

**№ 06**

**Трансгенные растения петунии с прижизненной визуализацией тубулинового цитоскелета как экспериментальная модель для изучения реорганизации микротрубочек в условиях абиотического стресса**

Демиденко Д.В.<sup>1,2\*</sup>, Варламова Н.В.<sup>1</sup>, Халилуев М.Р.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ВНИИСБ, Москва, Россия

<sup>2</sup>РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

\*E-mail: frankenvini1998@mail.ru

Микротрубочки – элементы цитоскелета с диаметром около 25 нм, состоящие из гетеродимеров глобулярного  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина. Эти структуры необходимы для клеточного функционирования, обеспечивая нормальное деление клеток у эукариотических организмов. Для изучения роли реорганизации тубулинового цитоскелета в условиях абиотических стрессов была проведена агробактериальная трансформация растений петунии самосовместимого (Белый шар, Суперкаскадная синяя F1) и самонесовместимого клонов. Использовали векторную конструкцию рСМУ-MTUBr с геном MAP-MBD, кодирующим слитый репортерный белок *mCherry* для прижизненной детекции микротрубочек, а также селективный ген *nptII*. Индукцию процессов морфогенеза проводили на базовой среде MS, дополненной 6-БАП и AgNO<sub>3</sub> в концентрациях 5 мг/л и 0,1 мг/л ИУК, а также 300 мг/л тиментина для элиминации агробактерии и 50 мг/л канамицина. Культивирование листовых эксплантов на селективной питательной среде обеспечило массовую регенерацию побегов. Часть линий успешно сформировало корни на среде для ризогенеза с высокой концентрацией канамицина. ПЦР подтвердила наличие чужеродных генов у 2 трансгенных линий сорта Белый шар. Кроме того, флуориметрический анализ экспрессии репортерного гена *mCherry* выявил визуальные отличия между контролем и трансгенными линиями, свидетельствуя об его экспрессии. В настоящее время продолжается отбор предположительно трансгенных линий и их молекулярно-генетический анализ.

Работа выполняется при финансовой поддержке РНФ в рамках проекта № 22-24-01148.

**№ 07**

**Тандемный вектор для анализа цис-регуляторных элементов в растениях**

Демьянчук И.С.\*, Тюрин А.А., Сухорукова А.В., Фридман В.А.,  
Голденкова-Павлова И.В.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, лаборатория функциональной геномики, Москва, Россия

\*E-mail: Demyan.Pya253@yandex.ru

Агроинфильтрация растений уже давно стала одним из основных подходов к тестированию генов и регуляторных элементов. Цель данного исследования – создание бирепортерного вектора, содержащего тандемную связку системы внутреннего контроля и основной экспрессионной кассеты. Для конструирования основной плазмиды применяли СПЕС (circular polymerase extension cloning). Агроинфильтрацию 4-недельных растений *N.benthamiana* проводили, используя *A.tumefaciens* (GV3101). Уровни экспрессии целевых генов оценивали по флуоресценции их продуктов. Статистическую обработку данных и их визуализацию проводили, задействуя библиотеки SciPy и Matplotlib для Python. Бирепортерный вектор pIRF разрабатывался для тестирования трансляционных цис-регуляторных элементов. Основой для тандемного вектора послужила, ранее разработанная авторами, плаزمида pVIG-T, оптимизированная для транзientной экспрессии в растениях. Система внутреннего контроля представлена геном *gfp* под контролем промотора актина арабидопсиса, целевая экспрессионная кассета включает ген *rfp* и промотор SmAM430. Для

тестирования созданного вектора в базовую плазмиду в дальнейшем были интегрированы известные трансляционные энхансеры: растительного (AT30, AT65, AT100 и AT208) и вирусного ( $\Omega$ ) происхождения. Главной идеей при разработке pIRF было то, что физическое сцепление двух репортерных систем даст линейную зависимость при их трансляции. Поэтому для анализа данных флюориметрии применяли линейную регрессию. Таким образом, уровни экспрессии исследуемых конструкций выражались наклоном регрессионной прямой относительно контрольного варианта.

*Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121033000137-1).*

## № 08

### **Влияние эпина на содержание продуктов ПОЛ в проростках пшеницы при гербицидном стрессе**

**Яковец О.Г.<sup>А\*</sup>, Дурдыева Д.<sup>А</sup>**

<sup>А</sup>Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь

\*E-mail: yakovets@inbox.ru

В сельскохозяйственной практике широко используются препараты на основе различных регуляторов роста. Препарат Эпин-Экстра (д.в. 24-эпибрасинолид), согласно литературным данным, обладает сильным антистрессовым действием. Целью нашей работы было исследование защитного действия данного препарата на проростки пшеницы, подвергнутые гербицидному стрессу. Эксперименты проводили на 10-дневных проростках яровой пшеницы сорта Любава, выращенных рулонным методом. Семена пшеницы (10 г) перед посадкой сначала в течение 15-20 мин обрабатывали слабо розовым раствором  $\text{KMnO}_4$ , затем промывали  $\text{H}_2\text{O}$  и замачивали в течение 24 ч в  $\text{H}_2\text{O}/10^{-7}$  М (по д.в) растворе эпина (10 мл) в термостате при температуре 24-26°C. Проростки выращивали при температуре  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , естественном освещении. За 1 сутки до эксперимента проростки обрабатывались прометрексом (*П*) и хизалофоп-П-этилом (*ХЗФ*) в концентрациях  $10^{-6}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-4}$  М путем помещения рулонов в сосуды с растворами гербицидов (контроль –  $\text{H}_2\text{O}$ ). ПОЛ оценивали методом прямой спектрофотометрии по количеству диеновых ( $D_{232}$ ), триеновых ( $D_{268}$ ) и оксодиеновых ( $D_{276}$ ) конъюгатов. На основании проведенного анализа выявлено, что предобработка семян эпином изменяет характер действия гербицидов на проростки яровой пшеницы сорта Любава. В присутствии используемых гербицидов в концентрации  $10^{-6}$  М количество продуктов ПОЛ начинает уменьшаться (за исключением диеновых конъюгатов в присутствии *ХЗФ*: оно также, как и в проростках, выращенных из необработанных эпином семян достоверно не изменяется по сравнению с контролем). Под действием обоих гербицидов в концентрации  $10^{-5}$  М установлен рост содержания всех типов конъюгатов. При этом *П* по сравнению с *ХЗФ* обладает более выраженными эффектами по триеновым и оксодиеновым конъюгатам. Действие гербицидов в концентрации  $10^{-4}$  М также отличается между собой. В присутствии *П* выявленные эффекты у проростков, выращенных из обработанных эпином семян, изменяются: уменьшаются по сравнению с таковыми у проростков, выращенных их необработанных регулятором роста семян. Под действием же *ХЗФ* обработка семян эпином никак не повлияла на изменение концентрации диеновых и триеновых конъюгатов, содержание же оксодиеновых конъюгатов достоверно уменьшилось, а не увеличилось.