

Библиографический список

1. Лыжин, А. С. Создание генетических паспортов подвойных форм яблони на основе анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей ДНК / А. С. Лыжин // Достижения науки и техники АПК. – 2019. – Т. 33. – № 2. – С. 11-13. – DOI 10.24411/0235-2451-2019-10203.
2. Тужилова-Орданская, Е. М. Проблемы гражданско-правового регулирования в сфере защиты прав гражданина в Российской Федерации при использовании генетической информации / Е. М. Тужилова-Орданская, Е. В. Ахтямова // Вестник Пермского университета. Юридические науки. – 2021. – № 52. – С. 263-284. – DOI 10.17072/1995-4190-2021-52-263-284.
3. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов яблони селекции Крымской опытно-селекционной станции ВИР / Л. В. Багмет, И. С. Чепинога, А. А. Трифонова [и др.] // Садоводство и виноградарство. – 2021. – № 6. – С. 5-16. – DOI 10.31676/0235-2591-2021-6-5-16.
4. Хлесткина, Е. К. Генетические ресурсы России: от коллекций к биоресурсным центрам / Е. К. Хлесткина // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2022. – Т. 183. – № 1. – С. 9-30. – DOI 10.30901/2227-8834-2022-1-9-30.
5. Рамазанова С.А. Идентификация сортов сои (*Glycine max* L.) с использованием микросателлитных локусов ДНК // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2016. – Вып. 2 (166). – С. 63–67.
6. Рамазанова С.А., Коломыцева А.С. Оптимизация технологии генотипирования сои на основе анализа полиморфизма SSR-локусов ДНК // Масличные культуры. – 2020. – №1 (181). – С. 42–48.
7. О семеноводстве: Федеральный закон от 30.12.2021 № 454-ФЗ: [принят Государственной думой 22 декабря 2021 года: одобрен Советом Федерации 24 декабря 2021 года]. Москва; 2021). URL:<http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202112300119> [дата обращения: 24.05.2022].

УДК 577.29

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ, ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЭКСПРЕССИЯ ИНДУЦИРУЕМОГО ЗАСУХОЙ ГЕНА ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАК-ЛИАЗЫ ИЗ *OSIMUM BASILICUM* L. (ОбPAL)

Бедарев Владислав Алексеевич, аспирант кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, vladislav290@yandex.ru

Поливанова Оксана Борисовна, доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, polivanova@rgau-msha.ru

Аннотация: Фенилаланин-аммиак-лиаза (*Phenylalanine ammonia-lyase* (PAL)) – точка отсчета для фенилпропаноидных и терпеноидных метаболических путей. Для лучшего понимания их биосинтеза проведено

описание и клонирование κДНК PAL *Ocimum basilicum* (ObPAL), оценена гетерологичная экспрессия и ферментативная активность. Филогенетический анализ выявил значительную эволюционную связь ObPAL с PAL, описанной у разных видов *Lamiaceae*. Результаты показали, что экспрессия гена ObPAL, возможно, зависит от сорта и стресса, индуцированного засухой.

Ключевые слова: *Ocimum basilicum* L, экспрессия, стресс, индуцированный засухой, PAL.

Базилик (*Ocimum basilicum* L., семейство *Lamiaceae*) – хорошо известное травянистое, ароматическое и лекарственное растение. Согласно фармакологическому исследованию, широкий спектр основных биоактивных летучих соединений в эфирном масле базилика делится на две основные группы: терпеноиды и фенилпропаноиды, которые синтезируются и хранятся в специализированных железках (железистые трихомы на поверхности листьев) и критически влияют на особые свойства многих специй и трав. Метилэвгенол и метилхавикол, родственные фенилпропену, являются наиболее важными ароматическими соединениями в некоторых разновидностях *O. basilicum*, которые играют центральную роль в их фармакологических, структурных свойствах и защитных функциях [1].

Для подробной характеристики механизмов регуляции биосинтеза ценных метаболитов важно идентифицировать, охарактеризовать и клонировать основные гены, способствующие производству, модификации и регуляции экспрессии метаболитов фенилпропаноидного пути на молекулярном уровне, также необходимо установить контролирующую роль многих ферментов в биосинтезе метилэвгенола и метилхавикола. В растениях путь биосинтеза летучих фенилпропенов, т.е. метилэвгенола и метилхавикола, все еще неясен. Он связан с образованием монолигнолов, необходимых для биосинтеза лигнина/лигнана на предварительных стадиях, где PAL является первой точкой разветвления и важным регуляторным ферментом фенилпропаноидного пути. Он вовлечен в регулирование потока углерода, в последующие пути биосинтеза различных летучих соединений фенилпропана путем деаминации, добавления гидроксильных и метоксильных функциональных групп, стадий метилирования и декарбоксилирования. В качестве точки входа PAL катализирует дезаминирование L-фенилаланина с образованием аммиака и транс-коричной кислоты – субстрата, общего для биосинтеза различных классов фенилпропаноидных продуктов, например, метилэвгенола и метилхавикола. Изучение литературы показывает, что активность PAL строго контролируется на уровне транскрипции и сильно варьируется в зависимости от стадии развития, дифференцировки клеток и тканей, связанной со специфичным синтезом фенилпропаноидных соединений. Активность PAL в биосинтезе различных вторичных метаболитов также связана с развитием растений, защитными реакциями и устойчивостью против абиотических стрессов [2-4]. Гены PAL кодируются небольшим полигенным

семейством с 2-4 копиями в гаплоидном геноме. Исключением являются томат (*Solanum lycopersicum*) с более чем 26 копиями и картофель (*Solanum tuberosum*) с примерно 40-50 копиями [5, 6].

Хотя подробная информация о функциональной и регуляторной роли PAL не была описана у базилика, PAL в качестве общего фермента может оказывать каскадное влияние на восходящую регуляцию нижестоящих генов в повышении уровней метилэуगेнола и метилхавикола.

Проведено исследование характера экспрессии PAL и коэффициента накопления метилэуगेнола и метилхавикола в трех иранских сортах базилика в ответ на три уровня стресса, индуцированного засухой (легкий, умеренный и сильный) на стадии цветения.

Семена *O. basilicum* из двух регионов Ирана (г. Амол (сорт 2 и 3) и г. Джахром (сорт 1)) были посеяны в отдельные горшки, заполненные супесчаной почвой. Двухнедельные саженцы использовались для извлечения РНК и экспериментов с засухой. Был исследован контроль и три варианта с разным уровнем влажности почвы (FC), описанные как: С: 100 % FC, W1: 75 % FC, W2: 50 % FC и W3: 25 % FC. После проведения 29-дневного эксперимента с засухой были отобраны образцы трех сортов в фазе полного цветения. Образцы побегов после каждой обработки собирали и немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °C до проведения дальнейших анализов [7].

Было проведено выделение ДНК, синтез РНК и кДНК с помощью рViozol (Sigma) [7].

Клонирование кДНК PAL. Пара вырожденных олигонуклеотидных праймеров (ObPALf, ObPALr; табл. 1), находящихся на консервативной последовательности гена у нескольких растений, использовалась для амплификации фрагмента кДНК ObPAL. Ампликоны 574 п.н. извлекали из агарозного геля, лигировали в вектор для ПЦР-клонирования рTG19-Т, трансформировали в клетках DH5a и выделенную плазмиду использовали для определения последовательности. Был сконструирован ПЦР-продукт для фрагмента ObPAL с ген-специфическими праймерами [прямые (Ob-PAL1, Ob-PAL2) и обратные (R1) праймеры] для клонирования 3'-конца ObPAL с помощью 3'-RACE-ПЦР [7]. Таким образом, для полноразмерной последовательности праймеры ObPAL-P1 и ObPAL P2 (в качестве начального праймера амплификации и вложенного праймера соответственно; табл. 1) в качестве прямых праймеров были непосредственно синтезированы из последовательности PAL *Perilla frutescens*. Амплифицированный фрагмент элюировали из геля, клонировали в вектор ПЦР-клонирования рTG19-Т и подвергали секвенированию. Полученная нуклеотидная последовательность для фрагмента ObPAL показала, что она имеет максимальную идентичность (> 80 %) с последовательностью PAL *Perilla frutescens*. Для полноразмерной последовательности праймеры ObPAL-P1 и ObPAL-P2 (табл. 1) в качестве прямых праймеров были непосредственно синтезированы из последовательности PAL *Perilla frutescens*. Обратный праймер был синтезирован в соответствии с данными из ранее клонированных фрагментов

(табл. 1). Амплифицированные фрагменты были очищены, лигированы, клонированы и секвенированы [7].

Таблица 1 - Последовательности праймеров, использованных в исследовании

Название праймеров	Последовательность праймеров
ObPALf	5'-AAG CCG GTG GTG AAG CTC GG-3'
ObPALr	5'-TGA CGC CGG CRA GCT TGA AGG-3'
Ob-PAL1	5'-AAC ATC ACT CCA TGC CTG C-3'
Ob-PAL2	5'-GGG AAG CCS GAG TTC AC-3'
R1	5'-ACGCTACGTAAGGCATGACA-3'
ObPAL-P1	5'-AAG CCG GTG GTG AAG CTC-3'
ObPAL-P2	5'-GTC AAA TAC GCA ATT CAC TAG CC-3'
ObPAL-SalI-F	5'-ATA GTC GAC ATG GAT CCC TTG AAC TGG GTA ATG-3'
ObPAL-NotI-R	5'-AA G CGG CCG CTT AGC AAA TAG GAA GAG GTG C-3'
Ob-P-Pal-F	5'-CGC CCT TGT CAA CGG AAC TG- 3'
Ob-P-Pal-R	5'-AAG TTG CCA CCG TGC AGA GCC-3'
Ob-PAL-E1	5'-GGC ACA TCC ATC TTC CAC AG-3'
Ob-PAL-E2	5'-CTG GTT CCG AGC TCC TCT-3'
Actin-f	5'-TCTATAACGAGCTTCGTGTTG-3'
Actin-r	3'-GAGGTGCTTCAGTTAGGAGGAC-3'

После анализа последовательностей, филогенетического анализа (рис.1), прогнозирования трехмерной структуры ObPAL, проведения гетерологичной экспрессии ObPAL в *Escherichia coli* BL21 (DE3) и анализа активности ферментов, был проведен анализ экспрессии с использованием qRT-ПЦР [7].

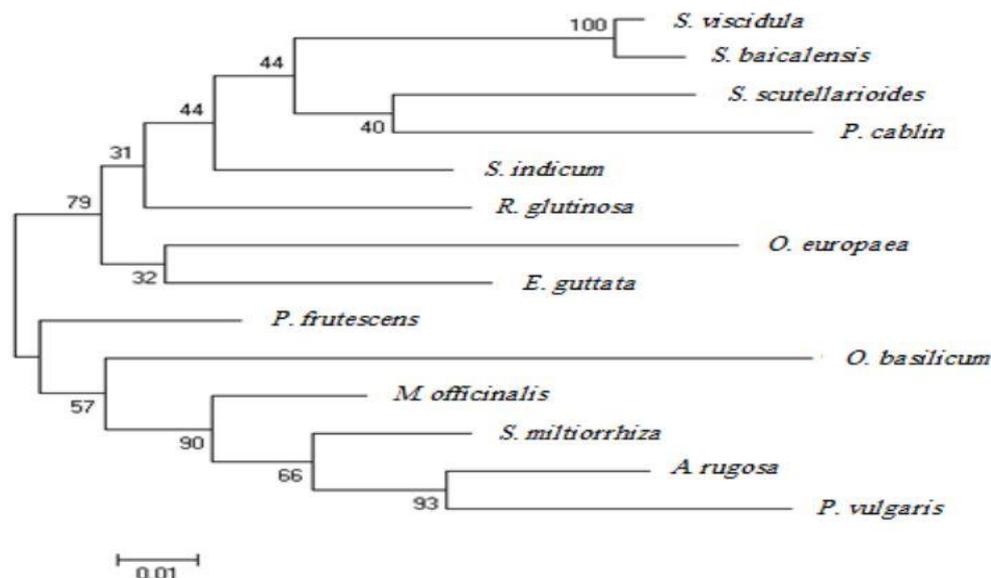


Рисунок 1. Филогенетическое дерево последовательностей белков PAL различных растений

A. rugosa (GenBank Acc. № AF326116_1), *P. vulgaris* (GenBank Acc. № ANY94892.1), *S. miltiorrhiza* (GenBank Acc. № ABD73282.1), *M. officinalis* (GenBank Acc. № CBJ23826.1), *O. basilicum* (Регистрационный номер Генбанка KU375119), *P. frutescens* (регистрационный номер Генбанка AEZ67457.1), *R. glutinosa* (регистрационный номер Генбанка AF401636_1), *O. europaea* (Регистрационный номер Генбанка ANZ31605.1), *E. guttata* (регистрационный номер Генбанка XP_012836017), *S. viscidula* (регистрационный номер GenBank ACR56688.1), *S. baicalensis* (регистрационный номер GenBank ADN32767.1), *P. cablin* (регистрационный номер GenBank AJO53273.1), *S. scutellarioides* (регистрационный номер GenBank AFZ94859.1), *S. indicum* (регистрационный номер GenBank XP_011077338.1). Построение филогенетического дерева было выполнено с помощью mega 6. 0. Цифры над ветвями указывают значения начальной загрузки

Тотальную РНК получали из молодых листьев сортов базилика при трех уровнях стресса, индуцированного засухой, для изучения экспрессии ObPAL, и 1,0 мкг этой РНК транскрибировали в кДНК. Каждая последовательность праймеров была разработана на основе соответствующего гена с использованием программного обеспечения Primer3 (табл. 1). Сначала была проведена обычная ПЦР с использованием термоциклера Bio-Rad. Ампликоны подвергали электрофорезу в 2 %-ном агарозном геле. Затем был проведен анализ амплификации qRT-ПЦР с помощью системы ПЦР в реальном времени QIAGEN (Rotor-Gene Q). ПЦР проведена с помощью qRT-ПЦР-машины QIAGEN. Эксперименты повторяли по меньшей мере трижды, и статистический анализ экспрессии генов проводили с помощью программного обеспечения REST.

Статистический анализ результатов эксперимента был усреднен по трем повторностям. Данные были подвергнуты анализу с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) для оценки существенных различий между методами обработки с использованием множественного теста Дункана ($p \leq 0,05$). Кроме того, значения выражали в виде среднего \pm стандартное отклонение (SD) (Рис. 2) [7].

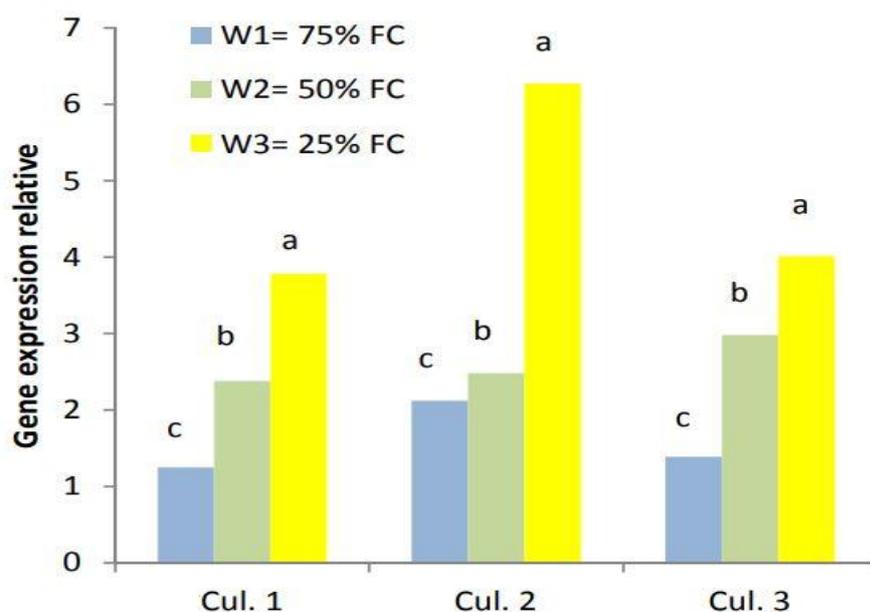


Рисунок 2. Дифференциальные уровни экспрессии гена ObPAL в трех сортах базилика при различных уровнях стресса от засухи (W1, W2, W3 составляют 75%, 50% и 25 % FC соответственно). Различные буквы (a, b, c), указанные над столбцом, представляют статистически значимую разницу при $p \leq 0,05$ (множественный тест Дункана)

Результаты исследования: аминокислотная последовательность ObPAL показала высокую идентичность с PAL растений из базы данных GeneBank [7]. Было подтверждено, что экспрессия генов, участвующих в биосинтезе летучих соединений повышается при стрессе, индуцированного засухой. Как показано на рисунке 2, как для Cul. 1, так и для Cul. 3, относительный коэффициент экспрессии PAL повышался (W1; в 1,25 и 1,39 раза соответственно) и

постепенно увеличивался для W2 (в 2,38 и 2,98 раза соответственно) и продолжал возрастать до наступления сильного стресса (W3; 3,78 и 4,012 раза соответственно), в то время как для второго сорта, Cul. 2, коэффициент экспрессии PAL постепенно регулировался во время первого (W1; изменение в 2,12 раза) и второго (W2; изменение в 2,48 раза) варианта и резко увеличился на третьем варианте с значительным изменением в ~6,27 раз. Высокая концентрация ObPAL на конечном уровне стресса, индуцированного засухой (W3, рис. 1), может способствовать увеличению потребностей в биосинтезе метилэугенола, который рассматривается как механизм защиты растений, а экспрессия гена PAL может быть вызвана различными факторами окружающей среды, такими как свет, инфекция, низкая температура и стресс от засухи. Последовательность PAL у *Ocimum basilicum* выявила значительное эволюционное сходство (около 80%) с последовательностью нескольких таксонов семейства *Lamiaceae*. Рекомбинантный белок, полученный в результате клонирования PAL в вектор pET28a (+), проявлял высокую активность PAL и катализировал превращение L-Phe в t-коричную кислоту. Исследования PAL *O. basilicum* могут послужить отправной точкой для совершенствования фармацевтического и биотехнологического применения этого ценного лекарственного растения в будущем, а также обозначить функциональную и регуляторную функции PAL в фенилпропаноидном метаболическом пути лекарственных растений [7].

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-748 от 13 мая 2022 года (внутренний номер МК-3084.2022.1.4) о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации в рамках гранты Президента Российской Федерации на государственную поддержку молодых российских ученых - кандидатов наук, докторов наук и ведущих научных школ Российской Федерации при, а также при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2020-905 от 16 ноября 2020 года о предоставлении гранта в виде субсидии из федерального бюджета Российской Федерации. Грант был предоставлен для государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Библиографический список

1. M. Šimović, F. Delaš, V. Gradvol, D. Kocevski, H. Pavlović, Antifungal effect of eugenol and carvacrol against foodborne pathogens *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium roqueforti* in improving safety of fresh-cut watermelon/ Šimović M., Delaš F., Gradvol V., Kocevski D., Pavlović H. // J. Intercult. Ethnopharmacol. – 2014. 3, 91.
2. J. Song, Zh. Wang, Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza*/ Song J., Wang Zh. // Mol. Biol. Rep. – 2009. 36, 939–952.

3. Q. Jin, Y. Yao, Y. Cai, Y. Lin, Molecular Cloning and Sequence Analysis of a Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene from *Dendrobium*/ Jin Q., Yao Y., Cai Y., Lin Y. // PLoS ONE. 8, e62352. – 2013.

4. W. Zhang, J.B. Li, F. Xu, Y. Tang, S.Y. Cheng, F.L. Cao, Isolation and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL) promoter from *Ginkgo biloba* and its regulation of gene expression in transgenic tobacco plants/ Zhang, W., Li, J.B., Xu, F., Tang, Y., Cheng, S.Y., Cao, F.L. // POJ. – 2014. 7, 353-360.

5. Joos, H.J., Hahlbrock, K., Phenylalanine ammonia-lyase in potato L/ Joos H.J., Hahlbrock K. //Eur. J. Biochem. – 1992. 204, 621–629.

6. S.W. Lee, J. Robb, R.N. Nazar, Truncated phenylalanine ammonia-lyase expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*)/ Lee S.W., Robb J., Nazar R.N. // J. Biol. Chem. – 1992. 267, 11824–11830.

7. F. Khakdan, H. Alizadeh, M. Ranjbar, Molecular cloning, functional characterization and expression of a drought inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (ObPAL) from *Ocimum basilicum* L./ Khakdan F., Alizadeh H., Ranjbar M. // Plant Physiology and Biochemistry (2018), doi: 10.1016/j.plaphy.2018.07.026.

УДК 636.082.12

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА КАЛЬПАИНА И ЕГО СВЯЗЬ СО СКОРОСТЬЮ РОСТА ТЕЛОЧЕК АБЕРДИН АНГУССКОЙ ПОРОДЫ

Евстафьева Лилия Валерьевна, аспирант кафедры разведения, генетики и биотехнологии животных ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, *lilmo@inbox.ru*

Евстафьев Дмитрий Михайлович к.б.н., доцент кафедры ветеринарии и физиологии животных КФ ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, *evstafevdm@gmail.com*

Научный руководитель: *Селионова Марина Ивановна* д.б.н., профессор заведующий кафедрой разведения, генетики и биотехнологии животных ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, *m_selin@mail.ru*

Аннотация: Селекционный отбор и совершенствование мясного скота с помощью ДНК-маркеров, ассоциированных с количественными и качественными показателями мясной продуктивности. В статье приводятся результаты полиморфизма гена кальпаина и его связь со скоростью роста телочек абердин ангусской породы. Установлено, что полиморфизм гена кальпаина *CAPN1_316* и *CAPN1_530* представлен тремя генотипами *CC*, *CG*, *GG* и *AA*, *AG*, *GG*. Наибольший процент животных с желательным гомозиготным генотипом *AA* в локусе *CAPN1_530* составил 71,3 %. Установлено достоверное превосходство по живой массе телочек в 8,12 и 15 месячном возрасте гомозиготных носителей желательной аллели над гетерозиготными на 15,34 ($P < 0,05$).