

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](mailto: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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , 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 19<sup>th</sup> 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-Marooof 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'-AGАСАААТCGСТССАССААС-3'. Для оценки уровня экспрессии гена *Srlk* был использован метод относительной количественной оценки ( $\Delta C_t$ ). 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	Микровегетационный эксперимент			Вегетационный эксперимент		
			Длина корня	Масса корня	Масса растения	Длина корня	Длина побега	Кэф. 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)							

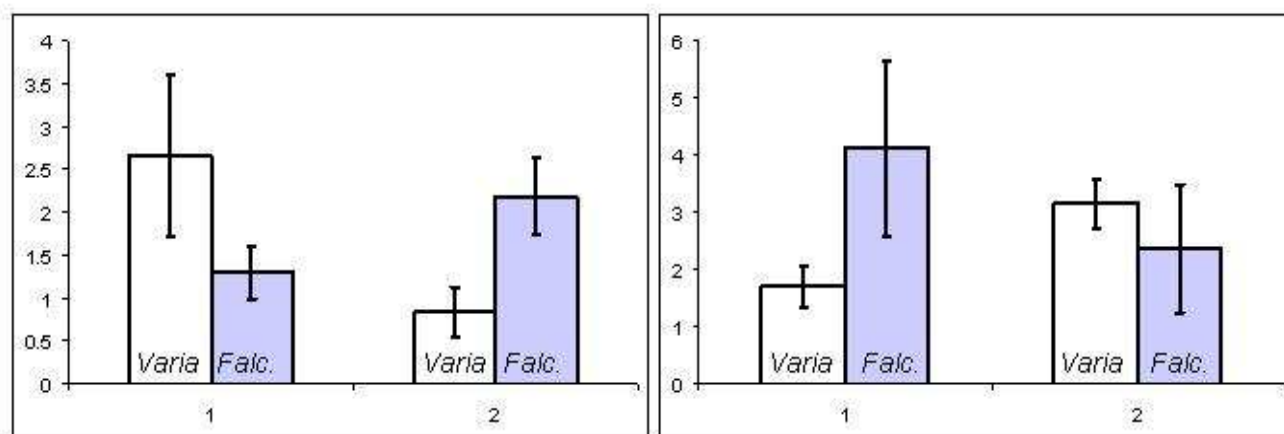
уст. - устойчивые образцы, выделены серым цветом.

**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-GCCGCTCCCAACCCCAATCCTAA; *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					
<b>Жизнеспособность</b>	<b>1</b>	<b>14,98</b>	<b>14,98</b>	<b>16,79</b>	<b>0,0001</b>
<b>Остаточная изменчивость</b>	<b>130</b>	<b>116,02</b>	<b>0,89</b>		
<b>Общая изменчивость</b>	<b>131</b>	<b>131,00</b>			
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/Asn 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					
<b>Жизнеспособность</b>	<b>1</b>	<b>7.74</b>	<b>7.74</b>	<b>8.59</b>	<b>0.005</b>
<b>Остаточная дисперсия</b>	<b>68</b>	<b>61.26</b>	<b>0.90</b>		
<b>Общая дисперсия</b>	<b>69</b>	<b>69.00</b>			
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			

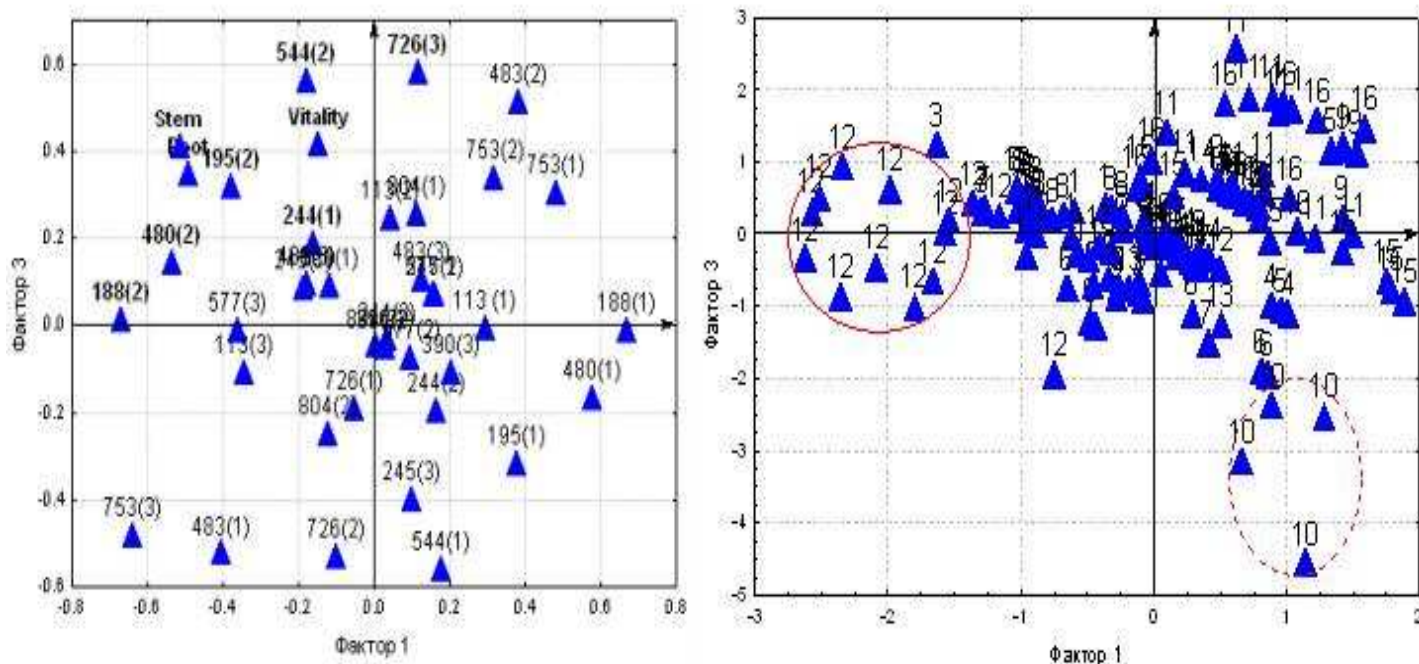
SS – сумма квадратов, MS – средне квадратичное отклонение, F – значение критерия Фишера, p – уровень значимости, Фактор 1-4 – факторы, описывающих аллельное разнообразие *Srlk* в изученной выборке растений, df – число степеней свободы.

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

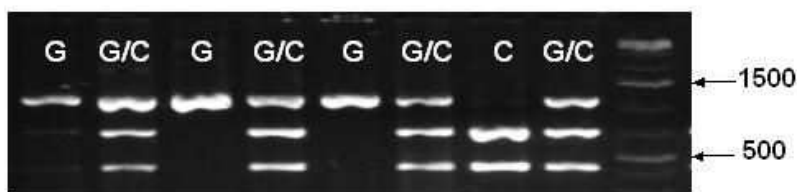


непосредственно с позицией SNP, и продукт длиной 438 н.п. амплифицируется только при наличии «С» (рис. 3). Предложенный доминантный маркер не позволяет с уверенностью интерпретировать отсутствие ПЦР-продукта как аллель «Т», однако успешная амплификация с аллель-специфичными праймерами может применяться для диагностики нуклеотида «С» в позиции SNP<sub>188</sub>. Это было подтверждено в специальном эксперименте для 16 генотипов люцерны, у которых ген *Srlk* был секвенирован.



**Рисунок 3.** Выявление несинонимичного SNP<sub>188</sub> (Т/С) в последовательности гена *Srlk* у растений люцерны с помощью аллель-специфичных праймеров.

SNP<sub>480</sub> (С/С) может быть выявлен с помощью рестриктазы *Bse*II, 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, С) и гетерозиготные (С/С) генотипы по этому локусу.



**Рисунок 4.** CAPS маркер, выявляющий SNP<sub>480</sub> (С/С) в последовательности гена *Srlk* с помощью рестриктазы *Bse*II 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 19<sup>th</sup> 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.