

## Режимы ПЦР для синтеза второй цепи кДНК

Варианты режима ПЦР								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин	94°C, 3мин
94°C, 30 с 50°C, 30 с 72°C, 3мин.	94°C, 30 с 55°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 60°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 50°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 55°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 60°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 50°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 55°C, 30 с 72°C, 3мин	94°C, 30 с 60°C, 30 с 72°C, 3мин
10 циклов	10 циклов	10 циклов	16 циклов	16 циклов	16 циклов	25 циклов	25 циклов	25 циклов
72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин	72°C, 3мин
4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞

В результате проведенной работы была выделена высококачественная мРНК из листьев *Solanum melongena L.* с использованием набора PolyA Tract System 1000 Promega. Также показано, что, подобрав оптимальные условия полимеразной цепной реакции, можно синтезировать двухцепочечную кДНК размером до 10 т.п.н., что в последующем позволит создать кДНК библиотеку, которая будет иметь важное значение для изучения экспрессии генов.

1. A. Schneiderbauer, H.J. Sandermann. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds // *Anal. Biochem.* - 1992. - V.197. - P.91-95.
2. C. Tesniere, M. E. Vayda. Method for the isolation of high-quality RNA from grape // *Plant Mol. Biol. Repr.* - 1991. - V. 9. - P. 242-251.
3. S.-H. Cheng, B. D. Moore, J. R. Seemann. Purification of uncontaminated, intact plant RNA // *The Nucleic Acid Protocols Handbook.* - 2000. - P. 17-22.
4. M. Malnoy, J.P. Reynoirdi, F. Mourgues, E. Chevreau, P. Simoneau. A method for isolating total RNA from pear leaves // *Plant Molecular Biology Reporter.* - 2001. - № 19. - P. 69-69.
5. I. Murillo, D. Raventos, E. Jaeck, B. San Segundo. Isolation of total RNA and mRNA from plant tissues // *Promega Notes Magazine.* - 1995. - № 54. - P. 2-6.

## НАСЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО

М.П. Куницкая, В.С. Анохина

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь**Kunitskaja\_mp@bsu.by*

Одной из актуальных задач является изучение частной генетики растений. В качестве объекта исследований нами был выбран люпин узколистный, имеющий значительный полиморфизм по качественным признакам и широко возделывающийся как сидеральная и кормовая культура. Несмотря на частое использование морфологических мутантов люпина узколистного в селекции, изучению наследования качественных признаков посвящено ограниченное число работ [1-3], причем имеющиеся данные по генетике люпина узколистного отрывочны и иногда противоречивы. В связи с этим целью нашей работы было изучение совместного наследования признаков окраски вегетативных органов, цветков, семян, алкалоидности и архитектоники растений. Эти признаки имеют важное таксономическое значение и могут быть маркерами селекционно ценных форм.

Генетический анализ люпина узколистного по анализируемым признакам проводили с использованием 19 образцов из России – Северный 3, Немчиновский 846, Ладный, Беларуси – Беньяконский 335, Первоцвет 1, ГЛ-174-86, Вада 18, Ланедекс 1, Лаф-рбс/2, Мужин белый, Польши – Мут 1, Migella, Швеции – Вогге, Германии – Гюльцовский, Греции – Apendrilon, США – Frost, Австралии – Unicrop, являющихся представителями разных групп в

классификации люпина узколистного [1]. Все формы в соответствии с их фенотипами были распределены по группам.

Таблица

Анализ совместного наследования качественных признаков у люпина узколистного

Комбинация	Признаки	Расщепление в F <sub>2</sub> по фенотипу				$\chi^2$	Гены	
		фактическое		ожидаемое				
алкалоидные с детерминантным ветвлением × малоалкалоидные индетерминантные	алкалоидность - детерминация ветвления	393	119	116	41	9 : 3 : 3 : 1	1,79	iuc - det
алкалоидные с синими цветками × малоалкалоидные с белыми 1 цветками	алкалоидность - окраска цветков	482	155	146	44	9 : 3 : 3 : 1	2,23	iuc - alb
синецветковые с детерминантным ветвлением × белоцветковые 1 индетерминантные	окраска цветков - детерминация ветвления	496	166	143	51	9 : 3 : 3 : 1	2,65	det - alb
алкалоидные с синими цветками × малоалкалоидные с белыми 2 цветками	алкалоидность - окраска цветков	218	61	61	20	9 : 3 : 3 : 1	3,08	iuc - leuc
синецветковые с детерминантным ветвлением × белоцветковые индетерминантные	окраска цветков - детерминация ветвления	248	72	80	34	9 : 3 : 3 : 1	2,91	det - leuc
зеленые розовоцветковые × антоциановые белоцветковые 3	окраска цветков - окраска вегетативных органов	121	34	39	16	9 : 3 : 3 : 1	1,43	alb - pur
алкалоидные с розовыми цветками × малоалкалоидные с белыми 3 цветками	алкалоидность - окраска цветков	114	35	37	14	9 : 3 : 3 : 1	0,38	iuc - ros
зеленые алкалоидные × антоциановые малоалкалоидные	алкалоидность - окраска вегетативных органов	115	32	35	20	9 : 3 : 3 : 1	5,46	iuc - pur
синецветковые с детерминантным ветвлением × розовоцветковые индетерминантные	окраска цветка - детерминация	51	21	16	3	9 : 3 : 3 : 1	2,93	det - ros

По признаку «окраска венчика» было выделено четыре основные группы образцов: с синей окраской – Мут 1, Бемяконский 335, Первоцвет, Frost, Apendrilon, с розовой – Borre,

Вада 18, Северный 3, Гюльцовский, Лаф-рбс/2, Mirella, белой с сиреневым оттенком – Немчиновский 846, Ладный, Мужин белый, белой – Unicrop, Ланедекс 1 и белой с розовым оттенком – ДМ-антоциановый – окраской венчика. По признаку «окраска семян» было выделено семь групп образцов, различающихся фенотипически: серосемянные – Мут 1, Борре; черносемянные – Беньяконский 335, Северный 3; 7с землисто-коричневыми двухцветными семенами – Первоцвет, ГЛ-174-86, Гюльцовский; с бежевыми семенами – Апендрилон, Мирелла; с чисто белыми семенами – Немчиновский 846, Ладный, Мужин белый, ДМ-антоциановый; белосемянные со светло-коричневой мраморностью – Уникроп, Ланедекс 1; с грязно-белыми семенами – Фрост, Лаф-рбс/2. По признаку «окраска всходов» было выделено четыре группы образцов: с антоциановыми (Беньяконский 335, Северный 3, ДМ-антоциановый, Мужин белый), темно-зелеными (Вогге), зелеными (Мут-1, Mirella, ГЛ-174-86, Лаф-рбс/2, Казан, Вада-18, Первоцвет, Apendrilon, Ладный, Немчиновский 846) и светло-зелеными (Ланедекс-1, Unicrop, Гюльцовский) всходами. По признаку «детерминация ветвления» было выделено три группы форм: индетерминантные (ветвящиеся) – Apendrilon, Борре, Frost, Mirella, Беньяконский 335, Гюльцовский, Немчиновский 846, Северный 3, ДМ-антоциановый, ГЛ-174-86, Лаф-рбс/2, Уникроп, Мужин белый, Казан, Вада-18; формы с детерминацией на главном побеге – Первоцвет 1, Ланедекс 1, Ладный; формы с детерминацией на боковых побегах первого порядка – Мут 1. По признаку «алкалоидность» были выделены алкалоидные (Мут 1, Apendrilon, Беньяконский 335, Гюльцовский и Mirella) и малоалкалоидные формы (Северный 3, Немчиновский 846, Ладный, ДМ-антоциановый, Лаф-рбс-2, Unicrop, Казан, Першацвет 1, Ланедекс 1, Вада-18, Frost, ГЛ-174-86/1).

Анализ данных циклических скрещиваний проводили в соответствии с методами, изложенными в руководстве Н.М. Орловой [4].

Ранее в результате анализа наследования по каждому признаку отдельно нами было выявлено, что по признаку «окраска венчика цветка» проанализированные образцы различаются тремя неаллельными, взаимодействующими по типу комплементарности генами (ros, alb и leuc) [5], по признаку «окраска семени» – четырьмя неаллельными взаимодействующими генами (pig, alb, leuc, d) и четырьмя аллелями гена alb [6], по признаку «окраска вегетативных органов» – четырьмя неаллельными генами [7], по признаку «детерминация ветвления» – не менее чем двумя неаллельными генами (det и deb) [8], по признаку «алкалоидность» также не менее чем двумя, один из которых iuc [9]. Следующим этапом нашей работы было изучение совместного наследования этих качественных признаков. Из результатов анализа следует, что гены iuc, det, alb, ros, leuc, pig наследуются независимо друг от друга (таблица).

Таким образом, показано отсутствие сцепления между проанализированными признаками окраски цветков и семян, вегетативных органов, детерминации ветвления и алкалоидности растений.

1. Генофонд и селекция зерновых бобовых культур (люпин, вика, соя, фасоль). Под ред. *Б.С. Курловича, С.И. Репьева*. – СПб. – 1995. – 439с.
2. *Г.А. Дебелый, В. И.Дербенский, Ю.Б. Коновалов и др.* О проявлении признака детерминантности у гибридов люпина узколистного // С.-х. биология. – 2001. - №1. – С. 34-37.
3. *Н.С. Купцов, И.П.Такунов.* Люпин. Генетика, селекция, гетерогенные посевы. – Брянск. – 2006. – 623 с.
4. *Н.Н. Орлова.* Генетический анализ. М., 1991. 318 с.
5. *Куницкая М.П.* Наследование признака «окраска цветков» у люпина узколистного // Генетика и селекция на рубеже 21 века. – Мн. – 1999. – С.38-40.
6. *М.П. Куницкая, В.С. Анохина.* Наследование признака «окраска семян» у люпина узколистного. // Проблемы производства продукции растениеводства и пути их решения. – Горки. – 2000. – С.52-57.
7. *М.П. Куницкая, В.С. Анохина.* Генетический анализ люпина узколистного по окраске вегетативных органов // Материалы VIII съезда генетиков и селекционеров республики Беларусь, 23-25 июля 2002 г., г. Минск. – Мн.: ИООО «Право и экономика». – С.85.

8. М.П. Куницкая, В.С. Анохина. Наследование признака «детерминация ветвления у люпина узколистного» // Достижения совр. биологии и биологическое образование. – Мн., 2002. С. 159-162.
9. М.П. Куницкая, В.С. Анохина. Изучение аллельности мутаций малоалкалоидности у образцов люпина узколистного // Материалы Междунар. научно-практической конф. «Научное обеспечение люпиносеяния в России» Брянск, 12 – 14 июля 2005г. Брянск, 2005. – С. 58 –60.

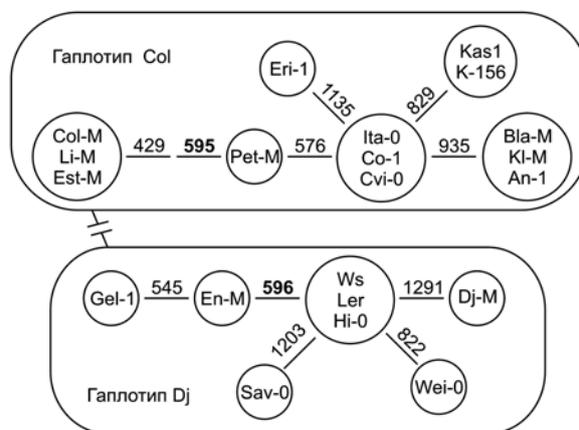
## ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ДИМОРФИЗМА ГЕНА ПЕРОКСИДАЗЫ *AtPrx53* *ARABIDOPSIS THALIANA*

**Е.В. Куприянова**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*  
*ekupriyanova@gmail.com*

Ген *AtPrx53 Arabidopsis thaliana* относится к мультигенному семейству растительных пероксидаз III класса. Пероксидазы растений принимают участие во многих физиологических процессах: лигнификация, суберинизация, катаболизм ауксина, защита от действия патогенов и стрессовых факторов.

При исследовании полноразмерной нуклеотидной последовательности гена *AtPrx53* из 20-ти рас и линий выявлено 29 сайтов замен, распределенных по всему гену. Среди них 20 информативных сайтов (замены, встречающиеся не менее чем у двух последовательностей), 5 замен, свойственных только отдельным расам (однонуклеотидные замены – SNP, 2 инсерции, 2 делеции). Выявлена неоднородность распределения полиморфных сайтов: наиболее часто они обнаруживаются во 2-м и 3-м интронах и 3-м экзоне. По 18 полиморфным сайтам 20 рас и линий разделяются на 2 гаплотипа, обозначенные как гаплотип Dj или Col (рис. 1). Наряду с этим обнаружены также единичные замены, относящиеся к отдельным расам (Eri-1, Wei-0, Di-M, Sav-0, Kas-1).



**Рис. 1.** Полиморфные сайты пероксидазного гена *AtPrx53*. Цифры указывают позиции полиморфных; -// - различия между гаплотипами в 21 нуклеотид.

Таким образом, анализ нуклеотидной последовательности пероксидазного гена *AtPrx53* у 20-ти природных рас *Arabidopsis thaliana*, выявил существование двух гаплотипов. Выявлена ассоциация между гаплотипом и рядом количественных показателей развития растений (рис. 2). Показано также, что гаплотипы отличаются по особенностям экспрессии в разных органах и кодируют высокоактивные анионные аллозимы, отличающиеся электрофоретической подвижностью.

Анализ полиморфизма внутри каждого из гаплотипов показал, что в гаплотипе Col уровень общего полиморфизма несколько выше, чем в Dj. Разница обусловлена большим числом нуклеотидных замен в кодирующей части гена. Теоретически, это может быть связано как с более древним происхождением гаплотипа Col по сравнению с гаплотипом Dj. Возможно также, что гаплотип Dj является более древним, а низкий полиморфизм этого гаплотипа является следствием жесткого селекционного давления, в пользу чего свидетельствует отрицательное значение показателя D, указывающего на избыток низкочастотного полиморфизма. Для проверки последнего предположения проведена амплификация и анализ нуклеотидной последовательности наиболее полиморфного участка гена *AtPrx53* других представителей семейства крестоцветных. Установлена полная