

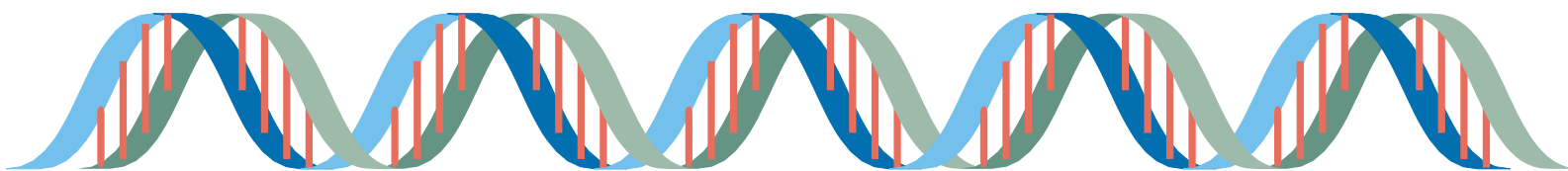


ФГБНУ ВНИИСБ
Курчатовский геномный центр -
ВНИИСБ



XXII Международная конференция молодых ученых
«Биотехнология в растениеводстве,
животноводстве и сельскохозяйственной
микробиологии»

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ КОНФЕРЕНЦИИ



7-9 ноября 2022 г.
Москва

Посвящается
памяти академика РАСХН Георгия
Сергеевича Муромцева

В рамках соглашения
о создании и развитии центра
геномных исследований
мирового уровня
«Курчатовский геномный центр»

XXII Международная конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии»



Конференция проводится на основании Соглашения от «31» октября 2019 г. № 075-15-2019-1667 о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации на осуществление государственной поддержки создания и развития центра геномных исследований мирового уровня «Курчатовский геномный центр» в рамках реализации федерального проекта «Развитие научной и научно-производственной кооперации» национального проекта «Наука»

ГЕНЕРАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ



Официальные спонсоры



Спонсоры



**ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР
ООО «НАУЧНЫЙ СЕРВИС»**

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

XXII МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

**«БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, ЖИВОТНОВОДСТВЕ
И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»**

7-9 ноября 2022 г.

**КОНФЕРЕНЦИЯ ПОСВЯЩАЕТСЯ
ПАМЯТИ АКАДЕМИКА РАСХН
ГЕОРГИЯ СЕРГЕЕВИЧА МУРОМЦЕВА**

Москва – 2022

УДК 663.18(063);606;573.6;57.088

ББК 30.16

Авт.знак Д22

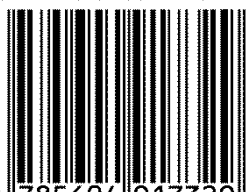
ISBN 978-5-6049173-2-9

«Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии»: 22-я Всероссийская конференция молодых учёных (Москва, 07-09 ноября 2022 г., ФГБНУ ВНИИСБ), сборник тезисов докладов. – М.: ФГБНУ ВНИИСБ, 2022. – 147 с.

**Конференция посвящается памяти
академика РАСХН
Георгия Сергеевича Муромцева**

22-я Всероссийская молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» проводится ежегодно Всероссийским научно-исследовательским институтом сельскохозяйственной биотехнологии. В сборник включены тезисы докладов научных работ аспирантов и молодых ученых научно-исследовательских институтов и ВУЗов. Конференция проводится на основании Соглашения от «31» октября 2019 г. № 075-15-2019-1667 о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации на осуществление государственной поддержки создания и развития центра геномных исследований мирового уровня «Курчатовский геномный центр» в рамках реализации федерального проекта «Развитие научной и научно-производственной кооперации» национального проекта «Наука». Сборник тезисов представляет интерес для специалистов в области биотехнологии, молекулярной биологии, генной инженерии, клеточной биологии.

ISBN 978-5-6049173-2-9



9 785604 917329

© ФГБНУ ВНИИСБ, 2022 г.

Оглавление

СЕКЦИЯ

«ПРИКЛАДНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ»	12
ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА (<i>HELIANTHUS ANNUUS</i> L.) ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ.....	13
Абрамова А.С., Соловьев А.А., Гарибян Ц.С.	
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ <i>CRYPTOCORYNE WENDTII</i> “GREEN GECKO” И <i>HEMIANTHUS</i> <i>CALLITRICHOIDES</i> “CUBA”.....	13
Алфёров А.П., Кирюшина А.С., Дмитриева А.Р., Корнеева А.А., Соловьев А.А., Гарибян Ц.С.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗАЧАТОЧНОГО КОЛОСА КАК ПЕРВОНАЧАЛЬНОГО ЭКСПЛАНТА В КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ СТЕРИЛЬНЫХ ЗЛАКОВ	14
Алкубеси М., Блинков А.О., Черноок А.Г.	
НОКАУТИРОВАНИЕ ГЕНОВ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ТОМАТА С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR-CAS9	16
Баранов Д.Ю., Долгов С.В., Тимербаев В.Р.	
АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ ПОДБОР СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ.....	17
Баженов М.С.	
МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФАЙЛИНГ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ЗАГРЯЗНЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС ТЕРРИТОРИЯХ.....	18
Битаршвили С.В., Волкова П.Ю., Шестерикова Е.М., Подлущий М.С.	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ НЕАННОТИРОВАННЫХ ГЕНОВ В РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ ЗЕРНОВКЕ ТРИТИКАЛЕ.....	20
А.А. Болотина, Е.С. Полховская, М.В. Дудников, И.В. Киров	
МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОСПОР ЗЛАКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФЛОТИРУЮЩЕЙ КУЛЬТУРЫ	21
Блинков А.О., Алкубеси М., Крупина А.Ю., Козарь Е.В., Дивашук М.Г.	
ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ КАРТОФЕЛЯ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ.....	22
Чернова М. М.	
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КАЛЛУСОГЕНЕЗА У ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ <i>ALTERNANTHERA LILACINA</i> И <i>HYGRONILA PINNATIFIDA</i>	24
Дмитриева А.Р., Корнеева А.А., Кирюшина А.С., Алфёров А.П., Серeda П.А., Соловьев А.А., Гарибян Ц.С.	
ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА MD-PG1, ДЕТЕРМИНИРУЮЩЕГО ПРИЗНАКИ КАЧЕСТВА ПЛОДОВ У ГИБРИДНЫХ СЕМЕЙ ЯБЛОНИ	25
Должикова М.А., Павленко А.А.	
ВОДНЫЙ РЕЖИМ ПШЕНИЦ С РАЗЛИЧНЫМ ГЕНОМНЫМ СОСТАВОМ И УРОВНЕМ ПЛОИДНОСТИ	26
Ермошин А.А., Рукавишников Д.С., Киселёва И.С.	
ПОДХОДЫ К “DNA-FREE” ГЕНОМНОМУ РЕДАКТИРОВАНИЮ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЁРЕН ЛУКА РЕПЧАТОГО (<i>ALLIUM CEPA</i> L.).....	28
Ермолаев А.С., Мардини М., Пивоваров А.М., Хрусталева Л.И.	
СОЗДАНИЕ СТРУКТУРЫ И ЛОГИКИ ЭЛЕКТРОННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ, АДАПТИРОВАННОЙ ПОД АВТОМАТИЧЕСКИЙ ПОДБОР ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПОСРЕДСТВОМ ИСКУССТВЕННОЙ НЕЙРОСЕТИ.....	30
Галанов А.Э.	

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА ГОРОХА.....	31
Игнатъева И.М., Словарева О.Ю.	
ГЕН АЛЬФА-ГАРПИНИНА <i>Sm-AMP-X</i> ИЗ РАСТЕНИЯ <i>Stellaria media</i> : ПАТТЕРН ЭКСПРЕССИИ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ	33
Иванова Л.А., Комахин Р.А.	
ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ТКАНИ ЛИСТЬЕВ <i>Vicia cracca</i> , ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В ЗОНЕ ОТЧУЖДЕНИЯ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС	35
Казакова Е.А., Битаршвили С.В., Волкова П.Ю.	
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО (<i>THYMUS SERPYLLUM L.</i>)	36
Кожина С.Э., Царева О.В., Константинов З.С., Галахова О.Б., Соловьев А.А., Гарибян Ц.С.	
СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИИ ЯРОВОЙ И ОЗИМОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ KASP-МАРКЕРА НА АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕНА ZDS	37
Коробкова В.А., Архипов А.В., Яновский А.С., Воропаева А.Д., Ульянов Д.С., Никитина Е.А., Дивашук М.Г.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЫСТРЫХ НЕЙТРОНОВ В КАЧЕСТВЕ ФИЗИЧЕСКОГО МУТАГЕНА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗМОЖНОСТИ УЛУЧШЕНИЯ СОРТОВЫХ СВОЙСТВ РИСОВОЙ КУЛЬТУРЫ	38
Кругляк А.И., Алексеенок Ю.В., Дорошкевич А.С., Аппазов Н.О., Бакирулы К.Б.	
МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА КОЛОКОЛЬЧИК...40	
Куприянова Д.М., Савлуковская С.В., Репина А.С., Галахова О.Б., Соловьев А.А., Константинов З.С., Гарибян Ц.С.	
ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ КАК НЕОБХОДИМОЕ УСЛОВИЕ ПОИСКА ГЕНОВ TAL-ЭФФЕКТОРОВ	41
Лебедева М.В.	
ПОЙМАЙ МОБИЛОМ, ЕСЛИ СМОЖЕШЬ	42
Меркулов П.Ю., Егорова Е.Г., Серганова М.А., Петров Г.А., Киров И.В.	
СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА α -ХАРПИНИНА <i>Sm-AMP-X</i> ИЗ <i>STELLARIA MEDIA L.</i> В РАСТЕНИЯХ ТОМАТА.....	44
Михель И.М.	
ИНТРОГРЕССИЯ ГЕНА-ВОССТАНОВИТЕЛЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ИЗ <i>RAPHANUS SATIVUS L.</i> В <i>BRASSICA NAPUS L.</i> ПУТЕМ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ	46
Мурзина Э.Р., Монахос С.Г.	
ВЕГЕТАЦИОННЫЙ ПЕРИОД КАК ФАКТОР ПРИ ВЫБОРЕ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СКОРОСПЕЛЫХ СОРТОВ ОВСА В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ.....	48
Мишечкина В.С., Любимова А.В., Кочнева Д.А.	
РАЗНООБРАЗИЕ ВИДОВ <i>CLADOSPORIUM</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ С ЛИСТЬЕВ ТОМАТА, ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА.....	49
Пуховская Е.А., Чижик В.К., Мартынов В.В.	
ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОГРАММЫ БИОИНФОРМАТИКИ И ГЕНОМИКИ НА ОСНОВЕ ОНЛАЙН ИНСТРУМЕНТОВ	51
Орлова Н.Г., Орлов Ю.Л.	
ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ <i>IN VIVO</i> , ИНДУЦИРОВАННЫЕ ГИПОКСИЧЕСКИМ СТРЕССОМ.....	53
Оя П.С.	

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ТИПОВ ЦМС В КОЛЛЕКЦИИ НОВЫХ СЕЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ <i>BRASSICA NAPUS</i>	54
Пырников А.С., Артющин А.В., Соловьёв А.А., Милюкова Н.А.	
ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА АРТЕМИЗИНИНА ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ НЕРОДСТВЕННЫХ ПОЛЫНИ РАСТЕНИЙ	55
Рахманов Б.К., Имамходжаева А.С., Усманов Д.Э., Мирзахмедов М.Х., Убайдуллаева Х.А., Шерматов Ш.Э., Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю.	
МЕХАНИЗМЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ЗАЩИТНЫЙ ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ОТВЕТ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ЭКЗОГЕННОМ ПРИМЕНЕНИИ дцРНК ПРОТИВ У ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ	56
Самарская В.О., Спеченкова Н.А., Маркин Н.В., Супрунова Т.П., Завриев С.К., Калинин Н.О., Тальянский М.Э.	
ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО СТРЕССА	58
Серганова М.А., Меркулов П.Ю., Киров И.В.	
CLASSIFICATION OF WILD ANIMALS FROM THE GENUS <i>PHACOCHOERUS</i> , <i>POTAMOCHOERUS</i> AND <i>SUS</i> ON THE BASIS OF THE ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF THE <i>MC1R</i> , <i>NR6A1</i> AND <i>HEPH</i> GENES	59
Snytkov E.V., Kipen V.N.	
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ЛОКУСЫ ГЕНОМА САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (<i>BETA VULGARIS</i>) ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ	60
Шалаева Т.В., Шилов И.А.	
МОДИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ FC-ФРАГМЕНТА АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННОГО ПРОТИВ ОНКОБЕЛКА HER2/NEU И ПРОДУЦИРУЕМОГО В РАСТЕНИЯХ	61
Шешукова Е.В., Камарова К.А., Ершова Н.М., Комарова Т.В.	
НАСЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ РНК-САЙЛЕНСИНГА И ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ У МУТАНТОВ СОРГО С УЛУЧШЕННОЙ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТЬЮ КАФИРИНОВ И ИХ ЭФФЕКТЫ НА СЕЛЕКЦИОННО-ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ	63
Борисенко Н.В., Эльконин Л.А., Геращенко Г.А., Кенжегулов О.А., Сарсенова С.Х., Панин В.М., Рожнова Н.А.	
ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ АЛЛЕЛОПАТИИ В АГРОФИТОЦЕНОЗАХ: ПУТИ ИХ УЧЕТА И КОНТРОЛЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ	65
Градов О.В.	
ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ МАЛОНОВОГО АЛЬДЕГИДА В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ <i>IN VIVO</i> ПРИ ЗАСОЛЕНИИ ХЛОРИДОМ НАТРИЯ	67
Плотникова Е.В., Анохина Г.Б.	
РАЗРАБОТКА HRM-МАРКЕРА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ У ЛУКА РЕПЧАТОГО (<i>ALLIUM CEPA</i> L.)	68
Нзеха М., Ермолаев А.С., Хрусталева Л.И.	
ПОИСК ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ У ПШЕНИЦЫ В ГЕНОМЕ ТРИТИКАЛЕ	69
Саенко К.Ю., Дудников М.В.	
МЕТОД ПОДТВЕРЖДЕНИЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА	70
Самарина М.А., Архипов А.В., Дивашук М.Г.	
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ КЛЕЙКОВИНЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ	

СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (<i>T. AESTIVUM</i>) ПО ЛОКУСАМ GLU	71
Стрембовский И.В., Дивашук М.Г.	
ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ «УЛУЧШИТЕЛЕЙ» ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ТРИТИКАЛЕ И РЖИ.....	73
Черноок А.Г., Панченко В.В.	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ ИЗ РОДА <i>FUSARIUM</i> ВЫДЕЛЕННЫХ С КУЛЬТУР СЕМЕЙСТВА <i>SOLANACEAE</i>	74
Шингалиев А.С., Чижик В.К., Мартынов В.В., Енгальчева И.А., Дудников М. В.	
СЕКЦИЯ	
«КУЛЬТИВИРОВАНИЕ <i>IN VITRO</i> И РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА».....	76
КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ЧЕСНОКА ОЗИМОГО НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПОВЫШЕННОЙ КИСЛОТНОСТИ ПОЧВЫ.....	77
Азопкова М.А.	
ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗЕРНОВОГО СОРГО, ВЫРАЩЕННОГО В СТЕПНЫХ АГРОЦЕНОЗАХ	78
Барановский А.В., Косогова Т.М, Меркулов А.Е.	
ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i> ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО.....	80
Броносских Е.Д., Пивоварова Н.С.	
ИЗМЕНЕНИЯ В АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЕ КОРНЕЙ ТАБАКА СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ ЭКСПАНСИНОВ <i>NTEXRA1</i> И <i>NTEXRA5</i> ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	82
Бережнева З.А., Кулуев Б.Р.	
ИЗУЧЕНИЕ КАСПАЗО-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ, КАК ОСНОВНОГО ПРИЗНАКА ПКС МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ (<i>PETUNIA HYBRIDA</i> L.) ПРИ САМОНЕСОВМЕСТИМОМ ОПЫЛЕНИИ <i>IN VIVO</i>	83
Богатырева А.Л., Захарова Е.В.	
ЦИТОКИНИНЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК В СИСТЕМАХ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> (НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ <i>P. HYBRIDA</i> L.).....	84
Бравкова Е.В., Захарова Е.В.	
ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ЭПИКОТИЛЕЙ ГОРОХА, ЭКЗОГЕННО ОБРАБОТАННЫХ ДОНОРОМ NO, В НОРМЕ	85
Герасимов Н.Ю., Неврова О.В., Жигачева И.В., Генерозова И.П., Голощанов А.Н.	
ВЛИЯНИЕ ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОРАСТАНИЕ И РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ТОМАТОВ ПРИ СОВМЕСТИМОМ И САМОНЕСОВМЕСТИМОМ ОПЫЛЕНИИ, А ТАКЖЕ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>	86
Газиева И.И., Голиванов Я.Ю., Захарова Е.В.	
АКРИЛОВЫЕ СУПЕРВЛАГОАБСОРБЕНТЫ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ.....	87
Глухова А.С.	
ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ВЛИЯЮЩИХ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО (<i>LUPINUS ANGUSTIFOLIUS</i> L.) В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	88
Злобнова Н.В.	
МЕГАСПОРОГЕНЕЗ И РАЗВИТИЕ ЖЕНСКОГО ГАМЕТОФИТА ОРХИДЕИ <i>COELOGYNE SPECIOSA</i> SUBSP. <i>FIMBRIATA</i> (J.J.SM.) GRAVENDEEL.....	89
Коломейцева Г.Л., Коваль В.А., Рябченко А.С., Бабоша А.В.	
ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПАТОГЕНЫ РАСТЕНИЙ <i>TARAXACUM KOK-SAGHYZ</i>	91
Мартиросян Л.Ю., Мягкова Е.Р., Филатова С.И., Мартиросян Ю.Ц.	

ПОЧВЕННЫЙ КОНДИЦИОНЕР НА ОСНОВЕ ОРГАНИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ	92
Сахарова Ю.А., Олехнович Р.О.	
ЦИТОКИНИНЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК В СИСТЕМАХ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> (НА МОДЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТАХ ТОМАТАХ <i>S. HABROCHAITES</i>, <i>S. PENNELLII</i>, <i>S. CHILENSE</i>)	93
Ханина Т.П., Голиванов Я.Ю., Захарова Е.В.	
ФАКТОРЫ ИНДУКЦИИ ЭМБРИОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ФРАГМЕНТОВ ЗАВЯЗЕЙ <i>CUCUMIS SATIVUS</i> L.	95
Осминина Е.В., Монахос С.Г.	
ИЗМЕНЕНИЕ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ <i>SSADH1</i> И <i>SSADH2</i> ДЕГИДРОГЕНАЗЫ СУКЦИНИЛОВОГО ПОЛУАЛЬДЕГИДА В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ (<i>ZEA MAYS</i> L.) ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ	97
Шахов З.Н., Оя П.С.	
ВЛИЯНИЕ ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОРАСТАНИЕ И РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ПЕТУНИИ ПРИ СОВМЕСТИМОМ И САМОНЕСОВМЕСТИМОМ ОПЫЛЕНИЯХ, А ТАКЖЕ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>	98
Корякина Ю. И., Захарова Е.В.	
ЛИПИДЫ И ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ОВСА ПОЗДНЕЛЕТНЕГО ПОСЕВА - КРИОКОРМА ЖИВОТНЫХ ЯКУТИИ	99
Нохсоров В.В., Петров К.А.	
ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ <i>SETARIA ITALICA</i> (L.) P. BEAUV. SUBSP. <i>ITALICA</i> В УСЛОВИЯХ ВОЛОГОДСКОЙ ОБЛАСТИ	100
Сухарева Л.В.	
КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК <i>PANAX JAPONICUS</i> И <i>POLYSCIAS FRUTICOSA</i> (<i>ARALIACEAE</i>) – ПРОДУЦЕНТЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ	102
Тюрина Т.М., Кочкин Д.В., Глаголева Е.С., Титова М.В.	
РАЗВИТИЕ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРЕДЫ ПОСТ-АКТИВАЦИОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	103
Лопухов А.В.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДОПОГЛОЩАЮЩЕГО ПОЛИМЕРНОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И АКРИЛОВОГО ГИДРОГЕЛЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ	104
Фатеев А.Д., Успенская М.В.	
СЕКЦИЯ	
«КЛАССИЧЕСКИЕ И ЦИФРОВЫЕ МЕТОДЫ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ»	107
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕРАОММЕТРИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЭТИОЛИРОВАННОГО РАСТЕНИЯ И ЕГО КОРОТКОВОЛОНОВОВОГО ФОТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ОТКЛИКА	108
Адамович Е.Д., Градов О.В.	
ГЕНЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕГУЛЯЦИИ АЗОТНОГО ОБМЕНА У КОРОТКОСТЕБЕЛЬНЫХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ	110
Кочешкова А.А., Баженов М.С., Черноок А.Г., Дивашук М.Г.	
ОЦЕНКА УРОЖАЙНОСТИ ПШЕНИЦЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ ПОЛУЧЕННЫХ БПЛА НА НИЗКОЙ ВЫСОТЕ	111
Кожекин М.В., Генаев М.А., Коваль В.С., Афонников Д.А.	

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ГЕНА КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ <i>RHT-B1P</i> (<i>RHT-17</i>) НА ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ У ТВЕРДОЙ И МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ.....	113
Назарова Л. А., Черноок А. Г., Никитина Е. А., Коробкова В. А., Юркина А. И.	
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ФЕНОТИПИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФОТОМОРФОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ ТОМАТА, БАЗИЛИКА И РЕДИСА.....	114
Товстыко Д.А., Слепцов Н.Н., Котов Г.Е., Анташкевич А.А., Тараканов И.Г.	
ЦИФРОВОЕ ФЕНОТИПИРОВАНИЕ НА ПОЛЯХ И В ЛАБОРАТОРИИ	116
Литвинов Д.Ю.	
АНАЛИЗ ГЕНОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ ЗА ДЛИНУ ВЕГЕТАЦИОННОГО ПЕРИОДА У ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ	117
Меглицкая Я.С., Мохов. Т.Д., Черноок А.Г., Тархов И.С.	
ИНТЕРАКТИВНЫЙ СТЕНД ДЛЯ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ RHENOBORD	119
Ульянов Д.С., Ульянова А.А., Литвинов Д.Ю., Кочешкова А.А., Дивашук М.Г.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕАКЦИИ ЗЛАКОВЫХ НА ЗАСУХУ В ДИНАМИКЕ	120
Ульянова А.А., Ульянов Д.С., Кочешкова А.А., Дивашук М.Г., Литвинов Д.Ю.	
СЕКЦИЯ	
«ЦИТОЛОГИЯ И ЦИТОГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ»	122
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ КОРНЕЙ ДВУХ ГЕНОТИПОВ ТОМАТА (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.) В УСЛОВИЯХ НАСЛ-ЗАСОЛЕНИЯ <i>IN VITRO</i>	123
Богоутдинова Л.Р., Баранова Е.Н., Юмаков Д. Д., Халилуев М.Р.	
ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА В БИОТЕХНОЛОГИИ <i>BETA VULGARIS</i> L.	124
Колесникова Е.О., Пономарева С.В., Донских Е.И., Музалевская А.А., Бердников Р.В.	
СОЗДАНИЕ ДНК-ЗОНДОВ ДЛЯ ФИЗИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ ГЕНОВ/МАРКЕРОВ НА ФИЗИЧЕСКИХ ХРОМОСОМАХ ЛУКА РЕПЧАТОГО (<i>ALLIUM CEPA</i> L.)	125
Пивоваров А.М., Кудрявцева Н.А., Одинцов С.В., Ермолаев А. С., Хрусталева Л.И.	
РАЗРАБОТКА НОВЫХ ХРОМОСОМНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ J-ГЕНОМА <i>THINOPYRUM BESSARABICUM</i> НА ОСНОВЕ САТЕЛЛИТНЫХ ПОВТОРОВ	127
Юркина А.И., Соколова В.М., Крупин П.Ю., Ульянов Д.С., Дивашук М.Г.	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ МЕЙОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ (<i>ASY1</i> , <i>ZYP1</i> , <i>MLH1</i> , <i>MUS81</i> и <i>CENH3</i>) У <i>ALLIUM CEPA</i> И <i>ALLIUM FISTULOSUM</i>	128
Кудрявцева Н.А., Хрусталева Л.И., Одинцов С.В., Пивоваров А.М., Ермолаев А. С., Симановский С.А.	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РОДА <i>ILEX</i>	129
М.Х Гонсалес Франко, О.В. Разумова, О.С. Александров	
ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ РАСТЕНИЙ - ЭВОЛЮЦИЯ, МОРФОЛОГИЯ, МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ	130
Разумова О.В., Дивашук М.Г., Александров О.С., Романов Д.В., Карлов Г.И.	
ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ НА ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМАХ КОНОПЛИ ПОСЕВНОЙ (<i>CANNABIS SATIVA</i> L.)	132
Романов Д.В., Дивашук М.Г.	
СЕКЦИЯ	
«СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»	134
ДИНАМИКА АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ РИЗОСФЕРНЫХ ШТАММОВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	135
Артамонова М. Н., Потатуркина - Нестерова Н. И.	

ПРОФИЛЬ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН РИЗОСФЕРНЫХ ШТАММОВ <i>PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES</i>.....	136
Хитрова А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И.	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ КИНЕТИКА РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ «ВОЛГОГРАД/D(1L-5-6L) MGF110»	137
Нефедьева М.В., Малоголовкин А.С., Титов И.А.	
К ВОПРОСУ О ПРИМЕНИМОСТИ АЭРОЗОЛЬНЫХ СПЕКТРОМЕТРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АВТОМАТИЧЕСКОГО ИСКУССТВЕННОГО ОПЫЛЕНИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ, А ТАКЖЕ ДЛЯ АНАЛИЗА СПОРОВОЙ КОНТАМИНАЦИИ В КАРАНТИНЕ РАСТЕНИЙ...	139
Орехов Ф.К., Градов О.В.	
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПОДСОЛНЕЧНИКА С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ АМПЛИКОНОВ ПО ТЕХНОЛОГИИ OXFORD NANOPORE	141
Саенко К.Ю., Дудников М.В., Киров И.В., Демулин Я.Н., Соловьев А.А.	
ПОДБОР ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ ДЛЯ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ НА ЗЕРНО	142
Сотченко Д. Ю., Сотченко Дм. Ю., Таов А. А.	
СОЗДАНИЕ ВЫСОКОМАСЛИЧНЫХ ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛЕКЦИИ ВСЕРОССИЙСКОГО ИНСТИТУТА ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА (ВИР)	143
Яндиева А.Р., Аппаев С.П., Матаева О.Х.	
ФЕНОТИПИРОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОЗИМОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ В РАННИХ	145
Воропаева А.Д., Яновский А.С., Мудрова А.А.	
ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СЕЛЕКЦИИ ОЗИМОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ НА МОРОЗОСТОЙКОСТЬ	146
Яновский А.С., Мудрова А.А., Воропаева А.Д.	

**СЕКЦИЯ
«ПРИКЛАДНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ»**

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

Абрамова А.С.^{1,2}, Соловьев А.А.¹, Гарибян Ц.С.¹

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», лаборатория маркерной и геномной
селекции растений, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42, Россия

2 – ФГАО УВО «Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет)», 141701, Московская область, г. Долгопрудный,
Институтский переулок, д.9.
E-mail: abramovsn@icloud.com

Подсолнечник (*Helianthus annuus*) является одной из основных масличных культур не только в России, но и в мире. В связи с этим, актуальным является изучение методов увеличения генетического разнообразия данной культуры. В настоящее время широко используются протопласты (клетки, лишенные клеточной стенки) в качестве исходного материала для генетических манипуляций с культурными растениями. Успешное выделение протопластов зависит от многих факторов от сортовых особенностей в том числе, их необходимо индивидуально оптимизировать.

Цель работы: оптимизация условий получения протопластов подсолнечника сортов Джинн, СПК, Победа, Казачий.

В качестве эксплантов использовали молодые листья 2-3-х недельных проростков, выращенных в условиях *in vitro*. Экспланты инкубировали в ферментных растворах в течение 16 часов при температуре +29°C. Оптимизировали условия центрифугирования протопластов в ферментном и промывочном растворах. Определяли эффективность выделения протопластов подсолнечника разных сортов, подсчитывая число выделенных протопластов под микроскопом и определяя жизнеспособность выделенных протопластов с помощью раствора ФДА.

Полученные данные показали, что для всех изученных сортов максимальное число жизнеспособных протопластов выделяется при добавлении ферментов с концентрацией 500 мг/л Cellulase Onozuka R-10 (1,3 U/mg) и 500 мг/л Macerozyme R-10 (0,71 U/mg), а увеличение концентрации приводит к резкому снижению выходу жизнеспособных протопластов. Максимальное количество жизнеспособных протопластов было получено из мезофилла листа подсолнечника сорта Джинн. Был подобран соответствующий режим центрифугирования для успешного выделения протопластов, им оказался: время центрифугирования 4 мин при 1000 об/мин. Продолжается работа по оптимизации условий культивирования полученных протопластов.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ *CRYPTOCORYNE WENDTII* “GREEN GECKO” И *HEMIANTHUS* *CALLITRICHOIDES* “CUBA”

Алфёров А.П.¹, Кирюшина А.С.¹, Дмитриева А.Р.¹, Корнеева А.А.¹, Соловьев
А.А.², Гарибян Ц.С.²

1 – ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет - МСХА
имени К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127550,
E-mail: anrelova.ann@gmail.com

2 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», ул. Тимирязевская 42, Москва, 127550

Новым направлением в современной аквариумистике является акваскейпинг (англ. Aquascaping) – создание декоративных водных «ландшафтов» в аквариуме [1]. Водные растения – частично или полностью произрастающие в воде, используются при декорировании традиционных аквариумов или водных садов, с каждым годом обороты товаров и услуг, продаваемых для данной отрасли, возрастают [2]. Для увеличения разнообразия растительного материала используются биотехнологические методы, в том числе соматическая гибридизация, имеющая ряд преимуществ перед другими методами генетической трансформации, в том числе позволяющая ускорить процесс получения генетически модифицированных растений [3].

Цель работы: оптимизация компонентов ферментных растворов и питательных сред для культивирования протопластов водных растений *Cryptocoryne wendtii* var. *Green gecko* и *Hemianthus callitrichoides* *Cuba* *in vitro*.

В качестве объектов исследования были использованы стерильные растения *Cryptocoryne wendtii* var. *Green gecko* и *Hemianthus callitrichoides* *Cuba*, размножаемые в культуре *in vitro* микрочеренкованием на питательных средах MS (Murashige, 1966) и ½ MS (с добавлением всех компонентов питательной среды MS на 50%, кроме сахарозы и агар-агара) при температуре 20±2°C и фотопериоде 16/8 часов. В качестве эксплантов были отобраны 2-х недельные побеги *Hemianthus callitrichoides* *Cuba* и 2-3-х недельные листья *Cryptocoryne wendtii* var. *Green gecko*. Раствор для инкубации содержал ферменты Cellulase Onozuka R-10 (1,3 U/mg) 1% и Macerozyme R-10 (0,71 U/mg) 0,5%. Инкубация длилась 4;16;24;40 часов при температуре 29°C. Центрифугирование проводили при 750;800;1000 об/мин. Полученные протопласты культивировали на средах с базой MS и добавлением различных фитогормонов с концентрациями, мг/л: НУК (0,5;1,0;2,0), 2,4-Д (0,2; 0,5;2,0), Зеатин (0,5).

Полученные экспериментальные данные показали, что оптимальное время инкубации для *Cryptocoryne wendtii* var. *Green gecko* является 16 часов, а для *Hemianthus callitrichoides* *Cuba* при тех же условиях составляет 24 часа. При этом для обеих культур наилучшим режимом центрифугирования является 4 мин. при RPM 1000 об/мин.

Продолжается исследование по повышению выхода протопластов при ферментации и оптимизации условий культивирования протопластов водных растений.

Список литературы:

1. Клональное микроразмножение некоторых видов аквариумных растений в культуре *in vitro* /Е. В. Немцова, Д. М. Новиков, Т. П. Выхорь //Физиология и биохимия растений /Бюллетень Брянского отделения РБО, 2018 – № 3 (15). С. 42–48.
2. Adventitious Shoot Regeneration from Leaf Explant of Dwarf Hygro (*Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson) / Mehmet Karatas [and others] //The ScientificWorld Journal – 2013.
3. Protoplast Isolation and Culture of Aquatic Plant *Cryptocoryne wendtii* De Wit / Kasetsart J. (Nat. Sci.) 41 : 300 - 310 (2007)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗАЧАТОЧНОГО КОЛОСА КАК ПЕРВОНАЧАЛЬНОГО ЭКСПЛАНТА В КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ СТЕРИЛЬНЫХ ЗЛАКОВ

Алкубеси М.^{1,2}, Блинков А.О.¹, Черноок А.Г.¹

1- ФГБНУ «Всероссийский научно- исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, 127550

E-mail: malak.alkupisy@bk.ru

2- ФГБОУ ВО Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550

Отдалённая гибридизация, получение удвоенных гаплоидов и амфидиплоидов являются широко распространёнными методами создания исходного материала в селекции злаков. Однако, некоторый ценный генетический материал у отдалённых гибридов мягкой и твёрдой пшеницы, а также других злаков, может теряться из-за проблемы стерильности данных растений, вызванной наличием негомологичных субгеномов и трудностей полиплоидизации. При невозможности получения семян от самоопыления, использование клонального микроразмножения может помочь сохранить и размножить эти растения. Учитывая, что клеточные биотехнологии напрямую зависят от физических и физиологических факторов, а также от состава питательной среды, **целью** данной работы являлось изучение влияния возраста экспланта и условий культивирования на процессы каллусообразования и регенерации растений.

Для эксперимента по поиску первоначального экспланта, обладающего наибольшей отзывчивостью использовали колосья 4 пшенично- ржаных гибридов на следующих стадиях: а) V этап органогенеза по Куперман [1]; 31-32 подфаза по Zadoks и др. [2] (в дальнейшем фаза 1); б) VI этап органогенеза по Куперман [1]; 33-36 подфазы по Zadoks и др. [2] (в дальнейшем фаза 2); в) начало VII этапа органогенеза по Куперман [1]; 37-38 подфазы по Zadoks и др. [2] (в дальнейшем фаза 3). Наибольшей отзывчивостью к формированию каллуса на среде MS, дополненной 2 мг/л 2,4-Д, отличались молодые колосья, находящихся на 1 и 2 фазах. Экспланты, находящиеся на данных фазах развития, формировали каллус с частотой каллусообразования 100% среди всех изучаемых генотипов. Молодые колосья, находящиеся на 3 фазе, формировали каллус в зонах поранения, реже в частях с менее дифференцированными колосками, с частотой 8,5 ($\pm 2,08$) %, что значительно ниже, чем у эксплантов на 1 и 2 стадии развития ($F_{\text{факт}} > F_{0,5}$).

Полученный каллус развивался на среде для регенерации (MS, дополненная 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л кинетина) по пути соматического эмбриогенеза. Наблюдалось влияние возраста экспланта на среднее число регенерировавших побегов на эксплант. При культивировании молодых колосьев фазы 1 и фазы 2 из каллуса регенерировало в среднем по генотипам 1,42 ($\pm 0,59$) и 1,11 ($\pm 0,51$) побегов на эксплант соответственно. Для колосьев на 3 фазе развития данный показатель значительно снижался ($F_{\text{факт}} > F_{0,5}$) и составлял 0,14 ($\pm 0,12$) побегов на эксплант в среднем по генотипам. При культивировании каллуса по мимо соматического эмбриогенеза наблюдался и исключительно ризогенез. Среди регенерировавших растений не наблюдалось альбиносов. Полученные растения не требовали яровизации для формирования колоса.

При различных способах культивирования (в темноте и при 16-часовом фотопериоде) не было выявлено статистически значимого влияния света на процессы каллусообразования у колосьев на фазах 1 и 2 ($F_{\text{факт}} < F_{0,5}$). Оба типа экспланта формировали каллус с частотой 100% среди изучаемых генотипов. При культивировании колосьев на 3 фазе развития частота каллусообразования была значительно выше при 16- часовом фотопериоде в сравнении с культивированием в темноте ($F_{\text{факт}} > F_{0,5}$). Частота каллусообразования среди изучаемых генотипов для 3 фазы была 19,5 ($\pm 10,28$)% и 8,5 ($\pm 2,08$)% для культивирования при 16- часовом фотопериоде и в темноте соответственно.

Проявлялось положительное влияние темновой инкубации на конечный выход зелёных растений. Так, при культивировании в темноте у колосьев в фазе 1 и 2 формировалось в среднем по генотипам 1,42 ($\pm 0,59$) и 1,11 ($\pm 0,51$) побегов на эксплант соответственно, что значительно выше ($F_{\text{факт}} > F_{0,5}$), чем при 16- часовом фотопериоде 0,037 ($\pm 0,04$) и 0,03 ($\pm 0,05$) соответственно. Для колосьев, находящихся в фазе 3 конечный выход зелёных растений среди изучаемых генотипов, был очень мал и составлял 0,14 ($\pm 0,12$) и 0,01 ($\pm 0,01$) для культивирования в темноте и при 16- часовом фотопериоде соответственно. Наши предварительные исследования показали, что для увеличения регенерационной способности, инкубирование в темноте необходимо проводить в течение 4 недель с пассированием на аналогичную питательную среду после 2 недель

культивирования. Если же инкубация проходит всего 2 недели, то формируется небольшое количество каллуса, который в основном развивается по пути ризогенеза.

Изученные параметры легли в формирование протокола клонального микроразмножения стерильных злаков, заключающегося в индукции каллуса у эксплантов молодых колосьев 1 и 2 фазы развития, в темноте при 25°C на среде MS, дополненной 2 мг/л 2,4-Д с последующей индукцией соматического эмбриогенеза при 16-часовом фотопериоде на среде MS, дополненной 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л кинетина. Использование данного протокола на генотипах пшенично- ржаных гибридов показало, что у всех генотипов каллус формировался с частотой 100%, а среднее количество побегов на эксплант варьировало от 0,5 до 1,8 в зависимости от генотипа.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-16-00121

Список литературы:

1. Куперман Ф.М. Биологические основы культуры пшеницы: в 3-х ч. Часть 2. Москва: МГУ, 1953, 300.
2. Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. 1974. 14: 415.

НОКАУТИРОВАНИЕ ГЕНОВ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ТОМАТА С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR-CAS9

Баранов Д.Ю.¹, Долгов С.В.^{1,2}, Тимербаев В.Р.^{1,2}

**1 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии (ВНИИСБ), Москва 127550**

**2 – Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ), Пушкино 142290
E-mail: timerbaev@gmail.com**

Фитопатогенные вирусы наносят значительный вред сельскохозяйственному производству. Несмотря на развитие технологий по сдерживанию вирусных болезней томата, включающих как методы классической селекции, так и биотехнологические методы, данные заболевания вызывают серьезные потери урожая по всему миру. Самовоспроизведение фитовирусов включает взаимодействие между вирусными компонентами и факторами растения-хозяина, поэтому мутации в соответствующих генах последних могут обеспечить резистентность к вирусной инфекции. В настоящее время, имеются данные, что белки комплекса эукариотического фактора элонгации трансляции 1 (eEF1) вовлечены в распространение некоторых фитовирусов. Установлено, что eEF1A может связываться с 3'-С-концом вирусной РНК, предположительно из-за того, что его вторичная структура напоминает структуру тРНК, а также с их соответствующей кодируемой РНК-зависимой РНК-полимеразой. Ранее было показано, что eEF1A и eEF1B β взаимодействуют с геном транспортировки вируса картофеля Х, участвуя в локальном и / или системном перемещении вируса. Также известно, что подавление eEF1A и eEF1B у *N. benthamiana* приводит к снижению накопления белка оболочки вируса табачной мозаики и его распространению. Тем не менее, вовлеченность отдельных генов фактора eEF1B в размножении фитовирусов остается все еще слабо изученной.

Настоящая работа посвящена изучению роли фактора eEF1B в развитии вирусной инфекции томата. Вклад каждой из субъединиц α , β и γ фактора eEF1B в вирусную резистентность томата будет определен путем внесения мутаций в нуклеотидные последовательности генов, кодирующих соответствующие субъединицы, с применением технологии геномного редактирования CRISPR-Cas9. В качестве

прикладного аспекта, в конечном итоге, мы рассчитываем найти пути создания растений томата с повышенной устойчивостью к некоторым вирусным заболеваниям. Ранее нами были сконструированы 15 бинарных векторов, различающихся последовательностями гидовых РНК, нацеленных на гены субъединиц eEF1B. С их помощью осуществлена стабильная агробактериальная трансформация растений томата, в которой на каждую из генетических конструкций было задействовано по 100 эксплантов. Проведен отбор первичных трансформантов на селективной среде, давший суммарно 329 трансгенных растений при средней эффективности трансформации в 22%. Осуществлена проверка присутствия вставки переносимой ДНК в геном томата путем амплификации фрагментов целевого и селективных генов. События редактирования в генах субъединиц фактора eEF1B подтверждены у 77 трансформантов с помощью T7E1-анализа, а также секвенированием. Выяснилось, что большинство трансгенных линий предположительно имеют химерный генотип, а мутации целевых генов в гомозиготном состоянии не обнаружены. В условиях закрытого грунта планируется получить потомство самоопыленных трансгенных растений с целью сегрегации вставки чужой ДНК и доведения мутаций в отредактированных генах до гомозиготного состояния.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ ПОДБОР СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ

Баженов М.С.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
E-mail: mikhabazhenov@gmail.com*

Клонирование и секвенирование отдельных генов пшеницы остается актуальным методом изучения её наследственного разнообразия, позволяющим находить новые ценные мутации, в том числе, получаемые современными методами генного редактирования.

Подбор праймеров для аллополиплоидных видов, таких как пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.), осложняется сходством нуклеотидных последовательностей их субгеномов. Традиционно, подбор праймеров для клонирования генов аллополиплоидов осуществляется вручную, путем поиска и выравнивания последовательностей всех гомеологов целевого гена и нахождения отличий между ними. Праймеры подбираются таким образом, чтобы их 3'-концы были комплементарны отличительным полиморфизмам. Однако лишь относительно недавно появились программные средства, позволяющие осуществлять автоматический подбор субгеном-специфичных праймеров для генов пшеницы, такие как AutoCloner (www.autoclone.com) [1].

Мы предлагаем альтернативный алгоритм подбора субгеном-специфичных праймеров для пшеницы мягкой, основанный на Primer3 (www.primer3.org) [2], и аннотированном геноме пшеницы IWGSC RefSeq1.0 [3]. Алгоритм автоматически выполняет следующие действия:

- по идентификатору целевого гена (к примеру, TraesCS2A02G500400) находятся идентификаторы его гомеологов (из базы аннотированных групп гомеологов);
- находится информация о положении этих генов в геноме, производится вырезание их последовательностей по координатам;

- на последовательность целевого гена накладывается «маска» в соответствии с аннотацией повторяющихся элементов генома, во избежание подбора комплементарных им праймеров;

- в последовательности целевого гена проводится поиск коротких tandemных повторов, чтобы исключить возможность подбора комплементарных им праймеров;

- на вход Primer3 подается последовательность целевого гена, а также последовательности генов-гомеологов, к которым подбираемые праймеры не должны быть комплементарны (через параметр PRIMER_MISPRIMING_LIBRARY), проводится поиск пар праймеров, дающих ПЦР-продукты размерами от 500 до 2000 (или более при необходимости) пар оснований ко всем возможным регионам целевого гена с интервалами в 100 пар оснований;

- из общего набора полученных пар праймеров производится выбор наименьшего набора пар, перекрывающих ампликонами целевую последовательность полностью, со взаимным перекрытием не менее 50 пар оснований и минимальной суммарной длиной всех ампликонов.

Амплификация генов по фрагментам, размер которых не превышает 2000 пар оснований сокращает время, требуемое для протекания полимеразной цепной реакции (меньшее время элонгации), и повышает вероятность получения результата без необходимости длительного этапа оптимизации условий реакции.

Полученные с помощью нашего алгоритма праймеры были использованы для ПЦР-амплификации и последующего секвенирования ряда генов пшеницы, в том числе гена глутаминсинтетазы GS2-2A (TraesCS2A02G500400) [4], гена транспортера аммония AMT-2B (TraesCS2B02G383600) (рисунок) и многих других генов. Успешность получения ампликонов с использованием праймеров, подобранных описанным методом, составила в среднем 64% для 66 пар праймеров, подобранных для 12 генов.

Список литературы:

1. Coulton, A.; Edwards, K.J. AutoCloner: Automatic Homologue-Specific Primer Design for Full-Gene Cloning in Polyploids. BMC Bioinformatics 2020, 21, 311, doi:10.1186/s12859-020-03601-7.
2. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—New Capabilities and Interfaces. Nucleic Acids Research 2012, 40, e115–e115, doi:10.1093/nar/gks596.
3. Alaux, M.; Rogers, J.; Letellier, T.; Flores, R.; Alfama, F.; Pommier, C.; Mohellibi, N.; Durand, S.; Kimmel, E.; Michotey, C.; et al. Linking the International Wheat Genome Sequencing Consortium Bread Wheat Reference Genome Sequence to Wheat Genetic and Phenomic Data. Genome Biology 2018, 19, doi:10.1186/s13059-018-1491-4.
4. Bazhenov, M.S.; Bessalova, L.A.; Kocheshkova, A.A.; Chernook, A.G.; Puzyrnaya, O.Y.; Agaeva, E.V.; Nikitina, E.A.; Igonin, V.N.; Bazhenova, S.S.; Vertikova, E.A.; et al. The Association of Grain Yield and Agronomical Traits with Genes of Plant Height, Photoperiod Sensitivity and Plastid Glutamine Synthetase in Winter Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Collection. International Journal of Molecular Sciences 2022, 23, 11402, doi:10.3390/ijms231911402.

МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФАЙЛИНГ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ЗАГРЯЗНЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС ТЕРРИТОРИЯХ.

Битаршвили С.В., Волкова П.Ю., Шестерикова Е.М., Подлущий М.С.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и
агроэкологии», 249032, Киевское шоссе, 109 км, г. Обнинск, Калужская обл., Россия.
E-mail: bitarishvili.s@gmail.com***

Загрязнение долгоживущими радионуклидами пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС территорий до сих пор остается серьезной экологической проблемой. Обитающие на этих территориях природные популяции растений уникальны для изучения экологических последствий хронического облучения и механизмов адаптации к ионизирующему излучению.

Адаптация растений к изменяющимся условиям окружающей среды приводит к перестройке метаболических путей, направленных на минимизацию негативного воздействия. Метаболомика позволяет выявить ключевые изменяющиеся метаболиты и метаболические пути, вовлеченные в ответ на воздействие.

Для выявления биохимических маркеров адаптации к долгосрочному хроническому облучению был выполнен метаболомный профайлинг дикорастущих травянистых растений из Чернобыльской зоны отчуждения.

Исследования проводили на двух видах хозяйственно ценных травянистых растений – горошке мышином (*Vicia cracca*) и клевере ползучем (*Trifolium repens*), принадлежащих к семейству Бобовые. Пробоотбор был проведен в июне 2021 года на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника в Гомельской области Республики Беларусь, в 30-километровой зоне отчуждения. Растения отбирали с двух контрольных участков Ломыш и Бабчин с фоновым уровнем радиации и двух загрязненных – Масаны и Кулажин, характеризующимися высокими уровнями радиоактивного загрязнения (2-7 мкЗв/ч). На каждом участке был оценен ряд показателей: мощность амбиентной дозы, активность радионуклидов в почве, концентрации обменных форм широкого спектра тяжёлых металлов, фиксировались погодные условия, чтобы исключить влияние иных факторов, помимо радиационного. Растения фиксировали в жидком азоте и впоследствии лиофилизировали. Метаболомный анализ был проведен при помощи метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Agilent 7890A с масс-спектрометрическим модулем Agilent 5975C. Разделение метаболитов осуществлялось на капиллярной колонке Rxi-5SilMS, Restek. Обработка данных ГХ-МС анализа проведена с помощью программы AMDIS 32, первичная статистическая обработка – в программе Multiple Experiment Viewer. Значимые отличия в выборках оценивали, используя критерий Краскела-Уоллиса. Для выявления релевантных метаболических путей использовали базу данных Plant Metabolic Network.

Для каждого растения было получено около 1250 метаболитов, из них около 950 были идентифицированы. После статистической обработки для дальнейшего анализа оставляли метаболиты, которые значимо отличались от обеих контролей. Так, для растений горошка мышиного было выявлено 15 значимых метаболитов, для клевера ползучего – 11 значимых метаболитов.

В результате метаболомного анализа показано, что у растений с загрязненных радионуклидами участков повышено содержание сахаров, которые входят в состав важнейших полисахаридов и гликопротеидов клеточной стенки и участвуют в защите клеток от АФК и посттрансляционной модификации белков.

Выявлено снижение мио-инозитола и его производных галактинола и олигосахаридов семейства рафиноз, указывающее на структурные изменения клеточной стенки и изменения работы мембранных каналов.

У растений горошка мышиного выявлены изменения в работе шикиматного пути, важнейшего метаболического пути растений, который берет на себя около 30% зафиксированного при фотосинтезе углерода. Перераспределение углерода в растениях, подвергшихся хроническому облучению, направлено на биосинтез метаболитов с антиоксидантной активностью и метаболитов, образующих полимеры клеточной стенки.

Показаны изменения в работе цикла Кребса у горошка мышиного, направленные на стабилизацию окислительно-восстановительных реакций в клетке и оптимизацию метаболических путей.

Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов адаптации растений к длительным антропогенным воздействиям и задают направление для дальнейшего более детального изучения процессов, вовлеченных в ответ на хроническое облучение.

Исследование проведено при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-74-10004 «Адаптивные реакции травянистых растений на ионизирующее излучение: в поиске кандидатных молекул устойчивости к абиотическим стрессорам».

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ НЕАННОТИРОВАННЫХ ГЕНОВ В РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ ЗЕРНОВКЕ ТРИТИКАЛЕ

А.А. Болотина^{1,2}, Е.С. Полховская¹, М.В. Дудников^{1,2}, И.В. Киров^{1,2}

**¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва, Россия**

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

*** e-mail: boloti.anya@yandex.ru**

Тритикале (*×Triticosecale* Wittm.) в основном является кормовой культурой, однако она обладает не только высокими потенциальными возможностями урожайности, но и повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды [1]. Поэтому изучение принципов и закономерностей регуляции биологических процессов тритикале имеет высокий потенциал для производства и селекции растений. Тритикале имеет огромный геном (24 Gb), большая часть которого состоит из неизвестных генов, таких как, например, некодирующие РНК (нРНК). Известно, что у растений длинные некодирующие РНК (днРНК) регулируют важные процессы в развитии и реакции растений на стресс [2-3]. К настоящему моменту днРНК малоизучены в отношении тритикале.

В нашем исследовании было проведено прямое нанопоровое секвенирование РНК зерновки тритикале на 10-ый день после цветения для обнаружения днРНК, которые специфически экспрессируются на ранних стадиях развития зерновки. Было идентифицировано 796 днРНК тритикале, кодируемые 780 локусами в субгеномах А (167 днРНК), В (212 днРНК) и R (410 днРНК), причем большинство из них ранее не были аннотированы. Произведенный поиск днРНК, показал, что паттерн экспрессии идентифицированных днРНК является тканеспецифичным, причём почти половина днРНК демонстрирует максимальный уровень экспрессии во время развития зерновки. Для дальнейшего анализа были взяты 16 днРНК субгеномов А и В, которые потенциально могли выполнять специфическую роль в регуляции развития зерновки и изучен полиморфизм их генов в коллекции тритикале. Анализ структурных вариаций генов днРНК среди сортообразцов коллекции яровой тритикале выявил инсерции и делеции для 50% генов днРНК у 23 образцов коллекции тритикале. Среди проанализированных генотипов линия С95 является наиболее вариабельной, ввиду наличия 6 нереперенсных аллелей.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ FGUM-2022-0005)

Список литературы:

1. Чумикина Л. В. и др. Особенности создания зерновой культуры тритикале и возможности ее применения //Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2008. – №. 5-6. – С. 12-16.
2. Xuan H. et al. PLNlncRbase: a resource for experimentally identified lncRNAs in plants //Gene. – 2015. – Т. 573. – №. 2. – С. 328-332.

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОСПОР ЗЛАКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФЛОТИРУЮЩЕЙ КУЛЬТУРЫ

Блинов А.О.¹, Алкубеси М.^{1,2}, Крупина А.Ю.¹, Козарь Е.В.³, Дивашук М.Г.¹

**1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, 127550**

E-mail: aoblinkov@gmail.com

**2 – ФГБОУ ВО Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им.
К.А. Тимирязева, Москва, 127550**

3 – ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», ВНИИССОК, 143080

В селекционном процессе культурных злаков особый интерес представляет технология получения удвоенных гаплоидов, поскольку с её помощью становится возможным быстрое получение рекомбинантных инбредных линий для последующего изучения на пригодность использования их как сорта. Однако, ряд факторов, таких как генотипзависимость, слабая отзывчивость микроспор к делению, альбинизм и трудности в полиплоидизации полученных растений являются ограничивающими в рутинном использовании данной технологии.

Флотирующая культура пыльников является одним из методов получения андрогенных гаплоидных растений. Данный метод заключается в культивировании пыльников на жидкой питательной среде, на которой происходит растрескивание пылевых мешков и выход микроспор в среду. Данная технология показывает свою высокую эффективность у ряда культур, поскольку микроспоры, вышедшие таким путём, не подвергаются стрессовому механическому воздействию и имеют хорошее питание. Однако, без корректировки метода для той или иной культуры, данная технология может иметь и ряд недостатков, проявляющихся в формировании большого количества каллуса с отсутствующей регенерацией, высоком уровне альбинизма, витрификации делящихся клеток, а также анатомически неверном росте зародыша. В связи с этим целью данной работы является изучение факторов, влияющих на морфогенетический потенциал микроспор во флотирующей культуре пыльников тритикале.

В работе использовали различные генотипы яровой и озимой тритикале, выращенных как в тепличных, так и в полевых условиях. Колосья инкубировали 2 недели при +4°C в качестве стрессовой предобработки. Пыльники, содержащие главным образом одноядерные вакуолизированные микроспоры, культивировали в темноте при +28°C на различных иницирующих питательных средах. Сформировавшийся каллус и зародыши переносили на среду для регенерации.

В качестве иницирующей питательной среды большую эффективность продемонстрировала неагаризованная 190-2, дополненная 63 г/л мальтозы и без добавления регуляторов роста. Данный состав предоставлял условия для массового и дружного митотического деления микроспор с последующим формированием большого количества каллуса и зародышей. В качестве среды для регенерации использовали среду 190-2 с добавлением 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л кинетина, на которой сформировавшиеся в иницирующей среде зародыши продолжали рост по пути прямого эмбриогенеза, а из полученного каллуса наблюдался органогенез побегов.

Микроскопический анализ показал, что у пыльников на 4-5 день происходит растрескивание пылевых мешков, сами микроспоры выходят из них на 7-8 сутки с начала культивирования. В целом, практически все пылевые мешки оказывались пустые

после первой недели культивирования. Микроспоры в большинстве случаев развивались по пути прямого эмбриогенеза, таким образом, что в конечном счёте зародыш флотировал на поверхности среды щитком вниз. При длительном культивировании на первоначальной среде щиток зародыша обрастал каллусом, что подтвердилось результатами сканирующей электронной микроскопии. Такие зародыши хуже регенерировали и имели трудности с укоренением. В связи с этим, важным этапом была пересадка зародышей с иницирующей среды на регенерационную, когда зародыш достигал размеров 1 мм и имел чётко выраженный колеоптиль.

Огромное значение на эффективность флотирующей культуры оказывала плотность культивируемых пыльников. Показано, что использование 20 пыльников на 10 мл питательной среды является оптимальным по сравнению с культивированием 10, 40 и 60 пыльников на 10 мл среды. При использовании высокой плотности пыльников, микроспоры развивались по пути каллусогенеза или формировали мелкие слабо дифференцированные зародыши с плохой регенерационной способностью, часто альбиносы.

У растений, имевших трудности с формированием корней, удавалось индуцировать корнеобразование за счёт их культивирования на среде, дополненной 1 мг/л НУК.

Результаты проточной цитометрии показали, что регенерировавшие растения были гаплоидны, реже происходило спонтанное удвоение хромосом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-16-00121.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ КАРТОФЕЛЯ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

Чернова М. М.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева» ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Москва 117434 E-mail:info@rgau-msha.ru

Микроклональное размножение — метод, основанный на размножении растений *in vitro* (технология выполнения экспериментов, когда опыты проводятся «в пробирке» — вне живого организма) [1], при котором полученные особи растений генетически идентичны исходному экземпляру [2]. У этого метода есть ряд преимуществ, которые выделяют его, это например: «чистота» организмов от вирусов, сокращение продолжительности селекционного процесса, возможность размножения растений, которые сложно размножить традиционными путями, искусственное ускорение роста растений [3]. Одним из первых этапов является выбор растения донора и введение его в культуру *in vitro* [4]. Сельскому хозяйству необходимо много безвирусного картофеля, а микроклональное размножение картофеля быстрее, чем использование традиционных методов сельского хозяйства.

Поскольку традиционная селекция является длительным процессом, все большую популярность обретают биотехнологические методы, позволяющие целенаправленно вмешиваться в геном растения [5]. Технология редактирования генома CRISPR/Cas9 в самом простом применении позволяет целенаправленно создать мутации во всех аллелях конкретного гена у тетраплоидного картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и придать сорту новые полезные признаки [6]. Источниками получения протопластов служат изолированные органы растений и их части (листья, семядоли, корни, гипокотили, лепестки, пыльцевые зерна), суспензионные культуры и каллусная ткань. В клетках разных типов тканей в зависимости от функциональных особенностей, возраста, наличия

вторичных утолщений соотношения различных компонентов клеточной стенки (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектиновые вещества, белки) могут варьировать[4].

Протопласты – одни из наиболее ценных объектов в биотехнологии. Несомненным преимуществом протопластов является удобство их использования в качестве модели для изучения транспорта различных веществ и ионов через плазмалемму, электрических свойств мембраны и воздействия на нее физических и химических факторов. Современный метод выделения протопластов заключается в удалении клеточной стенки с помощью ферментов, ее разрушающих (целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы). Этот метод получил название ферментативного [4].

Для проведения работы были отобраны сорта картофеля : «Аврора», «Кумач», «Гала», «Балтик роуз», «Варяг» и «Северное сияние». Все сорта картофеля были проверены на вирусы. Весь картофель оказался безвирусным. Для введения проверенных образцов в культуру *in vitro* была приготовлена среда Мурасиге-Скуга (МС). Стерилизацию верхушечного побега растений проводили с помощью следующих этапов:

1. Погружали верхушки растений на 5 секунд в 70% этанол,
2. Погружали на 20 минут в 7,5% раствор Domestos,
3. 5 мин в растворе Мирамистина,
4. Три раза промывали стерильной дистиллированной водой.

После стерилизации растения были посажены в контейнеры со средой МС. В результате, спустя две недели, 4 из 6 сортов: «Аврора», «Кумач», «Гала» и «Северное сияние» укоренились, два сорта заросли предположительно бактериями, поэтому сорта «Балтик роуз» и «Варяг» были повторно стерилизованы и посажены в контейнеры с новой средой. Спустя месяц, все укоренившиеся образцы картофеля были прочеренкованы по пробиркам со средой МС.

После этого мы занялись выделением протопластов. Это проходило в два этапа: преплазмолиз и ферментация. Преплазмолиз: Повреждали поверхностный слой молодых листьев картофеля и выдерживали в растворе 0,5М сорбитола в течении 1-2 часов. Ферментация : Приготовили ферментный раствор, стерилизовали через вакуумный фильтр; Поврежденные листья оставили в ферментном растворе на сутки в темноте при комнатной температуре. После чего выделяли протопласты, для этого центрифугировали и ресуспензировали с разными растворами.

В результате проведения эксперимента у нас выделились протопласты .

Таким образом, мы проверили картофель сортов «Аврора», «Кумач», «Гала», «Балтик роуз», «Варяг» и «Северное сияние» на вирусы X-, Y-, M-, S- и ВСЛК и убедились, что образцы не заражены данными вирусами, а затем успешно ввели все образцы этих сортов картофеля в культуру *in vitro*.

Из образцов картофеля выделили протопласты для дальнейшего использования этих образцов для геномного редактирования.

Список литературы:

1. *In vitro*. Википедия — свободная энциклопедия [Электронный ресурс] URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/In_vitro (дата обращения 05.08.2020)
2. Широков А. И., Крюков Л. А. Основы биотехнологии растений //Электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет. – 2012. – Т. 49.
3. Тимофеева О. А., Невмержицкая Ю. Ю. Клональное микроразмножение растений: Учебно-методическое пособие //Казань: Казанский университет. – 2012. – С. 56.
4. Дитченко Т. И. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций. – 2007.
5. Menz J. et al. Genome edited crops touch the market: a view on the global development and regulatory environment //Frontiers in plant science. – 2020. – С. 1525.
6. Andersson M. et al., (2016). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Reports, V. 36, № 1, pp 117–128.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КАЛЛУСОГЕНЕЗА У ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ *ALTERNANTHERA LILACINA* И *HYGROPHILA PINNATIFIDA*

Дмитриева А.Р.¹, Корнеева А.А.¹, Кирюшина А.С.¹, Алфёров А.П.¹,
Середа П.А.¹, Соловьев А.А.², Гарибян Ц.С.²

1 – ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет - МСХА имени
К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127550,

2 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», ул. Тимирязевская 42, Москва, 127550,
E-mail: anrelova.ann@gmail.com

Водные растения – важные живые организмы в водной среде, которые поддерживают уровень кислорода, органического вещества, а также среду для питания и размножения других водных организмов. В настоящее время водные растения приобретают всё большую популярность при декорировании аквариумов и водных садов [1]. Для производства и увеличения разнообразия посадочного материала декоративных культур, включая аквариумные растения, используются биотехнологические методы на основе культур *in vitro* [2]. Основным фактором, регулирующим процесс каллусогенеза и образования соматического эмбриогенеза растений из каллусной ткани, является присутствие в составе питательной среды регуляторов роста (фитогормонов) с цитокининовой и ауксиновой активностью [3]

Целью работы являлось оптимизация концентраций фитогормонов для индукции каллусогенеза у *Alternanthera lilacina* и *Hygrophila pinnatifida* в условиях *in vitro*.

В качестве объектов исследования использовали стерильные растения *Alternanthera lilacina* и *Hygrophila pinnatifida*. Для установления оптимальных условий, способствующих каллусогенезу, использовали листовые пластины 4-х недельных растений. Культивирование растений проводили в условиях *in vitro* методом микрочеренкования на питательных средах MS (Murashige, 1966) и ½ MS (с добавлением всех компонентов питательной среды MS на 50%, кроме сахарозы и агар-агара) при температуре 20±2°C и фотопериоде 16/8 часов. Средой для индукции каллусогенеза послужила база MS, с добавлением различных фитогормонов разных концентраций, мг/л: 2,4-Д (0,5-4,0), 6-БАП (0,5-2,0), НУК (0,5-1,0), ИМК (0,1), Кинетин (0,8).

На основе полученных экспериментальных данных выявлено, что оптимальной питательной средой для индукции каллусогенеза у *Alternanthera lilacina* является среда MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л 2,4-Д, где коэффициент каллусогенеза (КК) составил 100%, а для *Hygrophila pinnatifida* - среда MS с добавлением 2,0 мг/л 6-БАП и 1,0 мг/л НУК, КК=98%.

Список литературы:

1. In vitro high frequency regeneration through apical shoot proliferation of *Hemianthus callitrichoides* “Cuba” – a multipurpose ornamental aquatic plant /Surenda Barpete [and others] // Turkish Journal of Biology. – 2015. – 39: 493-500.
2. Константинов А. В., Карунос А. С., Грищенко И. В. Микроклональное размножение декоративных водных растений семейств *Amaranthaceae* Juss. и *Acanthaceae* Juss. для аквариумов // Сборник материалов 2-й международной научно-практической конференции Полесский государственный университет. – 2017. – С.22 –24.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. М.:ФБК-ПРЕСС, 1999, - 160 с.

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА MD-PG1, ДЕТЕРМИНИРУЮЩЕГО ПРИЗНАКИ КАЧЕСТВА ПЛОДОВ У ГИБРИДНЫХ СЕМЕЙ ЯБЛОНИ

Должикова М.А., Павленко А.А.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский
научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, Орловская
область, п/о Жулина, 302530 Россия
E-mail: dolzhikova@vniispk.ru*

Яблоня является одной из ведущих плодовых культур, в связи с чем имеет широкое распространение и высокий удельный вес в садовых насаждениях России. В производственных целях особое значение уделяется расширению периода реализации и внешнему виду плодов [4]. Способность плодов сохранять товарность и потребительские качества в течении определенного периода определяет их лежкость. Лежкоспособность – генетический признак. Генотипы яблони, которые проявляют способность к длительному хранению и хорошей транспортировке, активно вовлекаются в селекцию, и полезны как для МОС с последующим созданием новых конкурентоспособных сортов, так и для питомниководческих хозяйств с экономической точки зрения [5].

У яблони в процессе хранения плодов под влиянием этилена на активность ферментных систем происходит ферментативное разрушение клеточных стенок и ламеллярного слоя в плодах. Один из этих ферментов – полигалактуроназа вовлечен в процесс деградации пектина, который приводит к размягчению богатых пектином слоев ткани плодов [1].

Главный локус количественного признака *Md-PG1* яблони детерминирует активность этилен-зависимой эндополигалактуроназы и влияет на процесс размягчения мякоти плодов при хранении. Для гена *Md-PG1* в настоящее время идентифицированы функциональные ДНК маркеры – SSR-локусы, косегрегирующие с данными генами [2].

Выделение ДНК проводилось из высушенных молодых листьев СТАВ методом (Diversity Arrays Technology P/L (DArT) (www.DiversityArrays.com)). ПЦР проводили по методике, описанной у Longhi [3], с использованием праймеров к микросателлитному локусу *MdPG1ssr10kd*. Амплификация фрагментов проводилась в следующем профиле программы: предварительная денатурация 5 мин при 95 °C; следующие 30 циклов (отжиг праймеров): 30 с при 58 °C; элонгация ДНК 30 с при 72 °C и завершающая элонгация 10 мин при 72 °C.

Для электрофоретического анализа амплифицированных фрагментов использовался 8% полиакриламидный (ПААГ) гель.

В ходе исследований было проанализировано 83 образца из 3 гибридных семей: 6395 (Имрус × Пепин Орловский), 6396 (Имрус × Свежесть), 6397 (Имрус × 31-5-42).

Присутствие комбинаций аллелей с разной длиной SSR повтора локуса *Md-pg10kd* связывают с показателями плотности мякоти плода при хранении. Сочетание аллелей 310:319 и 313:319 соответствует среднему уровню активности, этилен-зависимой полигалактуроназы и соответственно среднему уровню показателей качества мякоти, наилучшее сочетание аллелей при котором аллель 319 п.н. отсутствует, оно теоретически обуславливает наилучшее качество мякоти и его наименьшее снижение при хранении, наличие аллеля 319 в гомозиготе нежелательно – оно ассоциировано с наиболее рыхлой мякотью. Таким образом, можно выделить три типа комбинаций аллелей в данном локусе:

1. Нежелательная (худшие показатели плотности мякоти) – аллель 319 в гомозиготе.
2. Наилучшие показатели по плотности мякоти обуславливает сочетание аллелей при котором аллель 319 п.н. отсутствует: это 310, 313, 310/313.

3. Средние показатели качества мякоти обуславливают сочетания аллелей с нежелательным аллелем 319 в гетерозиготе: 310:319 и 313:319.

В гибридной семье 6395 (Имрус × Пепин Орловский) с наилучшим сочетанием аллелей выделено 3 гибрида: 11/101 (310/313), 11/102 (310), 11/104 (310). В гибридной семье 6396 (Имрус × Свежесть) выделено 8 гибридов из 20 проанализированных с желательным сочетанием аллелей: 11/108 (310/313), 11/109 (310/313), 11/111 (310/313), 11/113 (310/313), 11/118 (310), 11/119 (310), 11/120 (310), 11/121 (310). В гибридной семье 6397 (Имрус × 31-5-42) 13 сортообразцов было выявлено с аллелью 310: 11/127, 11/128, 11/130, 11/132, 11/135, 11/141, 11/153, 11/169, 11/171, 11/173, 11/176, 11/179, 11/191. Два сортообразца с сочетанием 310/313: 11/140, 11/190.

Как итог были идентифицированы гибриды, несущие аллели гена *Md-PG1*. Данные гибриды могут быть использованы в селекционном процессе.

Применение ДНК-маркеров в селекции для идентификации аллелей целевых генов имеет важное значение, так как появляется возможность идентификации гибридов, несущих аллельный набор, детерминирующий высокие показатели качества плодов, до вступления гибридных форм в плодоношение. Таким образом, появляется возможность провести отбор и выбраковку семян с «нежелательными» аллелями уже на первом году жизни семян, что позволяет существенно сократить объем селекционного материала и повысить экономическую эффективность селекции.

Список литературы:

1. Busatto N. et al. Target metabolite and gene transcription profiling during the development of superficial scald in apple (*Malus × domestica* Borkh) BMC plant biology. 2014. V. 14. №. 1. 1-13.
2. Costa, F. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylenedependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.) F. Costa, C.P. Peace, S. Stella [et al.] // J Expt Bot. 2010. № 61 P. 3029–3039.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erq130>
3. Longhi, S.A. candidate gene based approach validates *Md-PG1* as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus domestica* Borkh.) S. Longhi, M.T. Hamblin, L. Trainotti [et al.] // BMC Plant Biol. 2013. №13. P. 37.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-37>
4. Седов Е. Н., Корнеева С. А., Янчук Т. В. Роль отечественной селекции в совершенствовании сортимента яблони в России Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2021. №. 4. С. 17-19.
5. Супрун И. И., Токмаков С. В. Изучение аллельного разнообразия генов синтеза этилена *Md-ACS1* и *Md-ACO1* в отечественной генплазме яблони Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 17. №. 2. С. 298-302.

ВОДНЫЙ РЕЖИМ ПШЕНИЦ С РАЗЛИЧНЫМ ГЕНОМНЫМ СОСТАВОМ И УРОВНЕМ ПЛОИДНОСТИ

Ермошин А.А., Рукавишников Д.С., Киселёва И.С.

**ФГАОУ ВО Уральский федеральный университет, Екатеринбург, 620002
*Alexander.Ermoshin@urfu.ru***

Пшеница является основной сельскохозяйственной культурой в мире. Увеличивающееся население Земли нуждается в увеличении производства сельскохозяйственной продукции, поэтому актуальной задачей является создание новых сортов, отличающихся повышенной продуктивностью, скороспелостью и устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды.

Род *Triticum* включается в себя, по оценкам разных авторов, порядка 20 видов. Часть из них культивируется в настоящее время, часть культивировалась человечеством ранее, а часть только начинает внедряться в практику сельского хозяйства. Дикие сородичи пшеницы, виды и сорта, вышедшие из широкого употребления, могут являться донорами полезных признаков для современных селекционных форм.

Особенностью пшениц является то, что они являются аллоплоидами, отличающимися уровнем пloidности и геномным составом. Проведены значительные исследования по влиянию геномного состава пшениц на их сельскохозяйственную продуктивность, содержание и качество белка. Имеются работы, показывающие связь пloidности и геномного состава с интенсивностью фотосинтеза и организацией фототрофных тканей, однако практически не изучена взаимосвязь геномного состава и уровня пloidности с показателями водного режима растений.

Обеспеченность растений водой является одним из факторов, лимитирующих сельскохозяйственную продуктивность, поэтому изучение параметров водного режима важно для поиска форм с максимальной продуктивностью.

Цель нашей работы – изучить показатели водного режима у растений пшеницы, отличающихся друг от друга геномным составом и уровнем пloidности.

Работа выполнена на биостанции УрФУ (Свердловская обл., г. Дзуреченск) в 2021 и 2022 годах. В работе использовали семенной материал, полученный из коллекции Всероссийского института растениеводства. Всего в работе использовали 51 образец, относящиеся к 16 видам пшеницы. Растения культивировали мелкоделяночным способом. В фазе колошения были отобраны предфлаговые листья, на которых были определены интенсивность транспирации, а также показатели водного обмена – водоемкость, водообеспеченность и водный дефицит. Все растения были обильно политы за 12 часов до эксперимента.

Исследованные образцы обладали значительными отличиями в интенсивности транспирации: от 260 (у *T. polonicum*) до 600 (*T. melitinae*) мг/г сырой массы в час. Различия в водоемкости были не столь существенны – разброс составлял от 78 до 84% от массы листа. Обеспеченность растений водой, в отличие от водоемкости, были существеннее – от 84% (у *T. melitinae*) до 98% (у *T. polonicum*). Таким образом, можно заметить, что растения с наибольшей интенсивностью транспирации испытывают наибольший недостаток воды, тогда как растения с низкой интенсивностью практически полностью обеспечены водой, хотя исследованные образцы получали одинаковое количество почвенной влаги.

Известно, что полиплоидные растения обладают в среднем большим числом устьиц и большим размером устьичной щели на единицу площади листа, поэтому мы предположили, что увеличение пloidности приведет к росту интенсивности транспирации и снижению обеспеченности растений водой. Однако увеличение пloidности, произошедшее при окультуривании пшениц, привело к обратному эффекту – снижению интенсивности транспирации – с 523 (у диплоидных видов) до 377 (у гексаплоидных видов) мг/г сырой массы в час. При этом значительных изменений в водоемкости (80 – 82%) и водообеспеченности (92 – 94%) не наблюдалось.

Сравнение образцов, отличавшихся геномным составом, показало, что добавление генома D не повлияло на интенсивность транспирации и водообеспеченность растений – растения с геномным составом A^uB имели уровень транспирации 364±32 мг/г сырой массы в час, тогда как с геномом A^uBD 370±24 мг/г*ч.

Был проведен линейный дискриминантный анализ, показано, что параметры водного обмена растения способны надежно дискриминировать растения по показателям пloidности и геномного состава. Показано, что группа диплоидных пшениц достоверно обособляется от группы гексаплоидных, а область тетраплоидных видов занимает промежуточное положение и пересекается с двумя другими группами. При сравнении геномных составов обращает на себя внимание резкое обособление видов с геномом A^bG.

Это согласуется с полученными нами ранее данными по особенностям анатомии листа и интенсивности фотосинтеза различных видов пшениц, а также с результатами сравнения фракционного состава белка зерна различных видов пшеницы.

Полученные результаты могут быть использованы в поиске доноров генетического материала для селекции пшеницы и для углубления понимания эволюции культурных видов пшеницы.

ПОДХОДЫ К "DNA-FREE" ГЕНОМНОМУ РЕДАКТИРОВАНИЮ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЁРЕН ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM CEPA* L.)

Ермолаев А.С.^{1,2}, Мардини М.¹, Пивоваров А.М.^{1,2}, Хрусталева Л.И.^{1,2}

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550; ermol-2012@yandex.r;

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К. А. Тимирязева», г. Москва 127434; ermol-2012@yandex.ru

Открытие системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 создает новые возможности в получении сортов растений с заданными свойствами. Генетическое редактирование имеет огромный потенциал для эффективного создания новых сортов растений с заданными свойствами с минимальными затратами времени. Прямое редактирование пыльцевых зерен без использования ДНК-плазмиды, а лишь только с использованием белка Cas9 представляет из себя привлекательную возможность для создания генетически отредактированных организмов (ГРО), которые, возможно, будут восприниматься потребителями охотнее, чем ГМО, поскольку при их создании не используется чужеродная ДНК. Кроме этого, такой подход также является менее ресурсозатратным поскольку позволяет избежать этапа регенерации новых растений из отредактированных тканей и сразу получить жизнеспособные отредактированные семена со зрелым зародышем.

Попытки получить отредактированные пыльцевые зерна осуществлялись ранее (Zhang *et al.*, 2019; Nagahara *et al.*, 2021). Однако, несмотря на работы, показывающие успешное редактирование с высокой эффективностью, другие авторы сообщали, что им не удается воспроизвести результаты, полученные в этих работах (Vejlupkova *et al.*, 2020). Кроме того, все работы для получения события редактирования использовали плазмиду, содержащую ген нуклеазы Cas9 и гидовой РНК (sgRNA), а не уже собранный RNP (Ribonucleoprotein), состоящий из белка Cas9 и sgRNA, а значит не являлись "DNA-free".

Для разработки "DNA-free" системы геномного редактирования в нашей работе был выбран ген LFS (Lachrimatory Factor Synthase, синтаза фактора слезотечения). Это короткий (510 bp) безинтронный однолокусный ген, орфанный для видов рода *Allium*, который участвует в пути биосинтеза летучих серосодержащих веществ. Нокаут этого гена даст хорошо идентифицируемый фенотип - потеря луком способности вызывать слезотечение при разрезании.

На последовательность ORF (Open Reading Frame) гена LFS (GenBank: AB089203.1) были разработаны sgRNA. Для возможности быстро проверять наличие или отсутствие события редактирования для дальнейшей работы были отобраны те sgRNA, сайт редактирования которых находился внутри сайта рестрикции. Для возможности проверки события редактирования без выделения геномной ДНК из пыльцевых зерен, была оптимизирована прямая ПЦР на пыльце. Функциональная активность разработанных sgRNA была проверена и подтверждена *in vitro* на ПЦР-продукте гена LFS. Для

дальнейшей работы была отобрана sgRNA, которая показала полное разрезание ПЦР-продукта гена LFS.

Нами были применены три различных способа трансфекции RNP в пыльцевое зерно: магнитофекция, оптопорация и естественное поглощение (natural uptake). Метод магнитофекции для доставки макромолекул (плазмид) в пыльцевые зерна был использован на хлопке (Zhang *et al.*, 2019). При магнитофекции магнитные наночастицы в стабильной суспензии используются в качестве вектора для переноса RNP внутрь пыльцевого зерна под действием постоянного магнитного поля. Принцип использованного нами метода лазерной оптопорации заключается в усилении энергии лазерного излучения плазмон-резонансными наночастицами, локализованными вблизи клеточных мембран, что приводит к увеличению проницаемости последних для целевых молекул (Schomaker *et al.*, 2015). Таким образом, наночастицы работают не как средство доставки, а как источник точечного сильного нагрева, перфорирующего клеточную мембрану, или в нашем случае оболочку пыльцевого зерна, что увеличивает вероятность диффузии экзогенных молекул внутрь клетки. При естественном поглощении не используются дополнительные факторы для прохождения RNP в пыльцевые зерна. Поглощение RNP происходит естественным путем при первичном набухании пыльцы вместе с потоком жидкости, входящим в пыльцевое зерно.

Cas9, который использовался в экспериментах, был слит с GFP, что должно было позволить детектировать прохождение его внутрь пыльцевого зерна, однако нам не удалось обнаружить флуоресценцию после обработки пыльцевых зерен. Для подтверждения того, что в пыльцевые зерна могут проходить макромолекулы, имеющие размер, сравнимый с белком Cas9, мы использовали плазмиду, содержащую ген белка GFP. После трансфекции пыльцевыми зернами плазмиды путем естественного поглощения, фиксировалась значительная флуоресценция по сравнению с необработанной пыльцой, что подтвердило возможность прохождения макромолекул внутрь пыльцевых зерен.

Пыльцевые зерна, подвергнутые обработкой RNP различными методами, были использованы в прямой ПЦР для получения ПЦР-продукта ORF гена LFS. Полученный ПЦР-продукт был секвенирован с помощью Illumina (Москва, Геномед) парными ридами по 150 bp. Частота инделов в области ± 10 bp вокруг предполагаемой точки разрезания (за 3 bp от PAM-сайта) была оценена по количеству ридов, содержащих инсерции или делеции длиной 1 bp или длиннее. Результаты оценки показали, что частота ридов с инделами из пыльцы после обработки RNP не отличается от пыльцы, которая не была подвергнута обработке и не превышает частоту ошибок секвенирования. Полученные результаты говорят о том, что ни один из способов доставки RNP в пыльцевые зерна ни привел к редактированию.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ проекта № 20-016-00065 А

Список литературы

1. Nagahara, S., Higashiyama, T., & Mizuta, Y. (2021). Detection of a biolistic delivery of fluorescent markers and CRISPR/Cas9 to the pollen tube. *Plant reproduction*, 34(3), 191-205.
2. Schomaker, M., Heinemann, D., Kalies, S., Willenbrock, S., Wagner, S., Nolte, I., ... & Heisterkamp, A. (2015). Characterization of nanoparticle mediated laser transfection by femtosecond laser pulses for applications in molecular medicine. *Journal of nanobiotechnology*, 13(1), 1-15.
3. Vejlupkova, Z., Warman, C., Sharma, R., Scheller, H. V., Mortimer, J. C., & Fowler, J. E. (2020). No evidence for transient transformation via pollen magnetofection in several monocot species. *Nature plants*, 6(11), 1323-1324.
4. Zhang, Baohong, ed. *Transgenic Cotton: Methods and Protocols*. Vol. 1902. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2019.

СОЗДАНИЕ СТРУКТУРЫ И ЛОГИКИ ЭЛЕКТРОННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ, АДАПТИРОВАННОЙ ПОД АВТОМАТИЧЕСКИЙ ПОДБОР ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПОСРЕДСТВОМ ИСКУССТВЕННОЙ НЕЙРОСЕТИ

Галанов А.Э.

***1 – «Лаборатория геномных исследований в растениеводстве» «Научно-исследовательского института сельского хозяйства Северного Зауралья» филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра Тюменского научного центра Северного отделения Российской академии наук, Тюмень 625501
E-mail: inhumainnihiliste@yandex.ru***

Научный мир начал понимать биологические принципы работы нервной деятельности еще с 1950-х годов, с тех пор человечество приобрело понимание того, что мозг – не клетка, но их совокупность – нейронная сеть, что в последующем переложилось математической моделью в искусственную нейросеть (ИНС), которая посредством обработки, анализа входящей (исходной) информации достигает заданного ее задачами результата. Как нужно построить структуру и логику обширных и комплексных баз данных (БД) генетического материала под эффективную автоматизированную работу ИНС по подбору параметров с возможностью получения желаемого результата в виде, например, создания нового сорта?

В основной своей массе, БД по хранению генетической и селекционной информации являются реляционными, то есть имеют табличный формат хранения данных, которые при этом связаны с другими БД кластерной системой в 2D проекции [2].

Суть заключается не только в систематизации самих данных, дифференцированных по различным локальным БД и использования их комплекса, важно – создать единое информационное поле, представленное в 3D проекции, ориентирующееся на известные методики, методические рекомендации, пособия, программы. Другими словами, взаимодействие внутри поля будет осуществляться по многофакторной зависимости [3]: не получится анализировать лишь родословную, к ней должна быть осуществлена привязка переменных в виде генов с учетом маркеров подбора по математико-статистической значимости при следовании правилам, требованиям и законам непосредственных генетико-селекционных методик.

Возникающие расхождения должны отражаться на «матричной доске» с фиксацией сумматора, величина которого не превысила пороговый уровень, для дальнейшего независимого обучения ИНС.

Данные БД не будут являться динамическими во времени и пространстве, не будут происходить процессы диффузии, транспонирования: статичные базы – более устойчивы и стабильны.

Зарегистрированные градации в изучаемых сочетаниях (возникновение набора параметров) по статистической значимости включаются в отдельный программный код, который занимается сопоставлением найденных решений с уже изученными схемами.

Важно создать такую структуру БД, логику и логику движения информации, чтобы ИНС легко передвигалась внутри единого поля, занималась подбором комплекса параметров с различными величинами с наименьшими затратами времени на данные операции. Здесь заключается проблема также используемого языка БД и СУБД. Способны ли их функциональные возможности гарантировать поиск всевозможных вариантов подбора? При помощи MySQL, PostgreSQL [1, 4] мы можем структурировать данные, а уже посредством сочетания языков БД и Python [5] в различных файловых форматах возможно достичь необходимый уровень обработки информации при должном обучении и учете не только непосредственных величин, но и математически обработанных,

значение которых меняется при осуществлении обучения. ИНС не только обучается, но и модифицирует индексы, которые становятся динамичными в ходе обучения.

Список литературы:

1. Мухин А.М., Генаев М.А., Рассказов Д.А., Лашин С.А., Афонников Д.А. Технология структурирования и обработки транскриптомных данных на основе гибридного использования RDBMS и NoSQL подходов // Математическая биология и биоинформатика. 2020. Т. 15. № 2. С. 455-470. DOI 10.17537/2020.15.455.
2. Абдуллаев Ф.Х. Документирование генетических ресурсов растений: теоретические основы и методология / Приоритетные направления развития современной науки молодых ученых аграриев. Астрахань: Прикаспийский научно-исследовательский институт аридного земледелия. 2016. С. 401-405.
3. Боронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов // Аграрный вестник Урала. 2009. № 2 (56). С. 57-59.
4. Petkovic D. JSON Integration in Relational Database Systems // International Journal of Computer Applications. 2017. No 168 (5). P. 14-19. DOI 10.5120/ijca2017914389.
5. SQLAlchemy. The Database Toolkit for Python.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА ГОРОХА

Игнатьева И.М., Словарева О.Ю.

***Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), Московская обл., г.о. Раменский, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32, 140105
E-mail: babiraignirmi@ya.ru***

Горох является одной из ведущих экспортных культур России. В связи с его экспортной привлекательностью растут как посевные площади, так и урожайность гороха. Возбудитель бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) Young et al. (далее *P. syringae* pv. *pisi*) – угроза стабильному производству значимой продовольственной сельскохозяйственной культуры во всем мире. Фитопатоген включен в карантинный список ряда стран-импортеров из РФ (Бангладеш, Иран, Китай, Пакистан, Сирия, Турция). В современной мировой практике выявления *P. syringae* pv. *pisi* с помощью полимеразной цепной реакции (далее ПЦР) применяют только в качестве подтверждающего метода [1].

Целью настоящего исследования стало совершенствование ПЦР-теста, позволяющего проводить качественную диагностику *P. syringae* pv. *pisi* для дальнейшего его включения в качестве отборочного метода идентификации патогена из экстракта растительного материала зернобобовых культур в диагностических лабораториях сельскохозяйственного профиля.

На первом этапе исследования в лаборатории бактериологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» была проведена апробация специфичных праймеров AN 7F/7R и avrRps 4F/4R для *P. syringae* pv. *pisi* на основе классической ПЦР в соответствии с Qing Ch. et al., 2016 с использованием коммерческой смеси для амплификации «5X Screen Mix-HS» («Евроген», РФ) и коммерческой смеси для амплификации «5X MasDD MIX-2025» («Диалат», РФ) [2, 3]. Испытания проводили на амплификаторе «T 100 Thermal Cycler Bio-Rad» (Bio-Rad, США) с использованием штамма CFBP2105. После проведения гель-электрофореза, результаты интерпретировали с помощью программы «Image Lab».

В результате апробации двух пар праймеров подтверждена их видоспецифичность. Праймеры AN 7F/7R и avrRps 4F/4R амплифицируют изоляты *P. syringae* pv. *pisi*, продукты ПЦР имеют разную длину продукта (272 и 114 п.о.). В дальнейшем рекомендовано применять классическую ПЦР в соответствии с Qing Ch. et al., 2016 и с использованием любой протестированной коммерческой смеси для амплификации.

Использование различных интеркалирующих красителей (далее ИК), способных связываться с ДНК и при этом увеличивать квантовый выход флуоресценции, является довольно несложным и относительно дешевым способом проведения ПЦР в режиме «реального времени» (далее ПЦР-РВ) [4]. Подобная модификация может позволить проводить тест в лабораториях, не оборудованных зоной электрофореза, а также получать результаты в значительно более короткие сроки, чем при дополнительном проведении гель-электрофореза. На втором этапе исследования была проведена апробация специфичных праймеров AN 7F/7R и avrRps 4F/4R для *P. syringae* pv. *pisi* на основе ПЦР-РВ с использованием ИК «5X qPCRmix-HS SYBR» и условиями амплификации в соответствии с Baldwin (состав реакционной смеси унифицировали). Апробацию проводили на амплификаторе «ДТ-Прайм» (ДНК-технология, Россия).

Результаты апробации специфичных праймеров AN 7F/7R и avrRps 4F/4R для *P. syringae* pv. *pisi* на основе ПЦР-РВ с использованием ИК «5X qPCRmix-HS SYBR» («Евроген»), показали, что кривые плавления можно использовать для идентификации специфических продуктов амплификации со ссылкой на положительные реакции контроля ($\pm 1,5$ °C). Продукты ПЦР имеют разные температуры плавления ($86,5 \pm 1,5$ °C и $84,5 \pm 1,5$ °C соответственно). Главным недостатком использования всех ИК является способность связываться с любой двуцепочечной ДНК, появляющейся в реакционной смеси, которая может быть, как целевым продуктом ПЦР, так и артефактом. В связи с этим ПЦР-РВ с ИК, несмотря на дешевизну и удобство, в практической диагностике должна использоваться достаточно осторожно [4].

Поиск нуклеотидной последовательности, соответствующей участку генома *P. syringae* pv. *pisi*, подходящей для ее использования в качестве ПЦР-мишени – одна из основных и наиболее сложных задач при разработке диагностических методов на основе ПЦР. На последовательности, амплифицируемые с праймерами AN 7F/7R и avrRps 4F/4R, подбирали зонды для проведения ПЦР в режиме "реального времени". При подборе зондов учитывали GC-состав (60%), температуру отжига (превышение температуры отжига зонда по сравнению с температурой отжига праймеров минимум на 10 °C) и длину зонда (25-28 п.о.). Олигонуклеотиды синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия). На третьем этапе исследования была проведена апробация разработанных зондов AN7P.1, AN7P.2, avrRps4.1, avrRps4.2 к специфичным праймерам AN 7F/7R и avrRps 4F/4R для *P. syringae* pv. *pisi* (состав реакционной смеси и условия амплификации унифицировали).

В результате апробации усовершенствованного ПЦР-РВ установлено, что положительным результатом является амплификация продукта ПЦР до 35 циклов. После получения патента на разработанные авторами зонды усовершенствованный ПЦР-тест будет рекомендован к включению в разработку российских методических рекомендаций по выявлению и идентификации *P. syringae* pv. *pisi* в качестве отборочного теста, что позволит ускорить проведение исследований в диагностических лабораториях сельскохозяйственного профиля.

Список литературы:

1. Grimault V., Germain R., Politikou A. International Rules for Seed Testing. 7-029: Detection of *Pseudomonas syringae* on *Pisum sativum*. Annex to Chapter 7: Validated Seed Health Methods. Effective from 1 January 2018. Host: *Pisum sativum* L. s.l. (pea). Pathogen: *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (bacterial blight).
2. Qing Ch., Jun-ting Q., Zhen-ji L., Zhi-peng F., Fu-rong L., Hong-yun C., Jian-ping Y. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from imported Canadian pea seeds. 2016. Acta Phytopathologica Sinica, 46 (2). 169:175.

3. Игнатьева И.М., Словарева О.Ю. Применение метода ПЦР для идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* в семенном и растительном материале зернобобовых культур. 2021. Сборник материалов 11-й Всероссийской конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур». 182:186.
4. Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. 2012. Вестник Башкирского университета, 17 (1). 59:67.

ГЕН АЛЬФА-ГАРПИНИНА *Sm-AMP-X* ИЗ РАСТЕНИЯ *Stellaria media*: ПАТТЕРН ЭКСПРЕССИИ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ

Иванова Л.А., Комахин Р.А.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва 127550 E-mail: recombination@iab.ac.ru*

Растение звездчатка средняя, или мокрица, (*Stellaria media* L.) член семейства гвоздичные (*Caryophyllaceae*) является космополитным сорняком в Европе и Северной Америке. Это съедобное растение, используется в народной медицине в качестве противовирусного средства, для наружного лечения кожных заболеваний, в качестве тонизирующего, мочегонного, успокаивающего и отхаркивающего средства [1]. Предполагается, что растения *S. media* хорошо адаптированы к разнообразным условиям окружающей среды, устойчивы к биотическому и абиотическому стрессу. В отличие от культурных растений, сорняки, как правило, изучены слабо, хотя они перспективны в качестве источника новых генов устойчивости к болезням и вредителям.

Ранее показали, что растение мокрица является уникальным источником антимикробных пептидов (АМП), одного из ключевых компонентов врожденного иммунитета растений. В частности, было выделено и описано несколько АМП, принадлежащих к разным семействам, в том числе и альфа-гарпининов [2]. Семейство альфа-гарпининов содержит пептиды со специфическим 4-цистеиновым (4-Cys) мотивом $C^1X_3C^2X_nC^3X_3C^4$. Эти АМП проявляют различные виды активности, включая противогрибковую активность, ингибирование протеаз и ингибирование синтеза белка [2].

В растениях мокрицы альфа-гарпинина *Sm-AMP-X* продуцируется как белок-предшественник с модульной структурой, включающей двенадцать альфа-гарпинин-подобных пептидов, что является наибольшим количеством повторов пептидов из всех ранее описанных предшественников альфа-гарпининов [2]. Последний пептид, наиболее близкий к С-концу белка-предшественника, обладает антимикробной активностью. Он подавляет прорастание конидий и удлинение гифов некоторых фитопатогенных грибов в микромолярном диапазоне концентраций [2].

В последовательности гена *Sm-AMP-X*, кодирующем белок-предшественник, было обнаружено два прямых повтора длиной около 200 п.н., идентичные на 87% [2]. Существует предположение, что изначально ген содержал только одну из повторяющихся последовательностей, и последующая дупликация привела к образованию нового гена с двумя гомологичными повторяющимися участками. В результате образовался один полноразмерный и функциональный ген (*Sm-AMP-X*) и один псевдоген (*Sm-AMP-X-Ψ2*) со стоп-кодоном внутри второго повтора и мРНК которого не обнаружили [2]. Позднее также обнаружили транскрипты высокогомологичного гена *Sm-AMP-X1*, который отличался от *Sm-AMP-X* отсутствием первых 141 п.н. в 5'-концевой кодирующей белок

области [3]. В предварительном исследовании экспрессии гена *Sm-AMP-X* с использованием праймеров на кодирующую область гена, включающую оба повтора, показали, что его мРНК присутствует в цветках и проростках на уровне мРНК гена «домашнего хозяйства» β -актина и не обнаружена в стеблях, корнях или листьях мокрицы [2].

В данной работе с целью верификации профиля экспрессии гена альфа-гарпинина *Sm-AMP-X* экстрагировали РНК из листьев, стеблей, корней и соцветий растения мокрицы. Затем методом обратной транскрипции РНК получили кДНК, которую использовали в качестве матрицы для ПЦР. С использованием ранее созданных праймеров на кодирующую область гена [2] обнаружили мРНК *Sm-AMP-X* во всех изученных органах и на более низком уровне, чем уровень β -актина мокрицы. Кроме этого, оказалось, что в этом случае кроме ампликона ожидаемого размера, амплифицировались дополнительные ампликоны. Поскольку ген *Sm-AMP-X* содержит в кодирующей области два повтора, предположили, что ранее разработанные праймеры [2] могут отжигаться в обоих повторах гена и провоцировать синтез неспецифичных ампликонов. С целью исключить неспецифичную амплификацию, разработали новые пары праймеров на 5'- и 3'-области гена *Sm-AMP-X*, расположенные вне повторов. Убедились, что новые праймеры позволяют получить единственный ампликон ожидаемого размера. С использованием новых праймеров подтвердили наличие мРНК гена *Sm-AMP-X* в листьях, стеблях, корнях и цветках растения мокрицы на уровне ниже, чем уровень мРНК гена β -актина.

В настоящее время, геном растения мокрицы не секвенирован и это не позволяет клонировать промоторную область гена *Sm-AMP-X*, используя традиционный подход. Поэтому, в данном исследовании его промоторную область клонировали методом «modified inverse PCR» [4]. В результате обнаружили две предполагаемые промоторные последовательности, идентичные на 83% в «коровой» и проксимальных областях. Исключили ген *Sm-AMP-X1* в качестве источника новых промоторов из-за отсутствия у него части нуклеотидной последовательности в 5'-концевой области, которая использовалась для отжига праймеров при клонировании. Предположили, что одна из промоторных последовательностей принадлежит гену *SmAMP-X*, а вторая генам *Sm-AMP-X-Ψ1* или *Sm-AMP-X-Ψ2*, которые первоначально были идентифицированы как псевдогены [2]. Для проверки этого предположения, разработали один специфичный праймер к идентичной области в последовательностях обоих промоторов и один специфичный праймер к идентичной области в последовательностях генов *SmAMP-X* и *Sm-AMP-X-Ψ2* (нуклеотидная последовательность *Sm-AMP-X-Ψ1* не опубликована). Используя эти праймеры, амплифицировали сегмент ДНК генома мокрицы, содержащий часть промоторной последовательности и часть кодирующей области гена. Сравнивая полиморфизмы сегментов ДНК из 12 клонов, обнаружили, что один промотор (4 клон), обозначен как pro-*SmAMP-X*, принадлежит гену *SmAMP-X*, а второй (6 клонов), обозначен как pro-*SmAMP-X-Ψ2*, принадлежит гену *SmAMP-X-Ψ2*. Еще 2 клон несли версию промотора pro-*SmAMP-X* и две разные рекомбинантные области гена, сочетающие замены нуклеотидов, характерные как для *SmAMP-X*, так и для *SmAMP-X-Ψ2*.

Анализ промоторных последовательностей с помощью компьютерных программ показал, что они содержат консервативные цис-элементы ТАТА-бокс и СААТ-бокс в ожидаемых положениях в «коровой» области. Также идентифицировали цис-действующие элементы, которые потенциально обеспечивают тканеспецифичную, индуцируемую, усиленную или подавленную экспрессию генов *SmAMP-X* и *SmAMP-X-Ψ2*. Эти потенциальные элементы могут быть связаны с функциональными свойствами промоторов pro-*SmAMP-X* и pro-*SmAMP-X-Ψ2*.

Список литературы

1. Haragan P.D., Weeds of Kentucky and Adjacent States: a Field Guide, The University Press of Kentucky, Lexington, KY, 1991

2. Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., et al, Novel antifungal alpha-hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution, *Plant Mol. Biol.* 84, 2014 189e202.
3. Slavokhotova AA, Shelenkov AA, Korostyleva TV, et al. Defense peptide repertoire of *Stellaria media* predicted by high throughput next generation sequencing. *Biochimie.* 2017;135:15-27. doi:10.1016/j.biochi.2016.12.017
4. Pogorelko G.V., Fursova O.V. A highly efficient miPCR method for isolating FSTs from transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *J Genet* 87:133-140, 2008, <https://doi.org/10.1007/s12041-008-0020-8>

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ТКАНИ ЛИСТЬЕВ *VICIA CRACCA*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В ЗОНЕ ОТЧУЖДЕНИЯ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС

Казакова Е.А.¹, Битаршвили С.В.¹, Волкова П.Ю.²

**1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», Россия, Калужская
область, Обнинск, Киевское шоссе, 109 км 249032**

E-mail: elisabethafeb19@gmail.com

2 – Независимый исследователь, Бельгия, Гел

В рамках проекта по исследованию адаптивных реакций травянистых растений на ионизирующее излучение с применением мультиомиксного подхода для поиска кандидатных молекул устойчивости к абиотическим стрессорам был проведён протеомный анализ листьев горошка мышиного (*Vicia cracca* L.) из зоны отчуждения Чернобыльской АЭС. Выявление детерминант устойчивости к стрессору представляет особый интерес для биотехнологии хозяйственно ценных растений, придавая прикладной смысл фундаментальным исследованиям последствий хронического действия излучения.

Летом 2021 года в зоне отчуждения ЧАЭС в Полесском радиационно-экологическом заповеднике Республики Беларусь были заложены несколько экспериментальных участков: два радиационно-загрязнённых Кулажин и Масаны и два контрольных Бабчин и Ломыш. Для всех участков оценена радиационная обстановка (мощность амбиентной дозы, плотность потока β -, α -частиц, удельные активности радионуклидов в почве). Для протеомного анализа на каждом участке были отобраны листья горошка мышиного и немедленно заморожены в жидком азоте.

Белки экстрагировали из растительной ткани, для осаждения использовали предварительно охлаждённую до -20 °С 10% трихлоруксусную кислоту, растворённую в ацетоне. Получившийся белковый осадок дважды промывали холодным ацетоном и сушили на воздухе. Далее лиофилизированные белки растворяли, измеряли количество методом ВСА и выполняли триптический гидролиз белков в растворе. По завершению пробоподготовки осуществляли хромато-масс-спектрометрический анализ с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano, соединённой с масс-спектрометром Q-Exactive HF на базе Сколковского института науки и технологий.

В результате биоинформатического анализа в MaxQuant v.1.6.17.0 с использованием поискового алгоритма Andromeda были получены данные о присутствии 155 белков в пробах горошка мышиного. После дополнительной фильтрации для выделения белков, которые не являются контаминантами и регистрируются минимум в двух из трёх технических повторов, был получен список из 106 белков горошка мышиного. Проверка кластеризации данных об идентифицированных белках методом

РСА показала, что образцы после облучения выделяются в отдельную группу от контрольных проб. Значимые различия между группами образцов горошка мышиного выявлены по 71 белку. В результате анализа были идентифицированы три белка, которые регистрируются во всех образцах облучённых растений горошка мышиного и значимо не зарегистрированы ни в одном из контрольных образцов. Для наглядного представления об изменении количества значимо отличающихся белков в контрольных и облучённых растениях была построена тепловая карта. В настоящее время проводится дальнейший детальный анализ полученных данных.

Использование омикс-подходов для выявления кандидатных молекул устойчивости у дикорастущих растений и сельскохозяйственных культур, испытывающих серьёзные стрессовые воздействия, вносит вклад в решение глобальной проблемы, связанной с повышением урожайности сельскохозяйственных растений и продовольственной безопасностью.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-10004).

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО (*THYMUS SERPYLLUM* L.)

**Кожина С.Э.¹, Царева О. В.¹, Константинов З.С.³, Галахова О.Б.¹,
Соловьев А.А.² Гарибян Ц. С.^{1,2}**

**1 – Университетская гимназия Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский проспект, д.27, корп. 7, Россия
E-mail: cojina.l@yandex.ru**

**2 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, лаборатория маркерной и геномной селекции
растений, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42, Россия**

3 – Университет «Сириус»

Тимьян ползучий (*Thymus serpyllum* L.) многолетний полукустарник из рода Тимьян (*Thymus*) семейства Яснотковые (*Lamiaceae*). Тимьян широко используют в медицине, фармацевтике, кулинарии, парфюмерии, косметологии, как медонос и декоративное растение. (Garnik et al., 2009; Korsakova et al., 2012)

В настоящее время промышленные плантации тимьяна в нашей стране фактически отсутствуют. Поэтому возникает необходимость расширения сырьевой базы в России, путем культивирования тимьяна.

В связи с этим, а также с сохранением и размножением редких видов возникает проблема ускоренного размножения этого растения. Микрклональное размножение является альтернативой традиционным методам размножения, которое не влияет на актуальное биоразнообразие растений.

Целью работы являлось изучение влияния состава питательной среды и условий культивирования на микрклональное размножение тимьяна (*Thymus serpyllum* L.) в условиях *in vitro*.

В экспериментах в качестве стерилизующего вещества использовали NaOCl с концентрацией активного хлора 5%, 10%, 15% и разное время экспозиции. Проращивали семена при температуре +25±2°C. Эффективность стерильности и прорастание семян оценивали через 2 недели после посадки.

Анализ полученных экспериментальных данных показал, что наилучшие результаты – 100% стерильных эксплантов и 76,7% проросших эксплантов получены при

последовательной стерилизации семян тимьяна 70 % этанолом в течение 1 мин и 15% раствором NaOCl в течение 3 мин.

Показано, что при обработке семян тимьяна в 15% растворе NaOCl в течение 5 мин, снижается жизнеспособность эксплантов.

Полученные проростки пересадили из чашек Петри в стеклянные пробирки, для дальнейшего роста растений и поместили в световую комнату при температуре 22±2°C и с фотопериодом 16/8 часов.

Наряду с влиянием состава питательной среды на эффективность микрклонального размножения *in vitro* важным фактором является тип культурального сосуда. В данной работе использовали два типа сосудов – стеклянные пробирки и пластиковые контейнеры.

Анализ морфометрических параметров развивающихся *in vitro* проростков проводили через 1, 1,5 и 2 месяца культивирования. При этом определяли число полученных побегов на эксплант и коэффициент размножения в зависимости от типа культурального сосуда и состава питательной среды.

Полученные экспериментальные данные показали, что при культивировании в контейнерах на всех вариантах питательных сред образуется в ~3,5-4 раза больше побегов на эксплант, чем в пробирках. Максимальное число побегов образовалось на питательной 1/2MS.

В результате работы предлагается следующая схема микрклонального размножения тимьяна ползучего: стерилизация семян последовательно 70% раствором этанола в течение 1 мин и последующей обработкой 15% раствором NaOCl в течение 3 мин, затем выращивание в стеклянных пробирках на питательной среде 1/2MS.

СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИИ ЯРОВОЙ И ОЗИМОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ KASP-МАРКЕРА НА АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕНА ZDS

**Коробкова В.А.¹, Архипов А.В.¹, Яновский А.С.², Воропаева А.Д.²,
Ульянов Д.С.¹, Никитина Е.А.¹, Дивашук М.Г.¹**

**1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550; E-mail:
bowlingistka@gmail.com**

2 – ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко», Краснодар 350012

Твёрдая пшеница (*Triticum durum*) – важная продовольственная культура, зерно которой является единственным сырьем для производства высококачественных макаронных изделий, семолины, круп булгур и кус-кус. Одним из основных показателей качества конечной продукции является цвет изделий (паста, крупа). Жёлтый цвет обусловлен накоплением в эндосперме зерна каротиноидов, обладающих провитаминами и антиоксидантными свойствами [1]. До 30% качества конечной продукции, получаемой из твердой пшеницы, определяется концентрацией каротиноидных пигментов в зерне [2]. Ген *Zds*, контролирующий активность фермента z-каротиндесатуразы, – один из генов, участвующих в биосинтезе каротиноидов, расположенный в локусе, оказывающем влияние на индекс желтизны (YI) и на содержание жёлтых пигментов (YPC) в зерне [1]. Селекция твердой пшеницы направленная на увеличение содержания каротиноидов в зерне и конечной продукции – важное направление, в котором совместно с методами традиционной селекции для повышения эффективности следует применять технологии MAS-селекции [2, 3].

В нашем исследовании с помощью KASP-маркера ZDS-A1-SNP были проанализированы 57 сортов озимой и 211 образцов яровой твёрдой пшеницы,

предоставленных из НЦЗ им. П.П. Лукьяненко. Этот кодоминантный маркер позволяет определить два аллельных варианта гена *Zds*: аллель *Zds-A1a* (оказывает негативное влияние на содержание желтых пигментов и YI), и *Zds-A1b* (повышающий YPC и YI).

Нами были получены следующие данные: практически все сорта озимых пшениц обладают аллелем *Zds-A1b*, только 1 образец имеет аллель снижающий YI. В свою очередь, среди яровых образцов твердой пшеницы у 15% был выявлен аллель *Zds-A1a*, у остальных образцов - *Zds-A1b*. Не смотря на низкую встречаемость у исследуемых образцов аллеля *Zds* с негативным влиянием, в будущем следует учитывать его наличие у родительских форм при создании новых сортов твердой пшеницы.

С помощью KASP-маркера ZDS-A1-SNP можно эффективно выявлять на разных этапах селекции образцы, обладающие нужным аллелем гена *Zds*. Для более эффективной MAS-селекции направленной на повышение концентрации каротиноидных пигментов в зерне, крупке и макаронных изделиях следует дополнительно применять молекулярные маркеры и на другие гены, оказывающие влияние на биосинтез каротиноидов и их окисление в процессе изготовления конечных продуктов твердой пшеницы (*Psy-1*, *Psy-2*, *Lpx-B1*, *Ppo-1*).

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-16-00121.

Список литературы:

1. Мальчиков П. Н., Мясникова М. Г. / Содержание желтых пигментов в зерне твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.): биосинтез, генетический контроль, маркерная селекция // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – №. 5. – С. 501. DOI: 10.18699/VJ20.642
2. Мясникова М. Г., Мальчиков П. Н., Шаболкина Е. Н., Анисимкина Н. В., Розова М. А., Чახеева Т. В. Результаты селекции твердой пшеницы в России на содержание каротиноидных пигментов в зерне // Зерновое хозяйство России. 2019. № 6(66). С. 37–40. DOI: 10.31367/2079-8725-2019-66-6-37-40.
3. N'Diaye A. Single marker and haplotype-based association analysis of semolina and pasta colour in elite durum wheat breeding lines using a high-density consensus map / A. N'Diaye, J. K. Haile, A. T. Cory, F. R. Clarke, J. M. Clarke, R. E. Knox, and C. J. Pozniak // PLoS Onejournal.pone. 2017. 12(1).0170941. DOI: 10.1371/journal.pone.0170941.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЫСТРЫХ НЕЙТРОНОВ В КАЧЕСТВЕ ФИЗИЧЕСКОГО МУТАГЕНА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗМОЖНОСТИ УЛУЧШЕНИЯ СОРТОВЫХ СВОЙСТВ РИСОВОЙ КУЛЬТУРЫ

**Кругляк А.И.¹, Алексеенок Ю.В.¹, Дорошкевич А.С.¹, Аппазов Н.О.²,
Бакирулы К.Б.³**

1 – Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Moscow Region 141980

E-mail: Anastasiya.Kruglyak@nf.jinr.ru

2 – Korkyt Ata Kyzylorda University, Kyzylorda, Kazakhstan 120014

3 – Kazakh Research Institute of Rice named after I. Zhakhaev, Kyzylorda, Kazakhstan 120004

Рис (*Oryza sativa* L.) является не только популярной продовольственной культурой, обеспечивая едой около 40% населения земного шара [1], но и хорошим модельным объектом для всех злаковых культур, ввиду простоты своего генома [2]. При этом данная культура является вторым по счету растением, у которого был полностью секвенирован геном [3] после арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), размер генома которого примерно в четыре раза меньше [4]. Знания обо всей структуре геномной последовательности дают

возможность менять свойства конкретного гена, отвечающего за определенные агрономически важные признаки.

Область развития данной злаковой культуры интересна многим странам ввиду прогнозируемого увеличения населения по всей планете в ближайшем будущем. Даже открытие самого генома уже приставляло собой многонациональный проект, совместные усилия к которому приложили такие страны, как Япония, Китай, США, Франция, Тайвань и другие.

Вследствие постепенной деградации почвенных и водных ресурсов, необходимо не только повысить урожайность риса, но и не допустить его снижения.

Комплексно решить указанные выше проблемы может использование физических мутагенов, таких как радиационное воздействие, которое способно привести к мутагенезу с целью улучшения свойств популярного злака. Учитывая, что частота спонтанных мутаций крайне низкая [5], именно метод радиационно-индуцированного мутагенеза позволяет увеличить выход мутаций и ускорить процесс решения поставленных задач.

Виды ионизирующего излучения отличаются по величине линейной передачи энергии. К плотно ионизирующим относятся нейтроны, альфа-частицы, бета-частицы. Облучение быстрыми нейтронами вызывает множество отличных по размеру и количеству копий мутаций, такие как замена одиночных оснований, инверсии, делеции, вставки, транслокации и тогда как другие виды воздействия вероятнее вызывают одинаковый тип мутации [6].

Электростатический генератор ЭГ-5, созданный на основе генератора Ван де Граафа находится в Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка в ОИЯИ. При относительно большом токе ионный пучок обладает параметрами высокой пространственной и энергетической стабильности, что позволяет ускорителю оставаться эффективным ядерно-физическим инструментом для решения широкого спектра различных актуальных научных задач, в том числе биологических.

Облучение семян риса произведено быстрыми монохроматическими нейтронами, полученными в результате реакции $D(d, n)^3He$ с энергией до 4.1 МэВ. После радиационного воздействия семена выращивали на экспериментальном участке ТОО «Казахского НИИ рисоводства им. И. Жахаева» в республике Казахстан. Первые предварительные результаты показали, что доза в размере 50 Гр, полученная от воздействия нейтронов, достаточна для получения различного вида мутаций, часть мутаций идентифицирована, часть данных уточняется на данный момент. Далее семена мутантного растения составят следующее поколение, в котором будет проанализирован фенотип для поиска мутационных эффектов.

Acknowledgments. The study was performed in the scope of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan project number BR10765056 and within the framework Poland-JINR cooperation Projects PPPB/168-26/1128/2021, PPPB/120-25/1128/2022, PPPB/120-26/1128/2022, Serbia - JINR cooperation Projects № 178 2021 items 7 and 8.

Список литературы:

1. Moin, M. et al. Gain-of-function mutagenesis approaches in rice for functional genomics and improvement of crop productivity. Briefings in Functional Genomics, 2017. DOI 10.1093/bfpg/elw041
2. Viana V.E., Pegoraro C., Busanello C. and Costa de Oliveira A. Mutagenesis in Rice: The Basis for Breeding a New Super Plant // Frontiers in Plant Science. 2019. № 10.1326.
3. Sequencing Project, International Rice Genome. The map-based sequence of the rice genome. 436(7052), 793–800. 2005. DOI 10.1038/nature03895
4. Jackson S.A. Rice: The First Crop Genome. 2016. 9:14. DOI 10.1186/s12284-016-0087-4
5. Shu-Ye Jiang, Srinivasan Ramachandran. Assigning biological functions to rice genes by genome annotation, expression analysis and mutagenesis. 32(12), 1753–1763. 2010. DOI 10.1007/s10529-010-0377-7

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА КОЛОКОЛЬЧИК

Куприянова Д.М.¹, Савлуковская С.В.¹, Репина А.С.¹, Галахова О.Б.¹,
Соловьев А.А.², Константинов З.С.³, Гарибян Ц.С.^{1,2}

**1 – Университетская гимназия Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский проспект, д.27, корп. 7, Россия,
E-mail: savlukovskaya02@gmail.com**

**2 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, лаборатория маркерной и геномной селекции
растений, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42, Россия**

3 – Университет «Сириус»

Введение: В Красную книгу Москвы и Московской области внесены три вида Колокольчика: Бубенчик лилиелистный (*Adenophora liliifolia*), Колокольчик алтайский (*Campanula altaica*), Колокольчик сибирский (*Campanula sibirica*) (Варлыгина и др., 2018). В настоящее время перед человечеством стоит потребность в сохранении исчезающих видов растений.

Колокольчики широко используются в медицине и в садоводстве. Многие виды даже без селекционных преобразований обладают высокими декоративными качествами. Колокольчик сибирский синтезирует много вторичных метаболитов, важных для фармацевтики, таких как алкалоиды, флавоноиды и др.

Сохранение редких видов растений – это часть общей проблемы восстановления и рационального использования природных растительных ресурсов, в том числе колокольчика. Для поддержания биоразнообразия в настоящее время наряду с традиционными методами используется способ сохранения редких и исчезающих видов растений в виде растущих коллекций в условиях *in vitro*.

Цель работы: оптимизировать условия микроклонального размножения растений рода Колокольчик.

Материалы и методы исследований:

Объектом исследований являлись растения Колокольчика вида сибирский.

Для получения асептических растений необходимо было провести поверхностную стерилизацию семян. Мы остановились на стерилизующем агенте NaOCl. Так как в разных источниках описаны отличающиеся друг от друга концентрации и экспозиция агента, то возникла необходимость оптимизировать процесс. Были протестированы девять различных вариантов стерилизации.

На основе литературных источников по микроклональному размножению Колокольчика, были приготовлены следующие варианты питательных сред:

- питательная среда Мурасиге и Скуга (MS);
- питательная среда MS половинчатого состава макросолей ($\frac{1}{2}$ MS).

В варианты питательных сред для укоренения были добавлены два варианта ауксинов в различных концентрациях 0,5 мг/л, 1 мг/л и 2 мг/л ИУК и ИМК. Повторность каждого варианта опыта – трехкратная.

Результаты исследования:

В результате проведенных исследований показано, что для стерилизации семян Колокольчика сибирского оптимальным режимом является следующий: 1 мин в 70%

растворе этанола, 10 мин в 10% растворе NaOCl, трёхкратная промывка в стерильной дистиллированной воде.

Установлено, что наиболее эффективной средой для укоренения является $\frac{1}{2}$ MS с добавлением 1 мг/л или 2 мг/л ИМК.

Растения были адаптированы к условиям *ex vitro* и переданы в коллекцию Ботанического сада им. Ростовцева.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ КАК НЕОБХОДИМОЕ УСЛОВИЕ ПОИСКА ГЕНОВ TAL-ЭФФЕКТОРОВ

Лебедева М.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550; e-mail: marilistik@mail.ru

Бактерии *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Хсс) наносят существенный экономический урон, вызывая сосудистый бактериоз на различных культурных растениях семейства *Brassicaceae* [1]. Для развития инфекции Хсс используют различные белки-эффекторы, наиболее известной группой которых являются TAL-эффекторы (Transcription Activator-Like), TALE. Эти белки связываются с промоторными областями некоторых генов, активируя их транскрипцию. Узнавание нуклеотидных последовательностей генома растения-хозяина определяется строением центральной части белка, которая состоит из псевдо-повторов длиной 33-35 аминокислот. Каждый повтор, которых может быть 30 и более, связывается с одним определённым нуклеотидом, что зависит от 12 и 13 гипервариабельных аминокислот повтора. Гены растения, активируемые этими эффекторами, чаще всего являются генами восприимчивости, и их изучение представляет большой интерес с точки зрения разработки подходов к повышению устойчивости растений к Хсс. Однако, структура генов TALE – протяжённые повторы и высокий GC-состав – существенно затрудняют их идентификацию как при секвенировании с помощью NGS-технологий, так и при амплификации и секвенировании по Сэнгеру.

Ранее нами было проведено исследование распространения генов TALE среди изолятов Хсс разных рас [2]. В результате эти гены были идентифицированы у изолятов Хсс, отнесённых к 6-ой расе, которая считается наиболее патогенной, т.к. поражает все растения-дифференциаторы с разными генами устойчивости [3]. После долгой оптимизации условий амплификации удалось получить и отсекувенировать один полноразмерный ген TALE (около 3 т.п.о.) для каждого изолята с помощью секвенатора MinION.

В настоящей работе было проведено полногеномное секвенирование изолята Хсс XY1-1 с помощью сочетания NGS-секвенирования (Illumina) и SMRT (single-molecule real-time) секвенирования (Oxford Nanopore Technologies). После тримминга ридов сборка осуществлялась с помощью Unicycler v0.4.8 [4]. Таким образом, была идентифицирована кольцевая бактериальная хромосома размером 5080153 п.н. и плазида размером 40556 п.н. Среднее глубина покрытия генома составила 139. Средний GC-состав – 65,15%. Полученный геном был аннотирован с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [5]. Геном и его аннотация доступны в базе данных NCBI (BioProject: PRJNA888856).

Поиск генов TALE осуществлялся с помощью AnnoTALE [6], что позволило выявить два гена TAL-эффекторов. Один из них состоял из 14 полных и одного половинного повторов и полностью соответствовал выявленному в прошлом исследовании гену TALE [2]. Второй ген состоял из 11 полных и одного половинного повторов и был выявлен впервые. Несмотря на то, что праймеры для амплификации подбирались на консервативные участки 5' и 3' концов гена, амплификация второго гена TALE не происходила.

Отсеквенированный в данной работе геном является первым полным геномом изолята, определённого как 6 раса. Однако анализ доступных геномов *Xcc* с неизвестной расовой принадлежностью позволил выявить изоляты с очень схожими геномами, скорее всего, они также относятся к 6 расе.

Список литературы:

1. Hutin, M., Pérez-Quintero, A.L., Lopez, C. & Szurek, B. (2015) MorTALKombat: The story of defense against TAL effectors through loss-of-susceptibility. *Frontiers in Plant Science*, 6, 535. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00535>
2. Zlobin, N, Lebedeva, M, Monakhova, Y, Ustinova, V, Taranov, V. An ERF121 transcription factor from *Brassica oleracea* is a target for the conserved TAL-effectors from different *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains. *Mol Plant Pathol*. 2021; 22: 618– 624. <https://doi.org/10.1111/mpp.13048>
3. Vicente, J.G. and Holub, E.B. (2013), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant Pathology*, 14: 2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>
4. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 2017.
5. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2016 Aug 19;44(14):6614-24. doi: 10.1093/nar/gkw569. PMID: 27342282
6. Grau, J., Reschke, M., Erkes, A. et al. AnnoTALE: bioinformatics tools for identification, annotation and nomenclature of TALEs from *Xanthomonas* genomic sequences. *Sci Rep* 6, 21077 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep21077>

ПОЙМАЙ МОБИЛОМ, ЕСЛИ СМОЖЕШЬ

Меркулов П.Ю., Егорова Е.Г., Серганова М.А., Петров Г.А., Киров И.В.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550;***

E-mail: paulmerkulov97@gmail.com

Значительная часть геномов эукариот, включая растения, представлена последовательностями мобильных элементов, совокупность которых представляет собой мобилом. Несмотря на давний интерес исследователей к мобильным элементам, закономерности формирования мобилома остаются малоизученными. Активная часть мобилома, способная к транспозиции, сравнительно небольшая ввиду накопления большинством мобильных элементов мутаций, а также работы систем эпигенетического сайленсинга мобильных элементов. Среди мобильных элементов растений наиболее распространёнными в геноме выступают LTR-ретротранспозоны. Однако из-за многостадийности своего жизненного цикла, транскрипция ретротранспозонов не отражает их способности к транспозиции в геноме. Кроме того, экспрессия многих мобильных элементов, в том числе ретротранспозонов, является динамическим процессом, который может быть ограничен конкретным органом, тканью, стадией онтогенеза или внешними условиями. Таким образом, существует целый ряд факторов,

затрудняющих изучения активной части мобилома растений, с чем напрямую связана необходимость в создании новых и оптимизации существующих методов анализа мобильности транспозонов.

Для растений с небольшим геномом (в сравнении с многими сельскохозяйственными растениями) эффективным методом оценки потенциальной транспозиционной активности выступает метод SIRT (англ. Sequence-Independent Retrotransposons Trapping). Данный метод предполагает лигирование адаптеров к пре-интеграционным продуктам ретротранспозонов – линейной кДНК (лкДНК), а также дальнейшую амплификацию с помощью сиквенс-специфичного и адаптер-специфичного праймеров.

В нашем исследовании с помощью SIRT была проведена оценка накопления линейной кДНК (лкДНК) ретротранспозонов семейств *ONSEN*, *Évadé* и *ATCOPIA21* при отсутствии стресса, при тепловом стрессе (24 часа, 37°C) и в фазе восстановления после стресса у *ddm1* мутанта *A. thaliana* характеризующегося гипометилированием ДНК. Ранее Tsukahara *et al.* было показано увеличение количества инсерций элементов семейств *Évadé* и *ATCOPIA21* у самоопылённых линий *ddm1* [1]. В свою очередь элементы *ONSEN* является хорошо изученным примером индуцируемых тепловым стрессом ретротранспозонов [2]. При отсутствии стресса у растений *ddm1* нами была детектирована аккумуляция лкДНК *Évadé*, в то время как для остальных элементов накопление подобных молекул не было обнаружено. При тепловом стрессе была выявлена аккумуляция лкДНК *ONSEN* и *ATCOPIA21* на фоне снижения количества лкДНК *Évadé*. В фазе восстановления (6 часов после теплового стресса) детектировалось повышение количества лкДНК *ONSEN* и *Évadé* и стабильное сохранение уровня содержания лкДНК *ATCOPIA21*. Повышение активности *ATCOPIA21* на уровне лкДНК у мутанта *ddm1* при тепловом стрессе может быть связано с стресс-индуцибельной экспрессией данного элемента, что требует дальнейшего изучения.

Стоит отметить, что накопление лкДНК свидетельствует о прохождении ретротранспозонами этапов жизненного цикла вплоть до обратной транскрипции, однако не всегда приводит к интеграции новых копий в геном. Так, например, Ito *et al.* было показано, что, несмотря на накопление кДНК *ONSEN*, появлению новых наследуемых инсерций данных элементов препятствует строгий эпигенетический контроль [2]. Таким образом для подтверждения транспозиционной активности необходима детекция новых инсерций. Одним из методов такого анализа выступает Transposon Display, который заключается в рестрикции геномной ДНК, последующего лигирования адаптеров к местам рестрикции и амплификации с помощью сиквенс-специфичного и адаптер-специфичного праймеров. Важно учитывать, что возможность эффективного использования данного подхода лимитировано не только размером и сложностью структуры анализируемого генома, но и копийностью изучаемого элемента.

С помощью Transposon Display нами был проведён анализ генотипов *A. thaliana* Col-0, *ddm1*, а также 4 растений M1, полученных от самоопыления растений Col-0, подвергнутых комбинации эпигенетического и теплового стресса (M0). Новые инсерции элементов *Évadé* и *ATCOPIA21* были обнаружены только в генотипе *ddm1*, что коррелирует с данными других исследований [1]. В то же время дополнительные инсерции *ONSEN* были детектированы только в 2 из 4 генотипах растений M1. В дальнейшем планируется изучение как генетических, так и эпигенетических изменений, опосредованных данными инсерциями.

Подводя итог, стоит подчеркнуть, что изучение активного мобилома, формируемого как внутригеномными, так и внехромосомными формами ДНК, требует использование комплекса подходов. Нашей работой экспериментально проиллюстрирована как динамика накопления лкДНК элементов, находящихся под различными системами эпигенетического контроля, так и возможность детекции новых наследуемых инсерций.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-74-10055.

Список литературы:

1. Tsukahara S. Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis / S. Tsukahara, A. Kobayashi, A. Kawabe, O. Mathieu, A. Miura A, T. Kakutani // Nature. – 2009 – Vol. 461. – №7262. – pp. 423-426.
2. Ito H. An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress / H. Ito H, H. Gaubert, E. Bucher, M. Mirouze, I. Vaillant, J. Paszkowski // Nature. – 2011. – 472. – №7341. – pp. 115-119.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА α -ХАРПИНИНА Sm-AMP-X ИЗ *STELLARIA MEDIA* L. В РАСТЕНИЯХ ТОМАТА

Михель И.М.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550
Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42
E-mail: joseph.mikhel@gmail.com*

Томат является ценной овощной культурой, важным сырьем для пищевой промышленности и популярным салатным овощем. В 2019 г. мировой урожай томата составил более 180 млн т по данным FAO. Являясь важной культурой, томат уязвим для широкого спектра вирусных, грибных и бактериальных патогенов вследствие снижения генетического разнообразия культуры в процессе доместикации. Для томата описаны более 200 заболеваний по всему миру [1], что делает актуальной задачу защиты томата от фитопатогенов, в том числе, с применением генно-инженерных стратегий.

Среди естественных стратегий, применяемых растениями для защиты от биологических патогенов, одной из наиболее распространенных является биосинтез веществ с антимикробной активностью [2]. Вследствие этого создание трансгенных форм, экспрессирующих гетерологичные антимикробные пептиды, стало наиболее распространенным генно-инженерным направлением повышения устойчивости культурных видов растений к фитопатогенам [3]. Показано, что наилучший эффект достигается при совместной экспрессии в одном растении нескольких генов, опосредующих защиту от патогенов (пирамидирование или стэкинг) [4].

Перспективными источниками генов устойчивости к биотическому стрессу являются дикорастущие растения. К таким ценным источникам относят растение-космополит звездчатку среднюю (мокрицу) *Stellaria media* L. В последние 10 лет из семян *S. media* L. были выделены и охарактеризованы ряд пептидов с антимикробной активностью, в числе которых дефензины SM-AMP-D и α -харпинин Sm-AMP-X [5]. Микроорганизмы, развитие которых подавляется в присутствии малых концентраций SM-AMP-D и Sm-AMP-X (*B. cinerea*, *F. solani*, *P. infestans* и др.), являются хозяйственно важными патогенами томата, что обусловило выбор данных антимикробных пептидов для создания устойчивых трансгенных форм растений томата.

Для успешной экспрессии гетерологичных генов необходимы сильные конститутивные промоторы. Наиболее часто в генной инженерии растений используется вирусный промотор CaMV35S. Однако при инфицировании растения вирусом CaMV, а также в случае использования этого промотора для экспрессии нескольких трансгенов возможен эффект сайленсинга генов при взаимодействии нескольких копий одного промотора в геноме [6]. Указанный феномен ограничивает применение промотора CaMV35S в задаче пирамидирования и требует расширения круга применяемых промоторов. Недавно было установлено, что промоторы генов SM-AMP-D и Sm-AMP-X в

растениях арабидопсиса сопоставимы с CaMV35S по эффективности и могут быть рекомендованы для генетической инженерии. [7].

В задачи данного этапа исследования входит создание генетической конструкции, содержащей ген *Sm-AMP-X* под контролем промотора *pro-SmAMP-X2*, для агробактериальной трансформации томата и получения трансгенных растений, экспрессирующих данный антимикробный пептид.

Антимикробные пептиды синтезируются в растении в форме белков-предшественников, несущих на N-конце сигнальный пептид. Семейство α -харпининов отличается установленной ранее уникальной модульной структурой белка-предшественника, включающего несколько (в случае *Sm-AMP-X* - 12) доменов с характерным для зрелого пептида 4-Cys мотивом, соединенных линкерными участками. Для гена *Sm-AMP-X* известна полная последовательность кДНК белка-предшественника [5]. Механизм посттрансляционной модификации белка-предшественника α -харпинина в *S. media* L. не установлен. Для повышения вероятности успешной экспрессии было предложено использовать делеционный вариант гена, включающий последовательности сигнального пептида и зрелого пептида, соединенные между собой линкерным участком, примыкающим к 3'-концу последовательности сигнального пептида в исходном гене. Полученная нуклеотидная последовательность гена была оптимизирована с учетом частоты встречаемости кодонов в геноме томата для повышения уровня экспрессии рекомбинантного антимикробного пептида.

Вставка, содержащая промоторную и кодирующую последовательности рекомбинантного гена *Sm-AMP-X*, была клонирована в растительный вектор *pCAMBIA2301* для последующей агробактериальной трансформации. В настоящее время экспланты семядолей томата, сокультивированные с агробактерией штамма *AGLO*, содержащей данную плазмиду, находятся на этапе каллусогенеза для образования трансгенных регенерантов.

Список литературы:

1. Panno S., Davino S., Caruso A.G., Bertacca S., Crnogorac A., Mandić A., Noris E., Matić S. A review of the most common and economically important diseases that undermine the cultivation of tomato crop in the mediterranean basin. *Agronomy*, 2021, 11(11), p.2188.
2. Campos M.L., de Souza C.M., de Oliveira K.B.S., Dias S.C. Franco O.L. The role of antimicrobial peptides in plant immunity. *Journal of experimental botany*, 2018, 69(21), 4997-5011.
3. Khaliluev, M. R., Shpakovskii G. V. Genetic engineering strategies for enhancing tomato resistance to fungal and bacterial pathogens. *Russian journal of plant physiology*, 2013, 60 (6), 721-732.
4. Shehryar K., Khan R.S., Iqbal A., Hussain S.A., Imdad S., Bibi A., Hamayun L., Nakamura I. Transgene stacking as effective tool for enhanced disease resistance in plants. *Molecular Biotechnology*, 2020, 62(1), 1-7.
5. Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., Andreev Y.A., Oparin P.B., Berkut A.A., Vassilevski A.A., Egorov T.A., Grishin E.V., Odintsova T.I. Novel antifungal α -hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution. *Plant molecular biology*, 2014, 84(1), 189-202.
6. Amack S.C., Antunes M.S. CaMV35S promoter—A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology*, 20, 24, 100179.
7. Иванова, Л. А., Комахин, Р. А. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ НОВОГО ПРОМОТОРА *pro-Sm-AMPX* ИЗ РАСТЕНИЯ *STELLARIA MEDIA*. Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии, 2020, 27, 36.

ИНТРОГРЕССИЯ ГЕНА-ВОССТАНОВИТЕЛЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ИЗ *RAPHANUS SATIVUS* L. В *BRASSICA NAPUS* L. ПУТЕМ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ

Мурзина Э.Р., Монахос С.Г.

1 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет – МСХА К.А. Тимирязева, Москва, 127434.

Email: e.murzina@rgau-msha.ru

Рапс – одна из трех важнейших масличных культур, выращиваемых в России. По своим характеристикам рапсовое масло не уступает оливковому маслу. По данным Росстата за прошедшие 10 лет посевные площади, занятые этой культурой в России увеличиваются, что связано с государственной поддержкой этой отрасли, а также высокой маржинальностью рапсового масла.

Повышение урожайности рапса связано прежде всего с использованием гибридных семян, так в прошедшем году больше 50% площадей были засеяны гибридными семенами.

На осень 2022 году в Российском государственном реестре селекционных достижений не зарегистрировано ни одного отечественного F1 гибрида ярового или озимого рапса.

Для получения гетерозисных семян рапса используют цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС), позволяющая проводить контролируемую гибридизацию материнских и отцовских линий. Для идентификации различных типов ЦМС, а также генов-восстановителей фертильности разработаны системы молекулярных маркеров. При получении промышленных гибридов рапса в мире преимущественно используются системы ЦМС *ogu*, *pol*, *MSL* и *nap* (Анисимова и др., 2020).

Тип стерильности *Ogura* (*ogu*) впервые был описан у неизвестного сорта дайкона (*Raphanus sativus* L.) (*Ogura*, 1968). ЦМС *Ogura* характеризуется стабильностью проявления, уменьшением размера цветков и изменением формы лепестков. Цитоплазма *ogu* была перенесена в растения рода *Brassica*, сначала в капусту (*B. oleracea* L.), а затем в рапс (Heyn, 1976; Motegi et al, 2003). В литературе есть описание возникновения *Ogura*-подобной ЦМС, выявляемой соответствующими ДНК-маркерами, в потомствах от межвидовой и межродовой гибридизации *Brassica* (Зубко и др., 2019).

ЦМС типа *ogu* связана с наличием митохондриального гена с открытой рамкой считывания гена *orf138*, который в настоящее время секвенирован и маркирован (Hu et al., 2008, Зубко и др., 2019)

Фертильность пыльцы при ЦМС *ogu* восстанавливается в присутствии доминантного ядерного гена *Rfo*, продуктом которого является митохондриальный белок *PPR* (*Pentatricopeptide Repeat*) (Brown et al., 2003).

Растительный материал: Образцы были предоставлены ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева». В качестве источника гена-восстановителя фертильности был использован отдаленный гибрид между капустой белокочанной F1 Килатон (*Br. oleracea*, 2n = 18, CC) и японской редькой (дайкон) (*R. sativus*, 2n = 18, RR) (Монахос, 2016). Источником стерильной цитоплазмы стал линия рапса 926ки1МС.

Brassicoraphanus (2n=18(36)) – амфигаплоид и из-за дисбаланса хромосомного состава образует нежизнеспособную пыльцу. Но из-за спонтанного удвоения хромосом на растение завязывались цветки с амфидиплоидным числом хромосом (2n=36), пыльцу с таких цветков использовали в качестве отцовского компонента. Гибридизацию со стерильной линией рапса проводили в цветках. Полученные гибриды обладали общими свойствами родительских линий – опушение листа по краю листа, белые цветы с

пурпурно-розовыми жилками от дайкона, форма листа – рапс, цветки были значительно крупнее рапсовых и дайкона, лист плотный, с восковым налетом – признак капусты. На стеблях отмечалось антоциановые жилки – признак, переданный от дайкона.

Полученные гибридные комбинации беккроссировали с материнской стерильной линией. После первого беккросса наблюдалась нестабильность хромосомного состава, химеризм в клетках корневой меристемы и пыльцевых клетках, число хромосом варьировало от 30 до 37. Растения по фенотипу становились больше похожими на рапс, исчезло опушение и цветы стали желтыми. После второго беккросса были получены стабильные гибриды с числом хромосом $2n=37$, часть растений унаследовала белую окраску лепестков цветков. Для насыщения генотипов проводилось скрещивание с комбинацией Джаз х Маджонг и Джаз дг МС, источников хозяйственно-ценных признаков.

Далее отбирали растения с восстановленной фертильностью и самоопыляли их для дальнейшего размножения.

В ходе работы была отобрана перспективная комбинация сочетающая ген-восстановитель фертильности, типичного рапсового растения, а также была передана устойчивость к киле. Для подтверждения наличия типа цитоплазмы и гена-восстановителя фертильности *Rfo* будут использованы молекулярные маркеры.

Список литературы:

1. Анисимова, И. Н., Дубовская А. Г. Системы ЦМС у рапса и их использование в селекции отечественных гибридов //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 181. – №. 3. – С. 171-180.
2. Зубко О. Н., Монахос С. Г., Монахос Г. Ф. Возникновение ogura-подобной ЦМС в растениях Brassica при отдаленной гибридизации //Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2019. – №. 2. – С. 136-141.
3. Монахос С. Г. Интеграция современных биотехнологических и классических методов в селекции овощных культур //Москва. – 2016.
4. Brown, G.G., Formanova N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P. et al. The radish *Rfo* restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant Journal*. 2003;35(2):262-272. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2003.01799.x
5. Heyn, F.W. Transfer of restorer genes from *Raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. *Cruciferae Newsletter*. 1976; 1:15-16.
6. Hu, X., Sullivan-Gilbert M., Kubik T., Danielson J., Hnatiuk N., Marchione W. et al. Mapping of the *Ogura* fertility restorer gene *Rfo* and development of *Rfo* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding*. 2008;22(4):663-674. DOI: 10.1007/s11032-008-9207-1
7. Motegi, T., Nou I.S., Zhou J., Kanno A., Kameya T., Hirata Y. Obtaining an *Ogura*-type CMS line from a symmetrical protoplast fusion between cabbage (fertile) and radish (fertile). *Euphytica*. 2003;129:319-323. DOI: 10.1023/A:1022284803689
8. Ogura, H. Studies on the new male sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Memories of the Faculty of Education Kagoshima University*. 1968;6(2):39-78.
9. Рынок рапса - тенденции и прогнозы [Электронный ресурс]: стат. сб. / Росстат. - М., 2022. - Режим доступа: <https://ab-centre.ru/news/rynok-rapsa---tendencii-i-prognozy/> (Дата обращения 03.11.22)

ВЕГЕТАЦИОННЫЙ ПЕРИОД КАК ФАКТОР ПРИ ВЫБОРЕ РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СКОРОСПЕЛЫХ СОРТОВ ОВСА В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Мишечкина В.С., Любимова А.В., Кочнева Д.А.

*Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северного Зауралья
- филиал Тюменского научного центра СО РАН, Тюмень, Россия,
e-mail: leokin404gmail.com*

Овес – одна из основных возделываемых зерновых культур на территории Западной Сибири, а в Тюменской области его посевы есть в большинстве сельскохозяйственных зон. Он используется в качестве зернофуражной и кормовой культуры. При этом овес имеет минимальные изменения в количестве урожая по сравнению с другими культурами. По мнению некоторых авторов, в почвенно-климатических условиях Тюменской области выращивание овса наиболее целесообразно [1].

Количество получаемого урожая, а также качество и посевные свойства зерна, устойчивость сорта к поражению вредителями и болезнями зависит от продолжительности вегетационного периода. Чем более ранее созревание имеет один сорт овса, тем больше преимуществ он имеет над другими. Например, скороспелые сорта лучше приспособлены к возделыванию на севере, а на юге их высеивают в качестве промежуточных в летне-осенний период после уборки основной культуры. Так же с продвижением на север у овса наблюдается сокращение первой половины вегетации и прямо-пропорциональное увеличение второй в зависимости от количества осадков. В районах с засушливой погодой скороспелые сорта овса созревают до наступления суховея и засухи.

Среди культурных видов овса встречаются генотипы значительно отличающиеся друг от друга по продолжительности вегетационного периода. Существующие скороспелые яровые формы культурных видов овса, обладающие отдельными укороченными фазами развития растений или сокращенным вегетационным периодом, могут вовлекаться в селекцию скороспелых сортов [2].

Цель исследования - выделить сорта овса, наиболее перспективные для использования в качестве родительских форм в селекции на скороспелость в условиях Западной Сибири. Объектом исследования послужила коллекция культурных видов овса, включающая 310 сортов и линий. Посев проводился на опытном поле НИИСХ Северного Зауралья, которое расположено в северной лесостепи Зауралья в трех километрах от поселка московский. Почва опытного поля – серая лесная тяжелосуглинистая. Предшественник – чистый пар [3].

Исследование проводилось с мая по сентябрь 2022 года. Для начала вегетационного периода были характерны пониженные температуры и обильные осадки, с последующим незначительным повышением температуры с сохранением количества осадков. Такие погодные условия позволили овсу пройти все периоды вегетации без особой задержки.

Ранжирование коллекции позволило выделить группу ультраскороспелых сортов, которая включает в себя 16 сортов, что составляет 5% от всей коллекции. Максимальной скороспелостью характеризуется сорт Золотой дождь (к-7947) из Швеции, вегетационный период которого составил 46 суток. Так же в эту группу вошли сорта Тулунский 19 (к-14783, Россия, Иркутская обл.), Рооре (к-14789, Финляндия), Мах (к-15512, Германия) с вегетационным периодом в 60 суток.

На долю скороспелых овсов, где находятся стандарты (Отрада и Тюменский голозерный), пришлось 51% образцов (159 сортов). Период их вегетации составил 64-72

суток. Среди сортов наблюдается разнообразие по странам происхождения: Королёк – Беларусь, местный — Сирия (к-15039), FF 64-74 – Канада (к-12325).

Группа среднеспелых овсов (73-82 сут.) включала 94 сорта (30% от коллекции). Наиболее распространены были сорта Российской селекции – 37 образцов (39% от группы), на долю американских сортов приходилось 19 образцов (20% от группы).

В среднепоздней группе (83-90 сут.) оказалось 28 сортов, что является 9% коллекции. Наиболее распространенными были сорта Российской селекции – 10 сортов (38% от группы).

В группу наиболее позднеспелых вошел только один сорт — Варненский (Россия, Челябинская обл.), чей период вегетации составил 99 суток.

В результате изучения коллекции выделена группа ультраскороспелых образцов овса, перспективных для использования как исходный материал для селекции на скороспелость. В качестве источников скороспелости могут быть использованы: Золотой дождь (к-7947, Швеция) — 46 сут.; Тулунский 19 (к-14783, Россия, Иркутская обл.) - 60 сут.; Рооре (к-14783, Финляндия) — 60 сут.; Мах (к-15512, Германия) — 60 сут.; Pele (к-12305, Бельгия) - 61 сут.; Y 5 (к-14922, Китай) - 61 сут.; Уралец (Россия, Свердловская обл.) - 61 сут.; Solidor (к-12134, Германия) - 61 сут.; MF 9224-164 (к-15090, США) - 63 сут.; Flamingsgelb (к-14583, Германия) - 63 сут.; Villu (к-14863, Эстония) - 63 сут.; ГИБРИД (к-14983, Мексика) - 63 сут.; Кречет (к-14857, Россия, Кировская обл.) - 63 сут.; Буг (к-13676, Беларусь) - 63 сут.; Scorpion (к-15377, Германия) - 63 сут.; Мустанг (к015582, Россия, Томская обл.) - 63 сут.

Список литературы:

1. Остапенко А.В. Полиморфизм проламина культурных видов рода *Avena* L. в филогенетических и прикладных исследованиях. - 2016. - 19 с.
2. Варгач Ю. И. Источники хозяйственно ценных признаков признаков для селекции овса (*Avena* L.) в условиях нечерноземной зоны РФ. - 2019. - С. 13-14.
3. Еремин, Д. И. Биологическая активность и нитратный режим выщелоченных черноземов и луговых почв Тобол-Ишимского междуречья / Д. И. Еремин, С. В. Абрамова // Вестник КрасГАУ. – 2008. – № 2. – С. 67-71. – EDN ISDFDR.

РАЗНООБРАЗИЕ ВИДОВ *CLADOSPORIUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ С ЛИСТЬЕВ ТОМАТА, ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО АНАЛИЗА

Пуховская Е.А., Чижик В.К., Мартынов В.В.

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва
127550**

E-mail: p-katia@inbox.ru

На сегодняшний день известно около 170 видов кладоспор (Bensch, 2015). Организмы рода *Cladosporium* встречаются повсеместно и выделяются из почвы, воздуха, воды (Bensch, 2015). Также они могут встречаться как эндофиты. Хотя в основном представители рода *Cladosporium* являются сапротрофами, иногда они могут быть патогенами. К числу последних относится *C. fulvum*, который является возбудителем кладоспориоза томатов и наносит ущерб отрасли разведения томатов в закрытом грунте. Целью данного исследования было изучить полиморфизм генов вирулентности *C. fulvum*, благодаря которым патоген преодолевает защитную систему организма-хозяина и заражает его. Несмотря на широкое использование названия *C. fulvum*, на данный момент возбудитель кладоспориоза относят к роду *Passalora*. Перемещение в род *Passalora*

произошло как исходя из ДНК филогении, так и из-за отчётливых шрамов на конидиях, что характерно именно для грибов рода *Passalora* (Thomma, 2005).

В данном исследовании мы изучали изоляты, полученные с листьев растений томата с выраженными симптомами кладоспориоза из разных регионов России от Подмосковья до Дальнего Востока. Всего было исследовано 12 образцов. Образцы высевали на агар, получали колонии, типичные для кладоспор. Из выросших на агаре образцов выделяли тотальную ДНК, которую, амплифицировали с праймерами, специфичными для генов вирулентности *C. fulvum*. Однако в результате этой амплификации мы не получили ПЦР-продуктов ожидаемой длины, что свидетельствует об отсутствии этих генов в изучаемых образцах. Следовательно, мы сделали вывод о том, что ни один из этих образцов не являлся *C. fulvum*. Это предположение имеет свое подтверждение в научной литературе, где описано, что поражённые кладоспориозом листья томатов содержат как *C. fulvum* (*P. fulva*), так и других представителей рода *Cladosporium* (McGilp, 2018), особенно на поздних стадиях заболевания.

Чтобы узнать о принадлежности полученных нами изолятов к тем или иным видам рода *Cladosporium*, мы использовали метод ITS (internal transcribed spacer), широко применяющийся в филогенетическом анализе. Он основан на быстром накоплении мутаций в некодирующих последовательностях между генами 18S рРНК и 28S рРНК, тогда как сами эти гены достаточно консервативны, что позволяет создавать универсальные праймеры. Полиморфизм локусов ITS также использовался в филогенетических исследованиях эктомикоризы и ржавчинных грибов из растительного материала (Gardes, 1993). Мы амплифицировали изучаемые образцы с праймерами ITS4 и ITS5 (Lucentini, 2021). Полученные участки ДНК были очищены и секвенированы по Сэнгеру, а полученные последовательности мы зарегистрировали в базе данных GenBank NCBI. ПЦР и прямое секвенирование имеет несколько преимуществ перед клонированием и секвенированием, например, требует меньшее количество ДНК, а также уменьшает количество ошибок. Этот метод совместим с автоматизированным инструментом секвенирования ДНК, в котором используются флуоресцентно меченные секвенирующие праймеры или дидезоксинуклеотидтрифосфаты (White, 1990). Полученные последовательности использовали для множественного выравнивания с известными последовательностями ITS локуса разных видов *Cladosporium* из базы данных NCBI. По результатам этого выравнивания при помощи программы Mega методом Maximum likelihood была построена дендрограмма. Согласно этой дендрограмме, мы предположили, что исследуемые образцы принадлежат к следующим видам: *C. ramotenellum*, *C. pseudocladosporioides*, *C. herbarum*, *C. anthropophilum*, *C. neolangeronii*. Образец из Дальнего Востока кластеризовался с *C. anthropophilum*, образцы из Симферополя – с *Davidiella tassiana* (*C. herbarum*) и *C. pseudocladosporioides*, образцы из Раменского района – с *C. pseudocladosporioides*, образцы из Чеховского района – с *C. ramotenellum*, образцы из Наро-Фоминского района – с *C. anthropophilum*, *C. neolangeronii* и *C. ramotenellum*. Это сапротрофные организмы. *C. pseudocladosporioides* и *C. herbarum* могут вызывать вторичные инфекции растений и оппортунистические инфекции человека (Bensch, 2015). *C. anthropophilum* выделяется из растений как эпифит (Tibpromma, 2019), но может быть вторичным патогеном.

Наличие этих видов на растениях томата в разных регионах РФ должно приниматься во внимание при разработке методов диагностики кладоспориоза томата и контроля развития послеуборочных болезней растений, также наличие этих видов должно учитываться при сборе образцов для исследования. Возможна дальнейшая специализация этих видов и переход их к паразитизму на культуре овощей защищенного грунта.

Список литературы:

1. Bensch K. et al. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium* //Studies in Mycology. 2015. 82:1 DOI: 10.1016/j.simyco.2015.10.001

2. Gardes M., Bruns T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts //Molecular ecology. 1993.2:2 DOI: 10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x
3. Lucentini C. G. et al. *Fulvia fulva* [syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*] races in Argentina are evolving through genetic changes and carry polymorphic avr and ecp gene sequences //European Journal of Plant Pathology.2021. 159:3. DOI: 10.1007/s10658-020-02181-9
4. McGilp L. Characterization of *Passalora fulva* and tomato leaf mold-associated fungi in Minnesota high-tunnels and the management of common high-tunnel tomato diseases. 2018.
5. Thomma B. P. H. J. et al. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae //Molecular Plant Pathology. 2005. 4:6. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2005.00292.X
6. Tibpromma S. et al. Morphology and multi-gene phylogeny reveal *Pestalotiopsis pinicola* sp. nov. and a new host record of *Cladosporium anthropophilum* from edible pine (*Pinus armandii*) seeds in Yunnan province, China //Pathogens. 2019. 8:4 DOI: 10.3390/pathogens8040285
7. White T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics //PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990.18:1 DOI:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОГРАММЫ БИОИНФОРМАТИКИ И ГЕНОМИКИ НА ОСНОВЕ ОНЛАЙН ИНСТРУМЕНТОВ

Орлова Н.Г.^{1,2}, Орлов Ю.Л.^{3,4}

1 – Финансовый Университет при Правительстве РФ, Москва 125993

E-mail: orlovanina2@mail.ru

**2 – Московский государственный технический университет гражданской
авиации, Москва 125993**

**3 – Первый МГМУ им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет), Москва
119991. E-mail: y.orlov@sechenov.ru**

**4 – Аграрно-Технологический Институт, Российский Университет Дружбы
Народов, Москва 117198**

Развитие направлений биоинформатики, биотехнологии, применения омиксных технологий, как переход на цифровые технологии в целом (цифровизация) требует подготовки современных образовательных программ, адаптации курсов для студентов, аспирантов и молодых специалистов. Вопрос разработки учебных курсов биоинформатики связан с необходимостью адаптации обучения к профилю образования студентов и слушателей различных дисциплин с инженерным, компьютерным, естественно-научным образованием, возможностью доступа к образовательным ресурсам, и современным тенденциям распределенных компьютерных вычислений. Работает программа «Приоритет-2030», создание цифровых кафедр в ведущих вузах России (<https://национальныепроекты.рф>). Методы Машинного обучения, Искусственного Интеллекта находят все большее применение в естественных науках, в том числе для обработки и анализа данных высокопроизводительного секвенирования, системно-биологических моделей (Orlov et al., 2022).

Цель предложенной работы - обучение цифровым специальностям, биоинформатике с использованием онлайн и гибридных подходов, в более направленном ключе - разработка онлайн курса биоинформатики с видеолекциями, теоретической и практической частью. Переход на дистанционное обучение требует выработки новых методик преподавания, с возможностью обучающихся выполнять самостоятельную

работу используя только интернет-ресурсы, что в свою очередь встречает ряд вызовов в связи с ограничением доступа к ряду онлайн сервисов в России (например, хранение данных в облачных хранилищах Google, платформы Zoom). По опыту преподавания биоинформатики студентам-математикам требуется не только другая подача материала, но и сама методика, в отличие от студентов медиков и студентов биологических специальностей, у которых недостаточно навыков в информатике, программировании, написании собственного кода.

Частичный переход на дистанционное обучение в России с 2020 года требовал выработки новых методик преподавания, с возможностью обучающихся использовать интернет-ресурсы и выполнять самостоятельную работу без доступа к стационарному компьютерному классу, в удаленном режиме. Авторами предложен обучающий курс по основам биоинформатики, использование элементов которого начиналось в Новосибирском госуниверситете с начала 2000-х годов, адаптировано для студентов Сеченовского Университета в Москве (<https://student.sechenov.ru/>), и позднее для Аграрно-технологического Института РУДН и других вузов. Сам материал по онлайн-инструментам биоинформатики - банкам данных и веб-сервисам обновляется ежегодно. Растут объемы баз данных, банки данных секвенирования, число полностью секвенированных персональных геномов, общее число научных публикаций, и сами программы и инструменты биоинформатики. Оперативное поддержание актуальной информации в преподаваемом курсе требует регулярного обновления.

В предложенном модульном курсе используются следующие блоки и онлайн-ресурсы биоинформатики:

- Банки данных биоинформатики. NCBI, GenBank, EMBL. Базы данных Геномного Института в Китае (BIG).
- Поиск гомологии с помощью BLAST и BLAT (BLAST-like alignment tool).
- Анализ эволюции генов. Филогенетические деревья. iTOL. Программы CLUSTAL. Tree Plot, NGPhylogeny.fr, PhyML
- Вторичная структура РНК. Петли и шпильки вторичной структуры. Формат записи. Визуализация структуры РНК. ViennaRNA, MFold, Unafold.
- Вторичная и третичная структура белка. Альфа-спирали и бета-нити. Пространственное выравнивание структур белков. Базы данных белков PDB, UniprotKB.
- Генные и метаболические сети. Теоретико-графическое представление. Белок-белковые и ДНК-белковые взаимодействия. Регуляторная генная сеть. TRANSFAC.
- Реконструкция генной сети. Ресурсы STRING-DB, GeneMANIA, Cytoscape.
- Выделение кластеров (узлов) в сети, статистические оценки. KEGG, Reactome.
- Генные онтологии (Gene Ontology). Определение категорий генных онтологий. DAVID и PANTHER.
- Геномные браузеры (навигаторы) NCBI, UCSC, Ensembl. Визуализация генома.
- Основы технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК. Анализ профилей ChIP-seq. Galaxy.
- Архив GEO NCBI (Gene Expression Omnibus). Расчет геномных профилей RNA-seq, ChIP-seq. Технологии секвенирования на основе микрочипов, SAGE/CAGE, EST.

Примеры практических задач курса - формирование списков генов, связанных с заболеванием, реконструкция ассоциативной генной сети, визуализация генной сети, расчет категорий генных онтологий, представленных в заданном списке генов, определение пространственной структуры белка. Эти задачи студенты способны решать самостоятельно, используя онлайн инструменты, с подготовкой рефератов и собственных публикаций. Отметим работы по моделям генных сетей глиомы (Gubanov et al., 2021), болезни Паркинсона (Орлов и др., 2021), метаболическому синдрому (Dergilev et al., 2021).

Благодарности: Проект реализуется победителем грантового конкурса для преподавателей магистратуры 2021/2022 Стипендиальной программы Владимира Потанина.

Список литературы:

1. Орлов Ю.Л., Галиева А.Г., Орлова Н.Г., Иванова Е.Н., Мозылева Ю.А., Анашкина А.А. (2021) Реконструкция генной сети болезни Паркинсона для поиска генов-мишеней. Биомедицинская химия. 2021. 67(3): 222-230 doi: 10.18097/PBMC20216703222
2. Dergilev AI, Orlova NG, Dobrovolskaya OB, Orlov YL. Statistical estimates of multiple transcription factors binding in the model plant genomes based on ChIP-seq data. Journal of Integrative Bioinformatics. 2021. 19(1): 20200036. doi: 10.1515/jib-2020-0036.
3. Gubanova N.V., Orlova N.G., Dergilev A.I., Oparina N.Y., Orlov Y.L. Glioblastoma gene network reconstruction and ontology analysis by online bioinformatics tools. Journal of Integrative Bioinformatics. 2021. 18: 20210031. doi: 10.1515/jib-2021-0031
4. Orlov Y.L., Ivanisenko V.A., Dobrovolskaya O.B., Chen M. Plant Biology and Biotechnology: Focus on Genomics and Bioinformatics. International Journal of Molecular Sciences. 2022. 23(12): 6759. doi: 10.3390/ijms23126759

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ *IN VIVO*, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ГИПОКСИЧЕСКИМ СТРЕССОМ

Оя П.С.

*Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия 394018
E-mail: lol221297@mail.ru*

Важное значение для сельского хозяйства и растениеводства имеют исследования, посвящённые изучению механизмов адаптации растительных организмов к изменяющимся внешним факторам. В естественных условиях растительные организмы нередко подвергаются гипоксическому стрессу в результате затопления. Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, КФ 1.4.1.3) растений - энзим, катализирующий обратимое превращение 2- оксоглутарата в глутамат, обеспечивая тем самым связь энергетического и пластического обменов, а также метаболизм углерода и азота. Кроме того, образующийся из глутамата ГАМК может выступать в качестве субстрата для активации ГАМК-шунта[1]. В геноме кукурузы обнаружено два гена- *GDH2* и *GDH1*, кодирующих а и в-субъединицы глутаматдегидрогеназы, соответственно [2]. К сожалению, роль ГДГ в адаптивной реакции растений к гипоксии изучена недостаточно. В связи с этим, целью данной работы являлось исследование динамики экспрессии генов глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы *Zea mays* L. в условиях гипоксии.

Как объект использовались листья 10-дневной кукурузы сорта Воронежская-76, выращенной гидропонно при 10-часовом световом дне. Растения, с предварительно удалённой корневой системой, делили на 2 группы. Контрольная группа помещалась в вакуум-эксикатор объёмом 5 л, куда непрерывно осуществлялся приток воздуха. Растения из опытной группы NO_2 инкубировались в вакуум-эксикаторе, куда в течение суток подавался азот из коммерческого баллона.

Активность ГДГ определяли путём измерения оптической плотности раствора по реакции аминирования при длине волны 340 нм.

В первые часы эксперимента в листьях кукурузы, экспонированных при гипоксии, наблюдалось увеличение активности ГДГ более чем в 1,5 раза. Максимум активности был зафиксирован с 3 по 12 ч инкубации, после чего отмечалось ее резкое снижение. После 24 ч инкубации, отмечено падение активности ГДГ до контрольного уровня. Было

установлено, что транскрипция гена *GDH1* при инкубации растений в среде с низким содержанием кислорода первоначально снижается в два раза, что, однако, к третьему часу сменяется его активацией. К 6 часу эксперимента относительный уровень транскриптов *GDH1* достигает своего максимума. В последующие часы концентрация мРНК данного гена постепенно снижается. Следует отметить, что в контрольной группе растений относительный уровень транскриптов гена *GDH1* практически не изменялся (изменения в пределах колебаний) на протяжении всего времени эксперимента. Проведенное исследование динамики относительного уровня транскриптов гена, кодирующего α -субъединицу ГДГ – *GDH2* показало, что уже в первые часы эксперимента ген инактивируется) - на 6 час эксперимента зарегистрировано минимальное значение уровня мРНК данного гена, что в некоторой степени коррелирует с максимумом транскрипционной активности гена *GDH1*. На протяжении всего времени эксперимента относительный уровень транскриптов гена, кодирующего α -субъединицу ГДГ остается на достаточно низком уровне, более чем в 9 раз ниже уровня значений, демонстрируемых в контрольной группе растений.

Таким образом, показано, что гипоксический стресс вызывает активацию глутаматдегидрогеназной активности за счёт дифференциальной экспрессии обоих генов исследуемого фермента, что может быть связано с перенаправлением потока 2-оксоглутарата на ГАМК-шунт.

Список литературы:

1. Епринцев А. Т. Каталитические и молекулярные аспекты функционирования изо- форм глутаматдегидрогеназы в кукурузе *Zea mays* L./ А. Т. Епринцев, Г. Б. Анохина, П. С. Оя, Я. И. Дедов// Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57, No 2. С. 163-171
2. Marchi L. Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is less thermostable than GDH1 and GDH2 isoenzymes / L. Marchi, E. Polverini et al. // Plant Physiol Biochem. 2014. Vol. 83. P. 225- 231.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ТИПОВ ЦМС В КОЛЛЕКЦИИ НОВЫХ СЕЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ *BRASSICA NAPUS*

Пырников А.С., Артюшин А.В., Соловьёв А.А., Милюкова Н.А.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва 127550***

E-mail: andrey.pyrsikov@yandex.ru

Рапс является ценнейшей масличной и кормовой культурой семейства крестоцветных, экономическая целесообразность выращивания которой сегодня остается одной из самых востребованных как на Российском, так и на зарубежном рынке. Содержание полувысыхающего масла в семенах рапса доходит до 45 %, белка – до 33 %, а минеральных веществ – до 5 % [3].

Возможности выращивания рапса на территории нашей страны практически не ограничены за счёт её географического положения. Анализ мировых и европейских цен свидетельствует, что выращивание рапса обеспечивает высокую рентабельность [1]. Кроме экономической выгоды, рапс положительно влияет и на экологическое состояние окружающей среды. В частности, установлено, что 1 га посевов культуры выделяет почти 10,5 млн. л кислорода [4]. Рапс – это возобновляемый источник сырья и энергии, который может занимать значительное место среди ведущих масличных культур, производимых в России. Поскольку он улучшает структуру почвы и удобряет ее благодаря развитой

корневой системе, то уже доказана целесообразность его использования в севооборотах [5].

Применение эффекта гетерозиса является одним из основных факторов повышения урожайности рапса и весьма перспективным направлением в его селекции. Для ускорения процесса получения семян с помощью ЦМС был идентифицирован целый ряд последовательностей митохондрий ассоциированных с разными типами цитоплазмы [2]. Были определены гены митохондрий, ответственные за стерильность растений.

Цель данного исследования заключалась в анализе коллекции, состоящей из 114 образцов *Brassica Napus* на определение типов цитоплазм (*ogura*, *napus*, *camelina* и *polima*). Для выявления типов ЦМС у данных вариантов после предварительного выделения ДНК была проведена ПЦР с использованием MSS-маркеров (mitotype-specific sequences) и маркеров P21/22 и P21/32 специфичных к генам *orf222* и *orf224*. Визуализация результатов ПЦР проводилась методом электрофореза в агарозном геле. Пары праймеров MSS-6 и MSS-14 позволили амплифицировать фрагменты ДНК размером 1387 п.н. и 342 п.н. С помощью пар праймеров P21/22 и P21/32 амплифицировали фрагменты 1102 п.н., 510 п.н. и 747 п.н. к генам *orf222* и *orf224* соответственно. У 14 образцов с фрагментами 342 п.н. и 1102 п.н. был подтвержден тип ЦМС *ogura*. У 53 образцов с фрагментами 1387 п.н. и 510 п.н. идентифицирован тип *polima*, а у 45 образцов из исследуемой коллекции с фрагментами 1387 п.н., 510 п.н. и 747 п.н. – тип *camelina*. В двух образцах, у которых присутствовал только один фрагмент 1102 п.н. был идентифицирован тип ЦМС *napus*.

Список литературы:

1. Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin IAP, Zhao M, Ma J, Yu J, Huang S (2014) The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. Nat Commun 5:3930–3930. <https://doi.org/10.1038/ncomms4930>
2. Wang X, Wang H, Wang J, Sun R, Wu J, Liu S et al (2011) The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. Nat Genet 43:1035–1039. <https://doi.org/10.1038/ng.919>
3. Wang J, Jiang J, Li X, Li A, Zhang Y, Guan R, Wang Y (2012) Complete sequence of heterogenous-composition mitochondrial genome (*Brassica napus*) and its exogenous source. BMC Genomics 13:675. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-675>
4. Yang J, Liu D, Wang X, Ji C, Feng C, Liu B, Hu Z, Sheng C, Pental D, Ju Y (2016) The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection. Nat Genet 48:1225–1232. <https://doi.org/10.1038/ng.3657>
5. Zhao, H. X., Li, Z. J., Hu, S. W., Sun, G. L., Chang, J. J., & Zhang, Z. H. (2010). Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by a multiplex PCR assay. Theoretical and applied genetics, 121(4), 643-650. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1336-3>

ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА АРТЕМИЗИНИНА ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ НЕРОДСТВЕННЫХ ПОЛЫНИ РАСТЕНИЙ

**Рахманов Б.К., Имамходжаева А.С., Усманов Д.Э., Мирзахмедов М.Х.,
Убайдуллаева Х.А., Шерматов Ш.Э., Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю.**

**Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан,
Ташкент 111215, Узбекистан; E-mail: bakhtiyor.rakhmanov@gmail.com**

Артемизинин представляет собой сесквитерпеновый лактон, а полынь однолетняя (*Artemisia annua* L.) является его единственным источником. Артемизинин обладает терапевтическими свойствами против малярии, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, аллергического контактного дерматита, рака и других заболеваний. В

научных исследованиях коронавирусной инфекции COVID-19, ставшей источником всемирной пандемии, также был выявлен положительный потенциал артемизинина [1, 2, 3, 4]. В медицине артемизинин используется широко и учитывая тот факт, что его невозможно получить из подос в достаточно большом количестве, ожидается, что спрос на артемизинин значительно возрастет в ближайшем будущем.

По этим причинам производство артемизинина в больших объемах для удовлетворения потребности населения в качественной продукции является одной из наиболее актуальных глобальных проблем. Нами проведен биоинформатический анализ генов, участвующих в биосинтезе артемизинина, а также *in silico* созданы высокоэкспрессивные генетические конструкции на их основе. В мировой литературе есть данные о трансформации *Nicotiana benthamiana* и ряда сельскохозяйственных культур с использованием *Agrobacterium tumefaciens*. В настоящее время нами проводятся эксперименты по трансформации других культур, которые находятся в стадии каллусообразования. Наша следующая задача- получение растений-регенерантов *in vitro* методом соматического эмбриогенеза.

В результате наших исследований будут получены растения-трансформанты, содержащие гены биосинтеза артемизинина, эктопическая функция которых позволит им продуцировать артемизинин.

Список литературы:

1. D.H.J. Cheong, D.W.S. Tan, F.W.S. Wong, T. Tran. Antimalarial drug, artemisinin and its derivatives for the treatment of respiratory diseases. *Pharmacol Res*, 158 (2020), p. 104901.
2. T. Uzun, O. Toptas. Artesunate: could be an alternative drug to chloroquine in COVID-19 treatment? *Chin Med*, 15 (2020), p. 54.
3. Fuzimoto AD. An overview of the anti-SARS-CoV-2 properties of *Artemisia annua*, its antiviral action, protein-associated mechanisms, and repurposing for COVID-19 treatment. *J Integr Med*. 2021 Sep;19(5):375-388. doi: 10.1016/j.joim.2021.07.003. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34479848; PMCID: PMC8378675.
4. World health Organization. 19 July 2021. Global technical strategy for malaria 2016-2030, 2021 update. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme>.

МЕХАНИЗМЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ЗАЩИТНЫЙ ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ОТВЕТ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ЭКЗОГЕННОМ ПРИМЕНЕНИИ дцРНК ПРОТИВ Y ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

Самарская В.О.¹, Спеченкова Н.А.¹, Маркин Н.В.², Супрунова Т.П.², Завриев С.К.¹, Калинина Н.О.^{1,3}, Тальянский М.Э.¹

1 - Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва 117997, E-mail: viktoriya.samarskaya2012@yandex.ru

2 - ООО «Дока-Генные технологии», Московская область 141880

3 - НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва 119234

Технология опрыскивания растений экзогенной двуцепочечной РНК (дцРНК) или спрей-индуцированный сайленсинг генов применяется для индукции устойчивости растений к вирусам сельскохозяйственных культур [1]. В настоящей работе мы использовали этот подход для обработки растений картофеля *Solanum tuberosum* препаратами дцРНК, гомологичной консервативному фрагменту гена репликазы Y вируса картофеля (дцРНК-YВК), и изучили влияние экзогенной дцРНК на защитный ответ растений, основанный на механизмах специфической РНК интерференции (РНКи) [2] и неспецифического иммунитета, индуцируемого молекулярными паттернами,

ассоциированными с патогеном (РТИ), элиситором которого является дцРНК [3] при заражении растений УВК и неродственным вирусом Х вирусом картофеля (ХВК).

Показано, что экзогенное применение дцРНК-УВК существенно (на порядок) снижает уровень вирусной РНК в зараженных растениях картофеля и сопровождается значительным накоплением малых интерферирующих РНК, маркера РНКи. Обработка растений дцРНК-УВК также приводит к увеличению экспрессии генов, связанных с неспецифическим иммунитетом (РТИ), таких как *WRKY29*, *RbohD*, *EDS5*, *SERK3* и *PR-1b*.

Вместе с тем неспецифический механизм защиты оказался не способен ингибировать репликацию ХВК, вируса неродственного УВК. Таким образом, при применении дцРНК специфический механизм РНКи является основным механизмом, обеспечивающим устойчивость растений к вирусу, тогда как РТИ, индуцируемый дцРНК, является недостаточным для подавления вирусной инфекции.

Мы также проанализировали характер изменений в экспрессии генов, связанных с метаболизмом АДФ-рибозы. Известно, что полиАДФ-рибозилирование (РАрибирование) белков с помощью поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) и удаление этих фрагментов из состава белка с помощью поли(АДФ-рибоза) гликогидролазы (PARG) является важным механизмом, влияющим на иммунитет растений [4]. Причем PARG считается положительным регулятором толерантности к биотическому стрессу. Анализ экспрессии генов *PARP* и *PARG* методом RT-qPCR в образцах картофеля, показал, что ни сама дцРНК-УВК, ни вирусы (УВК или ХВК) в присутствии или в отсутствии дцРНК-УВК не влияли на уровень экспрессии гена *PARP1*. Напротив, экспрессия гена *PARG* значительно повышалась (более, чем в 10 раз) при обработке растений только УВК-дцРНК по сравнению с контролем (необработанными растениями). Вирусная инфекция (УВК и ХВК) также приводила к увеличению экспрессии гена *PARG*, но в меньшей степени, чем только одна УВК-дцРНК. Обработка растений УВК-дцРНК в условиях вирусной инфекции (УВК и ХВК) сопровождалась снижением уровней экспрессии гена *PARG* практически в два раза до уровней экспрессии, выявляемых в условиях вирусной инфекции. Сходным образом менялось и количество PAR, продукта гидролиза РАрибированных белков. Эти данные указывают на важную роль PARP/PARG в защитном ответе растения на вирусную инфекцию.

Полученные результаты перспективны для разработки подходов для эффективной защиты сельскохозяйственных культур от вирусных инфекций при совместном использовании защитных механизмов растений, основанных на специфической РНК интерференции, неспецифическом иммунитете и регуляции метаболизма поли(АДФ-рибозы).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-14-00049).

Список литературы:

1. Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Exogenous RNAs for Gene Regulation and Plant Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:2282.
2. Yang Z., Li Y. Dissection of RNAi-Based Antiviral Immunity in Plants. *Curr. Opin. Virol.* 2018;32:88–99.
3. Niehl A., Heinlein M. Perception of Double-Stranded RNA in Plant Antiviral Immunity. *Mol. Plant Pathol.* 2019;20:1203–1210.
4. Feng B., Liu C., de Oliveira M.V.V., Intorne A.C., Li B., Babilonia K., de Souza Filho G.A., Shan L., He P. Protein Poly(ADP-Ribosyl)ation Regulates Arabidopsis Immune Gene Expression and Defense Responses. *PLoS Genet.* 2015;11:e1004936.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ *SOLANUM LYCOPERSICUM* ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Серганова М.А, Меркулов П.Ю, Киров И.В.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550; E-mail: melany02@mail.ru

Мобильные генетические элементы (транспозоны) – последовательности ДНК, которые могут перемещаться внутри генома. Многочисленными исследованиями показано, что транспозоны являются факторами фенотипической изменчивости. Так, например, различные морфотипы *Brassica rapa* [1] и появление других агрономически ценных признаков у различных видов растений опосредовано транспозиционной активностью мобильных элементов, что делает перспективным изучение данных последовательностей не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения. Было показано, что ретротранспозоны семейства *Rider* способствовали появлению различных вариаций фенотипов по цвету и форме плодов в томатах *Solanum lycopersicum* [2].

Таким образом умение использовать мутагенный потенциал транспозонов открывает возможность генерировать генетические и эпигенетические вариации, из которых могут возникнуть ценные сельскохозяйственные признаки.

Однако мутагенная активность мобильных элементов может также приводить к нежелательным мутациям и нестабильности генома, ввиду чего в клетках растений функционируют системы эпигенетического сайленсинга мобильных элементов. К таким системам относятся РНК-интерференция и РНК-направленное метилирование ДНК.

РНК-интерференция – это процесс подавления экспрессии гена на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях через систему малых двуцепочечных РНК и ассоциированных белков. РНК интерференция приводит к деградации целевого транскрипта или к РНК-направленному метилированию ДНК. Одной из важных функций метилирования ДНК является стабильное подавление активности мобильных элементов. У растений канонический путь РНК-направленного метилирования ДНК опосредован РНК-полимеразой IV, в то время как неканонический путь зависит от РНК-полимеразы II.

Работой Thieme *et al.* была показана возможность химического ингибирования систем сайленсинга, что приводило к реактивации мобильных элементов и накоплению наследуемых инсерций мобильных элементов у *A. thaliana* [3]. В нашем исследовании с целью активации мобильных элементов у *Solanum lycopersicum* был использован тепловой стресс, а также вещества зебуларин и α -аманитин, которые являются ингибиторами ферментов ДНК-метилтрансферазы и РНК-полимеразы II, соответственно.

Среди полученных растений М0 было выявлено образование плодов нетипичной формы. Для детекции наследуемых генетических изменений нами были получены семена и выращена популяция растений М1. Среди данных растений были обнаружены фенотипы, отличающиеся от контрольных по интенсивности общего роста и развития боковых побегов. В дальнейшем все растения М1 будут проанализированы на наличие новых наследуемых инсерций мобильных элементов, а также опосредованные ими генетические изменения.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации (грант МК-47.2022.5).

Список литературы:

1. Cai X. Transposable element insertion: a hidden major source of domesticated phenotypic variation in *Brassica rapa* / X.Cai, R.Lin, J.Liang, G.J.King, J.Wu, X.Wang // Plant Biotechnology Journal. – 2022. – Vol. 20. - №. 7. – pp. 1-41

2. Benoit M. Environmental and epigenetic regulation of *Rider* retrotransposons in tomato / M. Benoit, H.G. Drost, M. Catoni, Q. Gouil, S. Lopez-Gomollon, D. Baulcombe, J. Paszkowski // PLOS Genetics. – 2019. – Vol. 15. – № 9. – e1008370
3. Thieme M. Inhibition of RNA polymerase II allows controlled mobilisation of retrotransposons for plant breeding / M. Thieme, S. Lanciano, S. Balzergue, N. Daccord, M. Mirouze E. Bucher // Genome Biology. – 2017. – Vol. 18. – №. 1. – pp 1-10

CLASSIFICATION OF WILD ANIMALS FROM THE GENUS *PHACOCHOERUS*, *POTAMOCHOERUS* AND *SUS* ON THE BASIS OF THE ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF THE *MC1R*, *NR6A1* AND *HEPH* GENES

Snytkov E.V., Kipen V.N.

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
220072, Republic of Belarus, Minsk, st. Academic, 27
e-mail: evsnytkov@gmail.com

Introduction. The main attention in solving the problem of differentiating wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) is given by forensic experts in the production of poaching examinations. In 2017, to implement the methodology in the expert laboratories of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, a test system was proposed based on the analysis of two SNPs [1].

Subsequently, we developed and tested on practical material a scheme for the differentiation of wild boar and domestic pig using three SNPs: H3GA0051814 (*HEPH*), c.367G>A (*MC1R*) and g.299084751C>T (*NR6A1*) [2]. This approach compares favorably with the original one, first of all, by its versatility (suitable for differentiation, including domestic pig breeds of Asian origin), as well as high accuracy and specificity.

However, in addition to the wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and the domestic pig (*Sus scrofa domesticus*), the genus *Sus* also includes the bearded pig (*Sus barbatus*), the Visayan warty pig (*Sus cebifrons*), the Celebes pig (*Sus celebensis*) and the Javanese pig (*Sus verrucosus*). Closely related to these animals are also representatives of the genus *Potamochoerus* - the brush-eared pig (*Potamochoerus porcus*) and the bush pig (*Potamochoerus larvatus*), and the genus *Phacochoerus* - the common warthog (*Phacochoerus africanus*).

Purpose of the study. We analyzed the genomes (in SRA format) of these biological species and determined in silico genotypes for SNPs in the *HEPH*, *MC1R*, and *NR6A1* genes from [2].

Materials and methods. For bioinformatics analysis, animal genomes were used, which are publicly available in the SRA format (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), which were additionally converted into *.fasta format using the SRA-Toolkit v.2.11 package. To automate the process of searching for in silico nucleotide sequences flanking the desired allele, a script in the Python v.3.10 programming language was used using the Jupyter Notebook software development environment. The chromosomal position for the SNP was determined for the genome assembly version Sscrofa11.1 (GCF_000003025.6). Samples analyzed were: SAMEA6141235 (*Phacochoerus africanus*), SAMEA6141236 (*Potamochoerus larvatus*), SAMEA6141237 (*Potamochoerus porcus*), SAMEA6141238 (*Sus barbatus*), SAMEA6141239 (*Sus barbatus*), SAMEA6141240 (*Sus barbatus*), SAMEA6141242 (*Sus cebifrons*), SAMEA6141245 (*Sus verrucosus*).

Results. As a result, the genotype for three SNPs—H3GA0051814 (*HEPH*), c.367G>A (*MC1R*), and g.299084751C>T (*NR6A1*) – was as follows: SAMEA6141235 – G allele/C/CT allele, SAMEA6141236 – GA/CC /CT, SAMEA6141237 – GA/CC/CT, SAMEA6141238 –

GA/CC/CT, SAMEA6141239 – GA/CC/CT, SAMEA6141240 – GA/CC/CT, SAMEA6141242 – GA/CC/CT, SAMEA6141244 – GA/-/CT, SAMEA6141245 – GG/CC/CT.

Conclusions. Thus, according to the scheme proposed in [2], only accession SAMEA6141245 (*Sus verrucosus*) was classified as "Wild boar", for the rest of the accessions the class ("Wild boar" or "Domestic pig") was impossible to determine.

Our further search for SNPs with a high differentiating potential to distinguish between *Sus scrofa scrofa* and the domestic pig *Sus scrofa domesticus* should help to solve this problem in the future.

Literature:

1. Котова С.А., Кипень В.Н., Рябцева А.О. и др. Методика установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида Кабан европейский методом ПЦР-ПДРФ / Под ред. И.С. Цыбовского. Минск: Право и экономика, 2017. 22 с. ISBN:978-985-552-751-1 (<https://e-catalog.nlb.by/Record/BY-NLB-br0001453546>)
2. Анализ полиморфизма гена гестина (HEPH) на X-хромосоме для установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида *Sus scrofa* / Кипень В.Н., Иванова Е.В., Снытков Е.В., Верчук А.Н. // Генетика. 2020. Т. 56. № 9. С. 1054-1064.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ЛОКУСЫ ГЕНОМА САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS*) ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ

Шалаева Т.В., Шилов И.А.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Россия, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
E-mail: shalaeva.tv@mail.ru, ishilov@rambler.ru*

Сахарная свёкла является важной технической культурой, на долю которой приходится примерно 40% мирового производства сахара. В настоящее время к числу важнейших хозяйственно-ценных требований к сорту, помимо выхода сахара с единицы сырья и площади посева, относятся повышение технологической пригодности сырья, получение семян с высокими посевными и физическими свойствами, толерантность к гербицидам, устойчивость к болезням, вредителям, факторам внешней среды, а главное – рентабельность производства в области семеноводства и возделывания коммерческих посевов сахарной свёклы. Современные гибриды создаются на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) и состоят, как минимум, из трёх компонентов: МС-линия, линия О-типа и линия-опылитель [1]. Таким образом, для стабильного получения коммерческого гибрида при ведении промышленного семеноводства сахарной свёклы (*Beta vulgaris*) необходимо строго следить за качественным поддержанием и размножением линий-компонентов гибридов.

Микросателлитный анализ представляется перспективным лабораторным методом для сопровождения селекции и семеноводства, поскольку с его помощью можно получать уникальные и стабильно воспроизводимые ДНК-профили растительных форм (праймеры комплементарны консервативным участкам генома). Кроме того, микросателлитные маркеры являются кодоминантными, что позволяет использовать их для отслеживания наследования геномов родительских линий в компонентах гибридов. В ряде публикаций, как зарубежных, так и отечественных учёных приводится большое количество информации о микросателлитных локусах генома сахарной свёклы. Однако для внедрения

в селекционную практику требуется разработка высокопроизводительной и удобной в применении технологии генетического анализа.

Для создания такой технологии, которая позволяет получать стабильные ДНК-профили, требуется более детальное изучение микросателлитных локусов генома сахарной свёклы на большой выборке верифицированного селекционного материала. Совместно с селекционерами ФГБНУ Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свёклы нами была отобрана коллекция из 146 образцов сахарной свёклы (*Beta vulgaris*), включающая 28 МС-линий, 28 линий О-типа, 82 линии-опылителя, 6 гибридов отечественной селекции (Азимут, Корвет, Первомайский, Рубин, Фрегат, Успех), гибриды Добрава и Доротея. Этот растительный материал был проанализирован с помощью 12 микросателлитных локусов FDSB502, FBSB1001, FDSB1033, Unigene 27833, Unigene 26753, Unigene 16898, Unigene 17623B, Unigene 15915, Unigene 17923, SB 04, SB 09, SB 15 [2]. Аллельные варианты каждого локуса были амплифицированы, клонированы в плазмидный вектор pAL2-T и секвенированы. Результаты секвенирования аллельных вариантов микросателлитных локусов FDSB 1001, FDSB 1033, Unigene 16898, Unigene 17623B, Unigene 26753, Unigene 17923, Unigene 27833, SB04 подтвердили, что полиморфизм длин этих локусов обусловлен исключительно количеством tandemных повторов в амплифицируемом фрагменте ДНК. Локус Unigene 15915 был исключен из дальнейшей работы, поскольку в нуклеотидных последовательностях его аллельных вариантов помимо микросателлитных повторов (AC)_n были выявлены дополнительные инсерции и делеции. Полиморфизм аллельных вариантов микросателлитных локусов SB 09, SB 15 и FDSB 502 обусловлен сложными/составными повторами. При этом локусы SB 09 и SB 15 были оставлены для дальнейшей работы, поскольку обеспечивали получение стабильных ДНК-профилей. В аллельных вариантах локуса FDSB 502 был выявлен полиморфизм (TC)_n(GAT)_n(AAG)_n, что в ряде случаев может осложнять интерпретацию результатов анализа. Для создания технологии генетического анализа линий и гибридов сахарной свёклы нами было предложено использование праймеров, фланкирующих только вариабельные микросателлитные повторы (GAT)_n и (AAG)_n, поскольку участок ДНК, содержащий микросателлитный повтор (TC)_n низкополиморфным.

Таким образом, для генотипирования линий и гибридов сахарной свёклы представляются перспективными 12 микросателлитных локусов, которые обеспечивают получение стабильных и однозначно интерпретируемых ДНК-профилей.

Полученные в данном исследовании результаты могут в дальнейшем быть использованы для создания технологии генетического анализа линий и гибридов сахарной свёклы, которая может стать надежным инструментом для сопровождения селекционного процесса и промышленного семеноводства сахарной свёклы.

Список литературы:

1. Балков И.Я. Эволюция сахарной свёклы: от огородных форм до современных рентабельных гибридов / И.Я. Балков, С.Д. Каракотов, А.В. Логвинов, В.А. Логвинов, В.Н. Мищенко // Монография. – 2017. – Щелково. – 384 с.
2. И.А. Шилов, Ю.В. Анискина, Т.В. Шалаева, О.С. Колобова, Н.С. Велишаева, В.Н. Мищенко, А.В. Логвинов Создание современных гибридов сахарной свёклы с применением микросателлитного анализа // Сахар – 2020 – № 8 – С. 27 – 31.

МОДИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ FC-ФРАГМЕНТА АНТИТЕЛА, НАПРАВЛЕННОГО ПРОТИВ ОНКОБЕЛКА HER2/NEU И ПРОДУЦИРУЕМОГО В РАСТЕНИЯХ

Шешукова Е.В.¹, Камарова К.А.¹, Ершова Н.М.¹, Комарова Т.В.^{1,2}

- 1 – ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991. E-mail: iogen@vigg.ru
- 2 – ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва 119991.

Развитие биотехнологии в последние десятилетия позволило рассматривать растение как «фабрику» для получения рекомбинантных белков. Благодаря высокому уровню синтеза в растительной клетке и относительной простоте очистки антитела являются одним из перспективных объектов для продукции в растении. В настоящее время существует около сотни терапевтических моноклональных антител, применяемых в терапии различных заболеваний [1], в том числе HER2/неу-позитивного рака молочной железы. HER2/неу принадлежит к семейству рецепторов эпидермального фактора роста человека. Повышенный уровень HER2/неу, вызванный, как правило, суперэкспрессией кодирующего его гена *ErbB2*, выявляется в ~15-20% случаев рака молочной железы [2]. Ранее в нашей лаборатории было продуцировано в растениях антитело против HER2/неу, аминокислотная последовательность легкой и тяжелой цепей которого была идентична составу цепей трастузумаба [3,4]. Трастузумаб является пионерским антителом для терапии HER2/неу-позитивного рака молочной железы [2]. Вариант трастузумаба, получивший название маргетуксимаб, содержит аминокислотные замены в константной части тяжелой цепи, что приводит к более высокой аффинности Fc-домена антитела к рецептору CD16A, в результате чего механизм антитело-зависимой клеточной цитотоксичности активируется более эффективно [5].

Целью данной работы было получение в растениях антитела против HER2/неу с модифицированным константным доменом тяжелой цепи и проверка его антипролиферативной активности, а также способности связываться с Fc-gamma III рецептором на поверхности клеток.

Для продукции в растениях *Nicotiana benthamiana* рекомбинантных антител были созданы генноинженерные конструкции на основе бинарного вектора pCambia1300, содержащие промотор и терминатор транскрипции 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, а также последовательность, кодирующую легкую или тяжелую цепь антитела. Аминокислотная последовательность легкой цепи (ЛЦ) была идентична ЛЦ трастузумаба, в то время как в тяжелой цепи (ТЦ) были произведены замены. Fc маргетуксимаба согласно литературным данным содержит 5 аминокислотных замен по сравнению с трастузумабом (L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L) [5]. Мы внесли мутации, приводящие к заменам соответствующих аминокислот в ТЦ трастузумаба, получив несколько вариантов конструкций, кодирующих ТЦ* (ТЦ с заменами). Затем конструкции, кодирующие ЛЦ и ТЦ*, были введены в листья растений *N. benthamiana* с помощью агроинфильтрации и проведена оценка накопления и сборки антител. Оказалось, что для вариантов, содержащих замену L235V, выход собранных антител чрезвычайно низок, что делает нецелесообразной дальнейшую работу с ними. При этом вариант антитела Ат*⁴, содержащий ТЦ с 4 заменами – ТЦ*⁴ – показал высокий уровень накопления, не отличимый от уровня накопления в растениях трастузумаба. Известно, что внесение даже трех мутаций (F243L/R292P/Y300L) в Fc приводило к повышению эффективности узнавания антитела Fc-gamma III рецептором [6]. Таким образом, для дальнейших экспериментов мы выбрали вариант, который эффективно накапливается в растениях и содержит 4 мутации в ТЦ. Для проверки антиген-связывающих и антипролиферативных свойств из растений был выделен препарат антитела с помощью аффинной хроматографии на сефарозе с белком А. Выход антител составил 0,1 мг с 1 грамма листовой массы. Функциональная активность Ат*⁴ была оценена по способности ингибировать пролиферацию клеток ВТ-474 с повышенной экспрессией онкогена *HER2/neu (ErbB2)* при использовании МТТ-теста. Мы показали, что полученное антитело ингибирует пролиферацию клеток с такой же эффективностью, что и трастузумаб,

продуцированных в культуре клеток млекопитающих или в растениях. Таким образом, внесение мутаций в ТЦ не повлияло на способность антитела подавлять пролиферацию HER2/неу-положительных клеток. На следующем этапе мы провели проверку эффективности связывания Ат^{*4} с Fc-gamma рецептором IIIa на поверхности клеток с помощью метода проточной цитофлуориметрии с использованием антител, конъюгированных с FITC, и линии клеток CHO-K1.C16 с экспонированным Fc-gamma RIIIa. Мы показали, что для использованных концентраций антител – 0,1 и 1 мкг/мл – процент флуоресцирующих клеток, т.е. клеток, с которыми связалось антитело Ат^{*4}, превосходит показатели для продуцированного в растении антитела, имеющего немодифицированную аминокислотную последовательность трастузумаба. Таким образом, внесение 4 указанных мутаций в константный домен тяжелой цепи приводит к повышению способности антитела, продуцированного в растительной клетке, связываться с Fc-gamma RIIIa.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МК-3828.2022.1.4.

Список литературы:

1. Kinch, M.S.; Kraft, Z.; Schwartz, T. Monoclonal Antibodies: Trends in Therapeutic Success and Commercial Focus. *Drug Discov. Today* 2022, 103415, doi:10.1016/j.drudis.2022.103415.
2. Kreutzfeldt, J.; Rozeboom, B.; Dey, N.; De, P. The Trastuzumab Era: Current and Upcoming Targeted HER2+ Breast Cancer Therapies. *Am. J. Cancer Res.* 2020, 10, 1045–1067.
3. Komarova, T.V.; Kosorukov, V.S.; Frolova, O.Y.; Petrunia, I.V.; Skrypnik, K.A.; Gleba, Y.Y.; Dorokhov, Y.L. Plant-Made Trastuzumab (Herceptin) Inhibits HER2/Neu+ Cell Proliferation and Retards Tumor Growth. *PLoS ONE* 2011, 6, e17541, doi:10.1371/journal.pone.0017541.
4. Komarova, T.V.; Sheshukova, E.V.; Kosobokova, E.N.; Serebryakova, M.V.; Kosorukov, V.S.; Tashlitsky, V.N.; Dorokhov, Y.L. Trastuzumab and Pertuzumab Plant Biosimilars: Modification of Asn297-Linked Glycan of the MAbs Produced in a Plant with Fucosyltransferase and Xylosyltransferase Gene Knockouts. *Biochem. Mosc.* 2017, 82, 510–520, doi:10.1134/S0006297917040137.
5. Nordstrom, J.L.; Gorlatov, S.; Zhang, W.; Yang, Y.; Huang, L.; Burke, S.; Li, H.; Ciccarone, V.; Zhang, T.; Stavenhagen, J.; et al. Anti-Tumor Activity and Toxicokinetics Analysis of MGAH22, an Anti-HER2 Monoclonal Antibody with Enhanced Fcγ Receptor Binding Properties. *Breast Cancer Res. BCR* 2011, 13, R123, doi:10.1186/bcr3069.
6. Stavenhagen, J.B.; Gorlatov, S.; Tuaillon, N.; Rankin, C.T.; Li, H.; Burke, S.; Huang, L.; Johnson, S.; Bonvini, E.; Koenig, S. Fc Optimization of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability to Kill Tumor Cells In Vitro and Controls Tumor Expansion In Vivo via Low-Affinity Activating Fc Receptors. *Cancer Res.* 2007, 67, 8882–8890, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0696.

НАСЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ РНК-САЙЛЕНСИНГА И ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ У МУТАНТОВ СОРГО С УЛУЧШЕННОЙ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТЬЮ КАФИРИНОВ И ИХ ЭФФЕКТЫ НА СЕЛЕКЦИОННО-ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ

**Борисенко Н.В.¹, Эльконин Л.А.¹, Геращенко Г.А.², Кенжегулов О.А.¹,
Сарсенова С.Х.¹, Панин В.М.¹, Рожнова Н.А.²**

*1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока», Россия, 410010, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7,
E-mail: borisenco-n.v@yandex.ru*

*2 – Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского*

Сорго - одна из важнейших культур мирового земледелия, использование которой в качестве источника фуражного и пищевого зерна сдерживается из-за устойчивости его запасных белков (кафиринов) к протеолитическому расщеплению и низкого содержания незаменимых аминокислот, в первую очередь лизина [1]. Нами ранее у сорта зернового сорго Аванс, посредством агробактериальной трансформации, путем использования штамма, несущего вектор с генетической конструкцией для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина (*gKAF1*) [2], а также штаммов, несущих вектора CRISPR/Cas с генетическими конструкциями для геномного редактирования нуклеотидных последовательностей генов α - и γ -кафиринов (*k1C5* и *gKAF1*) [3], получены мутанты с улучшенной перевариваемостью белков зерна и повышенным содержанием лизина [4, 5]. Цель данной работы – изучить наследование введенных генетических конструкций и их влияние на перевариваемость белков зерна и проявление селекционно-ценных признаков у потомства мутантов.

Установлено, что генетическая конструкция для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина, как правило, стабильно наследуется в потомстве исходного мутанта Аванс-1/18, вплоть до поколения T_3 , улучшая перевариваемость запасных белков (до 81%, тогда как у исходного сорта Аванс перевариваемость, в зависимости от условий выращивания, варьирует от 37 до 59%). В потомстве разных растений из поколения T_2 наблюдается разный характер расщепления по устойчивости к глюфосинату аммония, кодируемой маркерным геном *bar*, входящим в состав конструкции для сайленсинга, а именно: 3:1 и 15:1. Такой характер расщепления может быть обусловлен наличием одной или двух копий конструкции, соответственно. Анализ текстуры эндосперма зерновок, завязавшихся на растениях T_2 , расщеплявшихся по устойчивости 15:1, показал, что соотношение зерновок с мучнистым (модифицированным) и стекловидным эндоспермом (дикий тип) также соответствовало расщеплению 15:1, которое подтверждало наличие у этих растений двух копий генетической конструкции для РНК-сайленсинга. Выявлены растения T_1 , в потомстве которых присутствовали только гомозиготы, характеризовавшиеся мучнистым типом эндосперма. Гетерозиготные растения, содержавшие одну копию генетической конструкции, имели более низкую перевариваемость, по сравнению с гомозиготными растениями и с растениями, у которых, по-видимому, присутствовало две копии генетической конструкции.

Было обнаружено, что мутантные линии T_2 , несущие данную генетическую конструкцию в гомозиготном состоянии, отличаются сниженными показателями высоты растения, длины подметельчатого междоузлия, урожая зерна с метелки и массы 1000 зерен. Вместе с тем, в поколении T_3 выявлена линия с высокой перевариваемостью (до 80%), у которой снижение агрономически-ценных признаков носило незначительный характер (–5...–6%), и которая, в этой связи, может представлять интерес для практической селекции. С использованием этой линии получены гибриды F_1 с ЦМС-линиями, характеризовавшиеся высокой урожайностью (35-38 ц/га и улучшенной перевариваемостью запасных белков (до 63%), тогда как у исходного сорта урожайность в данном опыте составляла 26 ц/га, перевариваемость – 37%).

В потомстве мутантов, полученных посредством сайт-направленного мутагенеза генов α - и γ -кафиринов с помощью векторов CRISPR-Cas, в поколении T_1 выявлены растения с улучшенной перевариваемостью кафиринов (до 80%), в том числе, такие, у которых конструкция CRISPR/Cas отсутствовала. Мутанты с улучшенной перевариваемостью имели твердый стекловидный эндосперм, в отличие от мутантов с улучшенной перевариваемостью, полученных ранее другими группами исследователей [1]. Такой тип эндосперма имеет большую агрономическую ценность, по сравнению с мучнистым эндоспермом, поскольку придает зерновке механическую прочность и

устойчивость к поражению грибными патогенами. Потомство большинства растений с улучшенной перевариваемостью белков зерна (семьи T₂), полученные из экспериментов с векторами CRISPR/Cas, по проявлению агрономически-ценных признаков не имело значимых отличий от исходного сорта Аванс.

Таким образом, нами достигнута главная цель использования технологии CRISPR/Cas: получены мутанты с мутациями в целевых генах, но не содержащие трансгенной генетической конструкции, индуцировавшей эти мутации. У полученных мутантов улучшено проявление важного хозяйственно-ценного признака – перевариваемости запасных белков зерна, который повышает питательную ценность и расширяет возможности использования сорго в сельскохозяйственном производстве.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №19-016-00117).

Список литературы:

1. Duressa D., Weerasoriya D., Bean S.R., Tilley M., Tesso T. Genetic basis of protein digestibility in grain sorghum. *Crop Sci.* 2018. 58:2183-2199.
2. Эльконин Л.А., Итальянская Ю.В., Доманина И.В., Селиванов Н.Ю., Ракитин А.Л., Равин Н.В. Трансгенное сорго с улучшенной перевариваемостью запасных белков, полученное путем агробактериальной трансформации. *Физиол. раст.* 2016. 63:721-734.
3. Gerashchenkov G.A., Elkonin L.A., Rozhnova N.A., Hiekel S., Kumlehn J., Chemeris A.V. Binary vector construction for site-directed mutagenesis of *kafirin* genes in sorghum. *American Journal of Plant Sciences.* 2021. 12:1276-1287.
4. Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S.Kh. RNAi-mutants of *Sorghum bicolor* (L.) Moench with improved digestibility of seed storage proteins. In: *Grain and Seed Proteins Functionality*, Ed. J.C. Jimenez-Lopez Intech Open Ltd., 2021. DOI: 10.5772/intechopen.96204
5. Elkonin L.A., Gerashchenkov G.A., Borisenko N.V., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S. Kh., Rozhnova N.A., Panin V.M. Site-directed mutagenesis of kafirin genes to improve the nutritious value of sorghum grain using CRISPR/CAS technology. *Plamic2022.* 2022. 246.

ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ АЛЛЕЛОПАТИИ В АГРОФИТОЦЕНОЗАХ: ПУТИ ИХ УЧЕТА И КОНТРОЛЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Градов О.В.

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова
(ФИЦ ХФ РАН), Отдел динамики химических и биологических процессов*

**E-mail: o.v.gradov@gmail.com*

В настоящем докладе рассматриваются подходы, предложенные автором с 2010-2011 г. (в период работы в лаборатории геохимии углерода ГЕОХИ РАН) по 2013-2016 гг. (в период работы в масс-спектрометрической лаборатории ИНЭПХФ РАН), поэтому часть аргументации может показаться несколько тривиальной. Однако, поскольку пока не встречалось в агротехнической литературе предлагаемых методических комбинаций и результатов их применения, а на русском языке представляемая тематика фактически не докладывалась и не публиковалась, сообщение о столь давних работах имеет смысл. Концептуальной основой методов анализа биологической изотопии углерода в задачах агробиологии и почвоведения (при рассмотрении почвы как "обменника" и биокосного тела) является представление о биологическом фракционировании изотопов, развитое в работах акад. Э.М. Галимова (и др.). При фотосинтезе реализуется обеднение изотопом ¹³C, причём растения суши обеднены ¹³C в большей степени, чем морской планктон, а у растений с разным типом фотосинтеза (C₃ carbon fixation и C₄ carbon fixation, известный

также как Hatch–Slack pathway) изотопный состав отличается в разных биохимических конституентах (липидов, белков, углеводов etc.). Это всё является энциклопедическими хрестоматийными сведениями, не требующими дополнения - за исключением новейших сведений о зависимости изотопного состава растений от спектрального состава света и режимов облучения при фотосинтезе (от 7 до 19 раз к воздуху, что экзотично и требует проверки) [1]. Исходя из этого, в многовидовых сообществах (агрофитоценозах) можно скоррелировать фотосинтетическую продуктивность и видовой состав (чувствительных неэквивалентно к разным спектральным диапазонам растений), включая миграцию тех или иных изотопов между видами в механизмах аллелопатии в агрофитоценозах, в том числе - при смене времён года и севообороте в различных феноспектральных условиях, характеризующихся различными эффективными температурами и спектрально-зональными эффективностями (энергетическими освещённостями).

Изотопные эффекты аллелопатии неоднократно исследовались с 1990-х гг. [2-7], как в лабораторных условиях либо на изолированных опытных полях, так и в натуральных условиях, однако, во-первых, анализировались, преимущественно, сорные растения, не представляющие агробиологической ценности (*Leptochloa spp.*, *Echinochloa crus-galli* - ежовник, *Lolium perenne* L. - плевел; исключая, пожалуй, только щавель кислый *Rumex acetosa*, рис посевной *Oryza sativa* и ещё ряд возделываемых культур), а, во-вторых, при этом не учитывался спектральный состав, феноспектральные параметры произрастания и изотопный обмен с почвой, тоже участвующей во фракционировании изотопов [8-10]. В то же время, существуют масс-спектрометрические методы контроля изотопии газов, аллелохимикатов и частично упорядоченных сред почвы (в т.ч. т.н. complex mixtures), в том числе - в режиме (полу)автоматизированного перманентного мониторинга вместе с измерением параметров среды, с которой обменивается изотопами растение. Например, существуют методы времяразрешенной масс-спектрометрии, используемые в анализе роста и развития растений, отслеживающие изотопию и позволяющие отслеживать ряд переходов между фазами онтогенеза растений, характеризующимися эмиссией разных аллелохимикатов и хемоаттрактантов, вызывающих разные эффекты в агрофитоценозе. С их помощью изотопный эффект может быть сопоставлен феноспектральным стадиям и комплексным онтогенетическим физиологическим изменениям растений, поскольку, как указано в основополагающей работе по мультипараметрической (мультифасетной) аналитике аллелопатии, "leaf water potential, turgor pressure, conductance, or a change in tissue carbon isotope ratio" () являются равнозначными индикаторами биоотклика.

Список литературы

1. Кулешова, Т. Э., Павлова, Е. С., Галль, Н. Р. (2020). Фракционирование изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ из углекислого газа атмосферы в продукты фотосинтеза в листьях растений в зависимости от спектральных характеристик световой среды. *Письма в Журнал технической физики*, 46(16), 19-22. <https://doi.org/10.21883/PJTF.2020.16.49848.18333>
2. Peñuelas, J., Ribas-Carbo, M., & Giles, L. (1996). Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. *Journal of Chemical Ecology*, 22(4), 801-805. <https://doi.org/10.1007/BF02033587>
3. Gealy, D. R., & Fischer, A. J. (2010). ^{13}C discrimination: a stable isotope method to quantify root interactions between C3 rice (*Oryza sativa*) and C4 barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in flooded fields. *WS*, 58(3), 359-368. <https://doi.org/10.1614/WS-D-09-00053.1>
4. Hussain, M. I., & Reigosa, M. J. (2012). Seedling growth, leaf water status and signature of stable carbon isotopes in C3 perennials exposed to natural phytochemicals. *Australian Journal of Botany*, 60(8), 676-684. <https://doi.org/10.1071/BT12072>
5. Gealy, D., Moldenhauer, K., & Duke, S. (2013). Root distribution and potential interactions between allelopathic rice, sprangletop (*Leptochloa spp.*), and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) based on ^{13}C isotope discrimination analysis. *Journal of chemical ecology*, 39(2), 186-203. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0246-7>

6. Hussain, M. I., & Reigosa, M. J. (2017). Evaluation of photosynthetic performance and carbon isotope discrimination in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under allelochemicals stress. *Ecotoxicology*, 26(5), 613-624. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1794-3>
7. Hussain, M. I., Reigosa, M. J., & Muscolo, A. (2018). Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) stable isotope composition provide new insights into phenotypic plasticity in broad leaf weed *Rumex acetosa* under allelochemical stress. *Molecules*, 23(10), 2449. <https://doi.org/10.3390/molecules23102449>
8. Boström, B., Comstedt, D., & Ekblad, A. (2007). Isotope fractionation and ^{13}C enrichment in soil profiles during the decomposition of soil organic matter. *Oecologia*, 153(1), 89-98. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0700-8>
9. Lewicka-Szczebak, D., Dyckmans, J., Kaiser, J., Marca, A., Augustin, J., & Well, R. (2016). Oxygen isotope fractionation during N_2O production by soil denitrification. *Biogeosciences*, 13(4), 1129-1144. <https://doi.org/10.5194/bg-13-1129-2016>
10. Gaj, M., Kaufhold, S., Koeniger, P., Beyer, M., Weiler, M., & Himmelsbach, T. (2017). Mineral mediated isotope fractionation of soil water. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 31(3), 269-280. <https://doi.org/10.1002/rcm.7787>
11. Градов, О. (2014). Novel phenospectral auxanometry using complexation of optical spectroscopy and chromatographic auxanometry or GC-MS-auxanometry in forest plant species vegetation phenological monitoring based on gas & flavor chemistry principles. *Int. Journ. Green Herb. Chem., Ser. A*, 3(2):555–579. <https://doi.org/10.31220/osf.io/s2v8z>
12. Градов, О. В. (2015). Хромато-ауксанометрия и хромато-масс-ауксанометрия в фенологическом стадийном мониторинге лесных пород на основе флейво- и газохимических принципов с автоматической динамической идентификацией паттернов. *Известия высших учебных заведений. Лесной журнал*, (347):34–66. <http://dx.doi.org/10.17238/issn0536-1036.2015.5.34>
13. Градов, О. В. (2016). Хромато-ауксанометрия и хромато-масс-ауксанометрия в фенологическом стадийном мониторинге лесных пород на основе флейво- и газохимических принципов с автоматической динамической идентификацией паттернов [Автореферат]. *Реферативный журнал ВИНТИИ сер. Биология*, (5(Сводный том, раздел 04В. Ботаника)):188–189–Реф. № 16.05–04В7.10.
14. Ambika, S. R. (2013). Multifaceted attributes of allelochemicals and mechanism of allelopathy. In *Allelopathy* (pp. 389-405). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30595-5_16

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ МАЛОНОВОГО АЛЬДЕГИДА В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ IN VIVO ПРИ ЗАСОЛЕНИИ ХЛОРИДОМ НАТРИЯ

Плотникова Е.В., Анохина Г.Б.

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, 394018
E-mail: kate_plotnikova36@mail.ru

Солевой стресс является распространенным абиотическим стрессом, ограничивающим рост, развитие и урожайность кукурузы. Кукуруза - одна из самых распространенных зерновых культур в мире, используемых в сельском хозяйстве. Механизм реакции на соль представляет собой очень сложный процесс, в котором у растений участвуют различные компоненты клетки. Поэтому очень важно выявить молекулярный механизм солеустойчивости данного вида растений.

Известно, что в условиях действия различных стрессовых факторов происходит накопление малонового диальдегида (МДА). Вследствие дальнейших биохимических превращений он окисляется до диоксида углерода или вступает во взаимодействие с

фосфолипидами, аминокислотами и нуклеиновыми кислотами [3]. В настоящее время малоновый диальдегид рассматривается в качестве маркера стресса. Поглотители антиоксидантов могут повысить прочность мембран и могут защитить виды растений от атаки АФК, уровень которых возрастает в условиях стресса. Активность поглощения АФК можно оценить по выработке МДА, который является продуктом распада липидов в стрессовых ситуациях. Содержание МДА отражает выработку АФК в тканях растений во время стресса и отвечает за нестабильность клеточной мембраны [2].

В качестве объектов исследования использовали листья 14-дневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) сорта «Воронежская 76», выращенные гидропонным методом с интенсивностью света 25 Дж/(м² с) при температуре 20°C и 10-часовом световом дне.

Постановка эксперимента по действию солевого стресса осуществлялась путём помещения растений из опытной группы, с предварительно удаленной корневой системой, в солевой раствор на сутки (24 часа). Солевой раствор представлял собой 150 мМ водный раствор хлорида натрия (NaCl). В качестве контрольной группы использовались растения, помещённые в воду на сутки (24 часа). У данной группы корневая система также предварительно удалялась. Первые образцы для исследования отбирались ещё до начала инкубации (нулевой образец) и из контрольной, и из опытной группы растений. Далее, образцы изымались из инкубационной среды через час, три часа, шесть часов и спустя сутки от начала эксперимента.

Содержание малонового диальдегида определяли спектрофотометрически при длине волны 532 нм [1].

В связи с тем, что в условиях действия некоторых стрессоров концентрация МДА увеличивается, целью работы являлось исследование уровня МДА в проростках кукурузы при засолении, вызванным 150 мМ раствором хлорида натрия. В рамках исследования было установлено, что уровень МДА возрастает уже спустя час от начала эксперимента, достигая максимума к 24 часу инкубации проростков кукурузы в солевом растворе. Это указывает на то, что 150мМ раствор NaCl индуцирует окислительный стресс в клетках кукурузы. Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что при воздействии солевого стресса на организм кукурузы наблюдается увеличение концентрации малонового диальдегида, что свидетельствует о наличии стресса в клетках растения.

Список литературы:

1. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 351с.
2. Taxon E. S., Halbers L. P., Parsons S. M. Kinetics aspects of Gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2020. – Т. 1868. – №. 5. – С. 140376.
3. Tejwani V. et al. Investigation of the NADH/NAD⁺ ratio in *Ralstonia eutropha* using the fluorescence reporter protein Peredox //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2017. – Т. 1858. – №. 1. – С. 86-94.

РАЗРАБОТКА HRM-МАРКЕРА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ У ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM CEPA* L.)

Нзеха М.¹, Ермолаев А.С.^{1,2}, Хрусталева Л.И.^{1,2}

1 – ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550;

E-mail: mais123nzeha@gmail.com

**2 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550; E-mail: biotech@iab.ac.ru**

Цитоплазматическая мужская стерильность (CMS) является оптимальной системой для производства гибридного лука F1, благодаря тому, что она обеспечивает снижение затрат и увеличение скорости процесса получения гибридных семян лука. Использование CMS значительно упрощает получение гибридов F1, что приводит к значительному повышению урожайности. Сегодня почти все коммерческие гибридные сорта лука F1 выведены и поддерживаются с помощью CMS. Явление CMS заключается в частичной или полной неспособности пыльников производить жизнеспособные пыльцевые зерна. CMS вызывается мутантными и химерными генами в митохондриальном геноме. Kim & Kim (2019) показали, что ген *orf725* является ответственным за индукцию CMS у лука. Разработка молекулярного маркера для идентификации типа цитоплазмы позволит значительно ускорить селекционный процесс лука репчатого поскольку станет возможным быстро определять стерильные и фертильные растения на раннем этапе их развития, не дожидаясь цветения. Метод HRM (High Resolution Melting) является высокопроизводительным и чувствительным методом, пригодным для проверки больших популяций и идентификации малейших изменений последовательности (SNP или инделы) в целевом сайте (Vossen et al. 2009).

Для разработки праймеров для HRM мы секвенировали фрагмент митохондриального гена *cox1* и его химерного варианта *orf725*. С использованием референсных последовательностей митохондриального генома нормальной цитоплазмы (GenBank: AP018390.1) и стерильной CMS-S (GenBank: NC_030100.1) были разработаны праймеры для получения ПЦР-продукта и его последующего секвенирования по Сэнгеру. Области 577 bp гена *cox1* и 594 bp химерного *orf725*, включающие консервативные и полиморфные последовательности, были секвенированы у 11 сортов лука репчатого (*Allium cepa* L.) с нормальной и стерильной цитоплазмами. Результаты секвенирования показали, что последовательность гена *cox1* и химерного *orf725* не отличались от референсных последовательностей, что может указывать на редкие события перестройки в митохондриальном геноме лука репчатого. С использованием полученных секвенсов нами была разработана система HRM маркеров, состоящая из одного общего F1 праймера на консервативную последовательность и двух реверсных праймеров на полиморфные последовательности *cox1* и *orf725* генов. С использованием нашей системы HRM маркеров можно легко отличить нормальную цитоплазму от CMS-S и CMS-R.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-317 от 20 апреля 2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агробιοтехнологии будущего»

Список литературы:

1. Kim, B., & Kim, S. (2019). Identification of a variant of CMS-T cytoplasm and development of high resolution melting markers for distinguishing cytoplasm types and genotyping a restorer-of-fertility locus in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 215(10), 1-11.
2. Vossen, R. H., Aten, E., Roos, A., & den Dunnen, J. T. (2009). High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. *Human mutation*, 30(6), 860-866.

ПОИСК ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ У ПШЕНИЦЫ В ГЕНОМЕ ТРИТИКАЛЕ

Саенко К.Ю.^{1,2}, Дудников М.В.¹

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, 127550; E-mail: biotech@iab.ac.ru

За счет активного роста посевных площадей, тритикале все чаще подвергается воздействию биотических стрессов [1,2]. Поиск среди генотипов тритикале генов устойчивости и их последующее применение в селекционных программах является благоприятным способом защиты зерновых культур от возбудителя стеблевой ржавчины за счёт гибридного происхождения данной зерновой культуры [3].

Коллекция сортов и линий тритикале, среди которых присутствовало 37 яровых и 81 озимых генотипов, из лаборатории маркерной геномной селекции растений и коллекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко, была оценена на наличие продуктов амплификации характерных для широко используемых в селекционных процессах генов устойчивости. Контролем служила коллекция сортов дифференциаторов ФГБНУ ФНЦБЗР. ДНК выделяли из проростков СТАВ-методом с модификациями [4].

Применение микросателлитных ПЦР-маркеров позволило провести генотипирование 118 сортов и линий тритикале на наличие маркеров, характерных для генов устойчивости: Sr23, Sr26, Sr31, Sr33, Sr38 и обнаружены генотипы, имеющие соответствующие продукты амплификации, однако среди изучаемых образцов не были выявлены ПЦР-продукты, характерные для генов Sr23, Sr26.

Список литературы:

1. The Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Available at <http://faostat.fao.org/>
2. Bender C. M., Boshoff W. H. P., Pretorius Z. A. Infection and colonization of triticales by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Canadian Journal of Plant Pathology. – 2021. – Т. 43. – №. sup2. – С. S198-S210. DOI: 10.1080/07060661.2021.1931453
3. Крупин П. Ю. и др. Анализ коллекции яровой тритикале по генам устойчивости к листовой ржавчине с помощью ПЦР-маркеров // Генетика. – 2019. – Т. 55. – №. 8. – С. 893-903. DOI: 10.1134/S0016675819080083
4. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic acids research. – 1980. – Т. 8. – №. 19. – С. 4321-4326. DOI:10.1093/nar/8.19.4321

МЕТОД ПОДТВЕРЖДЕНИЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Самарина М.А.^{1,2}, Архипов А.В.¹, Дивашук М.Г.¹

**1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва
127550**

**2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Российский государственный аграрный университет — МСХА
имени К. А. Тимирязева», Москва 125183
E-mail: Samarina.homa@yandex.ru**

В настоящее время многие научно-исследовательские лаборатории прибегают к различным методам редактирования хозяйственно-ценных генов, а основными методами проверки достоверности прохождения редактирования остаются секвенирование по Сэнгеру и NGS. Метод капиллярного электрофореза так же может быть использован для оценки прохождения редактирования, обнаружения делеций и инсерций размером в один и более нуклеотид, благодаря точности определения размеров амплифицированных фрагментов. Кроме того, использование капиллярного электрофореза позволяет

обнаружить растения, в которых не прошло редактирование, что позволит исключить их из дальнейших экспериментов, снизить финансовые затраты и объем работы.

Исследование было проведено на базе Центра коллективного пользования «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ и ООО «Синтол». Биоинформатическую обработку данных осуществляли через программное обеспечение UGENE (Россия). Выделение ДНК проводили из зеленой части растения, в начале и на более поздних стадиях вегетации, набором реагентов «ГМО Сорб-Б» (Синтол, Россия). ПЦР-амплификацию осуществляли по одному для всех пар праймеров режиму (95 – 3мин; 95 – 20сек, 60 – 30сек, 72 – 20сек – 35 циклов; 72 – 5мин), в стандартной ПЦР-смеси (Mg²⁺ 2.5мМ, dNTP 0.25мМ). Продукты амплификации визуализировали методом капиллярного электрофореза с помощью генетического анализатора Нанофор05 (ИАП, Синтол, Россия).

В работе были использованы 105 растений картофеля сорта «Вектор». Образцы прошли редактирование по двум точкам гена. В качестве контрольного образца использовалось исходное растение сорта «Вектор» не проходившее редактирование.

На первом этапе работы были подобраны три пары специфичных праймеров. Общая пара, фланкирующая участок гена, содержащий обе точки редактирования, и две пары, каждая из которых фланкирует по одной точке редактирования. К прямым праймерам на 5'-конец были добавлены флуоресцентные метки для одновременной детекции результатов сразу по нескольким каналам, что позволяет оценивать прохождение редактирования нескольких участков. Таким образом продукты амплификации всех трех маркеров могут одновременно анализироваться на фрагментном анализе.

В каждой постановке ПЦР и фрагментного анализа присутствует контрольный образец – растение, не проходившее редактирование. Точный размер амплифицируемого фрагмента контрольного образца позволяет в сравнении определить не только наличие редактирования у исследуемых растений, но и рассчитать размер инсерций и делеций, что в свою очередь позволяет найти растения с желаемым редактированием.

Среди 105 проанализированных растений было обнаружено 7 растений с целевым редактированием и 5 химерных растения.

После постановки фрагментного анализа было проведено подтверждение полученных результатов методом NGS. Результаты фрагментного анализа совпали с результатами NGS, что указывает, на возможность использования этого метода, для подтверждения редактирования.

Список литературы:

1. Irene Serrano, Yangnan Gu, Dong Qi, Ullrich Dubiella, Roger W. Innes. The Arabidopsis EDR1 Protein Kinase Negatively Regulates the ATL1 E3 Ubiquitin Ligase to Suppress Cell Death. 2014. doi:10.1105/tpc.114.131540
2. Lei Wu, Xiaoying Zhang, Bingxin Xu, Yueyue Li, Ling Jia, Rengang Wang, Xueliang Ren, Genhong Wang, Qingyou Xia Identification and expression analysis of *EDR1*-like genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) in response to *Golovinomyces orontii*. 2018. doi: 10.7717/peerj.5244

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ КЛЕЙКОВИНЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*T. AESTIVUM*) ПО ЛОКУСАМ GLU

Стрембовский И.В., Дивашук М.Г.

Традиционным прямым, и как следствие более точным, методом оценки качественных показателей клейковины у хлебопекарных сортов пшеницы является пробная лабораторная выпечка [1]. Как и многие прямые методы оценки данный метод сопряжён с уничтожением большого объёма семян, а значит его проведение возможно только на поздних этапах селекционного процесса, когда какие-либо мероприятия по улучшению сортообразца провести уже невозможно. Альтернативой прямым выступают косвенные методы оценки (при оценке клейковины - метод седиментации, определение ИДК и тд [2]), которые не требуют большого расхода семян на проведение, но и существенно уступают в точности прямым методам [3]. Отдельно от остальных косвенных методов оценки отстоит метод электрофоретического разделения запасных белков зерна [4, 5].

Электрофорез запасных белков мягкой пшеницы как косвенный метод анализа качества клейковины, не нашёл широкого применения у отечественных селекционеров из-за его дороговизны, но метод активно применяется в странах западной Европы, США и Канаде, Китае и Японии [6].

В целях оптимизации методики анализа были проведены работы по определению состава НМВ субъединиц глютелинов рабочей коллекции сортов мягкой и твёрдой озимой пшеницы (120шт.), и на основании этого спрогнозированы показатели качества клейковины. Расчётная оценка качества клейковины проводилась путём определения суммарного вклада субъединиц - расчёт score клейковины.

Параллельно основному анализу был проведён анализ генетической структуры коллекции по соответствующим аллелям Glu-A1, Glu-B1, и Glu-D1 тяжёлых субъединиц. Это позволило, при соблюдении необходимой повторности, оценить генетическую структуру популяции: определить долю гомо- и гетерозигот по соответствующим локусам (важно на этапе отбора элитных растений и оценки потомства) и определить наличие и характер засорения посевов.

Немаловажным этапом работы было накопление и систематизация информации по глютелиновому составу сортов, вовлекаемых в селекционный процесс в качестве родительских форм. Было установлено, что субъединицы 7+9 (субгеном В) присутствуют у 62% образцов, 7+8 у 24%, 6+9 у 10%, а на субъединицы 7, 13+16 и 20х+20у в сумме приходится только 4%.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-16-00121.

Список литературы:

1. Долгодворова Л.И. Селекция полевых культур на качество. М.: Изд-во МСХА, 1995, с. 180.
2. Коновалов Ю.Б., Пыльнев В.В., Хупацария Т.И., Рубец В.С. Общая селекция растений: учебник для вузов - 3-е изд., испр. - Санкт-Петербург : Лань, 2021. - 480с.
3. Под ред. профессора Пыльнева В.В. Практикум по селекции и семеноводству полевых культур: Учебное пособие - СПб.: Издательство «Лань», 2014. - 448с.
4. Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., & Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1418), 133–142. doi:10.1098/rstb.2001.1024.
5. Shewry, P. R., Halford, N. G., & Lafiandra, D. (2003). Genetics of Wheat Gluten Proteins. *Advances in Genetics*, 111–184. doi:10.1016/s0065-2660(03)01003-4.
6. Wieser, H., & Zimmermann, G. (2000). Importance of amounts and proportions of high molecular weight subunits of glutenin for wheat quality. *European Food Research and Technology*, 210(5), 324–330. doi:10.1007/s002170050558.

ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ «УЛУЧШИТЕЛЕЙ» ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ТРИТИКАЛЕ И РЖИ

Черноок А.Г.¹, Панченко В.В.²

1- ФГБНУ «Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва, Россия, E-mail: Irbis-sibrI@yandex.ru

2- ФГБНУ «НЦЗ имени П.П. Лукьяненко», Краснодар, Россия

Рожь (*Secale cereale* L.) является второй по важности продовольственной культурой после пшеницы и экономически важной культурой для функционального питания. Рожь считается полезной крупой благодаря высокому содержанию пищевых волокон и является богатым источником витаминов В и Е, минеральных веществ: Са, Fe, F, P, K, Zn, Mn, Cu, K [1]. Тритикале (*×Triticosecale* Wittmack), не так давно ставшая известной, является пшенично-ржаным гибридом и используется для многих направлений: фуражное, производство спирта, изготовление хлебобулочных изделий [2]. Тритикале может занять достойное место среди традиционных зерновых культур.

Гены *Grf* кодируют специфичные транскрипционные белки, которые играют важную роль в регуляции роста и развития растений. *Grf* принимают участие в таких процессах как: цветение, развитие семян и корней, контроль роста в условиях стресса и регуляция продолжительности жизни растений. У мягкой пшеницы идентифицировано 30 генов *TaGRF* на 12 хромосомах, а в первые *Grf* были описаны у риса [3]. В наших предыдущих работах мы показали зависимость массы тысячи зёрен и массы главного колоса от аллельного состояния гена *TaGrf3-2A* у яровой тритикале и пшеницы [4-5]. Гены *Grf* ржаного происхождения, насколько нам известно, ещё не были изучены и описаны в литературе. Мы предполагаем, что они также будут оказывать значимое положительное влияние на хозяйственно-ценные признаки у ржи и тритикале.

Мы частично секвенировали гомолог пшеничного гена *TaGrf3* на хромосоме 2R у образцов ржи и тритикале, обнаружили у него два гаплотипа и создали кодоминантный ПЦР-маркер для их определения. С помощью нового маркера мы изучили влияние аллелей *ScGrf3-2R* среди образцов коллекции яровой тритикале (170 образцов) и ржи (43 образца), предоставленных нам НЦЗ имени П.П. Лукьяненко (Краснодар).

В нашем исследовании было выявлено, что среди образцов яровой тритикале наличие аллеля *ScGrf3-2Rb* привело к увеличению содержания белка (на 0,5%) и клейковины (на 1,5 %) в зерне, также аллель *ScGrf3-2Rb* увеличил устойчивость растений к стеблевой ржавчине на 21%. В коллекции ржи мы обнаружили преимущественное наличие аллеля *ScGrf3-2Ra*, и только 3 образца имели аллель *ScGrf3-2Rb*, два из них характеризовались пониженной массой 1000 зёрен и числом зерна по сравнению с *ScGrf3-2Ra*. Наша работа имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Полученные нами результаты могут быть полезны в селекции тритикале и ржи для создания новых сортов с улучшенными признаками, а созданный молекулярный маркер позволит быстро включить *ScGrf3-2R* в селекционный процесс.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № государственного задания 0431-2022-0001.

Список литературы:

1. Popović D. et al. Economically significant production of *Secale cereale* L. as functional foods //Agriculture and Forestry. – 2022. – Т. 68. – №. 3. – С. 133-145.
2. Zhukov A. M. et al. Biochemical properties of triticale. Triticale sprouts in food technology //IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2022. – Т. 1052. – №. 1. – С. 012029.

3. van der Knaap, E.; Kim, J.; Kende, H. A Novel Gibberellin-Induced Gene from Rice and Its Potential Regulatory Role in Stem Growth. *Plant Physiology* 2000, 122, 695-704 <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.695>.
4. Divashuk et al. *TaGRF3-2A* Improves Some Agronomically Valuable Traits in Semi-Dwarf Spring Triticale. *Plants* 2021, 10, 2012 <https://doi.org/10.3390/plants10102012>.
5. Bazhenov et al. Alleles of the *GRF3-2A* Gene in Wheat and Their Agronomic Value. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 12376 <https://doi.org/10.3390/ijms222212376>.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ ИЗ РОДА *FUSARIUM* ВЫДЕЛЕННЫХ С КУЛЬТУР СЕМЕЙСТВА *SOLANACEAE*

Шингалиев А.С.¹, Мартынов В.В.¹, Енгальчева И.А.², Дудников М. В.¹

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550

**2 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства», Московская обл. 143080
E-mail: kronstein491@yandex.ru**

Род *Fusarium* — космополитический род мицелиальных аскомицетов, обладающий различным уровнем специализации (одни виды паразитируют на широком спектре растений - хозяев, другие - приспособлены только к одному виду растений) и широким спектром стратегий заражения [1].

Болезни, вызываемые фузариозом, являются причиной значительных потерь урожая томата, перца, баклажана не только в нашей стране, но и в мире. Различные виды грибов рода *Fusarium*, паразитирующие на представителях семейства *Solanaceae*, распространены практически во всех климатических зонах, различаются по типу питания и вызывают два экономически значимых заболевания: базальная гниль плодов и фузариозное увядание [2]. Кроме того, грибы рода *Fusarium* в зависимости от вида могут синтезировать различные микотоксины (ДОН-производные, зераленон-производные, фумонизины, фузариевая кислота, монилиформин, энниатины) [3], которые накапливаются в растениях и продуктах переработки, что в свою очередь негативно сказывается на качестве продукции.

Видовая идентификация грибов данного рода методом изучения морфологических признаков затруднена вследствие небольшого их количества и высокой вариабельности в зависимости от условий культивирования. Использование молекулярных методов диагностики позволяют в сжатые сроки определить вид патогена и провести генотипирование. Близкородственные виды обладают значительной вариабельностью только в некодирующих спейсерных областях – внутренних транскрибируемых спейсерах (ITS) и межгенных спейсерах (IGS). В связи с этим высоко вариабельные последовательности пригодны для оценки внутри- и межвидовой изменчивости грибов за исключением случаев, когда виды одного рода имеют идентичные последовательности ITS-участков.

В нашем исследовании были отобраны с различных географических точек 14 изолятов грибов рода *Fusarium*. С помощью пар праймеров ITS1(F) ITS4(R) и ITS5(F) ITS4(R) был проведён ПЦР-анализ [2], продукты которого далее были секвенированы. В результате анализа полученных последовательностей и сравнением их с базой данных

NSBI, мы смогли идентифицировать виды изолятов: *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*.

Список использованной литературы:

1. Summerell, B. A. (2019). Resolving Fusarium: Current Status of the Genus. Annual Review of Phytopathology, 57(1). doi:10.1146/annurev-phyto-082718-100204
2. Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., ... Kazan, K. (2013). Fusarium Pathogenomics. Annual Review of Microbiology, 67(1), 399–416. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650
3. Литовка Ю. А. Эколого-биологические особенности и биоконтроль грибов рода *Fusarium*, распространённых в наземных экосистемах средней Сибири: специальность 03.02.08 – Экология(биология):диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук / Литовка Юлия Александровна; «Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева». – Красноярск, – 2018. – 497с.
4. Wang N., Lu B. H., Yang L. N., Wang X., et al. Fusarium avenaceum Causing Fruit Rot on Rubus idaeus in Jilin Province, China. Plant disease – 2017. Vol 101, P. 1037.

СЕКЦИЯ
«КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *IN VITRO* И РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА»

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ЧЕСНОКА ОЗИМОГО НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПОВЫШЕННОЙ КИСЛОТНОСТИ ПОЧВЫ

Азопкова М.А.

**Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства - филиал
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный
научный центр овощеводства» (ВНИИО – филиал ФГБНУ ФНЦО), Московская
область 140153; E-mail: bioteh438@mail.ru**

Чеснок (*Allium sativum* L.) является ценной овощной и лекарственной культурой. Это вегетативно размножаемое растение требовательно к плодородию почвы и уровню pH 6,5-7 [1]. В настоящее время общая площадь кислых почв в России достигла 50 млн га. По результатам агрохимического обследования на 2016 г. кислые почвы (pH ≤ 5,5) занимали более 34,7 млн. га пашни (33%) [2,3]. При снижении pH ниже 5,5 урожайность сельскохозяйственных культур снижается до 30 %. При использовании современных биотехнологических методов можно получить в культуре *in vitro* генотипы, являющиеся ценным исходным материалом для селекции. Перспективными являются такие направления, как получение соматоклональных вариантов, клеточная селекция и мутагенез *in vitro*.

Цель исследования – получение растений - регенерантов чеснока озимого в условиях *in vitro* с повышенной устойчивостью к кислотности почв.

Исследования проведены в отделе биотехнологии и инновационных проектов ВНИИО - филиал ФГБНУ ФНЦО (Московская область, Раменский район) в 2019-2022 гг.

Материалом для исследований служили соцветия чеснока сорта Гладиатор, изолированные на 7 сутки после их выхода из пазух листьев, культивируемые на питательной среде MS [4], обогащенной 2,4-Д в концентрации 2,0 мг/л и кинетином - 0,5 мг/л, уровень pH среды: 4,5, 5,0, 5,5, 6,0. Дальнейшее культивирование каллуса на питательной среде, содержащей кинетин в концентрации 1,0 мг/л, способствует образованию в среднем 24 побега на 1 эксплант.

В результате проведенных исследований получены растения - регенеранты чеснока из каллуса на питательной среде с повышенной кислотностью. Доля адаптированных к условиям *ex vitro* растений - регенерантов, полученных на питательной среде с уровнем pH 4,5 составила 76,3%, в контроле (pH 6,0) - 75,0%. В открытом грунте изучено 87 однозубковых луковиц, полученных при выращивании растений-регенерантов чеснока на почве с повышенной кислотностью.

Проведена оценка клонов чеснока, полученных от растений *in vitro* из каллуса, на фоне с повышенной кислотностью. При выращивании растений – регенерантов в условиях открытого грунта 61,9% образуют однозубковые луковицы диаметром 1-1,5 см, из которых 57,7% формируют многозубковые луковицы. Отмечено, что средняя масса луковиц при pH 4,5 составляла 12,2 г, при pH 5,5 - 18,4 г, в контроле - 24,7 г.

Каждое полученное растение чеснока, выращенное на селективном фоне, является потенциальным исходным материалом для создания форм чеснока с повышенной устойчивостью к кислотности почвы.

Список литературы:

1. Пивоваров В.Ф. Луковые культуры [Текст]: монография / В.Ф. Пивоваров, И.И. Ершов, А.Ф. Агафонов.- М., 2001,- 500 с.
2. Муравин Э.А. Агрохимия [Текст]: учеб. для вузов/ Э.А. Муравин, В.И. Титова - М.: КолосС.- 2009.- 463 с.
3. Шафран С.А. Совершенствование нормативно-справочной базы для определения потребности сельскохозяйственных культур в минеральных удобрениях// Агрохимия.- 2019.- № 7.- С. 27-34. DOI: 10.1134/S00021881907111

4. Murashige T., Skoog F. /A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures//*Physiol. Plant.*-1962.- V.15. -No 13.- P.473-497.

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗЕРНОВОГО СОРГО, ВЫРАЩЕННОГО В СТЕПНЫХ АГРОЦЕНОЗАХ

Барановский А.В.¹, Косогова Т.М.² Меркулов А.Е.¹

**1 – Государственное образовательное учреждение высшего образования
«Луганский государственный аграрный университет», Луганск, 91011**

E-mail: inbotanlit87@list.ru

**2- Государственное образовательное учреждение высшего образования
«Луганский государственный педагогический университет», Луганск, 91011**

В настоящее время выращивание зерновых культур в Донбасском регионе сопряжено с влиянием неблагоприятных засушливых и суховейных явлений в период вегетации культур, значительного температурного стресса, недостатка и даже полного отсутствия продуктивной влаги в пахотном и подпахотном слоях почвы и длительных бездождевых периодов. Для адаптации растений к неблагоприятным факторам окружающей среды, стрессовым ситуациям в критические периоды роста и развития необходимы регуляция обмена веществ и структурные перестройки растительных клеток. В адаптационных процессах антистрессовое действие оказывают именно регуляторы роста растений. При предпосевной обработке семян защитно-стимулирующими композициями регуляторы роста снимают токсичное действие, как остатков почвенных гербицидов, так и протравителей, и тем самым способствуют ускорению роста растений, помогают в борьбе культурных растений с сорняками и засухой [3].

Анализ экспериментальных данных по применению регуляторов роста показывает, что в условиях недостаточного и несбалансированного уровня экологических факторов, реальный прирост урожая сельскохозяйственных культур составляет 10–13 %, а при оптимальном – стимуляторы роста дают дополнительный прирост урожая 15–22 %.

Таким образом, в регионах с годовым количеством атмосферных осадков до 450 мм, предпочтение следует отдавать предпосевной обработке семян регуляторами роста в смеси с их протравителями. Полное покрытие оболочки семян регуляторами с пленкообразующими веществами обеспечивает повышение полевой всхожести на 4–8 %, активизируется формирование гоморизной корневой системы у зерновых культур, увеличение водопоглощающей способности на 10–16 %, числа продуктивных стеблей на 12–18 %, и как следствие – соответствующее увеличение продуктивности посевов.

Регуляторы роста и развития растений применяются в сельском хозяйстве более 70 лет. Они успешно используются для устранения периодичности плодоношения культур, ускорения или замедления цветения и созревания плодов, торможения роста корне- и клубнеплодов при длительном хранении, повышения устойчивости к неблагоприятным факторам, для повышения урожайности и качества продукции [2]. Действие современных регуляторов роста достаточно полно изучено на главных полевых культурах степного региона: пшенице, ячмене, кукурузе, горохе, сое, рапсе, сахарной свекле, подсолнечнике, картофеле, овощных, плодовых ягодных и декоративных культурах, а также – винограде [1, 4].

Цель: Изучение влияния регуляторов роста растений – Вымпел, Келпак, Блек Джек на продуктивность зернового сорго среднераннего сорта Одесский 205 на опытном поле Луганского государственного аграрного университета.

В условиях однофакторного полевого опыта изучали действие трех регуляторов роста растений – «Вымпел» (ПЕГ-400 – 230 г/л, ПЕГ-1500 – 540 г/л, гумат натрия – 30 г/л),

«Келпак» в.р. (ауксины, 11 мг/л, цитокинины, 0,03 г/л: ф. «ТерраВита ЛТД», Кипр, производитель – ф. Келп Продактс Лтд», Южно-Африканская Республика), «Блек Джек» КС (гуминовая, фульво– и ульминовая кислоты (гумус – 20 %), кампания «Авентло Сарл», Швейцария, производитель – кампания «Амкол Минералз Европа Лтд», Великобритания) на продуктивность зернового сорго сорта Одесский 205. Предшественник – озимая пшеница. Фон минерального питания – средний (N₇₀P₄₀).

Установили, в засушливых условиях первой половины вегетационного периода 2016 г. предпосевная обработка семян препаратами «Вымпел К» и «Келпак» способствовала ускорению наступления фенофаз – всходы, начало кущения и выход в трубку, но на 2–3 дня ингибировала наступление фаз – выметывания метелок, цветения, что объясняется более усиленным кущением и мощным стеблеванием растений сорго, формированием листовой поверхности большей площадью, накоплением значительно большего количества надземной массы растений.

Наибольший период вегетации (118–119 дней) отмечен при совместном применении обработки семян и 3-х кратной обработки посевов сорго в виде некорневой подкормки растений в периоды наиболее усиленного и активного роста стебля. Высота растений сорго к моменту созревания была в пределах 129,1–149,1 см, а надземная масса составляла 2335...2403 г. При этом соотношение зерна к листостебельной массе растений составляло 1:1,69–1,90.

В 2016 г. анализ показателей структуры биологического урожая культуры показал, наибольшая сухая масса растений формируется при обработке семян препаратами «Вымпел» и «Келпак».

В 2017 году показатели продуктивности растений зернового сорго в посевах на изучаемых вариантах были намного ниже, чем в 2016 году. Это относится не только к сформированной массе 1000 зерен и массе зерна с метелки, но и общей массе растений в воздушно-сухом состоянии с 1 м² (более чем вдвое).

В 2018 году сложились экстремально засушливые и неблагоприятные условия для вегетации сорго. Продолжительная августовская засуха ускорила созревание посевов сорго к концу августа – началу сентября. Период вегетации без применения регуляторов роста растений составил 101 день.

За счет совместного использования для предпосевной обработки семян сорго препаратов «Келпак» и «Вымпел К» и 3-х кратной обработки посевов в период вегетации значительно увеличивались не только масса зерна с метелки (на 17,7–12,2 %), но и количество зерен в ней (на 9,9–5,3 %). При этом высота растений и длина ножки метелки изменялись незначительно.

Установлено, в 2016-2018 годы препараты «Келпак», «Блек Джек» и «Вымпел» оказывали наиболее эффективное воздействие при их комплексном применении.

В засушливые и жаркие годы (2017-2018 гг.) данными регуляторами роста достаточно обрабатывать только посевы в фазы 3–5 и 7–8 листьев, а также перед выметыванием метелки.

Наиболее эффективным приемом в среднем за 3 года было комплексное применение препарата «Вымпел».

Список литературы:

1. Барановский А.В., Косогова Т.М., Меркулов А.Е. Влияние применения регуляторов роста растений на продуктивность зернового сорго // Научный вестник ГОУ ВО ЛНР "ЛНАУ». 2019. 7(1). 553–565.
2. Дорожкина Л.А., Орешкин М.В., Денисенко А.И., Рыбина В.Н. Гербициды и регуляторы роста растений: учебное пособие. Луганск: ФЛП Пальчак. 2017. 252
3. Шаповалов А.А., Пуцыкин Ю.Г., Егоров Б.Ф. Новые химические средства для усиления гербицидного действия // Агрохимия. 2002. 12. 68–71.
4. Baranovsky A.V., Kosogova T.M., Kapustin S.I., Kapustin A.S. The effect of nitrogen fertilizers on the productivity of grain sorghum // Bioscience Research, 2020, V.17(1): 228–234.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО

Броносских Е.Д., Пивоварова Н.С.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, 197376; E-mail: ekaterina.bronskih@spcpu.ru

Шлемник байкальский – многолетнее растение семейства Яснотковых, которое содержит широкий спектр биологически активных веществ: флавоноиды, кумарины, пирокатехины и другие. Ареал распространения растения в России ограничен [2]. Учитывая это, его заготовка приводит к истощению природных популяций, поэтому актуальным становится разработка протоколов микроклонального размножения.

Для асептического введения в культуру *in vitro* использовали семена Шлемника байкальского, которые проращивали на питательной среде Мурасиге — Скуга с добавлением НУК 6 мг/л, кинетина 2 мг/л, тиамина 1 мг/л. Проращивание проводили в темноте при температуре +25°C и относительной влажности воздуха 60-70%. Ёмкости с проростками размещали на стеллажах световой установки при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16/8ч, освещенности 3000 лк.

На первом этапе микроклонального размножения для получения хорошо растущей стерильной культуры необходимо предварительно подобрать правильные условия для стерилизации посевного материала. В качестве стерилизующих агентов выбраны 3,5% раствор белизны (гипохлорит натрия), 3% раствор H₂O₂ и УФ излучение.

Стерилизацию исходного материала проводили по схеме:

1. Промывка проточной водой;
2. Обработка 70% раствором этанола;
3. Обработка стерилизующим агентом;
4. Трёхкратная промывка стерильной водой очищенной.

Соединения гипохлоритов являются клеточным ядом, оказывая высокое повреждающее воздействие на растительные объекты [3]. поэтому в опыте использовали 3,5% раствор белизны с временем экспозиции 10 минут. При таком способе стерилизации уровень контаминации не превышал 4%. Выживаемость проростков составляла 88%.

Для более щадящего воздействия выбрали 3% раствор H₂O₂ с временем выдержки 24 часа, так как перекись водорода, по сравнению с другими стерилизующими соединениями, оказывает наименьшее повреждающее действие на экспланты. В результате проведенного опыта контаминация составляла 50% при уровне выживаемости 100%.

Одним из перспективных направлений является использование УФ излучения, так как известно, что оно оказывает бактерицидное воздействие, а также стимулирует рост растений [1]. Семена обрабатывали в полuasептических условиях УФ лампой при длине волны 302-365 нм в течение 30 минут. При таком способе стерилизации наблюдался максимальный уровень контаминации (65%), при этом выживаемость проростков составляла 100%.

При проращивании семян на питательной среде в асептических условиях наблюдался малый процент всхожести, поэтому принято решение о вводе в культуру *in vitro* проростков растений.

После изучения результативности применения различных способов стерилизации семян в качестве стерилизующего объекта выбрали 3,5% раствор белизны, так как при его использовании наблюдалась оптимальное соотношение жизнеспособных и не контаминированных эксплантов. Стерилизацию эксплантов проводили при достижении длины стебля 2,0-2,5 см.

Проростки обрабатывали 70% раствором этанола (30 сек.) и 3,5% белизной (5 мин). При таком методе стерилизации в течение 14 дней наблюдался некроз тканей и гибель всех объектов. При этом контаминация минимальна и составляла 8%.

Для уменьшения повреждающего воздействия на экспланты сократили время экспозиции в растворе белизны до 2 минут. Такой способ обработки позволил увеличить выживаемость проростков до 45%, контаминация не превышала 12%.

Для полного предупреждения некроза тканей решили отказаться от воздействия основного стерилизующего агента, а проводить обработку только 70% раствором этанола с увеличением времени выдержки до 2 минут. В результате проведенных опытов наблюдали 80% выживаемость проростков, при этом уровень контаминации увеличился до 40%.

На втором этапе микроклонального размножения для получения и поддержания активно растущей культуры *in vitro* весьма важным является правильный выбор фитогормонов.

Для наращивания вторичных эксплантов полученные на предыдущем этапе асептические проростки пересаживали на среду Мурасиге — Скуга с добавлением тиамина в концентрации 1 мг/л, глицина — 2 мг/л и пиридоксина — 0,5 мг/л. Через 2 месяца культивирования на такой среде наблюдалось множественное побегообразование. Среднее число побегов составляло $19,6 \pm 0,5$ шт., средняя длина побегов — $13,8 \pm 0,7$ мм.

Далее проводили черенкование полученных побегов. С помощью скальпеля от них асептически отделяли эпикотиль. Черенки помещали на питательную среду, содержащую половину макросолей Мурасиге — Скуга с добавлением в качестве укоренителей 1 мг/л ИМК, 1 мг/л кинетина и 1 мг/л тиамина. В данном варианте не наблюдалось корнеобразование, а в течение 14 дней происходил процесс каллусогенеза с последующим морфогенезом. Можно предположить, что соотношение концентраций ауксина ИМК и цитокина кинетина было недостаточным. Уменьшение отношения ауксин/кинетин, по данным литературных источников, приводит к дифференциации побегов из каллусной культуры [4]. Среднее число побегов составляло $10,3 \pm 0,7$ шт., средняя длина побегов — $8,6 \pm 0,9$ мм.

Результаты исследования могут служить основой при составлении протоколов микроклонального размножения редких видов растений, а в частности — Шлемника байкальского, что позволяет создать базу ресурсов ценных видов лекарственных и пряно-ароматических растений в составе коллекций *in vitro* для сохранения их генофонда.

Список литературы:

1. Бронских Е.Д., Пивоварова Н.С. Обзор методов предпосевной стимуляции семян и стерилизации растительных объектов в условиях выращивания *in vitro* // IX Международная научная конференция молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». Сборник научных трудов, М., ФГБНУ ВИЛАР, 2021. - с. 103-109. doi.org/10.52101/9785870191027_2021_103
2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Литвиненко В.И., Попова Т.П., Суслов Н.И. Шлемник байкальский. Фитохимия и фармакологические свойства. Томск, 1994.
3. Мацнева, О. В. Эффективность применения стерилизующих агентов для эксплантов земляники / О. В. Мацнева, Л. В. Ташматова, В. В. Шахов // Селекция и сорторазведение садовых культур Т.5. – 2018. – № 1. С.71-73.
- Чумикина Л.В., Арабова Л.И., Колпакова В.В., Топунов А.Ф. Фитогормоны и абиотические стрессы (обзор) // Химия растительного сырья. 2021. №4. С. 5–30. DOI: 10.14258/jcprm.2021049196.

ИЗМЕНЕНИЯ В АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЕ КОРНЕЙ ТАБАКА СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ ЭКСПАНСИНОВ NTEXPA1 И NTEXPA5 ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Бережнева З.А., Кулуев Б.Р.

***Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ
УФИЦ РАН, Уфа 450054
E-mail: berezhneva-z@yandex.ru***

Экспансины играют важную роль в обеспечении роста корней при нормальных условиях и при действии абиотических стресс-факторов, таких как засуха, гипотермия, засоление и влияние тяжелых металлов. Они являются неферментативными белками, вызывающими обратимое разрушение водородных связей между гликанами и микрофибриллами целлюлозы, кроме того могут оказывать позитивное влияние на антиоксидантную систему [1, 2]. Кадмий способствует образованию АФК и вызывает окислительный стресс, которые нарушают структуру и компоненты растительной клетки [3]. Ранее нами были созданы трансгенные растения *Nicotiana tabacum* L со сверхэкспрессией генов экспансинов NtEXPA1 [4] и NtEXPA5 [5]. Целью данной работы являлась оценка антиоксидантной системы корней этих трансгенных растений в условиях кадмиевого стресса.

Трансгенные растения проращивали в климатостатах Binder (Германия) при температуре +25°C, освещенности 140 мкмоль/(м²с) и фотопериоде 16/8 часов на питательной среде МС. После 10 дней проращивания на селективной среде с гигромицином проростки с одинаковыми размерами корней переносили на вертикально-ориентированные чашки Петри со средой МС при нормальных условиях и с добавлением ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ. По истечению 10 дней эксперимента была проведена оценка антиоксидантной системы корней. С этой целью для корней трансгенных растений табака был проведен анализ следующих биологических соединений: активности ферментов супероксиддисмутаза, гваяколпероксидаза, аскорбатпероксидаза, каталаза, глутатион-S-трансфераза, содержания количества водорастворимых сахаров, окисленного и восстановленного глутатиона, малонового диальдегида, пролина. Также проводили оценку общей антиоксидантной способности и определяли содержание общего растворимого белка.

Общая антиоксидантная способность в корнях трансгенных растений при воздействии ацетата кадмия была выше по сравнению с диким типом. В корнях трансгенных растений при воздействии ацетата кадмия обнаруживалась повышенная активность ферментов аскорбатпероксидаза по сравнению с диким типом. Активность ферментов супероксиддисмутаза, гваяколпероксидаза, каталаза, глутатион-S-трансфераза при воздействии ацетата кадмия существенно не отличалась от дикого типа. В условиях кадмиевого стресса в корнях трансгенных по гену NtEXPA5 растений количество пролина было меньше по сравнению с диким типом. Содержание водорастворимых сахаров, малонового диальдегида при действии ацетата кадмия в корнях исследуемых трансгенных растений было на уровне дикого типа. Количество восстановленного глутатиона в корнях трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена NtEXPA1 было больше по сравнению с диким типом. Содержание белка и окисленного глутатиона было меньше в корнях трансгенных растений табака со сверхэкспрессией экспансинов по сравнению с диким типом.

Полученные нами данные позволяют говорить об участии экспансинов в обеспечении роста корней растений, в том числе, при действии кадмия, посредством влияния не только на компоненты клеточной стенки, но и на антиоксидантную систему,

что отражалось в виде увеличения общей антиоксидантной способности и активности некоторых ферментов.

Список литературы:

1. Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений. Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. стр. 805-819.
2. Cosgrove D.J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. Curr. Opin. Plant Biol. 2015;25:162-172. doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.014.
3. Сазанова К.А., Башмаков Д.И., Лукаткин А.С. Генерация супероксидного анион-радикала в листьях растений при хроническом действии тяжелых металлов. Труды КарНЦ РАН. Серия: Экспериментальная биология. 2012. № 2. стр. 119-124.
4. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Роль генов NtEXPA1 и NtEXPA4 в регуляции клеточного растяжения при росте листьев табака. Генетика. 2014. Т. 50. № 5. стр. 560–569. doi: 10.1134/S1022795414010074.
5. Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г., Князев А.В., Чемерис А.В. Влияние эктопической экспрессии гена NtEXPA5 на размеры клеток и рост органов трансгенных растений табака. Онтогенез. 2013. Т. 44. № 1. стр. 34–41. doi: 10.1134/S1062360413010049.

ИЗУЧЕНИЕ КАСПАЗО-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ, КАК ОСНОВНОГО ПРИЗНАКА ПКС МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ (*PETUNIA HYBRIDA* L.) ПРИ САМОНЕСОВМЕСТИМОМ ОПЫЛЕНИИ *IN VIVO*

Богатырева А.Л., Захарова Е.В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42, E-mail: iab@iab.ac.ru*

Самонесовместимость – генетически детерминированный репродуктивный барьер, препятствующий инбридингу и тем самым обеспечивающий поддержание видового разнообразия растений. В предыдущих исследованиях нашей группы было показано, что программируемая клеточная смерть является фактором самонесовместимости S-РНКазного типа у *Petunia hybrida* L. Остановка роста самонесовместимых пыльцевых трубок происходит при повышении уровня активности каспазо-подобных протеаз в первые часы опыления и к моменту остановки роста пыльцевых трубок наблюдаются все признаки ПКС (нарушение целостности плазматической мембраны, деградация/фрагментация ДНК, разрушение внутренней структуры пыльцевой трубки: отсутствие вакуолей, нарушение тургора и отделение клеточной плазматической мембраны от клеточной стенки) (Zakharova et al., 2021).

В данном эксперименте, проводили визуализацию каспазо-подобных протеаз в растущих *in vivo* пыльцевых трубках петунии с использованием Image-iT™ LIVE Green Caspase-3 and -7 Detection Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Цветки петунии отбирали через 2 часа после самонесовместимого и перекрестно-совместимого опылений. Делали тонкие продольные срезы (длиной 4 мм) пестика (рыльце и верхняя часть столбика), срезы помещали в 1,5 мл пробирки Эппендорфа; немедленно добавляли рабочий раствор, реагент FAM-DEVD-FMK FLICA, в PBS (pH 7.4) полностью покрывающий срезы; и инкубировали при температуре окружающей среды в темноте в течение 60 мин. Затем срезы погружали в 5 мМ пропидиум йодид, также инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин, двукратно промывали промывочным буфером, помещали на предметное стекло в каплю того же буфера и изучали под флуоресцентным микроскопом. Зеленый флуоресцентный сигнал являлся

прямым показателем активности каспазо-подобных протеаз, которая присутствовала в момент, когда реагент был добавлен.

Согласно полученным результатам, активность каспазо-подобных протеаз была обнаружена в 90% растущих *in vivo* самонесовместимых пыльцевых трубках (через 2 ч после самонесовместимого опыления). В случае совместимого опыления, активность каспазо-подобных протеаз отсутствовала. Активность была локализована в цитоплазме пыльцевой трубки и в ядре, которое показывает яркий зеленый сигнал.

Список литературы:

1. Zakharova, E. V., Timofeeva, G. V., Fateev, A. D., & Kovaleva, L. V. (2021). Caspase-like proteases and the phytohormone cytokinin as determinants of S-RNase-based self-incompatibility-induced PCD in *Petunia hybrida* L. *Protoplasma*, 258(3), 573-586.

ЦИТОКИНИНЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO* (НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ *P. HYBRIDA* L.)

Бравкова Е.В., Захарова Е.В.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42, E-mail: iab@iab.ac.ru***

Цитокинины (ЦК) – группа классических фитогормонов, которые участвуют в регуляции многих процессов развития (включая стимуляцию клеточного деления и клеточной дифференцировки, а также морфогенеза). Относительно недавно стало понятно, что в высоких концентрациях ЦК оказывают ингибирующее действие на рост растений и даже апоптотическое действие на клетки (Li et al., 2020). Однако их функции в формировании репродуктивных органов и во взаимодействии пыльца-пестик до сих пор изучены очень слабо. Ранее в нашей группе получены некоторые доказательства того, что ЦК участвуют в развитии мужского гаметофита и в функционировании механизма гаметофитной самонесовместимости S-РНКазного типа у петунии (*P. hybrida* L.) (Zakharova et al., 2021).

В данном эксперименте, мы проводили визуализацию каспазо-подобных протеаз в растущих *in vivo* пыльцевых трубках петунии с использованием Image-iT™ LIVE Green Caspase-3 and -7 Detection Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Цветки петунии обрабатывали зеатином в концентрации 10 мкМ за 2 часа до опыления, далее проводили совместимое опыление и через 2 часа отбирали цветки для анализа. Делали тонкие продольные срезы (длиной 4 мм) пестика (рыльце и верхняя часть столбика), срезы помещали в 1,5 мл пробирки Эппендорфа; немедленно добавляли рабочий раствор, реагент FAM-DEVD-FMK FLICA, в PBS (pH 7.4) полностью покрывающий срезы; и инкубировали при температуре окружающей среды в темноте в течение 60 мин. Затем срезы погружали в 5 мМ пропидиум йодид, также инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин, двукратно промывали промывочным буфером, помещали на предметное стекло в каплю того же буфера и изучали под флуоресцентным микроскопом. Зеленый флуоресцентный сигнал являлся прямым показателем активности каспазо-подобных протеаз, которая присутствовала в момент, когда реагент был добавлен.

Согласно полученным результатам, при совместимом опылении без обработки зеатином, активность каспазо-подобных протеаз не обнаруживалась. В случае обработки пестиков зеатином, наблюдалось яркое зеленое свечение цитоплазмы пыльцевых трубок через 2 часа после совместимого опыления. Таким образом, ЦК участвуют в активации

каспазо-подобных протеаз и запуске программируемой клеточной смерти в пыльце петунии.

Список литературы:

1. Li, Y.; Lin, Y.; Li, X.; Guo, S.; Huang, Y.; Xie, Q. Autophagy Dances with Phytohormones upon Multiple Stresses. *Plants* 2020, 9, 1038.
2. Zakharova, E. V., Timofeeva, G. V., Fateev, A. D., & Kovaleva, L. V. (2021). Caspase-like proteases and the phytohormone cytokinin as determinants of S-RNase-based self-incompatibility-induced PCD in *Petunia hybrida* L. *Protoplasma*, 258(3), 573-586.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ЭПИКОТИЛЕЙ ГОРОХА, ЭКЗОГЕННО ОБРАБОТАННЫХ ДОНОРОМ NO, В НОРМЕ

**Герасимов Н.Ю.¹, Неврова О.В.¹, Жигачева И.В.¹, Генерозова И.П.²,
Голощанов А.Н.¹**

**1 – Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН 119334, Россия,
Москва, ул. Косыгина, 4**

E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

**2 – Институт Физиологии растений им .К.А.Тимирязева РАН 127276, Россия,
Москва, ул. Ботаническая, 35**

Оксид азота (NO) является сигнальной молекулой клетки при стрессе. Известно, что воздействие стрессовых факторов может не только задерживать рост всего растения, листьев, корней, но и прорастание семян, а также скорость роста проростков. NO участвует в процессах адаптации, позволяя растению защищать себя от стресс-факторов путем предотвращения дисфункции митохондрий. Однако, о защитных механизмах оксида азота известно мало.

Натрий-μ2-дитиосульфатотетранитозилдиферрат тетрагидрат (ТНКЖ-тио) - кристаллический водорастворимый донор NO. Для исследования действия ТНКЖ-тио на структуру мембран митохондрий, изучена температурная зависимость микровязкости мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей гороха сорта Немчиновский 100, вне стрессовых условий, методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-γ-карболин-3-оксил (зонд II). Зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое липидных компонент мембраны, а зонд II - в липидах, прилегающих к белкам, что позволяет по поведению зондов I и II в липидном бислое судить о липид-белковых взаимодействиях в мембранах. Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны.

При обработке проростков гороха ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М изменения микровязкости липидной и прибелковой областей мембран имели разнонаправленный характер, что говорит о нормальном функционировании органелл клеток. Кроме того, ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М сдвигал термоиндуцированные структурные переходы в сторону более низких температур как прибелковых, так и липидных областей относительно контроля.

ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-4} М резко уменьшал микровязкость липидной фазы до значений, при которых мембраны находятся в жидком, а не жидкокристаллическом состоянии. Вместе с тем, никакой зависимости микровязкости липидной фазы от температуры не наблюдалось. Такие изменения могут приводить к нарушению структуры

мембран, что, вероятно, повлечет за собой дисфункцию митохондрий. Так, например, значительное разжижение мембран на фоне отсутствия зависимости от температуры характерно при развитии патологии у животных. В то же время, микровязкость при белковых областях мембран митохондрий при обработке ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-4} М возрастала на 10% относительно контроля. Вероятно, структура мембран изменялась, чтобы сохранить функционирование мембранных белков за счет деструкции липидной фазы.

Таким образом, ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М можно использовать для обработки проростков растений с целью повышения их адаптивности к влиянию экзогенных факторов и регуляции роста и развития растений. Напротив, применение большой дозы (10^{-4} М) может приводить к нежелательным последствиям.

ВЛИЯНИЕ ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОРАСТАНИЕ И РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ТОМАТОВ ПРИ СОВМЕСТИМОМ И САМОНЕСОВМЕСТИМОМ ОПЫЛЕНИИ, А ТАКЖЕ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Газиева И.И., Голиванов Я.Ю. *, Захарова Е.В.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42, E-mail: iab@iab.ac.ru***

****Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования Российский государственный аграрный университет –
МСХА им. К.А. Тимирязева***

Взаимодействие пыльцы и пестика - основной процесс репродуктивной биологии цветковых растений, который является предметом интенсивных фундаментальных исследований, имеющих ярко выраженную практическую ценность. На сегодняшний день показано, что фитогормоны могут участвовать в регуляции созревания пыльцы, прорастания и роста пыльцевых трубок по проводниковым тканям пестика, включая процесс оплодотворения. Ранее в исследованиях нашей группы было установлено, что фитогормоны, такие как этилен, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота и ауксины участвуют в регуляции созревания пыльцы, ее прорастания и роста пыльцевых трубок по проводниковым тканям пестика, а также их роль в процессе гаметофитной самонесовместимости у петунии (Zakharova et al., 2022).

В данном эксперименте, мы впервые исследовали влияние жасмоновой кислоты на прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок томатов, обладающих схожей с петунией системой самонесовместимости - *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. chilense* в системах *in vitro* и *in vivo*. В опытах использовали несколько концентраций растворов метилжасмоната: 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} моль. В экспериментах с культивированием пыльцы *in vitro* метилжасмонат растворяли в дистиллированной воде и в среде для прорастания пыльцы, включающую сахарозу и борную кислоту. Наблюдение и подсчет прорастания пыльцевых зерен и длины пыльцевых трубок проводили под световым микроскопом. В системе *in vivo* водный раствор метилжасмоната помещали на рыльце пестика согласно плану обработки (за 2 часа до опыления, в момент опыления и через 2 часа до опыления). Сбор материала производили через 2, 4, 6, 24 часа после опыления. С использованием окраски анилиновым голубым, наблюдали и измеряли рост пыльцевых трубок в тканях пестика под флуоресцентным микроскопом.

Согласно полученным результатам, метилжасмонат оказывал стимулирующее действие на прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок томатов как *in vitro*, так и *in vivo*. Наблюдалась четкая зависимость от концентрации фитогормона, наиболее

положительные результаты показала наименьшая концентрация метилжасмоната (10^{-12} моль).

Список литературы:

1. Zakharova, E.V.; Khaliluev, M.R.; Kovaleva, L.V. Hormonal Signaling in the Progametic Phase of Fertilization in Plants. Horticulturae 2022, 8, 365.

**АКРИЛОВЫЕ СУПЕРВЛАГОАБСОРБЕНТЫ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ
МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ**

Глухова А.С.

Научный руководитель Успенская М.В. д.т.н, профессор

Университет ИТМО, Санкт-Петербург 197101

Суперабсорбенты представляют собой полимерные материалы, которые обладают способностью поглощать и удерживать в себе большое количество воды (до 2 кг на 1 г сухого материала). Наилучшими показателями цена/качество обладают суперабсорбенты на основе акриловой кислоты и ее производных, которые используются в различных областях промышленности, в сельском хозяйстве, при решении водных и экологических проблем. Применение акриловых абсорбентов при незначительном внесении в почву позволяет существенно повысить влагообеспеченность почв, а использование композиционных материалов, содержащих органические и минеральные удобрения, и урожайность.

Используя композиционные влагопоглощающие материалы, содержащие различные доли и виды удобрений и питательных веществ, возможно не только водоудержание, но и пролонгирование выделения макро- и микроэлементов.

Однако, широкое использование влагоабсорбентов ограничено рядом существенных недостатков, в частности, низкими механическими характеристиками, коллапсом в присутствии би- и поливалентных металлов, а также эффектом гелевого блокирования («рыбьего глаза»).

В ходе работы нами была разработана методика получения гранул минерального удобрения, покрытого влагопоглощающим гидрогелевым материалом на основе акрилата натрия, акриламида и N,N' – метиленбисакриламида при варьировании рецептурных параметров. Полимерные влагопоглощающие материалы были получены методом свободно-радикальной полимеризации в водной среде при температуре 40 °С. Концентрация мономеров в реакционной смеси составляла 30 %. В качестве сшивающего агента использовался метилен-бис-акриламид с концентрацией 0,2 мас.% на загрузку мономеров, в качестве иницирующей системы была выбрана окислительно-восстановительная система: персульфат аммония и тетраметилэтилендиамин.

В ходе исследования был получен оптимальный состав композиции для нанесения на гранулы водорастворимого удобрения с различной степенью растворимости.

Регулирование растворимости удобрений позволит уменьшить потерю питательных компонентов от вымывания, увеличить коэффициент использования удобрений, что обуславливает рациональное использование сырьевых ресурсов, повышение урожайности и уменьшение загрязнения водосборных бассейнов компонентами удобрений.

Список литературы:

1. М. Д. Кильмухаметов, И. Ф. Садретдинов. Обзор современных технологий получения Суперабсорбирующих полимеров (САП) для комплекса акриловой кислоты ОАО «Газпром нефтехим салават». Башкирский химический журнал. 2014.

2. Maya Rajan, ... , ... Mathew, in Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture. Controlled release of fertilizers—concept, reality, and mechanism. 2021

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ВЛИЯЮЩИХ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* L.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Злобнова Н.В.¹

**1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва
127550**

E-mail: biotech@iab.ac.ru

Люпин узколистый (*Lupinus angustifolius* L.) является востребованной бобовой культурой в кормах животных, как источник растительного белка с высокой биологической ценностью. По этой ценности он не уступает сое. Благодаря способности формировать эффективный симбиоз с клубеньковыми бактериями, определяется средообразующая роль люпина в адаптивном земледелии. Данная сельскохозяйственная культура, среди зернобобовых культур, характеризуется практически полностью симбиотрофным азотным питанием, что в свою очередь снижает технологическую нагрузку на почву, повышая тем самым ее плодородие [1].

Одними из основных направлений по селекционной работе люпина является создание сортов с высоким содержанием белка, масла и устойчивых к различным видам стресса как биотической, так и абиотической природы. Помимо традиционных селекционных методов, применяются биотехнологические методы для создания трансгенного люпина. Данные методы за счет расширения источника генов, предоставляемого при половой гибридизации, позволяют получать растения, обладающие новыми хозяйственно-ценными признаками, в которых целенаправленно изменен геном. Разработки по культивированию клеток и тканей растений *in vitro*, с целью получения целого растения – это основа для дальнейшей успешной модификации генома [2].

Являясь представителем бобовых растений, люпин очень трудно поддается культивированию *in vitro*, как и большинство других представителей данного семейства. Однако среди научной литературы все же есть данные по успешному получению регенерантов люпина при помощи прямого и непрямого органогенеза и при помощи соматического эмбриогенеза. [3].

Тем не менее, на сегодняшний день имеется весьма ограниченное количество публикаций с подробными протоколами по регенерации узколистного люпина. Тем более что для каждого следующего генотипа, вводимого в культуру *in vitro*, необходимо подбирать новые соответствующие условия культивирования.

Нами отработана система получения регенерантов люпина узколистного двух сортов: Дикаф 14 и Куршавель через непрямой органогенез. Благодаря особому подготовительному этапу, проводимому с эксплантами, и оптимизации состава питательных сред, удастся получать от 5-ти до 17-ти регенерантов с одного экспланта, при этом от одного растения берем от 5-ти до 7-ми эксплантов. Максимальное количество регенерантов, которые были получены от одного растения, составило 119 штук.

Следует так же отметить, что среди проработанной научной литературы мы не нашли ни одного упоминания по получению регенерантов люпина узколистного у сорта Дикаф 14. Следовательно, наш протокол может оказаться полезным для дальнейшего улучшения данного сорта.

Список литературы:

1. Агеева, П. А., Почутина, Н. А., Громова, О. М., Зайцева, Н. М. Люпин узколистый-результаты изучения сортов и сортообразцов по адаптивности и комплексу хозяйственнобиологических признаков. 2022. 633.367.2:631.526.32. DOI 10.30766/2072-9081.2022.23.2.211-220
2. Фоменко Т. И., Малюш М. К. Регенерация растений люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) в культуре *in vitro*. 2011. 582.051.4: 57.04:581.19: 581.143.6.
3. Nadolska-Orczyk A. Somatic embryogenesis of agriculturally important lupin species (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. mutabilis*).1992.

МЕГАСПОРОГЕНЕЗ И РАЗВИТИЕ ЖЕНСКОГО ГАМЕТОФИТА ОРХИДЕИ *COELOGYNE SPECIOSA* SUBSP. *FIMBRIATA* (J.J.SM.) GRAVENDEEL

Коломейцева Г.Л., Коваль В.А., Рябченко А.С., Бабоша А.В.

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва, 127276
e-mail: vladimirkovall@yandex.ru

Орхидные (*Orchidaceae* Juss.) – одно из крупнейших семейств цветковых растений, насчитывающее 736 родов и более 28000 видов (Chase et al., 2015; Christenhusz, Byng, 2016). Род *Coelogyne* Lindl. относится к подсемейству Epidendroideae, трибе Coelogyneae подтрибе Coelogyneinae (Van den Berg, 2005), в него входят около 200 видов. Наибольшее число видов зафиксировано на островах Суматра и Калимантан (Alrich, Higgins, 2008). Некоторые виды *Coelogyne* используются в восточной и современной медицине в качестве лекарственных растений, из листьев *Coelogyne speciosa* выделены вещества с бактерицидными и фунгицидными свойствами (Tkachenko et al., 2015; Buyun et al., 2017). В настоящее время разрабатываются методы культивирования лекарственных видов *Coelogyne in vitro* (Naing et al., 2011), в том числе, неполного соматического эмбриогенеза. Однако пролонгированные сроки созревания плодов (более 2 лет) и отсутствие сведений о начальных стадиях развития семязачатков отражаются на эффективности биотехнологических работ.

Цель работы – выявить особенности мегаспорогенеза и развития женского гаметофита *Coelogyne speciosa* subsp. *fimbriata* (J.J.Sm.) Gravendeel для дальнейшего культивирования незрелых семян *in vitro*.

Растения содержали как эпифиты в горшках и корзинах с легким субстратом из коры и сфагнома в оранжерее с холодным температурным режимом (10–18 °C), высокой относительной влажности воздуха (более 60%) и при естественном освещении. Цветение наблюдали с июля до января, цветки опыляли гейтоногамным способом. Наблюдения проводили с помощью конфокального микроскопа Olympus FV1000D (Japan).

В завязи цветка семязачатки обособлены, но недоразвиты. После опыления примордии семязачатков на плацентах постепенно удлиняются, их субтерминальные клетки преобразуются в археспориальные клетки. На стадии 6 недель после опыления (НПО) археспориальная клетка преобразуется в мегаспороцит с более густой цитоплазмой и крупным ядром. На стадии 8 НПО происходит первое мейотическое деление мегаспороцита, образуется неравная диада мегаспор. Дистальная мегаспора диады отмирает, при конфокальном микроскопировании наблюдается более яркое свечение ее каллозных оболочек. Затем халазальная мегаспора претерпевает второе мейотическое деление, в клеточной стенке второй дегенерирующей мегаспоры также присутствует каллоза. В результате двух мейотических делений на стадии 9 НПО наблюдается триада,

состоящая из одной активной халазальной мегаспоры и двух неактивных микропилярных мегаспор.

На стадии 10 НПО в семязачатке начинается образование женского гаметофита. Нуцеллус, окружавший мегаспороцит, к началу образования зародышевого мешка почти полностью дегенерирует, за исключением самого нижнего халазального слоя, примыкающего к клетке постаменту. Два первых митотических деления приводят к образованию четырех ядер, попарно расходящихся к микропилярному и халазальному концам зародышевого мешка. Дальнейшее митотическое деление может проходить по-разному. В меньшей части зародышевых мешков оба халазальных ядра не делятся, в то время как два микропилярных ядра претерпевают второе митотическое деление. В результате образуется 6-ядерный зародышевый мешок. Иногда наблюдали зародышевые мешки промежуточного типа с 4 микропилярными и 3 халазальными ядрами. Однако большую часть составляют семязачатки с 8-ядерными зародышевыми мешками и одинаковыми по размеру ядрами. Сливания или соединения полярных ядер в зародышевых мешках мы не наблюдали вплоть до стадии 12 НПО. В возрасте 14 НПО на фоне увеличения размера семязачатков выявлены первые стадии оплодотворения, а также соединение или сливание полярных ядер в центральной части зародышевого мешка. К моменту оплодотворения эпидерма нуцеллуса почти полностью разрушалась, при этом базальный ярус клеток халазальной части нуцеллуса и 2 клетки постаменту сохранялись до стадии малоклеточного зародыша и элиминации внутреннего интегумента.

Таким образом, нами показана редукция некоторых стадий мегаспорогенеза и мегагаметогенеза у *C. speciosa* subsp. *fimbriata*. На стадии археспория редукция выражается в отсутствии деления археспориальной клетки и ее преобразования в материнскую клетку мегаспор. При мегаспорогенезе мейоз II и цитокинез происходит только в халазальной клетке диады с образованием триады мегаспор. Наружная и средняя клетки триады элиминировались, а из базальной клетки формировался моноспорический 6-, 7- или 8-ядерный зародышевый мешок. Двойного оплодотворения не выявлено, центральное ядро зародышевого мешка представлено двумя соединенными полярными ядрами или одним более крупным ядром. Полученные данные свидетельствуют о том, что новые биотехнологии размножения и сохранения *C. speciosa* subsp. *fimbriata*, в том числе, технологии непрямого соматического эмбриогенеза, проращивание незрелых семян *in vitro*, криосохранение можно проводить не ранее, чем через 3 месяца после опыления.

Список литературы:

- Alrich P., Higgins W. The Marie Selby Botanical Gardens illustrated Dictionary of Orchid Genera. Ithaca, London: Cornell Univ. Press. 2008.
- Buyun L., Tkachenko H., Osadowski Z., Kovalska L., Gyrenko O. The antimicrobial screening of the various extracts derived from the leaves of *Coelogyne speciosa* (Blume) Lindl. (Orchidaceae) against *Staphylococcus aureus* / Материалы V белорусско-польской конференции «Дерматология без границ». Гродно, 2017. 13–19.
- Chase M.W., K.M. Cameron K.M., Freudenstein J.V., Pridgeon A.M., Salazar G., Van den Berg C., Schuiteman A. An updated classification of Orchidaceae // Botanical Journal of the Linnean Society. 2015. 177.151–174.
- Christenhusz M.J.M., Byng J.W. The number of known plants species in the world and its annual increase // Phytotaxa, 2016. 261. 201–217.
- Gravendeel B., De Vogel E.F. Revision of *Coelogyne* section *Speciosae* (Orchidaceae) // Blumea. 1999. 44. 253–320.
- Tkachenko et al., 2015; Tkachenko H., Truchan M., Buyun L., Kovalska L., Gyrenko O. Antifungal efficacy of some orchids from *Coelogyne* Lindl. genus against *Candida albicans* / Тези наук-практич. конф. «Інтегрований захист та карантин рослин. Перспективи розвитку в XXI столітті». Київ. 2015. 178–181.

Van den Berg C. Artificial key to the subtribes of Epidendreae. In: Pridgeon A.M., Crib P., Chase M.W., Rasmussen F.N., eds. *Genera Orchidacearum Volume 4 Epidendroideae (Part one)* p. 164. Oxford University Press, 2005.

Naing A.H., Chung J.D., Lim K.B. Plant Regeneration through Indirect Somatic Embryogenesis in *Coelogyne Cristata* Orchid // *American Journal of Plant Sciences*. 2011. 2. 262-267.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПАТОГЕНЫ РАСТЕНИЙ *TARAXACUM KOK-SAGHYZ*

Мартиросян Л.Ю.^{1,2}, Мягкова Е.Р.², Филатова С.И.¹, Мартиросян Ю.Ц.^{1,2}

1 - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук», ул. Косыгина 4, Москва, 119334, Россия

2 - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии», ул. Тимирязевская, 42, г. Москва, 127550, Россия

Несмотря на широкое применение синтетического каучука, натуральный каучук остается востребованным и незаменимым в различных областях благодаря своим уникальным свойствам, таким как износостойкость, ударопрочность, эффективное рассеивание тепла и пластичность при низких температурах [1,2]. Совокупность различных проблем и факторов делает актуальным поиск альтернативных каучуконосов. Среди них наиболее важным является уязвимость гевеи бразильской (*Hevea brasiliensis*), единственного промышленно выращиваемого каучуконоса, перед грибковыми заболеваниями [3].

Альтернативой гевее для территории России является одуванчик кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz*) [1,2]. Однако для развития промышленных методов культивирования и достижения рентабельности, необходимо применение методов современных биотехнологий, начиная с оздоровления семян при производстве посадочного материала. В настоящее время активно используются различные формы серебра (наночастицы, коллоидные растворы, ионы), которые благоприятно влияют на рост и развитие растений, повышают качество посадочного материала *in vitro*, а также обладают бактерицидными или бактериостатическими свойствами [4].

В процессе экспериментов в культуре *in vitro* мы столкнулись с эндогенной бактериальной инфекцией кок-сагыза, которая не поддавалась устранению с помощью антибиотиков широкого спектра действия. Из растений с внешними признаками бактериоза были выделены чистые культуры патогенных бактерий.

Для идентификации патогенов было проведено секвенирование участка 16S рРНК с использованием стандартных праймеров, с дополнительным секвенированием участка бета-субъединицы гиразы *gyrB*. Для большей точности секвенирования на концах участка ПЦР-продукт был предварительно клонирован в рAL2-T вектор. Анализ последовательностей показал, что одним патогеном является *Pseudomonas putida*, а другим – *Raoultella terrigena*.

В качестве альтернативы антибиотикам использовали наночастицы серебра Ag-20 и Ag-40, с размером наночастиц 20 и 40 нм, соответственно. На бактериальном газоне с *P. putida* частицы Ag-20 формируют ореол диаметром около 1 мм, а частицы Ag-40 около 1,5 мм. На бактериальном газоне с *R. terrigena* – 0,6 и 0,8 мм, соответственно.

Первичное тестирование действия наночастиц серебра на растениях с выраженными признаками бактериоза в культуре *in vitro* заключалось в добавлении Ag-20

и Ag-40 в питательные среды и показало многообещающий результат. Развитие симптомов бактериальной инфекции прекратилось, началось образование новых корней.

Был также проведён анализ на содержание целевых веществ – каучука и инулина, в растениях, выращенных на питательных средах, содержащих наночастицы серебра. Анализ показал благоприятное воздействие всех форм серебра на содержание инулина. Ag-20 вызывало накопление каучука до 4,9% и инулина до 19,7%, а Ag-40 – до 5,9% каучука и 15,2% инулина.

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ, проект № 20-316-90032\20.

Список литературы:

1. Америк А.Ю., Мартиросян Л.Ю., Мартиросян В.В., Мартиросян Ю. Ц. *Parthenium argentatum* A. Gray, *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse Как Альтернативные источники натурального каучука: нужны ли они нам? // Сельскохозяйственная биология. Т. 57, № 1. С. 3-26.
2. Salehi, M., Cornish, K., Bahmankar, M., & Naghavi, M. R. (2021). Natural rubber-producing sources, systems, and perspectives for breeding and biotechnology studies of *Taraxacum kok-saghyz*. *Industrial Crops and Products*, 170, 113667.
3. Salehi M., Fakhimi A., Shahverdi H.R. et al. Natural rubber-producing sources, systems, and perspectives for breeding and biotechnology studies of *Taraxacum kok-saghyz* // *Industrial Crops and Products*. 2021. Vol. 170. P. 113-667.
4. Raghunath A., Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future // *International journal of antimicrobial agents*. 2017. Vol. 49(2). P. 137-152.

ПОЧВЕННЫЙ КОНДИЦИОНЕР НА ОСНОВЕ ОРГАНИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ

Сахарова Ю.А.¹, Олехнович Р.О.¹

**¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО».**

Санкт-Петербург, 197101

E-mail: sakharovayu@gmail.com

Плохая почва зачастую приносит массу проблем - отсталый рост, нехватка микроэлементов, неподходящий для растений уровень pH; затрудняет поглощение воды и питательных веществ растениями, мешает развитию корней. В результате таких проблем, растения увядают, желтеют, сохнут и погибают [1]. Почвенные кондиционеры – это добавки к почве, которые улучшают ее структуру за счет увеличения водоудерживающей способности и питательных веществ [2].

Наиболее широко известны водопоглощающие акриловые полимеры, которые получают методом полимеризации в водном растворе из акриловой кислоты и ее солей и производных акриламида в качестве мономеров, и использующиеся для удержания влаги и кондиционирования почв [3]. Практическое применение также показало, что сверхабсорбирующие полимеры увеличивают выживаемость растений и одновременно смягчают стресс от засухи в засушливых и полузасушливых районах. В то же время питательные вещества обладают другими важными факторами, которые ограничивают рост и урожай сельскохозяйственных культур [4]. Недостатки сухих почв и нехватки микроэлементов можно преодолеть с помощью удобрений с пролонгированным действием, которые высвобождают удобрения растениям постепенно с определенной скоростью, совпадающей с потребностью растений в питательных веществах [5]. Суперабсорбирующие гидрогели на основе органических удобрений обладают улучшенным водопоглощением, водоудерживающей способностью и скоростью

набухания; и могут эффективно использоваться для выращивания растений в песчаной почве [6].

В настоящей работе были получены гидрогели на основе акриловой кислоты и акриламида путем радикальной полимеризации с соотношением мономеров 30:70 и модулем ванны 30 мас.%. В качестве сшивающих агентов были использованы: N,N'-метиленабисакриламид с концентрацией 0,6 мас.% и гуматом в количестве 1г и 5г, с добавлением 5мл дополнительной воды и без нее. Иницирующей системой являлась окислительно-восстановительная система: персульфат аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин.

Набухание гидрогелей проводили в водных растворах H_2O дистиллированная (pH=7), и физиологическом растворе. Степень набухания рассчитывали по формуле:

$$Q_{\infty} = \frac{m_s - m_0}{m_0},$$

где m_s — масса набухшего образца, г.;

m_0 — масса высушенного образца, г.

Полученные гидрогелевые образцы с добавлением 5г гуматов и 5мл воды обладали максимальной сорбцией в дистиллированной воде, равной 200 г/г. Закономерно, уменьшение количества вносимого гумата с тем же количеством воды приводило к понижению сорбционных характеристик до 105 г/г. В физиологическом растворе максимальное значение равновесной степени набухания снижается с увеличением вносимого гумата и добавлении в исследуемые образцы дополнительные 5 мл воды - с 19 г/г до 13 г/г.

Список литературы:

1. Puoci F., Francesca I., Spizzirri U., Cirillo G., Curcio M., Nevio P. Polymer in Agriculture: a Review. 2008. 3. DOI 10.3844/ajabssp.2008.299.314.
2. Валеева Н.Ш., Хасанова Г.Б. Биополимеры – перспективный вектор развития полимерной промышленности 2013. №22.
3. Колесников, Л.Е., Успенская, М.В., Кременская, Марианна Игоревна Влияние акрилового почвенного кондиционера на продуктивность и устойчивость мягкой пшеницы к болезням. 2021. №7.
4. Колпакова В.В., Усачев И.С., Соломин Д.А. Биоразлагаемые полимеры: составные биокomпоненты и технологические решения производства. 2019. №12. DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10197
5. Cheng D., Liu Y., Yang G., Zhang A. Water- and Fertilizer-Integrated Hydrogel Derived from the Polymerization of Acrylic Acid and Urea as a Slow-Release N Fertilizer and Water Retention in Agriculture. 2018. 66(23), 5762–5769. DOI 10.1021/acs.jafc.8b00872
6. Agnihotri S., Singhal R. Effect of Sodium Humate on the Swelling Characteristics and Agricultural Application of Superabsorbent Hydrogels of Poly(acrylic acid/sodium alginate/sodium humate).2017. Journal of Polymer Materials; New Delhi.34(4) , (Oct-Dec 2017): 663-680

ЦИТОКИНИНЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO* (НА МОДЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТАХ ТОМАТАХ *S. HABROCHAITES*, *S. PENNELLII*, *S. CHILENSE*)

Ханина Т.П., Голиванов Я.Ю.*, Захарова Е.В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42, E-mail: iab@iab.ac.ru*

Половое размножение покрытосеменных – очень избирательный процесс. Материнские ткани пестика способны различать собственные и чужие пыльцевые зерна, самосовместимые и самонесовместимые. Эта избирательность сопровождается огромным разнообразием клеточных поверхностей мужских и женских половых органов, и их структур. Пестик хорошо организован не только для принятия пыльцевых зерен и роста пыльцевых трубок, но и имеет механизмы, которые блокируют их рост на разных стадиях. Одну из ведущих ролей в этих процессах играют фитогормоны. Ранее в нашей группе получены убедительные доказательства того, что цитокинины (ЦК) участвуют в развитии мужского гаметофита и в функционировании механизма гаметофитной самонесовместимости S-РНКазного типа у петунии (*P. hybrida* L.) (Zakharova et al., 2021).

Целью данного исследования было выяснить влияние цитокининов на других объектах, обладающих схожей системой самонесовместимости - *S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. chilense*. В экспериментах по влиянию ЦК на прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок в системе *in vitro* добавляли зеатин в среду культивирования, содержащую сахарозу и борную кислоту. В опытах использовали несколько концентраций растворов зеатина: 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} моль. Наблюдение и подсчет прорастания пыльцевых зерен и длины пыльцевых трубок проводили под световым микроскопом. В системе *in vivo* раствор зеатина помещали на рыльце пестика согласно плану обработки (за 2 часа до опыления, в момент опыления и через 2 часа до опыления). Сбор материала производили через 2, 4, 6, 24 часа после опыления. С использованием окраски анилиновым голубым, наблюдали и измеряли рост пыльцевых трубок в тканях пестика под флуоресцентным микроскопом. В эксперименте по влиянию ЦК на активность каспазо-подобных протеаз, проводили визуализацию каспазо-подобных протеаз в растущих *in vivo* пыльцевых трубках томатов с использованием Image-iT™ LIVE Green Caspase-3 and -7 Detection Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). Цветки томатов обрабатывали зеатином в концентрации 10мкМ за 2 часа до опыления, далее проводили совместимое опыление и через 2 часа отбирали цветки для анализа. Делали тонкие продольные срезы пестика (рыльце и верхняя часть столбика), срезы помещали в 1,5 мл пробирки Эппендорфа; немедленно добавляли рабочий раствор, реагент FAM-DEVD-FMK FLICA, в PBS (pH 7.4) полностью покрывающий срезы; и инкубировали при температуре окружающей среды в темноте в течение 60 мин. Затем срезы погружали в 5 мМ пропидиум йодид, также инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин, двукратно промывали промывочным буфером, помещали на предметное стекло в каплю того же буфера и изучали под флуоресцентным микроскопом. Зеленый флуоресцентный сигнал являлся прямым показателем активности каспазо-подобных протеаз, которая присутствовала в момент, когда реагент был добавлен.

Во всех использованных концентрациях зеатин ингибировал прорастание пыльцевых зерен томатов *in vitro* и *in vivo*. Наблюдалась четкая зависимость от концентрации фитогормона, наименьшее ингибирование наблюдали при наименьшей концентрации зеатина (10^{-12} моль). Согласно полученным результатам, при совместимом опылении без обработки зеатином, активность каспазо-подобных протеаз не обнаруживалась. В случае обработки пестиков зеатином, наблюдалось яркое зеленое свечение цитоплазмы пыльцевых трубок через 2 часа после совместимого опыления. Таким образом, ЦК участвуют в активации каспазо-подобных протеаз и запуске программируемой клеточной смерти в пыльце томатов.

Список литературы:

1. Zakharova, E. V., Timofeeva, G. V., Fateev, A. D., & Kovaleva, L. V. (2021). Caspase-like proteases and the phytohormone cytokinin as determinants of S-RNase-based self-incompatibility-induced PCD in *Petunia hybrida* L. *Protoplasma*, 258(3), 573-586.

ФАКТОРЫ ИНДУКЦИИ ЭМБРИОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ФРАГМЕНТОВ ЗАВЯЗЕЙ *CUCUMIS SATIVUS* L.

Осминина Е.В., Монахос С.Г.

ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, 127550, E-mail: info@rgau-msha.ru

Технологии ускоренной селекции сельскохозяйственных растений предполагают применение биотехнологических методов, повышающих эффективность и темпы создания конкурентноспособных коммерческих F1-гибридов (Dong Y. Q. et al., 2016). Одним из таких методов являются ДН-технологии, позволяющие значительно сократить сроки создания чистых гомозиготных линий (Kurtar, E. S. et al., 2020, Домблидес, Е. А., 2019). Технологии создания удвоенных гаплоидов огурца немногочисленны и требуют оптимизации для повышения эффективности протоколов.

Материалы и методы. В качестве исходного материала использовали генотипы F1 Рубинштейн, F1 Дружный, F1 Кайман. Растения выращивали по общепринятой технологии в необогреваемой пленочной теплице с естественным освещением. Полив осуществляли по мере необходимости.

Отбор завязей осуществляли за сутки до раскрытия бутона в стадии ярко-окрашенного венчика. Стерилизацию эксплантов проводили в растворе 2 %-ного NaOCl с добавлением 1-2 капель Tween 20 в течение 15 минут с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде в течение 1, 5, 10 мин. Экспланты инокулировали на питательную среду согласно методике Diao, W. P., 2009. Завязи разрезали на поперечные фрагменты толщиной 0,5-1 мм и инокулировали на твердую индукционную питательную среду в чашки Петри 100×20 мм, по 1 завязи на чашку. В качестве индукционной питательной среды использовали МС (Murashige T., Skoog F., 1962), дополненную 3 % сахарозой, 0,8 % агаром, 0,04 мг/л TDZ, 10 мг/л нитрата серебра. pH среды 5,8-5,9 до автоклавирования. Экспланты инкубировали при температуре 35°C в темноте в течение 3 суток, далее при температуре 25°C, 16-часовом фотопериоде. Спустя 2 недели фрагменты завязей переносили на регенерационную питательную среду МС, дополненную 3 % сахарозой, 0,8 % агаром, 1,5 мг/л 6-ВАР. pH среды 5,8-5,9 до автоклавирования. Пересадку на свежую питательную среду осуществляли каждые 2 недели. В качестве повторности использовали завязь. Для каждого изучаемого фактора было использовано не менее 3 повторностей.

В работе изучали влияние на частоту эмбриогенеза компонентов индукционной питательной среды: 500 мг/л гидролизата казеина, источников углеводов: 3 % сахароза, 3 % глюкоза; компонентов регенерационной питательной среды: сочетание регуляторов роста: 1,5 мг/л 6-ВАР, 0,2 мг/л 6-ВАР и 0,05 мг/л NAA. Изучали влияние стадии развития экспланта на частоту эмбриогенеза. Завязи отбирали за сутки до раскрытия цветка в фазе окрашенного венчика и во время цветения. Для статистического анализа данных использовали IBM SPSS Statistics 26 (тест Манна-Уитни).

Результаты. Спустя 2 недели инкубирования на индукционной питательной среде фрагменты завязей покрывались зелеными или полупрозрачными клетками каллуса. Семязачатки увеличивались в размерах в несколько раз, изменяли цвет с белого на светло-зеленый и выступали на поверхности поперечного фрагмента завязи, образуя эмбриониды

глобулярной стадии развития. Спустя 1 месяц инкубирования наблюдали побегообразные структуры, образующиеся из эмбриоидов.

Культивирование фрагментов завязей на индукционной питательной среде, содержащей 500 мг/л гидролизата казеина привело к увеличению частоты эмбриогенеза у генотипов F1 Дружный и F1 Кайман по сравнению со средним количеством эмбриоидов на питательной среде без добавления гидролизата казеина (68,9 и 97,4 шт./завязь у генотипа F1 Дружный, 46,6 и 49,6 шт./завязь у генотипа F1 Кайман). У генотипа F1 Рубинштейн среднее количество эмбриоидов на питательной среде без добавления гидролизата казеина превзошло среднее количество эмбриоидов на питательной среде, содержащей 500 мг/л гидролизата казеина (85,9 и 72,1 шт./завязь соответственно). Было отмечено, что образование побегообразных структур наблюдали у генотипа F1 Кайман только на индукционной питательной среде с добавлением гидролизата казеина. Генотипы F1 Дружный и F1 Рубинштейн образовали побегообразные структуры на питательной среде с добавлением и без добавления гидролизата казеина.

Частота образования эмбриоидов достоверно различается при культивировании фрагментов завязей у генотипа F1 Рубинштейн на питательной среде с сахарозой и глюкозой (85,9 и 38 шт./завязь соответственно). У генотипов F1 Дружный и F1 Кайман наблюдали тенденцию повышения частоты эмбриогенеза на индукционной питательной среде с добавлением 30 г/л глюкозы. Побегообразные структуры наблюдали у генотипов F1 Рубинштейн и F1 Дружный на питательной среде, содержащей 30 г/л сахарозы.

Регенерационная питательная среда оказывает существенное влияние на формирование эмбриоидов и растений-регенерантов в культуре фрагментов завязей огурца. У генотипа F1 Рубинштейн частота эмбриогенеза достоверно различается при культивировании на регенерационной питательной среде, содержащей 1,5 мг/л 6-BAР и на питательной среде с добавлением 0,2 мг/л 6-BAР и 0,05 мг/л NAA (85,9 и 38 шт./завязь соответственно). У генотипа F1 Дружный наблюдали положительную тенденцию увеличения частоты формирования эмбриоидов на регенерационной питательной среде, содержащей 1,5 мг/л 6-BAР, у генотипа F1 Кайман отметили увеличение частоты эмбриогенеза на питательной среде с добавлением 2 мг/л 6-BAР и 0,05 мг/л NAA. У генотипов F1 Рубинштейн и F1 Дружный отмечали образование побегообразных структур на питательной среде с 1,5 мг/л 6-BAР и 0,2 мг/л 6-BAР и 0,05 мг/л NAA. Генотип F1 Кайман формировал побегообразные структуры только на регенерационной питательной среде с добавлением 0,2 мг/л 6-BAР и 0,05 мг/л NAA.

Стадия развития экспланта является значимым фактором, влияющим на эмбриогенез. У генотипа F1 Рубинштейн частота формирования эмбриоидов достоверно различается при инкубировании завязи за сутки до открытия венчика и завязи, отобранной во время цветения (85,9 и 46,6 шт./завязь соответственно). У генотипов F1 Дружный и F1 Кайман отмечали положительную тенденцию увеличения частоты эмбриогенеза при введении в культуру завязи, отобранной во время цветения. У всех генотипов наблюдали формирование побегообразных структур при культивировании фрагментов завязей, отобранных во время цветения.

Изучение факторов, влияющих на индукцию гиногенеза огурца и повышающих частоту эмбриогенеза позволяет оптимизировать технологию создания удвоенных гаплоидов и использовать ее в рутинном производстве для создания коммерческих F1-гибридов.

Список литературы:

1. Diao, W. P., Jia, Y. Y., Song, H., Zhang, X. Q., Lou, Q. F., & Chen, J. F. (2009). Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Scientia horticulturae*, 119(3), 246-251.
2. Dong Y. Q. et al. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species //Plant cell reports. – 2016. – Т. 35. – №. 10. – P. 1991-2019.

3. Kurtar, E. S., Seymen, M., & Ünal, K. A. L. (2020). An overview of doubled haploid plant production in Cucurbita species. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 30(3), 510-520.
4. Домблидес, Е. А., Белов, С. Н., Солдатенко, А. В., & Пивоваров, В. Ф. (2019). Получение удвоенных гаплоидов огурца (*Cucumis sativus* L.). *Овощи России*, (5), 3-14.

ИЗМЕНЕНИЕ ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *SSADH1* И *SSADH2* ДЕГИДРОГЕНАЗЫ СУКЦИНИЛОВОГО ПОЛУАЛЬДЕГИДА В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ (*ZEА MAYS* L.) ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Шахов З.Н., Оя П.С.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования
Воронежский государственный университет, Воронеж, 394018
E-mail: zakharshakhov@gmail.com*

Сукцинатсемиаальдегиддегидрогеназа (ССАДГ, КФ 1.2.1.16, 1.2.1.24, 1.2.1.79) – фермент, участвующий в аноплеротическом шунте γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) – это метаболический путь, который обходит две стадии ЦТК, присутствует как у про-, так и у эукариот. У растений он состоит из регулируемой Ca^{2+} /кальмодулином системой цитозольного фермента глутаматдекарбоксилазы (ГАД, КФ 4.1.1.15), митохондриального фермента ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т, КФ 2.6.1.19) и дегидрогеназы сукцинилового полуальдегида (сукцинат-семиаальдегиддегидрогеназы, ССАДГ, КФ 1.2.1.16) [1]. Активность ГАМК-шунта в растениях быстро усиливается в ответ на различные биотические и абиотические стрессы. Также, шунт γ -аминомасляной кислоты необходим растению для нормального роста и поддержания определенного уровня различных метаболитов [2].

ССАДГ осуществляет высокоспецифичное каталитическое превращение сукцинилового полуальдегида в сукцинат. Функционируя в составе ферментной системы ГАМК-шунта, ССАДГ метаболизирует семиаальдегид сукцината в интермедиат цикла трикарбоновых кислот – сукцинат, снижая его губительную для клетки реакционную способность [3].

Анализ международной базы данных NCBI позволил обнаружить, что в настоящее время в геноме кукурузы обнаружено два гена, кодирующих ССАДГ. Ген *SSADH1* (LOC100284047) локализован в 4 хромосоме и несет в своем составе 24 экзона, кодируя митохондриальную форму фермента. Ген *SSADH2* (LOC100280779) локализован в 5 хромосоме и включает 20 экзонов. Нуклеотидные последовательности идентичны между собой на 83.68%.

В качестве модельного объекта использовались листья 12-дневной кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская-76. Кукуруза была выращена гидропонным методом при температуре 25°С. Первая (контрольная) группа помещалась в вакуум-эксикатор объемом 5 литров, куда непрерывно осуществлялся приток кислорода воздуха. Растения из опытной группы инкубировались в вакуум-эксикаторе, куда в течении суток подавался азот из коммерческого баллона. Анализ экспрессионной активности осуществлялся методом ПЦР в реальном времени с использованием в качестве интеркалирующего красителя SybrGreenI. В качестве матрицы использовалась кДНК, полученная в ходе реакции обратной транскрипции. Праймеры к генам *SSADH1* и *SSADH2* подбирались на основании нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе данных NCBI спомощью программы PrimerBlast.

SSADH1	Прямой	CACAGCCTGGGGATGTCATT
	Обратный	GGTGCCACCTGCGTTTGTAT

SSADH2	Прямой	GTGCTTAGAAGGGCGTGAGT
	Обратный	CAGGTTCTGAAGGTGAAGCCA

Гипоксический стресс вызывает увеличение транскрипционной активности гена *SSADH1* уже на первый час эксперимента более чем в 3 раза. Полученные результаты могут свидетельствовать об активации ГАМК-шунта в листьях кукурузы в ответ на снижение концентрации кислорода в составе газовой среды, а также и указывать на то, что при гипоксии запускается обходной путь ЦТК, что в первые часы обеспечивает дополнительный приток энергии, за счёт осуществляя поставки сукцината для СДГ.

Начиная с 3 часа инкубации относительный уровень транскриптов исследуемого гена постепенно снижается, достигая уровня незначительно превышающего контрольные значения. К 24 часу экспрессионная активность гена *SSADH1* снижается до значений, характерных для контрольной группы растений, у которых соответствующие показатели оставались на постоянном уровне на протяжении всего времени гипоксического воздействия. Инкубация растений в среде, с низким содержанием кислорода приводило к постепенной инактивации гена *SSADH2*. К концу эксперимента относительный уровень транскриптов исследуемого гена снизился в 5.5 раз. Таким образом, установлено, что в условиях гипоксического стресса активизируется ГАМК-шунт, что подтверждают полученные данные по динамике транскрипционной активности гена *SSADH1*, относительный уровень транскриптов которого в условиях действия низких концентраций кислорода увеличивается в первые часы воздействия.

Таким образом, установлено, что инкубация проростков кукурузы в гипоксических условиях приводит к разнонаправленным изменениям в экспрессии генов сукцинатсемиаальдегиддегидрогеназы. Ген *SSADH1* в первые часы гипоксического воздействия индуцирует экспрессионную активность, в то время как ген *SSADH2* постепенно инактивируется.

Список литературы:

1. Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. / Bouche, N., Fait, A., Bouchez, D., Moller, S. G., & Fromm, H. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2003) May 27;100(11)
2. The metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid / Bown A.W., Shelp BJ // *Plant Physiol* 115 (1997)
3. Salt-induced antioxidant metabolism defenses in maize (*Zea mays* L.) seedlings. / Menezes-Benavente, L., Kernodle, S. P., Margis-Pinheiro, M., & Scandalios, J. G. // *Redox Report*, 9(1), 29–36. (2004).

ВЛИЯНИЕ ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОРАСТАНИЕ И РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ПЕТУНИИ ПРИ СОВМЕСТИМОМ И САМОНЕСОВМЕСТИМОМ ОПЫЛЕНИЯХ, А ТАКЖЕ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Корякина Ю. И., Захарова Е.В.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42, E-mail: iab@iab.ac.ru***

Основной механизм взаимодействия мужского гаметофита с проводниковыми тканями пестика является одной из актуальных тем биологии развития. Межклеточное взаимодействие в системе пыльца-пестик во многом определяет возможность взаимной ассимиляции гамет при совместимом опылении или его невозможность при генетически детерминированном барьере к самооплодотворению, имеющему как теоретические (взаимодействия между клетками как общая биологическая проблема) и практическое

значение (урожайность и качество урожая). За последние 20 лет был достигнут значительный прогресс в понимании ключевых механизмов регуляции роста пыльцевых трубок, включая молекулярную передачу сигналов во взаимодействии пыльца-пестик, а также их физиологические реакции. Ранее в исследованиях нашей группы было установлено, что фитогормоны могут участвовать в регуляции созревания пыльцы, ее прорастания и роста пыльцевых трубок по проводниковым тканям пестика, а также при оплодотворении (Zakharova et al., 2022).

В данном эксперименте, мы впервые исследовали влияние жасмоновой кислоты на прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок петунии (*Petunia hybrida* L.) в системах *in vitro* и *in vivo*. В опытах использовали несколько концентраций растворов метилжасмоната: 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} моль. В экспериментах с культивированием пыльцы *in vitro* метилжасмонат растворяли в дистиллированной воде и в среде для прорастания пыльцы, включающую сахарозу и борную кислоту. Наблюдение и подсчет прорастания пыльцевых зерен и длины пыльцевых трубок проводили под световым микроскопом. В системе *in vivo* водный раствор метилжасмоната помещали на рыльце пестика согласно плану обработки (за 2 часа до опыления, в момент опыления и через 2 часа до опыления). Сбор материала производили через 2, 4, 6, 24 часа после опыления. С использованием окраски анилиновым голубым, наблюдали и измеряли рост пыльцевых трубок в тканях пестика под флуоресцентным микроскопом.

Согласно полученным результатам, метилжасмонат оказывал стимулирующее действие на прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок петунии как *in vitro*, так и *in vivo*. Наблюдалась четкая зависимость от концентрации фитогормона, наиболее положительные результаты показала наименьшая концентрация метилжасмоната (10^{-12} моль).

Список литературы:

1. Zakharova, E.V.; Khaliluev, M.R.; Kovaleva, L.V. Hormonal Signaling in the Progametic Phase of Fertilization in Plants. *Horticulturae* 2022, 8, 365.

ЛИПИДЫ И ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ОВСА ПОЗДНЕЛЕТНЕГО ПОСЕВА - КРИОКОРМА ЖИВОТНЫХ ЯКУТИИ

Нохсоров В.В.¹, Петров К.А.¹

**1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
биологических проблем криолитозоны СО РАН», Якутск 677007**

E-mail: vv.nokhsorov@mail.ru

Наибольшую кормовую ценность имеют северные луговые фитоценозы, которые в первой половине лета подвергаются длительному заливаннию паводковыми водами, стравливаннию животными и хозяйственному скашиванию. Поэтому у многих травянистых растений наблюдается два цикла роста. Первый цикл приходится на начало вегетации растений до затопления их паводковыми водами или механического повреждения, обычно он длится до середины лета. К этому времени растения успевают пройти фазы вегетации и начало цветения. Второй цикл характеризуется интенсивным ростом новых побегов из прикорневых почек, выросших после схода воды или травматической регенерации растений. Молодые побеги не успевают пройти весь цикл развития и уходят под снег частично в зелёном состоянии.

Основу осенневегетирующей травянистой растительности составляют злаки, осоки, пушицы и некоторые хвощи, сохраняющие под снегом до 100% своей зеленой массы (Софронова и др., 2019). Еще одним способом консервирования зеленых растений естественным холодом является посев однолетних холодоустойчивых растений в поздние

сроки. В Якутии научная новизна замороженного зеленого корма под названием «зеленый криокорм» или просто «криокорм» оформлена В.А. Румянцевым патентом СССР № 1835996 от 01.08.1990 года. Изучение содержания суммарных липидов (СЛ) и их незаменимых жирных кислот (НЖК) криокорма является целью данного исследования.

Опыты показали, что содержание СЛ в листьях летне- и осенневегетирующих растений овса в зависимости от сроков посева изменилось незначительно. В таблице 1 представлены результаты содержания СЛ для контрольного и опытного вариантов. По мере снижения среднесуточной температуры воздуха с 9 °С до 1 °С и –3 °С содержание СЛ в листьях растений опытного варианта по сравнению с контрольными образцами увеличилось в 1.2 раза.

Многолетний злак в варианте без скашивания за весь летний период характеризовался низким содержанием СЛ по сравнению с отавой. По мере отрастания новых побегов из прикорневых почек после срезки наблюдался значительный прирост количества СЛ. По времени это явление приходится на последнюю декаду августа, когда происходит постепенное закаливание молодых растений к ночным низким положительным температурам воздуха.

Проведенные лабораторные анализы подтвердили ценность криокорма и в части содержания в них жирных кислот, которое менялось по сезонам года. Срок осеннего отбора проб наших опытах в целом совпадает со временем холодого закаливания растений в условиях природной среды (таблица 2).

Исследование показало, что у обоих осенневегетирующих растений уровень содержания линолевой и α -линоленовой жирных кислот повышается по мере адаптации растения к понижению температуры среды и переходом их в состояние криокорма. Так, содержание С18:2(ω -6) линолевой кислоты у овса посевного увеличилось в 2,1 раза и составило в пересчете на грамм сухой массы 18.1 мг у овса повесного и 13 мг у костреца безостого, содержание α -линоленовой С18:3(ω -3) – увеличивалось в 1.8 раза, у овса посевного до 100.5 мг/г, у костреца 63.7 мг/г сухой массы. Прирост содержания как С18:2(ω -6), так и С18:3(ω -3) для костреца безостого после низкотемпературного закаливания по сравнению с летними травами составил 1.7 раз. Полученные результаты являются свидетельством высокой питательной и энергетической ценности криокорма для животных.

Таким образом, уровень ненасыщенных жирных кислот в липидах растений зависит от фазы их развития и температуры внешней среды. Почти двукратный рост накопленных питательных и биологически активных веществ в тканях опытных растений связан с первой фазой холодого закаливания (конец сентября). Осенневегетирующие и замороженные естественным холодом зимне-зеленые травянистые растения играют важное значение для поддержания криорезистентного состояния животного организма.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ 22-76-00043

Список литературы:

1. Софронова В.Е., Петров К.А., Дымова О.В., Головки Т.К., Чепалов В.А. Фонд зеленых и желтых пигментов у ярового овса, культивируемого для получения криокорма в условиях Центральной Якутии. 2019 Аграрный вестник Урала, 2019. 4(183), 72–77. doi: 10.32417/article_5cf9fc0d9620d9.91729225

ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ *SETARIA ITALICA* (L.) P. BEAUV. SUBSP. ITALICA В УСЛОВИЯХ ВОЛОГОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Сухарева Л.В.^{1,2}

**1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Вологодский научный центр Российской академии наук», Вологда 160014**

E-mail: lyubov.suxareva@yandex.ru

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина», Вологда – Молочное 160555

В последнее время все больше внимания уделяется экологизации производств, в частности сельского хозяйства. Для снижения химической нагрузки, увеличения коэффициента использования удобрений, улучшении адаптации растений и для большего наращивания надземной массы на кормовые цели все чаще используют биопестициды, аналогом которых являются биологические препараты нового поколения. Вытекающая из этого цель исследования заключается в изучении действия биопрепаратов на ростовые и продуктивные характеристики ценной кормовой культуры - *Setaria italica* (L.) P. Beauv. subsp. *italica* в условиях Вологодской области.

Научно – исследовательская работа по изучению действия биопрепаратов осуществлялась на опытном поле ФГБУН «Вологодский научный центр Российской академии наук» (ВолНЦ РАН) в 2020 г. Почва на опытном поле осушенная дерново-подзолистая, среднесуглинистая. Результаты химического анализа почвы опытного участка следующие: азот аммиачный – $4,2 \pm 0,6$ мг/кг, азот нитратный – $38,9 \pm 7,8$ мг/кг, массовая доля подвижного калия – $261,0 \pm 39,2$ мг/кг, массовая доля подвижного фосфора – $260,0 \pm 52,0$ мг/кг, pH солевой вытяжки $6,6 \pm 0,1$. В работе использовались биопрепараты, созданные компанией ООО «Биотроф» (г. Санкт-Петербург) на основе живых клеток микроорганизмов. В основе препарата «Натурост-Актив» лежит культура клеток *Lactobacillus buchneri*, «Натурост-М» – *Bacillus megaterium*, «Натурост» - *Bacillus subtilis*. Объектом исследования был выбран могар сорт Стамога.

Мелкоделяночный полевой эксперимент включал следующие варианты: обработка водой – контроль (1 вариант), варианты с внесением биопрепаратов «Натурост» (2 вариант), «Натурост-Актив» (3 вариант) и «Натурост-М» (4 вариант). Повторность опыта 3-х кратная, площадь учетной делянки – 5 м². Перед посевом семена опытных групп инокулировали в рабочих растворах препаратов в концентрации 1 мл препарата на 1 литр воды в течение 2 – х часов, семена контрольной группы замачивались в воде. Уход за культурами происходил в соответствии с общепринятыми агротехническими приемами [1,2].

Статистическую обработку данных осуществляли по стандартным методикам с использованием пакета анализа данных программы MS Excel'2010. Оценку достоверности различия выборочных средних проводили при значении доверительной вероятности 0,95.

Погодные условия отслеживались с 10 мая по 31 августа 2020 года: Среднее значение температуры $+16,4$ °С, максимальная точка $+29,0$ °С, среднее значение относительной влажности 76% [3].

Растения оценивались по следующим признакам: общая кустистость, продуктивная кустистость, количество листьев, площадь листовой поверхности. В варианте отбиралось по 15 растений.

Общая кустистость в контрольном варианте составляла в среднем 1,9 шт. При использовании препаратов «Натурост» и «Натурост-Актив» общая кустистость несколько снизилась относительно контроля на 5,3%, в варианте с применением препарата «Натурост-М» общая кустистость понизилась на 21,1%.

Наличие продуктивных органов было выявлено в каждом варианте и составляло не менее 60% от общего числа. На уровне контроля число продуктивных органов обеспечил вариант с препаратом «Натурост-Актив», число которых составило 0,7 шт. Наибольшая продуктивная кустистость наблюдалась в варианте с применением препарата «Натурост» и превысила контрольное значение на 14,3%.

Количество листьев снижалось на фоне применения препаратов «Натурост» и «Натурост-М» на 1,1% и 2,3% соответственно в сравнении с контрольным вариантом. В тоже время вариант с использованием препарата «Натурост-Актив» на основе бактерии *Lactobacillus buchneri* давал увеличение числа количества листьев относительно контроля на 8%.

Площадь листьев существенно увеличилась в варианте с применением препарата «Натурост-Актив» на 65% на фоне варианта без использования биопрепарата. Варианты с использованием препаратов «Натурост» и «Натурост-Актив» имеют некоторое снижение средней площади листовой поверхности на 1,3% и 2,7%.

Увеличение ростовых показателей опытных растений позволяет судить о ростостимулирующем свойстве исследуемых микробных биопрепаратов. Наблюдаемая стимуляция возможна за счет синтеза живыми микроорганизмами ауксинов, цитокининов или других биологически активных веществ.

По анализируемым параметрам с наименьшими потерями по параметрам общей и продуктивной кустистости, а также превосходящий контроль по количеству листьев на 8% и средней площади листовой поверхности на 65% стоит отметить вариант с использованием биопрепарата «Натурост-Актив» на основе культуры клеток *Lactobacillus buchneri*.

Эксперимент по выращиванию могоара продолжается. После анализа данных результаты по стимуляции роста и развития могоара перечисленными препаратами будут более точны и объективны.

Список литературы:

1. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – 5 – е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351с. – Текст: непосредственный.
2. Новоселов Ю.К. Методические указания по проведению полевых опытов с кормовыми культурами / Ю.К. Новосёлов, В.Н. Киреев, Г.П. Кутузов – М.: ВИК, 1983.
3. Погода в Вологде: [сайт]. – URL: <https://rp5.ru> (дата обращения: 03.10.2022) – Текст. Изображение: электронные.

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *PANAX JAPONICUS* И *POLYSCIAS FRUTICOSA* (ARALIACEAE) – ПРОДУЦЕНТЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

¹Тюрина Т.М., ^{1,2}Кочкин Д.В., ¹Глаголева Е.С., ²Титова М.В.

**1 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Москва 119991,**

**2 – Научно-исследовательское учреждение Российской академии наук «Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН», Москва 127276
E-mail: ifr@ippras.ru
tyurina.tatiana812@gmail.com**

Культуры клеток растений имеют множество применений, среди которых одно из важнейших – биотехнологическое получение соединений растительного происхождения в короткие сроки и вне зависимости от сезона. Растения из семейства Аралиевые синтезируют большое разнообразие веществ первичного и вторичного метаболизма, благодаря чему активно используются в традиционной и современной фитотерапии. Интерес представляют тритерпеновые гликозиды, в особенности редкие гликозиды даммаранового ряда растений рода женьшень (*Panax*), которые, как считается, отвечают за ряд терапевтических свойств продуктов из этих растений. Плантационное выращивание растений рода *Panax* spp. длительно и трудоемко, поэтому в настоящее время в качестве

источника целевых соединений все более перспективным является использование культур растительных клеток. Изучение закономерностей образования и накопления вторичных метаболитов в системах *in vitro* в сравнении с исходным растением позволяет расширить представления о возможностях направленного воздействия на процессы биосинтеза или получения новых соединений.

Целью работы являлась оценка качественного и количественного содержания тритерпеновых гликозидов в биомассе культур клеток и среды культивирования в культурах клеток *Panax japonicus* (С.А. Meyer) var. *repens* (2 линии) и *Polyscias fruticosa* (L.) Harms (1 линия) в процессе их выращивания на контрольных и измененных по гормональному составу средах в двух системах культивирования – колбах и барботажных биореакторах объемом 20 литров. Определение содержания тритерпеновых гликозидов проводили методом УЭЖХ-МС. Для всех культур клеток *P. japonicus* было показано накопление сложной смеси тритерпеновых гликозидов (гинзенозиды группы протопанаксадиола (PPD) и протопанаксатриола (PPT), малонилированных производных PPD- и PPT-гинзенозидов, гликозидов олеананового ряда), содержание которых в клеточной биомассе и среде культивирования возрастало по мере роста культур до достижения фазы деградации. Преобладающими являлись гинзенозиды группы олеаноловой кислоты и группы протопанаксадиола (PPD-группа). Культуры клеток *P. fruticosa* на разных средах накапливали гликозиды только олеананового ряда в концентрациях, не превышающих 1 мг/г сухой массы. Показано, что выращивание в колбах биомассы *P. japonicus* приводит к повышенному накоплению некоторых индивидуальных гинзенозидов (Rb1, m-Rb1, Rb2, m-Rb2, Rg1, ChIVa); содержание этих соединений в биомассе из биореактора в 2-3 раза меньше. Удаление кинетина из состава питательных сред при аппаратном выращивании культуры женьшеня приводило к снижению суммарного содержания гинзенозидов и индивидуальных соединений в клеточной биомассе по мере увеличения общей продолжительности выращивания. Культура *P. japonicus* количественно синтезирует значительно больше тритерпеновых гликозидов олеаноловой кислоты, чем культура *P. fruticosa*. Таким образом, эти культуры клеток являются перспективными продуцентами тритерпеновых гликозидов.

РАЗВИТИЕ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРЕДЫ ПОСТ-АКТИВАЦИОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Лопухов А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, дом 60, 142132 E-mail: vubi_myaso@mail.ru

Дополнительное культивирование совместно с пост-активационными агентами, такими как 6-диметиламинопурин (6-DMAP) и циклогексимид, стимулирует снижение уровня фактора промоции созревания (MPF) у активированных ооцитов и, как следствие, преодоление блока мейоза на стадии МП, что наряду с действием основного активирующего сигнала способствует успешному развитию партеногенетических эмбрионов, а также эмбрионов, полученных методом переноса ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) [1,2]. Тем не менее, есть подтверждение, что состав среды пост-активационного культивирования может корректировать это положительное влияние [3]. Также очевидно, что условия *in vitro*, в которых происходит развитие ооцитов после искусственной активации до сих пор остаются субоптимальными и требуют

детализации [4]. В рамках настоящей работы проводили сравнительный анализ влияния коммерческих сред BO-IVC и CR1aa на этапе пост-активационного и последующего культивирования искусственно активированных ооцитов на формирование и качество партеногенетических эмбрионов крупного рогатого скота. Отобранные по качеству ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) на протяжении 22 часов созревали в среде ТС-199, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 10 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и 10 мкг/мл лютеинизирующего гормона (ЛГ). Созревшие ооциты активировали к дальнейшему развитию в присутствии 5 мМ иономицина и культивировали в течение 4 часов с 2 мМ 6-диметиламинопурином (6-ДМАП) и 10 мкг/мл циклогексимида в среде CR1aa или BO-IVC с целью дополнительной активации. Ооциты после пост-активации в среде CR1aa далее переносили в среду CR1aa (группа CR1aa/CR1aa) или BO-IVC (группа CR1aa/BO-IVC). В случае дополнительной активации в среде BO-IVC дальнейшее их культивирование проходило только в среде BO-IVC (группа BO-IVC/BO-IVC). Доля раздробившихся ооцитов не различалась между экспериментальными группами и варьировала от 73,0 до 76,5%. Также не обнаружено значимого влияния условий пост-активационного культивирования ооцитов на их развитие до стадии поздней морулы и бластоцисты, выход которых для групп CR1aa/CR1aa, CR1aa/BO-IVC и BO-IVC/BO-IVC составил $28,9 \pm 1,7$, $40,4 \pm 7,5$ и $36,0 \pm 6,4\%$ соответственно. Тем не менее выявлено влияние культуральной среды на преодоление партеногенетическими эмбрионами 8-16 клеточного блока развития. В группе CR1aa/CR1aa 56,8% 2-х клеточных партеногенетических эмбрионов не обнаружили потенции к развитию до 16-ядерной стадии. Смена среды CR1aa на среду BO-IVC (группа BO-IVC/BO-IVC) достоверно снижала данный уровень ($p < 0,05$). В случае использования смешанного варианта культивирования (группа CR1aa/BO-IVC) отмечали не только его положительный эффект на активацию эмбрионального генома ($p < 0,001$), но также и на повышение качества партеногенетических эмбрионов (среднее число ядер, достигших стадии поздней морулы/бластоцисты, $p < 0,05$). Таким образом, среда BO-IVC на этапах пост-активации и дальнейшего развития искусственно активированных ооцитов коров по эффективности получения партеногенетических эмбрионов на стадии бластоцисты сравнима со средой CR1aa. Тем не менее ее замена на этапе пост-активации на среду CR1aa позволяет повысить качество партеногенетических эмбрионов.

Список литературы:

1. Alberio R., Zakhartchenko V., Motlik J., Wolf E. Mammalian oocyte activation: Lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.* 2001. 45: 797–809.
2. Liu L., Ju J.C., Yang X. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.* 1998. 49(3): 298-307.
3. Wani N., Hong S.B. In vitro maturation of pre-pubertal goat oocytes and their development after chemical activation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2019. 31(1): 205.
4. Kharche S. D., Birade H.S. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production: A review. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 2013. 4: 170–182.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДОПОГЛОЩАЮЩЕГО ПОЛИМЕРНОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И АКРИЛОВОГО ГИДРОГЕЛЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Фатеев А.Д.¹, Успенская М.В.¹

**1 – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО». Санкт-Петербург, 197101
E-mail: fateev.arseny@yandex.ru**

Водопоглощающие полимерные композиционные материалы, благодаря своим уникальным свойствам, используются во многих отраслях промышленности, в медицине, а также в сельском хозяйстве [1,2].

В сельском хозяйстве водопоглощающие полимеры используются в основном в качестве “конструкционного материала” для создания требуемых условий, благоприятных для роста и развития растений и семян. Развитие современных технологий и методов создания новых полимерных материалов с заданными свойствами позволит повысить функционал их применения как в сельскохозяйственной, так и в пищевой промышленности [3]. Применение «умных» полимерных материалов, способных реагировать на незначительные изменения окружающей среды, и систем доставки питательных веществ и минеральных удобрений, может помочь, например, в борьбе с вирусами и другими патогенами различных с/х культур, при регенерации и повышении плодородности почв и т.д. В частности, известно, что использование пестицидов и гербицидов в составе полимерных влагопоглощающих композиций, может существенно снизить вносимые дозы последних, повысить эффективность их применения и косвенно защитить окружающую среду чем при непосредственном внесении их в пахотный слой или при обработке поверхности почвы [4].

Наиболее широко известны водопоглощающие акриловые полимеры, которые получают методом полимеризации в водной растворе из акриловой кислоты и ее солей и производных акриламида в качестве мономеров, и использующиеся для удержания влаги и кондиционирования почв [5]. Такой материал способен поглощать в 100 раз больше своего собственного веса, что связано с наличием химических или физических поперечных связей отдельных полимерных цепей, а также наличием функциональных групп, включая $-\text{COO}-$, $-\text{OH}$ и $-\text{NH}_2$ [6].

В качестве природного полимера в сельском хозяйстве известен хитозан, который является биосовместимым, биоразлагаемым и нетоксичным веществом. Он обладает огромным потенциалом при создании биоматериалов для сельского хозяйства, в том числе, в качестве материала для покрытия семян зерновых культур, орехов, фруктов и овощей, положительно влияя на развитие семян и растений [7,8]. В частности:

- Изменяет проницаемость плазматической мембраны семян;
- Увеличивает концентрацию сахаров и пролина;
- Усиливает активность пероксидазы, каталазы, фенилаланинаммониализы и тирозинмониализы;
- Является противогрибковым, противовирусным и бионематодным средством;
- Действует как носитель, способствующий медленному высвобождению удобрений;
- Улучшает влагоудерживающие свойства почвы;
- Обладает наилучшими хелатирующими свойствами;
- Способен удалять тяжелые металлы и красители и контролировать загрязнение озера водорослями и действует как кондиционер почвы.

Создание полимерного материала для покрытия семян на основе хитозана и акрилового гидрогеля может способствовать прорастанию и развитию растений.

Список литературы:

1. Cheung H., Ho M., Lau K., Cardona F., Hui D. Natural fibre-reinforced composites for bioengineering and environmental engineering applications. 2009. 40(7), 655–663. DOI 10.1016/j.compositesb.2009.04.014
2. Валеева Н.Ш., Хасанова Г.Б. Биополимеры – перспективный вектор развития полимерной промышленности 2013. №22.
3. Колпакова В.В., Усачев И.С., Соломин Д.А. Биоразлагаемые полимеры: составные биокomпоненты и технологические решения производства. 2019. №12. DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10197

4. Puoci F., Francesca I., Spizzirri U., Cirillo G., Curcio M., Nevio P. Polymer in Agriculture: a Review. 2008. 3. DOI 10.3844/ajabssp.2008.299.314.
5. Колесников, Л.Е., Успенская, М.В., Кременская, Марианна Игоревна Влияние акрилового почвенного кондиционера на продуктивность и устойчивость мягкой пшеницы к болезням. 2021. №7.
6. Cheng D., Liu Y., Yang G., Zhang A. Water- and Fertilizer-Integrated Hydrogel Derived from the Polymerization of Acrylic Acid and Urea as a Slow-Release N Fertilizer and Water Retention in Agriculture. 2018. 66(23), 5762–5769. DOI 10.1021/acs.jafc.8b00872
7. Зимина Ю.А., Срослова Г.А., Постнова М.В. Применение биопрепаратов на основе хитозана в сельском хозяйстве. 2018. №3. DOI: <https://doi.org/10.15688/nsrjvolsu.2018.3.3>
8. Pandey P., Verma M. K., De N. Chitosan in agricultural context-A review. 2018. 7. 87-96.

**СЕКЦИЯ
«КЛАССИЧЕСКИЕ И ЦИФРОВЫЕ МЕТОДЫ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ
РАСТЕНИЙ»**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕРАОММЕТРИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЭТИОЛИРОВАННОГО РАСТЕНИЯ И ЕГО КОРОТКОВОЛОДОВОГО ФОТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ОТКЛИКА

Адамович Е.Д.*, Градов О.В.

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова (ФИЦ ХФ РАН), Отдел динамики химических и биологических процессов

**E-mail: camacsociety@gmail.com*

Несмотря на то, что первые измерения электрического сопротивления растений относятся более, чем к вековой давности, приложения импедансных методов анализа и контроля состояния растений в биотехнологии и прикладной ботанике вошли в силу не ранее последней четверти XX века, что было связано с развитием инструментария. Уже к началу 1990х гг. появляются циклы работ, посвященных не только фундаментальным модельным [1-3], но и технико-методическим аспектам измерений импеданса на тканях и клетках растений, на корнях и листьях [4-7]. Доказывается, что импедансометрия или диэлькометрия может являться эффективным средством анализа тепловых и холодовых повреждений тканей растения [8-10]. Однако инструментальные аспекты остаются, как правило, недоступными для реальных агрономов и биотехнологов - поскольку требуют использования прецизионных анализаторов [5], радиометрических и шигометрических, в том числе - радиочастотных шигометрических приборов [7], нередко хорошо работая только с взвесами клеток (выполняя функцию импедансного счётчика протопластов) с сканированием по диапазону частот [6]. Поэтому до сих пор превалирующее значение в характеристике состояния тканей и модулей растений имеет EIS - электроимпедансная спектроскопия [11-14], не всегда правильно применяемая и интерпретируемая многими агротехниками. Действительно, не вполне понятно, как интерпретировать с привязкой к конкретным моделям (таким, как Cole–Davidson function-based impedance model) отклик конкретных растений [15], как биологу без физматобразования интерпретировать сдвиг фазового угла при растительном стрессе [16], и т.д. Поэтому необходимо внедрение, на практике, более простых способов кинетического / динамического анализа импеданса с привязкой к топографии конкретных растений (что заместило бы потребность практики в электроимпедансной и радиочастотной томографии для задач фенотипирования [17]).

Нами предлагается использовать для этого элементарные тераомметры типа Е6-13А с клетками (камерами) Фарадея, способные работать даже в полевых условиях при наличии аккумулятора [18-20]. С их помощью можно регистрировать динамику роста и затухания импеданса растения при различных воздействиях (от этиолирования до тепла и холода в термостатируемых клетках Фарадея), характеризующие также гомеостазис и кинетику адаптации растения к раздражителю. Мы наблюдали: а) колебания импеданса свежего листа до наступления необратимых процессов (<https://youtu.be/6Q4oGgnNgF0>); б) высокую импедансную стабильность свежесорванного листа (малое компенсаторное изменение: <https://youtu.be/qqvEiCclayw>); в) рост сопротивления листа в этиолировании (<https://youtu.be/BAVwPfWVD80>); г) слабые флуктуации - переходный цикл реактивной декомпенсации с амплитудой на порядок менее колебаний сопротивления на активном листе сразу после установки его на стенд (https://youtu.be/MW_YncDBa5w); ускорение импедансной кинетики при УФ-облучении листа растения в 254 нм ЕПРОМ-еразере.

Список литературы:

1. Zhang, M. I. N., Stout, D. G., & Willison, J. H. M. (1990). Electrical impedance analysis in plant tissues. Symplasmic Resistance and Membrane Capacitance in the Hayden Model. *Journal of Experimental Botany*, 41(3), 371-380. <https://doi.org/10.1093/jxb/41.3.371>

2. Zhang, M. I. N., & Willison, J. H. M. (1991). Electrical impedance analysis in plant tissues. A Double Shell Mode. *Journal of Experimental Botany*, 42(11), 1465-1475. <https://doi.org/10.1093/jxb/42.11.1465>
3. Zhang, M. I. N., Repo, T., Willison, J. H. M., & Sutinen, S. (1995). Electrical impedance analysis in plant tissues: on the biological meaning of Cole-Cole α in Scots pine needles. *European Biophysics Journal*, 24(2), 99-106. <https://doi.org/10.1007/BF00211405>
4. Zhang, M. I. N., & Willison, J. H. M. (1993). Electrical impedance analysis in plant tissues. Impedance Measurement in Leaves. *Journal of Experimental Botany*, 44(8), 1369-1375. <https://doi.org/10.1093/jxb/44.8.1369>
5. Zhang, M. I. N., & Willison, J. H. M. (1991). A microcomputer-based precision impedance analyzer for measuring electrical impedance in plant tissues. *Canadian Journal of Plant Science*, 71(4), 1285-1288. <https://doi.org/10.4141/cjps91-180>
6. Homblé, F., & Jenard, A. (1990). Membrane Operational Impedance Spectra of Plant Cells. *Phys. Methods in Plant Sciences*, 11, 181-202. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83611-4_7
7. Tippet, J. T., & Barclay, J. L. (1987). Detection of bark lesions caused by *Phytophthora cinnamomi* in *Eucalyptus marginata* with the plant impedance ratio meter and the Shigometer. *Canad. J. of Forest Res.*, 17(10), 1228-1233. <https://doi.org/10.1139/x87-190>
8. Zhang, M. I. N., & Willison, J. H. M. (1992). Electrical impedance analysis in plant tissues: in vivo detection of freezing injury. *Canadian journal of botany*, 70(11), 2254-2258. <https://doi.org/10.1139/b92-279>
9. Zhang, M. I. N., & Willison, J. H. M. (1992). Electrical impedance analysis in plant tissues: the effect of freeze-thaw injury on the electrical properties of potato tuber and carrot root tissues. *Canad. Journal of Plant Science*, 72(2), 545-553. <https://doi.org/10.4141/cjps92-068>
10. Zhang, M. I. N., Willison, J. H. M., Cox, M. A., & Hall, S. A. (1993). Measurement of heat injury in plant tissue by using electrical impedance analysis. *Canadian journal of botany*, 71(12), 1605-1611. <https://doi.org/10.1139/b93-195>
11. Jócsák, I., Végvári, G., & Vozáry, E. (2019). Electrical impedance measurement on plants: A review with some insights to other fields. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 31(3), 359-375. <https://doi.org/10.1007/s40626-019-00152-y>
12. Liu, Y., Li, D., Qian, J., Di, B., Zhang, G., & Ren, Z. (2021). Electrical impedance spectroscopy (EIS) in plant roots research: a review. *Plant Methods*, 17(1), 1-25. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00817-3>
13. Lin, C. M., Chen, L. H., & Chen, T. M. (2012). The development and application of an electrical impedance spectroscopy measurement system for plant tissues. *Computers and electronics in agriculture*, 82, 96-99. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2011.10.017>
14. Hussain, M. I., El-Keblawy, A., Akhtar, N., & Elwakil, A. S. (2021). Electrical Impedance Spectroscopy in Plant Biology. *Sustainable Agriculture Reviews*, 52, 395-416. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73245-5_12
15. Kapoulea, S., Psychalinos, C., & Elwakil, A. S. (2020). Realization of Cole–Davidson function-based impedance models: Application on plant tissues. *Fractal and Fractional*, 4(4), 54. <https://doi.org/10.3390/fractalfract4040054>
16. Cseresnyés, I., Rajkai, K., Takács, T., & Vozáry, E. (2018). Electrical impedance phase angle as an indicator of plant root stress. *Biosystems Engineering*, 169, 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2018.03.004>
17. Corona-Lopez, D. D., Sommer, S., Rolfe, S. A., Podd, F., & Grieve, B. D. (2019). Electrical impedance tomography as a tool for phenotyping plant roots. *Plant Methods*, 15(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0438-4>
18. Adamovich, E. D. & Gradov, O. V. (2018). Teraohmmeter-assisted measurements of plant leaf resistance. 2. Kinetic registration of plant leaf resistance (10x time-lapse registration). *IEEE DataPort*, 10.21227/x4nc-w679.
19. Adamovich, E. D. & Gradov, O. V. (2018). Teraohmmeter-assisted measurements of plant leaf resistance. 3. Oscillations of plant leaf resistance. *IEEE DataPort*, 10.21227/5j37-ep41.

20. Adamovich, E. D. & Gradov, O. V. (2018). Teraohmmeter-assisted measurements of plant leaf resistance. 4. Accelerated photoinduced kinetics of electric impedance shifting under UV irradiation. *IEEE DataPort*, 10.21227/4nc9–9c71.

ГЕНЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕГУЛЯЦИИ АЗОТНОГО ОБМЕНА У КОРОТКОСТЕБЕЛЬНЫХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Кочешкова А.А., Баженов М.С., Черноок А.Г., Дивашук М.Г.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
г. Москва, Россия
alina.korotaeva@gmail.com*

Доступность азота является одним из факторов, влияющих на урожайность и качество урожая зерновых культур по всему миру. Все растения нуждаются во внешнем источнике азота в неорганической форме, ведь он функционирует как ключевой компонент биомолекул, таких как белки, нуклеиновые кислоты, хлорофилл и различные вторичные метаболиты. Доступность азота является ограничивающим фактором в сельскохозяйственной деятельности.

Сорта «Зеленой революции», несущие мутантные аллели генов *Rht-B1* или *Rht-D1*, *Ppd-D1* дают урожайность в 2-3 раза выше, чем у прочих сортов, так как большая часть ассимилянтов расходуется на формирование зерна. Однако возделывание этих сортов требует внесения большого количества удобрений, что приводит к повышенной экологической нагрузке сельского хозяйства на окружающую среду. Повышение эффективности использования азота одновременно с сохранением высоких урожаев – современные цели селекции пшеницы.

Эффективность использования азота контролируется множеством генов, не только кодирующих мембранные транспортеры и ферменты азотного метаболизма, но и определяющих общую архитектуру растения, особенности корневой системы, реакцию растений на изменение уровня питания, скорость старения листьев и регулирующих многие другие процессы. Таким образом, для улучшения эффективности использования азота целесообразно изучение генетики данного признака и использование методов маркер-опосредованной селекции.

Цель исследования оценить влияние аллельного состояния генов азотного обмена на хозяйственно ценные признаки в коллекции сортов озимой мягкой пшеницы несущей аллели «зеленой революции» генов *Rht-B1* и *Ppd-D1*.

В качестве растительного материала была использована коллекция из 195 образцов озимой мягкой пшеницы, входящая в состав коллекции Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко, г. Краснодар. Данная коллекция была оценена в течении трех лет вегетации по фенотипическим признакам и на урожайность в полевых условиях. В трехлетнем опыте было подтверждено, что полукарликовость и нечувствительность к фотопериоду положительно влияют на увеличение урожайности зерна.

На редкие однонуклеотидные полиморфизмы в последовательностях генов у пшеницы нами были разработаны два молекулярные KASP-маркера на гены *NGR5-1B*, *PARG-2A*. Среди коллекции были выявлены образцы, несущие мутантные аллели по этим генам. Но так как полиморфизмы являются редкими статистически значимых данных получено не было.

Был разработан молекулярный маркер на полиморфизм в промоторе гена *TaGS2*. Данный маркер фланкировал индел 10 п.н. и позволял выявить два аллеля: *TaGS2-A1a* и *TaGS2-A1b*. По результатам однофакторного дисперсионного анализа *TaGS2-A1* не оказал

существенного влияния ни на один из признаков. Однако у образцов, несущих аллель *TaGS2-A1b*, наблюдалась тенденция к повышению устойчивости к полеганию и задержке колошения. Наибольшая урожайность зерна $9,3 \pm 0,3$ т/га отмечена у образцов, сочетающих «положительные» аллели всех трех генов (*Rht-B1b* или *Rht-B1e* или *Rht-D1b* вместе с *Ppd-D1a* и *TaGS-2Ab*).

Таким образом, *TaGS2-A1b* может иметь потенциал для селекции чувствительных к фотопериоду сортов пшеницы с альтернативными генами карликовости, которые могут быть оптимальными для выращивания в определенных условиях.

Благодарности: Авторы выражают благодарность заведующей отделом селекции и семеноводства пшеницы и тритикале, академику РАН, доктору сельскохозяйственных наук Беспаловой Людмиле Андреевне за предоставление растительного материала.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 21-76-00043

ОЦЕНКА УРОЖАЙНОСТИ ПШЕНИЦЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ ПОЛУЧЕННЫХ БПЛА НА НИЗКОЙ ВЫСОТЕ

Кожекин М.В., Генаев М.А., Коваль В.С., Афонников Д.А.

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск 630090

Email: kozhekinmv@bionet.nsc.ru

Протоколы ручного подсчёта плотности колосьев в посевах долгое время были единственным способом оценки урожайности, однако, такие методы трудоёмки и занимают много времени. Альтернативой является разработка автоматизированной системы, работающей в полевых условиях. Большинство таких систем позволяют получать 2D изображения посевов и использовать методы компьютерного зрения для их автоматической обработки, в частности, для подсчёта колосьев на изображениях [1]. Современные методы анализа изображений, основанные на нейросетевых алгоритмах и глубоком обучении, позволяют идентифицировать колосья на изображениях посевов и подсчитывать их количество с высокой точностью [2-4]. Использование данных технологий оправдано более низкой стоимостью и приемлемой точностью, сравнимой с результатом работы людей.

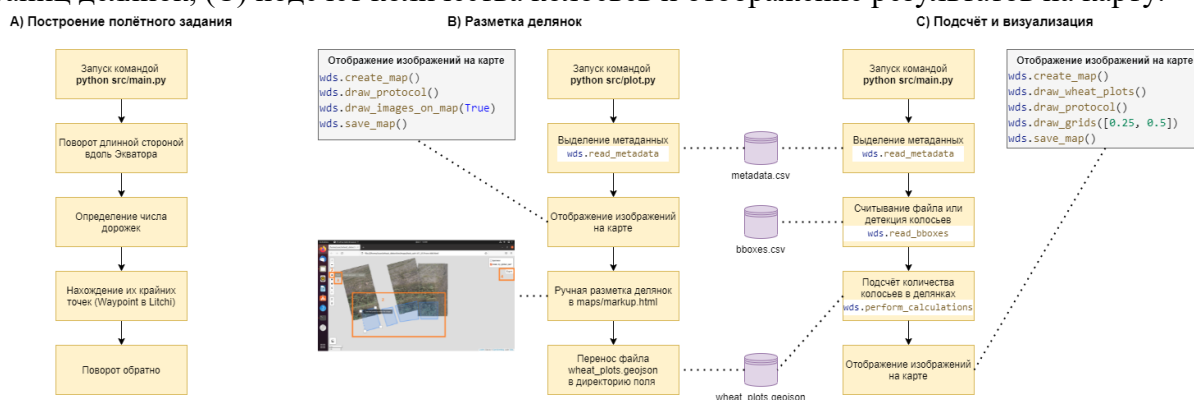
В этом исследовании модели детекции объектов Faster R-CNN[5] и EfficientDet[6] были обучены и оценены на 3 наборах данных: GWHD 2020, 2021[7-8] и изображениях пшеницы, снятых 29.07.2021 в поле СибНИИРС в фазе колошения. Ручной подсчёт колосьев проводили после уборки с площади 0.25 м^2 . Количество продуктивных стеблей подсчитывали в четырёх повторностях. В качестве обучающей выборки был выбран датасет GWHD 2020, а для тестирования моделей использовались снимки добавленные в 2021 году. Метрика mean Average Precision (mAP) с пороговым значением IoU 50% рассчитывалась как в работе [9]. После обработки изображений и подсчёта колосьев в нашей системе машинного зрения, вручную размечались границы делянок. Далее внутри программы рассчитывалось количество колосьев на них и зная, что площадь каждой делянки равна 24.75 м^2 , вычислялась плотность колосьев. Для сравнения значений, полученных при ручном подсчёте и рассчитанных нашей системой использовались коэффициенты корреляции Пирсона и Спирмена.

Результаты тестирования моделей детекции колосьев представлены в таблице ниже (frcnn - Faster R-CNN, effdet - EfficientDet).

	frcnn	effdet		frcnn	effdet		frcnn	effdet
ARC_1	39.81	34.63	CIMMYT_3	46.72	33.29	Terraref_1	19.29	14.60
Arvalis_10	50.53	69.74	KSU_1	22.03	38.33	Terraref_2	6.89	4.97
Arvalis_11	29.33	35.06	KSU_2	37.49	39.99	Ukyoto_1	34.25	36.62
Arvalis_12	51.37	40.97	KSU_3	30.52	37.33	ULiège-GxABT_1	25.14	33.68
Arvalis_7	62.79	43.13	KSU_4	13.61	26.00	UQ_10	49.70	39.84
Arvalis_8	57.31	47.16	NAU_2	72.45	69.98	UQ_11	30.18	24.95
Arvalis_9	44.60	36.09	NAU_3	73.26	73.54	UQ_7	50.64	46.49
CIMMYT_1	37.84	20.91	NMBU_1	55.72	37.84	UQ_8	41.23	32.99
CIMMYT_2	63.66	42.13	NMBU_2	33.13	22.17	UQ_9	38.28	30.33

Тестирование модели проводилось на 27 поднаборах, добавленных в датасет GWHD в 2021 году. Каждый набор предоставлен одной из 10 организаций. Велика вариативность сортов и условий съёмки. Наивысшую точность по метрике mAP обеспечивает модель EfficientDet 73.54%. Среднее арифметическое значение mAP по всем 27 выборкам 41.40 у Faster R-CNN и 37.51 у EfficientDet. Сравнение оценок плотности колосьев, посчитанных с использованием нашего подхода и вручную показало, что значения коэффициентов Спирмена и Пирсона между ними составляют 0.6176 и 0.5405 при $p < 0.01$.

Структура разработанного пакета WDS (Wheat Detection System) представлена ниже: (А) построение лётного задания на четырёхугольном поле по 4 точкам, (В) разметка границ делянок, (С) подсчёт количества колосьев и отображение результатов на карту.



Нами разработана система компьютерного зрения для оценки урожайности пшеницы путём подсчёта количества колосьев на изображениях снятых с БПЛА. Программный пакет решает 4 задачи:

- формирует лётное задание для съёмки посевов на низкой высоте (~3 м);
- подсчитывает на каждом изображении количество колосьев;
- привязывает обработанные снимки к карте посевов;
- визуализирует плотность колосьев и их количество на отдельных делянках.

Программный пакет, инструкции и скрипты для установки доступны по ссылке: https://github.com/Sl07h/wheat_detection.

Работа выполнена за счёт финансирования Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН (№ 075-15-2019-1662).

Список литературы:

1. Jin X. et al. High-throughput estimation of crop traits: A review of ground and aerial phenotyping platforms //IEEE Geoscience and Remote Sensing Magazine. – 2020. – Т. 9. – №. 1. – С. 200-231. DOI 10.1109/MGRS.2020.2998816
2. Khaki S. et al. Wheatnet: A lightweight convolutional neural network for high-throughput image-based wheat head detection and counting //Neurocomputing. – 2022. – Т. 489. – С. 78-89. DOI 10.1016/j.neucom.2022.03.017

3. Hasan M. M. et al. Detection and analysis of wheat spikes using convolutional neural networks //Plant Methods. – 2018. – Т. 14. – №. 1. – С. 1-13. DOI 10.1186/s13007-018-0366-8
4. Zhao J. et al. A wheat spike detection method in UAV images based on improved YOLOv5 //Remote Sensing. – 2021. – Т. 13. – №. 16. – С. 3095. DOI 10.3390/rs13163095
5. Ren S. et al. Faster r-cnn: Towards real-time object detection with region proposal networks //Advances in neural information processing systems. – 2015. – Т. 28.
6. Tan M., Pang R., Le Q. V. Efficientdet: Scalable and efficient object detection //Proceedings of the IEEE/CVF conference on computer vision and pattern recognition. – 2020. – С. 10781-10790.
7. David E. et al. Global Wheat Head Detection (GWHD) dataset: a large and diverse dataset of high-resolution RGB-labelled images to develop and benchmark wheat head detection methods //Plant Phenomics. – 2020. – Т. 2020. DOI 10.34133/2020/3521852
8. David E. et al. Global wheat head detection 2021: an improved dataset for benchmarking wheat head detection methods //Plant Phenomics. – 2021. – Т. 2021. DOI 10.34133/2021/9846158
9. Yu J., Zhang W. Face mask wearing detection algorithm based on improved YOLO-v4 //Sensors. – 2021. – Т. 21. – №. 9. – С. 3263. DOI 10.3390/s21093263

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ГЕНА КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ *RHT-B1P (RHT-17)* НА ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ У ТВЕРДОЙ И МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

**Назарова Л. А.¹, Черноок А. Г.¹, Никитина Е. А.¹, Коробкова В. А.¹,
Юркина А. И.¹**

***1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва
127550***

E-mail: lpukhova@yandex.ru

Высота пшеницы – сложный признак, который определяется различными группами генов и связан с морфологией и фертильностью колоса, временем цветения, продуктивностью растения и качеством зерна [5, 7, 8]. Одним из путей повышения урожайности пшеницы, особенно в условиях интенсивного земледелия, является оптимизация высоты растений за счет создания низкостебельных сортов [1, 3, 6]. Наибольшее значение в создании форм пшеницы с оптимальной высотой растений в настоящее время имеют аллельные варианты генов, определяющих высоту растений, обладающие фенотипическим эффектом снижения высоты растений. Среди многообразия генетических факторов, отвечающих за высоту растения пшеницы, особое место занимают аллельные варианты гена *Rht* (Reduced height), представленного у мягкой пшеницы тремя гомеологами: *Rht-A1*, *Rht-B1* и *Rht-D1*.

Фенотипический эффект таких мутантных аллелей – растения со сниженной высотой, которую нельзя восстановить внешней обработкой гиббереллинами (гиббереллин-нечувствительный фенотип) [2].

Мутантный аллель *Rht-B1p (Rht-17)* снижает высоту растений не менее чем на 30% у мягкой пшеницы и не менее чем на 45% у твердой пшеницы, а так же влияет на хозяйственно-ценные признаки [4].

Целью нашего исследования было изучение влияния нового аллелей гена короткостебельности *Rht-B1p (Rht-17)* на хозяйственно-ценные признаки. Объектом нашего исследования было поколение растений В₂F_{2:3}, различающиеся по аллельному составу, и полученное в результате скрещивания мягких пшениц

Cltr17241//Новосибирская67 и мягкой пшеницы с твердой пшеницей Chris Mutant/#517//LD222 выращенное в полевых условиях Нечерноземной зоны в 2019 году. При помощи молекулярных маркеров нами были получены данные генотипирования растений; эффект генов определяли путем оценки статистической значимости различий между гомозиготами.

При анализе независимого расщепления у мягкой пшеницы было выявлено: ген *Rht-B1p* (*Rht-17*) снижает высоту растений на 26,1 см (31%), уменьшает длину главного колоса на 0,3 см (4%), уменьшает массу 1000 зёрен на 1,95 г (5%), снижает массу зерна главного колоса на 0,11 г (7%), увеличивает количество дней от посева до колошения на 2 дня (4%) и количество дней от посева до цветения на 3 дня (6%), уменьшает длину первого верхнего междоузлия на 13,4 см (35%); не влияет на плотность колоса и на число зерен главного колоса.

При анализе независимого расщепления у твердой пшеницы было выявлено: ген *Rht-B1p* (*Rht-17*) снижает высоту растений на 45,4 см (46%), уменьшает длину главного колоса на 0,4 см (5%), уменьшает массу 1000 зёрен на 2,6 г (5%), снижает массу зерна главного колоса на 0,11 г (6%), увеличивает количество дней от посева до колошения на 5 дней (9%) и количество дней от посева до цветения на 6 дней (10%), уменьшает длину первого верхнего междоузлия на 24 см (50%); не влияет на плотность колоса и на число зерен главного колоса.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-16-001 21.

Список литературы:

1. Беспалова Л.А. Реализация модели полукарликового сорта академика П.П. Лукьяненко и ее дальнейшее развитие. В: Пшеница и тритикале: Матер. науч.-практ. конф. «Зеленая революция П.П. Лукьяненко». Краснодар, 2001;60-71.
2. Билова Т.Е., Рябова Д.Н., Анисимова И.Н. Молекулярные основы признака карликовости у культурных растений. Сообщение II. Della-белки, их структура и функции. С.-х. биология. 2016; 51(5):571-584. DOI 10.15389/agrobiology.2016.5.571rus.
3. Лукьяненко П.П. Выведение новых сортов интенсивного типа. Аграр. наука. 1970;4:54.
4. Bazhenov M.S., Divashuk M.G., Amagai Y., Watanabe N., Karlov G.I. Isolation of the dwarfing *Rht-B1p* (*Rht17*) gene from wheat and the development of an allele-specific PCR marker. 2015. 35:213. DOI 10.1007/s11032-015-0407-1
5. Chen H., Moakhar N., Iqbal M., Pozniak C., Hucl P., Spaner D. Genetic variation for flowering time and height reducing genes and important traits in western Canadian spring wheat. Euphytica. 2016;208: 377-390. DOI 10.1007/s10681-015-1615-9
6. Divashuk M., Bepalova L., Vasilyev A., Fesenko I., Puzyrnaya O., Karlov G. Reduced height genes and their importance in winter wheat cultivars grown in southern Russia. Euphytica. 2013;190(1):137- 144. DOI 10.1007/s10681-012-0789-7.
7. Würschum T., Langer S., Longin C., Tucker M., Leiser W. A threecomponent system incorporating Ppd-D1, copy number variation at Ppd-B1, and numerous small-effect quantitative trait loci facilitates adaptation of heading time in winter wheat cultivars of worldwide origin. Plant Cell Environ. 2018a;41:1407-1416. DOI 10.1111/pce. 13167.
8. Würschum T., Leiser W., Langer S., Tucker M., Longin C. Phenotypic and genetic analysis of spike and kernel characteristics in wheat reveals long-term genetic trends of grain yield components. Theor. Appl. Genet. 2018b;131:2071-2084. DOI 10.1007/s00122-018- 3133-3

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ФЕНОТИПИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФОТОМОРФОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ ТОМАТА, БАЗИЛИКА И РЕДИСА

Товстыко Д.А., Слепцов Н.Н., Котов Г.Е., Анташкевич А.А., Тараканов И.Г.

В последние годы в физиологии растений активно изучаются закономерности формирования и функционирования фенотипов растительных организмов [1,2]. Данное направление получило название феномика. Исследования в этой области направлены на анализ регуляции морфогенеза растений под воздействием различных факторов внешней среды, фотосинтетических и метаболических процессов, выявление механизмов стрессовых реакций и адаптации к неблагоприятным факторам среды, формирования высокой урожайности и повышения качества сельскохозяйственной продукции [1,2]. Это междисциплинарная область исследований, включающая компьютерные науки, биологию, статистику и геномику в попытке связать сложные фенотипы растений с генетической экспрессией для решения возникающих проблем в сельском хозяйстве, связанных с продовольственной безопасностью в условиях истощения природных ресурсов и при прогнозируемом изменении климата [2].

Фенотипирование растений является важным методическим подходом в области феномики, который осуществляется при помощи регистрирующих устройств, камер, систем машинного зрения (СМЗ) и др. Получаемая информация накапливается и обрабатывается с использованием специализированных компьютерных приложений, которые обеспечивают детальный анализ измеряемых параметров. Современные комплексы по изучению растений способны осуществлять «высокопроизводительное» фенотипирование (ВФ), при котором могут регистрироваться характеристики сотен или даже тысяч растений. ВФ растений на основе изображений облегчает изучение фенотипов благодаря точному анализу большого количества растений за короткий промежуток времени, что сокращает необходимость в трудоемком физическом человеческом труде. Процесс анализа растений с помощью СМЗ идет непрерывно, позволяя многократно количественно определять одни и те же признаки в различных масштабах в течение жизненного цикла растения.

Цель нашего исследования – разработка системы фенотипирования рассады с.-х. культур на базе алгоритмов машинного зрения. Для этого решались задачи подбора компонентов системы фенотипирования (бокс, системы выращивания растений, освещения и полива, система получения изображений, управляющий сервер-компьютер) и тестирования ее функциональности в лабораторных условиях.

Объектами исследования были выбраны растения редиса сорта Жара, базилика сорта Розы и детерминантного томата сорта Великолепная семерка. Растения выращивали в вегетационных сосудах на установках в контролируемых условиях. В экспериментах использовали искусственное светодиодное освещение растений. Световой блок содержал варианты облучения от 6, 12 и 18 часов, с интенсивностью облучения от 146, 220 и 440 мкмоль/м²*с.

В наших исследованиях мы использовали высокопроизводительную платформу визуализации. Растения регистрировали непрерывно с помощью RGB-камер, полученные изображения обрабатывали и получили кривые зависимости проекции площади ассимиляционной поверхности от периода выращивания и от фотопериода.

Визуализацию растений начинали на стадии семядольных листьев и регистрировали снимки до появления настоящих листьев (до смыкания рядов растений). Камера успешно отслеживала движение семядолей и листьев, также она способна анализировать виды растений с различной морфологией листьев. Результатом работы циркадных часов у растений являются ежедневные ритмические движения их листьев. Эти колебания можно использовать для оценки периода внутренних часов. Для определения времени движения листьев, использовали покадровую фотосъемку, которая выполнялась круглосуточно и при смене освещения.

Обнаружено, что никтинастические движения листьев растений были детерминированы продолжительностью темновой фазы. При выключении освещения листья начинали терять тургор через период времени эквивалентный длительности световой фазы. Причем в зависимости от культуры наблюдали разное изменение тургесцентного состояния растений. У базилика был более плавный переход, тогда как у редиса и томата наблюдали резкие пики спада проекции площади листовой поверхности. Особенно это заметно на примере редиса и томата на режимах облучения 12 ч х 220 мкмоль/ м²*с, 12ч х 440 мкмоль/ м²*с, 6ч х 440 мкмоль/ м²*с. Наблюдали прямую корреляционную зависимость между уменьшением фотопериода, одновременным увеличением интенсивности освещения (ИФ) и резким снижением тургора листьев растений томата и редиса в ночной период. При 18-часовом облучении и ППФ 146 мкмоль/ м²*с наблюдали умеренную транспирацию листьев и более плавный переход их в тургесцентное состояние на протяжении всего периода регистрации растений. В процессе онтогенеза у всех растений наблюдали одинаковую закономерность увеличения проекции площади листовой поверхности.

Движение семядолей зависело от активного роста гипокотилия растения, при прекращении вытягивания которого подвижность зародышевых листьев снижалась. При появлении настоящих листьев наблюдали переход колебаний от нижних (семядольных) листьев к верхним ярусам.

Циркадные ритмы у растений, несомненно, имеют приспособительное значение: амплитуда их колебания расширяет норму реакции организма в онтогенезе. Наследственные эндогенные ритмы могут перестроиться в процессе развития, что мы наблюдали при переходах проекции площади листьев на более высокие уровни в конце темнового периода (на томате, режим 6ч х 440 мкмоль/ м²*с) и обратный переход в конце светового дня (на редисе, режим 18ч х 146 мкмоль/ м²*с). Необходимо дальнейшее изучение и подбор оптимальных световых рецептов для оптимизации продукционного процесса растений в системах интенсивного культивирования.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-317 от 20 апреля 2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Список литературы:

1. Tarakanov I.G., Tovstyko D.A., Lomakin M.P., Shmakov A.S., Sleptsov N.N., Shmarev A.N., Litvinskiy V.A., Ivlev A.A. Effects of Light Spectral Quality on Photosynthetic Activity, Biomass Production, and Carbon Isotope Fractionation in Lettuce, *Lactuca sativa* L., Plants. Plants 2022, 11, 441. doi:10.3390/plants11030441.
2. Шашко А.Ю., Бондаренко В.Ю., Михальченко А.А., Каляга Т.Г., Сафонова О.Ю., Пржевальская Д.А., Черныш М.А., Колбанов Д.В., Жабинский В.Н., Хрипач В.А., Смолич И.И., Соколик А.И., Вальвачев А.Н., Абламейко С.В., Краснопрошин В.В., Смоликова Г.Н., Демидчик В.В. Разработка системы фенотипирования древесных растений при помощи алгоритмов машинного зрения и спектрального анализа. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;1:33–44. doi:10.33581/2521-1722-2019-1-33-44

ЦИФРОВОЕ ФЕНОТИПИРОВАНИЕ НА ПОЛЯХ И В ЛАБОРАТОРИИ

Литвинов Д.Ю.

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научноисследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва
127550. E-mail: dlitvinov@gmail.com**

Высокопроизводительное цифровое фенотипирование (ВЦФ) - новое быстро развивающееся направление фенотипирования, которое должно преодолеть отставание в производительности фенотипирования растений от производительности современных высокопроизводительных методов генотипирования. Для проведения ВЦП созданы и продолжают совершенствоваться платформы с масштабом областей фенотипирования от отдельного растения до промышленных сельскохозяйственных полей и значительной части сухопутной поверхности земли. На уровне отдельных растений можно проводить глубокое фенотипирование, с измерением морфологических параметров с разрешением в доли миллиметра, определением отражения в широком диапазоне видимого и ИК спектра с помощью гиперспектральных камер и ИК термографии, измерением флуоресценции хлорофилла. Глобальные спутниковые системы используют главным образом спектральную информацию об отражении растений в нескольких областях спектра. В многочисленных исследованиях опробовано более сотни спектральных индексов, вычисленных на основе отражения на нескольких длинах волн. Наиболее широко используемым индексом является Нормализованный Цифровой Индекс Вегетации (NDVI), значение которого зависит от содержания хлорофилла. Ряд других индексов, учитывающих отражение листьев в зеленой и синей областях спектра, может обнаруживать биотические и абиотические стрессы у растений.

В нашей лаборатории используется система цифрового фенотипирования, проводящая 3Д лазерное сканирование с наложением на 3Д модель мультиспектральных данных, с помощью которой был проведен ряд исследований по влиянию минерального питания, абиотических стрессов, действию гербицидов на растения, результаты которых будут представлены на конференции. Также, будет рассказано о программе ФеноБорд, созданной в нашей лаборатории для более глубокого анализа фенотипических данных.

АНАЛИЗ ГЕНОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ ЗА ДЛИНУ ВЕГЕТАЦИОННОГО ПЕРИОДА У ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Меглицкая Я.С.¹, Мохов. Т.Д.¹, Черноок А.Г.¹, Тархов И.С.²

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научноисследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва

127550 E-mail: yanameg20@gmail.com

2 – ФГБНУ «НЦЗ имени П.П. Лукьяненко», Краснодар, Россия

Современные сорта пшеницы по своей фотопериодической чувствительности варьируют от сильночувствительных до абсолютно нечувствительных, способных к колошению даже в условиях короткого 8-часового дня. Фотопериодическая нечувствительность считается важным свойством современных высокоадаптивных сортов со стабильно высокой продуктивностью. Возможность воздействовать на такой важный фактор, как сроки перехода к колошению в современных условиях изменяющегося климата может дать явное преимущество при селекции новых высокоадаптивных сортов пшеницы. Этим объясняется неизменно высокий интерес к донорам новых аллелей генов *Ppd* у мягкой пшеницы. Гены *Ppd*, отвечающие за чувствительность растения к длине дня (фотопериоду), играют важную роль при адаптации сортов пшеницы к разным агроклиматическим условиям. Доминантный аллель *Ppd-D1a* гена *Ppd-D1*, локализованный в хромосоме 2DS, отвечает за нечувствительность к фотопериоду и раннее цветение, в то время как другой рецессивный аллель – *Ppd-D1b* ответственен за фотопериодическую чувствительность.

Целью работы было изучение и характеристика генов, детерминирующих ультраскороспелость у мягкой озимой пшеницы.

Объектами исследований послужили образцы пшеницы мягкой озимой группы полукарликовых СП Ультра, присланные из ФГБНУ «Национальный центр зерна им П.П. Лукьяненко». Из них 180 образцов – потомство от скрещивания сортов Гордиан и Ультра 11, а 154 образца - потомство от скрещивания сортов Платин и Ультра 11.

В результате полученных данных из ФГБНУ «Национальный центр зерна им П.П. Лукьяненко», было установлено, что родительские сорта имеют одинаковые аллели по генам скороспелости *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* и *Ppd-A*, *Ppd-B*. По гену *Ppd-D1* имеются различия, сорта Гордиан и Платин имеют аллель *Ppd-D1b* (414 п.н.), а сорт Ультра 11 имеет аллель *Ppd-D1a* (288 п.н.), поэтому в популяциях потомков мы исследовали этот ген.

В результате исследования было установлено, что в популяции Гордиан длительность периода от посева до фазы выхода в трубку между образцами с тремя аллелями не сильно отличается. У образцов с рецессивным аллелем *Ppd-D1b* этот период составил 197,09 дней, с доминантным аллелем *Ppd-D1a* – 196,47 дней, у гетерозиготы – 196,57 дней. В популяции сорта Платин образцы с рецессивным аллелем *Ppd-D1b* в среднем имеют более длинный период от посева до выхода в трубку (198,87), чем с доминантным аллелем *Ppd-D1a* (196,47). Гетерозиготные генотипы имеют среднее значение на уровне 198,63.

В период от посева до фазы колошение в популяции Гордиан у образцов с аллелем *Ppd-D1b* среднее количество дней 222,28, что на три дня больше, чем у образцов с аллелем *Ppd-D1a* (220,23 дня). Период посев-колошение в популяции Платин у образцов с аллелем *Ppd-D1b* среднее количество дней – 222,87, а у образцов с аллелем *Ppd-D1a* на 4 дня меньше – 219,23 дней, у образцов, несущих гетерозиготу 220,04 дней.

В промежутке от посева до цветения в популяции Гордиан аллель *Ppd-D1a* ускоряет этот период на 3 дня (224,65 дней) по сравнению с аллелем *Ppd-D1b* (226,97 дней). В популяции сорта Платин у образцов с аллелем *Ppd-D1b* количество дней составило 228,13, а аллель *Ppd-D1a* ускоряет этот период на 4 дня (224,65 дней). Количество дней у гетерозиготы в среднем составило 224,96 дней.

В ходе работы был произведен анализ гена *Ppd-D1*, детерминирующего скороспелость у мягкой озимой пшеницы: при помощи молекулярных маркеров и метода KASP были получены данные об аллельном состоянии этого гена у изучаемых образцов.

Наличие доминантного аллеля совпадает с более коротким вегетационным периодом. Образцы 232 и 301 имеют самый длинный период вегетационного периода (241 день) и имеют аллель *Ppd-D1b*, 414 п.н. У образцов 100 и 200 самый короткий вегетационный период (218 дней), они имеют аллель *Ppd-D1a*, 288 п.н.

Таким образом, линии озимой мягкой пшеницы, несущие в своем генотипе доминантный аллель *PpdD1a* (288 п.н.) рекомендованы для дальнейшего использования в качестве источников скороспелости в различных селекционных программах.

Работа выполнена при поддержке Г/З 0431-2022-0011.

Список литературы:

1. Беспалова, Л.А. Фотопериодическая чувствительность и молекулярное маркирование генов *Ppd* и *Vrn* в связи с селекцией сортов пшеницы альтернативного образа жизни / Л.А. Беспалова [и др.] // Докл. РАСХН. – 2010. – № 6. – С. 3–6.
2. Калыбекова, Ж. Т. Аллельное разнообразие генов, контролирующих реакцию на яровизацию и чувствительность к фотопериоду среди сортов яровой мягкой пшеницы различного географического происхождения / Ж.Т.Калыбекова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 180. – №. 4. – С. 177-185.
3. Мухордова, М.Е. Идентификация доноров скороспелости у озимой пшеницы с помощью ДНК-маркеров и диаллельного анализа / М.Е. Мухордова // Вестник АГАУ. – 2022. – №1. – С.207.

4. Потокина, Е.К. Комбинация аллелей генов Rpd и Vrn определяет сроки колошения у сортов мягкой пшеницы / Е.К. Потокина [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 16. – №. 1. – С. 77-86.
5. Файт, В.И. Влияние различий генов Rpd на агрономические признаки озимой мягкой пшеницы / В.И. Файт [и др.] // Цитология и генетика. – 2007. – №6. – С. 89-93.

ИНТЕРАКТИВНЫЙ СТЕНД ДЛЯ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ PHENOBOARD

Ульянов Д.С., Ульянова А.А., Литвинов Д.Ю., Кочешкова А.А., Дивашук М.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550, E-mail: biotech@iab.ac.ru

Цифровое фенотипирование – активно развивающаяся область науки, автоматизирующая установление особенностей морфологии растений за счёт современных технологий. Такой метод требует значительно меньше трудозатрат, чем традиционная селекция, при этом обеспечивая высокую производительность. При этом на образцы не оказывается деструкционного воздействия, что позволяет наблюдать процессы развития и адаптации в динамике.

На сегодня существует порядка двадцати различных систем цифрового фенотипирования растений как в лабораторных условиях, так и в поле [1]. Подобные системы включают в себя сканеры с RGB, RGB+NIR, либо мультиспектральными камерами, а также сопутствующие вычислительные средства, осуществляющие обработку получаемых сканирований.

Цифровое фенотипирование позволяет получать метрики ключевых морфологических параметров растений. Однако, программ, поставляемых с прибором, часто не достаточно для гибкой настройки отображения динамики изменения параметров и расчётов статистики. В таком случае, данные с прибора экспортируются в формате csv и требуют дальнейшей обработки, в целях которой нами был создан интерактивный стенд PhenoBoard, написанный на Python 3 и работающий на платформе Jupyter Notebook. Данный интерактивный стенд позволяет:

- фильтровать выбросы в данных на уровнях отдельных измерений и образцов;
- группировать близкие временные точки в кластеры для совместного анализа;
- выбирать сложные фильтры для различных анализируемых групп образцов;
- получать в реальном времени инфографику для выбранных данных с возможностью настройки параметров отображения;
- проводить ряд статистических исследований для выбранных срезов данных по одному клику.

PhenoBoard был протестирован в ходе ряда экспериментов по выращиванию различных сельскохозяйственных культур. Эксперименты проводились на приборе TraitFinder производства Phenospex [2,3].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания № 0431-2022-0008.

Список литературы:

1. Li D. et al. High-Throughput Plant Phenotyping Platform (HT3P) as a Novel Tool for Estimating Agronomic Traits From the Lab to the Field // Front Bioeng Biotechnol. Frontiers Media SA, 2020. Vol. 8. P. 623705.

2. Phenospex - Smart plant analysis & Phenotyping systems [Electronic resource]. URL: <https://phenospex.com/> (accessed: 15.09.2022).
3. Phenospex FAQ [Electronic resource]. URL: <https://phenospex.helpdocs.com/> (accessed: 15.09.2022).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕАКЦИИ ЗЛАКОВЫХ НА ЗАСУХУ В ДИНАМИКЕ

Ульянова А.А., Ульянов Д.С., Кочешкова А.А., Дивашук М.Г., Литвинов Д.Ю.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г.

Москва, 127550

E-mail: shurf116@gmail.com

Цифровое фенотипирование – относительно новая и перспективная область науки, которая применяет современные методы, такие как съемка мультиспектральными камерами, для фенотипирования растений. Такой способ получения фенотипической информации о растении крайне выгоден благодаря легкой возможности оптимизации и автоматизации. В сравнении с традиционными методами селекции он показывает себя гораздо менее трудоемким и более производительным. Кроме того, цифровое фенотипирование является не деструктивным методом, а значит при его использовании за растениями можно наблюдать в течение всего периода их развития. Последним преимуществом является способность мультиспектральных камер фиксировать изменения, недоступные глазу человека [1]. Однако, немалую часть установок для цифрового фенотипирования представляют приборы с простыми RGB камерами из-за их сравнительно небольшой стоимости. Кроме того, в ограниченных случаях RGB камера с хорошим пространственным разрешением способна дать даже более точные результаты, чем мультиспектральная с худшим пространственным разрешением [2].

В данной работе использовалась платформа TraitFinder, которая получает изображения с двух мультиспектральных камер, составляет трехмерное облако точек и предоставляет ряд морфологических (таких как площадь листовой, угол наклона листьев, и т.д.) и спектральных (NDVI и т.д.) параметров для оценки растений. Благодаря возможности отслеживать состояние растений неинвазивно, можно рассматривать реакцию растений на стресс в динамике [3,4].

Устойчивость растений к абиотическому (засуха, засоление, неподходящие климатические условия) и биотическому (вредители и т.д.) стрессу является в последние годы важным предметом исследований из-за изменения климата и сокращения площади подходящих для сельского хозяйства территорий. Это связано с засолением и эрозией почв вместе с истощением ресурсов. При этом, засухоустойчивость растений – комплексный признак, на который может влиять относительное содержание воды, эффективность транспирации, развитие корневой системы и другие факторы [5].

Влияние засухи на растения было уже изучено методами цифрового фенотипирования на различных культурах: Arabidopsis, ячмень, виноград, томат, пшеница, рис, кукуруза и другие [5].

В данном эксперименте мы изучали засухоустойчивость злаковых. Сначала растения выращивались на песке с поливом раствором Хогланда, далее было два периода засухи продолжительностью около 5 дней с наблюдением за скоростью и динамикой восстановления растений.

Для этого были выбраны следующие параметры:

- Морфологические параметры:

- о Высота растения
- о Угол наклона листы
- Спектральные параметры:
- о NDVI – Normalized Difference Vegetation Index или нормализованный относительный индекс растительности. Это один из самых известных индексов, используемый для оценки растительного покрова. Как правило, чем выше NDVI, тем больше у растений здоровой зеленой листы, также он может использоваться как индикатор уровня биотического/абиотического стресса растений [6].
- о PSRI (Plant Senescence Reflectance Index) является индикатором старения/болезни/увядания

Далее результаты обрабатывались с помощью интерактивного стенда Phenoboard, позволяющего получить сложную статистику, фильтровать данные по времени суток, датам, обработкам, сортам, находить и устранять выбросы и предоставлять инфографику для выбранных данных.

Результаты эксперимента показали, что сорта тритикале обладают большей устойчивостью к засухе, показывая более плавные изменения спектральных параметров, чем сорта твердой и мягкой пшеницы. Сорта тритикале показывали более высокие в сравнении с мягкой и твердой пшеницей значения среднего NDVI и более низкие значения PSRI, что соответствует более здоровым растениям. Что касается морфологических параметров, угол наклона листьев четырех сортов тритикале также меняется менее резко и остается меньшим по значениям, то есть растения меньше полегают от стресса. Однако, это может быть связано с меньшей высотой растений. Средствами Phenoboard сорта мягкой пшеницы были разделены на две группы: с более плавными и более резкими изменениями спектральных параметров в ответ на стресс. Некоторые сорта реагировали на засуху с задержкой, также показывая более высокую устойчивость к засухе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания № 0431-2022-0008

Список литературы:

1. Li D. et al. High-Throughput Plant Phenotyping Platform (HT3P) as a Novel Tool for Estimating Agronomic Traits From the Lab to the Field // Front Bioeng Biotechnol. 2021. Vol. 8.
2. Sun D. et al. Advances in optical phenotyping of cereal crops // Trends Plant Sci. 2022. Vol. 27, № 2. P. 191–208.
3. Phenospex - Smart plant analysis & Phenotyping systems [Electronic resource]. URL: <https://phenospex.com/> (accessed: 15.09.2022).
4. Phenospex FAQ [Electronic resource]. URL: <https://phenospex.helpdocs.com/> (accessed: 15.09.2022).
5. Jangra S. et al. High-Throughput Phenotyping: A Platform to Accelerate Crop Improvement // Phenomics. 2021. Vol. 1, № 2. P. 31–53.
6. Araus J.L. et al. Crop phenotyping in a context of Global Change: what to measure and how to do it // J Integr Plant Biol. 2021.

**СЕКЦИЯ
«ЦИТОЛОГИЯ И ЦИТОГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ»**

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ КОРНЕЙ ДВУХ ГЕНОТИПОВ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) В УСЛОВИЯХ NaCl-ЗАСОЛЕНИЯ *IN VITRO*

Богоутдинова Л.Р.¹, Баранова Е.Н.^{1,3}, Юмаков Д.Д.¹, Халилуев М.Р.^{1,2}

1 – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия iab@iab.ac.ru

2 – Кафедра биотехнологии Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550 Россия info@rgau-msha.ru

3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук (ГБС РАН) INFO@GBSAD.ru

В некоторых регионах засоленность почв является одной из самых больших проблем при возделывании культурных растений, поэтому использование районированных солеустойчивых сортов в промышленных масштабах может значительно повысить урожайность. Большинство всех растений, включая важные хозяйственные и продовольственные культуры, в том числе и томат, являются гликофитами. Они чрезвычайно чувствительны к концентрациям солей в почве, например, при 100-200 мМ может наблюдаться ингибирование роста или гибель растений (1). Поэтому одним из важнейших направлений селекции является идентификация солеустойчивых генотипов растений и их последующий отбор (2). Целью настоящей работы было проведение сравнительной оценки реакции корней двух различающихся по солеустойчивости генотипов томата, регенерированных в различных условиях NaCl-засоления *in vitro*, по ряду цитологических показателей, которые могут быть предложены для оценки генотипов на солеустойчивость.

В ходе работы была изучена структурная организация корней томата линии ЯЛФ и сорта Рекордсмен (неустойчивый и устойчивый к засолению генотип соответственно), образованных путем ризогенеза при добавлении 0, 75 и 150 мМ NaCl. Фрагменты кончиков корней фиксировали при комнатной температуре в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере Соренсена с добавлением 1.5%-ной сахарозы. Затем растительный материал отмывали, дофиксировали, обезвоживали и заключали в смесь эпоксидных смол. Полутонкие поперечные срезы толщиной 1 — 2 мкм получали стекляннм ножом и монтировали на предметное стекло.

В результате исследования были проанализированы степень вакуолизации клеток чехлика и коры, а также длина клеток коллумеллы и эпидермиса. У обоих изученных генотипов повышение вакуолизации цитоплазмы клеток чехлика по сравнению с контролем наблюдалось только при 150 мМ NaCl. В клетках коры корня линии ЯЛФ при 75 мМ NaCl повышенная степень вакуолизации не отмечена, тогда как при 150 мМ NaCl показано повышение данного показателя по сравнению с контрольным вариантом. В отличие от линии ЯЛФ, у клеток коры корней сорта Рекордсмен увеличение вакуолизации клеток по сравнению с контролем было отмечено и при 75 мМ NaCl, и при 150 мМ NaCl.

При повышении концентрации NaCl в питательной среде у клеток колумеллы томата линии ЯЛФ при концентрации 75 мМ NaCl отмечено уменьшение данного показателя по сравнению с контрольным вариантом, а при концентрации 150 мМ NaCl — его увеличение. У сорта Рекордсмен наблюдалось увеличение длины клеток колумеллы по сравнению с контролем при 75 и 150 мМ NaCl. У эпидермальных клеток линии ЯЛФ при 75 мМ NaCl наблюдалось снижение длины клеток, а удлинение клеток наблюдалось при 150 мМ NaCl. У сорта Рекордсмен при 75 и 150 мМ NaCl наблюдалось уменьшение длины клеток эпидермиса.

Таким образом, в ходе исследования показаны отличия между генотипами по степени вакуолизации клеток коры, а также длины клеток коллумелы и эпидермиса. Полученные в ходе исследования данные могут быть использованы для оптимизации методов отбора устойчивых к засолению растений на ранних этапах их развития, что может значительно ускорить селекционный процесс. Работа выполнена в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0574-2019-0002.

Список литературы:

1. Malcolm C.V., Lindley V.A., O'leary, J.W., Runciman H.V., Barrett-Lennard E. G. Halophyte and glycophyte salt tolerance at germination and the establishment of halophyte shrubs in saline environments. *Plant and Soil*. 2003. 253:171.
2. Zaki H.E.M., Yokoi S. A comparative *in vitro* study of salt tolerance in cultivated tomato and related wild species. *Plant Biotechnology*. 2016. P. 16.1006 a.

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА В БИОТЕХНОЛОГИИ *BETA VULGARIS* L.

**Колесникова Е.О., Пономарева С.В., Донских Е.И., Музалевская А.А.,
Бердников Р.В.**

**Селекционно-генетический центр ООО «СоюзСемСвекла», 396030, Россия,
Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, д. 81
kolesnikovaeo@souzsemsvekla.ru**

Сахарная свекла в Российской Федерации является основным источником получения одного из важнейших продуктов питания – сахара. В условиях интенсификации сельского хозяйства главной задачей селекции *Beta vulgaris* L. является создание отечественных высокопродуктивных гибридов. При этом существует необходимость использования биотехнологических приемов для получения новых форм либо выравнивания и клонирования компонентов имеющихся селекционных достижений. Для создания диплоидных гибридов в настоящее время используют F1-гибрид между инбредной МС линией и неродственным О-типом как материнский компонент и открыто пылящую линию в качестве отцовского компонента-опылителя [1]. У данных растений при отборе материала для введения *in vitro* необходимо учитывать показатели, обуславливающие их перспективность для дальнейшей работы. К ним относятся в том числе и цитологические характеристики, такие как фертильность пыльцевых зерен, с которой связаны показатели потенциальной и реальной семенной продуктивности сахарной свеклы [2], а также хромосомный набор доноров эксплантов. В связи с этим целью наших исследований явилось изучение у растений МС-формы, О-типа и ОП качества пыльцы на основе цитоморфологических подходов и плоидности посредством проточной цитометрии.

Материал для исследования отбирали в полевых условиях в июне. Взятую из изолированных бутонов соцветий пыльцу окрашивали ацетокармином. В полученных препаратах подсчитывали процентное соотношение фертильных к общему числу пыльцевых зерен, измеряли их диаметр, строили вариационные кривые. Для идентификации хромосомного набора образцов *Beta vulgaris* L. проводили анализ клеточного цикла с использованием цитометра.

У исследуемых образцов с перспективными признаками при проведении анализа качества пыльцевых зерен рассматривались не только степень их окрашиваемости, но и диаметр. Ранжирование по размеру и построение вариационных кривых дало возможность наглядно представить степень неоднородности пыльцы по размеру и сделать выводы о ее качестве и способности к опылению. Исследования показали, что пыльцевое зерно *Beta*

vulgaris L. имеет две оболочки: наружную – прочную экзину и внутреннюю – интину, состоящую из клетчатки и пектиновых веществ. У отобранных форм О-типа было выявлено 10% полуфертильных образцов. Средний диаметр пыльцевого зерна растений с фертильностью 85–100% составил 9-12 мкм. У образцов с фертильностью ниже 85% встречались пыльцевые зерна с меньшим диаметром – 5-7 мкм (микропыльца), и более крупные – до 17 мкм (макропыльца). Растения многосемянных опылителей все оказались фертильными. В среднем данный показатель для них составил 97%. При этом колебания в размерах пыльцевых зерен были невелики. Наименьшее значение их диаметра составило 10 мкм, среднее, наиболее часто встречаемое значение, варьировало от 11 до 12 мкм, максимальное составило – 13,5 мкм. Пыльцевые зерна были равномерно окрашены. Все это подтверждало высокую фертильность образцов. Среди отобранных МС-форм 12% растений оказались полуфертильными, остальные 88% были на 100% стерильны. При их анализе могло наблюдаться незначительное количество имеющих прозрачную цитоплазму пыльцевых зерен, размер которых колебался от 5 до 8 мкм.

Растения, отобранные по признаку фертильности пыльцы, были идентифицированы по хромосомному набору. Диплоидные формы сахарной свеклы исходно характеризуются набором хромосом ($2n = 2x = 18$). Посредством анализа клеточного цикла было выявлено 89% $2n$ образцов. Миксоплоидия была характерна для 10% материала. Триплоидным оказался один образец.

Проведенные исследования позволили изучить фертильность пыльцевых зерен, основываясь на показателе интенсивности их окраски, на ранжировании по диаметру с построением вариационных кривых, что дало возможность выявить неоднородность пыльцы растений, следствием чего является плохая завязываемость семян. Кроме того, были выделены диплоидные формы и отбракованы растения с иными показателями плоидности. Данная работа позволила выделить для дальнейших биотехнологических и селекционных работ наиболее подходящие варианты О-типа, МС-форм и многосемянных ОП *Beta vulgaris*.

Список литературы:

1. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 2. Частная генетика растений. науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. Минск: Беларус. Навука. 2010. 579 с.
2. Цаценко Л.В., Синельникова А.С. Пыльцевой анализ в селекции растений. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2012. 77:38-48.

СОЗДАНИЕ ДНК-ЗОНДОВ ДЛЯ ФИЗИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ ГЕНОВ/МАРКЕРОВ НА ФИЗИЧЕСКИХ ХРОМОСОМАХ ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM CEPA* L.)

**Пивоваров А.М.^{1,2}, Кудрявцева Н.А.^{1,2}, Одинцов С.В.^{1,2}, Ермолаев А. С.^{1,2},
Хрусталева Л.И.^{1,2}**

**1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва 127550; E-mail: anton.pivovarov.2000@mail.ru**

**2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский государственный аграрный университет - МСХА
имени К. А. Тимирязева», г. Москва 127434; E-mail: anton.pivovarov.2000@mail.ru**

Технологии секвенирования и сборки геномов продвинулись далеко вперед за последние 10 лет, что позволяет осуществлять сборку *de novo* видов растений с крупными геномами таких как лук репчатый. Размер генома лука репчатого составляет 16 Gb с

огромным содержанием повторяющихся последовательностей (около 92-95%). При сборке генома *de novo* обычно используются генетические карты, которые строятся на основе статистического анализа числа рекомбинаций. Это может повлиять на точность упорядочения и ориентации скэффолдов внутри хромосомы, особенно в области подавления рекомбинации. Использование ДНК-зондов для физического картирования генов/маркеров на физических хромосомах позволяют увеличить точность сборок *de novo*. Физические карты обеспечивают нас информацией о позиции маркеров относительно цитологического ландшафта (центромера, теломера и т. д.), а также могут дать информацию о наличии хромосомных перестроек (Khrustaleva *et al.*, 2019).

Мы провели валидацию сборки генома лука репчатого, полно-геномное секвенирование которого было недавно выполнено Finkers с соавторами (Finkers *et al.*, 2021). Нами были созданы ДНК-зонды на хромосому 2 и 6 *A. cepa*. Для отбора маркеров была использована карта сцепления и базы данных полных геномных и транскриптовых последовательностей *A. cepa* (Fujito *et al.*, 2021; Finkers *et al.*, 2021). Визуализация маркеров на физической хромосоме осуществлялась с помощью метода Tyramide-FISH (Kudryavtseva *et al.*, 2021). Чтобы получить высокоспецифичный геномный зонд Tyr-FISH, мы разработали набор приёмов, основанных на выборе уникальной последовательности с минимальным потенциальным флуоресцентным фоном, возникающим в результате неспецифической гибридизации *in situ*. Чтобы избежать включения повторяющихся последовательностей в зонды использовались следующие приёмы: (1) последовательности транскриптов, не кодирующие белок, были исключены из анализа, поскольку они часто содержат повторы; (2) геномные последовательности были дополнительно проанализированы с помощью поиска сходства с базой данных повторов Viridiplantae (Dfam 3.3) и (3) поиск сходства со сборкой генома лука, использовался для фильтрации последовательностей зондов со значительным количеством геном-специфических повторов. Всего из группы сцепления хромосомы 2 и 6, содержащей 198 маркеров (135.5 сМ) и 126 маркеров (109.8 сМ), было отобрано 13 и 11 маркеров соответственно. ДНК-зонд так же был создан на ген *mlh1*, который не был генетически картирован и отсутствовал в генетических картах. Праймеры на соответствующие маркеры и ген *mlh1* подбирались с помощью программы Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012). С праймерами на отобранные маркеры была проведена ПЦР и ПЦР-продукт был очищен и клонирован в плазмиду pAL2-T (Evrogen), для последующего использования её в качестве пробы при проведении Tyramide-FISH.

Нами было установлено, что положение маркеров/генов на физической хромосоме не совпадало с их положением на генетической карте и соответственно собранных псевдохромосомах: 23,1% на хромосоме 2 и 27,3% на хромосоме 6, а также было определено положение гена *mlh1* на физической хромосоме 2 (Ermolaev *et al.*, 2022).

Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ проекта № 20-46-07005

Список литературы:

1. Ermolaev, A., Kudryavtseva, N., Pivovarov, A., Kirov, I., Karlov, G., & Khrustaleva, L. (2022). Integrating Genetic and Chromosome Maps of *Allium cepa*: From Markers Visualization to Genome Assembly Verification. *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10486.
2. Finkers, R., van Kaauwen, M., Ament, K., Burger-Meijer, K., Egging, R., Huits, H., ... & Scholten, O. (2021). Insights from the first genome assembly of Onion (*Allium cepa*). *G3*, 11(9), jkab243.
3. Fujito, S., Akyol, T. Y., Mukae, T., Wako, T., Yamashita, K. I., Tsukazaki, H., ... & Shigyo, M. (2021). Construction of a high-density linkage map and graphical representation of the arrangement of transcriptome-based unigene markers on the chromosomes of onion, *Allium cepa* L. *BMC genomics*, 22(1), 1-8.
4. Khrustaleva, L., Kudryavtseva, N., Romanov, D., Ermolaev, A., & Kirov, I. (2019). Comparative Tyramide-FISH mapping of the genes controlling flavor and bulb color in *Allium* species revealed an altered gene order. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.

5. Kudryavtseva, N., Ermolaev, A., Karlov, G., Kirov, I., Shigyo, M., Sato, S., & Khrustaleva, L. (2021). A dual-color tyr-FISH method for visualizing genes/markers on plant chromosomes to create integrated genetic and cytogenetic maps. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5860.
6. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ХРОМОСОМНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ J-ГЕНОМА *THINOPYRUM BESSARABICUM* НА ОСНОВЕ САТЕЛЛИТНЫХ ПОВТОРОВ

Юркина А.И., Соколова В.М., Крупин П.Ю., Ульянов Д.С., Дивашук М.Г.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва 127550; E-mail: aaaaaa3197@gmail.com***

В результате использования в селекции мягкой пшеницы ограниченного числа родительских форм ее генетическое разнообразие в значительной степени обеднело. В связи с этим возникает интерес к дикорастущим злакам – носителям J-генома, так как они обладают хозяйственно-ценными признаками [1]. Известно, что J-геном близок D-субгеному пшеницы [2], что позволяет использовать виды-носители J-генома для интрогрессии в пшеницу генов полезных признаков методом отдалённой гибридизации.

Поиск сателлитных tandemных повторов в нашей работе проводился при помощи RepeatExplorer2 на данных секвенирования *Th. bessarabicum* образца PI 531711 (2n=14, геномная формула - J^bJ^b), *Ae. crassa* образца AE 742 (2n=42, геномная формула - $D^1D^1X^{cr}X^{cr}$). На найденные повторы нами были подобраны праймеры с целью амплификации проб для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на следующие повторы: а) полученные из *Th. bessarabicum* PI 531711 – CL148, CL198, CL2; б) полученные из *Ae. crassa* – CL193, CL241, CL170, CL18, CL16, CL8, CL261, CL239, CL232. Для приготовления цитологических препаратов использовались корневые меристемы. В результате процедуры FISH с последующим кариотипированием выявленные двенадцать повторов были локализованы на хромосомах *Th. bessarabicum* образца PI 531711.

CL193 дает теломерные сигналы на одной из двух гомологичных хромосом 1J и 7J. CL241 локализуется на хромосоме 4J в середине длинного плеча и на хромосоме 7J дистально на коротком и длинном плечах. CL170 показал дистальную локализацию у одной из двух хромосом 1J на коротком плече, на хромосоме 3J на длинном плече, на хромосоме 6J на обоих плечах. Сигналы CL18 распределены диспергировано по всем хромосомам с наиболее интенсивными сигналами в проксимальных областях. Повторы CL148 и CL16 (гомологичен CL8) локализируются диспергировано на всех хромосомах, однако CL148 дает наиболее интенсивные сигналы в субтеломерной области хромосом, а CL16 в проксимальной. Повтор CL198 (гомологичен CL261) локализуется в прицентромерных областях всех хромосом кроме 1J и 3J. CL2 имеет сигналы гибридизации в теломерной области – на обоих плечах на хромосомах 1J и одной из двух хромосом 3J, только на коротком и только на длинном плече – на 2J и 6J соответственно. CL239 локализован теломерно на длинном плече хромосомы 2J, на коротком (у одной из двух хромосом) и на длинном (у обоих) на хромосоме 7J. CL232 локализацию *Th. bessarabicum* на хромосомах не показал.

Таким образом, четыре повтора показали диспергированный характер локализации, семь повторов были локализованы точно, один повтор не показал гибридизации на хромосомах *Th. bessarabicum*. Совместное использование выявленных нами повторов при

процедуре FISH позволяет однозначно идентифицировать индивидуальные хромосомы пырея бессарабского. Разработанные нами хромосомные маркеры открывают возможность проведения эволюционных и популяционных исследований, а также мониторинга интрогрессий чужеродного хроматина *Th. bessarabicum*, несущего новые ценные гены хозяйственно-ценных признаков, в геном пшеницы.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-16-00123.

Список литературы:

1. Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. / Использование генетического потенциала многолетних дикорастущих злаков в селекционном улучшении пшеницы // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – № 3. – С. 409-425.
2. Liu Z., Li D., Zhang X. Genetic relationships among five basic genomes St, E, A, B and D in Triticeae revealed by genomic southern and in situ hybridization // Journal of Integrative Plant Biology. – 2007. – Т. 49. – №. 7. – С. 1080-1086.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ МЕЙОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ (ASY1, ZYP1, MLH1, MUS81 и CENH3) У *ALLIUM CEPA* И *ALLIUM FISTULOSUM*

**Кудрявцева Н.А.^{1,2}, Хрусталева Л.И.^{1,2}, Одинцов С.В.^{1,2}, Пивоваров А.М.^{1,2},
Ермолаев А. С.^{1,2}, Симановский С.А.^{1,3}**

**1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научноисследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва 127550;**

**2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский государственный аграрный университет - МСХА
имени К. А. Тимирязева», г. Москва 127434;**

**3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук,
Москва 119071;**

Большинство живых организмов имеют случайное распределение хиазм вдоль хромосом как у лука репчатого (*A. cepa*). И только немногие являются исключением! Таким исключением является лук-батун (*A. fistulosum*), у которого хиазмы строго локализованы в проксимальных областях хромосом. Хиазмы – цитологическое проявление кроссинговера. Диаметрально противоположное распределение хиазм возможно является причиной стерильности ВС₁ гибридов между *A. cepa* и *A. fistulosum*.

События кроссинговера происходят в профазе I мейоза. Анализ синаптонемных комплексов (СК) – универсальный инструмент для изучения особенностей поведения хромосом в профазе I мейоза, который активно используется в современных исследованиях мейоза у растений. СК обеспечивает спаривание гомологичных хромосом и служит молекулярным компартментом для протекания процессов рекомбинации. У высших эукариот мейотическая рекомбинация невозможна в отсутствие СК (Богданов, Коломиец, 2007; Богданов, Гришаева, 2020).

Мы провели сравнительный анализ динамики сборки и разборки СК у *A. cepa* и *A. fistulosum* методом иммунофлуоресценции с использованием антител к мейотическим белкам ASY1 и ZYP1. ASY1 – белок латеральных элементов СК, ZYP1 – белок центрального элемента, объединяющий латеральные элементы. А также провели анализ распределения мейотических белков MLH1 и MUS81, которые являются ключевыми ферментами рекомбинации у растений, но отвечают за различные пути образования кроссоверов (Anderson *et al.*, 2014). MLH1 отвечает за образование кроссоверов I типа

(преимущественно дистальные области хромосом), MUS81 – за образование кроссоверов II типа (прицентромерные регионы). Распределение MLH1 и MUS81 вдоль физических хромосом оценивали по отношению к центромере (с помощью антител к CENH3).

Сравнительный иммунофлуоресцентный анализ сборки и разборки СК не выявил отличий в особенностях распределения белков ASY1 и ZYP1 у *A. ceras* и *A. fistulosum* в профазе I мейоза. Однако было выявлено отличие в динамике сборки и разборки СК у луков от большинства изученных растений (арабидопсис, рис, пшеница, кукуруза, ячмень), у которых ZYP1 начинает загружаться только в места спаривания хромосом. В то время как у луков ZYP1 начинает загружаться еще на неспаренные оси хромосом в лептотене-зиготене. Только у ржи ZYP1 начинает загружаться на неспаренные оси хромосом как это мы наблюдали у луков. С другой стороны, белок латеральных элементов ASY1 у *A. ceras* и *A. fistulosum* начинает выгружаться с мейотических хромосом после их полного спаривания – аналогично ситуации у риса, пшеницы, кукурузы и ячменя.

Для получения антител к мейоз-специфичным белкам AcMLH1, AcMus8, вовлеченным в рекомбинацию нами была выделена тотальная РНК у *A. ceras* сорта Халцедон и *A. fistulosum* сорта Русский зимний из бутонов, в которых пыльники находились на стадии профазы I мейоза. Были подобраны праймеры для ПЦР проверки наличия необходимых нам транскриптов в выделенной РНК. С помощью обратной транскриптазы MMLV (Евроген) была получена кДНК. ПЦР анализ с подобранными праймерами подтвердил наличие целевых транскриптов в выделенной РНК, а ПЦР продукты соответствовали ожидаемому размеру. По целевым транскриптам была построена аминокислотная последовательность белков AcMLH1 и AcMus8. На основе данных аминокислотной последовательности белков и тотальной РНК были наработаны поликлональные антитела в разных видах животных компанией «ПраймБиомед». Иммунофлуоресцентный анализу белков, вовлеченных в рекомбинацию, выявили тенденции в распределении MLH1 и MUS81 вдоль физических хромосом у *A. ceras* и *A. fistulosum*.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ проекта № 20-46-07005

Список литературы:

1. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. 2007. М.: КМК. – 358с
2. Богданов Ю.Ф., Гришаева Т.М. Консерватизм, изменчивость и эволюция мейоза. 2020. М.: КМК. – 345с.
3. Anderson L. K., Lohmiller L. D., Tang X., Hammond D. B., Javernick L., Shearer L., Basu-Roy S., Martin O.C., Falque M. Combined fluorescent and electron microscopic imaging unveils the specific properties of two classes of meiotic crossovers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014. 111(37), 13415–13420. DOI: 10.1073/pnas.1406846111.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РОДА *ILEX*

М.Х Гонсалес Франко^{1,2}, О.В. Разумова¹, О.С. Александров¹

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550

E-mail: jazminfranco800@gmail.com

2 – Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, 127550

В настоящее время изучение филогенетических отношений внутри родов растений может привести к пониманию эволюции и взаимосвязи между видами, которые распространены по всей земле. Род *Пех*, относящийся к семейству *Aquifoliaceae*, является крупнейшим древесным двудомным родом покрытосеменных растений, насчитывающим более 400 видов. Падубы (*Пех*) распространены в тропических, субтропических и умеренных регионах обоих полушарий. Они достигли наибольшего видового разнообразия в странах Южной и Северной Америки, Юго-Восточной и Восточной Азии, Европы и Полинезии. Падуб уже много столетий служит объектом разведения и селекции в целях озеленения и декоративного садоводства. Получено несколько сот гибридов и садовых форм, отличающихся по форме кроны, размерам, окраске листьев и плодов. Листья более 60 видов *Пех* используются для приготовления напитков. Наиболее широко известен чай (“*tereré*”), приготовленный из *I. paraguariensis*, “Йерба Мате” или Парагвайский Чай. Важно сказать, что для видов этого рода характерна высокая фенотипическая изменчивость, которая делает их интересным объектом для изучения.

Рибосомная ДНК (рДНК) — это последовательность ДНК, которая кодирует рибосомную РНК. Эти последовательности регулируют инициацию и амплификацию транскрипции и содержат как транскрибируемые, так и нетранскрибируемые спейсерные сегменты. рРНК, транскрибируемая из примерно 600 повторов ДНК, образует наиболее распространенный участок РНК, обнаруженный в клетках эукариот. рДНК имеет ген, кодирующий 5S рРНК, расположенный в геноме большинства эукариот. Гены 5S рРНК присутствуют в виде множества копий, расположенных в tandemных массивах в ядерном геноме высших растений. Каждая единица повтора 5S рДНК состоит из кодирующей последовательности длиной 120 п.н. и нетранскрибируемого спейсера (NTS). Вариация в области NTS использовалась у многих видов растений для изучения внутривидовых различий, картирования массивов 5S рДНК, эволюции генома и филогенетической реконструкции.

В этой работе выделили ДНК из 6 видов падуба. Фрагменты были амплифицированы с использованием праймеров 5S1 и 5S2. Ампликоны клонировали в бактерии, после чего отправляли на секвенирование. При секвенировании получили 3 последовательности двух разных видов и сравнили с последовательностями других видов падуба из базы данных NCBI с помощью программы GeneDoc. При сравнении нуклеотидных последовательностей нетранскрибируемых спейсеров разных видов падуба была показана гомология. Сходство нетранскрибируемых спейсеров вида *I. meserveae* little pirat с другими видами показывает самую низкую гомологию – между 18%–54%, одновременно уровень сходства 2 образца одного вида растения *I. aquifolium* “*Agentea marginata*” 1 и *I. aquifolium* “*Agentea marginata*” 2 варьируют между собой, разница составляет 2%–7%. С другими видами сходство *I. aquifolium* “*Agentea marginata*” 1 составляет 35%–97% и сходство *I. aquifolium* “*Agentea marginata*” 2 составляет 29%–88%. Таким образом, выявлен заметный полиморфизм нетранскрибируемых спейсеров у видов, и, следовательно, можно говорить о значительной изменчивости в данной группе.

ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ РАСТЕНИЙ - ЭВОЛЮЦИЯ, МОРФОЛОГИЯ, МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

**Разумова О.В.^{1,2}, Дивашук М.Г.¹, Александров О.С.¹, Романов Д.В.¹,
Карлов Г.И.¹**

**1 - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-
исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550
E-mail: razumovao@gmail.com**

Проблемы детерминации пола издревле волновали ученых. В отличие от животных, где разница между мужским и женским полом очевидна для всех, само наличие пола у растений долгое время вызывало сомнения даже в научной среде. Однако к концу XIX века половое размножение растений, и органы, за него отвечающие, были определены и общепризнаны. Столь долгий период сомнений в существовании мужских и женских органов размножения у растений по-видимому во многом можно объяснить тем, что большая часть покрытосеменных гермафродиты, то есть имеют мужские и женские органы в пределах одного цветка. Но небольшая часть растений образуют в пределах цветка только пестики или только тычинки, то есть являются раздельнополыми. При этом раздельнополые цветки могут располагаться как на одном растении, то есть образовывать гаметы с одного генотипа, так и на разных растениях, то есть быть подобно большинству животных полностью раздельнополыми. Несмотря на небольшое количество таких растений, всего порядка 6 % от общего описанного числа видов покрытосеменных, среди них много хозяйственно-значимых культур, возделываемых человеком. Таким образом, глубокое изучение механизмов детерминации пола у подобных видов открывает широкие возможности для управления урожайностью, поскольку как правило производство предъявляет конкретные требования к соотношению полов возделываемых растений.

Половые хромосомы, отличающиеся у мужских и женских организмов, по всей вероятности возникли в ходе эволюции из аутосом. Данное предположение было подтверждено множеством косвенных факторов и математических моделей. При этом то, что половые хромосомы растений обнаружены в филогенетически далеких группах, свидетельствует, что возникали они неоднократно и, по-видимому, разными путями. Таким образом прямое перенесение данных, полученных на одних видах, для объяснения формирования пола и половых хромосом у других групп, невозможно. Даже близкородственные виды растений могут обладать разными системами формирования пола. Такую картину можно наблюдать, например, у видов *Canabaceae*, *Rumex*, *Silene*.

Формально, мы в праве называть половыми хромосомами любые хромосомы, на которых локализованы гены, отвечающие за признаки формирования пола. Однако зачастую употребляя термин «половые хромосомы» мы подразумеваем именно гетероморфные половые хромосомы, то есть ту часть кариотипа, которая визуально отличается у мужских и женских особей. При этом иногда к тому моменту, как в ходе эволюции половые хромосомы (X и Y или Z и W) достигают того этапа, когда начинают внешне дифференцироваться, они теряют функцию непосредственного контроля над полом, и пол начинает определяться соотношением числа X-хромосом к аутосомам (так называемый балансовый механизм определения пола), что наблюдается, например, у *Humulus japonicus*, *Rumex acetosa* и др. Поэтому нам следует четко разделять понятия эволюции половых хромосом и эволюции механизмов детерминации пола, эти явления взаимосвязанные, но не тождественные. Ранее считалось, что эволюционная древность возникновения пола у двудомных растений прямо связана с морфологией половых хромосом. В начале эволюционного пути, после события потери рекомбинации, область хромосомы, не имеющая гомолога для спаривания, начинает накапливать ошибки ДНК, в частности большие области повторяющихся последовательностей некодирующей ДНК, в следствие чего физический размер половой хромосомы увеличивается. На этом этапе эволюции половые хромосомы часто оказываются самыми крупными в кариотипе. Далее, в ходе случайных событий рекомбинации, некодирующая часть половой хромосомы Y теряется, и на последних этапах эволюции Y-хромосома оказывается наоборот, самой маленькой в кариотипе. Данная концепция эволюции морфологии половых хромосом возникла в середине XX века и просуществовала практически в неизменном виде до нынешнего времени, получив подтверждение в целом ряде работ. Однако в последнее

время на других видах было показано, что эволюционно-древние виды могут иметь морфологически одинаковые половые хромосомы. Такая информация была получена для видов хурмы, ивы и тополя. У данных растений показано раннее, с эволюционной точки зрения, возникновение пола, однако их половые хромосомы визуальнo не отличимы от аутосом. Данные открытия демонстрируют, что как эволюция пола, так и эволюция морфологии половых хромосом, может идти разными путями, и механизмы, играющие роль в направлении пути эволюции требуют дальнейшего изучения.

В последнее десятилетие разработка и внедрение новых методов высокопроизводительного и точного секвенирования, биоинформатики, молекулярной биологии, оказало большое влияние в том числе и на исследования половых хромосом растений. Именно использование современных технологий, в том числе технологий геномного редактирования, позволило выяснить детали механизмов детерминации пола у видов *Salix* и *Populus*, цитогенетически определить половые хромосомы *Hippophae rhamnoides*, определить гены, связанные с полом у *Cannabis sativa*. Новый подход «от генома к хромосоме» для цитологического выявления половых хромосом, при котором сначала секвенируется геном растения или его участки, например пулы повторяющейся ДНК, показал свою высокую эффективность и относительную дешевизну в сравнении с традиционными способами поиска молекулярно-цитогенетических маркеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ договор № 20-016-00145

ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ НА ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМАХ КОНОПЛИ ПОСЕВНОЙ (*CANNABIS SATIVA* L.)

Романов Д.В.*, Дивашук М.Г.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Курчатowski геномный центр – ВНИИСБ, 127550, Москва,
ул. Тимирязевская, д.42.*

**E-mail: akabos1987@gmail.com*

Конопля посевная является важным сельскохозяйственным растением. Лечебными свойствами в разной степени обладают все надземные части растения. Используют при лечении ожогов, сердечно-сосудистых и бронхолегочных заболеваний, анемии, хрупкости костей и диатезе, заболеваний системы пищеварения. Кроме широкого использования в медицине, конопля успешно используется в качестве технической культуры, а также в косметологии и в кулинарии [1].

Конопля посевная является двудомным растением с XX\XY-системой детерминации пола, также существуют однодомные сорта, с женским кариотипом (XX) [2]. При этом двудомность конопли накладывает определенные ограничения на процесс ее возделывания. Мужские и женские растения созревают в разное время, из-за чего на определенном этапе необходимо проводить ручные прополки, что значительно сказывается на стоимости конечного продукта [3]. Определение механизмов детерминации пола в дальнейшем позволит влиять на процентное соотношение мужских и женских особей в популяции.

Механизмы функционирования половых хромосом до конца не изучены, поэтому мы решили провести исследования в области эпигенетики половых хромосом конопли обыкновенной. Известно, что различные модификации белков-гистонов могут активировать или наоборот подавлять экспрессию, таким образом экспрессионный

профиль хромосом можно косвенно оценить по профилям распределения модификаций гистоновых белков.

Основной задачей данной работы является определение эпигенетических механизмов детерминации пола с помощью построения профилей распределения модификаций гистоновых белков на половых хромосомах женских (XX) и мужских (XY) растений. Для решения поставленной задачи в первую очередь нами были созданы цитогенетические маркеры для идентификации половых хромосом конопли посевной. После этого была проведена и оптимизирована immuno-FISH на цитологических препаратах конопли посевной разного пола. Затем была проведена FISH с созданными цитогенетическими маркерами для идентификации половых хромосом конопли посевной на тех же препаратах, на которых проводился immuno-FISH.

В результате были обнаружены сигналы от антител на модификации гистоновых белков и сигналы гибридизации повторов, позволяющие идентифицировать половые хромосомы *C. sativa*. Нами были построены профили распределения модификаций гистоновых белков на половых хромосомах женских (XX) и мужских растений (XY), обсуждаются обнаруженные различия.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-76-00036).

Список литературы:

1. Russo, E. B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1614-1648.
2. Divashuk, M. G., Alexandrov, O. S., Razumova, O. V., Kirov, I. V., & Karlov, G. I. (2014). Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XY chromosome sex determination system. *PloS one*, 9(1), e85118.
3. Faux, A. M., Berhin, A., Dauguet, N., & Bertin, P. (2014). Sex chromosomes and quantitative sex expression in monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Euphytica*, 196(2), 183-197.

**СЕКЦИЯ
«СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»**

ДИНАМИКА АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ РИЗОСФЕРНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS*

Артамонова М. Н., Потатуркина - Нестерова Н. И.

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, 432017

Известно, что ризосферные микроорганизмы оказывают положительное влияние на растение-симбионт: они обеспечивают доступ питательных веществ растениям, защищают их от фитопатогенов, а также продуцируют физиологически активные и ростостимулирующие веществ [1,4]. Важно отметить, что положительный эффект ризобактерий на растение достигается только при успешной колонизации ими его ризосферы, начальным этапом которой является адгезия [2].

Явление адгезии интенсивно исследуется в последние годы. Изучение адгезивной активности бактерий может быть перспективным для разработки методов естественного воздействия на сельскохозяйственные растения. Однако большинство физических методов, используемых для измерения адгезии, имеют ряд недостатков, ограничивающих их применение в работе с микроорганизмами. Исследование адгезивной активности бактерий стало возможным благодаря созданию атомно-силовой микроскопии, которая основана на силовом взаимодействии между наноразмерным кантилевером, располагающимся на конце упругой консоли микроскопа, и поверхностью исследуемого образца [3]. В связи с этим целью исследования явилось изучение адгезивной активности ризосферных штаммов *B. subtilis*, выделенных из микробного сообщества ризосферы *C. перо L.* с помощью атомно-силовой микроскопии.

Объектом исследования явились штаммы *B. subtilis*, выделенные из ризосферы сельскохозяйственной культуры *C. перо L.* Силу адгезии определяли с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия). Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме. Показатель силы адгезии определяли по отклонению консоли от поверхности исследуемой клетки.

Данные, полученные путём АСМ-идентификации поверхности клеток *B. subtilis*, регистрации и анализа силовых кривых демонстрировали наращивание в процессе роста симбионта *C. перо L.* адгезивной активности исследуемых штаммов.

На начальных этапах вегетации растения сила адгезии бактериальных клеток увеличивалась незначительно, в фазе «всходы» и «бутонизация» данный показатель составил $32,0 \pm 6,0$ и $41,0 \pm 8,0$ нН ($p > 0,05$) соответственно. У штаммов *B. subtilis*, выделенных из микробиоценоза ризосферы *C. перо L.* в фазе «цветение» и «плодоношение», значения силы адгезии достоверно увеличивались по сравнению с первыми фазами ($73,0 \pm 5,0$ и $69,0 \pm 3,0$ нН соответственно; $p < 0,05$).

Таким образом, у изолятов *B. subtilis*, выделенных в ходе вегетации *C. перо L.*, выявлено повышение адгезивной активности, максимально проявившееся у штаммов, выделенных из микробиоценоза ризосферы в фазе «цветение» и «плодоношение» растения. Увеличение силы адгезии ризосферных штаммов бактерий в процессе роста *C. перо L.* способствует формированию взаимовыгодной растительно-микробной ассоциации с хозяином, что является одним из важных факторов положительного влияния бактерий на растения. Видимо, в процессе развития растения происходит увеличение продукции растительных полисахаридов, что усиливает адгезию *B. subtilis* к корневой поверхности и способствует формированию и функционированию ризосферного комплекса.

Список литературы:

1. Алексеева, А. С. Механизмы положительного влияния ризобактерий на жизнедеятельность растений / А. С. Алексеева, Н. И. Потатуркина-Нестерова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – С. 517.

2. Боронин, А. М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А. М. Боронин // Соросовский образовательный журн. – 1998. – № 10. – С. 25–31.
3. Потатуркина-Нестерова, Н. И. Применение клеточной эластографии для изучения биомеханических свойств *Bacillus subtilis* / Н. И. Потатуркина-Нестерова, М. Н. Артамонова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160. – № 8. – С. 209-211.
4. Ризосферные бактерии / Н. В. Феоктистова, А. М. Марданова, Г. Ф. Хадиева, М. Р. Шарипова // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – Т. 158. – № 2. – С. 207-224.

ПРОФИЛЬ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН РИЗОСФЕРНЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

Хитрова А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И.

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, 432017

Жирные кислоты, являясь одним из компонентов клеточной стенки бактерий, определяют некоторые физико-химические свойства и способны оказывать влияние на адаптивный потенциал микробной клетки. Динамика спектра жирных кислот клеточных мембран бактерий оказывает влияние на устойчивость к температурам, гидрофобность, адгезивную способность и колонизационные свойства [2]. Особую роль отводят ненасыщенным жирным кислотам, увеличение количества которых обеспечивает адекватную текучесть мембран и способствует высокой адаптивной активности и широкой распространенности микроорганизмов [3,4]. Известно, что морфофункциональные и механические свойства ризобактерий оказывают воздействие на физиологическое состояние растения-симбионта, кроме того, имеются данные, что это влияние изменяется в процессе роста растения [1]. Поэтому особый интерес представляет изучение профиля ненасыщенных жирных кислот ризобактерий, выделенных в ходе вегетации растения-ассоцианта.

Объектом исследования являлись штаммы *P. pseudoalcaligenes*, количественно преобладающих в ризосфере сельскохозяйственных культур *L. esculentum* Mill. С помощью газожидкостной хроматографии изучили профиль ненасыщенных жирных кислот клеточных мембран штаммов *P. pseudoalcaligenes*, выделенных из корневой системы томатов в фазу всходов, бутонизации, цветения и плодоношения. Метилловые эфиры общих жирных кислот получали согласно методике, утвержденной Европейским комитетом по стандартизации и рекомендованной Sherlock MIS-протоколом. Хроматографическое определение экзометаболитов проводили с использованием газового хроматографа Shimadzu GC-2010 (Япония).

Результаты исследования показали, что количество ненасыщенных жирных кислот, а именно Trans-9-октадеценовой кислоты и Cis-9-гексадеценовой кислоты, увеличивалось в ходе вегетации растения-ассоцианта. Так, содержание Cis-9-гексадеценовой кислоты возрастало в 1,3 раза, с $18,36 \pm 1,2\%$ в фазу всходов до $24,21 \pm 0,7\%$ в фазу плодоношения. Trans-9-октадеценовой кислоты – в 1,4 раза: с $9,47 \pm 0,3\%$ в фазу всходов до $13,04 \pm 0,7\%$ в фазу плодоношения. Отмечалось также увеличение общего содержания ненасыщенных жирных кислот по сравнению с насыщенными. В начале вегетационного периода ненасыщенные кислоты составляли 34% от общего количества липидов, в фазу плодоношения этот процент составил 42%.

Список литературы:

1. Артамонова, М. Н. Оценка стабильности морфофункциональных свойств ризосферных штаммов *Bacillus subtilis* с помощью атомно-силовой микроскопии / М. Н. Артамонова, Н. И. Потатуркина-Нестерова, Б. Б. Костишко // Теоретическая и прикладная экология. – 2021. – № 2. – С. 38-43. – DOI 10.25750/1995-4301-2021-2-038-043. – EDN NKIXXE.
2. Захарова Ю.В., Сухих А.С. Жирные кислоты клеточных стенок бифидобактерий с разной гидрофобностью. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 3: 1-12 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/ZJV-SAS-2015-3.pdf>).
3. Игнатов В. В., Коннова О. Н., Бойко А. С., Фомина А. А., Федоненко Ю. П., Коннова С. А. Характеристика состава жирных кислот липидов А липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum* // Изв. Саратов. ун-та Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2009. №1. с.36-41.
4. Hassan N, Anesio AM, Rafiq M. Temperature Driven Membrane Lipid Adaptation in Glacial Psychrophilic Bacteria// Front. Microbiol. 2020. V.11. P. 828.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ КИНЕТИКА РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ «ВОЛГОГРАД/D(1L-5-6L) MGF110»

Нефедьева М.В., Малоголовкин А.С., Титов И.А.

***ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии”, Вольгинский 601125
E-mail: masha67111@mail.ru***

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) вызывает острую геморрагическую лихорадку у домашних свиней и диких кабанов, что может привести к летальному исходу, приближающемуся к 100%. Продолжающееся распространение АЧС в Африке, Европе, Азии и совсем недавно в Доминиканской Республике оказывает огромное социально-экономическое воздействие [1]. Борьба с болезнью ограничивается выбраковкой всех инфицированных животных и принятием строгих мер по предотвращению ее распространения. Коммерческих эффективных вакцин в настоящее время нет.

Удаление определенных генов из генома вируса АЧС оказалось эффективным инструментом для понимания функции генов [2, 3]. Методология получения рекомбинантных вирусов, у которых отсутствуют специфические гены, позволяет оценить функцию генов в таких важных процессах, как репликация вируса и вирулентность в естественном хозяине.

Геном вируса АЧС содержит несколько различных мультигенных семейств (MGF), первоначально охарактеризованных как гены, присутствующие в повторяющихся последовательностях в терминальных областях генома [4]. Продемонстрировано участие членов MGF в возникновении болезни у домашних свиней, а удаление полных или частичных MGF может привести к развитию ослабленных штаммов вируса АЧС или не оказывать никакого влияния на вирулентность вируса [5, 6, 7]. Это говорит о том, что некоторые из отдельных членов семейства MGF могут быть мишенью для потенциального маркера DIVA и не оказывать отрицательного влияния на вирулентность вируса АЧС.

Таким образом, понимание функции генов в процессах репликации вируса и вирулентности имеет решающее значение для разработки экспериментальных вакцин и новых контрмер.

Целью данной работы является изучение кинетики репликации рекомбинантного вируса АЧС «Волгоград/D(1L-5-6L) MGF110» в перевиваемой культуре клеток COS-1.

Для того чтобы оценить потенциальную функцию генов 1L-5-6L MGF110 во время репликации вируса, кинетику репликации «Волгоград/D(1L-5-6L) MGF110» сравнивали с кинетикой родительского штамма «Волгоград/14с». Была построена многоступенчатая кривая роста с использованием перевиваемой культуры клеток COS-1. Клетки инфицировали при множественности заражения (MOI) 0,1 и 1 и инкубировали при 37°C 5% CO₂. Выход вируса оценивали спустя 1, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после инфицирования с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных праймеров, комплементарных фрагменту гена *B646L* (p72) на амплификаторе Real-time CFX96 Touch («Bio-Rad Laboratories», США) с флуоресцентной детекцией интеркалирующего красителя SYBR Green I (Евроген, Россия).

Результаты показали, что кинетика роста рекомбинантного вируса АЧС «Волгоград/D(1L-5-6L) MGF110» практически совпадает с кинетикой роста исходного «Волгоград/14с». Никаких существенных различий в выходе вируса не было обнаружено ни в один из оцениваемых периодов времени после заражения. Таким образом, удаление генов 1L-5-6L MGF110 из генома «Волгоград/14с» не влияет на способность «Волгоград/D(1L-5-6L) MGF110» реплицироваться в клетках культуры COS-1.

Таким образом, в результате проведенной работы можно сделать вывод, что сконструированный рекомбинантный вирус африканской чумы свиней «Волгоград/D(1L-5-6L) MGF110» с делецией генов 1L-5-6L мультигенного семейства MGF110 продемонстрировал отсутствие влияния на репликацию вируса в перевиваемой клеточной линии COS-1 и будет использован для дальнейших молекулярно - генетических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ №22-24-00552.

Список литературы:

1. Gonzales W., Moreno C., Duran U., Henao N., Bencosme M., Lora P., Reyes R., Nunez R., De Gracia A., Perez A.M. African swine fever in the Dominican Republic. *Transbound Emerg Dis.* 2021. 68:3018–3019.
2. O'Donnell V., Risatti G.R., Holinka L.G., Krug P.W., Carlson J., Velazquez-Salinas L., Azzinaro P.A., Gladue D.P., Borca M.V. Simultaneous deletion of the 9GL and UK genes from the African swine fever virus Georgia 2007 isolate offers increased safety and protection against homologous challenge. *J Virol.* 2017. 91.
3. Borca M.V., Ramirez-Medina E., Silva E., Vuono E., Rai A., Pruitt S., Holinka L.G., Velazquez-Salinas L., Zhu J., Gladue D.P. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. *J Virol.* 2020. 94.
4. Imbery J., Upton C. Organization of the multigene families of African swine fever virus. *Fine Focus.* 2017. 3:155–170.
5. Chen W., Zhao D., He X., Liu R., Wang Z., Zhang X., Li F., Shan D., Chen H., Zhang J., Wang L., Wen Z., Wang X., Guan Y., Liu J., Bu Z. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Sci China Life Sci.* 2020. 63:623–634.
6. Li D., Liu Y., Qi X., Wen Y., Li P., Ma Z., Liu Y., Zheng H., Liu Z. African swine fever virus MGF-110-9L-deficient mutant has attenuated virulence in pigs. *Virol Sin.* 2021. 36:187–195.
7. Ramirez-Medina E., Vuono E., Pruitt S., Rai A., Silva E., Espinoza N., Zhu J., Velazquez-Salinas L., Borca M.V., Gladue D.P. Development and in vivo evaluation of a MGF110-1L deletion mutant in African swine fever strain Georgia. *Viruses.* 2021. 13:286.

К ВОПРОСУ О ПРИМЕНИМОСТИ АЭРОЗОЛЬНЫХ СПЕКТРОМЕТРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АВТОМАТИЧЕСКОГО ИСКУССТВЕННОГО ОПЫЛЕНИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ, А ТАКЖЕ ДЛЯ АНАЛИЗА СПОРОВОЙ КОНТАМИНАЦИИ В КАРАНТИНЕ РАСТЕНИЙ

Орехов Ф.К.*, Градов О.В.

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова
(ФИЦ ХФ РАН), Отдел динамики химических и биологических процессов*

**E-mail: theorehov@gmail.com*

Общеизвестно и очевидно, что ручное и механическое опыление растений (hand pollination / mechanical pollination, в том числе - автоматические варианты, известные по западной литературе под названием "materially engineered artificial pollinators" [1]) могут в целом ряде случаев является безальтернативным и максимально доступным способом индустриального поддержания некоторых культур (от тыквы до ванили или финиковых пальм). Однако результаты автоматического опыления (с использованием большинства типов аэрозольных поллинаторов) во многих случаях оставляют желать лучшего. Часто пыльца агглютинирует или не доходит до целевой точки при рассеянном распылении, а в ряде случаев вместе с ней диспергируется поток механических частиц с неочевидным распределением размеров и механических параметров, нередко повреждающий цветок. Поэтому необходим контроль размеров и аэродинамических параметров пыльцы в ходе массированного опыления. Однако доступных инструментов для реализации подобного калиметрического измерения в "materially engineered artificial pollinators" не известно.

Нами предлагается использовать для этого аэрозольные спектрометры широкого диапазона, разрабатывавшиеся коллективом Ю.В.Жуланова, начиная с периода работы в НИФХИ им. Л.Я.Карпова при акад. И.В.Соколове-Петрянове (с 1970-х гг. по 2020 г.). Известно, что пыльца может рассматриваться в рамках аэрозольных представлений, для имплементации которых создавались соответствующие счётчики и анализаторы, в том числе - с кориолисовскими сэмплерами и аэрозольными импакторами [2-6], в том числе - с программными средствами для расшифровки пыльцы по размерам частиц, а иногда также и по форме частиц (как в сканирующей цитометрии) [7]. К сожалению, основные тренды аэрозольного пыльцевого анализа (на волне роста аллергических реакций с 70-х гг. XX в. [8,9]) свелись к анализу аллергически опасных пылевых аэрозолей [10-14], а агробиологические приложения подобных техник не были развиты. Нами предлагается использовать соответствующие счётчики, работающие от клеточного уровня до уровня многоклеточных репродуктивных структур [15,16], для контроля дисперсного состава и рефракционных параметров пыльцы, используемой в опылении. Одновременно в целях карантина растений и предупреждения споровой контаминации можно контролировать и размер паразитных частиц, потенциально относимых к грибковым агентам [17,18] и вирусам (типа табачной мозаики и др. [19]).

Список литературы:

1. Chechetka, S. A., Yu, Y., Tange, M., & Miyako, E. (2017). Materially engineered artificial pollinators. *Chem*, 2(2), 224-239.
2. Golovko, V. V., Koutsenogii, P. K., Kirov, E. I., & Koutsenogii, K. P. (1996). Pollen component of Siberian biogenic atmospheric aerosol. *J. of Aerosol Science*, (27), S243-S244.
3. Spieksma, M., & Nikkels, A. H. (1999). Similarity in seasonal appearance between atmospheric birch-pollen grains and allergen in paucimicronic, size-fractionated ambient aerosol. *Allergy*, 54(3), 235-241. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.1999.00817.x>
4. Carvalho, E., Sindt, C., Verdier, A., Galan, C., O'Donoghue, L., Parks, S., & Thibaudon, M. (2008). Performance of the Coriolis air sampler, a high-volume aerosol-collection system for

- quantification of airborne spores and pollen grains. *Aerobiologia*, 24(4), 191-201. <https://doi.org/10.1007/s10453-008-9098-y>
5. Mandal, J., Chakraborty, P., Roy, I., Chatterjee, S., & Gupta-Bhattacharya, S. (2008). Prevalence of allergenic pollen grains in the aerosol of the city of Calcutta, India: a two year study. *Aerobiologia*, 24(3), 151-164. <https://doi.org/10.1007/s10453-008-9095-1>
6. Kolpakova, A., Hovorka, J., & Klán, M. (2017). Pollen Characterization in Size Segregated Atmospheric Aerosol. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 95(6), 062001. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/95/6/062001>
7. Rivas-Ubach, A., Stanfill, B., China, S., Pasa-Tolic, L., Guenther, A., & Steiner, A. L. (2021). Deciphering the source of primary biological aerosol particles: a pollen case study. *ACS Earth and Space Chem.*, 5, 969-979. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.0c00295>
8. Guercio, J., Saketkhou, K., Birch, S., Fernandez, R., Tachmes, L., & Sackner, M. A. (1979). Effect of nasal provocation with histamine, ragweed pollen and ragweed aerosol in normal and allergic rhinitis subjects. *American Review of Respiratory Disease*, 119(4), 69.
9. Solomon, W. R., Burge, H. A., & Muilenberg, M. L. (1983). Allergen carriage by atmospheric aerosol: I. Ragweed pollen determinants in smaller micronic fractions. *J. of Allergy and Clinical Immun.*, 72(5), 443-447. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(83\)90579-1](https://doi.org/10.1016/0091-6749(83)90579-1)
10. Spieksma, F. T. M., Kramps, J. A., Van der Linden, A. C., Nikkels, B. H., Plomp, A., Koerten, H. K., & Dijkman, J. H. (1990). Evidence of grass-pollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction. *Clinical & Experimental Allergy*, 20(3), 273-280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1990.tb02683.x>
11. Spieksma, F. T. M., Kramps, J. A., Plomp, A., & Koerten, H. K. (1991). Grass-pollen allergen carried by the smaller micronic aerosol fraction. *Grana*, 30(1), 98-101. <https://doi.org/10.1080/00173139109427779>
12. Spieksma, F. T. M., Nikkels, B. H., & Dijkman, J. H. (1995). Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration. *Clinical & Experimental Allergy*, 25(3), 234-239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1995.tb01034.x>
13. Riediker, M., Koller, T., & Monn, C. (2000). Differences in size selective aerosol sampling for pollen allergen detection using high-volume cascade impactors. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 30(6), 867-873. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00792.x>
14. Riediker, M., Koller, T., & Monn, C. (2000). Determination of birch pollen allergens in different aerosol sizes. *Aerobiologia*, 16, 251-254. <https://doi.org/10.1023/A:1007651106231>
15. Градов, О. В., Жуланов, Ю. В., and Макавеев, П. Ю. (2019). К вопросу о возможности использования гидрозольных спектрометров в эмбриометрии. *Гены и клетки*, 14(3):78–79.
16. Zhulanov, Y. V., Makaveev, P. Y., and Gradov, O. V. (2018). Towards the aerosol cytometry and hydrosol cytometry based on laser aerosol spectrometers. *IEEE DataPort*, DOI: 10.21227/njak
17. Градов, О. В., Жуланов, Ю. В., Макавеев, П. Ю., and Марнаутов, Н. А. (2022). Интеграция технологий безлинзовой голографической микроскопии аэрозольных частиц и оптического, в том числе лазерного аэрозольного анализа в приложении к анализу спор на чипе и в проекционных аэродинамических шпирен-ячейках: идентификация и мониторинг. *Современная микология в России*, 9: (in press).
18. Макавеев, П. Ю., Градов, О. В., and Жуланов, Ю. В. (2022). О приложениях оптического метода анализа аэродисперсных систем для идентификации и сортировки спор: от счёта частиц до физико-химической идентификации и классификации спор в задачах мультипараметрической таксономии и филогенетической систематики. *Современная микология в России*, 9: (in press).
19. Градов, О. В., Жуланов, Ю. В., Макавеев, П. Ю. (2020). Оптическая ультраструктурная виromетрия и ее ограничения. *Фотоника*, 14(6):542–549. <http://dx.doi.org/10.22184/1993-7296.fros.2020.14.6.542.549>

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПОДСОЛНЕЧНИКА С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ АМПЛИКОНОВ ПО ТЕХНОЛОГИИ OXFORD NANOPORE

Саенко К.Ю.^{1,2}, Дудников М.В.¹, Киров И.В.¹, Демури Я.Н.³, Соловьев А.А.¹

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, 127550; E-mail: mx.dudnikov.07@gmail.com

2 – ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений», Краснодар, 350039, E-mail: saenkok1997@yandex.ru

3 – ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК им. В. С. Пустовойта

Россия является одной из лидирующих стран по производству подсолнечника, получая порядка 15,3 млн. тон в год с площади 10033 тыс. га (1). Признаки, по которым ведется селекция подсолнечника и улучшение его агрокультурных качеств, сильно разграничены в зависимости от производственных задач. Одними из основных направлений селекции подсолнечника являются устойчивость к гербицидам и болезням, повышение качества масла, селекция на декоративность культуры и др. (2).

У подсолнечника идентифицированы гены, обеспечивающие умеренную резистентность к основным группам пестицидов. Ген ANAS (ацетогидроксикислотная синтаза) имеет три функциональных паралога (ANAS1, ANAS2, ANAS3) (3). Крайне важным целевым геном для селекции подсолнечника, является ген FAD2 (фермент десатуразы жирных кислот), наличие определённого аллеля которого приводит к изменениям липидного состава семян, значительно увеличивая количество олеиновой кислоты (4). В нашем исследовании мы производили генотипирование коллекции линий подсолнечника по генам ANAS1, ANAS2, ANAS3 и FAD2 с целью поиска уникальных аллелей. Для этого проводилось нанопоровое секвенирование полноразмерных открытых рамок считывания (около 2 тыс.п.н.) с использованием технологии секвенирования ампликонов Oxford Nanopore.

В исследовании мы изучали коллекцию 48 линий подсолнечника ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК им. В. С. Пустовойта. В состав коллекции входили две линии с детектированной устойчивостью к имидазолинонам. Мы подобрали фланкирующие праймеры на открытые рамки считывания и ампликоны объединили в 12 пулов по 4 линии в каждом. После выравнивания концентрации ПЦР-продуктов по каждой линии подсолнечника как внутри, так и среди групп, провели молекулярное баркодирование и секвенирование ампликонов по технологии Oxford Nanopore.

В результате были успешно идентифицированы аллели 4 генов, представленные в изучаемой коллекции. Полученные результаты будут способствовать разработке подходов для массового генотипирования подсолнечника.

Исследования выполнены за счет гранта РНФ № 22-64-00076.

Список литературы:

1. The Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Available at <http://faostat.fao.org/>
2. Лукомец В. М., Трунова М. В., Демури Я. Н. Современные тренды селекционно-генетического улучшения сортов и гибридов подсолнечника во ВНИИМК // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. – №. 4. – С. 388-393.
3. Kolkman J. M. et al. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – Т. 109. – №. 6. – С. 1147-1159.

ПОДБОР ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ ДЛЯ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ НА ЗЕРНО

Сотченко Д. Ю., Сотченко Дм. Ю., Таов А. А.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт кукурузы», Пятигорск, 357528
E-mail: d.sotchenko@vniikukuruzy.ru*

Кукуруза одна из важнейших сельскохозяйственных культур в мире. Уникальность состоит в высокой урожайности и универсальности использования. Кукуруза используется на продовольственные, кормовые, технические и медицинские цели. Зерно является сырьём для производства крупы, муки, масла, крахмала, спирта, глюкозы и многих других продуктов. Стержни початка идут на производство клея, краски, лака, картона, изоляционных прокладок, линолеума, целлюлозы, фурфурола и пр. Доля кукурузы в производстве крахмала в мире составляет около 75%. Крахмал кукурузы используется для производства более 500 наименований продукции в пищевой, бумажной, текстильной, химической, фармацевтической промышленности, горючего, биодизеля, биометанола, биомасла.

Кукуруза возделывается на всех континентах. В мировом производстве зерна доля кукурузы составляет более 50%.

В России площадь посевов кукурузы на зерно в 2022 году составила около 2800 тыс. га и произведено около 15000 тыс. тонн при средней урожайности 5,25 т/га.

Расширение площадей возделывания кукурузы на зерно и силос является одним из главных приоритетов обеспечения продовольственной безопасности страны.

Наряду с ростом урожайности кукурузы при возделывании на зерно и силос решающими направлениями в исследованиях являются такие показатели как скороспелость, холодостойкость, засухоустойчивость, устойчивость к вредителям и болезням.

В зависимости от использования продукции (зерно, масса) возникают требования по качеству. Так при использовании кукурузы на кормовые цели необходимо повышенное содержание крахмала и белка.

В исследованиях нашего института, основными направлениями является селекция на раннеспелость и холодостойкость. В результате этого, создан ряд раннеспелых гибридов кукурузы, например как: Сибирский 135, Нур, Уральский 150, и др.

Нами проведены исследования по оценке исходного материала (самоопылённых линий). Были получены 52 линии, в том числе 2 ультраранних, 19 раннеспелых, 17 среднеранних и 14 среднепоздних. Оценка проведена по следующим показателям: ломкость растений ниже початка при перестое, полегание растений, высота растений и прикрепления початка, количество дней от всходов до цветения початка. По консистенции были представлены кремнистые, зубовидные и полужубовидные линии. Большинство изучаемых линий характеризовались как устойчивые к ломкости и полеганию стебля. Линии оценены по содержанию протеина, крахмала, масла, сахара. Выделены 19 линий с высоким содержанием протеина (14-16%) и 21 линия с повышенным содержанием крахмала (свыше 60%)

На основе диаллельных и топ кроссных скрещиваний было получено 460 гибридных комбинаций. В результате испытания в сравнении со стандартом Уральский 150 по урожайности выделены 5 раннеспелых комбинаций (703-71, 705-115, 703-88, 703-81, 705-121). Комбинации 703-88, 703-87 и 705-121 имели повышенное содержание крахмала (70,1 – 70,83). Из среднеранних гибридов преимущество по урожайности в сравнении со стандартом Машук 220 МВ показали комбинации 721-32, 720-5 и 720-9. Из

среднеспелых гибридов выделены номера 721-31, 720-8, которые превышает стандарт К 350 на 1,05-1,6 т/га.

По комплексной оценке самоопылённых линий по основным особо важным признакам выделяются линии МК 100, РМ 139, РМ 146, РМ 112, РМ 269, РП 510, РП 210, РМ 330 использование которых в скрещиваниях наиболее перспективно. По выделяющимся гибридным комбинациям испытания будут продолжаться с целью отбора для передачи на государственное сортоиспытание.

Список литературы:

1. Доспехов Б. А., Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1986. – 351 с.;
2. Сотченко Д.Ю., Войтов А.С., Сотченко Д.Ю., Таов А.А. Исходный материал для создания раннеспелых гибридов кукурузы. 2020. № 4. С. 3-9. DOI: 10.25715/y6169-7739-5229-с;
3. Широкий Унифицированный и Международный классификатор СЭВ вида Zea Mays L. / под ред. К. т. Н. В. Г. Кукекова. Л.: ВИР, 1977. – 82 с.

СОЗДАНИЕ ВЫСОКОМАСЛИЧНЫХ ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛЕКЦИИ ВСЕРОССИЙСКОГО ИНСТИТУТА ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА (ВИР)

Яндиева А.Р., Аппаев С.П., Матаева О.Х.

*Институт сельского хозяйства – филиал ФГБНУ ФНЦ «Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук», Нальчик 360004,
E-mail: kbniish2007@yandex.ru*

Хорошо известно, что кукуруза является универсальной культурой. В производстве используется все кукурузное растение – из нее получают более 150 продовольственных и технических продуктов. Зерно кукурузы используют для получения круп, муки, крахмала, патоки, спирта и т.д. Из зародыша кукурузного зерна вырабатывают полноценное пищевое масло [1].

Одно из важнейших направлений селекции – создание высокоурожайных гибридов кукурузы с повышенным содержанием крахмала в зерне. Отметим, что за последнее десятилетие более 50% всех продаж крахмала в мире приходилось на кукурузный крахмал, опережая продажи маниокового (тапиокового) крахмала, который занимает на мировом рынке чуть более 30%, и картофельного крахмала, чья доля превышает 7% от общемирового. В России более 80% крахмала производится из зерна кукурузы. При этом, сырьем для производства крахмала служат, преимущественно, высокопродуктивные гибриды зубовидного и кремнистого подвидов кукурузы [2].

Крахмал зерна зубовидного и кремнистого подвидов кукурузы состоит примерно на 72% из амилопектина и на 28% из амилозы. Тогда как, крахмал восковидной кукурузы формируется 100% амилопектина. Эта особенность и характеризует ценность физико-химических качеств зерна восковидной кукурузы. Следовательно, при условии использования для производства крахмала зерна восковидной кукурузы нет необходимости в проведении дополнительных технологических операций на разделение амилопектинового и амилозного крахмалов, что значительно снижает материально-технические затраты и повышает рентабельность производства. Кроме того, амилопектиновый крахмал используется в производстве получения противошокового кровезаменителя, который предназначен в качестве плазмозамещающего средства при травмах, ожогах, острой потере крови при операциях и в других случаях. Мука из восковидной кукурузы востребована в производстве смесей для быстрого приготовления пудингов, производстве клея и других промышленных продуктов, для которых требуется

амилопектиновый крахмал. Он также включается в качестве загустителя и стабилизатора в пищевые продукты, продукты детского и лечебного питания [3].

Отметим, что в настоящее время зерно восковидной кукурузы завозится из-за рубежа, поскольку Государственным Реестре селекционных достижений, допущенных к использованию нет гибридов восковидной кукурузы [4].

При производстве крахмала из кукурузы важное экономическое значение имеет качество побочных продуктов, в виде зародыша зерновки и воды после замачивания зерна. Основным побочным продуктом производства крахмала является кукурузное масло, добываемое из зародыша и протеин. Кроме того, из побочной продукции производится кормовые добавки.

Однако, в настоящее время нет высокомасличных и высокобелковых сортов и гибридов, не уступающих или равных по урожаю зерна зубовидной и кремнистой кукурузе, т.е. создание гибридов с высокими показателями выхода масла и белка остается актуальным

Материалом для исследования послужили 500 образцов мировой коллекции ГНЦ РФ ВИР им. Н.И. Вавилова.

Был проведен биохимический анализ по содержанию крахмала, белка и масла в зерне изучаемых образцов кукурузы.

Количество белка, крахмала и масла определяли методом инфракрасной спектроскопии на приборе Inframatic 8620 (Швеция). Данные для построения калибровочных кривых были получены: для белка на приборе Kjeltac Auto 1030 Analyzer (Швеция) по методу Кьельдаля, для крахмала – поляриметрическим методом Эверса, для масла – по массе сухого обезжиренного остатка с использованием аппарата Сокслета [5].

По результатам исследований нами отобрано 100 образцов для посева и последующего изучения в 2021 году. Биохимический анализ изучаемых образцов показал следующие результаты:

1.Содержание крахмала в зерне колебалось от 65,10% до 70,90%. Среди них лучшими оказались 27 образцов с содержанием крахмала в пределах 68,60-70,90%;

2.Содержание белка находилось в пределах 8,00-15,10%. В лучших 26 образцах белка содержалось от 13,70% до 15,10%;

3.По содержанию масла в зерне выделено 38 образцов. Количество масла в зерне – 5,80-6,90.

В сообщениях многих исследователей показано, что при повышении содержания белка в зерне снижается содержание крахмала и наоборот – при повышении крахмала содержание белка снижается. Проведенный нами анализ подтверждает этот тезис. Так, в линиях с содержанием белка 13,80-15,10% содержания крахмала не превышало показателя 65,00%. В линии 14/54-2 с наивысшим процентом содержания белка (15,10%), крахмала было всего 63,00%. И наоборот, в линиях 35/96 и 35/20-1 при высоких показателях крахмала (70,60% и 70,90% соответственно), показатели содержания белка не превышали 9,5%.

Считается, что повышенное содержание белка в зерне кукурузы сочетается с повышенным содержанием масла [6]. Наши исследования показали, что чаще всего так и происходит. Так лучшие по содержанию белка линии кукурузы отличались и высоким содержанием масла в зерне. Исключение составили две линии 102.1/101 2 x 1 и 102.1/101 2 x 1 с очень высоким уровнем значения по белку (14,40%), но крайне низким показателем масла (3,30%).

Отметим, что линии с высоким содержанием масла и белка показывают низкий процент крахмала в зерне. Одной из целей нашего исследования является подбор исходного материала с достаточно высокими показателями содержания белка, крахмала и масла в зерне. Нами выделено 10 образцов, которые сочетали в себе высокое содержание белка и масла с достаточно высокими показателями крахмала в зерне. Образцы 25/36-1 и 25/36 содержали более 70% крахмала и среднее содержание белка и масла.

По результатам проведенных исследований образцы с высокими биохимическими показателями будут включены в селекционные программы по созданию гибридов кукурузы с повышенными качественными показателями зерна.

Список литературы:

1. Гужов Ю.Л., Фукс А., Валичек П. Селекция и семеноводство культивируемых растений. М.: Мир, 2003. 544 с.
2. Жушман А.И., Карпов В.Г. Перспективное сырьё // Кукуруза и сорго. 1993. №5. С. 2-3.
3. Волчанская, А.А., Конарева В.Р., Аленикова Ю.Б. Химический состав различных гибридов кукурузы // Молодой ученый. 2016. № 13 (117). С. 914-916.
4. Хатефов Э.Б., Аппаев С.П., Коцева А.Р. Создание и оценка новых источников амилопектинового крахмала на основе линий восковидной кукурузы (*Zea mays Ceratina*) из коллекции ВИР // Успехи современного естествознания. 2019. №1. С. 57-62.
5. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. Методы биохимических исследований растений / Под ред. А.И. Ермакова. Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд., 1987. 430 с.
6. Радочинская Л.В., Букреева Г.И. Генетические возможности кукурузы при создании высокомасличных гибридов // Кукуруза и сорго. 2009. С. 15-17.

ФЕНОТИПИРОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОЗИМОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ В РАННИХ

Воропаева А.Д., Яновский А.С., Мудрова А.А.

**ФГБНУ «Национальный центр зерна имени П. П. Лукьяненко», Краснодар 350012
A7961559006@yandex.ru**

В течение XX века селекция твердой пшеницы *Triticum durum Desf.* в мире была направлена на получение сортов с более высокой продуктивностью, снижение высоты растения и уменьшение вегетационного периода (1). Начиная с 50 годов прошлого века одной из основных целей селекционных программ было создание сортов твердой пшеницы с высокими стандартами качества.

Твердая пшеница содержит сложную смесь белков, которые обладают уникальным свойством образовывать вязкоупругое тесто при смешивании муки с водой. Когда крахмал и водорастворимые белки вымываются из теста, остаточная вязкоупругая масса, которая остается, содержит в основном нерастворимые в воде белковые фракции, называемые «глютенном». Качество изготовления макаронных изделий в значительной степени связано с белковым составом глютена (2). Индекс глютена (GI) — это показатель качества глютена определяющий, является ли качество клейковины слабым ($GI < 30\%$), нормальным ($GI = 30-80\%$) или сильным ($GI > 80\%$) и который используется для скрининга сортов твердой пшеницы во всем мире (3).

Индекс глютена является одним из основных показателей, влияющий на получение премиальных цен на мировом ранке зерна твердой пшеницы. Данный показатель не включен в отечественный ГОСТ Р 52554-2006, вследствие этого селекционная работа по данному признаку в нашей стране не велась в полном объеме.

В ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» работа по выявлению генотипов с высоким показателем индекса (GI) была начата в 2019 году. Начиная с ранних этапов селекционного процесса, мы автоматическим способом с помощью системы для определения качества клейковины Глютоматик «Glutomatic 2100» по международным стандартам (ISO 21415-2-2015) ежегодно анализируем около 800 линий озимой твердой пшеницы, начиная с F_3 (селекционный питомник).

В среднем за три года изучения линейного материала в поколении F_3 , выявлены 1% генотипов со слабым качеством (GL), 29,5% со средним по качеству (GL). Основной

пул изучаемых генотипов, 69,5%, находился в диапазоне от 80 до 100% (Gl), что соответствует сильной по качеству клейковине.

Нами была установлена средняя по величине отрицательная корреляция между содержанием сухой клейковины и индексом (Gl) ($r = -0,506$; $p < 0,01$), что согласуется с результатами исследований итальянских ученых (4). Это обусловлено тем, что более низкая масса клейковины сталкивается с меньшей центробежной силой по сравнению с более высокой массой клейковины (таким образом, более высокий процент влажной клейковины остается на сите), что приводит к более высокому индексу (Gl).

Из всего изученного материала в поколении F_3 , в среднем за три года только у 200 линий или 25% были выявлены высокие значения сырой клейковины ($>28,0\%$) и индекса (Gl) ($>80\%$), соответствующие премиальному классу предъявляемые к твердой пшенице.

В настоящее время созданы и проходят изучение в конкурсном сортоиспытании ряд перспективных линий озимой твердой пшеницы с высокими показателями адаптивности, продуктивности и качеством зерна. По показателям «индекса глютена» и «индекса цвета» все они соответствуют требованиям мировых стандартов.

Список литературы:

1. P. De Vita , Lee Destri , O. Nicosia , F. Nigro , C. Platani , C. Rifolo , N. Di Fonzo , L. Cattivelli Breeding progress on morphophysiological, agronomic and qualitative characteristics of durum wheat varieties bred in Italy in the 20th centuryEuro. J. Agron. , 26 (2007), pp. 39-53,
2. M. SissonsThe role of durum wheat varieties on the quality of pasta and bread Food, 2 (2008), pp. 75 - 90
3. Cubadda, R.; Carcea, M.; Paskey, L.A. Suitability of the gluten index method for assessing gluten strength in durum wheat and semolina. Cereal Foods World 1992, 37 (12), 866 – 869.
4. D'Egidio, MG; Canton, Montana; Gosparini, E.; Cecchini, K.; Dottori, A.; Gulli, S. Characterization of qualitative diversity in trial 2004/05. Molini d'Italia 2006, 1, 87–105.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СЕЛЕКЦИИ ОЗИМОЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ НА МОРОЗОСТОЙКОСТЬ

Яновский А.С., Мудрова А.А., Воропаева А.Д.

**ФГБНУ «Национальный центр зерна имени П. П. Лукьяненко», Краснодар
350012, yanovskij81@list.ru**

Твердая пшеница *Triticum durum* Desf. до начала селекционной работы была представлена в основном яровыми и слабоморозостойкими полуозимыми формами.

Озимый образ жизни твердой пшеницы давно привлекал внимание земледельцев, так как во многих районах, в случае благоприятной перезимовки, урожай ее при осеннем посеве был выше, чем при весеннем. В связи с этим во многих селекционных учреждениях были начаты работы по созданию твердой пшеницы озимого типа развития и введение ее в сельскохозяйственное производство (1,2).

Селекционная работа по созданию озимой твердой пшеницы в ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» начата академиком Лукьяненко П.П. в 1931 году. Основным методом получения исходного материала была внутривидовая и межвидовая гибридизация с использованием в скрещиваниях твердой яровой и мягкой озимой пшеницы. Целью работы являлось получение высокозимостойких урожайных форм озимой твердой пшеницы для более суровых зимних условий.

На признак морозостойкость влияют многие факторы окружающей среды, что делает фенотипический отбор в полевых условиях сложной задачей из-за нерегулярности или отсутствия зимних повреждений в полевых опытах.

Промораживание растений в лабораторных камерах часто используют в физиолого-генетических исследованиях для выявления минимальной температуры, переносимой генотипом озимой твердой пшеницы.

Для создания сортов озимой твердой пшеницы с высоким уровнем морозостойкости в наших исследованиях мы используем тестирование линейного материала включающие как полевые испытания, основанные на визуальной оценке, так и лабораторные эксперименты в контролируемых условиях в климатических камерах, что позволяет оценить критическую температуру, при которой 50% растений погибают из-за вымерзания.

Ежегодно мы испытываем в климатических камерах более тысячи линий и сортов озимой твердой пшеницы в трех повторениях. В зависимости от прохождения этапа закаливания растений температура в опыте может варьировать от -14°C до -17°C . Так как не всегда высокая морозостойкость генотипа коррелирует с зимостойкостью, такой же набор линий и сортов мы высеем на стеллажах в северной зоне Краснодарского края для выявления зимоморозостойких генотипов.

Нами выявлены положительные трансгрессии по признаку морозостойкости, как при внутривидовых, так и межвидовых скрещиваниях, но наибольшая частота трансгрессий получена в линиях, в генеалогии которых участвовали эколого-географически отдаленные генотипы.

На сегодняшний день в ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» созданы и переданы в производство сорта с уровнем морозостойкости «средняя», которые обладают высокой толерантностью к морозам при температуре на узле кущения -14°C ; Леукурум 21, Алена, Уния, «выше средней» Золотко, Крупинка, Круча, Одари, Синьора -15°C .

В Государственном сортоиспытании проходят испытания два новых сорта Бэлла и Цель с «повышенным» уровнем морозостойкости, которые выдерживают температуру на узле кущения -16°C .

Список литературы:

1. Мудрова А.А. Селекция озимой твердой пшеницы на Кубани/КНИИСХ.-Краснодар, 2004.-190 с.
2. Лукьяненко П.П. О задачах и методике селекции твердых озимых пшениц на Кубани/П.П. Лукьяненко, В.В. Костин//Доклады ВАСХНИЛ. -1966.-№8.-С.2-6.