes in nuclear, chloroplast and mitochondrial genomes in androgenic plants produced by anther culture of alloplasmic lines). Aneuploids  $2n=41$  and  $2n=43$  were the most often among viable gametoclones with changed chromosome number. In alloplasmic plants with barley cytoplasm and rye chromosomes cytogenetic instability was observed not only in  $R_0$  plants, but also in their self-pollinated progenies. For instance, we have revealed  $R_1$  and  $R_2$  plants with  $2n=42$  and  $2n=43$  in which the chromosome breaks at the centromeres and following telocentric chromosomes formation were observed. The gametoclones with eliminations of wheat-rye translocations or genes responsible for resistance to fungal pathogens were found out. There were no changes of the mitochondrial DNA neither in green plants nor in albinos irrespective of cytogenetic stability or instability of these plants.

The work was supported by **RFFR** (No11-04-00806).

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ

Турганбаева А.К., Хапилина О.Н., Какимжанова А.А., Тагиманова Д.С.,  
Ергалиева А.Ж.

РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Астана, 010000, ул. Валиханова 13/1, факс: (87172) 21-46-33, тел. (87172) 20-07-91, [lbs@biocenter.kz](mailto:lbs@biocenter.kz)

В настоящее время для выявления полиморфизма на разных уровнях: формы, линии, растения-регенеранта, сорта, вида, рода широко используют ДНК-маркеры. Использование ДНК-маркеров в селекционных процессах позволяет быстро и эффективно отбирать нужные генотипы растений. Современный уровень развития молекулярной биологии позволяет использовать различные классы молекулярных маркеров, выявляющие полиморфизм ДНК растений. Каждый тип маркеров позволяет получить представления о типах полиморфизма линий растений-регенерантов. Многие методы ДНК-анализа являются высокоинформативными, хорошо воспроизводятся, надежны при установлении индивидуальных особенностей генотипа. RAPD технологии являются важным инструментом для быстрой идентификации маркеров, связанных с засухоустойчивостью, и весьма эффективна при определении генетического изменения среди генотипов пшеницы. Наибольшее распространение при анализе генома растений приобрел метод *RAPD PCR* (*random amplify/led polymorphic DNA polymerase chain reaction*), основанный на амплификации геномной ДНК с помощью случайных десятичных праймеров. Метод *RAPD* позволяет анализировать индивидуальные растения и отдельные каллусы. *RAPD* анализ позволяет выявить полиморфизм ДНК у соматических вариантов. Высокая разрешающая способность *RAPD* метода позволяет обнаружить изменения наследственной информации клеток на разных этапах их культивирования, что может способствовать изучению природы соматической изменчивости.

Целью исследований являлось определение полиморфизма фрагментов ДНК пшеницы с использованием *RAPD* маркера.

Был проведен RAPD-ПЦР анализ, при этом используя различные генотипы пшеницы с разной степенью адаптационной способностью к стрессовым факторам среды. Для выявления генетической оригинальности сортов пшеницы были использованы специфичные праймеры для анализа полиморфизма фрагментов ДНК. RAPD ПЦР проводили с различными праймерами (OPA 17, OPD 17, OPN15, OPN 8).

В результате использования метода ПЦР для анализа растений пшеницы были подобраны наиболее подходящие праймеры RAPD (OPA 17, OPD 17, OPN15, OPN 8) для идентификации генетических особенностей сортов пшеницы. Если оценить суммарный спектр ампликонов участков ДНК с использованием различных RAPD праймеров, полученный на ДНК разных сортов и гибридов пшеницы, то можно насчитать от 6 до 14 различных фрагментов длиной от 520 до 4000 п.о. При амплификации с различными праймерами (OPD 17, OPN 15) были выявлены межсортовые отличия.

Таким образом общее количество ампликонов варьировало от 184 до 474 в зависимости от генотипа пшеницы. В спектрах ампликонов всех сортов и гибридов пшеницы, присутствовали фрагменты длиной от 520 до 4000 п.о. Все изученные генотипы различались между собой по рисунку выявленных спектров, только 2 праймера OPA17 и OPN8 оказались не полиморфными. В связи с этим были проанализированы различные генотипы пшеницы с использованием праймеров OPD17 и OPN15. В данном случае общее количество амплифицированных фрагментов по OPD17 составило 460, из которых 14 были полиморфными, в данном случае уровень детектируемого полиморфизма составил 3,04% по сравнению с праймером OPN15 - 2,10% соответственно.

Исходя из результатов ПЦР, проведенного с различными праймерами, можно предположить, что RAPD праймеры OPD17 и OPN15 могут быть использованы для выявления генетического полиморфизма пшеницы.

**GENOTYPING OF WHEAT WITH DNA-MARKERS****Turganbayeva A.K., Hapilina O.N., Kakimzhanova A.A., Tagimanova D.S.,  
Ergalieva A.Z.**

Republican State Enterprise "National Center for Biotechnology", Kazakhstan, Astana, 010000,  
st. Valikhanova 13/1, fax: (87172) 21-46-33, tel. (87172) 20-07-91, lbps@biocenter.kz

Currently, identification of polymorphism at different levels forms lines regenerated plants, variety, species, genus widely used DNA markers. The use of DNA markers in breeding processes quickly and effectively select the desired genotypes of plants. The present level of development of molecular biology allows the use of different classes of molecular markers that detect polymorphism DNA of plants. Each type of marker can get an idea of the types of polymorphism lines regenerated plants. Many methods of DNA analysis are highformativ-governmental, are well reproduced, reliable in determining the individual characteristics of the genotype. RAPD technology is an important tool for the rapid identification of markers associated with drought resistance, and is very effective in determining the genetic variation among genotypes of wheat. The most widespread in the plant genome analysis technique has gained RAPD PCR (random amplify / led polymorphic DNA polymerase chain reaction), based on amplification of genomic DNA using random primers ten-membered. RAPD method allows us to analyze individual plants and some calluses. RAPD analysis reveals DNA polymorphism in somaclonal variants. High resolution of the RAPD method can detect changes in genetic information of cells in different stages of cultivation, which can help you understand the nature of somaclonal variation.

The aim of research was to determine the polymorphism of DNA fragments of wheat using RAPD marker.

Was performed RAPD-PCR analysis, while using different wheat genotypes with varying degrees of adaptation ability to stress factors. To identify the genetic originality wheat-specific primers were used for the analysis of polymorphism of DNA fragments. RAPD PCR was performed with different primers (OPA 17, OPD 17, OPN15, OPN 8).

The use of the PCR method for the analysis of the wheat plants were chosen the most appropriate primers RAPD (OPA 17, OPD 17, OPN15, OPN 8) to identify the genetic characteristics of wheat varieties. If the total rate spectrum of DNA amplicons with different RAPD primers prepared on the DNA of different varieties and hybrids of wheat, it is possible to count from 6 to 14 of different fragments from 520 to 4000 bp. The different amplification primers (OPD 17, OPN 15) were identified intervarietal differences.

Thus, the total number of the amplicons varied from 184 to 474 depending on the genotype of wheat. In the spectra of the amplicons of all varieties and hybrids of wheat, attended fragments ranging in length from 520 to 4000 bp All the studied genotypes differed in pattern identified spectra, only 2 primer OPA17 and OPN8 were not polymorphic. In this regard, different genotypes were analyzed using primers wheat and OPD17 OPN15. In this case, the total number of amplified fragments was 460 OPD17 14 of them were polymorphic in this case the level of the detected polymorphism was 3.04% compared with a primer OPN15 - 2,10% respectively.

Based on the results of PCR performed with different primers, it can be assumed that the RAPD primers and OPD17 OPN15 can be used to identify genetic polymorphisms wheat.

**КЛЕТОЧНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ ПОВЫШЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЦЕННЫХ МЕТАБОЛИТОВ В РАСТЕНИЯХ *AGASTACHE RUGOSA*****Фоменко Т.И., Спиридович Е.В., Мазур Т.В., Юхимук А.Н.**

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», Минск, 270012, ул. Сурганова 2В, факс (017) 284-14-61, тел. (017) 284-14-73, e-mail: [fomenko\\_ti@mail.ru](mailto:fomenko_ti@mail.ru)

Многоколосник морщинистый *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze – многолетнее лекарственное и декоративное растение из семейства Яснотковые (*Lamiaceae*). Согласно фитохимической и этноботанической базе данных д-ра Дюка из разных частей многоколосника выделено 71 БАВ, которые обладают широчайшим биологическим действием, от противовоспалительного до противоопухолевого. *Agastache rugosa* является сильнейшим биостимулятором, соперничающим с женьшенем. В зависимости от содержания регуляторов роста в среде культивирования на листовых и стеблевых эксплантах наблюдали каллусогенез, индукцию и формирование адвентивных почек и побегов, либо ризогенез. Разработаны условия получения прямого и непрямого органогенеза для различных эксплантов в культуре *in vitro*. Была разработана биотехнологическая система создания и размножения новых форм многоколосника морщинистого с использованием методов клеточной инженерии.

На основе соматической вариабельности полученные растения-регенеранты с повышенным синтезом вторичных метаболитов, проведена их идентификация и изучение состава фенольных соединений. Из 36 соматклонов для биохимического анализа были отобраны растения, которые имели выраженные отличия от родительской формы по морфофизиологическим показателям. Соматклоны *Agastache rugosa* проходили адаптационный период при переводе их к условиям *ex vitro*. В фазе цветения в растениях-регенерантах оценили суммарное содержание фенольных веществ, флавонолов (класс флавоноидов) и дубильных веществ, а также количество флавоноида акацетина. Полученные соматклоны по содержанию флавонолов превосходят исходную форму (от 3 до 7 раз). Были отобраны для биохимического анализа 5 соматклонов-гиперпродуцентов фенольных соединений. Использование ВЭЖХ позволяет эффективно разделить и идентифицировать нелетучие и термолабильные компоненты водноспиртовых экстрактов лекарственных растений, которые невозможно идентифицировать другими методами. Увеличение площади пика акацетина после проведения кислотного гидролиза свидетельствует о присутствии значительного количества гликозифицированной формы этого соединения в экстрактах соматклонов многоколосника морщинистого.

С целью выяснения возможной генетической природы зафиксированной вариабельности биохимических параметров у отобранных соматклонов по сравнению с исходной формой *A. rugosa*, было предпринято мультилокусное ДНК-маркирование генотипов с использованием RAPD- и ISSR-техник. После предварительного скрининга 42 праймеров были отобраны три RAPD (OPA-03, OPC-02 и OPP-19) и два ISSR (UBC-827 и UBC-856) праймера, выявляющие наибольший полиморфизм между исследованными соматклонами. В результате ПЦР тотальной ДНК многоколосника морщинистого с отобранными произвольными и микросателлитными праймерами, были получены четкие воспроизводимые ампликоны, набор которых для каждого исследуемого соматклона и исходной формы характеризовался уникальностью, т.е. праймеры обнаруживали полиморфизм между образцами и таким образом позволили дифференцировать все исследованные генотипы. Построена консенсусная дендрограмма генотипов *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze, сгенерированная с использованием UPGMA алгоритма на основе 73 RAPD и 45 ISSR маркеров.

**CELLULAR BIOTECHNOLOGIES OF VALUABLE METABOLITES CONTENT  
INCREASE IN AGASTACHE RUGOSA PLANTS****Fomenko T.I., Spiridovich E.V. Masur T.V. Yukhimuk A.N.**

GNI "The central botanical garden of National academy of Sciences of Belarus", Minsk, 270012, Surganov St. 2B, fax (017) 284-14-61, ph. (017) 284-14-73, e-mail: fomenko\_ti@mail.ru

*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze is a perennial medicinal and ornamental plant from *Lamiaceae* family. According to the phytochemical and ethnobotanical database of Dr. Duke 71 BAS which possess antiinflammatory and antitumours action were extracted from different parts of *Agastache rugosa*. Giant-hyssor *rugosa* is the biostimulator competing to a ginseng. The conditions of direct and not direct organogenesis receiving were developed. It was observed callusogenesis, an induction and formation of adventiv shoots and/or roots Depending on the maintenance of certain regulators of growth on leaves and stems. The biotechnological system of creation and reproduction of new forms of *Agastache rugosa* with use of methods of cellular engineering was developed.

Plants-regenerants with the increased synthesis of secondary metabolites are received on the basis of somaklona variability and identification and studying of structure of phenolic connections is carried out them. Plants which had the expressed differences from a parental forms on morphophysiological sings were selected for the biochemical analysis from 36 received somaklons. Somaklons *Agastache rugosa* passed the adaptation period when translating them to *ex vitro* conditions. In a flowering phase in plants-regenerates estimated the total content of phenolic substances, flavons (a class of flavonoids) and tannins, and also quantity flavonoid acatsetin. All somaklons surpass the original form on the contents of phenolic substances (from 3 to 7 times). 5 somaklons hyper producers of phenolic connections were selected for biochemical analysis. The HPLC allows to divide and identify effectively nonvolatile and thermolabile components of alcoholic extracts of herbs which can't be identified other methods. The increase in the area of peak acatsetin after carrying out acid hydrolysis testifies to presence of a significant amount of a glikozilirovanny form of this connection at extracts giant-hyssor somaklons.

Multilokusny DNA marking of genotypes with use of RAPD-and the ISSR technician was undertaken for finding-out of possible genetic nature recorded variability biochemical parameters in selected somaklons. After preliminary screening of 42 primers three RAPD (OPA-03, OPC-02 and OPP-19) and two ISSR (UBC-827 and UBC-856) of the primer revealing the greatest polymorphism between investigated somaklons were selected. As a result of PCR of total DNA of *A. rugosa* a with selected any and microsatellite primers, were received accurate reproduced amplicons which set for everyone investigated somaklons and an initial form was characterized by uniqueness, i.e. primers found polymorphism between samples and thus allowed to differentiate all studied genotypes. *Agastache rugosa* genotypes dendrogram was constructed with the use of UPGMA algorithms on the basis of 73 RAPD and 45 ISSR markers.



## УКОРЕНЕНИЕ МИКРОЧЕРЕНКОВ СИРЕНИ В ВЕРМИКУЛИТЕ. Шипунова А.А., Валиков В.А.

Научно-производственный центр биотехнологии «Фитогенетика» - структурное подразделение ОАО «КБП», г.Тула, 300004, ул.Щегловская засека, д.59, тел/ф (4872) 41-31-16, тел.(4872) 41-21-06, e-mail: [kbp@fitogenetika.ru](mailto:kbp@fitogenetika.ru)

Сирень – одна из наиболее востребованных декоративных культур на рынке посадочного материала. Традиционные способы размножения этой культуры – прививка и черенкование. Однако эти приёмы имеют ряд недостатков: низкий процент укоренения черенков, а также приживаемости прививок и необходимость в постоянном удалении поросли. Наиболее рациональным и прогрессивным способом размножения сортовой сирени является клональное микроразмножение.

Известно, что клональное микроразмножение состоит из нескольких этапов: введения в культуру, собственно размножения на искусственных питательных средах, укоренение микрочеренков и адаптация *in vivo*. По нашим многолетним наблюдениям наиболее узким местом в технологии клонального микроразмножения сирени является этап укоренения микрочеренков. Цель исследований – сравнить эффективность укоренения микрочеренков сирени *in vitro* и *in vivo* в условиях теплиц. На этапе укоренения *in vitro* использовали половинный состав макросолей питательной среды МС с добавлением ауксинов – ИУК 1 мг/л и ИМК 1 мг/л. Длительность укоренения составляла 6 недель. Процент укоренения – 45%, среднее количество корней на одно растение – 0,8, средняя длина корней – 3,5 см. Кроме того, корни образовались низкого качества: хрупкие, часто обламывающиеся при высадке растений из сосудов, не имеющие вторичных корней, что значительно усложняет этап адаптации. На этапе укоренения микрочеренков сирени *in vivo* использовали низкие овощные ящики, наполненные до половины вермикулитом. Перед высадкой микрочеренков вермикулит проливали сначала водопроводной водой, а затем раствором двух ауксинов в концентрации ИУК 1мг/л и ИМК 1 мг/л. После высадки ящики полностью закрывали плёнкой – стрейч для создания 100% влажности в зоне укоренения. Длительность этапа укоренения составила 6 недель. При этом способе наблюдали 100% укоренение микрочеренков, средняя длина корней составила 11,6 см, среднее количество корней на одно растение – 3,9. Кроме того отмечено высокое качество корней: отсутствие ломкости, наличие вторичных корней.

По результатам исследований способ укоренения микрочеренков сирени в вермикулите оказался предпочтительнее традиционного укоренения на агаризованной среде *in vitro*. Кроме того, дальнейшая высадка укоренённых в вермикулите черенков в ящики с торфом (этап адаптации) показала 100% приживаемость и хороший рост, в то время, как укоренённые *in vitro* черенки на этапе адаптации показали приживаемость около 70% и сильное отставание в росте по сравнению с предлагаемой технологией.

**ROOTING OF LILAC MICRO-CUTTINGS IN VERMICULITE****Shipunova A.A., Valikov V.A.**

“Fitogenetika” scientific and production centre of biotechnology – “KBP” OJSC department, 59, Shcheglovskaya zaseka str., Tula, 300004, phone/fax (4872) 41-31-16, phone (4872) 41-21-06, e-mail: kbp@fitogenetika.ru

Lilac is one of the decorative cultures being in the greatest request in the planting material market. Implanting and grafting are traditional ways of its propagation. But such techniques are not exempt from some disadvantages: low percentage of cuttings rooting and survival rate of implants as well as a necessity of constant suckering. A clonal micro-reproduction is the most perspective and rational way of varietal lilac propagation.

A clonal micro-reproduction is known to consist of several phases: introduction into culture, cloning itself on artificial growing media, rooting of micro-cuttings and adaptation *in vivo*. According to our long-term observations the phase of micro-cuttings rooting is a technology bottleneck. Our research objective was to compare efficiency of lilac cuttings rooting *in vitro* and *in vivo* in a hothouse. A half-mix of macro-sols of MC growing medium with addition of such auxins as ИУК 1 mg/l and ИМК1 mg/l was used at the stage of rooting *in vitro*. The rooting lasted 6 weeks. The rooting percentage was 45%, average number of roots per plant was 0.8, average length of roots was 3.5 cm. In addition the roots formed were of low quality and fragile, often broke while being transplanted from pots, exempt from secondary roots, that considerably complicates the adaptation stage. Low vegetable boxes half-filled with vermiculite were used at the stage of lilac micro-cuttings rooting *in vivo*. Before planting of micro-cuttings the vermiculite was watered with tape water followed by two auxin solution: ИУК 1 mg/l and ИМК1 mg/l. After transplanting the boxes were completely covered with stretch film to create 100% humidity in the rooting area. The rooting lasted 6 weeks. With this technology 100% of micro-cuttings rooting was achieved, average length of roots was 11.6 cm, average number of roots per plant was 3.9. In addition the roots formed were of high quality: there was not any fragility, secondary roots were formed.

According to the results of the research the way of lilac micro-cuttings rooting in vermiculite appeared to be more preferable than a traditional rooting in an agarized medium *in vitro*. In addition the following planting of cuttings rooted in vermiculite into boxes filled with peat (adaptation phase) showed 100% survival rate and good growth, while cuttings rooted *in vitro* showed about 70% of survival rate at their adaptation phase and also considerable stagnation in comparison with the suggested technology.

## БИОХИМИЧЕСКАЯ И ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АЛЮМИНИЮ ОТОБРАННЫХ IN VITRO РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

Широких И.Г.<sup>1,2</sup>, Огородникова С.Ю.<sup>2</sup>, Баранова Е.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Государственное научное учреждение научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока имени Н.В.Рудницкого Россельхозакадемии, Киров, 610007, ул. Ленина, 166а, факс: (8332) 33-10-25, тел. (8332)33-10-26, e-mail: [irgenal@mail.ru](mailto:irgenal@mail.ru)

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, 167982, ул. Коммунистическая, 28, факс/тел.: (8332) 37-02-77, e-mail: [ecolab2@gmail.com](mailto:ecolab2@gmail.com)

<sup>3</sup> Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Москва, 127550, ул. Тимирязевская, 42, факс: (499) 977-09-47, тел. (499) 977-16-36, e-mail: [greenpro2007@rambler.ru](mailto:greenpro2007@rambler.ru)  
В каллусной культуре ячменя (*Hordeum vulgare* L.), инициированной сортом 999-93, на кислых селективных средах с алюминием отобраны устойчивые линии. Из двух линий получены растения-регенеранты. Семенное потомство (R<sub>3</sub>) регенерантных линий R917-01 и R781-04 в модельном опыте подвергли воздействию кислого (pH 4.0) и алюмокислого (pH 4.0+10 мг/л Al<sup>3+</sup>) растворов. Реакцию регенерантов на стресс сравнивали с исходным сортом по накоплению в листьях и корнях малонового диальдегида (МДА), выходу электролитов из корневых тканей, содержанию в листьях пластидных пигментов, антоцианов и аскорбиновой кислоты.

Оценка интенсивности перекисного окисления липидов по накоплению в листьях МДА показала, что обе регенерантные линии характеризовались, в сравнении с исходным сортом, существенно более низкой степенью окислительных повреждений, вызванных повышенной кислотностью и алюминием. В ответ на стресс накопление МДА в листьях регенерантов, в отличие от исходной формы, существенно не увеличивалось. Другие биохимические показатели проростков исходного сорта и полученных от него регенерантных линий изменялись под воздействием ионной токсикации различным образом. По содержанию хлорофиллов R917-01 превосходил на 8-15% исходный генотип, а R781-04, напротив, на 9% уступал ему при стрессе. Оценка степени вызванных алюминием окислительных повреждений по выходу электролитов из клеток корня показала, что у R917-01 экзоосмос не изменялся, тогда как у R781-04 утечка электролитов из корневых тканей в 1,6-1,8 раза была выше контрольного показателя, что указывает на угнетение в условиях стресса барьерной функции мембран у этого генотипа. Содержание аскорбиновой кислоты при стрессе в листьях R917-01 не изменялось, а у R781-04 снизилось на 14-29% по сравнению с контролем. Содержание антоцианов в присутствии алюминия увеличилось в листьях R781-04, и не изменилось у R917-01 и исходного генотипа. Таким образом, R917-01 пострадал при стрессе меньше, чем исходный сорт и линия R781-04.

Исследование структурной организации корней путём микроскопии показало, что у исходного сорта при наложении стресса произошли необратимые изменения, приводящие либо к уплотнению цитоплазмы и ядер, особенно в центральной части корня, либо к плазмолизу и разрушению клеток, особенно в меристематической зоне. На поперечных срезах было установлено повреждение клеток центральной части корня, формирование уплотненной наружной клеточной стенки клеток эпидермиса. В корнях R917-01, на фоне вызванных токсичными ионами изменений структуры, установлена сохранность большей части клеток. Клетки меристемы в этом случае оставались живыми, без существенных повреждений, что также свидетельствует о большей, в сравнении с исходным генотипом, устойчивости к алюминию линии R917-01.

Полученные результаты свидетельствуют, что индуцированная в культуре ткани изменчивость не всегда является адаптивной. Об этом говорит появление регенерантных форм с изменениями устойчивости к стрессовому фактору, как в сторону повышения, так и понижения значений результирующего признака по сравнению с исходным сортом.

**BIOCHEMICAL AND CYTOLOGICAL ESTIMATION IN RESISTANT TO ALUMINUM OF BARLEY PLANTS OBTAINED IN VITRO**

**Shirokikh I.G.<sup>1,2</sup>, Ogorodnikova S.Yu.<sup>2</sup>, Baranova E.N.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> N. V. Rudnitski Zonal North-East Agricultural Research Institute, Russian Academy of agricultural Science, Kirov, 610007, Lenina str., 166 a, fax: (8332) 33-10-25, tel. (8332)33-10-26, e-mail: [irgenal@mail.ru](mailto:irgenal@mail.ru)

<sup>2</sup> Institute of Biology, Komi Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982, Kommunisticheskaya str., 28, fax/ tel.: (8332) 37-02-77, e-mail: [ecolab2@gmail.com](mailto:ecolab2@gmail.com)

<sup>3</sup> All-Russia research institute of agricultural biotechnology Russian Academy of agricultural science, Moscow, 127550, Timiryasevskaya str., 42, fax: (499) 977-09-47, tel. (499) 977-16-36, e-mail: [greenpro2007@rambler.ru](mailto:greenpro2007@rambler.ru)

Callus lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) initiated by variety 999-93, resistant to aluminum toxicity from which plants regenerated were obtained in acid selective systems with aluminum. Seeded progeny (R3) lines R917-01 and R781-04 in the model experiment were exposed to acidic (pH 4.0) and aluminium (pH 4.0 +10 mg / l Al<sup>3+</sup>) solutions. The reaction to stress of plants regenerated was compared with the initial variety for the ability accumulate malonic dialdehyde (MDA) in the leaves and roots, electrolytes out of the root tissue, content of plastid pigments, anthocyanins and ascorbic acid in the leaves.

It is shown that lines of barley R917-01 and R781-04 in comparison with the variety 999-93 have lower degree of oxidative damage, which is caused by high acidity and aluminum. Accumulation of MDA in leaves of plants regenerated is not significantly increased as compared with the original form. Other biochemical parameters of seedlings of barley 999-93 and the regenerants were modified by ion intoxication differently. The chlorophyll *a* and *b* content in leaves of the regenerants R917-01 was 8-15% higher, and in leaves of regenerants R781-04 was 9% lower in comparison with the initial form. Differences in barrier functions of membranes between the regenerants and the original genotype were judged from the amount of efflux of electrolytes from leaf tissue. It was 1,6-1,8 times greater in lines R781-04 as compared with initial form 999-93. Efflux of electrolytes out the line of R 917-01 under stress has not changed. Ascorbic acid content in leaves of R917-01 under stress did not change, while in the R781-04 it decreased by 14-29% as compared with the control line. The content of anthocyanins in presence of aluminum in the leaves of R781-04 increased, and in R917-01 and the original genotype did not change. Thus, R917-01 suffered from the stress less than the initial genotype and line R781-04.

Microscopy study of structural organization of the roots showed that the initial variety in stress had irreversible changes causing either seal or cytoplasm and nuclei, especially in the central part of the root, or to plasmolysis and cells destruction, especially in the meristematic zone. On cross-section damages of cells of the central part of the root were, found as well as forming compacted outer cell wall of the epidermal cells. In the roots of R917-01, in conditions of changes caused by toxic ions structure changes most of the were cells safe in this case. Meristem cells were alive, with no significant damage, which also indicates its greater resistance to aluminum line R917-01, as compared with the original genotype.

The results suggest that the variation induced in tissue culture is not always adaptive. This is evidenced by the appearance of modified forms of regenerants differently resistant to stress factors like more or less, as compared with the original genotype.

## ПОЛУЧЕНИЕ *IN VITRO* ГЕНОТИПОВ ЯЧМЕНЯ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ТОКСИЧНЫМ МЕТАЛЛАМ

Шуплецова О.Н., Широких И.Г.

ГНУ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока  
Россельхозакадемии, г. Киров, 610007, ул. Ленина, 166 а,  
тел. (8332) 331026, e-mail: [olga.shuplecova@mail.ru](mailto:olga.shuplecova@mail.ru)

Наряду с повышенной кислотностью и высоким содержанием ионов алюминия и марганца, характерными для подзолистых и дерново-подзолистых почв Нечерноземной зоны России, для ряда зональных почв отмечается высокий уровень загрязнения тяжелыми металлами, в частности, кадмием. Ионная токсикация наносит существенный вред культурным растениям, особенно при сокращении объемов известкования почв и, как следствие, повышении подвижности ионов токсичных металлов в почвенном растворе. В настоящее время, несмотря на интенсификацию генно-инженерных работ, селекция – пока единственное реальное решение вопроса в создании генотипов растений, способных переносить токсическое действие металлов без снижения урожайности. Для решения поставленной задачи использовали клеточную селекцию, как способ повышения адаптивного потенциала культурных растений.

Целью работы являлась разработка селективных условий для отбора каллусных линий ячменя, устойчивых к токсичным ионам  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Al^{3+}$  с последующим получением растений-регенерантов с измененными свойствами, семенное потомство которых может быть перспективным селекционным материалом.

Изучена генотипическая реакция каллусной ткани 8 сортов ячменя на введение в питательную среду  $Cd^{2+}$  (0-25 мкг/мл) и  $Mn^{2+}$  (0-350 мкг/мл) на этапах пролиферации и органогенеза. Построены дозовые кривые и выявлены оптимальные для отборов концентрации: ионов кадмия 15 - 20 мг/л, марганца — 250 мг/л. Установлено существенное снижение выживаемости каллуса при изменении pH среды от 6,5 до 4,5. Сравнительное изучение фитотоксического действия кадмия и марганца в сульфатной и хлоридной форме показало большую гибель каллуса ячменя в присутствии хлоридов, чем сульфатов.

Для проведения отборов устойчивых форм были установлены кратность и последовательность введения в селективные среды ионов  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Al^{3+}$  как индивидуально, так и в оптимальных сочетаниях. Показана целесообразность проведения в каллусной культуре ступенчатой селекции на устойчивость к кадмию и жесткой селекции – на устойчивость к марганцу и алюминию. Изучение комбинированного действия токсичных металлов позволило установить, что сочетание в питательной среде алюминия (25 мг/л) с марганцем (250 мг/л) снижало выживаемость каллуса в 2,5-3,5 раза по сравнению с выживаемостью на средах с отдельным введением этих ионов, а способность каллуса к морфогенезу утрачивалась полностью. В то же время, добавление к алюминию (25 мг/л) кадмия (20 мг/л) не оказало существенного влияния на выживаемость каллуса и незначительно изменяло частоту морфогенеза и регенерации. Для практического использования, тем не менее, более пригодны схемы отбора каллусных линий с последовательным введением в селективные среды ионов токсичных металлов, чем одновременное их введение, при котором возможны непредсказуемые кумулятивные эффекты, способные привести к утрате регенерационной способности каллусной ткани.

В результате клеточной селекции получены каллусные культуры ячменя, устойчивые к ионам  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , а также комплексам ионов  $Mn^{2+}$  и  $Al^{3+}$ ;  $Cd^{2+}$  и  $Al^{3+}$ . Созданы регенерантные растения, семенное потомство которых передано в дальнейший селекционный процесс для создания сортов ячменя, устойчивых к ионной токсикации без снижения продуктивности.

**OBTAINING *IN VITRO* GENOTYPES BARLEY WITH RESISTANCE TO TOXIC METALS****Shupletsova O.N., Shirokikh I.G.**

N.V. Rudnitski Zonal North-East Agricultural Research Institute, Russian Academy of agricultural Sciences, Kirov, 610007, Lenin st., 166-a,

Tel. (8332) 331026, e-mail: olga.shuplecova @ mail.ru

Along with high acidity and high content of aluminum and manganese ions that are characteristic of podzolic and sod-podzolic soils of Non-Chernozem zone of Russia, for a number of zonal soil has high levels of contamination by heavy metals, in particular cadmium. Ion intoxication causes significant harm to the crop, especially in reducing the volume of soil liming and, as a consequence, increase the mobility of toxic metal ions in the soil solution. Currently, despite the intensification of genetic engineering work, selection - so far the only real solution to the problem in the creation of plant genotypes that can carry toxic effects of metals without reducing crop yields. To solve the problem using the cell selection as a way to enhance the adaptive capacity of crops.

The purpose of the work was to develop a selective conditions for the selection of callus barley lines resistant to the toxic ions  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Al^{3+}$  and then obtaining regenerated plants with altered characteristics, seed progeny of which may be a promising breeding material.

Genotypic response studied callus 8 barley to introduction into the medium  $Cd^{2+}$  (0-25  $\mu g / ml$ ) and  $Mn^{2+}$  (0-350  $\mu g / ml$ ) on the proliferation stage and organogenesis. Dose curves were constructed and identified for the selection of optimal concentrations: cadmium ions 15 - 20  $mg / l$ , of manganese - 250  $mg / l$ . Established significant decrease in survival callus changing the pH from 6.5 to 4.5. A comparative study of the phytotoxic action of cadmium and manganese sulfate and chloride form callus showed greater death of barley in the presence of chlorides, sulfates than.

For the selection of resistant forms were identified multiple and succession carrying in ion selective medium  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Al^{3+}$ , both individually and in optimal combinations. The expediency of a callus culture stepped selection for resistance to cadmium and through selection - for resistance to manganese and aluminum. Study of the combined action of toxic metals revealed that the combination of the medium of aluminum (25  $mg / l$ ) and manganese (250  $mg / l$ ) reduced the survival callus 2.5-3.5 times in comparison with survival on media separate from the introduction of these ions, and the ability to callus morphogenesis was lost completely. At the same time, the addition of the aluminum (25  $mg / l$ ), cadmium (20  $mg / l$ ) had no significant effect on the survival of callus and slightly changed the frequency of morphogenesis and regeneration. For practical use, however, a suitable selection scheme callus lines with successive introduction of selective media toxic metal ions than their simultaneous introduction, where possible unpredictable cumulative effects capable of bringing the loss of regenerative capacity of the callus tissue.

As a result of cell selection derived callus cultures of barley resistant to ions  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , as well as complexes of ions  $Mn^{2+}$  and  $Al^{3+}$ ;  $Cd^{2+}$  and  $Al^{3+}$ . Created regenerantnye plant seed progeny are referred to the further selection process for the obtaining of barley sorts that are resistant to ion intoxication, without reducing productivity.

**ВТОРИЧНАЯ СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ КАРТОФЕЛЯ**  
**Яковлева Г.А., Семанюк Т.В., Дубинич В.Л., Родькина И.А., Щурко К.А.,**  
**Маханько О.В., Монархович С.В.**

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», Беларусь, Минский район, 223013, п. Самохваловичи, ул. Ковалёва 2а,  
факс: (+375-17) 506-70-01, тел.: (+375-17) 506-69-98, e-mail: [y\\_galina@tut.by](mailto:y_galina@tut.by)

Культурный картофель (*Solanum tuberosum* L.) имеет один из самых больших генетических пулов, который насчитывает более 200 видов. Прямой перенос генов от диких видов в культурный картофель затруднен барьерами пред- и пост- зиготной несовместимости. Слияние соматических протопластов двух различных геномов с последующей регенерацией растений и отбором гибридов позволяет преодолеть репродуктивные барьеры и расширить гермоплазму, доступную для селекции. При вторичной соматической гибридизации (ВСГ) один из партнеров или оба представлены соматическими гибридами.

Протопласты из мезофилла листа были слиты в присутствии ПЭГ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pH}=10$ . Из значительного количества полученных колоний регенерированы 990 побегов в 7-ми комбинациях ВСГ: 1) P – ЛДГ (*S. tuberosum*, 2x) + 10D-1 [*S. polyadenium* + (*S. etuberosum* × *S. brevidens*)]; 2) S – 10D-1 + *S. bulbocastanum*; 3) 6D – 429 (*S. tuberosum*, 2x) + 1D-37-4 [86-6 (*S. tuberosum* × *S. chacoense*) + *S. cardiophyllum*]; 4) 7D – 1D-37-4 + Л30-1-2 [78563-76 (*S. tuberosum*, 4x) + *S. caripense*]; 5) 8D – 1D-37-4 + *S. boliviense*; 6) 11D – 10D-1 + *S. boliviense*; 7) 12D – Sc4-18 [DL4-18 (ЛДГ + *S. bulbocastanum*) × 88.34/14] + *S. pinnatisectum*. Использовано три первичных соматических гибрида: 10D-1 (комб. 1, 2, 6), 1D-37-4 (комб. 3, 4, 5), Л30-1-2 (комб. 4). Первичный соматический гибрид DL4-18 – материнская форма полового гибрида Sc4-18, который является одним из партнеров комбинации ВСГ №7.

Вторичные соматические гибриды комбинаций P (№1), S (№2) and 6D (№3) идентифицированы по изозимам пероксидазы. Соматический гибрид идентифицирован в ПЦР с SSR-маркерами для 12 из 80 регенерантов комбинации №7. Дополнительно SCAR маркеры Sblb на гермоплазму *S. bulbocastanum* и COS4 на гермоплазму не клубненоса *S. etuberosum* были использованы для подтверждения гибридности в комбинации S. Определение гибридности регенерантов комбинаций 7D, 11D и 12D в процессе работы.

Цветущие растения описаны для регенерантов всех комбинаций за исключением 11D. Ягоды от свободного опыления и кроссов собраны на растениях комбинаций 1 (P), 2 (S), 3 (6D), 4 (7D), 5 (8D). Четыре семени, выделенные из двух ягод гибрида P2-17 в условиях *in vitro* дали 3 сеянца, два из которых 09P/1-2 и 09P/1-3 успешно скрестили с *S. tuberosum*, 4x. Вторичный соматический гибрид P2-17 и его половые потомки 09P/1-2, 09P/1-3 содержат гермоплазму не клубненоса *S. etuberosum* согласно данным ПЦР со SCAR маркером COS4.

Образцы, устойчивые к Y-вирусу картофеля (YVK), выявлены в популяциях растений-регенерантов комбинаций P (№1), S (№2), 6D (№3), 8D (№5) в тесте с прививкой на растения томата, инфицированные различными штаммами YVK. Устойчивые к фитофторозу образцы выделены в популяции соматических гибридов комбинации S к мексиканским видом *S. bulbocastanum*.

## SECONDARY SOMATIC HYBRIDIZATION OF POTATO

Yakovleva G.A., Semanvuk T.V., Dubinich V.L., Rodzkina I.A., Schurko K.A.,  
Makhanko O.V., Manarkhovich S.V.

Research and Practical Centre of National Academy of Sciences of Belarus for Potato, Fruit and Vegetable Growing, Belarus, Minsk region, 223013, Samokhvalovichy, 2a Kovaleva St, fax: (+375-17) 506-70-01, tel.: (+375-17) 506-69-98, e-mail: [y\\_galina@tut.by](mailto:y_galina@tut.by)

The cultivated potato *Solanum tuberosum* has one of the largest gene pools, including more than 200 wild relatives. Gene transfer from these species through conventional breeding is difficult owing to sexual incompatibility or reproductive barriers. Somatic hybridization via protoplast fusion is a possible alternative for gene transfer from these species to cultivated crops. The technique involves the fusion of protoplasts of the two different genomes followed by regeneration of plantlets and selection of hybrids. It was used for overcome sexual barriers and broadening potato germplasm accessible for breeding. The secondary somatic hybridization involves the fusion of protoplasts of the two partners, one of which or both partners are presented by the somatic hybrids.

The mesophyll leaf protoplasts were fused in presence PEG,  $\text{Ca}^{2+}$ , pH=10, large numbers of colonies were obtained and 990 shoots were regenerated in 7 combinations of secondary somatic hybridization: 1) P – LDG (*S. tuberosum*, 2x) + 10D-1 [*S. polyadenium* + (*S. etuberosum* × *S. brevidens*)]; 2) S – 10D-1 + *S. bulbocastanum*; 3) 6D – 429 (*S. tuberosum*, 2x) + 1D-37-4 [86-6 (*S. tuberosum* × *S. chacoense*) + *S. cardiophyllum*]; 4) 7D – 1D-37-4 + L30-1-2 [78563-76 (*S. tuberosum*, 4x) + *S. caripense*]; 5) 8D – 1D-37-4 + *S. boliviense*; 6) 11D – 10D-1 + *S. boliviense*; 7) 12D – Sc4-18 [DL4-18 (LDG + *S. bulbocastanum*) × 88.34/14] + *S. pinnatisectum*. Three primary somatic hybrids were used: 10D-1 (comb. N1, 2, 6), 1D-37-4 (comb. N3, 4, 5), L30-1-2 (comb. N4). The primary somatic hybrid DL4-18 was female parent of sexual hybrid Sc4-18 – one of the partners of combination N7.

The secondary somatic hybrid plants were identified by their isoenzyme peroxidase patterns in combinations P (comb. N1), S (comb. N2) and 6D (comb. N3). Molecular analysis with SSR-markers of 12 from 80 regenerated shoots was used for revealing hybrid in combination 7D (comb. N4). Additionally SCAR markers Sblb of *S. bulbocastanum* germplasm and COS4 non-tuberous germplasm *S. etuberosum* were used for confirmation hybridity of plants which were regenerated in combination S. The determination hybridity of regenerants of fusion combinations 7D, 11D and 12D are in the process.

Bloomed plants were revealed between regenerants of all combinations of secondary somatic hybridization except of 11D. The berries from free pollination and crosses with cultivated potato were collected from plants regenerated in combinations numbers 1 (P), 2 (S), 3 (6D), 4 (7D), 5 (8D). The four seeds were isolated from two berries obtained in free pollination of somatic hybrid P2-17 (comb. N1). Three seeds were germinated *in vitro*. Two from three obtained seedlings 09P/1-2 and 09P/1-3 were crossed successfully with cultivated potato. The secondary somatic hybrid P2-17 and their sexual progeny 09P/1-2 and 09P/1-3 were positive for SCAR marker COS4 which confirmed the presence in their genomes non-tuberous germplasm *S. etuberosum*.

The PVY resistant samples were found within populations of regenerants of combinations P (N1), S (N2), 6D (N3), 8D (N5) in the test with grafting on Y-affected tomato plants. Late blight resistant samples were detected within population of somatic hybrids S with species *S. bulbocastanum*.



## СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ КАРТОФЕЛЯ: ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

**Яковлева Г.А., Семанок Т.В., Дубинич В.Л., Родькина И.А., Щурко К.А.,  
Монархович С.В.**

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», Беларусь, Минский район, 223013, п. Самохваловичи, ул. Ковалёва 2а,  
факс: (+375-17) 506-70-01, тел.: (+375-17) 506-69-98, e-mail: [y\\_galina@tut.by](mailto:y_galina@tut.by)

Один из самых больших генетических пулов ценных для сельскохозяйственных культур генов принадлежит культурному картофелю (*Solanum tuberosum* L.), он насчитывает более 200 видов. Наличие пред- и пост-зиготных барьеров и различие в уровне функциональной ploидности, определяемой балансовым числом эндосперма (EBN) препятствуют прямому переносу генов из диких видов в *S. tuberosum*. Соматическая гибридизация, как альтернативный классической селекции метод, обеспечивает создание предселекционного материала с увеличенной генетической вариабельностью и ценными для селекции признаками от диких видов. Дополнительным преимуществом соматической гибридизации является возможность одновременного переноса ядерных и цитоплазматических генов и сохранения их биоразнообразия.

Критический момент соматической гибридизации – проблема с фертильностью соматических гибридов и их способностью к генерации жизнеспособного потомства в кроссах с культурным картофелем. Генерация полового потомства соматических гибридов имеет самостоятельную ценность независимо от наличия ценных для селекции признаков вследствие увеличения генетического пула доступного селекционеру.

Количество успешных соматических гибридов между *S. tuberosum* и другими представителями *Solanum* ограничено 10 видами: *S. acaule*, *S. brevidens*, *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. circaefolium*, *S. commersonii*, *S. etuberosum*, *S. nigrum*, *S. pinnatisectum* and *S. tarnii*. Как успешные мы рассматриваем соматические гибриды, обладающие желаемым для селекционера признаком, перенесенным от дикого вида, и способные скрещиваться с тетраплоидным картофелем, как правило, в качестве материнской формы.

В наших экспериментах межвидовые соматические гибриды картофеля получены химическим слиянием протопластов мезофилла листа в 16 комбинациях, в том числе 4 – во вторичной соматической гибридизации. Половое потомство получено в 7 комбинациях. Как правило, необходимо наличие фертильности у одного из партнеров соматической гибридизации. Первые несколько лет вегетативного размножения (от 2 до 6 в зависимости от комбинации) необходимы для стабилизации соматических гибридов, полученных слиянием суспензий протопластов 2-х родителей.

Для успешных соматических гибридов 5-ти комбинаций получено 2 и более половых поколений, в том числе по комбинациям: SB – тетраплоид *S. tuberosum* 78563-76 + *S. bulbocastanum*, 2D – 86-6 (*S. tuberosum* × *S. chacoense*) + *S. etuberosum*, 4D – 86-6 + Л49-2 (*S. etuberosum* × *S. brevidens*) – 4 и более; DL – дигаплоид *S. tuberosum* ЛДГ + *S. bulbocastanum* – 3; F – 78563-76 + *S. polyadenium* и P – ЛДГ (*S. tuberosum*, 2x) + 10D-1 [*S. polyadenium* + (*S. etuberosum* × *S. brevidens*)] – 2. Соматические гибриды SB и их половые поколения устойчивы к фитофторозу листьев и клубней и к Y-вирусу картофеля (YBK). Они содержат ген устойчивости к фитофторозу *RB* (*Rpi-blb1*) из *S. bulbocastanum*. Соматические гибриды 2D и 4D с неclubненосами и их половые поколения устойчивы к вирусам картофеля Y и L. Они включают гермоплазму неclubненосного вида *S. etuberosum* согласно ПЦП со SCAR маркером COS4. Соматические гибриды комбинаций SB, F, DL, 2D, 4D имеют различные сочетания геномов пластид и митохондрий согласно данным ПЦП с маркерами на хлоропластный (NTCP09, ALC\_1/ALC\_3) и митохондриальный (ALM\_1/ALM\_3, ALM\_4/ALM\_5) геномы.

## SECONDARY SOMATIC HYBRIDIZATION OF POTATO

Yakovleva G.A., Semanvuk T.V., Dubinich V.L., Rodzkina I.A., Schurko K.A.,  
Makhanko O.V., Manarkhovich S.V.

Research and Practical Centre of National Academy of Sciences of Belarus for Potato, Fruit and Vegetable Growing, Belarus, Minsk region, 223013, Samokhvalovichy, 2a Kovaleva St, fax: (+375-17) 506-70-01, tel.: (+375-17) 506-69-98, e-mail: [y\\_galina@tut.by](mailto:y_galina@tut.by)

The cultivated potato *Solanum tuberosum* has one of the largest gene pools, including more than 200 wild relatives. Gene transfer from these species through conventional breeding is difficult owing to sexual incompatibility or reproductive barriers. Somatic hybridization via protoplast fusion is a possible alternative for gene transfer from these species to cultivated crops. The technique involves the fusion of protoplasts of the two different genomes followed by regeneration of plantlets and selection of hybrids. It was used for overcome sexual barriers and broadening potato germplasm accessible for breeding. The secondary somatic hybridization involves the fusion of protoplasts of the two partners, one of which or both partners are presented by the somatic hybrids.

The mesophyll leaf protoplasts were fused in presence PEG,  $\text{Ca}^{2+}$ , pH=10, large numbers of colonies were obtained and 990 shoots were regenerated in 7 combinations of secondary somatic hybridization: 1) P – LDG (*S. tuberosum*, 2x) + 10D-1 [*S. polyadenium* + (*S. etuberosum* × *S. brevidens*)]; 2) S – 10D-1 + *S. bulbocastanum*; 3) 6D – 429 (*S. tuberosum*, 2x) + 1D-37-4 [86-6 (*S. tuberosum* × *S. chacoense*) + *S. cardiophyllum*]; 4) 7D – 1D-37-4 + L30-1-2 [78563-76 (*S. tuberosum*, 4x) + *S. caripense*]; 5) 8D – 1D-37-4 + *S. boliviense*; 6) 11D – 10D-1 + *S. boliviense*; 7) 12D – Sc4-18 [DL4-18 (LDG + *S. bulbocastanum*) × 88.34/14] + *S. pinnatisectum*. Three primary somatic hybrids were used: 10D-1 (comb. N1, 2, 6), 1D-37-4 (comb. N3, 4, 5), L30-1-2 (comb. N4). The primary somatic hybrid DL4-18 was female parent of sexual hybrid Sc4-18 – one of the partners of combination N7.

The secondary somatic hybrid plants were identified by their isoenzyme peroxidase patterns in combinations P (comb. N1), S (comb. N2) and 6D (comb. N3). Molecular analysis with SSR-markers of 12 from 80 regenerated shoots was used for revealing hybrid in combination 7D (comb. N4). Additionally SCAR markers Sblb of *S. bulbocastanum* germplasm and COS4 non-tuberous germplasm *S. etuberosum* were used for confirmation hybridity of plants which were regenerated in combination S. The determination hybridity of regenerants of fusion combinations 7D, 11D and 12D are in the process.

Bloomed plants were revealed between regenerants of all combinations of secondary somatic hybridization except of 11D. The berries from free pollination and crosses with cultivated potato were collected from plants regenerated in combinations numbers 1 (P), 2 (S), 3 (6D), 4 (7D), 5 (8D). The four seeds were isolated from two berries obtained in free pollination of somatic hybrid P2-17 (comb. N1). Three seeds were germinated *in vitro*. Two from three obtained seedlings 09P/1-2 and 09P/1-3 were crossed successfully with cultivated potato. The secondary somatic hybrid P2-17 and their sexual progeny 09P/1-2 and 09P/1-3 were positive for SCAR marker COS4 which confirmed the presence in their genomes non-tuberous germplasm *S. etuberosum*.

The PVY resistant samples were found within populations of regenerants of combinations P (N1), S (N2), 6D (N3), 8D (N5) in the test with grafting on Y-affected tomato plants. Late blight resistant samples were detected within population of somatic hybrids S with species *S. bulbocastanum*.

---

## Авторский указатель

<i>Bányai P., Kursinszki L., Kuzovkina I., Szőke É.</i>	206
<i>Leistner E.</i>	40
<i>Miroshnichenko D.N., Dolgov S.V.</i>	245
<i>Paek K. Y.</i>	41
<i>Park S.Y., Moon H.K., Shin H., Kang K.S., Paek K.Y.</i>	90
<i>Touraev A.</i>	42
<b>А</b>	
<i>Агафодорова М.Н., Солодка Л.А., Лапотышкина Л.И., Клименко И.А., Шамустакимова А.О.</i>	202
<i>Акулов А.Н., Горшков О.В., Румянцева Н.И.</i>	156
<i>Алексеева В.В., Мудрик В.А.2, Рукавцова Е.Б., Голубчикова Ю.С., Ермошин А.А.</i>	204
<i>Амброс Е.В., Полубоярова Т.В., Новикова Т.И.</i>	91
<i>Амирова А.К., Касымхан К., Бишимбаева Н.К., Рахимбаев И.Р.</i>	56
<i>Анапияев Б.Б., Искакова К.М., Бейскенбек Е.Б., Казкеев Д.Т., Жанбырбаен Е.А.</i>	95
<i>Антоненко Е.В., Кременевская Е.М., Ермишина Н.М., Лемеш В.А.</i>	93
<b>Б</b>	
<i>Беккужина С.С., Рахимбаев И.</i>	332
<i>Балекин А.Ю., Высоцкая О.Н.</i>	268
<i>Белинская Е.В., Тымчук С.М., Дербизова О.Ю.</i>	97
<i>Бишимбаева Н.К.</i>	99
<i>Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Карабаев М.К., Рахимбаев И.Р.</i>	101
<i>Бишимбаева Н.К., Парменова А.К., Шилманова А.А., Муртазина А.С., Рахимбаев И.Р.</i>	58
<i>Бободжанова Х.И., Абдулаллишоева С.Ф., Ясаулова Ш.К., Бабаева С.Х.</i>	270
<i>Бойкова Н.В., Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Матора Л.Ю., Бурыгин Г.Л., Щеголев С.Ю.</i>	334
<i>Бородай В.В., Бальвас К.М., Миголь М.О.</i>	60
<b>В</b>	
<i>Валиков В.А.</i>	272

<i>Вагапова Т.И., Сидорова Т.Н., Долгов С.В.</i>	103
<i>Валеева Л.Р., Нямсурэн Ч., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р.</i>	207
<i>Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Оркодашвили А.М., Баймиев А.Х.</i>	209
<i>Видягина Е.О., Ковалицкая Ю.А., Шестибратов К.А.</i>	211
<i>Видягина Е.О., Филиппов М.В., Шестибратов К.А.</i>	273
<i>Власова А.А., Скляр Ю.А., Пушин А.С., Тимербаев В.Р., Долгов С.В.</i>	213
<i>Волкова Л.А., Урманцева В.В., Бургутин А.Б., Носов А.М.</i>	158
<i>Волкова Л.А., Урманцева В.В., Носов А.М.</i>	275
<i>Воронкова Е.В., Жарич В.М., Ермишин А.П.</i>	105
<i>Воронкова Е.В., Лукиа В.И., Полюхович Ю.В., Свиточ О.В.,</i>	215
<i>Ворошилова Е.В., Третьякова И.Н.</i>	107
<i>Высоцкая О.Н.</i>	276
<b>Г</b>	
<i>Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Шувалова А.Р., Крылова Е.А., Овчинникова А.Б., Пендинен Г.И., Шувалова Л.Е., Черепко М.М., Волкова Н.Н.</i>	278
<i>Гизатуллина А.Т., Сташевски З., Гимаева Е.А.</i>	336
<i>Гиляшова Н.В., Таранов А.И., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В.</i>	215
<i>Гладков Е.А., Долгих Ю.И.</i>	338
<i>Гончарова Ю.К., Бушман Н.Ю., Верещагина С.А.</i>	1
<i>Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М., Бушман Н.Ю.</i>	109
<i>Гончарук А.Н., Бавол А.В., Дубровная О.В.</i>	219
<i>Гончарук Е.А., Клейменова Ю.К., Загоскина Н.В.</i>	161
<i>Гулевич А.А., Кунакова Е.А., Данилова С.А., Баранова Е.Н., Ралдугина Г.Н.</i>	221
<i>Гумерова Е.А., Иванова А.С., Акулов А.Н., Румянцева Н.И.</i>	163
<i>Гюнтер Е.А., Попейко О.В., Оводов Ю.С.</i>	62
<b>Д</b>	
<i>Данилова С.А.</i>	223

<i>Дейнеко Е. В.</i>	43
<i>Демидова Е.В., Решетняк О.В., Носов А.М.</i>	165
<i>Деркач Е. В., Абраимова О. Е., Сатарова Т. Н.</i>	113
<i>Долгих Ю.И., Осипова Е.С., Соловьева А.И., Седов К.А., Лысенко Е.А., Высоцкая О.Н.</i>	64
<i>Донская М., Суворова Г.</i>	111
<i>Дубровина А.С., Шумакова О.А., Христенко В.С, Киселев К.В</i>	225
<i>Дунаева С. Е., Шувалова Л. Е., Гавриленко Т. А.</i>	280
<i>Дьячук Т.И., Акинина В.Н., Поминов А.В., Кибкало И.А., Итальянская Ю.В., Сафронова Н.Ф.</i>	340
<b>Е</b>	
<i>Егорова Н.А., Ставцева И.В.</i>	342
<i>Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Максимова Л.А., Нурминская Ю.В., Шафикова Т.Н., Гаманец Л.В., Швецов С.Г.</i>	170
<i>Ермишин А.П.</i>	218
<i>Есимсеитова А.К., Шустов А.В., Какимжанова А.А.</i>	282
<b>Ж</b>	
<i>Железниченко Т. В., Новикова Т. И., Банаев Е. В.</i>	284
<i>Живетьев М.А., Папкина А.В., Перфильева А.И., Турская А.Л., Маркова Ю.А., Граскова И.А., Боровский Г.Б., Сухов Б.Г.</i>	344
<b>З</b>	
<i>Загорская А.А., Розов С.М., Дейнеко Е.В.</i>	230
<i>Загоскина Н.В.</i>	67
<i>Зайцева Ю.Г., Новикова Т.И.</i>	116
<i>Заяц А.Ю., Митрофанова И.В.</i>	286
<i>Зинченко М. А., Бавол А. В., Дубровная О. В.</i>	346
<b>И</b>	
<i>Ибрагимова Н.Н., Акулов А.Н., Горшкова Т.А., Румянцева Н.И.</i>	118
<i>Ибрагимова С.М., Кочетов А.В.</i>	232
<i>Иваницкая А.С., Пак М.Э., Третьякова И.Н.</i>	120
<i>Иванова А.Н., Голованова Т.И.</i>	122

<i>Иванова Н.Н., Митрофанова И.В.</i>	288
<i>Искакова К.М., Анапияев Б.Б., Бейсенбек Е.Б., Жанбырбаен Е.А., Казкеев Д.Т</i>	348
<b>К</b>	
<i>Калашиникова Е.А., Доан Тху Тхуи</i>	124
<i>Калашиникова Е.А., Киракосян Р.Н.</i>	126
<i>Кваско О. Ю., Лучаковская Ю. С, Дробот Е.С., Чапкевич С.А., Матвеева Н. А.</i>	172
<i>Киняйкин В.И., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В.</i>	234
<i>Киселев К.В. Дубровина А.С., Шумакова О.А</i>	174
<i>Кляченко О.Л., Крыловская С.А.</i>	350
<i>Кляченко О.Л., Никифорова Н.В.</i>	352
<i>Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Воронков А.С., Андреев И.М.</i>	176
<i>Ковалицкая Ю.А., Филиппов М.В., Васина Д.В., Даянова Л.К., Логинов Д.С., Королева О.В., Шестибратов К.А.</i>	238
<i>Коваль О. С., Дробык Н. М.</i>	353
<i>Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Сергеева Л.Е, Тищенко Е.Н.</i>	236
<i>Константинов А.В., Кулагин Д.В., Богинская Л.А.</i>	355
<i>Корзина Н.В., Митрофанова И.В.</i>	290
<i>Костина Е.Е., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В.</i>	69
<i>Костюкова Ю.А., Румянцева Н.И.</i>	71
<i>Котин А.М.</i>	357
<i>Кочкин Д.В., Носов А.М.</i>	46
<i>Кривошеева А.Б., Юрьева Н.О., Беляев Д.В.,</i>	240
<i>Криницына А.А., Чурикова О.А.</i>	358
<i>Крицкая Т.А., Кашин А.С.</i>	291
<i>Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Прокофьева М.Ю., Умралина А.Р., Чернышева Т.П.</i>	360
<i>Кулуев Б.Р., Князев А.В.</i>	242
<i>Кульханова Д.С., Эрст А.А., Новикова Т.И.</i>	128
<i>Кунах В.А.</i>	48

---

*Курицкая Е.В., Вржосек Э.В, Болтенков Е.В.* 293

## **Л**

*Ларская И.А., Барышева Т.С.* 130

*Лебедев В.Г., Салмова М.А., Розова Х.А., Ларионова А.А., Шестибратов К.А.* 244

*Лёшина Л.Г., Булко О.В., Егоров О.А.* 246

*Литвинова И.И., Гладков Е.А.* 362

*Литвинова И.И., Гладков Е.А.* 364

*Лобакова Е.С* 178

*Любушкина И.В., Грабельных О.И., Федяева А.В., Побежимова Т.П., Степанов А.В., Федосеева И.В., Войников В.К.* 180

## **М**

*Магзумова Г.К., Какимжанова А.А.* 295

*Майсурян А.Н., Садирмекова К.Г., Овчинникова В.Н., Варламова Н.В., Харченко П.Н.* 366

*Матушкин С.А.* 297

*Матушкина О.В.* 299

*Машикина О.С., Табацкая Т.М., Баранов О.Ю., Зеленина Е.А.* 301

*Митрофанова И.В.* 50

*Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П.* 303

*Михайлова И. Д., Лукаткин А. С.* 182

*Мозгова Г.В., Зайцева О.И., Лемеш В.А.* 73

*Моисеева Н.А., Серебрякова В.Н.* 75

*Молканова О.И.* 305

*Муратова С.А.* 132

*Мурсалимов С.Р., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В.* 184

## **Н**

*Нечаева Т.Л., Храмова Е.П., Высочина Г.И., Загоскина Н.В.* 186

*Никишина Т.В., Козлова О.Н., Левицкая Г.Е.З, Высоцкая О.Н.* 307

*Никонорова Н.А., Костюкова Ю.А., Нигматуллина Л.Р., Ризванов И.Х., Румянцева Н.И.* 77

---

*Новикова Т.И., Кузовкова А.А., Эрст А.А., Банаев Е.В.* 368

*Новикова Т.И., Полубоярова Т.В.* 136

## **О**

*Овчинникова В.Н., Варламова Н.В., Майсурян А.Н., Садирмекова К.Г., Харченко П.Н.* 370

*Озерова Л.В., Бургутин А.Б.* 309

*Оксана Ситар, Ахмед Магди Габр, Наталия Таран, Ирина Сметанская* 263

*Осадчая Т.С., Першина Л.А., Девяткина Э.П.* 134

## **П**

*Папихин Р.В.* 79

*Пермякова Н. В., Уварова Е.А., Дейнеко Е.В.* 249

*Першина Л.А., Осадчая Т.С., Трубачеева Н.В., Кравцова Л.А., Белан И.А., Россеева Л.П.* 372

*Петрова Н.В., Акулов А.Н., Каримова Ф.Г. Румянцева Н.И.* 81

*Плаксина Т.В.* 138

*Полубоярова Т.В., Новикова Т.И.* 140

*Полякова Л.В.* 310

*Попова Е.В., Кит Н.Н., Раек К.У., Кит Д.Н., Носов А.М* 52

*Постригань Б.Н., Благова Д.К., Чемерис А.В.* 251

*Пронина И.Н.* 142

## **Р**

*Райзер О.Б., Хапилина О.Н.* 374

*Ралдугина Г.Н., Бурмистрова Н.А., Гомаа А.А., Марей М.М., Букарев Р.В., Шумкова Г.А.*

*Рахимбаев И.Р., Бишимбаева Н.К., Амирова А.К., Парменова А.К., Шилманова А., Касымхан К., М.К. Карабаев* 376

*Решетников В.Н., Фоменко Т.И., Спиридович Е.В., Козлова О.Н., Филипья В.Л., Брель Н.Г., Бердичевец Л.Г.* 312

*Рукавцова Е.Б., Захарченко Н.С., Алексеева В.В., Лазарева Н.В., Бурьянов Я.И.* 255

*Румянцева Н.И.* 54

## **С**



<i>Самусь В.А., Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С.</i>	314
<i>Сарсекова А.Н., Измагамбетова А.Ж., Нечай Н.Л., Есимсеитова А.К., Какимжанова А.А.</i>	378
<i>Сахно Л.А., Сливец М.С., Остапчук А.Н., Король Н.А., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В.</i>	257
<i>Сащенко М.Н.</i>	144
<i>Седов К.А., Долгих Ю.И., Соловьева А.И.</i>	188
<i>Сергеев Р.В., Новиков П.С., Большакова Е.Е., Шургин А.И.</i>	380
<i>Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И.</i>	83
<i>Серебрякова В.Н., Моисеева Н.А.</i>	146
<i>Серенко Е.К., Аканов Э.Н., Чеботарева И.Б., Куренина Л.В., Гулевич А.А., Баранова Е.Н.</i>	2597
<i>Сибгатуллина Г.В., Нигматуллина Л.Р., Румянцева Н.И.</i>	85
<i>Сидорчук Ю.В., Герасименко И.М., Казанцев А.А., Шелудько Ю.В., Дейнеко Е.В.</i>	261
<i>Сидорчук Ю.В., Загорская А.А., Дейнеко Е.В.</i>	381
<i>Слепян Л.И., Каухова И.Е., Кириллова Н.В., Громова О.Н., Н.С. Пивоварова.</i>	383
<i>Смирнова Ю.В., Лавлинский А.В., Попов В.Н.</i>	264
<i>Смолов А. П.</i>	87
<i>Соболева Г.В.</i>	385
<i>Соловьева А.И., Высоцкая О.Н., Долгих Ю.И.</i>	316
<i>Соловьева В.В., Тихомирова Л.И.</i>	387
<i>Сперанская А.С., Криницына А.А., Мельникова Н.В., Беленикин М.С., Большева Н.Л., Зеленин А.В., Муравенко О.В.</i>	318
<i>Спиридович Е.В., Брель Н.Г., Фоменко Т.И., Власова А.Б., Юхимук А.Н.</i>	320
<i>Суворова Г.Н., Иконников А.В.</i>	389
<i>Суханова Е.С., Кочкин Д.В., Титова М.В., Носов А.М.</i>	190
<b>Т</b>	
<i>Тагиманова Д.С., Хапилина О.Н., Турганбаева А.К., Райзер О.Б., Ергалиева А. Ж.</i>	322
<i>Теплицкая Л.М., Сидякин А.И.</i>	324
<i>Терлецкая Н.В., Рысбекова А.Б., Мамонов Л.К.</i>	192

<i>Титова С.М., Фирсов А.П., Митюшкина Т. Ю., Долгов С.В.</i>	393
<i>Титова М.В., Черняк Н.Д., Соловьева Л., Кочкин Д.В., Суханова Е.С., Спринчану Е.К., Носов А.М.</i>	392
<i>Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Горшкова Е.Н., Носов А.М.</i>	391
<i>Тихомирова Л.И.</i>	148
<i>Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Спивак В.А., Матора Л.Ю., Бурьгин Г.Л., Лобачев Ю.В., Щеголев С.Ю.</i>	150
<i>Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Иваницкая А.С., Пак М.Э. Шуваев Д.Н.</i>	152
<i>Трофимова О.И., Ларская И.А., Заботин А.И.</i>	194
<i>Трубачеева Н.В., Осадчая Т.С., Кравцова Л.А., Перишина Л.А.</i>	395
<i>Турганбаева А.К., Хатилина О.Н., Какимжанова А.А., Тагиманова Д.С., Ергалиева А.Ж</i>	397
<i>Тюнин А.П., Киселев К.В.</i>	196
<i>Тюрин А.А., Бердичевец И.Н., Мустафаев О., Никифорова Х.Р., Фадеев В.С., <u>Голденкова-Павлова И.В.</u></i>	266
<b>Ф</b>	
<i>Федина Е.О., Акулов А.Н., Румянцева Н.И., Каримова Ф.Г.</i>	198
<i>Фоменко Т.И., Спиридович Е.В., Мазур Т.В., Юхимук А.Н.</i>	399
<b>Ш</b>	
<i>Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А.</i>	326
<i>Швецов С.Г., Еникеев А.Г.</i>	200
<i>Шипунова А.А., Валиков В.А.</i>	401
<i>Широких И.Г., Огородникова С.Ю., Баранова Е.Н.</i>	403
<i>Шуваев Д. Н.</i>	154
<i>Шумакова О.А., Киселев К.В.</i>	201
<b>Щ</b>	
<i>Шуплецова О.Н., Широких И.Г.</i>	405
<b>Э</b>	
<i>Эльконин Л.А., Итальянская Ю.В., Баранкова И.В., Носова О.Н., Ракитин А.Л., Равин Н.В.</i>	268

---

## **Я**

<i>Яковлева Г.А., Семанюк Т.В., Дубинич В.Л., Родькина И.А., Щурко К.А., Маханько О.В., Монархович С.В.</i>	406
<i>Яковлева Г.А., Семанюк Т.В., Дубинич В.Л., Родькина И.А., Щурко К.А., Монархович С.В.</i>	409
<i>Ярмоленко Л.В.</i>	328



**Фирма ООО «Лабметод Лтд» известна на рынке более 15 лет**

Наша деятельность – продажа оборудования известных мировых производителей для медицинских диагностических и научно-исследовательских лабораторий по направлениям:

- Молекулярная биология
- Проточная цитометрия
- Цитология, гистология
- Патанатомия, CO2-инкубаторы для выращивания клеточных культур
- Программируемые криозамораживатели, криохранилища, сосуды Дьюара
- Расходные материалы и реагенты

Мы являемся официальными дистрибьюторами следующих производителей:

- **PARTEC GmbH** (Германия) – проточные цитофлуориметры
- **Thamasc GmbH** (Германия) – цитоцентрифуги и расходный материал для жидкостной цитологии
- **TECHNE** (Великобритания) – оборудование для молекулярной биологии
- **New Brunswick** (Великобритания) – CO2-инкубаторы для клеточных технологий
- **PLANER** (Великобритания) – программируемые замораживатели, криохранилища для создания криобанков биоматериала.

Монтаж и введение в эксплуатацию оборудования, гарантийное и послегарантийное обслуживание обеспечивается высококвалифицированными инженерами нашей сервисной службы.



Юридический адрес: 121359, г. Москва, ул. Маршала Тимошенко, дом 19  
Фактический адрес: 117209, г. Москва, ул. Зюзиноская, дом 6, корпус 2, офис 132

Сайт: [www.labmetod.ru](http://www.labmetod.ru) | Тел. офиса мобильный: +7 (495) 721 05 58  
Тел. менеджера: +7 (495) 332 36 41 | Факс: +7 (495) 332 35 51 | Сервис: e-mail: [s@labmetod.ru](mailto:s@labmetod.ru)





ООО «Химмед – Поволжье» является представителем группы компаний «ХИММЕД» г. Москва, на территории Республики Татарстан.

Мы являемся дилерами мировых лидеров: Acros, Avocado, Merck-Millipore, Sigma-Aldrich, Applichem, Applied Biosystems, Biohit, BioWest, Hitachi, IKA, R&D Systems, Roth, Supelco, Enzo Life Sciences и др.

ООО «Химмед – Поволжье» предлагает:

- Реагенты и наборы для молекулярной биологии, геномики, протеомики, GWH-технологий, иммунодиагностики;
- Рестриктазы, полимеразы, нуклеиновые кислоты, системы экспекции и трансфекции;
- Антитела и Elisa-наборы для детекции антигенов человека;
- Расходные материалы и реагенты для методологий культур клеток;
- Питательные среды и их компоненты для научно-исследовательской, лабораторной, клинической и индустриальной микробиологии;
- Расходные материалы и реагенты для секвенирования и синтеза пептидов и их производных;
- Random и Antisense-олигонуклеотиды, постсинтетическая модификация, PAAG-электрофорез;
- Флуорисцентные зонды и красители;
- Пластик от лидирующих мировых брендов: Corning Costar, Nunc&Nalgene, BD Falcon, Greiner bioone, Sarstedt.
- Аналитические приборы и хроматография.

ООО «Химмед» имеет развитую и структурированную сеть собственной логистики, которая позволяет четко соблюдать сроки поставки, условия транспортировки и хранения грузов, включая длительную заморозку продуктов от -20 до -80°C, полностью исключая риск утрат потребительских свойств товара.

Общество с ограниченной ответственностью  
«ХИММЕД – ПОВОЛЖЬЕ»  
420081, РТ, г. Казань, ул. Седова, д. 22  
тел: (843) 273-67-61, 272-97-86  
E-mail: kazan@chimmed.ru  
www.chimmed.ru



ООО «БИОФАРМОС»

Россия, Санкт-Петербург, пр. Энгельса, д. 27, лит. «Ж»  
тел./факс +7 812 293 293 0 www.bioconstructor.ru

Компания «БИОФАРМОС» работает в области биотехнологического выращивания редких лекарственных растений и биотрансформации с 1987 года.

Продукция компании разработана совместно с Институтом акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН (Директор - Академик РАМН, Заслуженный деятель науки, проф. Э. К. Айламазян) и Лабораторией биотехнологии (Руководитель - проф. А. М. Носов) Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН (Директор - член-корр. РАН, проф. В. В. Кузнецов).

В 1995 компания вывела на рынок первый биотехнологический препарат на основе биомассы тропического лекарственного растения *Polyscias filicifolia*, - «Витагмал», который обладает свойством снижать риск врожденной патологии у детей (Патент РФ № 2058786, Международный патент WO 1996002266 A1) и включен в методические указания по профилактике и лечению невынашивания беременности.

В 2012 году компания удостоена награды «Европейский Гран При за качество» в номинации «Лидер в сфере применения инноваций в биотехнологиях» (Женева, Швейцария).

Основное направление R&D компании - поиск натуральных соединений на основе биомассы редких лекарственных растений и разработка продуктов на их основе, направленных на решение различных проблем со здоровьем.



---

# eppendorf



Eppendorf is a leading life science company that develops and sells instruments, consumables, and services for liquid-, sample-, and cell handling in laboratories worldwide. Its product range includes pipettes and automated pipetting systems, dispensers, centrifuges, mixers, spectrometers, and DNA amplification equipment as well as ultra-low temperature freezers, fermentors, bioreactors, CO<sub>2</sub> incubators, shakers, and cell manipulation systems. Associated consumables like pipette tips, test tubes, microtiter plates, and disposable bioreactors complement the instruments for highest quality workflow solutions.

Eppendorf products are most broadly used in academic and commercial research laboratories, e.g., in companies from the pharmaceutical and biotechnological as well as the chemical and food industries. They are also aimed at clinical and environmental analysis laboratories, forensics, and at industrial laboratories performing process analysis, production, and quality assurance.

Eppendorf was founded in Hamburg, Germany in 1945 and has more than 2,700 employees worldwide. The company has subsidiaries in 25 countries and is represented in all other markets by distributors.

**С 1988 года поставляет оборудование, расходные материалы и реактивы российских и зарубежных производителей. Наши клиенты - сотрудники лабораторий: биологических, химических, медицинских, контроля качества пищевых и химфарм предприятий, государственные контрольные службы**

**25**  
*лет*

  
**ДИА•М**  
современная лаборатория

**Главный офис в Москве**

**Адрес офиса: г. Москва, ул. Космонавта Волкова д. 10**

**Адрес для писем: 127299, г. Москва, Россия, а/я 100.**

**Время работы: Пн — Чт, с 10.00 до 18.00; Пт — 10.00 до 17.00**

**Телефон: (495) 745-05-08 (многоканальный)**

**Факс: (495) 745-05-09**

**Отдел продаж: [sales@dia-m.ru](mailto:sales@dia-m.ru)**