

На правах рукописи

Вишневская Мария Сергеевна

**НУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ
МНОГОЛЕТНИХ ВИДОВ ЛЮЦЕРНЫ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства имени Н. И. Вавилова» в 2010-2014 гг.

- Научный руководитель** доктор биологических наук
Потокина Елена Кирилловна, заведующая лабораторией мониторинга генетической эрозии растительных ресурсов Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства имени Н. И. Вавилова
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук
Карлов Геннадий Ильич, профессор, руководитель Центра молекулярной биотехнологии Российского государственного аграрного университета - МСХА имени К.А.Тимирязева
- кандидат биологических наук
Андронов Евгений Евгеньевич, заведующий лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики

Защита диссертации состоится «15» апреля 2015 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 006.041.01 во Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства им. Н. И. Вавилова по адресу: 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44, тел. 314-78-36, 312-25-93; факс (812) 571-87-28; e-mail: v.gavrilova@vir.nw.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства имени Н. И. Вавилова и на сайте <http://www.vir.nw.ru>.

Автореферат размещен на сайтах ВАК и ВИР « 13 » февраля 2015 г. и разослан «25» февраля 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Вера Алексеевна Гаврилова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Засоление возделываемых почв является одним из наиболее распространенных деградиционных процессов, понижающих плодородие сельскохозяйственных земель, приводящих к их опустыниванию и исключению из использования. По данным Международного института окружающей среды и развития около 10% поверхности континентов страдает от засоления. В России засоленные почвы занимают 5% площади равнин (Казакова, 2007).

Для эффективного восстановления деградированных земель перспективным является использование растений-биомелиорантов, среди которых представители семейства бобовых имеют приоритетное значение, так как обладают уникальной способностью повышать почвенное плодородие за счет накопления атмосферного азота вследствие симбиоза с клубеньковыми бактериями. Люцерна (*Medicago L.*) является важной сидератной культурой, выращиваемой на обширных территориях многих стран (Голобородько, 2009). Помимо симбиотических отношений с азотфиксирующими бактериями, культура люцерны способствует снижению уровня грунтовых вод и рассолению почв.

Анализ естественного аллельного разнообразия генов, контролирующих устойчивость к засолению, сохраняемого в коллекции образцов люцерны генбанка ВИР им. Н. И. Вавилова, представляет первостепенный интерес для селекции солеустойчивых сортов.

Генетический контроль ответной реакции растений на солевой стресс детально изучался на модельном объекте *Medicago truncatula* Gaertn. (Merchan et al., 2003; 2007; Lorenzo et al., 2009). По результатам транскриптомного анализа были идентифицированы гены-кандидаты, участвующие в формировании адаптивной реакции растения на засоление. В частности, у *M. truncatula* был идентифицирован ген, кодирующий транскрипционный фактор *Zpt2-1* (*TFIIIA-like*), регулирующий способность корней восстанавливать ростовые процессы после воздействия солевого стресса (Frugier et al., 2000, Merchan et al., 2003). Позже было установлено, что экспрессия *Zpt2-1*, в свою очередь, контролируется геном рецепторной протеинкиназы *Srlk* (Salt-Induced Receptor-like Kinase) (Lorenzo et al., 2009). Сигнальный белок *Srlk* встроен в клеточную мембрану, имеет три домена: экстрацеллюлярный, трансмембранный и интрацеллюлярный. Его функция заключается в передаче сигнала об изменении концентрации ионов натрия в околочлеточном пространстве и активации экспрессии генов, обеспечивающих защитную реакцию на засоление. Ген *Srlk* экспрессируется преимущественно в корнях, уровень его экспрессии в эпидермисе корневых волосков и в апексе корня увеличивается в несколько раз в условиях солевого стресса (Lorenzo, 2009). Установлено, что мутации в структурной части гена, изменяющие аминокислотную последовательность *Srlk*, или приводящие к стоп-кодонам

(TILLING *Srlk*-mutants), в условиях солевого стресса достоверно и существенно сказываются на длине и массе корней, массе наземной части растения, способности растения к образованию клубеньков (Lorenzo et al., 2009).

Сходная организация (синтения) геномов бобовых позволяет использовать знания, полученные для модельного вида *M. truncatula*, для идентификации генов солеустойчивости у экономически значимых многолетних видов *Medicago*.

Цель исследования заключалась в выявлении аллельного разнообразия генов, определяющих устойчивость многолетних видов люцерны к хлоридному засолению, для последующего использования в маркер-вспомогательной селекции.

Задачи исследования. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. На материале мировой коллекции ВИР сформировать выборку образцов *Medicago sp.* из разных эколого-географических зон произрастания, потенциально отражающих внутри и межвидовое генетическое разнообразие.
2. Провести фенотипическую оценку образцов по признаку солеустойчивости в вегетационных экспериментах: определить содержание поглощенных ионов Na^+/K^+ , определить степень угнетения растений.
3. Идентифицировать в геноме видов *Medicago* гены-ортологи, формирующие защитную реакцию на засоление, клонированные для модельного вида *M. truncatula*.
4. Оценить уровень экспрессии генов-кандидатов в корнях и листьях у солечувствительных и солеустойчивых образцов многолетних видов *Medicago* в условиях засоления субстрата и контрольных условиях.
5. Секвенировать последовательности генов-кандидатов в изучаемой выборке растений, выявить их нуклеотидный полиморфизм.
6. Сопоставить выявленные аллельные варианты генов-кандидатов с показателями солеустойчивости и идентифицировать аллели, связанные с устойчивостью к хлоридному засолению.
7. Разработать на потенциально перспективные аллели молекулярные маркеры для последующего их использования в целях маркер-вспомогательного отбора.

Научная новизна и практическая значимость работы.

На основе синтении геномов бобовых растений у люцерны посевной идентифицирована последовательность гена рецепторной протеинкиназы *Srlk* и активируемого им гена транскрипционного фактора *Zpt2-1*, чья ключевая роль в реакции на солевой стресс доказана для модельного вида *M. truncatula*.

Для 18 образцов многолетней люцерны из мировой коллекции ВИР, имеющих различное географическое происхождение и тестированных на выживаемость в условиях засоления, проанализирован нуклеотидный полиморфизм генов *Srlk* и *Zpt2-1*.

Экспериментально установлено, что в условиях солевого стресса уровень экспрессии гена *Srlk* в корнях солеустойчивого сорта люцерны изменчивой

достоверно выше, чем в контроле. У солеустойчивого образца многолетней люцерны уровень экспрессии гена *Srlk* в корнях ниже, по сравнению с контролем.

В последовательностях генов *Srlk* и *Zpt2-1*, выявлены несинонимичные нуклеотидные замены (SNP), достоверно ассоциированные со способностью растений восстанавливать ростовые процессы в условиях засоления.

На потенциально значимые несинонимичные SNP впервые разработаны молекулярные маркеры, которые могут быть использованы при массовом скрининге селекционного материала для выявления генотипов люцерны с повышенной устойчивостью к засолению.

По результатам фенотипической оценки на солеустойчивость образцы *M. varia* к-25782 сорт Тибетская и *M. coerulea* к-12821 определены как наиболее солеустойчивые и рекомендованы в качестве источников ценных аллелей для селекции сортов с повышенным адаптивным потенциалом.

Положения, выносимые на защиту.

1. В геноме многолетних видов люцерны идентифицированы ортологи генов *Srlk* и *Zpt2-1*, клонированных для модельного вида *M. truncatula*.
2. Уровень экспрессии гена *Srlk* в корнях солеустойчивого сорта люцерны изменчивой достоверно повышается в ответ на солевой стресс.
3. В последовательности генов *Srlk* и *Zpt2-1* выявлены несинонимичные SNP, достоверно ассоциированные со способностью растений люцерны выживать и восстанавливать ростовые процессы в условиях засоления.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на II Всероссийской молодежной научно-практической конференции «Перспективы развития и проблемы современной ботаники» ЦСБС СО РАН, Новосибирск (5-8 октября 2010); Всероссийском симпозиуме «РАСТЕНИЕ И СТРЕСС (Plants under Environmental Stress)» ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, Москва (9-12 ноября 2010); Международной школе молодых ученых «Bioinformatics methods and next generation sequencing technologies» ИЦиГ СО РАН, Новосибирск (26 – 30 августа 2011); Международной конференции 19th EUCARPIA General Congress, Будапешт (21-24 мая 2012); Конференции молодых ученых и аспирантов «Актуальность наследия Н. И. Вавилова для развития биологических и сельскохозяйственных наук», Санкт-Петербург (20-21 марта 2012); Международной научной конференции «Генетические ресурсы растений – основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни» Санкт-Петербург (6 – 8 октября 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 статьи в журналах из списка ВАК, 6 статей и тезисов в сборниках трудов конференций, 1 учебное пособие.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 97 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы (71 наименование, в том числе 50 зарубежных авторов), двух приложений, содержит 16 таблиц и 26 рисунков.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для фенотипической оценки по признаку солеустойчивости из мировой коллекции ВИР были отобраны 18 образцов многолетних видов люцерны. Среди них пять сортов *M. varia* Mart., два сорта *M. sativa* L., три дикорастущих местных образца *M. sativa* различного происхождения – из Казахстана, Туркмении и Китая, и восемь дикорастущих образцов разных видов: *M. coerulea* Less. ex Ledeb., *M. falcata* L., *M. trautvetteri* Shumn. (табл.1).

Оценку солеустойчивости производили экспериментально на разных стадиях развития растений. Всего проанализировано 2322 растения. Для оценки проростков люцерны на солеустойчивость использовали опубликованный ранее протокол (Rumbaugh, 1991). Эксперимент проводили в трех повторностях. Оценивали достоверность отличий по всхожести по критерию хи-квадрат с гипотетической «средней» кривой, полученной при усреднении значений гибели всех образцов при каждой концентрации. Образцы, которые значимо ($p < 0.05$) отличались от «средней» кривой в сторону большей смертности семян (меньшей всхожести), были определены как неустойчивые, в сторону меньшей – как устойчивые.

Методика микровегетационного эксперимента по выращиванию растений *in vitro* была первоначально отработана нами на люпине (Дроздов и др., 2007). В экспериментах с люцерной семена скарифицировали концентрированной соляной кислотой в течение 40 с и помещали в чашки Петри на агаризованную питательную среду Гамборга В5. Проростки рассаживали по одному в пробирки 160 мм в диаметре и 200 мм высотой и культивировали в течение 28 сут. Стресс создавали содержанием в среде 0,17 М NaCl по Мезенцеву (1980). Объем выборки составил 1023 растения, из них 682 выращены в условиях засоления и 341 – в условиях контроля. Для всех образцов эксперимент проводился в трех повторностях. Оценку угнетения проводили по трем показателям: длине корня, сухой массе корня и сухой массе растения. Влияние соли на указанные параметры оценивали с помощью дисперсионного анализа; для выравнивания дисперсий из всех измеренных величин был извлечен квадратный корень.

Выращивание люцерны в вегетационных сосудах проводили по методике, разработанной Смитом (Smith, 2011). По истечении срока выращивания были измерены длины побегов и корней. Дополнительно, визуально оценивали в баллах состояние растений по степени пожелтения (усыхания) листьев разных ярусов и точки роста по следующей шкале: 0 – отсутствие видимого стресса, 1 – небольшое пожелтение нижних листьев, 2 – слабое пожелтение всего растения, 3 – пожелтение всего растения, гибель листьев нижнего яруса, 4 – пожелтение всего растения, листья нижнего и среднего ярусов погибают, 5 – гибель всего растения.

Для определения содержания натрия и калия использовали метод, описанный Шавруковым (2009). Для каждого сорта составляли 3 выборки: а) контрольные растения, б) погибшие в опытном варианте растения, в) выжившие

в опытном варианте растения. Определения содержания натрия и калия проводили на пламенном фотометре (Flame photometer Jenway PFP 7, England).

Таблица 1. Образцы люцерны из мировой коллекции ВИР, проанализированные по устойчивости к засолению

№	Вид, № по каталогу ВИР, сорт	Плоидность	Происхождение	Характеристика образца
1	<i>M. coerulea</i> к-12821	2n	Дагестан, Кавказ	Образец дикорастущей люцерны. Предположительно солеустойчив.
2	<i>M. coerulea</i> к-36116	2n	Казахстан, Уральская обл.	Образец дикорастущей люцерны
3	<i>M. falcata</i> subsp. <i>borealis</i> Grossh. к-1467	2n	Россия, Ленинградская обл.	Образец дикорастущей люцерны. Собран на северной границе ареала. Предположительно зимостоек.
4	<i>M. falcata</i> к-36748	2n	Казахстан, Актюбинская обл.	Образец дикорастущей люцерны.
5	<i>M. falcata</i> к-44033	2n	Россия, Якутия	Образец создан на основе дикорастущего экотипа, распространенного в Якутии. Зимостоек. Выращивается на сено и под выпас скота.
6	<i>M. falcata</i> к-44050	2n	Россия, Краснодарский край	Образец дикорастущей люцерны. Собран в степи, подверженной вторичному засолению.
7	<i>M. sativa</i> к-33743	4n	Китай	Староместный образец. Предположительно солеустойчив.
8	<i>M. sativa</i> к-38539	4n	Казахстан, Семиреченск	Образец дикорастущей люцерны, собранный в Семиреченской области.
9	<i>M. sativa</i> , к-40812, сорт Надежда	4n	Украина	Создан в Херсонском НИИ орошаемого земледелия. Высокоурожайный.
10	<i>M. sativa</i> к-42760, сорт Deseret	4n	США	Создан на базе турецкого генотипа люцерны посевной. Выращивается на сено в условиях орошения.
11	<i>M. sativa</i> к-8958	4n	Туркмения	Предположительно солеустойчив.
12	<i>M. trautvetteri</i> к-35023	2n	Казахстан, Актюбинская обл.	Образец дикорастущей люцерны гибридного происхождения. Засухоустойчив и зимостоек.
13	<i>M. trautvetteri</i> к-38553	2n	Казахстан, Джезказганская обл.	Образец дикорастущей люцерны гибридного происхождения. Засухоустойчив и зимостоек.
14	<i>M. varia</i> к-25782, сорт Тибетская	4n	Казахстан, Актюбинская обл.	Создан на Аральской опытной станции ВИР на материале генотипа <i>M. sativa</i> из Непала. Выращивается на засоленных территориях.
15	<i>M. varia</i> к-27062 сорт Северная гибридная	4n	Россия, Ленинградская обл.	Создан в НИИ кормов, г. Москва, на материале <i>M. falcata</i> subsp. <i>borealis</i> Grossh. и <i>M. sativa</i> Rambler type. Выращивается под выпас.
16	<i>M. varia</i> к-33299, сорт Rambler	4n	Канада	Создан на материале <i>M. falcata</i> для возделывания на территории засушливых прерий Канады. Зимостоек.
17	<i>M. varia</i> к-38382, сорт Drylander	4n	Канада	Создан на материале разновидности Rambler для возделывания на территории засушливых прерий Канады
18	<i>M. varia</i> к-8469, сорт Vernal	4n	США	Сорт для орошаемых угодий США, выращивается на сено. Высокопродуктивен, зимостоек.

Геномную ДНК выделяли из лиофилизированных растений СТАВ-методом по Saghai-Marooft et al. (1990) с модификациями, использованными нами ранее для выделения ДНК из растений люпина (Егги и др., 2012). Для амплификации последовательностей генов *Srlk* и *Zpt2-1* были использованы геноспецифичные праймеры, разработанные в ходе исследования с использованием программного обеспечения Vector NTI 10.0 (Life Technologies). Секвенирование ампликонов проводили в прямом и обратном направлении (Евроген, Москва; Пекин, Китайская академия с.-х. наук, www.genomics.cn). Выравнивание последовательностей ДНК производили с использованием программы ClustalW. Анализ нуклеотидных последовательностей и выявление SNP осуществляли с помощью пакета Seqman программного обеспечения DNASTAR и BioEdit.

Для проведения экспрессионного анализа, тотальная РНК выделялась с использованием Trizol по протоколу производителя (Invitrogen, USA). Реакция обратной транскрипции проводилась с использованием TaqMan Reverse Transcription Reagents (Life Technologies, www.lifetechnologies.com) по протоколу производителя. Количественная ОТ-ПЦР проводилась с праймерами, специфичными для гена *Srlk*. В качестве гена внутреннего контроля использовали ген 18S рРНК с прямым праймером: 5'-СТСААСАСGGGGAAACTТАС-3' и обратным праймером: 5'-AGАСАААТСГСТССАССААС-3'. Для оценки уровня экспрессии гена *Srlk* был использован метод относительной количественной оценки (ΔC_t). Уровень экспрессии гена интереса определялся как $2^{\Delta C(t)} = 2^{C(t)(\text{ген сравнения}) - C(t)(\text{ген интереса})}$ (Ermilova et al., 2010). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка образцов люцерны на солеустойчивость производилась тремя разными способами: 1) методом проростков; 2) в стерильном эксперименте на агаризованной среде (микровегетационный эксперимент, 1023 растения); 3) при выращивании растений в вегетационных сосудах на субстрате (вегетационный эксперимент, 1299 растений). В каждом эксперименте каждый образец был определен как устойчивый или чувствительный к хлоридному засолению (табл. 4).

На стадии прорастания семян гибель растений достоверно зависела от концентрации соли (Kruskal-Wallis ANOVA, $H_{2,54}=38$, $p<0.001$), в среднем возрастая от 44% в контроле (0% соли) до 100% при максимальной концентрации (2% соли). С увеличением концентрации хлорида натрия, снижение количества проростков наблюдалось у всех образцов, при этом различия между образцами незначимы ($H_{17,90}=15$, $p=0.60$). Диплоидные образцы люцерны оказались более чувствительными к засолению, чем тетраплоидные (табл.4).

В микровегетационном эксперименте в качестве показателей солеустойчивости для опытных и контрольных растений сравнивались три параметра: 1) длина корня, 2) вес лиофилизированной корневой системы растения, 3) вес всего лиофилизированного растения. По результатам

двухфакторного дисперсионного анализа засоление среды значимо влияло на все показатели у всех образцов (табл. 2).

Таблица 2. Влияние засоления и принадлежности к образцу на морфометрические параметры люцерны

Параметры	Факторы		
	Засоление	Образец	Засоление×образец
Ювенильные растения (микровегетационный эксперимент):			
Длина корня	$F_{1,999}=308, p<0.001$	$F_{11,999}=6, p<0.001$	$F_{11,999}=1, p=0.26$
Сухая масса корня	$F_{1,999}=185, p<0.001$	$F_{11,999}=17, p<0.001$	$F_{11,999}=5, p<0.001$
Сухая масса побега	$F_{1,999}=258, p<0.001$	$F_{11,999}=25, p<0.001$	$F_{11,999}=4, p<0.001$
Виргинильные растения (вегетационный эксперимент):			
Длина побега	$F_{1,1265}=1310, p<0.001$	$F_{16,1265}=14, p<0.001$	$F_{16,1265}=12, p<0.001$
Длина корня	$F_{1,1265}=629, p<0.001$	$F_{16,1265}=23, p<0.001$	$F_{16,1265}=7, p<0.001$
Коэффициент угнетения	$F_{1,1082}=1565, p<0.001$	$F_{15,1082}=13, p<0.001$	$F_{15,1082}=21, p<0.001$

В вегетационном эксперименте по результатам дисперсионного анализа длина побега, длина корня и коэффициент угнетения значимо реагировали на повышенное содержание соли в субстрате (табл.2). Парные сравнения всех образцов по тесту Тьюки выявили образцы, с минимальным сокращением длины корня или стебля в ответ на солевой стресс, а также образцы с минимальным коэффициентом угнетения (табл.4).

Содержание Na^+ и K^+ в тканях испытуемых растений значимо зависело от засоления, генотипа образца, и от взаимодействия обоих факторов (табл. 3). При этом концентрация натрия для всех образцов была выше у погибших растений, чему у контрольных, для калия – наблюдалась обратная картина. Двухфакторный дисперсионный анализ не обнаружил значимых различий между образцами по содержанию натрия в условиях стресса (табл.3).

Таблица 3. Влияние засоления и принадлежности к образцу на содержание натрия и калия у люцерны

Параметры	Факторы		
	Засоление*	Образец	Засоление×образец
Образцы 2, 8 и 17 (нет выживших в эксперименте)			
Содержание Na	$F_{1,14}=367, p<0.001$	$F_{2,14}=5, p=0.03$	$F_{2,14}=6, p=0.02$
Содержание K	$F_{1,14}=98, p<0.001$	$F_{2,14}=8, p=0.004$	$F_{2,14}=6, p=0.01$
Отношение Na/K	$F_{1,14}=144, p<0.001$	$F_{2,14}=3, p=0.08$	$F_{2,14}=2, p=0.15$
Образцы 1, 3-5, 7, 9-16 и 18			
Содержание Na	$F_{2,162}=365, p<0.001$	$F_{13,162}=1, p=0.20$	$F_{26,162}=1, p=0.30$
Содержание K	$F_{2,162}=24, p<0.001$	$F_{13,162}=3, p=0.002$	$F_{26,162}=2, p<0.001$
Отношение Na/K	$F_{2,162}=195, p<0.001$	$F_{13,162}=4, p<0.001$	$F_{26,162}=3, p<0.001$

Из 18 тестируемых образцов к-25782 (*M. varia*, сорт Тибетская) оказался самым солеустойчивым. Этот сорт отличался устойчивостью к засолению на стадии прорастания и имел минимальный коэффициент угнетения в вегетационном эксперименте. Интерес для селекции может представлять образец *M.coerulea* из горных районов Дагестана (к-12821). Несмотря на

низкую всхожесть семян в условиях засоления, молодые растения этого образца успешно вегетировали при повышенных концентрациях соли в почве.

Таблица 4. Солеустойчивость образцов люцерны, выявленная на разных стадиях развития растений.

№образца	Вид, плоидность	Стадия проростков	Микровеgetационный эксперимент			Веgetационный эксперимент		
			Длина корня	Масса корня	Масса растения	Длина корня	Длина побега	Коеф. угнетения
1	<i>M. coerulea</i> (2n)		уст.	уст.	уст.		уст.	
2	<i>M. coerulea</i> (2n)			уст.	уст.			
3	<i>M. falcata</i> (2n)			уст.				
4	<i>M. falcata</i> (2n)							
5	<i>M. falcata</i> (2n)							
6	<i>M. falcata</i> (2n)			уст.	уст.			
7	<i>M. sativa</i> (4n)							
8	<i>M. sativa</i> (4n)	уст.						
9	<i>M. sativa</i> Надежда (4n)	уст.				уст.		уст.
10	<i>M. sativa</i> Deseret (4n)							
11	<i>M. sativa</i> (4n)	уст.				уст.		
12	<i>M. trautvetteri</i> (2n)							
13	<i>M. trautvetteri</i> (2n)		уст.	уст.	уст.			
14	<i>M. varia</i> Тибетская (4n)	уст.				уст.		уст.
15	<i>M. varia</i> Сев.гибридная (4n)	уст.						
16	<i>M. varia</i> Rambler (4n)						уст.	
17	<i>M. varia</i> Drylander (4n)							
18	<i>M. varia</i> Vernal (4n)							

уст. - устойчивые образцы, выделены серым цветом.

Выявление в геноме *M.sativa* последовательностей ДНК, ортологичных генам *Srlk* и *Zpt2-1*, клонированных для *M.truncatula*. На основании синтении геномов бобовых растений, в базе данных DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) для многолетних видов *Medicago sp.* были идентифицированы ортологичные последовательности для генов рецепторной киназы *Srlk* и транскрипционного фактора *MtZpt2-1*, опубликованные для *M.truncatula* под индексами TC115753 и TC77176 соответственно (Lorenzo et al., 2009). Процент сходства последовательности CO515446 у *M.sativa* с геном *Srlk* для *M.truncatula* составил 97%, последовательности Y18788 у *M.sativa* с геном *MtZpt2-1* для *M.truncatula* составил 94%. Для амплификации ортологичных последовательностей генов-кандидатов были сконструированы геноспецифичные пары праймеров: *Srlk*-for-GCTTTCTGGGTCACTTTATCTTCATCTCAAG и *Srlk*-rev-GCCGCTCCCAACCCAATCCTAA; *Zpt2-1*-for-CGGCACGAGAAATAACCACTTCTCTC и *Zpt2-1*rev-AGTCCGGAAGCCGGGAGGT. Полученные ампликоны длиной 1184 и 1006 п.н. были секвенированы и выравнены с референсными последовательностями.

Оценка уровня экспрессии гена рецепторной киназы *Srlk* у солечувствительного и солеустойчивого образцов многолетней люцерны в условиях засоления.

Согласно экспериментам Lorenzo et al. (2009), в условиях засоления уровень экспрессии гена *Srlk* в корнях солеустойчивых генотипов *M. truncatula* был всегда выше, чем в условиях контроля и в листьях. У чувствительных к засолению генотипов уровень экспрессии *Srlk* в корнях изменялся незначительно, тогда как в листьях разница в экспрессии была достоверной. Для подтверждения роли гена *Srlk* в индуцировании ответной реакции растений многолетних видов люцерны на солевой стресс, был проведен анализ экспрессии гена *Srlk* с использованием разработанных праймеров: RT-*Srlk*-for-GAGGTTAGGTGGGAGAGAGAG, RT-*Srlk*-rev-CGCAGCCATCAAATCACCAAG. Тотальная РНК была выделена из 12 растений, принадлежащих «солеустойчивому» образцу *M. varia* (к-25782 сорт Тибетская) (6 проб – растения в условиях засоления, 6 – контроль), аналогично для 12 растений «солечувствительного» *M. falcata* (к-44050).

В условиях засоления наблюдалось достоверное увеличение уровня экспрессии гена *Srlk* в корнях солеустойчивого образца сорта Тибетская по сравнению с контролем и уровнем его экспрессии в листьях. Для солечувствительного образца *M. falcata* (к-44050) наблюдалась обратная картина (рис.1).

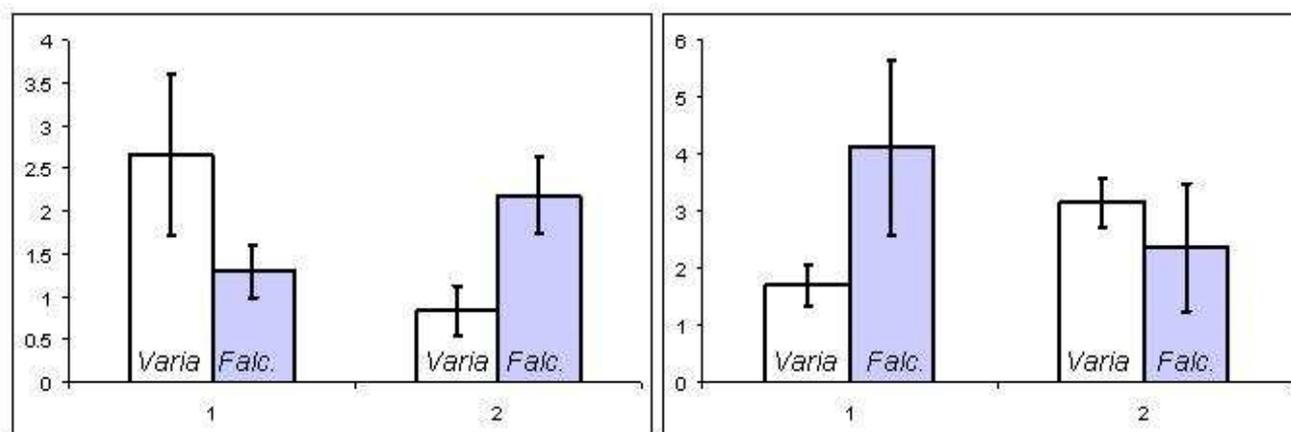


Рисунок 1. Уровень экспрессии гена *Srlk* в корнях (А) и листьях (Б) листьев двух генотипов люцерны: *M. varia* к-25782 с.Тибетская (*Varia*), *M. falcata* к-44050 (*Falc.*). 1 – условия засоления (1% NaCl). 2 – условия контроля (0% NaCl).

Выявление нуклеотидного полиморфизма последовательностей генов *Srlk* и *Zpt2-1*.

Для выявления нуклеотидного полиморфизма последовательности гена *Srlk* в изучаемой выборке первоначально был получен ПЦР-фрагмент ожидаемой длины с праймерами *Srlk*-for и *Srlk*-rev для 215 генотипов, относящихся к 18 образцам люцерны. Продукты ПЦР были подвергнуты рестриktionному анализу с использованием мелкощепящей эндонуклеазы *Tsp509I*, имеющей в исследуемой последовательности 9 сайтов рестрикции. Затем у 215 генотипов была проанализирована картина рестрикции с *Tsp509I*. В результате у 12 генотипов многолетних видов *Medicago*, показавших различающуюся картину рестрикции, фрагмент последовательности *Srlk* был секвенирован в прямом и обратном направлении. При сравнении этих 12

последовательностей *Srlk* с последовательностью TC115753, опубликованной для *M.truncatula*, было выявлено 30 SNP. Число нуклеотидных замен, выявленных при сравнении 12 последовательностей *Srlk* между собой, было значительно ниже (19 SNP, из них 7 несинонимичных).

Таким образом, было установлено, что анализируемый ген в имеющейся выборке образцов является полиморфным, и дальнейшее ре-секвенирование последовательности гена *Srlk* в фенотипированной выборке образцов с целью выявления ассоциации нуклеотидного полиморфизма и реакции растения на солевой стресс имеет очевидный смысл.

Структура аллельного разнообразия генов *Srlk* и *Zpt2-1* в анализируемой выборке растений люцерны и ее ассоциация с выживаемостью в условиях засоления. Ранее, в вегетационном эксперименте было протестировано 1299 растений, для которых были измерены длина корня, длина побегов и коэффициент угнетения в контроле и при засолении. Для 132 растений, выращенных при засолении, были получены данные секвенирования последовательности *Srlk*. Фрагмент последовательности гена *Zpt2-1* был секвенирован для 70 растений. Располагая фенотипической оценкой и данными секвенирования, мы провели статистический анализ с целью выявления ассоциации между отдельными SNP или их комбинациями и 1) выживаемостью в условиях стресса (1 – растение выжило; 0 – растение погибло), 2) длиной корня и длиной побега (Merchan et al., 2007; Lorenzo et al., 2009).

Для гена *Srlk* в анализируемой выборке из 132 растений было выявлено 13 полиморфных сайтов (SNP). Каждый SNP в анализе был представлен двумя (например, AA и CC, или AA и AC) или тремя (AA, AC, CC) выявленными гомо- или гетерозиготными состояниями. Из 13 SNP 11 уже были обнаружены в предыдущем эксперименте с использованием рестрикционного анализа.

Для выявления каких-либо закономерностей в распределении аллелей SNP среди изучаемых растений, был проведен факторный (компонентный) анализ. На первом этапе мы использовали факторный анализ для выявления характера и силы связей между аллелями, без учета параметров выживаемости растений в условиях солевого стресса. Было выявлено четыре фактора (F_1, F_2, F_3, F_4), отражающих структуру и уровень взаимосвязей между аллелями, их факториальная дисперсия равнялась 10%, 9%, 8% и 8%.

Для того, чтобы установить существует ли связь между каким-либо из этих факторов, характеризующих аллельное разнообразие изучаемой выборки генотипов, и степенью выживаемости растений в условиях засоления был проведен однофакторный дисперсионный анализ, где в качестве фактора использовали показатель выживаемости (1/0), а в качестве изменчивого ряда – значения факторных нагрузок, рассчитанные для каждого растения. Из четырех факторов выживаемость растений была достоверно ассоциирована только с F_3 . Достоверность влияния F_3 на выживаемость растений представлена в табл. 5.

Таблица 5. Результаты однофакторного дисперсионного анализа по выявлению ассоциации главных компонент аллельного разнообразия гена *Srlk* и степенью выживаемости растений люцерны в условиях засоления

Виды изменчивости	Df	SS	MS	F	p
Фактор 1					
Жизнеспособность	1	0,60	0,61	0,61	0,44
Остаточная изменчивость	130	130,39	1,00		
Общая изменчивость	131	131,00			
Фактор 2					
Жизнеспособность	1	2,33	2,33	2,36	0,13
Остаточная изменчивость	130	128,66	0,99		
Общая изменчивость	131	131,00			
Фактор 3					
Жизнеспособность	1	14,98	14,98	16,79	0,0001
Остаточная изменчивость	130	116,02	0,89		
Общая изменчивость	131	131,00			
Фактор 4					
Жизнеспособность	1	0,40	0,40	0,40	0,53
Остаточная изменчивость	130	130,60	1,01		
Общая изменчивость	131	131,00			

SS – сумма квадратов, MS – средне-квадратичное отклонение, F – значение критерия Фишера, p – уровень значимости, Фактор 1-4 – факторы, описывающие аллельное разнообразие *Srlk* в изученной выборке растений, df – числа степеней свободы

Выделенный фактор F_3 объясняется, в основном, аллелями четырех SNP, имеющих максимальные нагрузки для F_3 : SNP_480, 544, 726 и 245. Детальный анализ аллелей этих SNP показал, что SNP_245 приводит к замене аминокислоты Ser/Asp и встречается только у одного растения из 132 проанализированных, это растение не выжило в условиях засоления. Несинонимичный SNP_544 (Glu/Gln), был также обнаружен только у 4 растений *M. sativa* к-38539 (Казахстан, Семиреченск), все растения этого образца погибли. Наиболее вероятно, что эти редкие «образец-специфичные» аллели скорее отражают генетическую особенность образцов, чем ассоциированы с солеустойчивостью. Несинонимичный SNP_480 (Thr/Ser) является возможным кандидатом на рассмотрение ассоциации с солеустойчивостью, его альтернативные аллели не являются специфичными для какого-либо образца. SNP_726 является синонимичным.

Аналогичный факторный анализ был выполнен для гена *Zpt2-1*, для которого в анализируемой выборке было выявлено 15 SNP. Было выделено четыре фактора, отражающих структуру и уровень взаимосвязей между аллелями, их факториальная дисперсия равнялась 21%, 14%, 9% и 8%. По результатам однофакторного дисперсионного анализа, из четырех факторов выживаемость растений достоверно ассоциирована только с F_2 (табл. 6).

Таблица 6. Результаты однофакторного дисперсионного анализа по выявлению ассоциации главных компонент аллельного разнообразия гена *Zpt2-1* и степенью выживаемости растений люцерны в условиях засоления

Виды изменчивости	Df	SS	MS	F	p
Фактор 1					
Жизнеспособность	1	0.13	0.13	0.13	0.724
Остаточная дисперсия	68	68.87	1.01		
Общая дисперсия	69	69.00			
Фактор 2					
Жизнеспособность	1	7.74	7.74	8.59	0.005
Остаточная дисперсия	68	61.26	0.90		
Общая дисперсия	69	69.00			
Фактор 3					
Жизнеспособность	1	2.03	2.03	2.06	0.16
Остаточная дисперсия	68	66.97	0.98		
Общая дисперсия	69	69.00			
Фактор 4					
Жизнеспособность	1	0.24	0.24	0.24	0.63
Остаточная дисперсия	68	68.76	1.01		
Общая дисперсия	69	69.00			

SS – сумма квадратов, MS – средне квадратичное отклонение, F – значение критерия Фишера, p – уровень значимости, Фактор 1-4 – факторы, описывающих аллельное разнообразие *Srlk* в изученной выборке растений, df – число степеней свободы.

Максимальная нагрузка по фактору 2 приходится на SNP в позициях: 170 (син), 184 (Ser/Asn), 302 (син), 313(Asp/Gly), 317 (Asn/Lys), 321 (Ser/Thr), 326 (Asp/Glu), 333 (Ala/Arg), 472 (Ile/Thr).

Некоторые из перечисленных несинонимичных SNP заслуживают внимания, как потенциально ассоциированные с солеустойчивостью, встречаясь равномерно в исследуемой выборке в гомо- и гетерозиготном состояниях.

Ассоциация SNP, выявленных в последовательностях генов *Srlk* и *Zpt2-1*, с длиной корня, длиной побега и жизнеспособностью растений в условиях засоления. Способность растения восстанавливать рост корневой системы в условиях засоления – одна из ключевых характеристик адаптационного потенциала генотипов люцерны, наряду со способностью не снижать прирост надземных частей растения (Merchan, 2003, 2007; Lorenzo et al., 2009). Задача заключалась в том, чтобы выявить в структуре изучаемых генов-кандидатов нуклеотидные замены, ассоциированные с данными показателями солеустойчивости. Для выявления такой ассоциации, в первоначальную матрицу данных для факторного анализа были добавлены данные фенотипической оценки солеустойчивости 132 анализируемых растений: успешность выживания (1 – растение выжило при засолении, 0 – погибло), длина корня и длина побега в условиях засоления. Распределение нуклеотидных замен гена *Srlk*, выявленных у 132 растений разных образцов

люцерны, и параметров солеустойчивости растений в двухмерном пространстве факторов 1 и 3 показано на рис.2. На этом рисунке (справа) отмечена обособленность по фактору 1 растений сорта Тибетская (12) и образца люцерны посевной из Казахстана (10), наиболее контрастных по солеустойчивости.

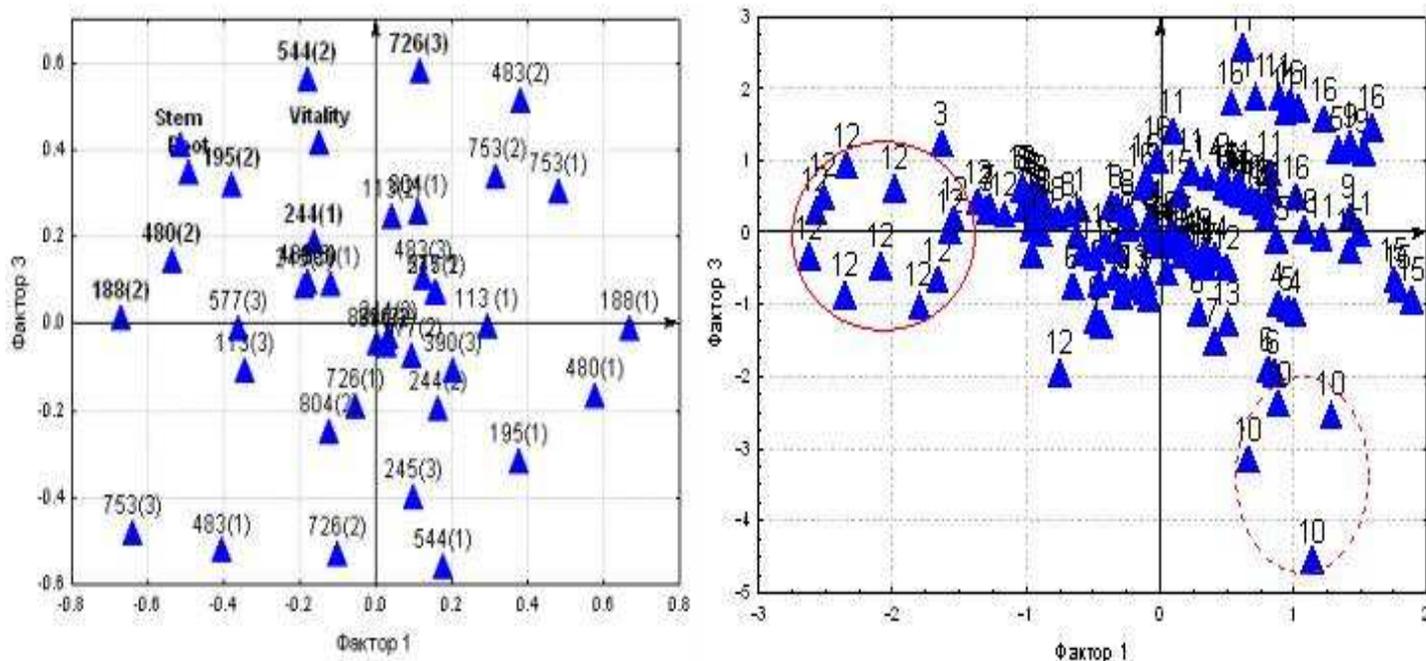


Рисунок 2. Слева: Распределение SNP, выявленных в последовательности гена *Srlk*, в пространстве факторов 1 и 3. Цифрами обозначены SNP. Параметры солеустойчивости: «vitality» - выживаемость, «root» - длина корня, «stem» - длина побега. Справа: Распределение проанализированных генотипов люцерны с учетом их принадлежности к образцу, в пространстве факторов 1 и 3. Выделены два образца: солеустойчивый (12) и солечувствительный (10). Нумерация образцов: 1 - *M. coerulea*, к-12821; 3 - *M. sativa*, к-42760, с. Deseret; 4 - *M. varia*, к-38382, с. Drylander; 5 - *M. falcata subsp. borealis* Grossh., к-1467; 6 - *M. falcata*, к-36748; 7 - *M. sativa*, к-33743; 8 - *M. sativa*, к-40812, с. Надежда; 9 - *M. varia*, к-33299, с. Rambler; 10 - *M. sativa*, к-38539; 11 - *M. varia*, к-27062, с. Северная гибридная; 12 - *M. varia*, к-25782, с. Тибетская; 13 - *M. trautvetteri*, к-38553; 14 - *M. trautvetteri*, к-35023; 15 - *M. falcata*, к-44033; 16 - *M. sativa*, к-8958; 17 - *M. varia*, к-8469, с. Vernal.

Дополнительно к факторному анализу, идентификацию SNP, коррелирующих с солеустойчивостью люцерны проводили по t-критерию Стьюдента, и его непараметрическому аналогу – критерию U Манна-Уитни (табл. 7). Помимо нуклеотидных замен, выявленных в составе «корреляционных плеяд» с использованием факторного анализа, непараметрический критерий U Манна-Уитни позволил идентифицировать для последовательности гена *Srlk* дополнительно три SNP, ассоциированных с показателями солеустойчивости.

Таблица 7. Нуклеотидные замены (SNP), выявленные в генах *Srlk* и *Zpt2-1*, достоверно ассоциированные с показателями солеустойчивости у растений люцерны в условиях засоления по результатам t-критерия Стьюдента и U-критерию Манна-Уитни.

SNP (аллель)	П.с.*	Число растений в группе		Среднее \pm стандартная ошибка в группе		t-критерий Стьюдента		U-критерий Манна-Уитни				
		0	1	0	1	t	p	Сумма рангов		U	Z	p
								0	1			
Нуклеотидные замены в последовательности гена <i>Srlk</i>												
113(3)	Vitality	123	9	0,76 \pm 0,04	0,33 \pm 0,17	2,81	0,01	8414	365	319,5	2,11	0,03
188(2)	Root	115	17	13,3 \pm 0,7	18,9 \pm 1,7	-2,78	0,01	7213	1566	542,5	-2,96	0,00
	Stem	115	17	11,3 \pm 0,5	16,0 \pm 1,4	-3,48	0,00	7192	1587	521,5	-3,10	0,00
195(2)	Stem	13	119	8,0 \pm 1,6	12,3 \pm 0,5	-2,77	0,01	540	8239	448,5	-2,48	0,01
480(2)	Root	106	26	13,2 \pm 0,8	17,2 \pm 1,3	-2,26	0,03	6579	2200	907,5	-2,69	0,01
	Stem	106	26	11,1 \pm 0,5	15,0 \pm 1,1	-3,38	0,00	6514	2264	843,0	-3,06	0,00
544(2)	Vitality	4	128	0,00 \pm 0,00	0,75 \pm 0,04	-3,44	0,00	74	8704	64,0	-2,55	0,01
	Root	4	128	3,5 \pm 0,2	14,3 \pm 0,7	-2,72	0,01	34	8744	24,0	-3,08	0,00
	Stem	4	128	5,4 \pm 0,1	12,1 \pm 0,5	-2,47	0,01	62	8716	52,0	-2,71	0,01
726(3)	Vitality	25	107	0,52 \pm 0,10	0,78 \pm 0,04	-2,63	0,01	1321	7458	995,5	-1,99	0,05
Нуклеотидные замены в последовательности гена <i>Zpt2-1</i>												
321(3)	Root	60	10	16,38 \pm 0,92	11,40 \pm 1,38	2,14	0,04	2259	226	171	2,17	0,03
326(3)	Vitality	65	5	0,82 \pm 0,39	0,40 \pm 0,05	2,23	0,03	0,82	0,40	2	68,00	0,03

*П.с. – показатели солеустойчивости: Vitality – выживаемость; Root – длина корня в условиях засоления; Stem – длина побега в условиях засоления.

SNP_195 (Asn/Tyr) достоверно влиял на длину побега у растений в условиях засоления и встречался у 119 растений из 132. Несинонимичный SNP_188 (Val/Ala), встречался преимущественно (94%) у образца *M.varia* к-25782 (сорт Тибетская) и единично у *M.coerulea* к-12821 и *M.sativa* к-8958. Поскольку, образец сорта Тибетская *M.varia* к-25782 по результатам наших экспериментов оказался наиболее солеустойчивым, то аллель SNP_188 (Ala) представляет интерес для дальнейшего изучения, как, возможно, повышающая адаптацию растений к засолению. SNP_113 является синонимичным.

Для последовательности гена *Zpt2-1* только два SNP из обсуждавшихся ранее результатов факторного анализа, оказались достоверно взаимосвязаны с показателями солеустойчивости растений люцерны (табл. 7).

Разработка аллель-специфичных маркеров для SNP гена *Srlk*, ассоциированных с адаптивностью растений люцерны в условиях засоления. Для двух нуклеотидных замен в последовательности *Srlk* (SNP_188 и SNP_480), показавших достоверную ассоциацию со способностью растений выживать и восстанавливать ростовые процессы в условиях засоления, были разработаны аллель-специфичные молекулярные маркеры.

SNP_188 не образует специфической мишени для известных эндонуклеаз, поэтому для его выявления были разработаны аллель-специфичные праймеры Tib_For1-TGGTTTCATCTGTGATTTTGC и Tib_Rev-TTCCCATCAAAACCATCCTT. При проведении ПЦР аллельные варианты SNP_188 (T/C) различаются за счёт того, что 3' концевой нуклеотид праймера Tib_For1 гибридизируется

непосредственно с позицией SNP, и продукт длиной 438 н.п. амплифицируется только при наличии «С» (рис. 3). Предложенный доминантный маркер не позволяет с уверенностью интерпретировать отсутствие ПЦР-продукта как аллель «Т», однако успешная амплификация с аллель-специфичными праймерами может применяться для диагностики нуклеотида «С» в позиции SNP_188. Это было подтверждено в специальном эксперименте для 16 генотипов люцерны, у которых ген *Srlk* был секвенирован.



Рисунок 3. Выявление несинонимичного SNP_188 (Т/С) в последовательности гена *Srlk* у растений люцерны с помощью аллель-специфичных праймеров.

SNP_480 (С/Г) может быть выявлен с помощью рестриктазы *BseII*, которая расщепляет ПЦР-продукт, полученный с праймерами *Srlk-for* и *Srlk-rev*, на два фрагмента (484+700=1184 н.п.) в случае «С» (рис. 4). CAPS маркер выявляет гомозиготные (С, Г) и гетерозиготные (С/Г) генотипы по этому локусу.

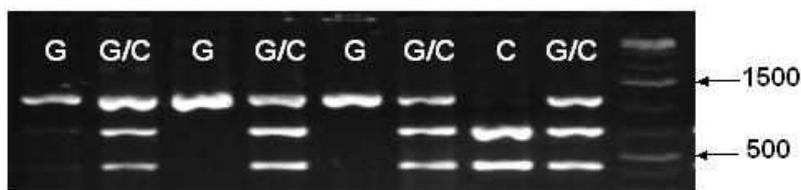


Рисунок 4. CAPS маркер, выявляющий SNP_480 (С/Г) в последовательности гена *Srlk* с помощью рестриктазы *BseII* на примере образца *M.sativa* (к-8958).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выполнении диссертационной работы в вегетационных экспериментах были испытаны на солеустойчивость 2322 растения, относящихся к 18 образцам многолетних диплоидных и тетраплоидных видов люцерны коллекции ВИР из разных эколого-географических регионов. В ходе испытаний оценка включала изучение солеустойчивости на разных стадиях онтогенеза и производилась с использованием разных методов. По результатам комплексной оценки были выявлены солеустойчивые и солечувствительные образцы. Полученная фенотипированная выборка послужила базой для последующих молекулярных исследований.

На основании синтении геномов нами были выявлены ортологичные последовательности для генов *Srlk* и *Zpt2-1*, опубликованных для *M.truncatula* (Merchan et al., 2003, 2007, Lorenzo et al., 2009), в геноме многолетних видов люцерны, представляющих экономический интерес. Было показано, что в условиях засоления в корнях солеустойчивого многолетнего сорта люцерны

экспрессия одного из этих ключевых генов (*Srlk*) достоверно повышается, а в корнях солечувствительного образца подобной реакции не наблюдается. Это свидетельствовало о причастности гена *Srlk* к формированию адаптивной реакции на засоление у испытуемых образцов. Таким образом, изучение естественного аллельного разнообразия генов-кандидатов, представлялось перспективным с точки зрения выявления функциональных нуклеотидных замен.

По результатам секвенирования последовательностей двух генов-кандидатов у 144 и 70 растений был сделан вывод о высоком уровне полиморфизма изучаемых генов. Особый интерес представляли выявленные несинонимичные нуклеотидные замены. Семь из них, по результатам факторного анализа и непараметрического теста, оказались достоверно ассоциированы со способностью растений люцерны восстанавливать ростовые процессы в условиях засоления. Молекулярные маркеры, разработанные для этих SNP могут быть использованы для маркер-вспомогательной селекции солеустойчивых сортов люцерны.

ВЫВОДЫ

1. У изученной выборки образцов люцерны из коллекции ВИР выявлен высокий уровень изменчивости по характеру реакции на засоление, как среди растений одного образца, так и между образцами.
2. По результатам вегетационных экспериментов образцы *M. varia* к-25782 (сорт Тибетская) и *M. coerulea* к-12821 являются наиболее солеустойчивыми и могут рассматриваться как источники ценных аллелей для селекции сортов с повышенным адаптивным потенциалом.
3. В геноме многолетних видов *Medicago* идентифицированы ортологи для генов рецепторной протеинкиназы *Srlk* и активируемого им транскрипционного фактора *Zpt2-1*, формирующих защитную реакцию на засоление у модельного вида *M. truncatula*.
4. Установлено достоверное повышение уровня экспрессии гена *Srlk* в корнях солеустойчивого образца *M. varia* к-25782 (сорт Тибетская) в ответ на солевой стресс, что доказывает роль этого гена в инициации адаптивной реакции на засоление.
5. Последовательность гена *Srlk* секвенирована у 144 генотипов многолетней люцерны, выявлен 21 SNP, из которых 8 являются несинонимичными. Последовательность *Zpt2-1* секвенирована для 70 генотипов, выявлено 15 SNP, из них 9 несинонимичных.
6. В последовательностях генов *Srlk* и *Zpt2-1*, выявлены несинонимичные нуклеотидные замены, ассоциированные со способностью растений восстанавливать рост и развитие корневой системы в условиях солевого стресса.
7. Для двух нуклеотидных замен в последовательности *Srlk* (SNP_188 и SNP_480), показавших достоверную ассоциацию со способностью растений выживать и восстанавливать ростовые процессы в условиях засоления, разработаны аллель-специфичные молекулярные маркеры.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи по теме диссертации в рецензируемых журналах из списка ВАК

1. Вишневская М.С., Павлов А.В., Дзюбенко Е.А., Дзюбенко Н.И., Потоккина Е.К. Нуклеотидный полиморфизм гена *Srlk*, определяющего устойчивость к засолению люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) // Генетика, 2014, том 50, № 4. С. 433–442.

Vishnevskaya M.S., Pavlov A.V., Dzyubenko E.A., Dzyubenko N.I., Potokina E.K. Nucleotide Polymorphism of the *Srlk* Gene That Determines Salt Stress Tolerance in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Russian Journal of Genetics, 2014, Vol. 50, No. 4. P. 378–386.

2. Вишневская М.С., Косарева И.А. Концентрация поглощенных ионов натрия и калия в тканях растений *Medicago* sp., различающихся по солеустойчивости // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета, 2015, № 38. С. 26-29.

3. Егги Э.Э., Вишневская М.С., Агеева П.А., Мехтиев В.С., Гаврилюк И.П., Гапонов Н.В., Красильников В.Н. Использование полиморфизма белков семян для сортовой идентификации люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) // Аграрная Россия, 2012, № 4. С.2-8.

4. Дроздов Е.В., Асямолов П.О, Вишневская М.С., Нам И.Я., Заякин В.В. Влияние условий культивирования на регенерацию и каллусогенез эксплантов из зародышей люпина // Вестник БГУ, 2007, Т.4. С.31-34.

Статьи в сборниках

1. Дзюбенко Н.И., Вишневская М.С., Павлов А.В., Дзюбенко Е.А., Потоккина Е.К. Нуклеотидный полиморфизм гена *Srlk*, контролирующего устойчивость к засолению у люцерны посевной (*Medicago sativa* L.).- В сб. Многофакторное адаптивное кормопроизводство, М., 2011. С.231-241.

Учебные пособия

1. Никитина В.В., Вишневская М.С. Селекция растений. Культивирование изолированных тканей и органов растений в условиях *in vitro* : практикум. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2015. – 32 с. ISBN 978-5-7422-4712-8.

Статьи в сборниках трудов конференций

1. Dzyubenko N.I., Vishnevskaya M.S., Pavlov A.V., Dzyubenko E.A., Potokina E.K. Nucleotide polymorphism of *Srlk* gene revealed for alfalfa genotypes that differ in their salt stress resistance. // Proceedings of the 19th EUCARPIA General Congress 21-24 May 2012, Budapest, Hungary, pp.86-92

2. Вишневская М.С., Потоккина Е.К., Дзюбенко Е.А., Дзюбенко Н.И. Нуклеотидный полиморфизм гена *Srlk*, определяющего реакцию на солевой стресс у видов *Medicago* L. // II Всероссийская молодежная научно-практическая конференция «Перспективы развития и проблемы современной ботаники» ЦСБС СО РАН г. Новосибирск 5-8 октября 2010 г. С. 262-264.

3. Vishnevskaya M.S., Pavlov A.V., Dzyubenko E.A., Dzyubenko N.I., Potokina E.K. Development of molecular markers for genes underlying salt stress resistance in *Medicago* L. species // Материалы международной школы молодых ученых, ИЦиГ СО РАН, 26 – 30 августа 2011, Новосибирск «Bioinformatics methods and next generation sequencing technologies», 2011, P. 20
4. Вишневская М.С., Косарева И.А., Двуреченский В.Н., Дзюбенко Е.А., Дзюбенко Н.И. Определение концентрации ионов натрия в листьях видов *Medicago* sp., выращенных в условиях засоления // Генетические ресурсы растений – основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни / Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 120-летию основания института, 6 – 8 октября 2014 г. – СПб.: ВИР С. 49.
5. Дзюбенко Н.И., Вишневская М.С., Дзюбенко Е.А., Косарева И.А., Потокина Е.К. Аллельное разнообразие генов, определяющих устойчивость люцерны к засолению // Генетические ресурсы растений – основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни / Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 120-летию основания института, 6 – 8 октября 2014 г. – СПб.: ВИР. С. 56.