

Движение к культуре изолированных микроспор свеклы столовой

Towards isolated microspores culture of red beet

Григолова Т.Р., Вишнякова А.В., Монахос С.Г.

Grigolava T.R., Vishnyakova A.V., Monakhos S.G.

Аннотация

Abstract

Производство удвоенных гаплоидов (УГ) *in vitro* – ускоренный способ создания чистых линий для селекции коммерческих F_1 гибридов. Наиболее распространенный метод производства удвоенных гаплоидов у растений рода *Beta*, главным образом свеклы сахарной, – культура изолированных семязачатков (гиногенез). Недостатки гиногенеза: способ производства УГ: высокая трудоемкость вследствие ручной изоляции и инокуляции семязачатков на питательную среду и высокая вероятность развития соматических клонов из тканей, окружающих зародышевый мешок семязачатка. Значимая альтернатива для исключения описанных недостатков – культура изолированных микроспор (КИМ). Однако на настоящий момент протоколов рутинного производства УГ свеклы столовой в культуре изолированных микроспор не разработано. Цель исследования: изучение факторов, влияющих на каллусогенез в культуре изолированных микроспор свеклы столовой, и выявление оптимальных условий культивирования микроспор *in vitro*. В работе нами изучена связь размера бутона, стадии развития микроспор с частотой каллусогенеза методом микроскопирования и культивирования в питательной среде микроспор, выделенных из бутонов различной длины в пределах 1,2–2,7 мм с шагом в 0,3 мм. Культивированием микроспор на питательной среде NLN с добавлением 2,4-D 0,1 мг/л, НУК 0,1 мг/л, 130 г/л сахарозы и на среде NLN без добавления регуляторов роста, содержащей 130 г/л сахарозы, исследовали влияние питательной среды, температуры культивирования и экспозиции температурной обработки на частоту каллусогенеза изолированных микроспор свеклы столовой. В результате исследования установлены размеры цветковых бутонов 1,2–1,5 мм, содержащие наиболее отзывчивые микроспоры одноядерной стадии развития, и питательная среда NLN с добавлением 130 г/л сахарозы, 0,1 мг/л 2,4-D и 0,1 мг/л НУК, обеспечивающая наибольший выход каллуса в культуре изолированных микроспор свеклы столовой. Показано, что при примененных условиях температурная обработка изолированных микроспор при разной экспозиции при 32,5 °C не индуцирует эмбриогенез микроспор.

Doubled haploids (DH) production *in vitro* is an accelerated way to create pure lines for breeding commercial F_1 hybrids. The most common method for the production of doubled haploids in plants of the genus *Beta*, mainly sugar beet, is the culture of isolated ovules (gynogenesis). The disadvantages of the gynogenic method for the DH production are high labor intensity due to manual isolation and inoculation of ovules on a nutrient medium and a high probability of development of somatic clones from the tissues surrounding the embryo sac. To eliminate the described disadvantages, the culture of isolated microspores is a significant alternative. However, protocols for the routine DH production of red beet in culture of isolated microspores have not yet been developed. The aim of this study was to study the factors affecting callusogenesis in the culture of isolated red beet microspores and to identify the optimal conditions for their cultivation *in vitro*. Microspores were isolated from buds 1,2–2,7 mm with a step of 0,3 mm to study the relationship between the bud size and the stage of microspores development with the frequency of callusogenesis and 1,2–1,5 mm to study of the nutrient medium effect, cultivation temperature and the effect of exposure to heat treatment at 32,5 °C on callusogenesis of isolated red beet microspores. Microspores were cultivated on NLN nutrient medium supplemented with 2,4-D 0,1 mg/l, NAA 0,1 mg/l, 130 g/l sucrose and on NLN medium without the growth regulators addition containing 130 g/l sucrose. As a result of the study, the sizes of flower buds were found to be 1,2–1,5 mm, containing the most responsive microspores of the mononuclear stage of development to IMT, and the nutrient medium NLN with the addition of 130 g/l of sucrose, 0,1 mg/l of 2,4-D and 0,1 mg/l NAA, providing the highest yield of microsporogenic callus. It has been shown that under the applied conditions, thermal treatment of isolated microspores at different exposures at 32,5 °C does not induce microspore embryogenesis.

Key words: *Beta vulgaris*, DH-technologies, androgenesis, isolated microspore, callusogenesis, callus, doubled haploids, red beet.

For citing: Grigolava T.R., Vishnyakova A.V., Monakhos S.G. Towards isolated microspores culture of red beet. Potato and vegetables. 2022. No5. Pp. 37-40. <https://doi.org/10.25630/PAV.2022.18.81.007> (In Russ.).

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, гаплоидные технологии, андрогенез, культура микроспор, каллусогенез, каллус, удвоенные гаплоиды, свекла столовая.

Для цитирования: Григолова Т.Р., Вишнякова А.В., Монахос С.Г. Движение к культуре изолированных микроспор свеклы столовой // Картофель и овощи. 2022. №5. С. 37-40. <https://doi.org/10.25630/PAV.2022.18.81.007>

Производство удвоенных гаплоидов *in vitro* – ускоренный способ создания инбредных линий, необходимых для селекции F_1 гибридов. В отличие от классического инбридинга и отбора, время создания гомозиготных линий свеклы (*Beta vulgaris*) с помощью гаплоидных технологий сокращается с 5–6 до 2 поколений. Наиболее распространенный путь развития, используемый при производстве удвоенных гаплоидов

у представителей рода *Beta*, это гиногенез. Гиногенез – трудозатратный метод создания удвоенных гаплоидов, требующий кропотливой ручной изоляции семязачатков. Еще один недостаток гиногенеза – вероятность развития соматических клонов из тканей, окружающих зародышевый мешок, что требует разработки эффективных молекулярно-генетических методов дифференциации удвоенных гаплоидов от клонов материнского растения.

Устранить описанные выше недостатки потенциально может позволить технология производства удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор. Однако протоколов для рутинного производства удвоенных гаплоидов свеклы столовой для генетических исследований и селекции коммерческих гибридов пока не представлено. В связи с этим разработка эффективной УГ-технологии растений рода *Beta* – актуальная задача, и перспек-

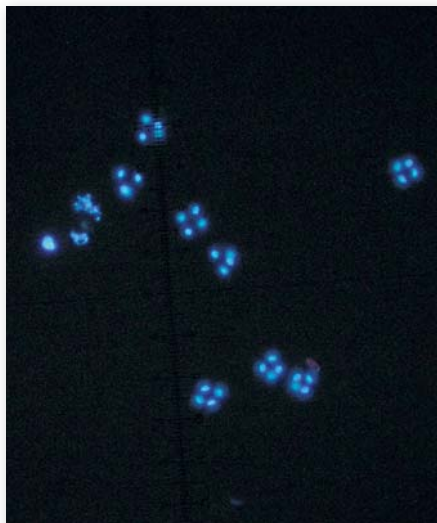


Рис. 1. Тетрады микроспор свеклы столовой

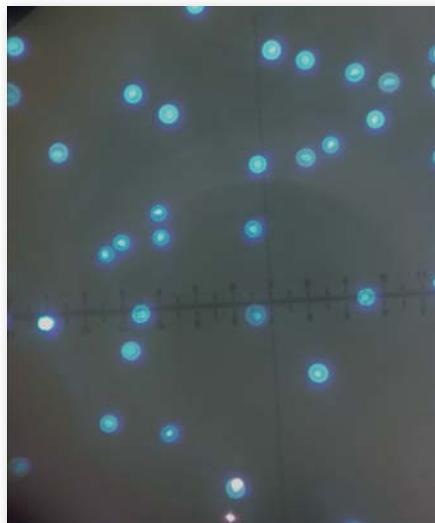


Рис. 2. Одноядерная стадия развития микроспор свеклы столовой

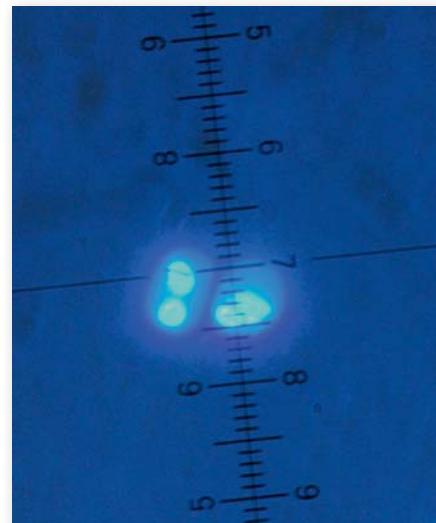


Рис. 3. Двухядерная стадия развития пыльцы свеклы столовой

тивные исследования особенностей андрогенеза в культуре изолированных микроспор должны решить ее.

Производство гаплоидов путем андрогенеза успешно применяют у многих видов растений, однако исследования по индукции гаплоидии в культуре изолированных пыльников или микроспор у свеклы сахарной и свеклы столовой, приводили только к формированию проэмбрионидных структур, которые иногда формировали каллус и/или корни [1, 2, 3, 4] либо неукорененные розетки листьев [5].

В связи с этим целью данного исследования было изучение влияния различных факторов на отзывчивость образцов свеклы столовой в культуре изолированных микроспор и подбор оптимальных условий культивирования. В задачи исследования входило изучение связи размера бутона и стадии развития микроспор, питательной среды, температурной обработки при 32,5 °С на каллусогенез изолированных микроспор свеклы столовой.

Условия, материалы и методы исследований

Исследования проводили в 2018, 2019, 2021 годах. В качестве рас-

тительного материала использовали 6 образцов свеклы столовой, предоставленных ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева»: гибрид RC × Д2, селекционный образец Б1, семьи – П2, ДТ 2, 6/1, ДТ 23/1. Растения генотипов Б1, П2, ДТ 2, 6/1, ДТ 23/1 были выращены и подготовлены в условиях открытого грунта, RC × Д2 – в условиях защищенного грунта.

Стадию развития микроспор определяли микроскопированием клеток пыльников, выделенных из бутонов размером 1,2–2,7 мм с шагом в 0,3 мм. Для определения стадии развития микроспор использовали флуоресцентную микроскопию, препараты микроспор окрашивали красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид) [6, 7].

Стерилизацию бутонов проводили в течение 30 секунд 70%-ным спиртом, далее в течение 10 мин. 3%-ным раствором NaOCl с добавлением нескольких капель tween-20. Дальнейшие манипуляции проводили в условиях ламинар-бокса.

Микроспоры выделяли по методике Байдиной и Монахоса [8] и Монахоса и Чистовой с модификациями [9], культивировали их на пи-

тательной среде NLN-13 без добавления регуляторов роста и с добавлением 2,4-Д 0,1 мг/л, НУК 0,1 мг/л.

Результаты исследований

При цитологических исследованиях микроспор были выделены следующие стадии их развития в зависимости от размера бутонов:

- 1, 2–1,5 мм – тетрады и одноядерные микроспоры (рис. 1);
- 1,8–2,1 мм – одноядерная и двухядерная пыльца с примесью единичных трехядерных пыльцевых зерен (рис. 2);
- 2,3–2,7 мм – двухядерная, трехядерная пыльца (рис. 3).

Изучение влияния размера бутона и стадии развития микроспор на частоту каллусогенеза проведено с использованием образцов RC × Д2, Б1, П2. Опыт заложен в пяти-восьмикратной повторности в чашках Петри диаметром 90 мм, по 10 мл суспензии в каждой чашке. Микроспоры культивировали на питательной среде NLN-13 без добавления регуляторов роста и с добавлением 2,4-Д 0,1 мг/л, НУК 0,1 мг/л (табл. 1).

На питательной среде NLN-13 с добавлением 2,4-Д 0,1 мг/л, НУК 0,1 мг/л образцы RC × Д2 и Б1 формировали каллус только из микроспор, выделенных из бутонов размером 1,2–1,5 мм (рис. 4), образец П2 формировал каллус из микроспор, выделенных из бутонов размером 2,3–2,7 мм и из бутонов размером 1,8–2,1 мм. На среде NLN-13 без добавления регуляторов роста образец RC × Д2 формировал каллус только из микроспор, выделенных из бутонов размером 1,2–1,5 мм, образец Б1 не формировал каллус ни в одном из вариантов опыта, образец П2

Таблица 1. Связь размера бутона и каллусогенеза в культуре изолированных микроспор на среде NLN-13 без добавления регуляторов роста (б.д.) и с добавлением 2,4-Д 0,1 мг/л, НУК 0,1 мг/л (с.д.)

Образец	Число чашек Петри с формирующимся каллусом, шт.					
	1,2-1,5 мм		1,8-2,1 мм		2,3-2,7 мм	
	б.д.	с.д.	б.д.	с.д.	б.д.	с.д.
RC × Д2	1	7	0	0	0	0
Б1	0	2	0	0	0	0
П2	0	0	0	4	1	4



Рис. 4. Каллус, полученный в культуре изолированных микроспор свеклы столовой

формировал каллус из микроспор, выделенных из бутонов размером 2,3–2,7 мм.

Прослеживается общая тенденция в отзывчивости микроспор на введение в культуру *in vitro* – наиболее отзывчивы на культивирование микроспоры стадии тетрад и одноядерной, выделенные из бутонов размером 1,2–1,5 мм. По данным Gorecka et al., для культуры изолированных микроспор и пыльников свеклы столовой оптимален размер бутонов 1,3–1,5 мм, которые содержат около 80% микроспор одноядерной стадии развития и около 15% двуядерной стадии, что является наиболее оптимальным для культуры изолированных микроспор и пыльников у большинства культур [10]. Гонтаренко и Герасименко при изучении культуры изолированных пыльников у сахарной свеклы определили, что оптимальной стадией развития микроспор для культуры пыльников также является одноядерная стадия [11]. В нашем исследовании наблюдается схожая тенденция, микроспоры одноядерной стадии, выделенные из бутонов размером 1,2–1,5, обладали наибольшей склонностью к каллусогенезу, причем на среде с добавлением NLN-13 2,4-Д 0,1 мг/л, НУК 0,1 мг/л отзывчивость микроспор была выше, отчего можно сделать вывод о необходимости добавления регуляторов роста в питательные среды для культивирования изолированных микроспор свеклы столовой.

Исследование по влиянию температуры культивирования на каллусогенез изолированных микроспор проведено с использованием четы-

Таблица 2. Влияние температуры культивирования микроспор в течение двух суток на частоту каллусогенеза

Образец	Число чашек Петри с формирующимся каллусом, шт.			
	+1±0,1 °С	+24±0,1 °С	+32,5±0,1 °С	+40±0,1 °С
Б1	1	0	1	0
ДТ 2	0	0	0	0
6/1	0	0	0	0
ДТ 23/1	0	0	1	0

рех генотипов свеклы столовой: Б1, ДТ 2, 6/1, ДТ 23/1. Для исследования отбирали бутоны размером 1,2–1,5 мм. Изолированные микроспоры культивировали на питательной среде NLN-13 с добавлением 2,4-Д 0,1 мг/л, НУК 0,1 мг/л, 130 г/л сахарозы и рН 5,8. Опыт был заложен в восьми-двадцатикратной повторности в чашках Петри диаметром 90 мм по 10 мл суспензии в каждой чашке.

При температуре культивирования в течение первых двух сут. 32,5±0,1 °С каллус формировали два образца из 4 изученных – Б1 и ДТ 23/1, а при температуре 1±0,1 °С один образец – Б1. При температуре 24±0,1 °С и 40±0,1 °С каллус не формировал ни один из образцов.

Гонтаренко и Герасименко [11] показали, что предобработка эксплантов с использованием низкотемпературного стресса (4–8 °С) в течение 3–15 суток является фактором, инициирующим переход микроспор свеклы сахарной с гаметофитного на спорофитный путь развития, тогда как предобработка высокими температурами (30–32 °С) не дает положительных результатов. В нашем исследовании каллус формировался при температуре 1±0,1 °С и 32,5±0,1 °С (табл. 2), однако полученных данных недостаточно для установления оптимальной температуры теплового шока для культуры изолированных микроспор свеклы столовой, необходимы дальнейшие исследования.

Исследование влияния экспозиции температурной обработки при 32,5 °С на каллусогенез изолированных микроспор проведено с использованием 3-х генотипов свеклы столовой: РС × Д2, Б1, П2 (табл. 3).

Отбирали бутоны длиной 1,2–1,5 мм. Микроспоры культивировали на питательной среде NLN-13 с добавлением 2,4-Д 0,1 мг/л, НУК 0,1 мг/л, 130 г/л сахарозы и рН 5,8. Опыт был заложен в 5–8-кратной повторности в чашках Петри диаметром 90 мм, по 10 мл суспензии в каждой чашке.

Изолированные микроспоры формировали каллус во всех вариантах опыта, общей закономерности при разной продолжительности температурной обработки не выявлено, выделить оптимальную продолжительность культивирования для всех генотипов по результатам исследования нельзя, в связи с чем требуются дополнительные исследования.

Выводы

Анализ отзывчивости у шести образцов свеклы столовой в культуре изолированных микроспор показал, что все генотипы отзывчивы на культивирование изолированных микроспор (формируют каллус). Во всех вариантах экспериментов наблюдали только каллусогенез, эмбриоиды из изолированных микроспор свеклы столовой не развивались. Наиболее отзывчивы на культивирование *in vitro* микроспоры, выделенные из бутонов длиной 1,2–1,5 мм. Оптимальная стадия для культуры изолированных микроспор свеклы столовой – одноядерная. Питательная среда NLN с добавлением 130 г/л сахарозы, 0,1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л НУК обеспечивает наибольший выход каллуса из изолированных микроспор свеклы столовой. Зависимости каллусогенеза от температуры культивирования микроспор в течение первых двух суток, а также экспозиции температурной обработки при 32,5 °С не выявлено.

Таблица 3. Влияние продолжительности культивирования при температуре 32,5 °С на частоту каллусогенеза изолированных микроспор свеклы столовой

Образец	Число чашек Петри с формирующимся каллусом, шт.				
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	10 сут.
РС×Д2	3	0	0	0	4
Б1	0	1	0	0	1
П2	0	1	1	2	0

Библиографический список

References

1. Banba H., Tanabe H. A study of anther culture in sugar beet. Bull. Sugar Beet Res. 1972. No14. Pp. 9–16.
2. Herrmann L., Lux H. Antherenkultur bei Zuckerruben, *Beta vulgaris* L. var altissima. Arch. Zuchtungsforsch. Berlin. 1988. Vol.18. 6. Pp. 375–383.
3. Goska M., Rogozinska J.H. Recent results on obtaining beet haploids through in vitro culture of anthers. Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimatyzacji Roslin. 1981. Vol.145. Pp. 141–143.
4. Van Geyt J., D'Halluin K., Jacobs M. Induction of nuclear and cell divisions in microspores of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Z. Pflanzenzuecht. 1985. Vol.95. Pp. 325–335.
5. Development of embryoids by microspore and anther cultures of red beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) K. Gorecka, D. Kryzanowska, U. Kowalska, W. Kiszczak, M. Podwyszynska. J. Cent. Eur. Agric. 2017. Vol.18(1). Pp. 185–195. DOI: 10.5513/JCEA01/18.1.1877
6. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). J.B.M. Custers M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. Kluwer Academic Publisher. 2003. Pp. 185–194. DOI:10.1007/978-94-017-1293-4_29
7. Монахос С.Г. Создание чистых линий – удвоенных гаплоидов капусты в культуре изолированных микроспор и селекция F₁-гибридов на основе современных методов биотехнологии: метод. рекомендации. М.: Изд-во РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, 2014. 44 с.
8. Байдина А.В., Монахос С.Г. Поиск методов повышения эмбриогенной отзывчивости капусты белокочанной в культуре микроспор. М.: Изд-во РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, 2016. С. 8–10.
9. Монахос С.Г., Чистова А.В. Создание удвоенных гаплоидов моркови столовой (*D. carota* L.) в культуре изолированных микроспор. М.: Грифон, 2017. 32 с.
10. Carrot Doubled Haploids. K. Górecka, D. Krzyżanowska, W. Kiszczak, U. Kowalska, R. Górecki. Advances in Haploid Production in Higher Plants. 2009. 20. Pp. 231–239. DOI: 10.1007/978-1-4020-8854-4_20
11. Гонтаренко С.М., Герасименко Г.М. Прямой индуцированный андрогенез у культуры *in vitro* буряков цукровых (*Beta vulgaris* L.). Plant Varieties Studying and protection. 2018. 14(4). 375–381. DOI: 10.21498/25181017.14.4.2018.151900
1. Banba H., Tanabe H. A study of anther culture in sugar beet. Bull. Sugar Beet Res. 1972. No14. Pp. 9–16.
2. Herrmann L., Lux H. Antherenkultur bei Zuckerruben, *Beta vulgaris* L. var altissima. Arch. Zuchtungsforsch. Berlin. 1988. Vol.18. 6. Pp. 375–383.
3. Goska M., Rogozinska J.H. Recent results on obtaining beet haploids through in vitro culture of anthers. Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimatyzacji Roslin. 1981. Vol. 145. Pp. 141–143.
4. Van Geyt J., D'Halluin K., Jacobs M. Induction of nuclear and cell divisions in microspores of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Z. Pflanzenzuecht. 1985. Vol. 95. Pp. 325–335.
5. Development of embryoids by microspore and anther cultures of red beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) K. Gorecka, D. Kryzanowska, U. Kowalska, W. Kiszczak, M. Podwyszynska. J. Cent. Eur. Agric. 2017. Vol. 18(1). Pp. 185–195. DOI: 10.5513/JCEA01/18.1.1877
6. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). J.B.M. Custers M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko. Kluwer Academic Publisher. 2003. Pp. 185–194. DOI:10.1007/978-94-017-1293-4_29
7. Monakhos S.G. Creation of pure lines - doubled cabbage haploids in the culture of isolated microspores and selection of F₁ hybrids based on modern methods of biotechnology: method. recommendations Moscow. Publishing house of the RGAU-MSHA named after K.A. Timiryazev. 2014. 44 p. (In Russ.).
8. Baidina A.V., Monakhos S.G. Search for methods to increase the embryogenic responsiveness of white cabbage in microspore culture. Moscow. Publishing house of the RGAU-MSHA named after K.A. Timiryazev. 2016. Pp. 8-10. (In Russ.).
9. Monakhos S.G., Chistova A.V. Creation of double haploids of carrot (*D. carota* L.) in culture of isolated microspores. Moscow. Grifon. 2017. P. 32 (In Russ.).
10. Carrot Doubled Haploids. K. Górecka, D. Krzyżanowska, W. Kiszczak, U. Kowalska, R. Górecki. Advances in Haploid Production in Higher Plants. 2009. 20. Pp. 231–239. DOI: 10.1007/978-1-4020-8854-4_20
11. Gontarenko S.M., Gerasimenko G.M. Direct induced androgenesis in culture *in vitro* in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Varieties Studying and Protection. 2018. 14(4). Pp. 375–381. DOI: 10.21498/25181017.14.4.2018.151900 (In Ukrainian).

Об авторах

Author details

Григолова Тамара Руслановна, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева). E-mail: grigolava1@gmail.com. ORCID 0000-0002-1594-8430

Вишнякова Анастасия Васильевна, канд. с.-х. наук, доцент кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева. E-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru. ORCID 0000-0002-9160-1164

Монахос Сократ Григорьевич, доктор с.-х. наук, зав. кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева. E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru. ORCID 0000-0001-9404-8862

Grigolava T.R., postgraduate student of the Department of Botany, Breeding and Seed Production of Garden Plants of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy after K.A. Timiryazev» (RSAU –MTAA after K.A. Timiryazev). E-mail: grigolava1@gmail.com. ORCID 0000-0002-1594-8430

Vishnyakova A.V., Cand. Sci. (Agr.), associate professor of the Department of Botany, Breeding and Seed Production of Garden Plants of the RSAU – MTAA after K.A. Timiryazev. E-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru. ORCID 0000-0002-9160-1164

Monakhos S.G., D.Sci. (Agr.), Head of the Department of Botany, Breeding and Seed Production of Garden Plants of the RSAU – MTAA after K.A. Timiryazev. E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru. ORCID 0000-0001-9404-8862



АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

140153 Московская область, Раменский район, д.Верее, стр.500, В.И. Леунову
Сайт: www.potatoveg.ru E-mail: kio@potatoveg.ru тел. 7 (49646) 24–306, моб.+7(910)423-32-29,
+7(916)677-23-42, +7(916)498-72-26

Журнал зарегистрирован в Министерстве Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций.
Свидетельство № 016257[®] Картофель и овощи, 2020

Журнал входит в перечень изданий ВАК РФ для публикации трудов аспирантов и соискателей ученых степеней, в международную реферативную базу данных AgriS.

Информация об опубликованных статьях поступает в систему Российского индекса научного цитирования (РИНЦ). Научным статьям присваивается цифровой идентификатор объекта DOI (Digital Object Identifier).

Подписано к печати 7.04.22. Формат 84x108^{1/16} Бумага гляцевая мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,2. Заказ №759. Отпечатано в ГУП РО «Рязанская областная типография» 390023, г.Рязань, ул.Новая, д.69/12.

Сайт: www.ryazanskaya-tipografiya.rf E-mail: stolzakazov@mail.ryazan.ru.
Телефон: +7 (4912) 44-19-36