

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФОРМ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ГЕНЕТИЧЕСКИ УСТОЙЧИВЫХ К ФИТОПАТОГЕНАМ

старший научный сотрудник **Е. Н. Васильченко**¹

доктор биологических наук **Т. П. Федулова**¹

кандидат биологических наук **Д. Н. Федорин**¹

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара
им. А.Л. Мазлумова», поселок ВНИИСС, Российская Федерация

Представлены результаты по разработке методов проведения генетической трансформации сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*) с использованием генетической конструкции *AGLO + pBilt7* с геном *mf2* в штамме *Agrobacterium tumefaciens*. В качестве донора генов устойчивости выступает микробный фактор (*MF2*), который был выделен из клеточных экстрактов *Bacillus thuringiensis*. Выделенный фактор (*MF2*), является термостабильным, низкомолекулярным белком и имеет большую степень гомологии с колд-шок белками (*cold shock proteins, CSP*) видов *Bacillus* и других бактерий. Действие *MF2* заключается в индукции защитных механизмов растения, а не в непосредственном угнетении фитопатогенов. Наилучшим способом трансформации явилось нанесение поранений за 24 часа до кокультивирования, частота регенерации при этом составила в среднем 25.9 %. Оценка первичных трансформантов, предположительно несущих ген *mf2*, на селективных средах *in vitro* с канамицином, показала относительную устойчивость растений. Проведенная проверка на наличие целевого гена *mf2* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) дала возможность отобрать 7 растений, в которых амплифицировался фрагмент ДНК соответствующего размера (20 п.н.). Сравнительный анализ изоферментного спектра пероксидазы трансформированных растений выявил 5 зон активности, по которым образцы различались между собой. Выявленная высокая активность пероксидазы, играющей ключевую роль при окислительно-восстановительных реакциях, имеет тесную взаимосвязь с защитными реакциями при действии индукторов устойчивости к фитопатогенам. Фитопатологическая оценка отобранных трансформантов сахарной свеклы в условиях закрытого грунта показала их относительную устойчивость к экзогенному воздействию штаммами грибов *Fusarium oxysporum*+ *Fusarium solani*. В результате проведенных исследований получены трансгенные растения сахарной свеклы, несущие ген *MF2*, связанные с устойчивостью к фитопатогенам, которые могут найти широкое применение в селекционном процессе.

Ключевые слова: сахарная свекла, регенерация, *Agrobacterium tumefaciens*, генетическая трансформация, ПЦР- анализ, фитопатогены.

MOLECULAR-GENETIC ASSESSMENT OF SUGAR BEET VARIETIES WHICH ARE GENETICALLY RESISTANT TO PHYTOPATHOGENS

Senior Research Officer **E. N. Vasilchenko**¹

DSc (Biology) **T. P. Fedulova**¹

PhD (Biology) **D. N. Fedorin**¹

1 – FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar
named after A.L. Mazlumov», village VNISS, Russian Federation

Abstract

The results of the genetic transformation of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) using the *AGLO + pBilt7* genetic construct with the *mf2* gene in the *Agrobacterium tumefaciens* strain are presented. The donor of resistance genes is microbial factor (*MF2*), which was isolated from *Bacillus thuringiensis* cell extracts. The selected factor (*MF2*) is a thermostable, low molecular weight protein and it has a high degree of homology with cold shock proteins (*CSP*) of *Bacillus species* and other bacteria. The action of *MF2* is to induce the plant defense mechanisms, but not to directly inhibit phytopathogens. The best method of transformation is the application of injuries 24 hours before cocultivation,

the frequency of regeneration is on average 25.9 %. Evaluation of primary transformants, presumably carrying the *mf2* gene, on selective media with kanamycin *in vitro*, showed the relative resistance of plants. The test for the presence of the target gene *mf2* using the polymerase chain reaction (PCR) made it possible to select 7 plants in which a DNA fragment of the appropriate size was amplified (20 bp). A comparative analysis of the peroxidase isozyme spectrum of transformed plants revealed 5 zones of activity, in which the samples differed among themselves. The revealed high activity of peroxidase, which plays a key role in redox reactions, has a close relationship with protective reactions under the action of inductors of resistance to pathogens. Phytopathological evaluation of sugar beet transformants in greenhouse conditions has showed their relative resistance to the exogenous effects of the fungi *Fusarium oxysporum* + *Fusarium solani*. As a result of research, transgenic sugar beet plants with resistance to phytopathogens, which can be widely used in selection, have been created.

Keywords: sugar beet, regeneration, *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, PCR analysis, phytopathogens

Молекулярные взаимодействия, приводящие к активации защитных механизмов растения, интенсивно изучаются, и последние достижения открывают возможности для повышения устойчивости сельскохозяйственных и лесных древесных растений к грибным и бактериальным болезням методами генетической инженерии.

Создание сортов и гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с повышенной устойчивостью к различным стрессовым факторам внешней среды является одной из важных и перспективных проблем в селекции [8]. Сахарную свеклу поражают различные болезни, что приводит к значительному снижению урожая и ухудшению качества сырья. Так, от корневых гнилей за вегетационный период с каждого гектара теряется до 7,5 и более тонн корнеплодов. Высокая стоимость обработок посевов и экологические нарушения, вызванные применением химических средств защиты растений, заставляют искать новые пути решения данной проблемы [9]. В связи с этим, большое значение приобретает селекция на повышение устойчивости растений к болезням. Использование методов генной инженерии, предусматривающей передачу в растения целевых генов и их экспрессию, способствует решению данной проблемы [1, 2].

При создании трансгенных растений в качестве донора генов устойчивости могут выступать не только близкородственные растения, как в классической селекции, но и организмы, отстоящие далеко от данного растения в плане генетического родства, такие как бактерии, грибы и многие другие [3, 7].

Одним из них является микробный фактор

(*MF2*), который был выделен из клеточных экстрактов *Bacillus thuringiensis*. Выделенный фактор (*MF2*), является термостабильным, низкомолекулярным белком и имеет большую степень гомологии с колд-шок белками (*cold shock proteins, CSP*) видов *Bacillus* и других бактерий. Действие *MF2* заключается в индукции защитных механизмов растения, а не в непосредственном угнетении фитопатогенов [6]. Использование генов, кодирующих белки, способных индуцировать неспецифическую устойчивость растения к вирусным и грибным фитопатогенам, может способствовать созданию сортов и гибридов, обладающих устойчивостью к широкому спектру фитопатогенов. В связи с этим разработка методов создания трансгенных растений сахарной свеклы с устойчивостью к биотическим стрессовым факторам является в настоящее время актуальным направлением исследований.

Для создания трансгенных растений сахарной свеклы, устойчивых к широкому спектру фитопатогенов, использовали генетическую конструкцию с бактериальным геном *mf2* в штамме *Agrobacterium tumefaciens*, которую любезно предоставил к.б.н. Джавахия В.Г. (лаборатория молекулярной биологии ВНИИФ, Голицино, Московская обл.) [5]

В качестве материалов для исследований были использованы растения мужскостерильных форм и фертильные линии сахарной свеклы селекции ВНИИСС. В качестве реципиентной ткани использовали черешки и ткани из области семядольных узлов, содержащих меристематические клетки, компетентные к прямой регенерации побегов *in vitro*.

Проверку предполагаемых трансгенных растений сахарной свеклы на наличие целевого гена *mf2* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии праймеров (5'- atg caa aca ggt aaa gtt - 3' и 5'- agt ttt ttg taa cgt tag cag c - 3'), синтезированных в ЗАО «Синтол» (г. Москва).

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что независимо от генотипа наилучшей регенерационной способностью обладают экспланты из области семядольных узлов (переходная зона между черешком семядоли и гипокотилем), чем экспланты из основания побегов черешков. В среднем частота регенерации в первом случае составила 27,9 %, а во втором 14,0 %. При этом область семядольных узлов формировала не один, а множество придаточных побегов, в то время как экспланты из основания черешков формировали 1,2 побега на эксплант [4].

Дальнейшая инкубация полученных эксплантов при температуре на 3-5⁰С выше (т.е. 30⁰С) в темновых условиях приводила к увеличению выхода регенерантов. Частота регенерации составила в среднем у переходной зоны 34,8 %, а у черешков листьев 27,4%.

По результатам исследований выявлено, что лучшим способом трансформации оказалось нанесение поранений за 24 часа до кокультивирования эксплантов. При этом частота регенерации составила в среднем 25,9%, против 13,9 % при поранении непосредственно перед кокультивированием (табл. 1).

Наши эксперименты показали, что однократное погружение эксплантов в суспензию агробактерий с последующим культивированием на агаризованной среде является более «щадящим», чем кокультивирование эксплантов в жидкой среде с добавлением агробактерий. В первом случае количество регенерирующих эксплантов составило 51,1 %, а во втором 22,1 %.

Таким образом, передача целевого гена *mf2*, осуществленная на сахарной свекле путем прямой регенерации, дала возможность отобрать 8 первичных регенерантов с геном *mf2*, обладающих устойчивостью к селективному агенту – канамицину [10]. Молекулярно-генетическая оценка предполагаемых трансгенных растений сахарной свеклы на наличие целевого гена, с использованием специфических праймеров, позволила отобрать 7 растений с геном *mf2*. В данных растениях выявлен ДНК-ампликон соответствующего размера (20 п.н.) (рис. 1).

Результаты проведенного молекулярно-генетического анализа показали интеграцию целевого гена *mf2* в геном растений – реципиентов № 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 и отсутствие данного гена в растении № 4.

ПЦР-анализ растений сахарной свеклы с использованием произвольных RAPD-праймеров PAW6, PAW16, PAW17 показал значительные отличия опытных растений по сравнению с контролем в виде характерных дополнительных ампликонов в изученных растениях.

Таблица 1

Влияние типа экспланта на регенерационную способность.

Поранение нанесено непосредственно перед кокультивированием				Поранение нанесено за 24 часа до кокультивирования			
тип экспланта	кол-во посажен. эксплан.	кол-во регенерантов		тип экспланта	кол-во посажен. эксплан.	кол-во регенерантов	
		шт.	%			шт.	%
черешок	294	39	13,4	черешок	210	51	23,7
Переходная зона	183	26	14,4	Переходная зона	157	44	28,1
среднее		13,9		среднее		25,9	

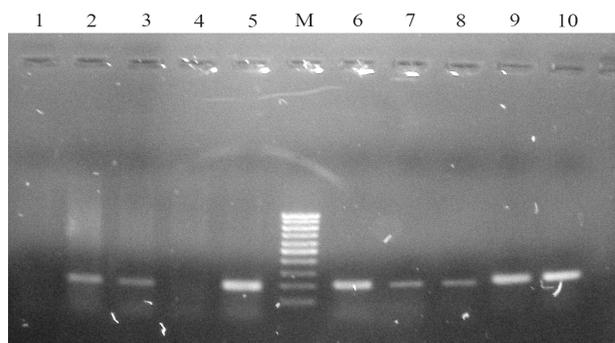


Рис. 1. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов растений сахарной свеклы
1 – ДНК нетрансформированного растения (контроль); М – маркеры молекулярных масс;
2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 – ДНК трансформированных растений, несущих ген *mf2*; 4 – ДНК трансформированного растения, не несущего ген *mf2*;
10 – контрольная ДНК агробактерии AGLO + pBilt5

Выявленные генетические изменения в растениях сахарной свеклы указывают на разнородность полученного материала, обусловленного различной интеграцией гена *mf2* в геном сахарной свеклы.

Также был исследован уровень полиморфизма микросателлитных локусов трансгенных растений сахарной свеклы с геном *mf2*. Высокий полиморфизм обнаружили локусы, амплифицированные с SSR-праймерами Bv21/Bv53: по четыре ДНК-ампликона выявлено у образцов под номерами 1, 3 и у контрольного растения, три ДНК-фрагмента – у образца № 4, парные полосы иден-

тифицированы у линии под номером 2.

Амплификация с SSR-праймерами Bv43/Bv15 показала наличие парных, но не идентичных ДНК-фрагментов у линий 1, 3, 4 и у контрольного образца. Линия № 2 имела один фрагмент.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что не все микросателлитные локусы одинаково эффективны для исследования генома трансгенных форм сахарной свеклы, так как могут проявлять незначительный полиморфизм или являться мономорфными. Однако, следует отметить, что при совокупном анализе нескольких локусов получены уникальные микросателлитные профили с набором фрагментов, специфичных для каждой линии. Это стало основой для составления индивидуальных генетических паспортов.

Для более надежной и точной идентификации различий между созданными ГМ растениями сахарной свеклы планируется проведение более глубоких молекулярных исследований на генетическом анализаторе с использованием SNP-маркеров. Это позволит определить точечные изменения в геноме полученных трансгенных форм.

Биохимический анализ отобранных растений-трансформантов выявил повышение в 2-2,5 раза активности фермента пероксидазы, играющего ключевую роль при окислительно-восстановительных реакциях, тесно взаимосвязанных с защитными свойствами организма (рис. 2).

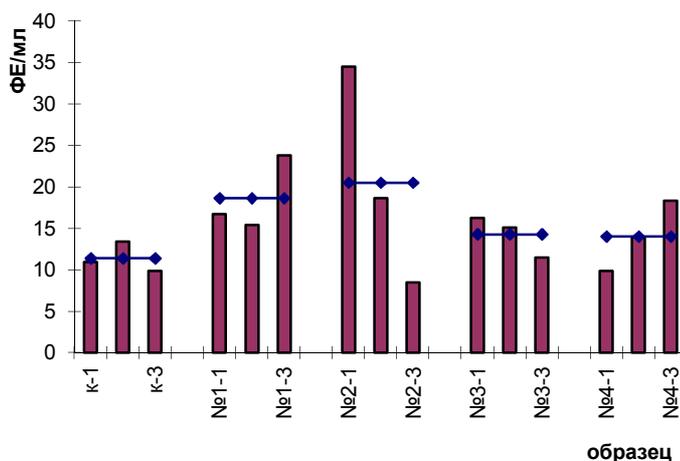


Рис. 2. Общая активность пероксидазы микроклонов сахарной свеклы:
к1-к3 – контрольный образец, № 1 - № 4 – трансгенные образцы, несущие ген *mf2*

По результатам биохимических исследований выявлено изменение изоферментного спектра пероксидазы у трансгенных растений. Это позволило предположить, что повышение активности пероксидазы и отличие в изоферментном спектре у созданных растений, возможно, вызваны внедрением чужеродных генов и могут отражать устойчивость растений (рис. 3).

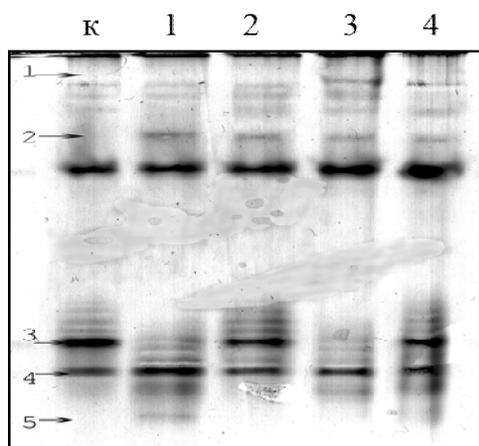


Рис. 3. Изоферментный спектр пероксидазы микроклонов сахарной свеклы: к – контрольный образец; 1-4 – трансгенные образцы, несущие ген *mf2* (стрелками выделены зоны различий)

У отобранных генетически модифицированных растений показано также повышение активно-

сти дегидрогеназ глиоксилатного и лимонного циклов, отражающих стрессовое состояние энергетического метаболизма при встраивании целевых генов.

У трансгенных растений отмечено повышение более чем в 2 раза активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы. Данный фермент участвует обычно в синтезе и утилизации в клетках лигнина при разнообразных защитных реакциях организма (рис. 4).

Результаты проведенных исследований показывают, что повышение активности данного фермента свидетельствует о повышении свойства неспецифической устойчивости трансгенных растений по сравнению с контрольными формами.

Дальнейшая фитопатологическая оценка регенерантов сахарной свеклы в условиях закрытого грунта при обработке споровой суспензией *Fusarium solani* + *Fusarium oxysporium* выявила замедление роста и развития в 2-2,5 раза только в контрольном варианте. У растений происходило отмирание листового аппарата, хлороз и скручивание листьев, появление некротических пятен. Наблюдалось утолщение и шелушение кожицы корнеплода и образование на ее поверхности различных наростов. Сосудистая система оставалась не пораженной, как у опытных, так и у контрольных образцов (рис. 5).

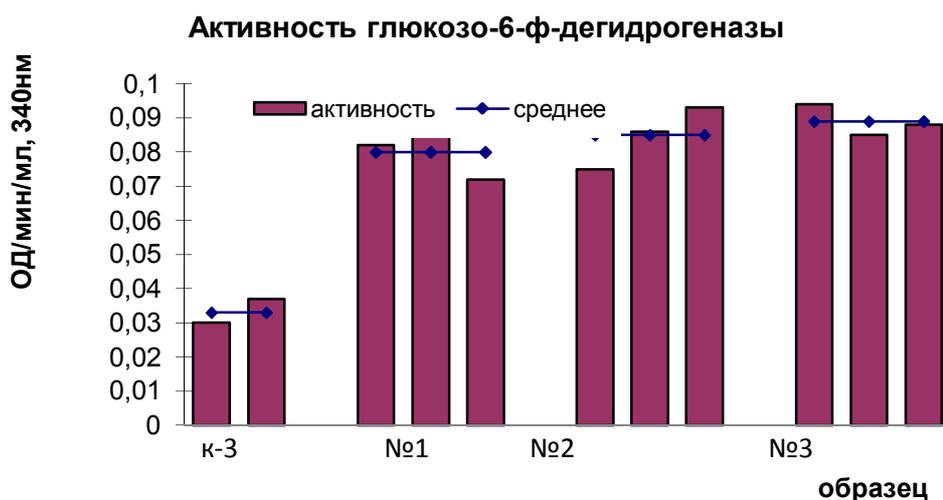


Рис. 4. Общая активность фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы микроклонов сахарной свеклы, несущих ген *mf2*: № 1 - № 3 – трансгенные образцы



Рис. 5. Обработка трансгенных растений сахарной свеклы (штаммами грибов *Fusarium solani* + *Fusarium oxysporium*)

У опытных образцов морфологических изменений в формировании листового аппарата не выявлено.

При обработке культуральной жидкостью данных грибов растений-трансформантов и контрольных образцов отмечена потеря тургора у контрольных растений и полное увядание на третьи сутки.

Это подтверждает относительную устойчивость

трансформантов к экзогенному воздействию грибов.

Таким образом, в результате проведенных биотехнологических и молекулярно-генетических исследований разработан оригинальный метод генетической трансформации сахарной свеклы с геном *mf2* в штамме *Agrobacterium tumefaciens* и созданы трансгенные растения сахарной свеклы с устойчивостью к фитопатогенам. Данные растения могут найти широкое применение в качестве нового исходного материала при селекции на устойчивость к болезням.

Разработанные нами научно-методические и молекулярно-биологические приемы могут быть использованы не только на сахарной свёкле, но и на лесных древесных культурах при создании форм растений, генетически устойчивых к биотическим факторам. Расширение данных исследований с вовлечением новых видов растений, в том числе древесных в промышленном масштабе потребует строгого следования определенным критериям, таким как эффективность, надёжность, отсутствие токсичности и слабое воздействие на окружающую среду.

Библиографический список

1. Atanasov, A. L. Sugar Beet [Text] / A. L. Atanasov // Handbook of Plant Cell Culture, V. 4 ; Eds. Evans D.A. et al. N. Y.: MacMillan, 1986. – 720 p.
2. Ingersoll, J. L. Effect of Promotor-Leader Sequences on Transient Expression of Reporter Gene Chimeras Biolistically Transferred into Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Suspension Cells [Text] / J. L. Ingersoll, T. M. Heutte, L. D. Owens // Plant Cell Rep. – 1996. – Vol. 15. – pp. 836-840.
3. Thomas, T. H. Biotechnological Advances in Sugar Beet Research [Text] / T. H. Thomas // Genet. Engen. Biotechnol. – 1991. – Vol. 11. – pp. 14-17.
4. Васильченко, Е. Н. Получение растений сахарной свеклы, несущих ген MF2, индуцирующий неспецифическую устойчивость к фитопатогенам [Текст] / Е. Н. Васильченко, Т. П. Жужжалова., О. А. Землянухина, Д. Н. Федорин // Сахарная свекла. – 2009. – № 2. – С. 20-21.
5. Джавахия, В. Г. Бактериальные белки - индукторы неспецифической устойчивости растений к фитопатогенам [Текст] / В. Г. Джавахия // Современные системы защиты растений от болезней и перспективы использования достижений биотехнологии и геной инженерии Материалы Всероссийского совещания. – Голицино, 2003. – С. 196-198.
6. Общая молекулярная фитопатология [Текст] / Ю. Т. Дьяков, О. Л. Озерцовская, В. Г. Джавахия, С. Ф. Багирова. – М.: Общество фитопатологов, 2001. – С. 254-291.
7. Захарченко, Н. С. Техника генетической трансформации разных сортов сахарной свеклы [Текст] / Н. С. Захарченко, М. А. Каляева, Я. И. Бурьянов // Физиология растений. – 2000. – Т. 47. – № 1. – С. 79-85.
8. Корниенко, Ф. С. Комплексная защита сахарной свеклы от болезней, вредителей и сорняков при индустриальной технологии ее выращивания [Текст] / Ф. С. Корниенко, В. Т. Саблук, С. И. Матушкин // Технические культуры: селекция, технология, переработка ; под ред. В.С. Шевелухи [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1991. – С. 57-64.
9. Кромина, К. А. Создание трансгенных растений табака и рапса с геном MF2 белка из *Bacillus thuringiensis*,

индуцирующего неспецифическую устойчивость к фитопатогенам [Текст] / К. А. Кромина, Д. В. Шумилина, В. Г. Джавахия // Современные системы защиты растений от болезней и перспективы использования достижений биотехнологии и генной инженерии. – Голицино, 2003. – С. 201-203.

10. ПЦР-анализ трансгенных форм сахарной свеклы с геном Mf2 [Текст] / А. С. Хуссейн, Н. Н. Богачева, А. А. Налбандян, Е. Н. Васильченко // Доклады РАСХН. – 2014. – № 5. – С. 10-13.

References

1. Atanasov A. L. Sugar Beet. Handbook of Plant Cell Culture, V.4 / Eds Evans D.A. et al. N. Y.: MacMillan, 1986, 720 p.

2. Ingersoll J. L., Heutte T. M., Owens L. D. Effect of Promotor-Leader Sequences on Transient Expression of Reporter Gene Chimeras Biologically Transferred into Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Suspension Cells. *Plant Cell Rep.*, 1996, Vol. 15, pp. 836-840

3. Thomas T. H. Biotechnological Advances in Sugar Beet Research. *Genet.Engen. Biotechnol.*, 1991, Vol. 11, pp. 14-17.

4. Vasilchenko E. N., Zhuzhzhhalova T. P., Zemlyanuhina O. A., Fedorin D. N. *Poluchenie rastenij saharnoj svekly, nesushhih gen MF2, inducirujushhij nespe-cificheskiju ustojchivost' k fitopatogenam* [Obtaining of sugar beet plants bearing the MF2 gene that induces non-specific resistance to phytopathogens]. *Saharnaja svekla* [Sakharnaya svekla], 2009, no. 2, pp. 20-21. (In Russian)

5. Dzhavakhiya V.G. *Bakterial'nye belki - induktory nespecificheskoj ustojchivosti rastenij k fitopatogenam* [Bacterial proteins are inducers of non-specific resistance to phytopathogens] *Sovremennye sistemy zashhity rastenij ot boleznej i perspektivy ispol'zovanija dostizhenij biotehnologii i gennoj inzhenerii Materialy Vserossijskogo soveshhanija* [Modern systems of plant protection from diseases and prospects of using the achievements of biotechnology and gene engineering Materials of All-Russian Conference]. 2003, pp. 196-198. (In Russian)

6. Dyakov Yu. T., Ozeretskovskaya O. L., Dzhavakhiya V. G., Bagirova S. F. *Obshhaja molekulyarnaja fitopatologija* [General molecular phytopathology]. Moscow, 2001, pp. 254-291. (In Russian)

7. Zakharchenko N. S., Kalyayeva M. A., Buryanov Ya. I. *Tehnika geneticheskoy transformacii raznyh sortov saharnoj svekly* [Technique of genetic transformations of different sugar beet varieties]. *Fiziologija rastenij* [Fiziologiya rastenij], 2000, Vol. 47, no. 1, pp. 79-85. (In Russian)

8. Korniyenko F. S., Stabluk V. T., Matushkin S. I. *Kompleksnaja zashhita saharnoj svekly ot boleznej, vreditelej i sornjakov pri indu-strial'noj tehnologii ee vyrashhivaniya* [Complex sugar beet protection from diseases, pests and weeds when using industrial technology of its growing]. *Tehniche-skie kul'tury: selekcija, tehnologija, pererabotka* [Industrial crops: breeding, technology]. Moscow, 1991, pp. 57-64. (In Russian)

9. Kromina K. A., Shumilina D. V., Dzhavakhiya V. G. *Sozdanie transgennyh rastenij tabaka i rapsa s genom MF2 belka iz Bacillus thuringiensis, inducirujushhego nespecificheskiju ustojchivost' k fitopatogenam* [Development of tobacco and rape transgenic plants with the MF2 gene of protein from *Bacillus thuringiensis* that induces non-specific resistance to phytopathogens] *Sovremennye sistemy zashhity rastenij ot boleznej i perspektivy ispol'zovanija dostizhenij biotehnologii i gennoj inzhenerii* [Modern systems of plant protection from diseases and prospects of using the achievements of biotechnology and gene engineering]. Golitsino, 2003, pp. 201-203. (In Russian)

10. Hussein A. S., Bogachova N. N., Nalbandyan A. A., Vasilchenko E. N. *PCR-analiz transgennyh form saharnoj svekly s genom Mf2* [PCR-analysis of sugar beet transgenic forms with the Mf2 gene]. *Doklady RASHN* [Papers of RASKhN], 2014, no. 5, pp. 10-13. (In Russian)

Сведения об авторах

Васильченко Елена Николаевна – старший научный сотрудник отдела генетики и биотехнологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», пос. ВНИИСС, Российская Федерация; e-mail: biotehnologiya@mail.ru.

Федулова Татьяна Петровна – заведующая лабораторией биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ

«Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», доктор биологических наук, пос. ВНИИСС, Российская Федерация; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Федорин Дмитрий Николаевич – научный сотрудник отдела генетики и биотехнологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», кандидат биологических наук, пос. ВНИИСС, Российская Федерация; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Information about authors

Vasilchenko Yelena Nikolayevna – Senior Researcher of the Department of Genetics and Biotechnology, FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov», village VNISS, Russian Federation; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Fedulova Tatyana Petrovna – Head of the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov», DSc (Biology), village VNISS, Russian Federation; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Fedorin Dmitry Nikolaevich – Researcher of the Department of Genetics and Biotechnology, FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov», PhD (Biology), village VNISS, Russian Federation; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

DOI: 10.12737/article_5c1a3206dad755.50307403

УДК 633.63:575:632.52.577.1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM*

кандидат биологических наук **А. А. Налбандян**¹

доктор сельскохозяйственных наук **Н. В. Безлер**¹

¹ – ФГБНУ «Всероссийский НИИ сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова»
пос. ВНИИСС, Российская Федерация

Целью работы являлось апробирование и подбор родо-специфических пар праймеров для достоверной идентификации азотфиксирующих микроорганизмов – грамтрицательных бактерий рода *Azospirillum*. В ходе работы была модифицирована методика экстракции суммарной ДНК изолятов бактерий из их биомассы – чистой культуры. Проводились экспериментальные исследования по подбору родо-специфического молекулярного маркера для надежной идентификации. Были оптимизированы условия проведения полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Амплификация суммарной ДНК бактерий с праймером Az16S-A F / Az16S-A R выявила у всех изучаемых номеров наличие ампликона размером в 640 п. н., что подтверждает принадлежность всех трех исследуемых образцов к роду *Azospirillum*. В результате проведенных экспериментов апробирован и отобран родо-специфический праймер Az16S-A F / Az16S-A R, позволивший выделить штаммы рода *Azospirillum* в чистой культуре (3 штамма). Полученные экспериментальные данные по молекулярному маркеру позволяют образцам штаммов, принадлежность которых к данному роду подтверждена ПЦР анализом, служить как положительным, так и отрицательным контролем при дальнейшей работе с бактериями.

Ключевые слова: ДНК, полимеразно-цепная реакция, праймер, бактерии, *Azospirillum*.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF AZOTFIXING BACTERIA *AZOSPIRILLUM*

PhD (Biology) **A. A. Nalbandyan**¹

DSc (Agriculture) **N. V. Bezler**¹

¹ – FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov»
village VNISS, Russian Federation

Abstract

The aim of the work was to test and select genus-specific primer pairs for the reliable identification of nitrogen-fixing microorganisms - gram-negative bacteria of *Azospirillum* genus. In the work, the technique for extracting total DNA of bacterial isolates from their biomass (pure culture) has been modified. Experimental studies have been con-