

Национальный исследовательский
Томский государственный университет
Биологический институт
Кафедра физиологии растений и биотехнологии
МОО «Микробиологическое общество»
Общество физиологов растений России

**БИОТЕХНОЛОГИЯ, БИОИНФОРМАТИКА И ГЕНОМИКА
РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Материалы Всероссийской молодежной
научной конференции с международным участием
26–28 апреля 2016 года**

*Под редакцией
профессора О.В. Карначук*

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2016

Таким образом, показана одинаковая дозовая зависимость уровня Хл *a* от концентрации SeO₃-иона на синем и зеленом свету, что позволяет предполагать участие криптохромов в регуляции синтетических процессов. Действие SeO₃-иона на пигментный состав на красном свету отличалось от действия на синем и зеленом свету. В то время как на синем и зеленом свету SeO₃-ион в высокой концентрации приводил к снижению уровня пигментов, на красном свету повышался уровень Хл *b*. В процессе роста на красном и зеленом свету высокая концентрация селена ингибировала растяжение семядоли и гипокотили проростков *M. albus*.

ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ И УСЛОВИЙ ПЦР ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ ВИДОВ РОДА *SAUSSUREA* DC. МЕТОДОМ ISSR*

М.Н. Шурупова, Е.Ж. Баяхметов, Д.О. Улько, В.Д. Шипоша

Национальный исследовательский Томский
государственный университет, Томск, Россия

Род *Saussurea* DC. (Asteraceae) включает около 415 видов (Shi et al., 2011), из которых 52 встречаются на территории Сибири. Среди сибирских представителей рода 28 видам присвоен статус охраняемых (Шурупова, 2015). При изучении редких видов ключевым показателем является генетический полиморфизм популяций (Van Dyke, 2008). Исследования генетического разнообразия затронули лишь 2 вида *Saussurea* (Yuan et al., 2009; Zeng et al., 2012).

Данное исследование посвящено подбору праймеров и условий ПЦР для изучения генетического разнообразия популяций *Saussurea* методом ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), который наряду с технологиями RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats) и AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) позволяет ана-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы «Научный фонд им. Д.И. Менделеева» Томского государственного университета и РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00477 мол_а.

лизировать полиморфизм генома (Galvan et al., 2003). Этот метод показал свою эффективность при филогенетическом анализе рода *Jurinea* (Dogan et al., 2007), включенного вместе с другими родами в группу *Saussurea* трибы *Cardueae* (Shi et al., 2011).

В исследование включено шесть популяций четырех видов *Saussurea*: *S. baicalensis* (Adams) B.L. Rob. (1 популяция), *S. controversa* DC. (1 популяция), *S. parviflora* (Poir.) DC. (1 популяция) и *S. schanginiana* (Wydł.) Fisch. ex Serg. (3 популяции), в которых в 2014 г. было собрано и высушено в силикогеле по 10–12 образцов молодых розеточных листьев с разных особей. Выделение геномной ДНК производилось согласно протоколу коммерческого набора DiamondDNA Plant Kit D. Выделенная ДНК растворялась в 100 мкл ТЕ-буфера. Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали, используя спектрофотометрическое отношение поглощения света при длинах волн 230, 260 и 280 нм с помощью спектрофотометра P330 (Implen, Германия).

На этапе подбора ISSR праймеров было протестировано 22 олигонуклеотида (Медиген, Россия): M2, M7, M10, M11, M13, HB12, 17898A, 17898B, 17899B, UBC808, UBC810, UBC811, UBC827, UBC836, UBC840, UBC841, UBC846, UBC855, UBC864, UBC868, UBC873 и UBC895. Специфичность каждого праймера проверялась при градиенте температуры отжига 49–60°C. В итоге для дальнейшего исследования были отобраны 8 олигонуклеотидов, показавших специфичность для изучаемых видов *Saussurea* (табл. 1). Для каждого из восьми отобранных праймеров ПЦР-смесь (BIORON, Германия) была оптимизирована по концентрациям $MgCl_2$ и Taq-полимеразы (табл. 2).

ПЦР проводили в программируемом термоциклере Thermal Cycler S1000 (Bio-Rad, США). Условия амплификации: первичная денатурация ДНК – 3 мин при 95°C, затем 33 цикла, включающих 3 этапа: 30 с при 95°C, 30 с при оптимальной температуре отжига праймера (табл. 1), 1 мин при 72°C; финальная достройка цепей – 10 мин при 72°C, затем охлаждение до 4°C. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в течение 2,5 ч при напряжении 125 В с помощью горизонтальной камеры Sub-Cell Model 192 (Bio-Rad, США) в 1,7%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. В качестве буферного рас-

творя использовали 1x TAE. Последующая визуализация проходила на системе гель-документирования Universal Hood II (Bio-Rad, США).

Таблица 1

Специфичные праймеры для видов *Saussurea*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Число бэндов	Число полиморфных бэндов	Оптимальная температура отжига праймера, °C
M2	(AC) ₈ YG	20	14	53
M7	CAG ₅	14	1	57
M10	(CA) ₆ RG	16	14	49
HB12	(CAC) ₃ GC	13	0	49
17898B	(CA) ₆ GT	29	25	49
17899B	(CA) ₆ GG	22	16	49
UBC827	(AC) ₈ G	24	24	58
UBC855	(AC) ₈ YT	22	20	58

Таблица 2

Состав ПЦР-смеси для отобранных ISSR-праймеров

Компоненты ПЦР-смеси на один образец	Объем ISSR-праймеров, мкл							
	M2	M7	M10	HB12	17898B	17899B	UBC827	UBC855
Буфер, 10x	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
dNTPs (25 mM)	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Праймер (10 мкМ)	2	2	2	2	2	2	2	2
Образец ДНК (10 нг/мкл)	2	2	2	2	2	2	2	2
MgCl ₂ (25 mM)	1	1,6	1,6	1,6	2	1,6	1,6	1,6
Тaq-полимераза (5 е.а/мкл)	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2
dH ₂ O	до 15	до 15	до 15	до 15	до 15	до 15	до 15	до 15

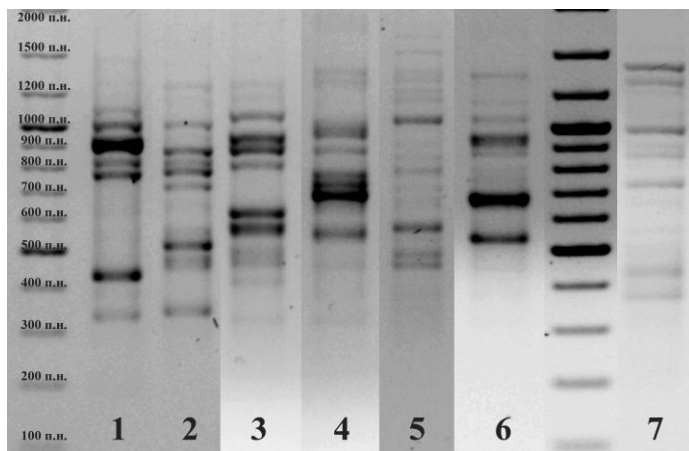


Рис. 1. Пример распределения бэндов для 6 популяций *Saussurea* по праймеру UBC855: 1 – *S. baicalensis*, 2 – *S. parviflora*, 3 – *S. controversa*, 4–6 – *S. schanginiana*, 7 – *Frolovia frolovii* (Ledeb.) Raab-Straube (внешняя группа)

Данные электрофореза не показали полиморфизма исследуемых образцов для 2 из 8 праймеров – HB12 и M7. С праймерами M2, M10, 17898B, 17899B, UBC827 и UBC855 размер амплифицируемых бэндов составил 170–1815 п.н. (рис. 1). Таким образом, эти олигонуклеотиды являются подходящими для изучения генетического полиморфизма *S. baicalensis*, *S. controversa*, *S. parviflora* и *S. schanginiana* методом ISSR.

Литература

1. Шурупова М.Н. Экология и биология редких видов рода *Saussurea* DC. на Кузнецком Алатау : фвтореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 2015. 23 с.
2. Dogan B., Duran A., Hakki E.E. Phylogenetic analysis of Jurinea (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification // Annales Botanici Fennici. 2007. Vol. 44, № 5. P. 353–358.
3. Galvan M.Z., Borner B., Balatti P.A., Branchard M. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // Euphytica. 2003. Vol. 132. P. 297–301.

4. Shi Z., Raab-Straube E. von, Greuter W., Martins L. Cardueae [Electronic resource] // Flora of China. Vol. 20–21 : Asteraceae / eds. Z.Y. Wu , P.H. Raven, D.Y. Hong. Electron. Data. [S.l.], 2011. URL: http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume20/Flora_of_China_ (access date: 17.10.2014).

5. Van Dyke F. Conservation biology. foundations, concepts, applications. Dordrecht : Springer Netherlands, 2008. 477 p.

6. Yuan X.F., Dai Z.H., Wang X.D., Zhao B. Assessment of genetic stability in tissue-cultured products and seedlings of *Saussurea involucreata* by RAPD and ISSR markers // Biotechnology Letters. 2009. Vol. 31. P. 1279–1287.

7. Zeng L., Chong L., Tersing T., Bu N., Zhao J., Zhong Y. Microsatellite markers for *Saussurea gnaphaloides* (Asteraceae), a native Himalayan mountain species // American Journal of Botany. 2012. Vol. 99, № 8. P. 326–329.

СРАВНЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* ПРИ ХЛОРИДНОМ ЗАСОЛЕНИИ

О.К. Мурган¹, А.С. Дорошенко², Н.В. Кудрякова², М.В. Ефимова¹

¹Национальный исследовательский Томский
государственный университет, Томск, Россия

²Институт физиологии растений им. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Вопрос о вкладе цитокининов в формирование механизмов устойчивости к хлоридному засолению до сих пор остается открытым. В основном исследования проводят на мутантах с нарушенным синтезом гормона или оценивают его экзогенное воздействие (Riefler, 2006; Nishiyama, 2012).

В качестве объекта исследований нами были использованы проростки *Arabidopsis thaliana* (экотипа Columbia-0) с нарушенной рецепцией цитокинина – *ahk2/ahk3* или *ahk2*.

Устойчивость проростков к засолению выявляли по динамике прорастания и некоторым физиологическим показателям (содержание фотосинтетических пигментов и осмотический потенциал клеточного содержимого) на различных концентрациях NaCl в 1/2 MS среде (0, 75, 100, 125, 150, 175 и 200 мМ) на протяжении 14 суток после трехсуточной стратификации семян. Эксперимент проводили не менее двух раз.