

YEMETS Z.V., MAMENKO O.M., KHRUCKIY S.S.

*Kharkov state zooveterinary Academy, The Ministry Of Agrarian Of Ukraine
Ukraine, 62341, Kharkov, Small Danilovka, e-mail: zoya_emez@mail.ru*

CHANGES THE PROTEIN PERCENTAGE OF COWS UNDER THE INFLUENCE OF NEGATIVE FACTORS BIOGEOCHEMICAL PROVINCE

Aims. In the article the results of scientific and business experience, which was held in the zone of heavy metals contamination of the biogeochemical province in the negative anthropogenic impact on genetically predetermined quality indicator of protein in the milk of cows. Given production processing method for the production of environmentally safe milk and increasing percentage of protein in the milk of cows with the help of toxic action of mineral additives and biologically active preparation «AVGOR-5». **Methods.** Laboratory of physico-chemical tests of an experimental material with use of the method of atomic-absorption spectrophotometry AAS-30 (Carl Zeiss, Jena), held – biometric processing of the received results. **Results.** It should be noted that due to the application of special fodder additives and biologically active preparation was achieved not only the persistence of high levels of protein content in the milk, but also a decrease in urinary excretion of extremely toxic creatinine, which is important for prevention of environmental pollution. **Conclusions.** Genetically predetermined rate the protein percentage milk may change under the influence of such «shock» factor, as the high content of heavy metals in the feed. A balanced vitamin-mineral additives, used in the feeding of the cows with the product «AVGOR-5», contributed to the normalization of such genetic indicator, as the content of protein in the milk of cows, which in connection with the anthropogenic pollution is significantly decline in province of the Central Donbass with the negative anthropogenic influence that has affected the quality of the products obtained, and may be evidence of the oppression of genetically caused by the capacity of animals in the protein percentage.

Key words: protein in the milk of cows, genetically predetermined figure, the biogeochemical province, negative factors.

**ЖУКОВ В.А., СУЛИМА А.С., ЖЕРНАКОВ А.И., ШТАРК О.Ю., БОРИСОВ А.Ю.,
ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Рос-
сельхозакадемии*

Россия, 196608, г. Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3, e-mail: zhukoff01@yahoo.com

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ НОВЫХ СОРТОВ ГОРОХА, УСТОЙЧИВЫХ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) подвергается нападению многих вредителей и патогенных микроорганизмов, включая насекомых, нематоды, бактерии, грибы и вирусы. Наиболее распространенными, а также наиболее вредными по степени воздействия, являются болезни, вызываемые грибами. Возбудитель мучнистой росы *Erysiphe communis* f. *pisi* (H.A. Dietr.) Jacz. является узкоспециализированным облигатным паразитом, распространенным во всех районах выращивания гороха. Мучнистая роса переносится воздушным путем и поражает листья, стебли, а также бобы. Заболевание негативно влияет на качество зернобобовой продукции, используемой в пищевой и кормовой промышленности. При сильном (до 90–100 %) поражении растений гороха мучнистой росой происходит снижение урожая зерна в 5 раз, также снижается содержа-

ние белка [4].

Защитные меры против мучнистой росы гороха включают в себя ранние посадки культуры, мелкодисперсный полив, использование фунгицидов и растительных экстрактов. Одним из наиболее известных способов является применение коллоидной серы или серосодержащих соединений. Альтернативой данным способам служит использование сортов, устойчивых к мучнистой росе, или введение генов устойчивости в уже существующие сорта, что должно приводить к снижению затрат на химическую обработку посевов и негативного эффекта от обработок.

У гороха посевного (*Pisum sativum* L.) известны три гена, определяющие устойчивость гороха к мучнистой росе: *er1*, *er2*, *Er3*. Данные гены были выявлены на основе анализа устой-

чивости растений гороха из природных популяций к заболеванию мучнистой росой. Большинство выявленных случаев имеют в основе рецессивную аллель единственного локуса *er1* [9].

У различных видов растений, таких как арабидопсис (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L.) и других, известны линии, обладающие устойчивостью к мучнистой росе, которая определяется мутацией с потерей функциональности в гене семейства *MLO*. Данное семейство кодирует белки, содержащие трансмембранные домены, которые сходны с рецепторами, сопряженными с G-белками (англ. G-protein-coupled receptors, GPCR) [1].

Недавно была выявлена последовательность гена гороха *PsMLO1* [2]. Тест на аллелизм между линией гороха с мутацией в гене *PsMLO1* и сортом Franklin, несущим аллель *er1*, определяющую устойчивость к заболеванию мучнистой росой, показал соответствие генов *PsMLO1*

Материалы и методы

Биологический материал. В работе были использованы следующие линии и сорта гороха посевного: устойчивые к мучнистой росе J192, J101, J105, J201, J210, J1128, J1171, J1559, J1951, J2019, J2302, Franklin, а также восприимчивая к мучнистой росе линия SGE. Линии J192, J101, J105, J201, J210, J1128, J1171, J1559, J1951, J2019 и J2302 любезно предоставлены Майком Амброзом (Mike Ambrose, John Innes Centre, Norwich, UK).

Молекулярно-биологические процедуры. Геномную ДНК выделяли из молодых листьев растений гороха с использованием буфера СТАВ по модифицированному протоколу Rogers, Bendich (1985). Тотальную РНК выделя-

ли из молодых листьев растений гороха с использованием RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. кДНК синтезировали с использованием oligo-dT-праймера и обратной транскриптазы RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, США). ПЦР проводили в термоциклерах iCycler™ (BioRad, США) и Personal Cyler (Biometra, Германия). Секвенирование осуществляли на автоматическом приборе ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя. Праймеры были синтезированы компанией «Евроген» (Москва, Россия).

и *er1* [6]. Также соответствие *PsMLO1* и *er1* было подтверждено с помощью транзистентной экспрессии *PsMLO1* в листьях устойчивых к мучнистой росе линий гороха [2].

В практику мирового сельского хозяйства в последнее десятилетие активно внедряются сорта гороха, устойчивые к мучнистой росе. Линии и сорта, несущие подобные мутации в гене *PsMLO1*, являются перспективными донорами признака устойчивости к мучнистой росе. Для эффективного проведения селекции требуется разработка генетических маркеров, которые бы позволяли на самых ранних этапах проводить отбор гибридов. В настоящей работе были созданы молекулярные маркеры, пригодные для идентификации известных мутантных аллелей гена *PsMLO1*. Данные маркеры могут быть использованы в селекционной работе для создания новых сортов гороха, устойчивых к заболеванию мучнистой росой.

ли из молодых листьев растений гороха с использованием RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. кДНК синтезировали с использованием oligo-dT-праймера и обратной транскриптазы RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, США). ПЦР проводили в термоциклерах iCycler™ (BioRad, США) и Personal Cyler (Biometra, Германия). Секвенирование осуществляли на автоматическом приборе ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя. Праймеры были синтезированы компанией «Евроген» (Москва, Россия).

Использовали следующий состав компонентов ПЦР (на 1 реакцию):

MgCl ₂	–	0,1 мМ
Нуклеотиды (каждый)	–	0,2 мМ
Праймер (каждый)	–	0,1 мкМ
Буфер для Taq-полимеразы	–	1x
Taq-полимераза	–	0,05 ед/мкл
ДНК-матрица	–	~5-10 нг.

Реакцию проводили в объеме 10 мкл. Количество циклов реакции – 35. Температура отжига праймеров составляла 60°C, время отжига 30 секунд, время элонгации 30 секунд. После окончания реакции реакцию смесь разделяли электрофорезом в 2 % агарозном геле в 0,5-кратном буфере ТАЕ.

Компьютерный анализ. В работе были ис-

пользованы следующие программы и сайты:

– данные по секвенированию нуклеотидных последовательностей обрабатывали с помощью приложения Contig Express из пакета программ Vector NTI 8.0.

– множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью серверов Multalin (<http://bioinfo.genopole->

toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html) и ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), а также в программе MEGA 5.05 [8].

Результаты и обсуждение

Последовательность гена гороха *PsMLO1*, мутации в котором придают растению устойчивость к заболеванию мучнистой росой (генетический символ *er1*), депонирована в базе данных NCBI под идентификатором FJ463618 [2]. К настоящему моменту проведена молекулярно-биологическая характеристика 5 мутантных аллелей данного гена [2, 5]. На основе этой информации возможно осуществлять маркер-ассоциированную селекцию гороха на устойчивость к мучнистой росе с использованием маркеров, представляющих определенные мутантные аллели гена *PsMLO1*. В качестве доноров признака устойчивости могут выступать различные линии и сорта, полученные независимо друг от друга, а также несущие не охарактеризованные ранее мутантные аллели гена *PsMLO1*. По этой причине возникает необходимость созда-

– дизайн праймеров осуществляли с помощью программ OligoCalc [3] и Primer3Plus [10].

ния молекулярных маркеров для каждой линии-донора.

Согласно литературным данным, растения сорта Franklin несут протяженную (более 20 000 п.н.) вставку транспозона в последовательности гена *PsMLO1*, вследствие чего в ходе сплайсинга образуется неверная последовательность мРНК, содержащая фрагмент транспозона и, таким образом, отличающаяся от мРНК «дикого типа» [5]. На основании этой последовательности в ходе данной работы были созданы праймеры (табл.), с помощью которых были амплифицированы фрагменты гена *PsMLO1* на геномной ДНК растений сорта Franklin (несущих вставку транспозона и устойчивых к мучнистой росе) и растений линии SGE (имеющих последовательность гена *PsMLO1* «дикого типа» и восприимчивых к мучнистой росе).

Таблица. Праймеры, использованные для амплификации фрагмента гена *PsMLO1*

Название праймера	Последовательность, 5' – 3'
PsMLO4	TGG TTG AGC CTG GAG ATC ACC
PsMLO8	CCA GTT CTT AAG CGC TGT TGC
MLO1_A	TAA CCT CTT GCT TCC ACA AAA CA
MLO1_C	GGT GGC GAC TCT TCT GTC AT

Секвенирование полученных фрагментов показало, что последовательность мРНК и геномной ДНК в области левой границы вставки транспозона идентичны. На основании полученной информации был создан молекулярный маркер типа RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms), представляющий собой систему из 3 праймеров, которая позволяет по результату одной реакции ПЦР однозначно идентифицировать аллельное состояние гена *PsMLO1* у анализируемого растения (рис.).

Такая система праймеров включает:

праймер (А) – последовательность ДНК, комплементарная кодирующему участку гена *PsMLO1*;

– праймер (В) – последовательность ДНК, комплементарная кодирующему участку гена *PsMLO1*, которая вместе с праймером А позволяет амплифицировать фрагмент АВ на матрице ДНК природной аллели гена *PsMLO1* (соответствующей восприимчивости к мучнистой росе);

– праймер (С) – последовательность ДНК, комплементарная вставке транспозона в гене *PsMLO1*, присутствующей у растений сорта Franklin, которая вместе с праймером А позволяет амплифицировать фрагмент АС на матрице ДНК аллели гена *PsMLO1* со вставкой транспозона.

При этом размер фрагмента АС отличается от размера фрагмента АВ. Каждый из фрагментов можно отличить стандартными лабораторными методами, например, определив размер продукта амплификации после электрофореза в 2 % агарозном геле.

Для определения оптимальной комбинации трех праймеров были сконструированы различные варианты праймеров А, В и С, и проведена ПЦР со всеми возможными комбинациями праймеров на геномной ДНК, выделенной из листьев растений линии SGE и сорта Franklin (общее число комбинаций составило $2 \times 5 \times 5 = 50$). Размер продукта АВ составляет приблизительно 200 нуклеотидов, продукта АС – приблизительно 400 нуклеотидов.

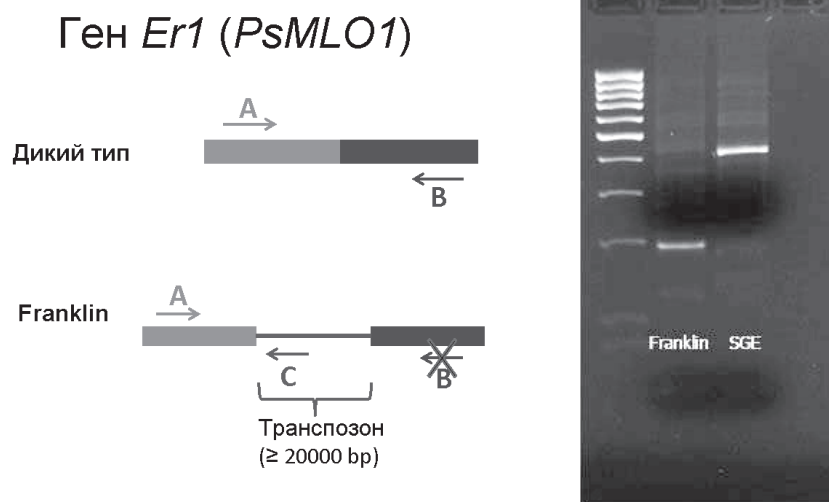


Рис. Молекулярный маркер для определения аллельного состояния гена *PsMLO1* у растений гороха, несущих вставку транспозона в указанном гене (Franklin) и не несущих ее (SGE, дикий тип)

Примечания: Слева – схема расположения праймеров относительно вставки транспозона, справа – результат электрофореза продукта реакции с оптимально работающими праймерами в 2%-ном агарозном геле.

Оптимальное сочетание трех праймеров является интеллектуальной собственностью, которая будет защищена в соответствии с законодательством РФ (подана заявка на патент, номер заявки 2012147570/20(076429)). Созданный молекулярный маркер (система праймеров) позволяет определять аллельное состояние гена *PsMLO1* у анализируемого растения (например, перспективного образца для создания селекционной линии) по результату одной реакции ПЦР с последующей детекцией размера продуктов (рис.). Данную систему можно применять при проведении селекционных работ с использованием сорта Franklin (либо другого сорта или линии,

имеющей аналогичную вставку транспозона) в качестве донора признака устойчивости к заражению мучнистой росой.

Аналогичные молекулярные маркеры планируется создать для других аллельных состояний гена *PsMLO1*, представленных у других линий-доноров признака устойчивости к мучнистой росе. Для этого в работе было проведено секвенирование кДНК *PsMLO1* у серии генотипов гороха, устойчивых к мучнистой росе. На основании информации об обнаруженных нуклеотидных заменах предложены способы использования данных отличий в последовательности ДНК в качестве молекулярных маркеров.

Выводы

На основании результатов секвенирования гена гороха *PsMLO1* разработаны молекулярные маркеры, позволяющие детектировать аллель-

ные состояния указанного гена, соответствующие устойчивости или восприимчивости гороха к заболеванию мучнистой росой.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента РФ (НШ-337.2012.4), Министерства образования и науки (ГК №16.512.11.2155 и соглашения № 8056 и № 8109) и РФФИ (12-04-01687-а, 12-04-32126_мол-а, 13-04-01702-а и 13-04-01703-а).

Литература

1. Devoto A., Hartmann H.A., Piffanelli P., Elliott C., Simmons C., Taramino G., Goh C.-S., Cohen F.E., Emerson B.C., Schulze-Lefert P. Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family // J. of Mol. Evol. – 2003. – Vol. 56, №1. – P. 77–88.
2. Humphry M., Reinstädler A., Ivanov S., Bisseling T., Panstruga R. Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea *er1* plants is conferred by natural loss-of-function mutations in *PsMLO1* // Mol. Plant Pathol. – 2011. – Vol. 12, №9. – P. 866–878.
3. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator // Nucleic Acids Res. – 2007. – Vol. 35

(webservice issue). – W. 43–46.

4. Mahmood T., Ahmad I., Qureshi S., Aslam M. Estimation of yield losses due to powdery mildew in peas // *Pak. J. Bot.* – 1983. – Vol. 15. – P. 113–115.
5. Pavan S., Schiavulli A., Appiano M., Marcotrigiano A.R., Cillo F., Visser R.G., Bai Y., Lotti C., Ricciardi L. Pea powdery mildew *er1* resistance is associated to loss-of-function mutations at a MLO homologous locus // *Theor. Appl. Genet.* – 2011. – Vol. 123, №8. – P. 1425–1431.
6. Pavan S., Schiavulli A., Appiano M., Miacola C., Visser R.F., Bai Y., Lotti C., Ricciardi L. Identification of a complete set of functional markers for the selection of *er1* powdery mildew resistance in *Pisum sativum* L. // *Mol. Breed.* – 2013. – Vol. 31, №1. – P. 247–253.
7. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 5. – P. 69–76.
8. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28, №10. – P. 2731–2739.
9. Tiwari K., Penner G., Warkentin T. Inheritance of powdery mildew resistance in pea // *Can. J. Plant Sci.* – 1997. – Vol. 77, №3. – P. 307–310.
10. Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35 (webservice issue). – W. 71–74.

ZHUKOV V.A., SULIMA A.S., ZHERNAKOV A.I., SHTARK O.Y., BORISOV A.Y., TIKHONOVICH I.A.

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RAAS

Russia, 196608, Saint-Petersburg, Pushkin, Podbelsky ch., 3, e-mail: zhukoff01@yahoo.com

MOLECULAR MARKERS FOR BREEDING THE NEW PEA CULTIVARS RESISTANT TO POWDERY MILDEW

Aims. Powdery mildew is economically important disease of pea (*Pisum sativum* L.) as it causes severe losses of yield worldwide. Environmental friendly approach to control powdery mildew, in contrast to chemical protection, is use of the resistant cultivars. Mutations in pea gene *PsMLO1* that confer resistance to powdery mildew can be used as molecular markers for breeding resistant cultivars. **Methods.** Mutant allelic variants of *PsMLO1* were sequenced in resistant pea cultivars and lines in order to detect SNPs and/or indels suitable for creation PCR-based molecular markers. **Results.** The system of 3 primers was designed that allows one-step PCR-based identification of natural mutant allele *PsMLO1* with transposon insertion in reading frame that presents in resistant pea cultivar Franklin. **Conclusions.** This molecular marker can be used for breeding resistant cultivars when taking cultivar Franklin (as well as related lines and cultivars) as donors of powdery mildew resistance trait.

Key words: *Pisum sativum* L., powdery mildew, molecular markers, resistance, breeding.

ЗАДОРОЖНА О.А.

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН

Україна, 61060, Харків, Московський пр., 142, e-mail: olzador@ukr.net

**ПОЛІМОРФІЗМ МАРКЕРНИХ ЛОКУСІВ, ЗЧЕПЛЕНИХ З QTL,
ЩО КОНТРОЛЮЮТЬ ОЗНАКИ НАСІННЯ**

Однією з важливіших олійних культур в Україні є соняшник. Серед виробництва олійних культур його частка становить майже 70 %. Спостерігається тенденція до збільшення виробництва насіння соняшнику. У 2011 році врожай цієї культури становив 8,7 млн тон, що на 28 % перевищує показники 2005 року [1]. У світовому виробництві соняшник займає лише 9 % після сої, ріпаку та бавовни. Україна за цим показни-

ком займає одне з перших місць, чергуючись з Росією та Аргентиною. Україна є одним з лідерів світового експорту продуктів переробки. Так за даними 2012 року Міністерства сільського господарства США (USDA) доля України в світовій торгівлі соняшnikовою олією оцінюється на рівні 57 %, що підтверджує лідерство за експортом цього продукту. Для порівняння експорт олії з Росії становить 11 % світового продажу, з