

УДК 631.523:577.21

**СОЗДАНИЕ ГЕНОМНОЙ ВАС-БИБЛИОТЕКИ *ALLIUM FISTULOSUM* L.
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ***

А.В. КИСЕЛЁВА, И.А. ФЕСЕНКО, Л.И. ХРУСТАЛЁВА

(РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева)

Получено 800 ВАС клонов *A. fistulosum* L. сорта Русский зимний. С помощью полимеразной цепной реакции отобраны четыре ВАС клона, несущие субтеломерный повтор. Для скрининга ВАС-библиотеки на наличие клонов с видоспецифичными повторами была проведена перекрестная дот-блот гибридизация с меченными биотином *Cot-1* фракциями геномной ДНК *A. fistulosum* и *A. cepa* L. Был выявлен один ВАС клон с низкой гомологией к высокоповторяющейся фракции геномной ДНК *A. cepa*.

Ключевые слова: *Allium fistulosum*, *A. cepa*, ВАС библиотека, ВАС клоны, дот-блот гибридизация, *Cot-1*, субтеломерный повтор.

Лук репчатый (*Allium cepa* L.) и лук батун (*Allium fistulosum* L.) являются важными сельскохозяйственными культурами. Однако геном луков до сих пор остается слабо изученным из-за целого ряда причин, в числе которых — большой размер генома, высокая частота дупликаций и повышенная гетерозиготность. Так, размер генома составляет у лука репчатого $1C=16\,415$ м.п.н. [6], а у лука батун — $1C=12\,275$ м.п.н. [10]. Геном *A. cepa* в 5 и 13 раз больше генома кукурузы и риса соответственно. На сегодня в мире существует большая проблема обедненного генофонда этого вида, это является результатом более 5000-летнего периода целенаправленного отбора и утери при этом ряда ценных признаков. В современной селекции *A. cepa* близкородственный вид лук батун является уникальным источником многих ценных признаков, которые могли бы быть использованы для создания новых сортов лука репчатого. *A. fistulosum* устойчив к луковой мухе [4] и ко многим фитопатогенам, наносящим значительный экономический ущерб, а именно к таким заболеваниям, как луковая листовая гниль [3], розовая корневая гниль [11], антракноз [8].

Кроме того, лук батун обладает рядом других ценных признаков: высоким содержанием сухого вещества, более острым вкусом и морозостойкостью, более ранним и более коротким цветением, большей привлекательностью соцветий для насекомых-опылителей [16]. Для переноса важных сельскохозяйственных признаков от *A. fistulosum* в геном *A. cepa* и мониторинга их интрогрессии необходимы знания молекулярной структуры генома *A. fistulosum*.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» ГК№ 16.552.11.7032 от 29 апреля 2011 г. на оборудовании ЦКП «ВНИИСБ».

В настоящее время известно всего лишь 721 нуклеотидных последовательностей, принадлежащих *A. fistulosum*, в то же время для лука репчатого это число в десятки раз выше — 32000.

Упорядоченные библиотеки ДНК с большими вставками являются незаменимым инструментом для геномных исследований, особенно при широкомасштабном физическом картировании и секвенировании. В 1992 г. для клонирования крупных фрагментов ДНК были созданы векторы на основе бактериальных искусственных хромосом (bacterial artificial chromosome ВАС), которые сохранялись и реплицировались в бактериальных клетках (*Escherichia coli*). В ВАС векторах можно клонировать и стабильно сохранять фрагменты ДНК свыше 300 т.п.н. в клетках кишечной палочки [15]. Несмотря на то, что размер вставок в таких векторах меньше, чем в дрожжевых искусственных хромосомах (yeast artificial chromosome YAC), они обеспечивают ряд преимуществ, таких как низкий уровень химеризма, более простая методика выделения и очистки ДНК и высокая стабильность бактериальных клеток.

С начала 90-х гг. ВАС технология стала главным инструментом анализа геномов [12], а большой размер вставки позволял уменьшить количество клонов, необходимых для полного покрытия генома. В 2001 г. была создана ВАС-библиотека лука репчатого, включающая 48 000 клонов и покрывающая лишь 30% генома [13]. Для создания ВАС-библиотеки *A. cepa*, составляющей 95% генома, потребуется около 450 тыс. клонов, размером 100 т.п.н. [14].

Геном *A. fistulosum* на 28% меньше генома лука репчатого (1С=12,275 м.п.н. [10].) Кроме того, у *A. fistulosum* существует вероятность получения ВАС клонов с высоким содержанием генов из-за их предполагаемой концентрации в проксимальном регионе хромосом [6].

Целью наших исследований является создание молекулярно-цитогенетических маркеров на основе целенаправленного отбора и секвенирования крупных геномных вставок. В данной работе представлены результаты конструирования неполной ВАС-библиотеки *A. fistulosum* и скрининга полученных клонов с помощью ДНК-зондов на субтеломерную последовательность и видоспецифичную фракцию высокоповторяющейся ДНК. Нами было отобрано из 800 ВАС клонов четыре клон, несущие субтеломерный повтор и один клон, несущий видоспецифичный повтор. Отобранные ВАС клоны будут в дальнейшем анализированы с помощью ВАС-FISH, субклонированы и секвенированы.

Материалы и методы исследования

Растительный материал

Работа проведена на *A. fistulosum* сорта Русский зимний, предоставленный ВНИИССОК. Семена были выращены в теплице в течение 21 сут. при 22 °С в почвенной смеси при 16-часовом световом дне и 8-часовой ночи.

Выделение высокомолекулярной ДНК

Для выделения высокомолекулярной ДНК использовали листья растений. Их замораживали в жидком азоте и сохраняли при -80 °С в морозильнике или использовали свежими, предварительно выдержанными на льду. Выделение интактных ядер проводили по ранее описанной методике [5, 17].

Запаивание ядер в агарозных слайсах

Ядра, смешанные с 1% (w/v) легкоплавкой агарозой, охлаждали до 37 °С и заливали в форму для слайсов, после чего оставляли на 20 мин на льду. Затем слайсы переносили в 5-10 объемов буфера для лизиса (0,5 М этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), pH 9,0-9,3 ; 1% (w/v) лаурил саркозин натрия, 0,1—0,5 мг/мл протеиназы К). Инкубировали агарозные слайсы в буфере для лизиса в течение 24-48 ч при 50 °С с мягким покачиванием.

Очистка высокомолекулярной ДНК в агарозных шариках

Перед дальнейшими манипуляциями ДНК очищали, а также удаляли из агарозных слайсов остатки протеиназы К, добавленной в буфер для лизиса. Для этого слайсы промывали три раза в течение одного часа на льду в 10—20 объемах холодного ТЕ (10 тМ Трис-НСь, pH 8,0; 1 шМ EDTA, pH 8,0) с добавлением 0,1 шМ фенилметилсульфонил флуорида (PMSF), а затем три раза по часу в 10—20 объемах холодного ТЕ без PMSF.

Рестрикция

Инкубировали агарозные слайсы в буфере в течение 20 мин на льду (1:1 (v/v) высокомолекулярная ДНК — 10 х буфер для рестрикции, 40 тМ спермидин). Добавляли 3 единицы рестриктазы *VamHI* (Fermentas) и выдержали 20 мин на льду и 5 мин при 37 °С. Останавливали реакцию добавлением 1/10 объема 0,5 М EDTA, pH 8,0 на льду.

Пульс-электрофорез

Анализировали результаты частичной рестрикции с помощью пульс-электрофореза при следующих условиях: 1% (w/v) легкоплавкая агароза (BIO-RAD) в 0,5 х TBE, 14 °С, 120° угол, 6 В/см, начальный импульс 90 с, финальный импульс 90 с. продолжительность 18—22 ч. В качестве маркера размеров использовали DNA Size Markers—Yeast Chromosomal (BIO-RAD). Он представляет собой 16 хромосом дрожжей *S. cerevisiae* с размерами от 225 до 2200 т.п.н.

Отбор рестрицированных фрагментов для дальнейшего клонирования

Гель разделяли на 2 части. Половину геля с маркером окрашивали с помощью бромистого этидия и документировали с помощью трансиллюминатора BIO-RAD Universal Hood II. Из неокрашенной половины геля вырезали зону, соответствующую окрашенной от 100 до 400 т.п.н.

Лигирование отобранной ДНК с вектором ВАС

Вырезанные фрагменты геля обрабатывали с помощью 1 единицы фермента агаразы (Fermentas). Затем смесь для лигирования смешивали в соотношении вектор: ДНК = 1:4 (v/v). Полученные фрагменты геномной ДНК были клонированы в векторе pCC1BAC (Epicentre), размером 8128 п.н., с сайтом рестрикции для *VamHI*. Инкубировали лигазную смесь с T4 DNA Ligase (Fermentas) в течение 8—12 ч при 16 °С.

Трансформация лигированной ДНК в клетки E. coli DH10B методом электропорации

Трансформировали лигированную ДНК в электрокомпетентные клетки *E. coli*, используя электропоратор BIO-RAD MicroPulser (1,8 kV).

Затем клетки из кюветы электропоратора перенесли в 1 мл среды SOC (2% (w/v) бактотриптон, 0,5% (w/v) дрожжевой экстракт, 10 мМ хлорид натрия, 2,5 мМ хлорид калия, 20 мМ сульфат магния, 20 мМ глюкоза) и инкубировали при 37 °С в течение часа. После чего клетки наносили на чашки Петри с твердой средой LB (1% (w/v) триптон, 0,5% (w/v) дрожжевой экстракт, 0,5% (w/v) хлорид натрия, 1,5% (w/v) агароза), содержащей хлорамфеникол (12,5 мкг/мл), и инкубировали при 37 °С в течение 24-36 ч. Отбирали индивидуальные клоны и пересаживали в 96-луночные планшеты. Инкубировали клоны в течение ночи при 37 °С в жидкой среде LB (1% (w/v) триптон, 0,5% (w/v) дрожжевой экстракт, 0,5% (w/v) NaCl) с 15% (w/v) глицерином и сохраняли на -70 °С.

Приготовление ДНК-зондов

В качестве ДНК-зондов использовались Cot-1 фракции ДНК *A. fistulosum* и *A. serpa*, выделенные по стандартной методике [18]. Фракцию Cot-1 метили с помощью Biotin-Nick translation mix (Roche) согласно рекомендациям производителя.

Скрининг ВАС-библиотеки с помощью дот-блот гибридизации

Дот-блот гибридизацию проводили с использованием Cot-1 фракции согласно ранее описанной методике [9]. Биотин детектировали с помощью Alkaline Phosphatase Streptavidin Conjugated (R&D Systems).

Скрининг с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Кроме того, полученные ВАС клоны отбирали на наличие в них субтеломерной последовательности. В 25 мкл смеси для ПЦР содержалось: 0,2 мМ каждого нуклеотида, 1 х буфер для ПЦР, 100 нг ДНК-матрицы, 20 нг каждого праймера, 2,5 U ДНК-полимеразы. На основании данных о нуклеотидной последовательности сателлитного повтора лука батуна [10] были сконструированы праймеры, фланкирующие отрезок длиной 378 п.н. [1]:

34902 5'-ATCGATTCTTCGGACGGCCT-3

34903 5'-ATCCGCAGGGTGCAACATCTGCGG-3'

Аmplификацию проводили на амплификаторе "Tetrad" (BIORAD) при следующих параметрах: 94 °С — 5 мин; 30 циклов: 94 °С — 1 мин, 55 °С — 40 с, 72 °С — 2 мин 30 с.

Продукты ПЦР разделяли в 1,5%-м агарозном геле с буфером TBE (45 мМ трис-борат, 1 мМ EDTA pH 8) при напряженности поля 6 В/см. В качестве маркера размеров использовали "100 bp leader" (Fermentas).

Результаты и обсуждение

Выделение высокомолекулярной геномной ДНК

Для выделения высокомолекулярной ДНК из растительных тканей мы использовали методику, основанную на предварительной изоляции ядер [17]. В результате из молодых листьев лука-батуна было выделено достаточное количество неповрежденных ядер в высокой концентрации (рис.1).

Клонирование крупных фрагментов геномной ДНК в pCC1BAC векторе

Для создания ВАС-библиотеки был выбран вектор pCC1BAC с сайтом рестрикции для *BamHI* в связи с тем, что сайт рестрикции данного фермента не встречается в субтело мерном повторе *A. fistulosum*, который является одним из объектов наших исследований.

Анализ полученных ВАС клонов с помощью электрофореза

В ходе проделанной работы нами было получено 800 ВАС клонов. Размер вставок геномной ДНК в векторе определяли с помощью маркера размеров из *Saccharomyces cerevisiae* DNA Size Markers — Yeast Chromosomal (BIO-RAD) на пульс-электрофорезе, который позволяет разделить фрагменты ДНК крупных размеров в сотни тысяч и миллионы пар нуклеотидов, что невозможно достичь с использованием обычного электрофореза.

Электрофореграмма (рис. 2а) демонстрирует, что размер ВАС клонов меньше 225 т.п.н. Для того чтобы выяснить нижнюю границу размеров этих клонов, был проведен обычный электрофорез с маркером Lambda DNA (Sib-Enzyme), размер которого составляет 50 т.п.н. На рисунке 2б видно, что полученные ВАС клоны больше 50 т.п.н., т.е.

мы можем утверждать, что размер полученных вставок колеблется от 50 до 225 т.п.н. Это указывает на наличие вставки геномной ДНК в клонирующем векторе, так как размер вектора рСС1ВАС составляет 8,128 т.п.н.

Создание ДНК зондов

Для выявления клонов, несущих вставку геномной ДНК *A. fistulosum*, локализованной на дистальном (теломерном) окончании хромосом, была проведена ПЦР

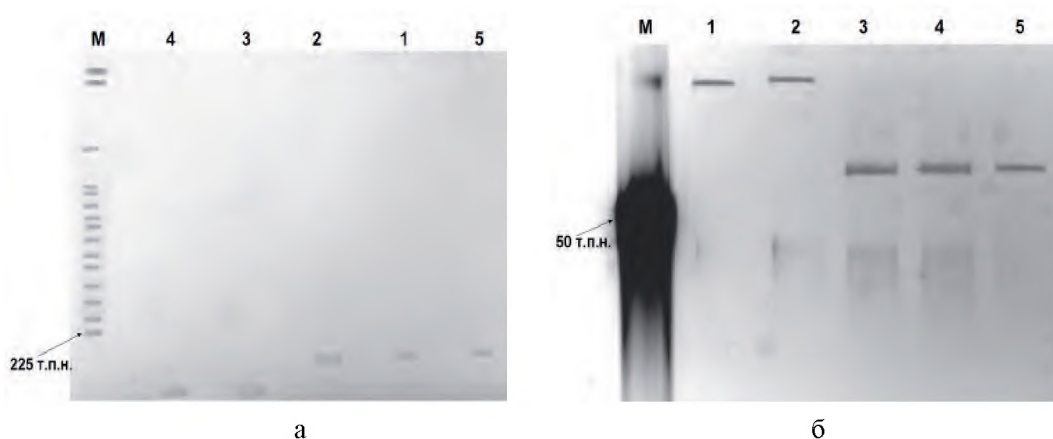


Рис. 2. Электрофореграмма ВАС клонов: а — пульс-электрофорез, М — маркер размеров DNA Size Markers — Yeast Chromosomal, 1-4 — ВАС клоны 1.1, 1.2, 2.1, 2.2.; б — обычный электрофорез в постоянном электрическом поле, М — маркер Lambda DNA (50 т.п.н.), 1-4 — ВАС клоны 1.1, 1.2, 2.1, 2.2

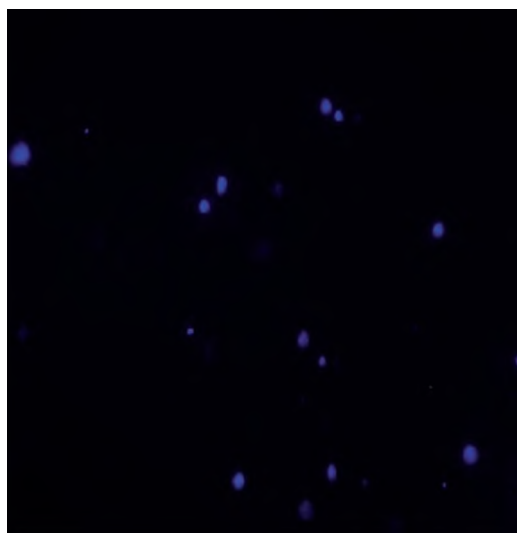


Рис. 1. DAPI-окрашенные ядра, выделенные из молодых листьев *A. fistulosum*. Увеличение 10 x 10, флуоресцентный микроскоп Carl Zeisse Axiolmager

с праймерами (34902 и 34903) на субтеломерный повтор. Нуклеотидная последовательность этого субтеломерного повтора была опубликована в 1995 г. группой японских ученых, которые с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации показали его локализацию на тело мерных окончаний хромосом [7]. И. А. Фесенко с соавт. [1] подобрали праймеры (34902 и 34903) на этот повтор с целью изучения его геномной организации и возможной функции в качестве теломеры. С помощью ПЦР с данными праймерами и в комбинации с праймерами на микросателлиты и на консервативную последовательность обратной транскриптазы *Tu 1-cornu* ретротранспозона авторами было показано, что субтеломерный повтор организован тандемно и содержит участки микросателлитой ДНК и ретротранспозоны. Однако результаты ПЦР-анализа не дают полной картины организации протяженных участков ДНК в геноме, и только клонирование больших геномных вставок в ВАС векторе позволит установить число копий повтора, его структуру и окружение, а значит, возможно, удастся установить, является ли этот повтор субтеломерным или теломерным. В наших исследованиях мы использовали 34902 и 34903 праймеры на субтеломерный повтор [1] для отбора ВАС клонов, несущих этот повтор.

В качестве ДНК-зонда для отбора ВАС клонов, несущих видоспецифичный повтор лука батун, была использована *Cot-1* фракция геномной ДНК, которая содержит высокоповторяющиеся последовательности, такие как микросателлиты и минисателлиты (теломерный и центромерный повтор, рДНК). Они представлены сотнями тысяч и миллионами копий, следующих друг за другом тандемно.

В результате цитогенетических исследований гибридов двух близкородственных видов *A. cepa* и *A. fistulosum* было высказано предположение о наличии у лука батун в субтеломерном регионе крупного блока высокоповторяющейся видоспецифичной последовательности ДНК [2]. А так как к *Cot-1* фракции относятся высокоповторяющиеся последовательности, мы предположили, что с помощью перекрестного отбора *Cot-1* фракций геномов этих двух видов можно будет выявить клоны с видоспецифичными нуклеотидными последовательностями. С этой целью были использованы *Cot-1* фракции геномов *A. cepa* и *A. fistulosum* в качестве ДНК-зондов для скрининга ВАС клонов.

Скрининг ВАС клонов

Все полученные ВАС клоны были проанализированы с помощью ПЦР на наличие в них субтеломерного повтора, длиной 378 п.н. В ходе нашей работы было обнаружено 4 ВАС клон (5.3.1, 5.3.6, 5.8.7, 7.11.7), несущих данную последовательность (рис. 3). В дальнейшем эти клоны будут субклонированы и секвенированы.

Результаты перекрестной дот-блот гибридизации с *Cot-1* фракциями геномов двух близкородственных видов представлены на рисунке 4 а, б. Скрининг с помощью дот-блот анализа с меченой биотином *Cot-1* фракцией геномов двух видов лука выявил четкую гибридизацию пробы на всех анализируемых клон. Это свидетельствует о том, что ВАС клоны несут вставки геномной ДНК *A. fistulosum*, которые содержат высокоповторяющиеся последовательности. Скрининг тех же самых клонов с помощью *Cot-1* фракции *A. cepa* выявил наличие клон ЗЕ со слабым гибридизационным сигналом, что может указывать на присутствие в этом клон вставки ДНК с низкой гомологией к фракции высокоповторяющейся ДНК лука репчатого. На остальных клон был получен сильный сигнал, что и следовало ожидать в связи с известной высокой степенью гомологии геномов у этих двух близкородственных видов [7].

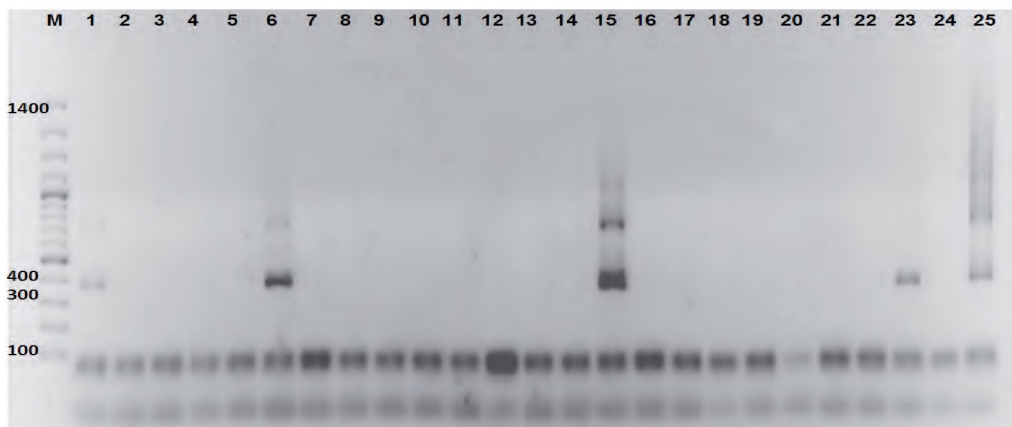


Рис. 3. ПЦР ВАС клонов с праймерами на субтеломерный повтор: М — маркер размеров 100 бр, 1-24 — ВАС клоны 5.3.1-5.3.8, 5.8.1-5.8.8, 7.11.1-7.11.8, 25 — *A. fistulosum*

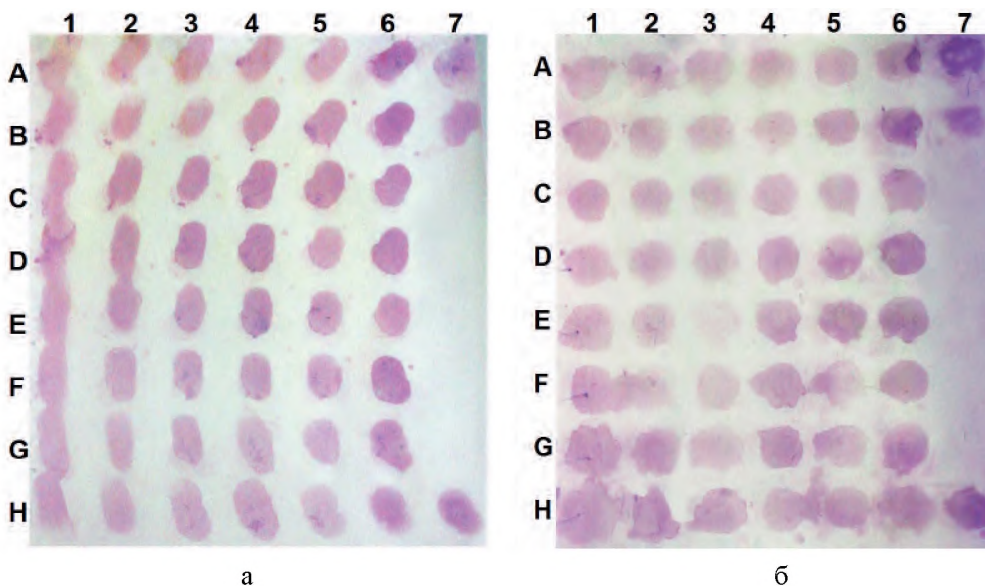


Рис. 4. Результаты дот-блот гибридизации 49 ВАС клонов: а — с меткой Cot-1 фракцией *A. fistulosum*, меченной биотином (1А-7В — номера клонов), контроль — геномная ДНК *A. fistulosum* (7Н); б — с меткой Cot-1 фракцией *A. cepa*, меченной биотином (1А-7В — номера клонов), контроль — геномная ДНК *A. cepa* (7Н)

Выводы

В ходе работы было получено 800 ВАС клонов *A. fistulosum*. С помощью ПЦР отобрано 4 клонa, несущих субтеломерный повтор. Перекрестная дот-блот гибридизация ВАС клонов с Cot-1 фракцией *A. cepa* выявила один клон, несущий вставку геномной ДНК *A. fistulosum* со слабой гомологией к Cot-1 фракции генома лука репчатого. Все отобранные клоны будут в дальнейшем анализированы с помощью ВАС-FISH, субклонированы и секвенированы.

Библиографический список

1. Фесенко И.А., Хрусталева Л.И., Карлов Г.И. Изучение организации сателлитного повтора 378 п.н. в терминальном гетерохроматине *Allium fistulosum* // Генетика. 2001. Т. 38. № 7. С. 894-903.
2. Хрусталева Л.И., КанЛ.Ю., Киров И.В., Сальник АА. Молекулярно-цитогенетический анализ естественных и синтетических гибридов *Allium fistulosum A. cepa* // Известия ТСХА. 2010. Вып. 4. С. 12-21.
3. Currah E, Maude R.B. Laboratory tests for leaf resistance to *Botrytis squamosa* in onions // Ann Appl Biol. 1984. № 105. P. 277-283.
4. De Ponti O.M.B., Inggamer H. Resistance to the onion fly in *Allium cepa* and *Allium fistulosum* / ed. Q.P. van der Meer // Proc 3rd Eucarpia Allium Symp. PUDOC Wageningen, The Netherlands, 1984. P. 21-23.
5. Hatano S., Yamaguchi J., Hirai A. The preparation of high-molecular-weight DNA from rice and its analysis by pulsed-field gel electrophoresis // Plant Science. 1992. № 83. Iss. 1. P. 55-64.
6. Havey M.J., McCallum J., Town C.D., Jakse J., Shigyo M. The Potential Impact of Genomes for Allium Crop Improvement IISHS Acta Horticulturae 770: XXVII International Horticultural Congress — IHC 2008: International Symposium on Cultivation and Utilization of Asian, Sub-tropical, and Underutilized Horticultural Crops, 2008. — URL: <http://naldc.nal.usda.gov/download/46390/PDF>.
7. Irifune K., Hirai K., Zheng J., Tanaka R., Morikawa H. Nucleotide sequence of highly repeated DNA sequence and its chromosomal location in *Allium fistulosum* // Theor. Appl. Genet. 1995. №90. P. 312-316.
8. Galvan G.A., Wietsma W.A., Putrasemedja S., Permadi A.H., Kik C. Screening for resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) in *Allium cepa* and its wild relatives // Euphytica. 1997. № 95. P. 173-178.
9. Khrustaleva L. GISH to mitotic chromosomes of *Allium* // Plant Research International B.V. 2002. 5 p.
10. Narayan R. K. J. Constraints upon the organization and evolution of chromosome in *Allium* // Theor. Appl. Genet. 1988. № 75. P. 319-329.
11. Netzer J., Rabinowitch H.D., Weintal Ch. Greenhouse technique to evaluate pink root disease caused by *Pyrenochaeta terrestris* // Euphytica. 1985. № 34. P. 385-391.
12. Shizuya H, Birren B., Kim U.-J. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F- factor-based vector // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. № 89. P. 8794-8797.
13. Suzuki G., Ur a A., Saito N. BAC FISH analysis in *Allium cepa* // Genes Genet. Syst. 2001. №76. P. 251-255.
14. Suzuki G, Yasuhiko M. Efficient Storage and Screening System for Onion BAC Clones // Breeding Science. 2002. Vol. 52. № 2. P. 157-159.
15. Tao Q., Zhang H.B. Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors // Nucleic Acids Res. 1998. № 26. P. 4901-4909.
16. Van der Meer Q.P., Bennekom van J.L. Improving the onion crop (*Allium cepa* L.) by transfer of characters from *Allium fistulosum* L. // Biul. Warzywnicy. 1978. № 22. P. 87-91.
17. Zhang H.-B., Zhao X., Ding X., Paterson A. H., Wing Rod A. Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei // The Plant Journal. 1995. № 7. Iss. 1. P. 175-184.
18. Zwick M.S., Hanson R.E., Islam-Faridi M.N., Stelly D.M., Wing R.A., Price H.J., McKnight T.D. A rapid procedure for the isolation of Cot-1 DNA from plants // Genome. 1997. №40(1). P. 138-142.

Рецензент — к.б.н. М.Г. Дивашук

**CONSTRUCTION OF A GENOMIC BAC LIBRARY FOR DEVELOPMENT
OF CYTOGENETIC MARKERS *III ALLIUM FISTULOSUM I.***

A. V. KISELYOVA, L.A. FESENKO, L.I. KHRUSTALYOVA

(RTSAU named in honour of K. A. Timiryazev)

We have created more than 800 BAC clones for a variety of A. fistulosum «Russkiy zimniy». Selection of BAC clones carrying the sub-telomeric repeat was made by polymerase chain reaction with primers for this sequence. Screening of the BAC library for the presence of species-specific repeat was carried out using cross-dot-blot hybridization with biotin-labeled Cot — I fraction of the A. fistulosum and A. cepa genomes. Four BAC clones with the sub-telomeric repeat were revealed and one with a species-specific sequence.

Key words: Allium fistulosum, A. cepa, BAC library, BAC clones, dot-blot, Cot-I, sub-telomeric repeat.

Киселёва Анна Витальевна — аспирант кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева; тел.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: sanyutabe@mail.ru.

Фесенко Игорь Александрович — к.б.н., кафедра генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева; тел.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: fesigor@gmail.com.

Хрусталёва Людмила Ивановна — д.б.н., проф. кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 5а; тел.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: khrustaleva@timacad.ru).