

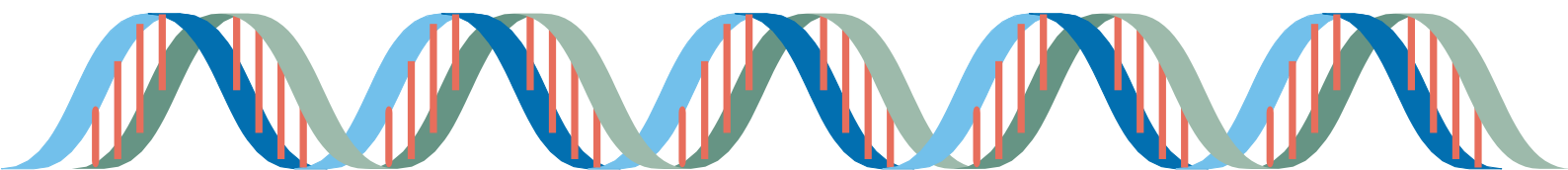
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии»



XXIII конференция молодых ученых с международным
участием

«Биотехнология в растениеводстве,
животноводстве и сельскохозяйственной
микробиологии»

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ КОНФЕРЕНЦИИ



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

14 – 16 ноября 2023 г.
Москва

ГЕНЕРАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ



ОФИЦИАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ



ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ ПАРТНЁР

ООО «НАУЧНЫЙ СЕРВИС»

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ПАРТНЁРЫ



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»

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

XXIII КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

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

14 – 16 ноября 2023 г.

Москва – 2023

УДК 663.18(063);606;573.6;57.088

ББК 30.16

Авт.знак Д22

ISBN 978-5-6049173-7-4

«Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии»: 23-я Всероссийская конференция молодых учёных (Москва, 14 – 16 ноября 2023 г., ФГБНУ ВНИИСБ), сборник тезисов докладов. – М.: ФГБНУ ВНИИСБ, 2023. – 164 с.

23-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, геномной инженерии, клеточной биологии.

ISBN 978-5-6049173-7-4



© ФГБНУ ВНИИСБ, 2023 г.

Оглавление

СЕКЦИЯ «ПРИКЛАДНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ»	
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕНОВ ТОМАТА	
Алексеева А.И., Абдурашитов С.Ф.	13
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ/ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ООО «ЩЁЛКОВО» ПО ГЕНАМ <i>RHT</i>, <i>VRN</i>, <i>PPD</i> И <i>GLU</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ	
Алкубеси М., Стрембовский И.В., Черноок А.Г., Назарова Л.А., Самарина М.А., Дивашук М.Г.	14
РАНЖИРОВАНИЕ ИСТОЧНИКОВ ПРИЗНАКА МНОГОПОЧАТКОВОСТИ КУКУРУЗЫ КОЛЛЕКЦИИ ВИР ПО ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫМ ПРИЗНАКАМ	
Васипов В.В., Хатефов Э.Б.	16
АССОЦИАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ <i>RPM1</i> <i>RPS2</i> С РАСОВО-СПЕЦИФИЧНОЙ РЕАКЦИЕЙ РАСТЕНИЙ <i>BRASSICA RAPA</i> L. НА ЗАРАЖЕНИЕ ШТАММАМИ <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> PV. <i>CAMPESTRIS</i> (РАМ.) DOW	
Гайсина Э.М., Игнатов А.Н.	17
СОЗДАНИЕ ГИБРИДОВ F₁ ТОМАТА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ АНТОЦИАНОВ И КАРОТИНОИДОВ ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ	
Дрозд Е.В., Бабак О.Г., Некрашевич Н.А., Анисимова Н.В., Яцевич К.К., Пугачева И.Г., Добродькин М.М., Игнатова С.И., Кильчевский А.В.	19
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА	
Дудникова К.Ю., Дудников М.В.	21
ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНА <i>E1</i>, ВЛИЯЮЩЕГО НА СРОКИ ЦВЕТЕНИЯ И СОЗРЕВАНИЯ У СОИ (<i>GLYCINE MAX</i> (L.) MERR.)	
Злобнова Н.В., Крупин П.Ю., Бурсаков С.А., Кочешкова А.А., Черноок А.Г., Самарина М.А., Архипов А.В., Назарова Л.А., Меглицкая Я.С., Мохов Т.Д., Дивашук М.Г.	22
ПОИСК ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ ТРИТИКАЛЕ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ	
Дудникова К.Ю., Дудников М.В.	23
СЕЛЕКЦИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ КАРТОФЕЛЯ В ТАДЖИКИСТАНЕ	
Курбонали Партоев, Мавлон Курбонов, Алишер Наимов.	23
СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ У ГИБРИДОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, СОДЕРЖАЩИХ ЧУЖЕРОДНЫЕ ИНТРОГРЕССИИ	
Логинова А.С., Тимонова Е.М., Баранцова М.А., Леонова И.Н., Салина Е.А.	25
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛЮТЕНИНОВ У СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ РАЗЛИЧНОГО ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	
Москалев Е.А., Груздев И.В., Полховская Е.С., Киров И.В.	26
РАЗРАБОТКА <i>KASP</i>-МАРКЕРА НА ПОЛИМОРФИЗМ В ГЕНЕ <i>PARG-2A</i> У <i>TRITICUM AESTIVUM</i>	
Мохов Т.Д., Кочешкова А.А., Баженов М.С., Меглицкая Я.С., Архипов А.В.	28
ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АЛЛЕЛЕЙ <i>PPD</i> И <i>VRN</i> У ЛИНИЙ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ НЕСТАНДАРТНУЮ ОТВЕТНУЮ РЕАКЦИЮ НА УСЛОВИЯ ЯРОВИЗАЦИИ И КОРОТКИЙ ФОТОПЕРИОД	
Муратов Т.Р., Алкубеси М., Черноок А.Г., Митронова А.Д., Блинков А. О., Беспалова Л.А., Пузырная О.Ю., Агаева Е.В., Дивашук М.Г.	30
АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛЮТЕНИНОВ В СВЯЗИ С КАЧЕСТВАМИ ЗЕРНА ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ (<i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.)	
Наждодов Б.Б., Рубец В.С., Пылнев В.В., Груздев И.В.	31

СВЯЗЬ ПРИЗНАКОВ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ И ЗДОРОВЬЯ ГОЛШТИНСКОГО СКОТА С ГЕНАМИ ASS1, SMC2, UMPS	
Пиметьев В.О., Шатохин К.С., Камалдинов Е.В., Петров А.Ф.	33
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА НЕКРАХМАЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ ТРИТИКАЛЕ ПРИ ОЦЕНКЕ КРАХМАЛИСТОСТИ ЗЕРНА	
Семенова А.В., Соловьев А.А.	35
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ ПРИ СОЗДАНИИ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА КУКУРУЗЫ РАЗНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ	
Сотченко Д.Ю., Сотченко Дм.Ю., Таов А.А.	37
АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА (<i>GRF</i>) У КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОЙ ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ	
Черноок А.Г., Баженов М.С., Крупина А.Ю., Ермолаев А.С., Беспалова Л.А., Дивашук М.Г.	39
БИОТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ПРИМЕНЕНИЕ В РЫБОВОДСТВЕ	
Шаропова Шахноза Рахматиллоевна, Хасанова Мафтуна Шукрулло қизи.....	40
ФЕНОМЕН РЕЦЕССИВНОЙ БЕЛОЙ МАСТИ В СТАДЕ МИНИ СВИНЕЙ ИЦиГ СО РАН	
Шатохин К.С., Запорожец В.И.	42
ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> , СИНТЕЗИРУЮЩИХ АНТИТЕЛА ПРОТИВ HER2/NEU В ВИДЕ ПРОЦЕССИРУЕМОГО ПОЛИПРОТЕИНА	
Шешукова Е.В., Камарова К.А., Ершова Н.М., Поздышев Д.В., Комарова Т.В.....	44
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ РОДА <i>FUSARIUM</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-МАРКЕРОВ	
Шингалиев А.С., Скорнякова Т.С., Кургузова Н.С., Енгальчева И.А., Дудников М. В.	46
ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТООБРАЗЦОВ КАРТОФЕЛЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАТОГЕНАМ	
Урман М.В., Мухордова М.Е.	47
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИЙ СТЕРИЛЬНЫХ И ФЕРТИЛЬНЫХ ЛИНИЙ ИНДЕТЕРМИНАНТНЫХ РОЗОВЫХ ТОМАТОВ ПО ГЕНАМ УСТОЙЧИВОСТИ К НАИБОЛЕЕ ЗНАЧИМЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ	
Хунвану Никэз.....	49
СЕКЦИЯ «ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ»	
ПОИСК ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ ФАКТОРОВ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ДИКИХ ВИДОВ КАРТОФЕЛЯ	
Антипов А.Д., Злобин Н.Е.	52
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА VIGS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИРУСНЫХ СУПРЕССОРОВ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ	
Болотина А.А., Власова А.В., Полховский А.В., Киров И.В.	53
ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ Т-ДНК БИНАРНОГО ВЕКТОРА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОМОТОРА ГЕНА АЛЬФА-ГАРПИНИНА <i>SmAMP-X</i>	
Иванова Л.А., Комахин Р.А.	54
МОДИФИКАЦИЯ КЭП-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ ОБЛАСТИ ϵ IF4E, КАК СПОСОБ СОЗДАНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К РYУ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ	
Карлов В.Д., Таранов В.В., Никонов О.С.	56
СОЗДАНИЕ КАРТОФЕЛЯ (<i>S. TUBEROSUM</i> L.) С НОКАУТОМ ГЕНА <i>STLEAFY</i>	
Лебедева М. В.	57

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ $\Delta 9$-ДЕСАТУРАЗЫ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ ТОМАТОВ	
Миловская И. Г., Варламова Н. В., Стариков А. Ю., Павленко О.С., Тюрин А. А., Соболев Д. С., Халилуев М. Р., Голденкова-Павлова И. В.	57
СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЛИПИД-ТРАНСПОРТНОГО БЕЛКА <i>NsLTP1</i> ИЗ <i>N. sativa</i> L. В РАСТЕНИЯХ ТОМАТА	
Михель И.М.	58
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА VPg ВИРУСА PVY С ФАКТОРАМИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ СЕМЕЙСТВА ϵIF4E ТАБАКА	
Никаноркина В.В., Криолло Дельгадо Л.М., Таранов В.В., Лебедева М.В.	59
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНОГО ГЕНА RAS85D	
Сивопляс Е.А., Куликов А.М.	60
РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА <i>NICOTIANA TABACUM</i> С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ BASE EDITING	
Суценко А.С., Ражина О., Никаноркина В., Лебедева М.В., Таранов В.В.	61
ПРОМОТОР ГЕНА ДЕФЕНЗИНА <i>Sm-AMP-D1</i> ИЗ РАСТЕНИЯ МОКРИЦА СРЕДНЯЯ (<i>STELLARIA MEDIA</i> L.)	
Трофимов А.С., Комахин Р.А.	62
РАЗРАБОТКА НАБОРА ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРОВ С ЕДИНЫМ САЙТОМ КЛОНИРОВАНИЯ	
Черняев К.А., Карлов В.Д., Лебедева М.В.	63
ДНК-МАРКЕРЫ БЕСШИПНОСТИ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА <i>ROSACEAE</i>	
Э.Х. Шаймарданова, Р.С. Рахмангулов, Л.В. Погорелец, Д.Ю. Шаймарданов	64
РЕЦЕПТОРПОДОБНЫЕ КИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА LRR-RLKIII КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ПАСЛЕНОВЫЕ, УСТОЙЧИВЫХ К ПЕКТОБАКТЕРИОЗАМ	
Шруб Е.В., Колубако А.В., Бадалян О.А., Вычик П.В., Николайчик Е.А.	66

СЕКЦИЯ «КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ, РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ»

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ	
Авакумов А.Д., Голиванов Я.Ю.	69
ОРТОДОКСАЛЬНЫЕ И РЕКАЛЬЦИТРАНТНЫЕ СЕМЕНА – ДВЕ СТРАТЕГИИ АДАПТАЦИИ	
Азаркович М.И.	70
ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИСТЬЕВ DAUCUS CAROTA (МОРКОВИ) IN VITRO	
Алжарамани Н., Монахос С.Г.	72
РОЛЬ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ АГРОЦЕНОЗА НА ОСНОВЕ МИСКАНТУСА (<i>MISCANTHUS</i> SPP.)	
Анисимов А.А.	74
ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ОТСУТВИЯ ОСВЕЩЕННОСТИ НА ИНДУКЦИЮ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК ОГУРЦА (<i>CUCUMIS SATIVUS</i> L.)	
С.Н. Белов, Д.М. Зупарова, Е.А. Домблидес	76
ПОЛУЧЕНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ОГУРЦА (<i>CUCUMIS SATIVUS</i> L.) В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК	
Белов С.Н., Коротцева И.Б., Домблидес Е.А.	77

ЭМБРИОКУЛЬТУРА - ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ В SPEED BREEDING ОСНОВНЫХ ПОЛЕВЫХ КУЛЬТУР	
Бизякина Д.О., Алкубеси М., Крупина А.Ю., Свистунова Н.Ю., Радзенице С.Б., Канунникова В.Ю., Блинков А.О., Кочешкова А.А., Дивашук М.Г.	79
СКВАЛЕН В ЭКСУДАТЕ РЫЛЬЦА ПЕСТИКА <i>LILIUM LONGIFLORUM</i> L. И <i>NICOTIANA TABACUM</i> L.	
Воронков А.С., Иванова Т.В., Брейгина М.А., Клименко Е.С., Бабушкина К.	81
РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ПОИСКА НОВЫХ СЕМЕЙСТВ СИГНАЛЬНЫХ ИММУННЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ	
Ганаева Д.Р., Ляпина И.С., Фесенко И.А.	82
ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СПОСОБНОСТЬ ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛИ (<i>SCHIZAPHIS GRAMINUM</i> R.)	
Голиванов Я.Ю.	84
УСТОЙЧИВОСТЬ <i>AGROBACTERIUM RADIOBACTER</i> 204 К РАЗЛИЧНОМУ УРОВНЮ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛЕЙ	
Грицевич К.С., Абдурашитов С.Ф.	85
ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТИПА ЭКСПЛАНТА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ КЛЕЩЕВИНЫ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	
Демиденко Д.В.	87
УСКОРЕНИЕ СЕЛЕКЦИИ КАБАЧКА И ПАТИССОНА (<i>CUCURBITA PEPO</i> L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	
Ермолаев А.С., Домблides Е.А., Коротцева И.Б., Химич Г.А., Кан Л.Ю., Широкова А.В., Слетова М.Е., Домблides А.С.	88
ПОЛУЧЕНИЕ ГОМОЗИГОТНЫХ РАСТЕНИЙ СВЕКЛЫ САХАРНОЙ И СТОЛОВОЙ В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК <i>IN VITRO</i>	
Заячковская Т.В., Алёхина К.Г., Тукусер Я.П., Домблides Е.А.	90
ВЛИЯНИЕ РЕАГЕНТА ЯРИВА (3-D-GLC, 3-ФЕНИЛГЛИКОЗИД) НА РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ТОМАТА (<i>S. LYCOPERSICUM</i> СОРТА БЛАШ) В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>	
Иброгимов Р.Ф., Голиванов Я.Ю., Натыров А.Н., Захарова Е.В.	92
ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ПЕСТИКОВ ИНГИБИТОРОМ КАСПАЗО-3-ПОДОБНОЙ ПРОТЕАЗЫ (АС-DEVD-СНО) НА РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У <i>SOLANUM PENNELLII</i>	
Иброгимова В.К., Голиванов Я.Ю., Захарова Е.В.	93
ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO PAEONIA</i> L.	
А.А. Иванов, Р.С. Рахмангулов.	94
ВЛИЯНИЕ РЕАГЕНТА ЯРИВА (3-D-GLC, 3-ФЕНИЛГЛИКОЗИД) НА РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ПЕТУНИИ (<i>PETUNIA HYBRIDA</i> E. VILM.) В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>	
Киприн М.Е. Голиванов Я.Ю., Натыров А.Н., Захарова Е.В.	95
МОДИФИЦИРОВАННЫЙ СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОСПОР ПЕРЦА (<i>CAPISICUM ANNUUM</i> L.)	
Козарь Е.В., Домблides Е.А.	96
ИДЕНТИФИКАЦИЯ SIX-ГЕНОВ В ГЕНОМАХ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА <i>FUSARIUM</i>	
Костенникова З.С., Назифулла М., Марданова А.М.	97
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА <i>HAIRY ROOTS</i> ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА <i>FABACEAE</i>	
Кузнецова Е.С., Соловьева А.И., Степанова А.Ю.	99

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭТАПА УДВОЕНИЯ ХРОМОСОМНОГО НАБОРА ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ МОРКОВИ СТОЛОВОЙ	
Кулаков Ю.В., Фомичева М.Г., Чичварина О.А., Киракосян Р.Н., Домблидес Е.А.	101
АНАЛИЗ ПРОТЕОМА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ <i>TRITICUM AESTIVUM</i> В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ	
Макеева А.А., Мамаева А.С., Азаркина Р.А., Фесенко И.А.	102
КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИТОФАГОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ НА ПРИМЕРЕ ЧЕРЕМУХОВО-ЗЛАКОВОЙ ТЛИ (<i>RHOPALOSIPHUM PADI</i> L.)	
Мкртычян Д.Э.	103
ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ЗЛАКОВ ДЛЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ	
Нагамова В.М., Бизякина Д.О., Муратов Т.Р., Митронова А.Д., Щелканов Д.А., Алкубеси М., Крупина А.Ю., Разумова О.В., Федорова Т.А., Козарь Е.В., В.С. Рубец, Блинков А.О., Дивашук М.Г.	105
СРОДСТВО ФЕРМЕНТА Г-ГИДРОКСИБУТИРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ <i>ZEА MAYS</i> L. К СУБСТРАТУ	
Плотникова Е.В., Анохина Г.Б.	107
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>IN VITRO</i> СОРТОВ АМЕЛАНШЬЕР МЕДИК.	
Раева-Богословская Е.Н.	109
ОПТИМИЗАЦИЯ РАБОТЫ ПЛОСКОТНОГО ФОТОБИОРЕАКТОРА С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ	
Савиных Г.А. , Габриелян Д.А. , Габель Б.В. , Синетова М.А. , Лось Д.А.	110
КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЁННЫХ СЕМЯПОЧЕК ТОМАТА (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.)	
Тукусер Я.П., Чичварина О.А., Алехина К.Г., Заячковская Т.В., Домблидес Е.А.	111
АСПЕКТЫ АДАПТАЦИИ И ДОРАЩИВАНИЯ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ ПОСЛЕ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ	
Тураева О.А.	113
РОСТ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА В ПРОВОДНИКОВЫХ ТКАНЯХ ПЕСТИКА ПРИ МЕЖРОДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ♀ <i>PETUNIA HYBRIDA</i> E. VILM. X ♂ <i>NICOTIANA TABACUM</i> L.	
Ульянов А.И., Голиванов Я.Ю., Захарова Е.В.	114
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ <i>HYSSOPUS OFFICINALIS</i> СОРТА ИНЕЙ	
Федотова П.А., Жданова М.В., Чередниченко М.Ю.	115
БАКТЕРИИ РОДА <i>PSEUDOMONAS</i> , КАК СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ: ОТ СВЕТОПЛОЩАДКИ ДО ПОЛЯ	
Феоктистова А.В., Тимергалин М.Д., Рамеев Т.В., Четвериков С.П.	117
ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ОБРАБОТКИ ЛАТРУНКУЛИНОМ В РЫЛЕЦ ПЕТУНИИ (<i>PETUNIA HYBRIDA</i> E. VILM.) НА АКТИВНОСТЬ КАСПАЗО-ПОДОБНЫХ ПРОТЕАЗ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i>	
Ханина Т.П. , Тимофеева Г.В. , Захарова Е.В.	118
СТИМУЛИРОВАНИЕ РОСТА ПРОРОСТКОВ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> И-5/6	
Хигерович Л.А., Новикова И.И.	119
ЭКСПРЕССИЯ SIX-ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С ПРИЗНАКАМИ ФУЗАРИОЗНОГО УВЯДАНИЯ	
Холиков С.И., Марданова А. М.	121

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ УКОРЕНЕНИЯ <i>CATTLEYA GASKELLIANA</i> (N.E.BR.) V.S. WILLIAMS В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> Хуссиен Мусаб, Молканова О. И., Орлова Е. Е.....	122
---	-----

**СЕКЦИИ «ЦИТОЛОГИЯ И ЦИТОГЕНЕТИКА» ,
«ЦИФРОВОЕ ФЕНОТИПИРОВАНИЕ»**

СРАВНИТЕЛЬНОЕ FISH-КАРТИРОВАНИЕ 45S И 5S рДНК РОДА <i>ILEX</i> Гонсалес Франко М.Х, Разумова О.В.....	126
АВТОМАТИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАРАЖЕННОЙ ОБЛАСТИ ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ ПО ФОТОГРАФИЯМ ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДОВ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ Онежко Н.Н., Ермолаев А.С., Дивашук М.Г.	127
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ОКРАШИВАНИЕ DAPI ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХРОМОСОМ <i>CHONDRILLA JUNCEA</i> И <i>C. GRAMINEA</i> (ASTERACEAE) Пархоменко А.С., Ефименко С.Ф., Разумова О.В., Кашин А.С.	128
СОЗДАНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ХРОМОСОМ ЦИТРУСОВ Романов Д.В., Коробкова В.А., Разумова О.В., Боне К.Д., Александров О.С., Дивашук М.Г.	130
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНЕСЕНИЯ АЗОТНЫХ УДОБРЕНИЙ НА РАЗНЫЕ СОРТА ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ Ульянова А. А., Ульянов Д.С., Кочешкова А. А., Литвинов Д.Ю.	132
РАЗРАБОТКА ИНТЕРАКТИВНЫХ СТЕНДОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ R И SHINY Ульянов Д.С., Ульянова А. А., Кочешкова А. А., Литвинов Д.Ю.	133
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ <i>THINOPYRUM BESSARABICUM</i> W6 21890 Юркина А.И., Крупин П.Ю., Карлов Г.И., Дивашук М.Г.	134

СЕКЦИЯ «МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА, ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ»
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ РАЗВИТИЯ ТЕРМИНАЛЬНОГО ЦВЕТКА У
ЛЬВИНОГО ЗЕВА (*A. MAJUS*)

И.В. Барабанов, Р.С. Рахмангулов.....	137
ДИНАМИКА LTR РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ СУПЕРСЕМЕЙСТВА СОPIA И GYPSY У РОДА <i>CITRUS</i> . Боне К.Д., Разумова О. В., Коробкова В. А., Дивашук М. Г., Романов Д. В.....	138
АКТИВАЦИЯ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННОГО САЙЛЕНСИНГА ГЕНОВ Власова А.В., Камараули Е.Д., Перевозчиков Д.В., Киров И.В.	139
ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ И СТРУКТУРЫ ДОМСТИЦИРОВАННОГО БЕЛКА GAG (DGAG) <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> Еремина М. Ю., Полховский А. В., Парыгина А. Д., Киров И. В.	141
АНАЛИЗ АКТИВИРУЮЩИХСЯ В ОТВЕТ НА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТРЕСС ТРАНСПОЗОНОВ РАПСА (<i>BRASSICA NAPUS</i>) Ивахненко А.С., Тюрин К.Н, Киров И.В.	142
ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ОПОСРЕДОВАННОГО АГРОБАКТЕРИЯМИ ВИРУС-ИНДУЦИРОВАННОГО САЙЛЕНСИНГА ГЕНОВ (VIGS) У ПОДСОЛНЕЧНИКА <i>HELIANTHUS ANNUUS</i> L. Ивойлова Э.А., Уткина В.В., Мардини М., Казанцев М.Ю., Власова А.В., Киров И.В.....	143
ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННАЯ АКТИВАЦИЯ МОБИЛОМА <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> Камараули Е.Д., Власова А.В., Перевозчиков Д.В., Киров И.В.	145

НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> НА ОСНОВЕ МОБИЛЬНЫХ ТРАНСКРИПТОВ CRISPR-CAS9 СИСТЕМЫ	
Парыгина А. Д., Полховский А. В., Киров И. В.	146
ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННЫЙ САЙЛЕНСИНГ ГЕНА DDM1 У <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> , ВОВЛЕЧЕННЫЙ В МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК	
Перевозчиков Д.В, Власова А.В., Камараули Е.Д., Киров И.В.	147
АКТИВНЫЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ <i>SOLANUM PERUVIANUM</i> , ИНТРОГРЕССИРОВАННЫЕ В ГЕНОМ ТОМАТА (<i>S. LYCOPERSICUM L.</i>)	
М.А. Серганова, П.Ю. Меркулов, Г.А. Петров, И.В. Киров.....	148

**МАТЕРИАЛЫ САТЕЛЛИТНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ТЕМАТИЧЕСКОМУ
НАПРАВЛЕНИЮ**

«ТРИТИКАЛЕ: ГЕНЕТИКА, БИОТЕХНОЛОГИЯ, СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО, ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ И ПЕРЕРАБОТКИ»	
НОВЫЙ СОРТ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ БОТАНИЧЕСКАЯ 4	
Аленичева А.Д., Щуклина О.А.	151
РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ОЗИМОЙ ГЕКСАПЛОИДНОЙ ТРИТИКАЛЕ В ПРЕДВАРИТЕЛЬНОМ СОРТОИСПЫТАНИИ В УСЛОВИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОГО РАЙОНА НЕЧЕРНОЗЕМНОЙ ЗОНЫ РОССИИ	
Ворончихина И.Н., Ворончихин В.В.	152
ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ИНДУКЦИОННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГАПЛОПРОДУКЦИИ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ТРИТИКАЛЕ <i>IN VITRO</i>	
Жилин С.В., Хомякова О.В., Акинина В.Н., Дьячук Т.И., Калашникова Э.В., Куликова В.П.	154
ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗЕЛЕННОЙ МАССЫ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ УДОБРЕНИЙ В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ	
Квитко В. Е., Щуклина О. А., Соловьев А. А.	156
АНАЛИЗ РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ ЗЕРНОВКИ ТРИТИКАЛЕ	
Полховская Е.С.....	158
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА НЕКРАХМАЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ ТРИТИКАЛЕ ПРИ ОЦЕНКЕ КРАХМАЛИСТОСТИ ЗЕРНА	
Семенова А.В., Соловьев А.А.	160
ИЗУЧЕНИЕ МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО И ЯРОВОГО ОБРАЗА ЖИЗНИ В ОСЕННЕМ ПОСЕВЕ В УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ	
Хлебникова А.А., Ковтуненко В.Я., Кузенко М.В.	162

**СЕКЦИЯ
«ПРИКЛАДНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕНОВ ТОМАТА

Алексеева А.И., Абдурашитов С.Ф.

*ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»
(ФГБУН НИИСХ Крыма);
E-mail: alena_crao2000@mail.ru*

Определение видовой принадлежности патогенов растений одна из составляющих комплекса мер по их защите. В зависимости от организма и его видовой принадлежности различаются и методы борьбы с фитопатогенами. В современных разработках для этой цели используются различные методы, однако на практике наиболее широко используют метод ПЦР по определенному гену или мультиплексная ПЦР, оба метода предназначены в первую очередь для определения наличия на растении определенного вида патогена [5]. Однако во многих случаях требуется определить вид патогена с нуля. Для этой цели часто используют секвенирование высококонсервативного локуса. Данный метод позволяет проводить таксономическую идентификацию большинства групп организмов до рода и вида [1; 4]. Однако в случае отсутствия достаточного количества референсных последовательностей в базах данных, определение до вида может быть затруднено [2]. Цель исследований – идентификация патогенов, выделенных с растений томата, с применением секвенирования консервативных участков ДНК.

Образцы были отобраны с растений сорта Pink Heart (Китай), выращенных в условиях закрытого грунта, на которых наблюдалось два типа поражений. Выделение фитопатогенов в чистую культуру проводили из различных частей объектов поражений согласно Методов определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений [3]. ДНК выделяли из чистых культур фитопатогенов. В ПЦР и секвенировании использованы универсальные праймеры на рибосомальный спейсер: ITS1/ITS4 – для грибов, и гена 16S рРНК: 25f и 1425g – для бактерий. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями, размещенными в GenBank, с помощью сервиса BLAST.

На томатах наблюдалось два типа поражений. Первый тип характеризовался темными полосами на стеблях, потемнением концов листовой пластинки с постепенным усыханием всего листа, возникновением темных пятен на плодах. Второй тип поражения представлен хлоротичными пятнами на листьях, а также потемнениями участков листовой пластинки, при этом на других частях растений описанный вид поражения отсутствовал. Выделение проводили из пораженных участков стеблей, листьев и плодов. Всего в чистую культуру было выделено 15 изолятов грибов и бактерий. Для идентификации методом секвенирования отобрано 9 штаммов, имеющих преимущество по представленности в различных повторностях и местах появления.

Согласно результату секвенирования, можно предположить, что первый тип поражения вызван бактериями, гомологичных *Enterobacter ludwigii*, *E. kobei*, *E. cloaca*. Идентичность всех гомологов составляет 100 % при 100 % покрытии. В литературе штаммы этих бактерий также определены как патогены растений. Выделенные патогены LBст1.2.2 и LBст3.2.2 определены как *E. ludwigii*. Изолят LBп1.2.1 идентичен *Pseudomonas veronii*, штаммы этого вида проявляют способность к утилизации n-алканов и других органических соединений, и используются в биотехнологии. Согласно наблюдению на уже поврежденных участках растения развивались грибы, чьи нуклеотидные последовательности гомологичны *Botrytis cinerea* (изолят ГМл3.1сер2) и роду *Penicillium* (ГМЛВл1.2бел и ГМст3.1серо-зел), штаммы которых, согласно литературным данным, в большинстве своем не относятся к патогенам. Второй тип поражения скорее всего вызван *Cladosporium* sp. (КД_л.4черн.2 и КД_л.1черн.1), а

Penicillium chrysogenum (КД_л.4бел.1) поселился на уже поврежденных участках растения. Гомологичность составила 100 % со 100 % покрытием.

Таким образом, по результату секвенирования определено, что первый тип поражения вызван бактериями *E. ludwigii*, которые поразили стебель и его проводящие пучки. Второй тип поражения на листьях вызван грибами рода *Cladosporium* sp. (КД_л.4черн.2 и КД_л.1черн.1).

Список литературы:

1. Белякова, Н. В. Молекулярно-генетический анализ фитопатогенов в лесных насаждениях Воронежской области / Н. В. Белякова, Е. А. Воробьева, В. А. Сиволапов // Современные машины, оборудование и IT-решения лесопромышленного комплекса: теория и практика : Материалы Всероссийской научно-практической конференции, Воронеж, 17 июня 2021 года. – Воронеж: Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, 2021. – С. 29-33. – DOI 10.34220/MMEITSIC2021_29-33. – EDN OIQQVO.

2. Использование its-региона для идентификации патогенов рода *Venturia* CES.et de not / Т. Н. Марцинкевич, Т. А. Гашенко, З. А. Козловская [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. – 2019. – Т. 27. – С. 62-69. – EDN FYKQHN.

3. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений / [И. Бетхер, Т. Ветцель, Ф. В. Дреус и др.] ; пер. с нем. д-ра биол. наук К. В. Попковой и канд. биол. наук В. А. Шмыгли. - Москва : Агропромиздат, 1987. - 223 с. – электронный ресурс, режим доступа: <https://www.activestudy.info/metody-opredeleniya-boleznej-i-vrediteljev-selskoxozyajstvennyx-rastenij/>

4. Применение методов молекулярной генетики для анализа наличия фитопатогенов в лесных насаждениях и питомниках Российской Федерации / Т. С. Алимова, В. А. Сиволапов, Н. А. Карпеченко [и др.] // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 35-41. – EDN SYQTJX.

5. ПЦР-диагностика грибов - возбудителей болезней огурца и томата / А. А. Барейко, А. В. Сидоренко, Л. Н. Валентович [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : Сборник научных трудов. – Минск : Республиканское унитарное предприятие "Издательский дом "Белорусская наука", 2019. – С. 200-215. – EDN QQVHMB.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ/ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ООО «ЩЁЛКОВО» ПО ГЕНАМ *RHT*, *VRN*, *PPD* И *GLU C* ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Алкубеси М., Стрембовский И.В., Черноок А.Г., Назарова Л.А., Самарина М.А., Дивашук М.Г.

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

Создание популяции для отбора – одного из основных этапов селекционного процесса, невозможно без планирования родительских скрещиваний. Учитывая то, что современные сорта мягкой пшеницы являются продуктом многоступенчатых скрещиваний, где количество родителей крайне велико, может быть достаточно сложно проследить наследование отдельно взятого признака, не имеющего фенотипического проявления. Известны методы классической селекции, например, беккроссирование, позволяющее оценить наличие/отсутствие аллеля, обуславливающего моногенный

признак, но это требует больших затрат времени [1]. Закономерное развитие классических методов селекции привело к появлению новых способов контроля наследования признаков и, как следствие, появлению целого набора новых методов, объединённых под общим названием маркер опосредованной селекции (Marker-assisted selection). Основой данной методологии являются маркеры: морфологические, биохимические, цитологические и, преимущественно, генетические маркеры, как наиболее удобные в использовании и наименее привязанные к онтогенезу растений [2].

Учитывая вышесказанное, мы – Курчатовский геномный центр ВНИИСБ, задались целью провести валидацию набора коммерчески доступных и разработанных нами генетических KASP, CAPS, STS маркеров и, используя наиболее достоверные из них, выполнить генетический скрининг рабочей коллекции из сортов/линий мягкой пшеницы ООО «Щёлково» (58 шт, коллекция предназначена для ведения селекции в условиях Московской области). Всего в исследование было включено 25 маркеров: 23 шт KASP (19шт коммерческих + 5шт разработанных нами), 1шт CAPS и 1шт STS. В данной работе мы ограничились аллельным скринингом только хорошо изученных и очевидно селекционно значимых генов: *Rht* (определяют высоту растения, в исследование включены *Rht1*, *Rht2* и *Rht11*), *Vrn*, (гены чувствительности к яровизации), *Ppd* (гены чувствительности к фотопериоду) [3] и *Glu1* (кодируют тяжёлые субъединицы глютеинов и определяют качество клейковины)[4]. Оценка аллельного состояния генов запасных белков глютеинов (*Glu1*) проводилась путём сопоставления результатов постановки упомянутых KASP маркеров и результатов электрофореза белков пшеницы – белковых маркеров. Приоритет в оценке отдавался белковым маркерам как наиболее достоверным. Оценка остальных генетических маркеров, а именно KASP маркеров, была основана на анализе кластеризации (формированию «облаков») исследуемых сортов/линий по наличию конкретного аллеля каждого гена и на сопоставлении результатов классической ПЦР с немечеными праймерами и конкурентной ПЦР с KASP маркерами. В свою очередь CAPS и STS маркеры использовались для установления наличия транслокации 1A1R и 1B1R у образцов исследуемой коллекции.

В ходе условного первого этапа нашей работы – валидации, был создан набор маркеров, удовлетворяющий нашим требованиям: соотносимость результатов, полученных при использовании разных типов маркеров (по генам *Glu1*) и разных методик анализа (гены *Rht*, *Vrn* и *Ppd*). В конечную работу были включены 23 из 25шт маркеров (исключены были только KASP маркеры).

Результатом второго этапа – непосредственного генетического скрининга коллекции, стало установление аллельного состава генов исследуемых линий/сортов. Так, все маркеры, нацеленные на ген *Vrn* показали гомозиготность всех исследуемых образцов по данному гену по обоим субгеномам (*Vrn* присутствует в А и В субгеномах). При этом коллекция не демонстрировала аллельного разнообразия по гену *Vrn*. Влияние установленного аллеля *Vrn* на фенотип ещё предстоит выяснить. Схожая картина наблюдалась и по генам *Rht11*, *Ppd1A* (субгеном А) и *Glu1*, где преимущественно (в 90% случаев) преобладал один аллель.

В противоположность этому аллельный состав генов *Rht1*, *Rht2*, *Ppd1B* (субгеном В) и *Ppd1D* (субгеном D) был крайне вариативен: по гену *Rht1* соотношение аллелей (а и b) было 1:1 (частота 50%/50%), по *Rht1*(аллель а и b) – 2,3:1 (частота 70%/30%), по *Ppd1B* - 4,55:1 (частота 82%/18%) и по *Ppd1D* - 2,3:1 (частота 70%/30%). Отдельно стоит отметить наличие у ряда сортов/линий гетерозигот по данным генам, что следует учитывать при планировании селекционного процесса.

У отдельных линий/сортов (10шт) так же было установлено наличие транслокации 1B1R и, только у одной линии, транслокации 1A1R, что стоит учитывать при работе с ними.

Результаты проведённой работы будут крайне полезны практикующим селекционерам, при планировании родительских скрещиваний и непосредственной оценке

генетического профиля (гетерозиготность и аллельный состав) родителей и их потомства, что особенно важно при создании чистых линий.

Список литературы:

1. Acquaah G. (2009) Principles of Plant Genetics and Breeding.
2. Kroupin P. Beshalova L., Kroupina A., Yanovsky A., Korobkova V., Ulyanov D., Karlov G. and Divashuk (2023). Association of High-Molecular-Weight Glutenin Subunits with Grain and Pasta Quality in Spring Durum Wheat (*Triticum turgidum* spp. durum L.), *Agronomy* 2023, 13(6), 1510; <https://doi.org/10.3390/agronomy13061510>.
3. Kroupin, P., Karlov, G. , Beshalova, L., Salina, E., Chernook, A., Watanabe, N., Divashuk, M. G. (2020). Effects of Rht17 in combination with Vrn-B1 and Ppd-D1 alleles on agronomic traits in wheat in black earth and non-black earth regions. *BMC Plant Biology*, 20(S1). doi:10.1186/s12870-020-02514-0.
4. 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.

РАНЖИРОВАНИЕ ИСТОЧНИКОВ ПРИЗНАКА МНОГОПОЧАТКОВОСТИ КУКУРУЗЫ КОЛЛЕКЦИИ ВИР ПО ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫМ ПРИЗНАКАМ

Васипов В.В., Хатефов Э.Б.

***ФГБНУ ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений
им. Н.И. Вавилова»
E-mail: vl.vasipov@gmail.com***

Выделение генотипов кукурузы, закладывающих несколько хозяйственно годных початков на стебле, важно для повышения урожайности зерна за счет внедрения в производство многопочатковых гибридов кукурузы.

Цель наших исследований – поиск, выделение и изучение генетических источников признака многопочатковости с оптимальным сочетанием хозяйственных и селекционно-ценных признаков в коллекции кукурузы ВИР.

На Кубанской опытной станции ВИР в 2017 г. изучено 596 образцов коллекции кукурузы ВИР, получены гибриды между многопочатковыми и однопочатковыми линиями кукурузы. В степной зоне Кабардино-Балкарии, на территории ССЦ «ОТБОР», в 2020 г. испытаны 52 гибрида между многопочатковыми и однопочатковыми линиями кукурузы. Проведен учет селекционно-ценных признаков, вычислен коэффициент многопочатковости (кмп) у исходных линий и их гибридного потомства с однопочатковым тестером с ранжированием типа наследования признака многопочатковости у 52 родительских линий.

По результатам изучения выделены 42 образца коллекции кукурузы, характеризующиеся многопочатковым типом формирования урожая, различающихся по эколого-географическому происхождению, консистенции и окраске зерна, а доля образцов кукурузы с высокими показателями признака многопочатковости составила 27,8% от общего числа изученных образцов.

Ранжирование многопочатковых образцов по группам спелости ФАО и продолжительности вегетационного периода позволило разделить коллекцию на шесть групп спелости по ФАО. Из изученного в опыте количества 2 образца отнесено к раннеспелой (ФАО-100) группе, 18 образцов отнесены к среднеранней группе (ФАО-200); 10 образцов к среднеспелой (ФАО-300), 9 образцов к среднепоздней группе (ФАО-400), к позднеспелой (ФАО-500) и очень позднеспелой (ФАО-600) группам спелости отнесено по четыре образца.

Результаты исследования гибридов между многопочатковыми и однопочатковыми линиями кукурузы показали, что признак многопочатковости передается потомству сложным комплексом генов преимущественно с промежуточным (неполным) типом доминирования. Гибриды от таких скрещиваний, в зависимости от типа многопочатковости у родительских линий, могут формировать до 3 продуктивных початков на гибридном растении. При этом эффект гетерозиса наблюдается как по урожайности, так и по числу початков на гибридном растении.

Результаты тест-кроссов отцовских форм показали, что 9 линий отнесены к материнскому типу поскольку формируют не более 1 початка на гибридном растении. 26 линий отнесены к промежуточному типу из-за неполного фенотипического проявления двухпочатковости и асинхронности цветения вторых початков. К отцовскому типу отнесены 11 линий, который характеризуются выраженной двухпочатковостью и синхронностью цветения. К линиям с гетерозисным типом удалось отнести только 6 линий, число початков на растении которых превысил лучшего по этому признаку родителя.

Коммерческую значимость и хозяйственную полезность для селекции многопочатковой кукурузы представляют образцы только с отцовским и гетерозисным типом многопочатковости. Изучение коллекции кукурузы в условиях степной зоны Кабардино-Балкарской Республики позволило выделить 42 генетических источника признака многопочатковости с дифференцированной группой спелости по ФАО.

Исследования типа многопочатковости в 52 тест-кроссах с типично однопочатковой линией ГК26М показало, что 17 образцов имеют практическое значение для использования в гибридной селекции кукурузы на многопочатковость. Результаты исследований показали, что имеющиеся в коллекции ВИР источники многопочатковости далеко не все исчерпаны и их эффективность зависит от степени генетического разнообразия исходного материала. Все выделенные источники могут вовлекаться в гетерозисную селекцию гибридов различных групп спелости.

Совместная работа выполнена в рамках государственного задания ВИР согласно тематическому плану НИР Васиповым В.В по теме FGEM-2022–0012 Клеточные технологии для расширения селекционного потенциала культур овощного направления использования и Хатефовым Э.Б. в рамках №FGEM-2022-0009 «Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

АССОЦИАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ RPM1 RPS2 С РАСОВО-СПЕЦИФИЧНОЙ РЕАКЦИЕЙ РАСТЕНИЙ *BRASSICA RAPA* L. НА ЗАРАЖЕНИЕ ШТАММАМИ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* (PAM.) DOW

Гайсина Э.М., Игнатов А.Н.

**ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»
(РУДН), 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
E-mail: gaysina-em@rudn.ru**

Локус RPM1 *Arabidopsis thaliana* land race Columbia обеспечивает узнавание продукта гена авирулентности avrRpm1 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm) [1], гомологичного генам avrRpiA и avrB из псевдомонад, патогенных для бобовых культур [2]. У восприимчивых к Psm линий резущки Таля локус RPM1 делецирован с сохранением фланкирующих генов. Данный локус присутствует у амфидиплоидного вида *Brassica napus* в 6 копиях - три от *B. oleracea* и три от *B. rapa*. Две копии несут функциональный ген с высоким сходством между собой и с геном RPM1, четыре копии делецированы с

уникальными замещающими последовательностями, что вероятно показывает разное историческое время возникновения данных делеций. При этом функционирующие гены у *B. napus* не придают растению устойчивости к штаммам Psm, авирулентным к арабидопсису с геном RPM1 [3]. Таким образом, *B. oleracea* и *B. rapa* несут по одной копии функционального гена RPM1, не активного по отношению к штаммам бактерий, несущих ген авирулентности, гомологичный группе avrB. А. Кастанеда с коллегами [4] обнаружили у *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) ген авирулентности avrXccC, отвечающий за авирулентную реакцию с геном устойчивости Rxcс1, типичного для дикорастущих крестоцветных растений. Данный ген был выявлен у рас Xcc 1, 3 и 4 [5]. Он также принадлежит к семейству avrB генов, со сходством более 79% по аминокислотной последовательности с геном avrBPph3221 *P. syringae* [6]. Ген avrXccC необходим для экспрессии 48кДа белка-эффектора с функцией специфического узнавания растения-хозяина фитопатогеном [7]. А.Н. Игнатовым и др. (2002) было обнаружено изменение расы Xcc при заражении устойчивого генотипа растения *Brassica composita* (геном ABC) [8], а в работе Н. Пуниной (2009) [9] было доказано, что изменение расы происходит в результате индуцированной делеции гена avrXccC в геномах Xcc рас 1, 3 и 4. Мы предполагали, что растения с геномом В (В, АВ, ВС), устойчивые к штаммам Xcc и Psm с генами, гомологичными avrB несут или добавочную копию гена RPM1, или отличную аллель этого гена, придающую устойчивость к штаммам с avrB (avrXccC). В этом случае восприимчивая линия *B. carinata* может иметь делецию в данном локусе или измененную последовательность данного гена. С меньшей долей вероятности можно предположить, что функциональные аллели гена RPM1 определяют устойчивость *B. oleracea* к расам 1, 3 или другим. Для *B. oleracea* было показано не менее 6 типов устойчивой реакции и большее число аллелей на локус устойчивости, что поддерживает гипотезу об одном мультиаллельном локусе [10]. Устойчивость *B. rapa/B. napus* к расе 4 Xcc с 3 аллелями локуса Rxc4 была показана ранее [11]. В качестве альтернативной гипотезы можно предположить, что устойчивость *B. rapa/B. napus* к расам Xcc определена локусом RPS2, присутствующим в единичной копии, а также показывающим высокий полиморфизм экспрессии [12] и нуклеотидной последовательности [13] между устойчивыми и восприимчивыми генотипами разных видов растений.

В данной работе была проведена оценка расщепляющейся популяции *Brassica rapa* F₂ от гибрида ДН 206 (♀ устойчивая) и ДН 192 (♂ восприимчивая), отобранных из референтной генетически картированной популяции дигаплоидных линий, созданной из F₁(ДН Р175 × ДН Р115) [14]. Получены и оценены на устойчивость к 4 расам патогена 87 растений популяции F₂, в которых отмечено расщепление по продуктам ПЦР амплификации с праймерами, специфичными для генов устойчивости Rpm1 / Rps2 и по реакции растений на заражение 3 из 4 использованных рас Xcc (1, 3 и 4). Для заражения использовали штаммы Xcc PHW231 (раса 1), HRI5212 (раса 3), HRI1279a (раса 4), и В-32 (раса 6).

Результаты. Оценка реакции растений проводилась в двух независимых экспериментах (осенний и весенний сезоны). Условия проведения инокуляций отличались более высокой ночной температурой в осенний сезон. Все растения родительских линий ДН206 и ДН192 были восприимчивы к расам 1, 3 и 6. Линия 206 была устойчивой, а линия 192 – восприимчивой к расе 4. Для родительских линий между сезонами существенной разницы не наблюдалось, хотя при оценке весной их восприимчивость к расам 3 и 4 была ниже. Сегрегация реакции к расам Xcc 1, 3 и 4 и ПЦР амплификации генов RPM1 и RPS2 в популяции 87 растений F₂ от гибрида линий 206 x линия 192 показали, что у потомства дигаплоидных линий имело место существенное отклонение от менделевского расщепления и для фенотипического проявления устойчивости и для маркеров локусов RPS2 и RPM1. Соотношение положительных и отрицательных ПЦР реакций составило 46:41 для локуса RPM1 и 38:49 – для локуса RPS2. Соотношение устойчивых и восприимчивых растений F₂ варьировало для разных рас: 33:54 (для расы 4),

39:48 (для расы 3) и 27:60 (для расы 1). 18 из 28 растений без ПЦР маркеров для локусов RPM1 и RPS2 были восприимчивы ко всем расам патогена. 10 растений, где гены RPS2 и RPM1 не были идентифицированы, проявили устойчивость к расе 1. 18 из 34 растений, устойчивых к расе 4 имели маркеры для генов RPM1 и RPS2.

Таким образом, исходное предположение о связи маркеров генов устойчивости RPM1 и RPS2 с расово-специфичной реакцией растений к расам Хсс не подтвердилось.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-26-00168.

Список литературы:

1. Debener, T., et al. 1991. The Plant Journal, 1(3), 289-302.
2. Vivian, A., et al. 1989. Physiological and Molecular Plant Pathology, 34(4), pp.335-344.
3. Grant, M.R., et al. 1995. Science, 269(5225), pp.843-846.
4. Castañeda, A., et al. 2005. Molecular plant-microbe interactions, 18(12), pp.1306-1317.
5. Игнатов, А.Н., 2006. Автореф. дисс. Док. Биол. Наук. Российский государственный аграрный университет-МСХА, 34 сс.
6. Lindeberg, M., et al. 2009. Molecular plant pathology, 10(6), pp.767-775.
7. Wang, D., et al. 2007. Current Biology, 17(20), pp.1784-1790.
8. Игнатов, А.Н., и др. 2000. Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, (4), pp.71-75.
9. Пунина, Н.В., 2009. Автореф.дисс. канд. биол. Наук. Московский государственный университет им. МВ Ломоносова (МГУ)), 25 сс.
10. Caicedo, A.L et al. 1999. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(1), pp.302-306.
11. Grant, M.R., et al. 1998. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(26), pp.15843-15848.
12. Li Z, et al. Front. Plant Sci. 10: 417.doi: 10.3389/fpls.2019.00417 17.
13. Monakhos, G., et al. 2017, VII International Symposium on Brassicas 1202 (pp. 107-112).
14. Артемьева А.М., и др. С.-х. биол., 2018. №1

СОЗДАНИЕ ГИБРИДОВ F₁ ТОМАТА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ АНТОЦИАНОВ И КАРОТИНОИДОВ ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Дрозд Е.В.¹, Бабак О.Г.¹, Некрашевич Н.А.¹, Анисимова Н.В.¹, Яцевич К.К.¹, Пугачева И.Г.², Добродькин М.М.², Игнатова С.И.³, Кильчевский А.В.¹

1 – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси (ИГЦ НАНБ), Минск 220072; E-mail: drozd.liza@bk.ru

2 – Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия (БГСХА), 213410

3 – ВНИИО – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», д. Веря, Московская обл. 143080

Современные тенденции перехода к здоровому образу жизни связаны с функциональным питанием человека и, как следствие, с созданием продуктов питания, обладающих высокими антиоксидантными свойствами за счет накопления биологически активных веществ. В вегетативных органах и плодах овощных растений накапливаются такие группы пигментов, относящиеся к БАВ, как каротиноиды и антоцианы. Поиск молекулярных маркеров, обеспечивающих эффективный отбор интересующих

родительских форм для создания гибридов F₁, содержащих комплекс аллелей, детерминирующих накопление биологически активных веществ, является основным этапом при создании форм для функционального питания.

Маркер-сопутствующий отбор (MAS – Marker Assisted Selection) – сравнительно новый подход в селекции растений, основанный на прямой оценке растений по генам, определяющим хозяйственно-ценные признаки. В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (ИГЦ) используются молекулярные маркеры к генам качества плодов, количества и состава каротиноидов (*t*, *B*, *og*, *og^c*, *Del*, *hp-2^{dg}*, *gf-3*, *U-del52*), антоцианов (*Ant1*, *An2*, *Atv*, *SLMYB12*), устойчивости к болезням (*I-2*, *I-2C*, *I-3*, *I-7*, *Mil.2*, *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-4A*, *Cf-5*, *Cf-9*, *DC9*, *Ph-2*, *Ph-3*, *Ve*, *Tm2²*, *Ty-2*, *Ty-3*), а также к гену, контролирующему тип роста главного побега (*Sp*). В результате циклических скрещиваний совместно с Белорусской государственной сельскохозяйственной академией (БГСХА) и селекционной агрофирмой «Ильинична» созданы формы, сочетающие в своем генотипе 3-5 целевых аллелей, определяющих пигментный состав плодов томата и устойчивость к болезням. Данные формы использовались в качестве родительских форм при получении гибридов F₁. В 2021 г. в Институте генетики и цитологии и БГСХА было создано 35 гибридов F₀ с комплексом генов качества и устойчивости.

В связи с вышеизложенным, целью данных исследований было создание гибридов F₁ и проведение двухлетних испытаний полученных гибридов томата с повышенными антиоксидантными свойствами, обусловленными комплексом аллелей, определяющих содержание каротиноидов и антоцианов. Лучшие формы по комплексу признаков были отобраны для дальнейшего производства.

Отбор форм для гибридизации проводился по результатам ДНК-типирования образцов томата с использованием ПЦР-анализа. Осуществлен поиск молекулярных маркеров следующих целевых аллелей генов качества плодов: *CRTISO* (*tangerine*, *t*), *CYCB* (*old gold crimson*, *og^c*; *beta*, *b*; *Beta*, *B*), *DET1* (*high pigment*, *hp-2^{dg}*), *GLK2* (*U*, *U-del52*), *SLMyb12* (*yellow*, *Y/y*) *R2R3Myb* (*Anthocyanin*, *Ant1*; *Anthocyanin2*, *An2*), *R3Myb* (*Atroviolacium*, *atv*) и устойчивости к болезням: фузариозу (*I-2*, *I-3*, *I-7*), кладоспориозу (*Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-4A*, *Cf-5*, *Cf-9*, *DC9*), мелойдогинозу (*Mil.2*), фитофторозу (*Ph-2*, *Ph-3*), вертициллезу (*Ve*), вирусу мозаики томата (*Tm2²*), вирусу желтой курчавости листьев (*Ty-2*, *Ty-3*) [1-3].

По результатам комплексного отбора по фенотипу и генотипу отобрана 21 линия для дальнейшего скрещивания. В результате гибридизации данных форм получены 35 гибридов F₁ с комплексом генов качества и устойчивости, испытания которых проводились в 2022 – 2023 гг. В рамках двухлетних испытаний проведены фенотипическая оценка окраски плодов, выполнен учет биометрических признаков (высота, количество листьев между кистями, число кистей на главном стебле, завязываемость плодов на 1-3 кистях), испытания по признакам урожайности (ранняя урожайность, товарная урожайность, общая урожайность, масса плода) в условиях неотапливаемых остекленных теплиц на БОС ИГЦ и карбонатных теплиц БГСХА, а также проведен биохимический анализ содержания каротинов в плодах с использованием метода спектрофотометрии.

По результатам учета и статистического анализа признаков урожайности полученных гибридов F₁ на опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси и БГСХА лучшими по комплексу признаков были гибриды: №7, №8, №10, №11, №19, №4Б, №10Б, №12Б, №13Б.

Согласно полученным данным ряд гибридов с комплексом аллелей повышенного содержания каротиноидов и антоцианов имел урожайность на уровне лучших по продуктивности гибридов-стандартов (Аламина, Старт, Евро): ранняя урожайность 0,96–3,66 кг/м², товарная урожайность 6,81–9,34 кг/м², общая урожайность 7,23–9,97 кг/м² при массе плода 51,5–109,3 г.

По результатам биохимического анализа ряд испытываемых гибридов с комплексом аллелей повышенного содержания каротиноидов и антоцианов показал высокое содержание каротинов в плодах, что усиливает их антиоксидантные свойства. Количество каротинов по результатам анализа варьировалось от 2,03 до 5,98 мг/100 г сырой массы.

Следовательно, согласно данным двухлетних испытаний показана возможность получения форм (гибридов) растений одновременно с высоким качеством плодов, высокими антиоксидантными свойствами и урожайностью. По результатам испытания лучшие гибриды переданы для государственного сортоиспытания в 2024 году.

Список литературы:

1. Кильчевский, А.В. ДНК-типирование генов качества плодов и устойчивости к болезням томата / А.В. Кильчевский, О.Г. Бабак, С.В. Мальшев, В.Ф. Аджиева, Н.А. Некрашевич, К.К. Яцевич, А.В. Кондратюк; Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Национальная академия наук Беларуси, Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. – Минск, 2016. – с. 41. – ISBN 978-985-552-526-5.

2. Babak O.G., Nekrashevich N.A., Yatsevich K.K., Malyshev S.V., Kilchevsky A.V. Genetic bases of tomato marker-assisted selection in Belarus. Eurobiotech. J. 2018; 2(2): 128-135, doi:10.2478/ebtj-2018-0017

3. Игнатова С.И., Бабак О.Г., Багирова С.Ф. Создание высококопировых гибридов томата для теплиц с использованием традиционных методов селекции и молекулярных маркеров. Овощи России. – 2020 – №5, С.22-28. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-5-22-28>.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Дудникова К.Ю.^{1,2}, Дудников М.В.¹

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва

2 – ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений» (ФГБНУ ФНЦБЗР)

E-mail: saenkok1997@yandex.ru

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) занимает первое место среди масличных культур, возделываемых в России и выращивается на площади более 9 млн га (rosstat.gov.ru). Из семян подсолнечника производится растительное масло, которое играет важнейшую роль в пищевой индустрии. В связи с огромной хозяйственной ценностью подсолнечника, требуется ускорение селекционного процесса для получения более урожайных и технологичных сортов и гибридов. Важное значение на разных этапах селекционного процесса имеют технологии ускоренного генотипирования растений.

Биологические особенности данной культуры, предполагают большую долю гетерозигот среди растений, что связано с типом их опыления: чаще опыляются пыльцой соседних растений с помощью пчёл и других насекомых.

Определение генотипа подсолнечника путём секвенирования ПЦР ампликонов ДНК с помощью секвенирования методом Oxford Nanopore позволит значительно ускорить процесс генотипирования. Наши исследования позволят проводить таргетный анализ интересующих генов среди большого количества образцов, за относительно короткий срок.

Для изучения использовали коллекцию подсолнечника ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК им. В. С. Пустовойта (Россия, Краснодар), состоящую из 48 генотипов перспективных линий,

включая источники цитоплазматической мужской стерильности и восстановитель фертильности, а также линии с повышенной устойчивостью к гербицидам группы имидазолинов: «ВК1-кпп А», «ВК1-ими А». Для проведения реакции амплификации были подобраны специфические праймеры с фосфатной группой на 5'-конце, фланкирующие последовательности открытых рамок считывания генов ANAS1, ANAS2, ANAS3, FAD2, с использованием программного обеспечения Primer 3.0.

Таким образом, поиск генетических вариантов у подсолнечника, будет проводиться за короткое время с максимальной эффективностью.

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНА *E1*, ВЛИЯЮЩЕГО НА СРОКИ ЦВЕТЕНИЯ И СОЗРЕВАНИЯ У СОИ (*GLYCINE MAX (L.) MERR.*)

Злобнова Н.В.¹, Крупин П.Ю.¹, Бурсаков С.А.¹, Кочешкова А.А.¹, Черноок А.Г.¹, Самарина М.А.¹, Архипов А.В.¹, Назарова Л.А.¹, Меглицкая Я.С.¹, Мохов Т.Д.¹, Дивашук М.Г.¹

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

У сои (*Glycine max (L.) Merr.*) от реакции на относительные изменения светового дня и периода темноты во многом зависит переход от вегетативного роста растений к репродуктивной стадии. Реакцией на фотопериод в большинстве своем будут определяться сроки достижения растениями физиологической зрелости. Так как в зависимости от географического положения продолжительность дня варьирует, сою адаптировали для выращивания в определенных широтах. Только при выращивании сои в регионе оптимальной адаптации возможно достичь максимальной реализации потенциала урожайности [1].

На сегодняшний день большая часть исследователей выделяет 12 локусов – *E1-E11* и *J*, управляющих временем цветения и созревания у сои. Из них ген *E1* оказывает на инициацию цветения наиболее выраженное воздействие. Им кодируется бобово-специфичный транскрипционный фактор, содержащий *B3* домен, осуществляющий роль репрессора цветения [2].

Для гена *E1* идентифицировано 7 аллельных природных вариаций: *E1*, *e1-as*, *e1-fs*, *e1-nl*, *e1-b3a*, *e1-re*, *e1-p*. Аллель *e1-as* имеет единственную миссенс-мутацию, которая находится в области сигнала ядерной локализации. *e1-as* частично задерживает цветение. Три аллеля *e1-fs*, *e1-nl*, *e1-b3a* являются нефункциональными. *e1-nl* – нулевой аллель. Механизм влияния на цветение аллелей *e1-re* и *e1-p* в настоящее время не определен [3].

Мы изучили 464 образца из нашей коллекции сои на содержание аллелей *e1-as* и *e1-fs*. В 231 образце был определен аллель *e1-as*. В 7 образцах был обнаружен редкий аллель *e1-fs*. На данном этапе наши исследования продолжаются. В будущем они могут быть полезны при подборе пар для скрещивания и получения растений, способных произрастать в географических широтах в условиях длинного дня.

Список литературы:

1. Langewisch, T., Lenis, J., Jiang, G. L., Wang, D., Pantalone, V., & Bilyeu, K. (2017). The development and use of a molecular model for soybean maturity groups. *BMC Plant Biology*, 17, 1-13.
2. Федорина, Я. В., Хлесткина, Е. К., Сеферова, И. В., & Вишнякова, М. А. (2022). Молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе продвижения ареала возделывания сои к северу. *Экологическая генетика*, 20(1), 13-30.

3. Han, J., Guo, B., Guo, Y., Zhang, B., Wang, X., & Qiu, L. J. (2019). Creation of early flowering germplasm of soybean by CRISPR/Cas9 technology. *Frontiers in Plant science*, 10, 1446.

ПОИСК ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ ТРИТИКАЛЕ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ

Дудникова К.Ю.^{1,2}, Дудников М.В.¹

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва

2 – ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений» (ФГБНУ ФНЦБЗР)

E-mail: saenkok1997@yandex.ru

По сравнению с другими зерновыми, тритикале (пшенично-ржаной гибрид), относительно недавно получил хозяйственное значение и имеет ограниченный ареал распространения и поэтому не успел пройти длительную коэволюцию с внешними факторами. Однако тритикале за счёт своего гибридного происхождения имеет характерные особенности - высокий уровень урожайности зерна и зеленой массы, характерный для пшеницы, а также устойчивость к болезням, пришедшая от ржаного генома.

Несмотря на то, что в первые годы возделывания отмечался высокий уровень устойчивости тритикале, в последнее время всё чаще отмечаются случаи поражения тритикале грибными патогенами: мучнистой росой, листовой, желтой и стеблевой ржавчинами. Одним из наиболее агрессивных патогенов является – *Puccinia graminis*, возбудитель стеблевой ржавчины. В популяциях гриба появились новые расы, способные поражать, по крайней мере, некоторые генотипы тритикале. Таким образом, в центре внимания ученых оказалась селекция устойчивости тритикале к стеблевой ржавчине.

Среди коллекции озимой и яровой тритикале ФГБНУ ВНИИСБ, мы осуществляли поиск источников устойчивости тритикале к стеблевой ржавчине с использованием ПЦР-диагностики. Применение в исследовании SSR-маркеров на локусы, содержащие гены устойчивости к наиболее агрессивным патотипам, мы обнаружили генотипы, содержащие целевой фрагмент. В коллекции показано наличие ПЦР-фрагментов, ассоциированных с пшеничными генами устойчивости Sr9a (Xgwm47), Sr13 (Barc104-6A), Sr23 (Xwmc764), Sr26 (Sr26#43; BE518379), Sr38 (VENTRIUP-LN2) в сортах и селекционных линиях тритикале. ПЦР-продуктов, ассоциированных с генами Sr24 и Sr26, в коллекции выявлено не было.

СЕЛЕКЦИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ КАРТОФЕЛЯ В ТАДЖИКИСТАНЕ

Курбонали Партоев, Мавлон Курбонов, Алишер Наимов

Институт ботаники, физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан, Душанбе

E-mail: pkurbonali@mail.ru

В условиях Таджикистана картофель является ценной сельскохозяйственной культурой, а отрасль картофелеводства играет важную роль в обеспечении продовольственной безопасности страны. В связи с этим, Правительство республики

уделяет особое внимание дальнейшему развитию данной отрасли. Ученые Института ботаники, физиологии и генетики растений НАН Таджикистана в течение десяти последних лет при сотрудничестве с Международным центром картофелеводства (СИП, Перу), с Институтом садоводства и овощеводства Таджикской академии сельскохозяйственных наук, с Таджикским аграрным университете им. Ш. Шотемура путем использования традиционных методов селекции и современной биотехнологии создали перспективные гибриды и сорта картофеля. Материалом для проведения наших исследований послужили элитные и сортовые семенные клубни (I-II-ой семенной репродукции) различных сортов, гибридов и клонов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) коллекционного материала Института ботаники, физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан (ИБФиГР АН РТ), Института картофельного хозяйства Российской Федерации им. А.Г. Лорха, Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР) и селекционные материалы в виде пробирочных растений и гибридных семян F₁, полученных из Международного Центра Картофеля (СИП, Перу, 2005г.).

Экспериментальные работы по скрещиванию сортов картофеля и изучению селекционного материала проводились в течение 2005 - 2022 гг. в условиях высокогорья (Ляхшский район, на высоте более 2700 м над уровнем моря) и в условиях лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Института ботаники, физиологии и генетики растений НАН Таджикистана (840 м над уровнем моря). При выращивании гибридов картофеля использовалась общепринятая в горной зоне агротехника. В конце вегетации на основе визуальной оценки растений по признакам отсутствия поражения грибных, бактериальных и вирусных болезней на стеблях, листьях и клубнях, исследуя компактность гнезд, количество клубней, глубину глазков, размер столонов, окраску клубней, продуктивность кустов, легкость выделения клубней от столонов и другие признаки, провели клоновые отборы. Выделенные клоны среди популяции гибридов F₁, были изучены в F₁ S₁ (первое клубневое поколение или питомник изучения гибридов первого года) в сравнении с родительскими формами.

Для повышения эффективности селекционно-семеноводческой работы в будущем особая роль принадлежит комплексному сочетанию традиционных методов селекции картофеля с методами биотехнологии. Благодаря сочетания этих методов создан новый сорт картофеля «Таджикистан», который с гектра дает по 35-40 тонн урожая клубней, что это на 40-60% больше по сравнению со стандартный сорт - «Кардинал» и других сортов картофеля.

В экспериментах нами установлено, что частота полезных клоновых отборов среди популяции гибридов F₁ картофеля, составляет от 4.76 до 20%.

Определено что, между признаками количества клубней, массой одного клубня и продуктивности растений, существует положительная коррелятивная связь ($r=0.876$), а между количеством клубней на одно растение и массой одного клубня – отрицательна корреляция ($r= -0.673$). В настоящее время нами ведется селекционная доработка этих гибридов с целью использования их в скрещивании и передачи на Государственное сортоиспытание для оценки в разных зонах возделывания.

Нами изучались особенности роста, развития и продуктивность перспективных сортов картофеля в условиях высокогорья, которые получены посредством сочетания методов традиционной селекции и биотехнологии картофеля.

Новый сорт картофеля «Таджикистан» по сравнению с стандартный сорт – «Кардинал» является высокоурожайным (на 62.8%), а также и по сравнению с других сортов имеет высокую урожайность. Этот новый сорт картофеля сейчас в разных картофелеводческих хозяйствах республики выращивается на площади более 5000 га.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ У ГИБРИДОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, СОДЕРЖАЩИХ ЧУЖЕРОДНЫЕ ИНТРОГРЕССИИ

Логинова А.С.^{1,3}, Тимонова Е.М.^{1,2}, Баранцова М.А.^{1,4}, Леонова И.Н.^{1,3},
Салина Е.А.^{1,2}

*1 – Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
СО РАН (ФИЦ ИЦиГ СО РАН), Новосибирск 630090*

E-mail: loginovaas@bionet.nsc.ru

*2 – Курчатовский геномный центр Институт цитологии и генетики СО РАН
(КГЦ ИЦиГ СО РАН), Новосибирск 630090*

*3 – ФГБОУ ВО Новосибирский государственный аграрный
университет (ФГБОУ ВО НГАУ), Новосибирск 630039*

*4 – ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет (НГУ), Новосибирск 630090*

Один из подходов для сокращения сроков селекционного процесса – это использование удвоенных гаплоидов или дигаплоидов (ДГ). Однако для большинства сельскохозяйственных культур успех использования ДГ во многом зависит от разработки эффективного протокола индукции гаплоидов. В работах с мягкой пшеницей и ее гибридами чаще других используют метод культуры пыльников на основе андрогенеза *in vitro*, при котором растение развивается из незрелой гаплоидной микроспоры. Однако большое количество сортов проявляет низкую способность к андрогенезу *in vitro* (Lantos et al., 2013). Альтернативой является метод отдаленной гибридизации с последующей селективной элиминацией хромосом вида-опылителя. Данный метод прост в исполнении и является менее дорогостоящим по сравнению с культурой пыльников *in vitro*. К настоящему времени опубликовано очень мало работ, в которых проводится сравнение эффективности данных методических подходов получения ДГ. Целью работы было провести оценку результативности разных методов получения ДГ с использованием перспективных образцов мягкой пшеницы, устойчивых к грибным патогенам.

В работе были использованы гибриды мягкой пшеницы, содержащие в геноме чужеродные фрагменты генома с генами устойчивости к мучнистой росе и бурой ржавчине: 1) Велют 991 (поколение F3) с транслокацией от ржи *Secale cereale* L. (T1RS.1BL) и от *Aegilops speltoides* (T5BS.5BL-5SL); 2) 132-10 (F3) с транслокацией T1BL.1BS-3EL от *Thinopyrum elongatum*, 3) 282 (F4), содержащий хромосому 6Ai от *Th. intermedium*. Получение дигаплоидных линий в культуре пыльников *in vitro* проводилось согласно опубликованным данным (Тимонова и др., 2022). Эффективность андрогенеза оценивалась по числу эмбриоидов, альбиносных и зеленых растений на 100 пыльников. Получение гаплоидов методом отдаленной гибридизации выполнялось согласно протоколу (Devaux P., 2021) с небольшими изменениями. В качестве доноров пыльцы были использованы сладкие скороспелые сорта и гибриды F1 кукурузы: Детское лакомство, Птичье молоко, Ранняя лакомка, Сахарная королева, Тройная сладость, Хуторянка.

В результате культивирования *in vitro* пыльники всех генотипов образовывали эмбриоиды, а затем альбиносные и зеленые проростки, однако в целом способность к андрогенезу отличалась между линиями. Наиболее высокие показатели отмечены для гибридов Велют 991 и 132-10. Так, частота регенерации зеленых растений для них составила 8,6% и 4,9% соответственно. Значения показателей андрогенеза у гибрида 282 были значительно ниже, а частота регенерации зеленых растений составила всего 0,6%. Суммарно для всех гибридов в работу было взято 57 колосьев и получено 158 зеленых растений.

Эффективность индукции гаплоидов методом отдаленной гибридизации варьировала как в зависимости от генотипа материнского растения, так и от образца донора пыльцы. С наибольшей частотой зерна завязывались у гибридов Велют991и132-10, при этом частота завязывания зерен составила 50,9%и 44,2%соответственно.Для гибрида 282 частота завязывания зерен составила всего 12,6%. Процент образовавшихся зародышей в зависимости от количества опыленных цветков составил: 4,3 % для гибрида Велют 991, 4,6 % для гибрида 132-10 и 0 процентов для гибрида 282. Выход зеленых растений в зависимости от числа опыленных цветков 1,2 %; 1 % и 0 %для Велют 991, 132-10 и 282 соответственно. Лучшую способность стимулировать образование гаплоидных зародышей в зависимости от числа опыленных цветков проявили образцы кукурузы Детское лакомство, Тройная сладость и Птичье молоко:4,4%, 3,8% и 3,5%, что значительно ниже показателей полученных другими авторами согласно литературным данным. Суммарно для всех пшеничных гибридов пыльцой кукурузы был опылен 71 колос и получено 9 зеленых проростков.

Таким образом, более высокая частота формирования зерен и зародышей при опылении кукурузой показана для образцов Велют 991 и 132-10. Эти гибридные линии оказались также более отзывчивыми к андрогенному пути образования гаплоидов в культуре *in vitro*. Для гибрида 282 оба метода оказались неэффективными, что может свидетельствовать о влиянии генотипа реципиента. Полученные результаты также свидетельствуют, что метод андрогенеза *in vitro* в культуре пыльников является более эффективным при получении ДГ с использованием образцов пшеницы с чужеродными интрогрессиями.

Работа была поддержана Курчатовским Геномным Центром ИЦиГСОРАН (соглашение № 075–15–2019-1662).

Список литературы:

1. Lantos, C., Lehoczki-Krsjak, S. & Pauk, J. Induction of *in vitro* androgenesis in anther culture of recalcitrant einkorn (*Triticum monococcum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2022.150:417–426. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02293-6>.
2. Тимонова Е.М., Адонина И.Г., Салина Е.А. Изучение влияния чужеродных транслокаций на показатели андрогенеза *in vitro* у линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции.* 2022.183(1):127-134. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-1-127-134>.
3. Devaux P. Production of Wheat Doubled Haploids Through Intergeneric Hybridization with Maize. *Methods Mol Biol.* 2021. 2287:267-279. doi: 10.1007/978-1-0716-1315-3_14.PMID: 34270036.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛЮТЕНИНОВ У СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ РАЗЛИЧНОГО ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Москалев Е.А.¹, Груздев И.В.², Полховская Е.С.², Киров И.В.^{2,3}

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

E-mail: badsaxon@mail.ru

2 – ФГБНУ ВНИИСБ, Москва 127550,

3 – ФГБНУ МФТИ, Долгопрудный 141701

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – важнейшая продовольственная и кормовая сельскохозяйственная культура в мире. По данным ФАО в 2021 году пшеница возделывалась на площади 220,8 млн га, являясь лидером по этому показателю, а валовый

сбор составил 770,9 млн т при средней урожайности в 3,5 т/га (<http://faostat.fao.org/>). Высокая востребованность этой культуры связана с тем, что её зерно является основным сырьём для хлебопекарной промышленности. При этом ценность используемого для хлебопечения зерна зависит в первую очередь от качества и количества содержащегося в нем белка, и в особенности клейковины (Савельев, 2015). Клейковина (глютен) представляет из себя глиадин-глютениновый комплекс, важнейшим компонентом которого, благодаря способности формировать пептидную сеть, образуя межмолекулярные связи, являются высокомолекулярные субъединицы глютенинов (High Molecular Weight Glutenin Subunits, HMW-GS) (Shewry, Halford, 2002). Высокомолекулярные глютенины являются весьма полиморфным семейством запасных белков пшеницы. Известно, что они кодируются 3 локусами (*Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1*), расположенными на длинных плечах хромосом первой гомеологической группы мягкой пшеницы, сочетающей субгеномы А, В и D (Bietz et al., 1975). Обширным полиморфизмом запасных белков пшеницы, в особенности HMW-GS, в значительной мере объясняются различия в хлебопекарных качествах сортов со сходным содержанием белка. В связи с этим фокус селекции в последнее время сместился с повышения продуктивности растения на качественные характеристики зерна.

С целью обеспечения растущего населения достаточным количеством продовольствия высокого качества, а также повышения конкурентоспособности отечественных сортов на внутреннем и внешнем рынках, необходимо активно внедрять в селекционный процесс методики и инструменты, облегчающие отбор на ранних стадиях для выявления необходимых признаков и свойств сельскохозяйственных культур (Новосельская-Драгович, 2015). Оценка селекционного материала с помощью белковых маркеров позволяет достаточно быстро и качественно провести отбор интересующих исследователей признаков и контролировать их передачу от родительских форм потомкам (Paune, 1987). Однако электрофорез белков (SDS-PAGE) зачастую не позволяет достоверно идентифицировать некоторые HMW-GS ввиду их сходной подвижности в геле. Кроме того, электрофорез не дает информации о структуре генов и, тем более, об однонуклеотидном полиморфизме (single nucleotide polymorphism, SNP). Между тем, современные исследования показывают взаимосвязь между технологическими качествами и отдельными SNP, а не целыми субъединицами. Помимо этого, существуют аллели, чья степень экспрессии влияет на хлебопекарные качества ($Vx7^{OE}$), что может быть связано с последовательностью промоторной области гена (Ravel et al., 2020). В связи с этим, существует необходимость в новой высокопроизводительной методике, позволяющей решить данную проблему, и, дающей возможность отойти от старых слабоспецифичных ПЦР-маркеров (Anderson, Greene, 1989). Примером такой методики может выступать секвенирование полной последовательности гена путем прочтения его ампликонов на платформе ONT (Oxford Nanopore Technology) (Nazarenko et al., 2023), позволяющее получить исчерпывающую информацию о полиморфизме локусов, кодирующих HMW-GS, которую невозможно или трудно получить при стандартном методе SDS-PAGE.

В ходе исследования у 61 образца яровой мягкой пшеницы методом SDS-PAGE (Branlard et al., 2003) были идентифицированы следующие аллельные варианты: в локусе *Glu-1A* – *a* (субъединица 1), *b* (2*), *c* (null); в локусе *Glu-1B* – *b* (7+8), *c* (7+9), *f* (13+16), *h* (14+15), *i* (17+18); в локусе *Glu-1D* – *a* (2+12), *d* (5+10). В дальнейшем у 23 образцов из числа изученных проведено секвенирование ампликонов генов, кодирующих HMW-GS, на платформе ONT (Polkhovskaya et al., 2023). На основе данных нанопорового секвенирования у изучаемых образцов были выявлены идентифицированные ранее методом SDS-PAGE аллели локусов *Glu-1*, однако при детальном анализе прочтений амплифицированных последовательностей у некоторых образцов обнаружены делеции в гене, кодирующем субъединицу *Vx7*, а также SNP в гене, кодирующем субъединицу *Ax1*, которые потенциально могут быть связаны с иным, нежели у обычных субъединиц *Vx7* и *Ax1* влиянием, на хлебопекарные качества.

Исследование проведено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Госзадание № FGUM-2022-0005).

Список литературы:

1. Anderson O.D., Greene F.C. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1989. – Т. 77. – С. 689-700.
2. Payne P. I. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1987. – Т. 40. – №. 1. – С. 51-65.
3. Ravel C. et al. SNP markers for early identification of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GSs) in bread wheat // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2020. – Т. 133. – С. 751-770.
4. The Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations [Электронный ресурс] // URL: <https://www.fao.org/faostat/ru/#data/QCL>.
5. Новосельская-Драгович А.Ю. Генетика и геномика пшеницы: запасные белки, экологическая пластичность и иммунитет // *Генетика*. – 2015. – Т. 51. – №. 5. – С. 568-568.
6. Савельев, В.А. Яровая пшеница : монография / В. А. Савельев. — Курган : КГСХА им. Т.С.Мальцева, 2015. — 230 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/159251>.
7. Polkhovskaya E. Nanopore Amplicon Sequencing allows rapid identification of Glutenin allelic variants in a wheat collection/ E. Polkovskaya, I. Gruzdev, , E. Moskalev, Anna Bolotina, I. Kirov // *Agronomy*. – 2023. (in print).
8. Bietz J.A. Single-kernel analysis of glutenin: Use in wheat genetics and breeding. / J.A. Bietz, K.W. Shepherd, J. S. Wall // *Cereal Chem*. – 1975. – 52. – P.513-532.
9. Shewry P.R. Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization / P.R. Shewry, N.G. Halford // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2002. – 53. – P. 947–958.
10. Branlard G. Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.) /G.Branlard, M. Dardevet, N.Amiour, G. Igrejas// *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 2003. – V. 50. –P. 669-679.
11. Nazarenko M. S. Calling and Phasing of Single-Nucleotide and Structural Variants of the LDLR Gene Using Oxford Nanopore MinION/ M.S. Nazarenko, A.A. Sleptcov, A.A.Zarubin, R.R.Salakhov, A.I. Shevchenko, N.A. Tmoyan, I. S. Zakharova//*International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Т. 24. – №. 5. – С. 4471.

РАЗРАБОТКА KASP-МАРКЕРА НА ПОЛИМОРФИЗМ В ГЕНЕ PARG-2A У *TRÍTICUM AESTÍVUM*

**Мохов Т.Д.¹, Кочешкова А.А.¹, Баженов М.С.¹, Меглицкая Я.С.¹,
Архипов А.В.¹**

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

Снижение темпов роста урожая продовольственных культур и значительный рост мирового населения создает необходимость нового прорыва в производстве пшеницы. И в первую очередь появления на рынке новых сверхпродуктивных сортов, устойчивых к абиотическим стрессам в условиях изменяющегося климата. Для этого необходимо производить поиск и внедрение в селекционные программы новых генов, в том числе оказывающих комплексный положительный эффект на рост, качество и урожайность. К

таким генам можно отнести транскрипционные факторы, оказывающие плеiotропный эффект на хозяйственно ценные признаки [1].

Семейство транскрипционных факторов AP2/EREBP (этилен-чувствительные элементысвязывающие белки) играют важную роль в росте и развитии растений. Предыдущие исследования показали, что члены подсемейства APETALA2 (AP2) имеют значительное влияние на контроль процессов развития цветков и семян. У арабидопсиса AP2 также участвует в определении размера семян и их веса, а также накоплении в них белка [2]. Современные биотехнологические методы, основанные на использовании молекулярных маркеров в селекции растений, позволяют получить значительные результаты, как в исследованиях генетического разнообразия, так и в практически значимых исследованиях генов, контролирующих хозяйственно-значимые признаки. Одной из наиболее эффективных технологий являются KASP-маркеры (Competitive Allele Specific PCR).

Нами был разработан молекулярный KASP-маркер на плеiotропный ген TaPARG-2A, с целью изучения коллекций мягкой пшеницы и тритикале и аллельное состояние этого гена.

Мы исследовали коллекцию мягкой пшеницы, состоящую из 202 образцов Российской и зарубежной селекции, и коллекцию тритикале, состоящую из 81 образца.

На диагностические полиморфные сайты были разработаны праймеры KASP, отвечающие всем требованиям KASP-анализа. К аллель-специфическим праймерам присоединяются стандартные «хвосты» для флуорофоров FAM и HEX. Целевой однонуклеотидный полиморфизм располагается на 3'-конце.

Также была секвенирована нуклеотидная последовательность гена TaPARG-2A у 10 сортов мягкой пшеницы различного географического происхождения. Был выявлен ряд не значимых полиморфизмов с использованием методов биоинформатического анализа. Однако при этом были выявлены полиморфизмы в втором экзоне гена TaPARG-2A. У референсных последовательностей пшениц из базы данных IWGSC RefSeq1.0 (<https://www.wheatgenome.org/>) был детектирован однонуклеотидный полиморфизм во 2-ом экзоне с.793C>T. Этот SNP приводит к замене аминокислоты гистидина на уроцил р.(H265Y) у двух сортов Norin61 и Chinese Spring. При этом вариант белка у сорта Chinese Spring по прогнозу PROVEAN нефункционален (PROVEAN score = -4.749).

На данный полиморфизм с.793C>T был разработан KASP-маркер. В качестве праймеров подобраны следующие нуклеотидные последовательности: TaPARG-2A-A 5'-cctggtgacgccacggtA -3'; TaPARG-2A-B 5'-cctggtgacgccacggtG -3'; TaPARG-2A-Common 5'-gcaagtcacatcgacacgttc -3'. Длина ампликона была 56 п.н. Обратные праймеры TaPARG-2A-A и TaPARG-2A-B специфичны А-субгеному мягкой пшеницы, общий прямой праймер не специфичен для субгенома А и амплифицируется со всех трех субгеномов мягкой пшеницы.

После апробации на разработанный KASP-маркер были проанализированы коллекции мягкой пшеницы и тритикале, включающие сорта российской селекции. Среди 202 сортов выявлен единственный сорт, несущий аллель «С»: сорт Ермак. Процент встречаемости в анализируемой коллекции мягкой пшеницы составляет всего 0,5%. В анализируемой коллекции тритикале также был выявлен единственный селекционный образец 0-113t12, несущий редкий аллель «С», что составляет 1,2% коллекции.

Сорт Ермак, несущий аллель «С», является высокопродуктивным сортом с урожайностью от 76 до 105 ц/га и высокой массой 1000 семян – 42-46 г. При этом сорт обладает высокой зимостойкостью, высокой засухоустойчивостью, устойчивостью к полеганию. Это делает его перспективным для использования в селекционных программах.

Экспрессия гена PARG у риса была связана с уменьшением высоты растения, снижением скорости завязывания семян и уменьшению массы 1000 зерен, но приводила к увеличению кущения. Поскольку вариант белка аллеля «С» приводит к потере

функциональности гена, это может предотвратить негативное влияния на хозяйственно-ценные признаки. Что, в свою очередь, может являться причиной высокой продуктивности сорта Ермак, в комплексе с положительным влиянием других хозяйственно-значимых генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №21-76-00043.

Список литературы:

1. Baillo E. H. et al. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement //Genes. – 2019. – Т. 10. – №. 10. – С. 771.
2. Jofuku K. D. et al. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene APETALA2 //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – Т. 102. – №. 8. – С. 3117-3122.
3. Xu Z. S. et al. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement F //Journal of integrative plant biology. – 2011. – Т. 53. – №. 7. – С. 570-585.
4. Li B. et al. Two novel AP2/EREBP transcription factor genes TaPARG have pleiotropic functions on plant architecture and yield-related traits in common wheat //Frontiers in Plant Science. – 2016. – Т. 7. – С. 1191.
5. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi // Plant Molecular Biology Manual. – Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. – Pp. 183–190

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АЛЛЕЛЕЙ *PPD* И *VRN* У ЛИНИЙ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ НЕСТАНДАРТНУЮ ОТВЕТНУЮ РЕАКЦИЮ НА УСЛОВИЯ ЯРОВИЗАЦИИ И КОРОТКИЙ ФОТОПЕРИОД

Муратов Т.Р.^{1,2}, Алкубеси М.^{1,2}, Черноок А.Г.¹, Митронова А.Д.^{1,2}, Блинков А. О.¹, Беспалова Л.А.³, Пузырная О.Ю.³, Агаева Е.В.³, Дивашук М.Г.¹

- 1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550;**
2 – ФГБОУ Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К. А. Тимирязева (РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева), Москва 127434
3 – ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко» (НЦЗ Им. П.П. Лукьяненко), Краснодар 350012
E-mail: temur-muratov@mail.ru

Одними из основных групп генов, детерминирующих время цветения злаков, выступают *Vrn* (vernalization response) и *Ppd* (photoperiod response), регулирующие реакцию растения на яровизацию и длину светового дня. Данные аллели оказывают наибольшее влияние на продолжительность вегетационного периода, тип развития, зимо- и морозостойкость, урожайность злаков. Посредством изменения числа копий генов *Vrn* или комбинирования друг с другом различных аллелей *Vrn* и *Ppd* можно манипулировать длиной вегетационного периода растений [1].

В условиях Краснодарского края были обнаружены линии озимой мягкой пшеницы Д-471 Супербаш 6-23 и Д-208 Супербаш, проявляющие нестандартную для озимой пшеницы ответную реакцию на яровизацию и фотопериод. Данные линии часто не выколашиваются в течение всего периода вегетации и вместо кущения, что обычно проявляется у пшеницы при недостатке яровизации или коротком световом дне, у данных линий проявлялась гибель. Нами была поставлена *цель* изучения работы генов *Vrn* и *Ppd* у линий мягкой пшеницы д.208 Супербаш и д.471 Супербаш в условиях искусственного климата.

В искусственных климатических условиях яровизационной камеры (Климбиотех, Россия) были созданы условия, различающиеся по: продолжительности периода яровизации (25 и 65 дней), а также фотопериоду при яровизации (10 часов день/14 часов ночь и 18 часов день/6 часов ночь). Для всех перечисленных условий температуру яровизации поддерживали 4-5°C. Выращивание растений после яровизации проводили в климатических камерах Fitotron SGC 120 (Weiss Technik, Нидерланды) при температуре 22°C. Для имитации короткого и длинного дня в период вегетации использовали различные режимы фотопериода (10 часов день/14 часов ночь и 18 часов день/6 часов ночь). В качестве контрольных генотипов использовали озимый чувствительный к фотопериоду сорт Алтиго (*Ppd-D1b, vrn-D1, vrn-B1, vrn-A1*) и озимый нечувствительный к фотопериоду сорт Гром (*Ppd-D1a, vrn-D1, vrn-B1, vrn-A1*). В качестве изучаемых линий были Д-471 Супербаш 6-23 и Д-208 Супербаш (*Ppd-D1b, vrn-A1*).

Генотипы, используемые нами в качестве контрольных, проявляли себя согласно своему аллельному составу генов *Vrn* и *Ppd*. После прохождения яровизации у чувствительного к фотопериоду сорту Алтиго наблюдалось раннее и дружное колошение и цветение только во время выращивания его при фотопериоде 18 часов день/6 часов ночь. Различные условия яровизации не проявили значительного влияния на генотип. У нечувствительного к фотопериоду сорта Гром раннее и дружное колошение наблюдалось исключительно в условиях длительной яровизации (65 суток) и одинаково быстро на длинном и коротком фотопериоде. Для данного сорта фотопериод во время яровизации не оказывал значительного влияния.

В сравнении с чувствительным к фотопериоду сортом Алтиго и нечувствительным к фотопериоду сортом Гром, линии Д-471 Супербаш 6-23 и Д-208 Супербаш демонстрировали чувствительность к фотопериоду аналогичную сорту Алтиго. Однако, чувствительность к фотопериоду линий Д-471, Д-208 можно было бы назвать «сверхчувствительность»- у линий полностью отсутствовало цветение при коротком фотопериоде вегетации или было очень недружным. Фотопериод при яровизации не оказывал на данные линии значительного влияния, однако данные линии проявили себя склонными к длительной яровизации (65 дней).

Согласно полученным результатам линии Д-471 Супербаш 6-23 и Д-208 Супербаш предположительно имеют новые и неизученные аллели гена *Ppd*. Данный аллель может играть определённое значение в селекционной практике.

Список литературы:

1. Kamran A., Iqbal M., Spaner D. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. 2014. 197:1-26.

АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛЮТЕНИНОВ В СВЯЗИ С КАЧЕСТВАМИ ЗЕРНА ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Наджодов Б.Б.¹, Рубец В.С.¹, Пылнев В.В.¹, Груздев И.В.²

1 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - Московская сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева» (РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева), Москва

**2 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва
E-mail: boburnajodov@gmail.com**

Пшеница – хлебная культура (Bhullar et al. 2009), один из важных пищевых злаков, используемый для производства хлеба (Wieser et al. 2006; Koehle et al. 2013) и является наиболее широко возделываемых культур, играет очень важную роль для обеспечения продовольственной безопасности во всем мире. Тенденция снижения высококачественного зерна пшеницы во всем мире открывает широкие перспективы (Чебатарева и др. 2022).

Качество зерна пшеницы является решающим фактором, определяющим его полезность в различных продуктах питания, особенно в хлебопекарной промышленности.

Качественная оценка зерна яровой мягкой пшеницы характеризуется рядом биохимических, физических и технологических показателей. Определение всех показателей существенно увеличивает объем биохимических и технологических анализов, и зачастую их проведение не всегда целесообразно. (Methodology of state 1988).

Высокомолекулярные глютеины (HMW-GS), находящиеся в зерне пшеницы, представляют собой ключевой компонент, оказывающий значительное воздействие на свойства теста и качество пшеничной муки. Аллельное разнообразие HMW-GS, закодированных генами на длинном плече хромосомы группы 1, имеет выдающееся значение для формирования хлебопекарных характеристик пшеничного продукта. Ряд исследований подтверждает, что определенные аллели HMW-GS ассоциируются с улучшением хлебопекарного качества, включая более прочное тесто, улучшенную эластичность, растяжимость и водопоглощение.

В данной работе проведена идентификация высокомолекулярных субъединиц глютеинов, используя различные сорта и линии яровой пшеницы. Выбор этих образцов был обоснован необходимостью определения ранее не установленных показателей, которые могли бы косвенно влиять на хлебопекарные характеристики. Для дальнейшего анализа образцы были запечены в лабораторных условиях.

Целью исследования было выявление высокомолекулярных субъединиц глютеинов у различных видов и сортов яровой пшеницы, которые ранее не имели установленных показателей, влияющих косвенно на качество выпечки.

Методика исследуемые образцы подверглись лабораторным хлебопекарным оценкам по качеству. Зерно после очистки размалывали на лабораторной мельнице «Квадрумат Юниор» фирмы «Брабендер» (Наждодов, 2022).

Пробную лабораторную выпечку после месячной отлежки по модифицированной методике государственного сортоиспытания (Беркутова, 1992; Методика..., 1988).

Высокомолекулярные субъединицы глютеинов извлекались по модифицированному протоколу, анализ проводился на 5-50 зернах; электрофорез выполнялся на полиакриламидных гелях (20×18,3×0,1 см) с использованием SDS-PAGE в вертикальной электрофорезной камере PROTEAN® II xi, применяя трис-глициновый электродный буфер. Процесс электрофореза продолжался 19,5 часов при силе тока 16 мА, с концентрацией T=5%/C=2,67% и T=12,8%/C=0,99%. Гели фиксировались в уксусном спирте, окрашивались в Coomassie Brilliant Blue R-250 и проводилась идентификация высокомолекулярных глютеинов на основе молекулярной массы и подвижности, сравнивая их с глютеинами сортов яровой пшеницы China Spring (AxN/Vx7+Vy8/Dx2+Dy12) и Лада (Ax1/Vx7+Vy9/Dx5+Dy10).

Выводы данного исследования подчеркивают, что у многих изученных линий яровой пшеницы обладают потенциалом для формирования высококачественных хлебопекарных качество, особенно среди линий мексиканской коллекции №59 и №67.

Анализ генетических формул высокомолекулярных глютеинов позволяет установить, что различные линии, такие как Лисий Хвост, Линия №23, 57 и №59 яровой мягкой пшеницы, имеют наивысший показатель качества (10 баллов) в спектре высокомолекулярных глютеинов, что делает их потенциально перспективными для дальнейшей селекции и использования.

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. Bhullar, N. K., Street, K., Mackay, M., Yahiaoui, N., & Keller, B. (2009). Unlocking wheat genetic resources for the molecular identification of previously undescribed functional alleles at the Pm3 resistance locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (23), 9519–9524.
2. Wieser H., Bushuk W., MacRitchie F. The polymeric glutenins // Gliadin and Glutenin: the Unique Balance of Wheat Quality / Eds Wrigley C., Bekes F., Bushuk W. AACC Intern. St. Paul, 2006. P. 213–240
3. Koehler, P., Wieser, H. (2013). Chemistry of Cereal Grains. In: Gobbetti, M., Gänzle, M. (eds) *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, New York, NY.
4. Чебатарева, М. В. Роль аллельного состояния высокомолекулярных глютелинов мягкой пшеницы в улучшении качественных показателей её зерна / М. В. Чебатарева, С. Б. Лепехов // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2022. – № 5(211). – С. 10-15.
5. Наджодов, Б. Б. Оценка хлебопекарных качеств коллекции яровой пшеницы 2021 года в условиях ЦРНЗ / Б. Б. Наджодов // Материалы X Международной научно-практической онлайн-конференции, Тюмень 2022. – С. 22-27.

СВЯЗЬ ПРИЗНАКОВ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ И ЗДОРОВЬЯ ГОЛШТИНСКОГО СКОТА С ГЕНАМИ ASS1, SMC2, UMPS

Пиметьев В.О., Шатохин К.С., Камалдинов Е.В., Петров А.Ф.

***ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет»,
Россия, Новосибирск 630039
E-mail: vlad.pimetev@mail.ru***

Идентификация конкретных локусов моногенных заболеваний и их возможная роль в изменчивости признаков отбора остается непростой задачей. Известно, что моногенные заболевания, проявляющиеся у животных с высокой степенью гомозиготности часто бывают нежизнеспособными либо имеют более низкий уровень продуктивности по сравнению со здоровыми [1,4]. Обнаружение таких носителей позволяет скорректировать схему подбора родительских пар и оздоровить стадо, создав основу для дальнейшего разведения [2]. Аутосомно-рецессивное летальное генетическое заболевание характеризуется высоким уровнем аммиака в крови сцеплено с геном ASS1 [3]. SMC2 принимает участие в поддержании структуры хромосом. Гомозиготные особи показывают сниженную способность гидролизировать АТФ. Конечным результатом является образование дисфункциональных комплексов конденсина и структурной аномалии хромосом [6]. Недостаточность уридинмонофосфатсинтазы (DUMPS) – это ещё одно специфичное для скота заболевание, имеющее генетическую основу. Это заболевание представляет собой нарушение выработки уридинмонофосфатсинтазы (UMPS) – фермента, ответственного за превращение оротовой кислоты в уридинмонофосфат (UMP), который является важным компонентом пиримидиновых нуклеотидов [5]. Объекты и методы исследования. Объектом исследования выступали гены, связанные с рядом моногенных заболеваний. Предметом исследования послужили гены ASS1, SMC2, UMPS.

Лабораторные исследования проводились с использованием чипов высокой плотности Illumina BovineSNP50 v3 BeadChip в ООО «Мираторг-Генетика» (г. Москва). Данные о продуктивности и состоянии здоровья животных были получены из верифицированных баз данных предприятий Новосибирской области. Анализ данных проводили с помощью языка статистического программирования R.

Результаты и обсуждения. Проведено генотипирование 100 голов голштинской породы (53218 SNP). Проанализированы следующие признаки, связанные с молочной продуктивностью и репродуктивными качествами: белок за всю лактацию (%), белок за 305 дней (%), белок за всю лактацию (кг), удой за 305 дней (кг), жир за 305 дней (%), жир за 305 дней (кг), межотельный период, дойные дни, сухостойный период, сервис период.

Гены: ASS1, SMC2, UMPS продемонстрировали 34 важных генетических вариаций, которые оказали влияние на количественные и качественные признаки. Обнаружена связь с признаками (белок за всю лактацию (кг), белок за 305 дней (%), дойные дни, сервис период) в разных лактациях. ASS1 оказался связан с содержанием молочного белка за всю лактацию во второй лактации ($\alpha = 0,0455$), а также с дойными днями во второй и третьей лактации ($\alpha = 0,0333$ и $\alpha = 0,0081$ соответственно). Ген SMC2 предположительно был ассоциирован с белком за 305 дней второй лактации ($\alpha = 0,0374$), а также с дойными днями. По третьей лактации также картина наблюдалась по гену SMC2 ($\alpha = 0,0059$). Предварительный анализ также позволил выявить ряд ассоциаций с такими количественными признаками, как: белок за 305 дней второй лактации ($\alpha = 0,0331$), дойные дни третьей лактации ($\alpha = 0,0365$), и сервис период второй лактации ($\alpha = 0,0274$) оказал ген UMPS. Вывод. В ходе исследования обнаружена значимая роль моногенных заболеваний, которая на молекулярном уровне способна воздействовать на полезные для селекции признаки. Мониторинг аутосомно-рецессивных генетических заболеваний, отрицательно оказывающих влияние, на здоровье и продуктивность позволит сохранить здоровое стадо.

Список литературы:

1. CHEN Y. et al. Exploration of Key Functional Genes Affecting Milk Production Traits in Dairy Cattle Based on RNA-seq // *Biotechnology Bulletin*. – 2020. – Т. 36. – №. 9. – С. 244.
2. Citek J. et al. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic // *Vet Med*. – 2006. – Т. 51. – №. 6. – С. 333-339.
3. Dennis J. A. et al. Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1989. – Т. 86. – №. 20. – С. 7947-7951.
4. Djari, A., Esquerré, D., Weiss, B. et al. Gene-based single nucleotide polymorphism discovery in bovine muscle using next-generation transcriptomic sequencing. *BMC Genomics* 14, 307 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-307>
5. Gozdek M. et al. Report on the incidence of hereditary disorders (BLAD, DUMPS) in the Polish population of Holstein-Friesian cattle // *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*. – 2020. – Т. 19. – №. 3. – С. 15-22.
6. Ussenbekov Y. et al. Identification of monomorphic and polymorphic genes associated with recessive fertility defects in Holstein cows reared in Kazakhstan // *Veterinarski arhiv*. – 2022. – Т. 92. – №. 1. – С. 27-35.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА НЕКРАХМАЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ ТРИТИКАЛЕ ПРИ ОЦЕНКЕ КРАХМАЛИСТОСТИ ЗЕРНА

Семенова А.В.^{1,2}, Соловьев А.А.^{3,1}

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550;

E-mail: semnast97@mail.ru

2 – Всероссийский научно-исследовательский институт крахмала и переработки крахмалсодержащего сырья – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха» (ВНИИК – филиал ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»), Московская обл. 140051

3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), Московская обл. 140150

Зерно тритикале содержит внушительное количество слизистых веществ (в среднем 2...8 % массы зерна), главным образом, пентозанов. Слизи представляют собой некрахмальные полисахариды, в большинстве случаев растворимые в воде. Подвергаясь гидролизу, они разлагаются до пентоз – арабинозы и ксилозы – то есть до простых сахаров. Олигосахариды тритикале представлены мальтотриозами, мальтотетраозами, мальтопентаозами, трифруктозаном. Такую особенность важно учитывать в технологии получения крахмала, так как эти вещества оказывают влияние на эффективность извлечения конечного продукта, а также могут искажать точность показателей при оценке крахмалистости зерна. Снизить степень влияния слизей и увеличить выход крахмала из зерна стало возможным благодаря применению ферментов, разделению водно-мучной суспензии на фракции, а также очистке суспензии от водорастворимых и взвешенных частиц [1, 2].

Установлено, что ферментные препараты целлюлолитического действия интенсифицируют экстракцию растворимых веществ из зерна тритикале и способствуют активному разжижению зерновой пульпы. Эффект продемонстрировали следующие ФП: Viscoferm (Эндо-1,4-β-D-глюканаза; эндо-1,3-β-D-глюканаза; эндо-1,4-β-D-ксиланаза; целлюлаза), Distizum GL (Эндо-1,4-β-D-маннаназа; эндо-1,4-β-D-ксиланаза; эндо-1,3-β-D-ксиланаза; экзо-1,4-β-D-ксиланаза; экзо-1,3-β-D-ксиланаза; термостойкая β-глюканаза), Optimash TBG (Эндо-1,4-β-D-глюканаза; эндо-1,3-β-D-глюканаза) и Optimash VR (Экзо-1,4-β-D-ксиланаза; эндо-1,4-β-D-ксиланаза; целлюлаза). При этом лучшие результаты по повышению выхода растворимых веществ из зерна и разжижению дробленой зерновой пульпы установлены при следующих концентрациях ФП: Viscoferm – 300–400 г/т; Distizum GL – 75–100 г/т; Optimash TBG – 50–100 г/т; Optimash VR – 75–100 г/т. Также на примере ФП Distizum GL и Viscoferm выявлен синергизм действия при использовании двух целлюлолитических ФП. Это указывает на возможность комплексного использования целлюлолитических ФП.

Для оценки массовой доли крахмала в зерновых культурах, как правило, используется метод Эверса [3]. Анализ по данному методу основан на измерении оптического угла вращения плоскости поляризации света продуктами кислотного гидролиза крахмала. На показатели по методу Эверса также влияют и растворимые простые сахара, содержащиеся в зерне. Для их идентификации анализ проводится с поправкой на растворимые углеводы. Однако помимо крахмала гидролизу подвергаются также другие полисахариды. В связи с этим, необходимо исследование подходов к

определению истинного содержания крахмала в зерновых культурах с высоким содержанием некрахмальных полисахаридов.

Оценена эффективность предварительной очистки цельносмолотой муки тритикале от пентозанов с помощью целлюлолитических ФП. В основе способа также лежит механизм гидролиза [4] некрахмальных полисахаридов. Эксперимент проводили на образце тритикале Тимирязевская 42 [5], с использованием ферментного препарата Optimash TBG [6], способствующего расщеплению некрахмальных полисахаридов оболочек зерна.

Для этого в исходном образце цельносмолотой муки тритикале определяли общее содержание углеводов методом Эверса ($70,3 \pm 0,6\%$) с поправкой на растворимые углеводы ($67,9 \pm 0,6\%$). Затем среднюю пробу цельносмолотой муки смешивали с дистиллированной водой (гидромодуль 2). Полученную суспензию подкисляли раствором серной кислоты до $\text{pH}=5,4$. Добавляли ферментный препарат Optimash TBG из расчета 200 г фермента на 1 т суспензии. Проводили термостатирование полученной суспензии в течение 3 часов при температуре 40°C при периодическом перемешивании. Далее смесь центрифугировали в течение 15 мин при 4000 мин^{-1} . Весь осадок без потерь собирали, высушивали и затем измельчали. По йодной пробе проконтролировали отсутствие мелких зерен крахмала в супернатанте.

В полученной после очистки муке (влажность муки составила $6,07 \pm 0,3\%$) также определяли общее содержание углеводов методом Эверса с поправкой на растворимые углеводы. По разнице между показателями находили содержание крахмала в зерне тритикале.

Обработка цельносмолотой муки ферментным препаратом целлюлолитического действия не повлияла на значение общего содержания углеводов в зерне, полученное методом Эверса: $70,3 \pm 0,6\%$ СВ. Однако массовая доля растворимых углеводов существенно возросла по сравнению с исходным их содержанием в зерне: с $2,39 \pm 0,1\%$ СВ до $5,44 \pm 0,2\%$ СВ. Это объясняется ферментативным расщеплением некрахмальных полисахаридов до простых сахаров. В связи с этим, истинное содержание крахмала снижалось на 3 % по сравнению с предполагаемым (с $67,9\%$ до $64,9\%$).

Таким образом, принцип ферментативного расщепления некрахмальных полисахаридов может быть использован как для повышения выхода крахмала из зерна тритикале, так и для более точного определения истинного содержания крахмала в зерне.

Список литературы:

1. Андреев Н.Р., Костенко В.Г., Кривцун Л.В., Носовская Л.П., Адикаева Л.В. Исследование процесса переработки зерна тритикале как сырья для производства крахмала и крахмалопродуктов. Инновационные технологии производства и хранения материальных ценностей для государственных нужд. 2015. 4: 7–23.
2. Гильмуллина Л.Ф., Пономарева М.Л., Пономарев С.Н., Маннапова Г.С. Методы качественного и количественного определения арабиноксиланов в зерне злаков (обзор). Химия растительного сырья. 2021. 1: 27–43. DOI: [10.14258/jcprm.2021017713](https://doi.org/10.14258/jcprm.2021017713)
3. ГОСТ 10845-98 «Зерно и продукты его переработки. Метод определения крахмала».
4. Santos J., Moreira L., Ferreira Filho E. Cellulose-degrading enzymes: key players in biorefinery development. Biologia. 2022. DOI: [10.1007/s11756-022-01274-6](https://doi.org/10.1007/s11756-022-01274-6)
5. Щуклина О.А., Соловьёв А.А., Полховская Е.С., Квитко В.Е., Клименкова И.Н., Завгородний С.В. Тимирязевская 42 – новый сорт яровой тритикале (*×Triticosecale* Wittm. ex. Camus). Кормопроизводство. 2021. 8: 43–46. DOI: [10.25685/krm.2021.8.2021.008](https://doi.org/10.25685/krm.2021.8.2021.008)
6. Liu X., Unaegbunam E., Stuart D.T. Co-Production of Isobutanol and Ethanol from Prairie Grain Starch Using Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation. 2021. 7(3): 150. DOI: [10.3390/fermentation7030150](https://doi.org/10.3390/fermentation7030150)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ ПРИ СОЗДАНИИ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА КУКУРУЗЫ РАЗНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Сотченко Д.Ю., Сотченко Дм.Ю., Таов А.А.

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт кукурузы» (ФГБНУ ВНИИ кукурузы), 357502, Ставропольский край, Пятигорск, ул. Ермолова, д. 14-а
E-mail: d.sotchenko@vniikukuruzy.ru*

Кукуруза – одна из важнейших сельскохозяйственных культур, занимающая третье место в мире по посевным площадям после пшеницы и риса. Уникальность кукурузы заключается в разностороннем направлении использования зерна и листостебельной массы.

Зерно используется для пищевых, кормовых и технических целей. В пищевой промышленности кукурузное зерно является сырьём для производства круп, муки, масла, крахмала, спирта. Зерно сахарной кукурузы употребляется в пищу в варёном и консервированном виде.

Кукурузу также можно считать технической культурой, поскольку её зерно можно использовать в технических целях. Кукурузный крахмал используется в бумажной, химической и фармацевтической промышленности. Доля кукурузы в мировом производстве крахмала составляет около 75%.

Зерно кукурузы обладает высокими кормовыми качествами. Как высокоэнергетический корм, кукурузное зерно подходит для кормления всех видов животных и птицы – это неотъемлемая часть комбикорма. Кукуруза является лучшей злаковой культурой на силос, так как она имеет благоприятное соотношение питательных веществ и хорошо силосуется.

Кукуруза имеет большое агрономическое и экологическое значение. При выращивании на зерно, она является хорошим предшественником для многих культур, раннеспелые гибриды хорошо подойдут для озимой пшеницы. Раннеспелую кукурузу можно с успехом выращивать на зерно в поукосных посевах, а также использовать как страховую культуру для пересева весной-летом в случае гибели озимых и яровых культур.

Интенсивное внедрение гетерозисных гибридов в промышленное семеноводство с середины 20-го века способствовало массовому созданию инбредных линий во всём мире. В конце 20-го века началось распространение метода гаплоиндукции с целью массового получения дигаплоидных линий кукурузы по всему миру и в том числе в Российской Федерации [1]. Гаплоиндукторы кукурузы – это специализированные линии, обладающие повышенной пыльцевой способностью, которые в результате гибридизации с диплоидным растением способствует развитию гаплоидного генотипа будущих дигаплоидных линий кукурузы, а также формирует гибридные зерновки на початке. Частота образования гаплоидных зёрен на гибридных початках зависит от гаплоиндуцирующей способности используемого гаплоиндуктора, генотипа материнского растения (донора) и условий внешней среды. Гаплоидность конкретного зерна на початке определяется визуально по специфическим доминантным маркерным генам, действие которых, чаще всего проявляются в виде антоциановой окраски зерна, зародыша, проростков, стебля, листьев, рылец на початке, метёлки и некоторых частей растения. Наиболее распространёнными генами, используемыми в современных гаплоиндукторах кукурузы, являются гены, локализованные в районах *qhirl*, *qhirl1*, *qhirl2* хромосомы 1 кукурузы [2], в сочетании с геном-маркером *R1-nj* антоциановой окраски зерновки зародыша, а также генами *A1* и *B1*, определяющими антоциановую окраску растения. Следует отметить, что экспрессия цветового маркера окраски *R1-nj* может существенно варьироваться в зависимости от

генетического фона материнской линии, использованной для гибридизации, генотипа гаплоиндуктора, а также факторов окружающей среды [3].

В ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» созданы гаплоиндукторы ЗМК (зародышевый маркер краснодарский) и их модификации (ЗМК-1У, ЗМК-3, ЗМК-5) на основе маркерных генов окраски зерновки *R1-nj*, характеризующихся высокой частотой гаплоиндукции (10-15%) [4].

С 2022 г. в лаборатории селекционно-генетических исследований по кукурузе ФГБНУ ВНИИ кукурузы ведутся работы по созданию новых линий кукурузы методом гаплоидии. По договору о научно-техническом сотрудничестве с ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» с использованием технологии получения матроклинных гаплоидов кукурузы [5] и генетического маркирования, предложенную S. Chase [6]. В трёх гибридных комбинациях получено 23 маркированных початка, на которых выделили 855 маркированных зерновки (с окрашенным зародышем и алейроном, с окрашенным зародышем и неокрашенным алейроном, с неокрашенным зародышем и алейроном и с неокрашенным зародышем и окрашенным алейроном), которые являются предполагаемыми гаплоидами. Такие зерна были высеяны на селекционном поле в 2023 г., а диплоидные растения удалили. Результаты значения истинной частоты варьировали в районе 18-20%. Высейные предположительные гаплоиды (313 растений) в фазе 2–3 листьев подверглись инъекции раствором колхицина 0,125% по методике, разработанной в КНИИСХ. Цветущие растения инцухтировались, полученные зерновки с дигаплоидных растений будут высеяны в 2024 г.

Оценить полученные растения-регенеранты на уровень плоидности – крайне важный этап технологии, поскольку для успешного включения полученных растений в селекционный процесс необходимо получить потомство от самоопыления, что невозможно будет сделать у гаплоидных и триплоидных форм без перевода их на повышенный уровень плоидности.

Плоидность полученных растений планируется определить методом проточной цитометрии клеточных ядер (определение содержания количества хроматина в ядрах клеток) в ФГБНУ ВНИИСБ. Это относительно простой и крайне быстрый, позволяющий за рабочие сутки проанализировать несколько сотен образцов, метод, требующий незначительное количество анализируемого материала. К преимуществам также относится возможность проводить исследование на любой стадии развития растения *in vitro* и *in vivo*, даже когда проростки находятся на ранних стадиях роста [7]. Кроме того, проточная цитометрия – единственный метод, который даёт подробную информацию о существовании миксоплоидных тканей и их пропорциях в исследуемом генотипе [8]. В основе метода лежит окрашивание клеток ДНК-специфическим флуоресцентным красителем и последующая их детекция, подсчёт и сортировка с использованием лазера.

Несмотря на то, что быстрая обработка образцов сделала метод проточной цитометрии наиболее эффективным, точным и удобным подходом для определения уровня плоидности регенерантов, его применение во многих лабораториях все еще ограничено из-за высокой стоимости оборудования и более высокой стоимости каждого анализа.

Список литературы:

1. Шацкая О. А. Разработка и внедрение новых технологий селекции кукурузы на основе явления гаплоидии. URL: <http://www.kniish.ru/kniish23244.html>, 2013 [дата обращения 06.04.2020].
2. Hu H., Schrag T. A., Peis R., Unterseer S., Schipprack W., Chen S., Lai J., Yan J., Prasanna B. M., Nair S. K., Chaikam V., Rotarencu V., Shatskaya O. A., Zavalishina A., Scholten S., Schön C. C., Melchinger A. E. The Genetic Basis of Haploid Induction in Maize Identified with a Novel Genome-Wide Association Method // *Genetics*. 2016. Vol. 202, N 4. P. 1267-1276. DOI: 10.1534/genetics.115.184234

3. Prigge V., Sanchez C., Dhillon B. S., Schipprack W., Araus J. L., Banziger M., Melchinger A. E. Doubled haploids in tropical maize: 1. Effects of inducers and source germplasm on in vivo haploid induction rates // Crop Science. 2011. Vol. 51. P. 1498-1506. DOI: 10.2135/cropsci2010.10.0568
4. Шацкая О. Л. Результаты использования метода гаплоидии в селекции кукурузы и Кукуруза и сорго. 2001. № 4. С. 14-17.
5. Забирова Э. Р., Чумак М. В., Шацкая О. А., Щербак В. С. Технология массового ускоренного получения гомозиготных линий кукурузы и Кукуруза и сорго. 1996. № 4. С. 17-19.
6. Chase S.S. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines. Genetics. 1949;34(3):328. <https://doi.org/10.1093/genetics/34.3.328>
7. Ochatt S.J. Flow cytometry in plant breeding. Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology. 2008;73(7):581–598.
8. Bohanec B. Ploidy determination using flow cytometry. Doubled haploid production in crop plants. 2003. p. 397–403

АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА (*GRF*) У КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОЙ ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ

**Черноок А.Г., Баженов М.С., Крупина А.Ю., Ермолаев А.С.¹, Беспалова Л.А.²,
Дивашук М.Г.¹**

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

2 – ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко», Краснодар

E-mail: Irbis-sibir1@yandex.ru

Основой «Зеленой революции» было создание полужерновиков сортов растений. Такие сорта демонстрируют повышенную урожайность, однако также они имеют относительно низкую эффективность использования азота и требуют большого количества азотных удобрений для достижения высокого урожая [1]. Стремление к устойчивому сельскому хозяйству требует сокращения использования удобрений при одновременном повышении урожайности зерна.

Транскрипционные факторы семейства GRF (Growth Regulating Factors) впервые были охарактеризованы у риса. Известно, что у короткостебельных риса и пшеницы снижается эффективность усвоения азота [2]. В связи с этим интерес к генам *GRF* вызван, прежде всего, их способностью влиять на обмен азота и углерода. *GRF* у риса увеличивает поглощение ионов аммония, что в последствии приводило к увеличению размера метёлки и зерна, у твёрдой пшеницы с геном-кандидатом *GRF* показано увеличение массы 1000 зёрен [3]. Позже было обнаружено, что семейство факторов транскрипции *GRF* существует в большом количестве у наземных растений [4]. Таким образом, изучение генов семейства *GRF* является перспективным, так как эти гены обладают положительными эффектами на признаки продуктивности, которые могут быть снижены у короткостебельных растений.

Используя последовательность гена *GRF* риса, мы обнаружили гомологичный участок у пшеницы. Были подобраны праймеры и проведено секвенирование генов *TaGRF3-2A*, *TaGRF3-2B*, *TaGRF3-2D* в сортах пшеницы. С использованием разработанных маркеров на выявленные полиморфизмы генов *TaGRF3* мы провели генотипирование сортов и линий пшеницы из коллекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко, а

также рекомбинантных инбредных линий пшеницы и тритикале, выращенных нами в условиях полевого опыта. В нашем исследовании аллель *TaGRF3-2Aa(339)* увеличивал массу 1000 зёрен у пшеницы (при наличии аллеля короткостебельности *Rht-B1p*). В присутствии аллеля короткостебельности *Ddw1* у растений тритикале аллель гена *TaGRF3-2A(274)* увеличивал массу зерна с главного колоса, массу 1000 зёрен, сокращал время цветения и колошения. Полученные нами данные показывают перспективность изучения генов семейства *GRF* для улучшения признаков растений пшеницы и тритикале, путём вовлечения в селекционный процесс определённых аллелей этих генов.

Список литературы:

1. Gooding M.J., Addisu M., Uppal R.K., Snape J.W., Jones H.E. Effect of wheat dwarfing genes on nitrogen-use efficiency // *The Journal of Agricultural Science* – 2012. – Vol. 150. P. 3–22.
2. van der Knaap E., Kim J. H., Kende H. A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth // *Plant Physiology* – 2000. – Vol. 122, No. 3. P. 695–704.
3. Hu B., Wang W., Ou S., Tang J., Li H., Che R., Zhang Z., Chai X., Wang H., Wang Y. et al. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies // *Nat Genet* – 2015. – Vol. 47. P. 834–838.
4. Kim J.H. Biological roles and an evolutionary sketch of the GRF-GIF transcriptional complex in plants// *BMB Rep* – 2019. – Vol.52. P. 227-238.

БИОТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ПРИМЕНЕНИЕ В РЫБОВОДСТВЕ

Шаропова Шахноза Рахматиллоевна¹, Хасанова Мафтуна Шукрулло кизи²

1-Старший преподаватель Бухарского Государственного университета, Бухара

200100; E-mail: s.r.sharopova@buxdu.uz

2-Магистрантка (БухГУ), Бухара 200100;

E-mail: maftunahasanova12@gmail.com

Аннотация: В данной статье представлены пищевая ценность протококковых водорослей. Экспериментально подобраны питательные среды для микроводорослей. Представлены культивирования хлореллы в лабораторных условиях и значение применения в рыбоводстве.

Abstract: This article presents the nutritional value of protococcal algae. Nutrient media for microalgae were experimentally selected. The cultivation of *Chlorella* in laboratory conditions and the significance of its use in fish farming are presented.

Ключевые слова: культивирование, биомасса, питательная среда, микроводоросли, формирование, крахмал, регенерация, источник пищи, замкнутая экосистема, химические соединения.

Keywords: cultivation, biomass, nutrient medium, microalgae, formation, starch, regeneration, food source, closed ecosystem, chemical compounds.

Введение. Микроводоросли играют важнейшую роль в функционировании всей биосферы. Их можно встретить во всех водоемах планеты. Количество микроводорослей насчитывается более 50000 видов, из которых только были изучены около 30000 видов[1]. Кроме того, они занимают особое место среди представителей альгофлоры, являющиеся в связи с фототрофным типом питания начальным звеном трофических цепей. Фотосинтезирующие микроорганизмы иллюстрируют все многообразных типов трофии[2,3]. В настоящее время уделяется большое влияние именно на применение

микроводорослей в самых различных сферах народного хозяйства, в том числе и в рыбоводстве. Особое внимание уделяется культивированию зеленых микроводорослей которые относятся к родам *Chlorella* и *Scenedesmus*[4]. Для массового культивирования представляют интерес именно эти виды, которые характерны быстрым ростом и способные в благоприятных условиях накапливать большую биомассу.

Протококковые водоросли и их пищевая ценность. Протококковые водоросли – это обширный класс микроскопических зеленых водорослей. Они в основном являются пищей для рыб. Два вида водорослей *Chlorella* и *Scenedesmus* считаются объектами массового культивирования. Нами были произведены попытки культивировать сценедесмус в качестве корма и источника пищи. В исследованиях выяснилось, что эти группы водорослей содержат большое количество белков, в которых имеются все незаменимые аминокислоты (лизин, лейцин, валин, изолейцин, треонин, фенилаланин, триптофан, тирозин, метионин). Кроме того имеются витамины группы В и их содержание в водорослях больше чем, в фруктах и овощах. Следовательно, калорийность сухого вещества этих водорослей даёт возможность быстрому развитию зоопланктона и бентоса, а также повышает рыбопродуктивность.

Культура для микроводорослей. Культуру из водорослей получает в лабораторных условиях, либо в аквариуме или в пруду во время цветения воды в них. Производство биомассы микроводорослей можно описывать следующим образом:



Для культивирования используются разнообразные культиваторы, установки или реакторы. А более простые способы – это колба, или подобные водные сосуды, которые поливают на шейкер. Кроме того имеются факторы, влияющие на рост биомассы микроводоросли. Интенсивность света, температура, перемешивание, аэрация, а также питательная среда. Питательная среда – это субстрат, содержащий питательные соли, который необходим для нормального протекания жизненных процессов, протекающий в клетках микроводорослей, среда может быть твердой, которая приготавливается из агаризованных основ или жидкость из дистиллированной или чистой воды[5]. В наших исследованиях использовалась “Среда О4” следующего состава:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.2 г/л ; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.03 ; $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.03 ; NaHCO_3 – 0.1 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.08 ; KCl – 0.025 ; FeCl_3 - 1 % раствор – 0,15мл; Почвенный экстракт – 0,5мл; Раствор микроэлементов – 1мл. Для рыбных прудов можно использовать различные виды удобрений. К примеры органические (перепревший навоз-перегной, навозная жижа, вытяжка из навоза, компосты, растительность водная и наземная) и минеральные вещества(известь, зола, суперфосфат, аммиачная селитра). Они способствуют интенсивному развитию организмов, которыми питаются рыбы и повышению рыбопродуктивности водоёма.

Выводы. Согласно всем исследованиям и технологии применения микроводоросли *Chlorella vulgaris* в качестве дешёвого корма для личинок молодых рыб, выявлены важные полезные свойства хлореллы. К таким свойствам относятся повышение иммунитета, стрессоустойчивости рыб, снижение вероятности отравлений и хронических заболеваний. Кроме вышеуказанных свойств, применение хлореллы в прудовом рыбоводстве позволяет улучшить качество воды, снизить концентрацию нитратов и стабилизировать их на безопасном уровне. Чем выше урожай этих микроводорослей, тем выше рыбопродуктивность. Поэтому этих водорослей является объективным показателем общей биологической продуктивности водных экосистем.

Список литературы:

1. Музафаров А.М. Флора водорослей водоёмов Средней Азии//Ташкент: Наука, 1965 с.565-580
2. Микро- и макроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей/ В.В.Упитис: Зинатне, 1982-239с.

3. Саут.Р., Уиттик А. Основы альгологии/ Р.Саут, А.Уиттик-М.: мир, 1990-596с.
4. Арутянин Н.П. Культивирование одноклеточных водорослей. Ереван: Изд-во АН АРМ, 1996, с.3-86
5. Селяметов Р.А., Якубов Х.Ф. К изучению витаминного состава хлореллы и сценедесмуса. Культивирование водорослей и высших и водных растений в Узбекистане. Ташкент: Фан, 1971, с.59-60

ФЕНОМЕН РЕЦЕССИВНОЙ БЕЛОЙ МАСТИ В СТАДЕ МИНИ СВИНЕЙ ИЦиГ СО РАН

Шатохин К.С.¹, Запорожец В.И.²

**1 – ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет»
2 – ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН**

Изучение полиморфизма генотипа и фенотипа масти домашних животных и в частности свиней является одним из старейших направлений науки в зоотехнии. Вероятно на ранних этапах доместикиции отличная от дикой масть позволяла лучше идентифицировать животных. На стадии выведения заводских пород масть служила одним из признаков отличия породы от других и была обязательным пунктом описания экстерьера. В настоящее время описание масти заводских пород свиней практически лишено смысла так как большинство из них имеет одинаковый фенотип масти. В разведении лабораторных мини-свиней нет требований по однородности масти для конкретной селекционной группы, напротив, большинство известных популяций полиморфны по типам масти. Исключения составляют те селекционные группы, где масть является принципиальным критерием для проведения медико-биологических исследований. Опыт показывает, что в разведении лабораторных мини-свиней имеют место случаи выщепления редких окрасок. В некоторых работах селекция на разнообразии окрасок мини-свиней рассматривается как инструмент максимизации гетерозиготности популяции [1-3].

Типы масти домашних свиней условно можно разделить на два больших кластера: пигментированные и белые. Наличие пигментации связывают с экспрессией генов *MC1R*, кодирующий синтез чёрного пигмента эумеланина и *ASIP* кодирующий синтез чёрного пигмента феомеланина. В распределение пигмента по щетине и пигментированных щетинок по поверхности тела задействован ряд генов, в частности *EDNRB* и *MITF*. Белая масть у свиней обусловлена отсутствием пигментации, что достигается как минимум тремя путями. Первый, ингибирование пигментации семейством доминантных аллелей гена *KIT* (доминантная белая масть), второй — альбинизм, третий отключение генов *MC1R* и *ASIP* из-за внутренних мутаций, вследствие которых нарушается качественный состав транскриптома (рецессивная белая масть). Рецессивная белая масть описана у лабораторных мини-свиней (мини-Лёве, ланью) и некоторых местных китайских пород. О наличии рецессивной белой масти у свиней заводских пород не обнаружено никакой информации [3-5].

Ранее в стаде мини-свиней ИЦиГ СО РАН были описаны 4 основных фенотипа масти: доминантная белая, доминантная чёрная, агути и чёрно-пёстрая [2, 6]. Недавний анализ записей зоотехнического учёта показал в стаде наличие особой рецессивной белой масти. Цель исследования состоит в описании животных рецессивной белой окраски в стаде мини свиней ИЦиГ СО РАН и объяснении возможных причин генетического контроля данной масти.

Материалы и методы. Анализ проводился по записям зоотехнического учёта новорождённых поросят (n = 2809) с 2013 по 2020 годы. Фенотип масти определяли

визуально. Рецессивная белая масть фиксировалась при рождении белых поросят от не белых (окрашенных) родителей. Для анализа родословной использовали табличный процессор LibreOfficeCalc и среду статистического программирования R.

Результаты исследований. Было обнаружено 22 поросёнка белой масти, рождённых от родителей, не имеющих доминантной белой масти, что составляет 0,78 % от общего новорождённых. Все особи были рождены в 8 гнёздах. Внешне такие поросята не имели видимых отличий от животных доминантной белой масти. Живая масса новорождённых поросят рецессивной белой масти составляет 711 ± 20 г. В месячном возрасте живая масса рецессивных белых поросят составляет $3 \pm 0,11$ кг. До воспроизводства была допущена одна свиноматка рецессивной белой масти, которая принесла за первый опорос 4-х, а за второй 6-х поросят. Сохранность поросят в обоих случаях была 100%-й. Живая масса свиноматки составила 30 и 45 кг соответственно. Приведённые показатели являются типичными как внутри стада, так и для лабораторных мини-свиней в целом. На данный момент нет никаких указаний на то, что мутация рецессивной белой масти в стаде мини-свиней ИЦиГ СО РАН является причиной снижения жизнеспособности живых.

Судя по родословной, вероятность интродукции причинной мутации рецессивной белой масти в стадо мини-свиней ИЦиГ СО РАН от вьетнамских и ландрасских хряков в процессе вводного скрещивания, имевшего место в 1998, 2007 и 2010 годах, практически сведена к нулю. Таким образом, причинная мутация либо возникла непосредственно в стаде, либо была унаследована от родоначальников: свиноматок крупной породы либо светлогорских хряков.

На сегодняшний день отсутствуют результаты молекулярно-генетического анализа генов масти у мини-свиней ИЦиГ СО РАН из-за чего невозможно сказать, является ли мутация вызвавшая рецессивную белую масть в стаде идентичной обнаруженным ранее или же является уникальной, не описанной ранее. Установление мутации, вызвавшей рецессивную белую масть является целью дальнейших исследований.

Список литературы:

1. Cieslak, M.; Reissmann, M.; Hofreiter, M.; Ludwig, A. Colours of Domestication. *Biological Reviews* **2011**, *86*, 885–899, doi:10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x.
2. Nikitin, S.V.; Shatokhin, K.S.; Knyazev, S.P.; Goncharenko, G.M.; Zaporozhets, V.I.; Ermolayev, V.I. Polymorphic loci of coat color in mini-pigs. *Vestn. VOGiS* **2016**, *20*, 584–595, doi:10.18699/VJ16.180.
3. Shatokhin, K.S. Problems of mini-pig breeding. *Vestn. VOGiS* **2021**, *25*, 284–291, doi:10.18699/VJ21.032.
4. Fontanesi, L. Invited Review: Genetics and Genomics of Pigmentation Variability in Pigs: A Review. *Livestock Science* **2022**, *265*, 105079, doi:10.1016/j.livsci.2022.105079.
5. Lai, F.; Ren, J.; Ai, H.; Ding, N.; Ma, J.; Zeng, D.; Chen, C.; Guo, Y.; Huang, L. Chinese White Rongchang Pig Does Not Have the Dominant White Allele of KIT but Has the Dominant Black Allele of MC1R. *Journal of Heredity* **2007**, *98*, 84–87, doi:10.1093/jhered/esl053.
6. Nikitin, S.V.; Knyazev, S.P.; Shatokhin, K.S.; Goncharenko, G.M.; Zaporozhets, V.I.; Ermolayev, V.I. Juvenile coat colours in mini-pigs at ICG. *Vestn. VOGiS* **2017**, *21*, 638–645, doi:10.18699/VJ17.280.

ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA BENTHAMIANA*, СИНТЕЗИРУЮЩИХ АНТИТЕЛА ПРОТИВ HER2/NEU В ВИДЕ ПРОЦЕССИРУЕМОГО ПОЛИПРОТЕИНА

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

1 – ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва.

2 – ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва 119991.

E-mail: sheshukova@vigg.ru

Первые упоминания об использовании растения в качестве платформы для производства фармацевтических молекул было описано в 1989 году [1]. По сравнению с устоявшимися системами экспрессии рекомбинантных белков в клетках дрожжей, бактерий и млекопитающих, растительная платформа производства рекомбинантных белков привлекает внимание исследователей благодаря своей гибкости, скорости, масштабируемости, низким затратам на производство и отсутствию риска загрязнения патогенными микроорганизмами животного происхождения [2]. Новые эффективные системы экспрессии позволяют получать в растениях моноклональные антитела, в том числе для диагностики и терапии онкологических заболеваний [3]. Тем не менее, оптимизация имеющихся и разработка новых эффективных систем экспрессии, позволяющих получать в растениях терапевтические препараты подобные по биологическим свойствам известным лекарствам, включая антитела, применяемые для терапии рака, представляется актуальной, т.к. потребность в рекомбинантных белках для фармацевтического и нефармацевтического потребления с каждым годом растет. Ранее мы показали на мышинной модели, что использование полученного в растении *Nicotiana benthamiana* растительного биосимиляра пертузумаба (РБП) совместно с растительным биосимиляром трастузумаба (РБТ) приводит к повышению эффективности торможения роста Her2+ опухоли [4].

В растительную клетку затруднительно вводить гены иммуноглобулинов, которые, как это происходит на ранних этапах дифференцировки лимфоцитов, в результате соматической рекомбинации ДНК создают матрицу для синтеза антитела против конкретного антигена [5]. Гораздо проще для обеспечения синтеза антител в растительной клетке внести готовую матрицу. Обычно вводят две матрицы, одна для тяжелой (ТЦ), а другая для легкой цепи (ЛЦ) антитела. Для корректного фолдинга и активности рекомбинантных антител требуется достичь эквимолярного соотношения между ЛЦ и ТЦ, которого, однако, не всегда получается достичь при использовании двух отдельных векторов, в связи с тем, что трудно контролировать относительный уровень экспрессии генов ЛЦ и ТЦ. Система экспрессии, содержащая сразу оба гена, предпочтительнее, так как позволяет получить гарантированное эквимолярное соотношение генов ТЦ и ЛЦ, что возможно достичь благодаря процессируемым полипротеинам, содержащим аминокислотные последовательности ЛЦ и ТЦ. Процессинг данного полипротеина может осуществляться за счет присутствия между ЛЦ и ТЦ 33 а.к. линкера, специфически расщепляемого Kex2p-подобными протеазами растительной клетки [6]. Ранее нам удалось получить растительный биоаналог пертузумаба и трастузумаба в виде процессируемого полипротеина с линкером узнаваемым Kex2p-подобными протеазами растительной клетки [7,8].

Целью данной работы было получение стабильно трансформированных растений *Nicotiana benthamiana* синтезирующих антитела против HER2/neu в виде процессируемого полипротеина.

Трансформацию *N. benthamiana* с помощью *Agrobacterium tumefaciens* штамм AGL1 проводили традиционным методом листовых дисков [9]. Листовые диски табака инкубировали с *A. tumefaciens*, содержащей бинарный вектор, несущий генетическую кассету «ЛЦ-КР6pp-ТЦ», в течение 24 ч при 26°C в темноте. Инфицированные диски переносили на регенерационную среду (среда MS, дополненная 1 мг/л 6-бензиладенина и 0,1 мг/л α -нафталин-уксусной кислоты), содержащую 700 мг/л цефотаксима и 100 мг/л канамицина для селекции. Устойчивые к канамицину побеги укореняли на селективной среде MS, содержащей 100 мг/л канамицина. Трансгенные растения T0 были получены из дисков *N. benthamiana* и охарактеризованы с помощью ПЦР и анализа накопления антител в соке растения с помощью электрофореза в ПААГ с последующим вестерн-блот анализом специфическими к полноразмерным иммуноглобулинам G1 антителами. В результате работы были получены растения *N. benthamiana* синтезирующие антитела против HER2/neu в виде процессируемого полипротеина.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МК-3828.2022.1.4.

Список литературы:

1. Hiatt, A.; Cafferkey, R.; Bowdsh, K. Production of Antibodies in Transgenic Plants. *Nature* 1989, 342, 76–78, doi:10.1038/342076a0.
2. Komarova, T.V.; Baschieri, S.; Donini, M.; Marusic, C.; Benvenuto, E.; Dorokhov, Y.L. Transient Expression Systems for Plant-Derived Biopharmaceuticals. *Expert Rev. Vaccines* 2010, 9, 859–876, doi:10.1586/erv.10.85.
3. Yao, J.; Weng, Y.; Dickey, A.; Wang, K.Y. Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 28549, doi:10.3390/ijms161226122.
4. Komarova, T.V.; Sheshukova, E.V.; Kosorukova, E.N. Trastuzumab and Pertuzumab Plant Biosimilars: Modification of Asn297-Linked Glycan of the mAbs Produced in a Plant with Fucosyltransferase and Xylosyltransferase Gene Knockouts | SpringerLink Available online: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0006297917040137> (accessed on 27 July 2022).
5. Zan, H.; Casali, P. Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody Response. *Front. Immunol.* 2015, 6, doi:10.3389/fimmu.2015.00631.
6. Zhang, B.; Rapolu, M.; Huang, L.; Su, W.W. Coordinate Expression of Multiple Proteins in Plant Cells by Exploiting Endogenous Kex2p-like Protease Activity. *Plant Biotechnol. J.* 2011, 9, 970–981, doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00607.x.
7. Шешукова, Е.В.; Поздышев, Д.В.; Круглов, И.И.; Комарова, Т.В. Оценка Эффективности Продукции Растительного Биосимиляра Пертузумаба, Синтезируемого в Растительной Клетке в Виде Процессуемого Полипротеина. X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. Сборник тезисов 2023, 281–282, doi:10.25205/978-5-4437-1526-1-150.
8. Шешукова, Е.В.; Липскеров, Ф.А.; Комарова, Т.В. Система Продукции Антител в Растении *Nicotiana Benthamiana*, Основанная На Использовании Вирусного Вектора, Кодированного Процессуемый in Planta Полипротеин. *Актуальная биотехнология* 2022, 344–348.
9. Horsch, R.B.; Klee, H.J. Rapid Assay of Foreign Gene Expression in Leaf Discs Transformed by *Agrobacterium Tumefaciens*: Role of T-DNA Borders in the Transfer Process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986, 83, 4428–4432.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-МАРКЕРОВ

Шингалиев А.С.¹, Скорнякова Т.С.³, Кургузова Н.С.³, 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

3– Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова», Москва 119234
E-mail: kronstein491@yandex.ru

Культуры семейства *Solanaceae* имеют важное агрономическое значение. Они выращиваются на больших площадях по всему миру и ценятся в первую очередь за свои питательные качества. Однако пасленовые подвержены поражению широкого спектра патогенов, например, таких как *Septoria lycopersici*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea* и др. Наиболее значимый ущерб наносят представители рода *Fusarium* которые поражают сосуды растения и нарушают поступления питательных веществ.

Представители рода *Fusarium* относятся к крупному роду мицелиальных грибов и широко распространены в почвах практически всех климатических зон [1]. Грибы данного рода вызывают два экономически значимых заболевания: базальная гниль плодов и фузариозное увядание [2]. Это приводит к значительным потерям урожая таких культур, как томат, перец, баклажан не только в нашей стране, но и в мире. 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 .

Изучение морфологических особенностей патогена является относительно затруднительным, поскольку их признаки могут отличаться в зависимости от условий культивирования. Молекулярно-генетическая идентификация патогенных грибов позволяет определить вид патогена и провести генотипирование в сжатые сроки. Чаще всего используют молекулярные маркеры, для выявления уникальных характеристик исследуемого объекта. Например, близкородственные виды обладают значительной вариабельностью в некодирующих спейсерных областях – внутренних транскрибируемых спейсерах (ITS) и межгенных спейсерах (IGS). В связи с этим, высоко разнообразные 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 изоляты грибов рода *Fusarium*. При оценке на агрессивность в отношении культур семейства *Solanaceae*, патогены были разделены на группы сильно, средне и слабо агрессивные. С помощью пар праймеров ITS1(F) ITS4(R) и ITS5(F) ITS4(R) был проведён ПЦР-анализ[4], 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*, *F.Sporotrihoides*, *F. Incarnatum*.

Список 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). FusariumPathogenomics. 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 Rubusidaeus in Jilin Province, China. Plant disease – 2017. Vol 101, P. 1037.

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТООБРАЗЦОВ КАРТОФЕЛЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАТОГЕНАМ

Урман М.В., Мухордова М.Е.

ФГБНУ “Омский аграрный научный центр”. Омск 644012
E-mail: mv.urman1712@omgau.org

Считается, что к приоритетным направлениям селекции относится создание высокоустойчивых к вирусным болезням сортов, поскольку наиболее эффективным и экологически безопасным способом защиты от патогенов является возделывание устойчивых растений. ПЦР-маркирование позволяет отобрать более подходящие генотипы для селекции в зоне Западной Сибири [1].

Наиболее пагубный эффект оказывает Y вирус картофеля (YVK), так как по вредоносности и распространению поражения, может привести к полному вырождению растений, особенно в комплексе с X, M, L и S вирусами. Встречаемость носителей генов устойчивости к этим вирусам невелика, что свидетельствует о высокой ценности селекционного материала, несущего эти гены [2].

Не менее важным, помимо поиска вышеупомянутых генов к вирусам, является идентификация генов устойчивости к вредителю золотистая цистообразующая картофельная нематода – ЗКН (*Globodera rostochiensis*), так как на территории Российской Федерации она относится к объектам внутреннего и внешнего карантина. Химических средств борьбы против этих возбудителей нет, поэтому основным способом защиты является возделывание устойчивых сортов картофеля. Помимо ЗКН к карантинным организмам относится возбудитель рака картофеля *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Потери урожая картофеля при возделывании восприимчивых сортов могут достигать 90-95% [3].

Кроме поиска генов к карантинным заболеваниям важна детекция генов устойчивости к фитофторозу, возбудителем которого является *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. т.к. из всех патогенов он имеет наиболее широкое распространение на территории России и в «фитофторные годы» потери урожая могут достигать 60%.

Таким образом, выявление генов устойчивости к патогенам позволяет упростить отбор ценных образцов и значительно увеличить выборку исследуемого материала при отборе генотипов с комплексом олигогенов, что существенно сокращает время создания новых сортов картофеля [4].

Цель исследования - определить наличие генов, ответственных за устойчивость к фитопатогенам (вирусам X, Y, S, L, фитофторозу, раку и золотистой картофельной нематоды) в сортообразцах картофеля методом ПЦР-анализа. Выделить перспективный материал для дальнейшего использования в селекционном процессе.

Материалом для исследования служили 23 сортообразца картофеля: Розара, Ред Скарлетт, Гала, Адретта, Идеал, Антонина, Жуковский ранний, Кумир, Спектр, Алёна, Алая заря, Былина Сибири, Триумф, Хозяюшка, Лазарь, Вечерний Омск, Держава, гибрид 49-18, гибрид 86-18, гибрид 58-16, гибрид 56-16, гибрид 52-17, гибрид 63-14.

Эксперименты проводились на пробирочных растениях (возраст - 40 дней). Экстрагировали ДНК с помощью готового набора реактивов «ФитоСорб» («Синтол», Россия). Пробоподготовка образцов осуществлялась при помощи гомогенизатора TissueLyser LT. Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием праймеров к SSR-маркеру гена *Rx* (вирусу X): *PVX* [5]; к маркерам генов *Ryadg*, *Rychc*, *Rysto* (вирусу Y): *RYSC3* [6], *Ry-186* [5] и *YES3-3A* [7]; к маркерам генов *NS* и *NL* (вирусу S и L): *SCG17* и *NL127* [8,9]; к маркеру гена *H1* (нематоды – золотистой цистообразующей патогена *Ro1*, *Ro4*): *57R* [10], к маркеру гена *Rpi-blb1* (фитофторозу): *blb1* [11], к маркеру гена *Sen1* (рак картофеля): *NL25* [12]. ПЦР проводили в амплификаторе «CFX96TM Real-Time PCR System» (Bio-Rad, США). Амплифицированные фрагменты ДНК фракционировались методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-боратном (1×TBE) буфере.

В результате исследований выявлено, что в значительном количестве образцов (70%) обнаружен ген устойчивости к раку; маркеры гена устойчивости к ЗКН, L и S вирусам детектированы в 40% сортообразцов.

Отдельное внимание стоит уделить фитофторозу, вирусам X и Y, т.к. гены устойчивости к этим заболеваниям обнаружены всего в нескольких формах (менее 20%). А именно, ген устойчивости к вирусу X выявлен в сортообразцах: Кумир, Спектр, Хозяюшка, Жуковский ранний, Гибрид 63-14; к вирусу Y: Держава (*Rychc*), Гибрид 52-17 (*Rysto*), ген *Ryadg* не обнаружен; к фитофторозу: Гала, Вечерний Омск, Гибрид 52-17. В Идеале, Былине Сибири и Адретте целевые гены отсутствовали.

Примечательно, что образцы отечественной селекции в сравнении с иностранными сортами (кроме Галы) обладали более богатым генотипом по целевым генам.

Таким образом, в результате молекулярно-генетического анализа были выделены образцы с комплексной устойчивостью, которые имели в своем генотипе пять и более генов устойчивости:

1. Спектр, Хозяюшка, Жуковский ранний (ген устойчивости к вирусам X, S и L, ЗКН, раку)
2. Гала, Вечерний Омск (ген устойчивости к вирусам S и L, ЗКН, раку, фитофторозу)
3. Гибрид 52-17 (ген устойчивости к вирусам Y, S и L, ЗКН, раку, фитофторозу)

Выделенные сортообразцы являются источником комплекса устойчивости к нескольким вредоносным фитопатогенам картофеля, а также служат перспективным материалом, который может применяться при подборе пар для скрещиваний.

Список литературы:

1. Сайнакова А. Б. Исследование коллекционных образцов картофеля на наличие генетических маркеров устойчивости к фитопатогенам / А. Б. Сайнакова, М. С. Романова, С. Н. Красников, О. В. Литвинчук, Я. И. Алексеев, А. В. Никулин, Е. В. Терентьева // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 1. С. 18-24.
2. Бирюкова В. А. Молекулярные маркеры генов экстремальной устойчивости к Y вирусу картофеля в сортах и гибридах *Solanum tuberosum* L / В. А. Бирюкова, И. В. Шмыгля, В. А. Жарова, М. П. Бекетова, Е. В. Рогозина, А. В. Митюшкин, А. А. Малёшин // Российская сельскохозяйственная наука. 2019. № 5. С. 17-22.

3. Шанина Е. П. Применение ДНК-маркеров для оценки исходного селекционного материала картофеля / Е. П. Шанина, Л. Б. Сергеева, М. А. Стафеева, Е. М. Ключкина // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. № 12. С. 47-49.
4. Мухордова, М. Е. Комплексная оценка перспективного селекционного материала картофеля в условиях Омской области / М. Е. Мухордова, А. И. Черемисин, М. В. Урман // Кормопроизводство. 2023. № 3. С. 12-17.
5. Mori K., Sakamoto Y., Mukojima N., Tamiya S., Nakao T., Ishii T., Hosaka K. Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. *Euphytica*. 2011. No. 180. P. 347-355.
6. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V. A., Valkonen J. P., Gebhardt C., Watanabe K. N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ryadg based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*. 2000. Vol. 43. No. 1. P. 1-8.
7. Song Y. S., Hepting L., Schweizer G., Hartl L., Wenzel G., Schwarzfischer A. Mapping of extreme resistance to PVY (Rysto) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theoretical and applied genetics*. 2005. No. 111. P. 879-887.
8. Marczewski W., Hennig J., Gebhardt C. The Potato virus S resistance gene Ns maps to potato chromosome VIII. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 2002. 105(4), 564–567.
9. Marczewski W., Flis B., Syller J., Schäfer-Pregl R., & Gebhardt, C. A Major Quantitative Trait Locus for Resistance to Potato leafroll virus Is Located in a Resistance Hotspot on Potato Chromosome XI and Is Tightly Linked to N-Gene-Like Markers. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2001. 14(12), 1420–1425.
10. Schultz L., Cogan N.O.I., McLean K., Dale M.F., Bryan G.J., Forster J.W., Slater A.T. Evaluation and implementation of a potential diagnostic molecular marker for H1-conferred potato cyst nematode resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Breed.* – 2012. No.131. P. 315-321.
11. Wang M., Allefs S., van den Berg R. G., Vleeshouwers V. G., van der Vossen E. A. G., & Vosman B. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of Rpi-blb1 are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2008. 116(7), 933–943.
12. Hehl R., Faurie E., Hesselbach J., Salamini F., Whitham S., Baker B., Gebhardt C. TMV resistance gene N homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 1999. 98(3-4), 379–386.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИЙ СТЕРИЛЬНЫХ И ФЕРТИЛЬНЫХ ЛИНИЙ ИНДЕТЕРМИНАНТНЫХ РОЗОВЫХ ТОМАТОВ ПО ГЕНАМ УСТОЙЧИВОСТИ К НАИБОЛЕЕ ЗНАЧИМЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

Хунвану Никээ

ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) является экономически важной сельскохозяйственной культурой во всем мире, и, по оценкам, во всем мире ежегодно выращивается более 160 миллионов тонн помидоров (Продовольственная и Сельскохозяйственная Организация 2013). В месте с тем, он подвержен большому количеству болезней, серьезно влияющих на урожай различных культурных сортов. Благодаря новым технологиям исследователи смогли идентифицировать большое количество молекулярных маркеров, связанных с генами устойчивости томатов к болезням. Общая цель работы – провести молекулярно-генетический скрининг коллекции линий томата на наличие генов устойчивости к фузариозу, вирусу бронзоватости, вертициллезу, вирусу табачной мозаики, клядоспориозу, нематоды и др. Используемый материал представляет собой коллекцию стерильных и фертильных линий

индетерминантного томата с розовыми плодами. Всего использовали 19 линий томата, в том числе 16 стерильных и 3 фертильных. Выбрано 32 молекулярных маркера, которые были использованы для определения наличия генов устойчивости к девяти изучаемым заболеваниям у этих линий. Для каждого молекулярного маркера отбирали и тестировали три разные реакционные смеси. Скрининг коллекции линий томатов показал наличие в коллекции генов устойчивости I2-I2C-1 и I2-J2C-1, Ve 1 и Ve 2, Cf 2, Cf 5 и Cf 6, Sw-5, Tu-3a, Tu-2, Ol 1 и Ol 3, et Mi-2 у 16 тестируемых стерильных линий и 2 из 3 фертильных линий и отсутствие гена *ph3* устойчивости к фитофторозу и гена *Tm2²* устойчивости к табачной мозаике у томатов. Оптимизация условий проведения ПЦР позволила определить реакционную смесь, состоящую из 25 мМ MgCl₂, 2 мМ dNTP, 2 мМ праймера и от 50 до 100 нг ДНК, как наилучшую реакционную смесь, когда 10 мкл этой смеси содержит 1 мкл dNTP, 1 мкл каждого из праймеров и 0,5 мкл полимеразы Taq. Подтверждение наличия у этих линий генов устойчивости к наиболее известным болезням томатов ускорит процесс селекции изучаемых линий томата.

**СЕКЦИЯ
«ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ»**

ПОИСК ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ ФАКТОРОВ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ДИКИХ ВИДОВ КАРТОФЕЛЯ

Антипов А.Д., Злобин Н.Е.

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550
E-mail: antipovdm37@gmail.com*

Эукариотический фактор инициации трансляции 4E, также известный как eIF4E, представляет собой белок, который существует как в свободной форме, так и в составе преинициаторного комплекса eIF4F. Белок eIF4E необходим клеткам для трансляции с матрицы мРНК. Как правило, в растениях существует целое мультисемейство генов фактора инициации трансляции eIF4E. У растений семейства Solanaceae, таких как картофель, томат и перец — это семейство состоит из 4 изоформ — eIF4E1, eIF4E2, eIF4Eiso и nCBP [1].

Белки eIF4E помимо своей прямой функции инициации трансляции в клетках растений, используются некоторыми вирусами для репликации и распространения этих вирусов по растению. Для семейства Solanaceae, и, в частности, для картофеля, самым опасным вирусным заболеванием на сегодняшний день можно считать вирус Y, заражение которым может привести к большой потере урожая. Последние исследования биоразнообразия факторов инициации трансляции у перца и томата показали наличие аллельных вариантов генов eIF4E, которые придают устойчивость растений к вирусу Y за счет несинонимичных аминокислотных замен, препятствующих использованию eIF4E вирусом [2]. Однако на сегодняшний день нет опубликованных литературных данных о наличии резистентных аллелей eIF4E у картофеля. Задачей данного исследования было провести секвенирование генов факторов инициации трансляции диких видов картофеля.

В качестве источника аллелей eIF4E были использованы дикорастущие виды картофеля *S. Pinnatisectum*, *S. Chacoense*, *S. Phureja* и *S. Stenotomum* предоставленные ВИР. Из растений была выделена геномная ДНК (18 растений *S. Pinnatisectum*, 49 растений *S. Chacoense* и по 24 растения *S. Phureja* и *S. Stenotomum*) методом СТАВ [3]. С геномной ДНК были амплифицированы все 4 изоформы eIF4E методом ПЦР и амплифицированные продукты были получены в очищенном виде.

Секвенирование полноразмерных последовательностей осуществлялось с помощью MinION. Пробоподготовка образцов проводилась с использованием набора на 24 баркода для секвенирования методом длинных прочтений на ячейке FLO-MIN106 (OxfordNanopore). Всего было приготовлено 6 библиотек, которые были последовательно нанесены на ячейку, и после каждого нанесения ячейка промывалась согласно протоколу от OxfordNanopore.

Полученные на выходе fast5 файлы были конвертированы в fastq формат для дальнейшей обработки. После демультимплексирования и картирования fastq файлов на референсную последовательность (объединенную последовательность всех изоформ eIF4E, взятых из базы NCBI (сборка генома: GCF_000226075.1)), был проведен поиск полиморфизмов. Результаты анализа консенсусных последовательностей экзонных участков 4 изоформ eIF4E всех видов показали, что помимо наличия малого количества полиморфизмов в отдельных растениях, есть полиморфизмы, которые встречаются во всех растениях одного вида .

Полученные данные свидетельствуют о том, что у обоих видов наибольшее количество полиморфизмов имеет ген eIF4E1. На основе литературных данных можно сделать предположение, что вирус Y в картофеле в основном использует изоформу eIF4E1, то возможным объяснением наибольшего количества полиморфизмов в eIF4E-1 может быть эволюционное воздействие вируса Y и естественный отбор таких аллелей,

которые не взаимодействуют с вирусными белками за счет изменения их нуклеотидной и аминокислотной последовательности. В дальнейшем планируется проанализировать аминокислотные изменения, вызванные нуклеотидными полиморфизмами и сравнить полученные белковые последовательности с литературными данными.

Исследование поддержано проектом РФФ № 21-76-10050.

Список литературы:

1. Lebaron C., Rosado A., Sauvage, C., Gauffier C., German-Retana S., Moury B., Gallois J. L. A new eIF4E1 allele characterized by RNAseq data mining is associated with resistance to PVY in tomato albeit with a low durability // J. Gen. Virol. 2016. V. 97(11). P. 3063–3072.
2. Charron C., Nicolai, M., Gallois J. L., Robaglia C., Moury B., Palloix A., Caranta C. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg // Plant J. 2008. V. 54(1). P. 56–68.
3. Хегай С. В. Применение универсального СТАВ метода для выделения днк из листьев растений // Изв. Нац. Академии наук Кыргызской Республики. 2018. № 1. С. 92–97.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА VIGS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИРУСНЫХ СУПРЕССОРОВ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Болотина А.А., Власова А.В., Полховский А.В., Киров И.В.

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва
E-mail: boloti.anya@yandex.ru*

Достижения в технологии секвенирования следующего поколения привели к аккумулярованию большого объема геномных данных, открыв новые перспективы для поиска функциональных генов. Для установления и изучения функций генов могут быть использованы методы обратной генетики, например с помощью сайленсинга их экспрессии. Вирус-индуцированный сайленсинг генов (англ. Virus-Induced Gene Silencing, VIGS) – это метод, основанный на пост-транскрипционном подавлении генов (англ. - Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS), реализуемый с применением естественного механизма РНК-интерференции, используемого растениями для борьбы с вирусными инфекциями [1]. Защитный ответ активируется наличием двухцепочечной РНК (дцРНК), которая может вырабатываться во время репликации вируса. ДцРНК позже распознается и расщепляется DICER-подобным ферментом, в результате чего образуются молекулы малых интерферирующих РНК (миРНК). Антисмысловая цепь миРНК связывается с белком Argonaute (AGO)-содержащим комплексом РНК-индуцированного сайленсинга (RISC) и направляет эффекторный комплекс к комплементарной мРНК. Затем эффекторный комплекс катализирует расщепление мРНК, которая позже разрушается, вызывая PTGS [2]. Технология VIGS широко используется в качестве инструмента для генетического скрининга и функциональной геномики многих видов, таких как пасленовые, капустные, злаковые, лютиковые и сложноцветные.

На сегодняшний день создано более 50 векторов VIGS путем модификации растительных ДНК- и РНК-вирусов для двудольных и/или однодольных растений. Так, например, вирус погрешковости табака (англ. Tobacco Rattle Virus, TRV) имеет широкий круг растений-хозяев и может активно распространяться по всему растению, временно поражая меристематическую область на ранних стадиях инфекционного цикла и проявляя при этом легкие симптомы инфекции по сравнению с другими вирусами [3]. Известно, что

большинство растительных вирусов выработали механизмы, которые помогают им обойти противовирусную защиту растений, РНК-интерференцию, путем кодирования белков, называемых вирусными супрессорами сайленсинга РНК (англ. Viral Suppressor of RNA silencing, VSR). Различные VSR часто имеют небольшое сходство последовательностей и нацелены на разные этапы пути сайленсинга РНК, ввиду чего механизмы подавления РНК-сайленсинга сильно различаются. Некоторые VSR напрямую взаимодействуют с механизмом сайленсинга растения-хозяина, например, белок 2b вируса мозаики огурца (англ. Cucumber Mosaic Virus, CMV, представитель семейства *Bromoviridae*), который функционирует, препятствуя AGO1-опосредованному подавлению генов, посредством взаимодействия с доменом PAZ. Некоторые VSR взаимодействуют с дцРНК, связывая миРНК для предотвращения образования активного комплекса RISC, например, белок P19 вируса кустистой карликовости томатов (англ. Tomato Bushy Stunt Virus, TBSV, представитель семейства *Tombusviridae*) [4]. Таким образом применение метода VIGS с использованием VSR может увеличить эффективность эксперимента, предоставляя возможности для быстрого функционального анализа генов и понимания многих механизмов, что в дальнейшем окажет прямое влияние на создание сортов сельскохозяйственных культур. В нашей работе мы провели сравнение эффективности VIGS для разных векторов TRV, отличающихся наличием/отсутствием и типом VSR (P19 и C2b). Кроме этого, была проведена оценка динамики возникновения систематической инфекции, используя вирус TRV с белком GFP.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-64-00076.

Список литературы:

1. Singh B. et al. VIGS: a flexible tool for the study of functional genomics of plants under abiotic stresses //Journal of Crop Improvement. – 2019. – Т. 33. – №. 5. – С. 567-604.
2. Rössner C., Lotz D., Becker A. VIGS goes viral: how VIGS transforms our understanding of plant science //Annual Review of Plant Biology. – 2022. – Т. 73. – С. 703-728.
3. Zulfıqar S. et al. Virus-induced gene silencing (VIGS): a powerful tool for crop improvement and its advancement towards epigenetics //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 6. – С. 5608.
4. Sehki H. et al. TYMV and TRV infect Arabidopsis thaliana by expressing weak suppressors of RNA silencing and inducing host RNASE THREE LIKE1 //PLoS Pathogens. – 2023. – Т. 19. – №. 1. – С. e1010482.

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ Т-ДНК БИНАРНОГО ВЕКТОРА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОМОТОРА ГЕНА АЛЬФА-ГАРПИНИНА *SmAMP-X*

Иванова Л.А., Комахин Р.А.

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

Антимикробные пептиды (АМП) являются важными компонентами врожденного иммунного ответа растений, которые быстро борются с различными патогенами (1). АМП подразделяются на несколько семейств в соответствии с положением их дисульфидных мостиков и другими характеристиками их аминокислотных последовательностей (2). К основным семействам растительных АМП относятся: дефензины, тионины, белки-переносчики липидов, α -гарпинины, гевиноподобные пептиды, снакины, ноттины и циклотиды. Гены, принадлежащие к нескольким семействам АМП, были использованы в качестве трансгенов для создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью к

грибковым и бактериальным патогенам (3). Так же было показано, что растительные АМП не только обладают антимикробными свойствами, но и регулируют жизненный цикл растений от прорастания семян до развития корней, способствуют росту вегетативных и репродуктивных органов, а также способствуют развитию семян и устойчивости к питательному стрессу (1). Несмотря на обширные данные о характере экспрессии генов растительных АМП в интактных растениях, функциональная организация промоторов их генов остается недостаточно изученной, так как во-первых, полученные данные не охватывают все семейства АМП, а во-вторых, на характер экспрессии промоторов в трансгенных растениях могут влиять элементы промотора/энхансера, используемые для экспрессии селективных маркерных генов в области Т-ДНК бинарного вектора, или элементы, обнаруженные во фланкирующей области вставки (4,5). В растениях *S. media* гены, кодирующие АМП, включают ген АМП X (*SmAMP-X*) из семейства альфа-гарпинины. Он кодирует противогрибковый пептид SmAMP-X, проявляющий высокую активность широкого спектра действия против грибковых фитопатогенов (6).

В отличие от исходного исследования (6), в данной работе экспрессия *SmAMP-X* была обнаружена в листьях, стеблях, корнях и цветках *S. media*, используя три комбинации генспецифичных праймеров для различных участков гена *SmAMP-X*. Был клонирован промотор гена *SmAMP-X* и обнаружены две геномные последовательности для промотора (обозначенные pro-SmAMP-X и pro-SmAMP-X-Ψ2) с идентичностью 83% в их коровой и проксимальной областях. Анализ нуклеотидных последовательностей pro-SmAMP-X и pro-SmAMP-X-Ψ2, с помощью онлайн-баз данных элементов показал, обе промоторные последовательности содержат несколько типов предполагаемых цис-действующих элементов, включая СААТ-боксы и ТАТА-боксы. Более того, идентифицировали цис-действующие элементы, которые потенциально обеспечивают тканеспецифичную, индуцируемую и усиленную или подавленную экспрессию генов *SmAMP-X* и *SmAMP-X-Ψ2*.

При транзientной экспрессии в листьях *N. benthamiana* делеционные варианты промоторов в векторе pCambia1381Z продуцировали более 42% и 71% активности GUS, продуцируемой промотором CaMV35S в векторе pCambia1301. Замена элемента-энхансера 2× CaMV35S последовательностью *lacZ* почти полностью устранила активность GUS в конструкции pC1381Z-406 (CaMV35S-less). Другая конструкция с экспрессионными кассетами для селективного гена и репортерного гена *uidA*, расположенными в ориентации "голова к хвосту", и с сильным конститутивным растительным промотором pro-SmAMP2 (-426 п.н.) для экспрессии селективного гена показывала средний уровень активности GUS в листьях *N. benthamiana* 1600 ± 213 пмоль/мин·мг, что значительно ниже, чем у конструкции pC1381Z pro-SmAMP-X-Ψ2(-406 п.н.):*uidA* и значительно выше, чем у конструкции pC1381Z pro-SmAMP-X-Ψ2(-406 п.н.):*uidA*(CaMV35S-less). Таким образом, предшествующая 5'-фланкирующая последовательность ДНК определяла эффективность нового растительного промотора в получении высокой активности GUS при транзientной экспрессии *N. benthamiana*.

В листьях трансгенного *A. thaliana*, промоторы pro-SmAMP-X(-382 п.н.) и pro-SmAMP-X-Ψ2(-406 п.н.) в векторе pCambia2301 продуцировали 49% и 80% активности GUS, продуцируемой промотором CaMV35S, соответственно. С помощью метода 5'RACE определили, что транскрипция *uidA* с промоторов pro-SmAMP-X(-382 п.н.) и pro-SmAMP-X-Ψ2(-406 п.н.) в векторе pCambia2301 у трансгенных растений *A. thaliana* иницируется в TSS, которые отличаются от TSS гена *SmAMP-X* в растениях *S. media*, что приводит к образованию дополнительных открытых рамок считывания. Возможно, что наработка GUS с использованием промоторов pro-SmAMP-X и pro-SmAMP-X-Ψ2 в векторе pCambia2301 может дополнительно регулироваться за счет формирования альтернативных 5'НТО.

Установили, что промоторы pro-SmAMP-X(-382 п.н.) и pro-SmAMP-X-Ψ2(-406 п.н.) обеспечивают селекцию трансгенных клеток *N. tabacum* на среде с высокой

концентрацией канамицина даже без энхансера CaMV35S в области Т-ДНК бинарного вектора. Следовательно, они являются относительно слабыми и конститутивными промоторами для контроля экспрессии генов в трансгенных растениях табака.

В нескольких вегетативных тканях трансгенных растений картофеля промотор про-SmAMP-X-Ψ2(-406 п.н.) в векторе pCambia2301 эффективно стимулирует высокую экспрессию *uidA*; GUS наиболее активен в сосудистой системе стеблей. А в конструкции без энхансера CaMV35S промотор про-SmAMP-X-Ψ2(-406 п.н.) эффективность значительно снижается.

В заключение следует подчеркнуть, что последовательности промоторов растений должны быть функционально валидированы в бинарных векторах, которые не содержат последовательности промотора CaMV35S в области Т-ДНК

Список литературы:

1. Li J, Hu S, Jian W et al (2021) Plant antimicrobial peptides: Structures, functions, and applications. *Bot Stud* 62:5. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>
2. Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC et al (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci* 16:3, 297-323. <https://doi.org/10.1080/07352689709701952>
- Lee SC, Hwang IS, Choi HW et al (2008) Involvement of the pepper antimicrobial protein CaAMP1 gene in broad spectrum disease resistance. *Plant Physiol* 148:1004-1020. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123836>
3. Gudynaite-Savitch L, Johnson DA, Miki BL (2009) Strategies to mitigate transgene-promoter interactions. *J Plant Biotechnol* 7:472-485. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00416.x>
4. Singer S, Cox K, Liu Z (2010) Both the constitutive cauliflower mosaic virus 35S and tissue-specific AGAMOUS enhancers activate transcription autonomously in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol J* 74:293-305. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9673-9>
5. Slavokhotova AA, Rogozhin EA, Musolyamov AK et al (2014) Novel antifungal α -hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: Structure, biosynthesis, gene structure and evolution. *Plant Mol Biol* 84:189-202. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0127-z>

МОДИФИКАЦИЯ КЭП-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ ОБЛАСТИ eIF4E, КАК СПОСОБ СОЗДАНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К PVY РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Карлов В.Д.¹, Таранов В.В.¹, Никонов О.С.²

1 – Всероссийский научно исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

2 – Институт белка РАН, Пуццо

Вирус Y картофеля – представитель наиболее крупного семейства растительных вирусов Potyviridae – считается наиболее вредоносным патогеном для сельскохозяйственных культур картофеля. Вирусная частица PVY представляет собой гибкую палочковидную частицу с геномом в виде кодирующей одноцепочечной РНК размером 10 т.п.н.. 5'-конец вирусной РНК ковалентно связан с белком VPg, а 3'-конец полиаденилирован.

Для синтеза вирусных белков PVY эксплуатирует аппарат трансляции хозяина, внедряясь в инициаторный комплекс посредством взаимодействия VPg с eIF4E. Известны случаи устойчивости к потивирусам, обусловленные мутациями eIF4E у многих паслёновых, за исключением картофеля. Попытки нокаутировать ген eIF4E не приводили к возникновению прочной устойчивости, в связи с чем создание функциональных

мутантов eIF4E, неспособных связывать VPg, можно считать наиболее перспективным направлением получения устойчивых растений картофеля.

С помощью разработанной нами пространственной модели взаимодействия eIF4E и VPg, а также данных молекулярной динамики eIF4E, мы спроектировали несколько мутантных вариантов eIF4E, содержащих аминокислотные замены в области кэп-связывающего участка. Ряд мутантных eIF4E был сгенерирован путём сайт-направленного мутагенеза и протестирован на способность инициировать трансляцию *in vivo* в дрожжевой модели. Способность связывать VPg оценивали с помощью анализа дрожжевого двугибридного скрининга.

Полученные результаты позволили качественно уточнить спроектированную нами пространственную модель eIF4E и расширить наше понимание механизма взаимодействия eIF4E и VPg вируса Y картофеля.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексной научной программы «Развитие картофелеводства и семеноводства».

СОЗДАНИЕ КАРТОФЕЛЯ (*S. TUBEROSUM* L.) С НОКАУТОМ ГЕНА *STLEAFY*

Лебедева М. В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550, Тимирязевская, 42
marilistik@mail.ru*

Одним из важнейших сельскохозяйственных растений является картофель (*Solanum tuberosum* L.). В данной работе с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 были инактивированы все копии гена *LEAFY* (гомолог *AtLFY*), одного из ключевых регуляторов перехода к цветению, у тетраплоидного культурного картофеля. Линии с нокаутами всех четырёх аллелей были получены с помощью двух гидовых РНК, нацеленных на разные участки первого экзона. Для детекции мутаций использовалось таргетное NGS-секвенирование, которое позволяет выявить все варианты редактирования и оценить их пропорцию в каждом тетраплоидном геноме. Было показано, что уже в T0 поколении растений-регенерантов наблюдается высокий уровень редактирования и для каждой гидовой РНК были отобраны линии с нокаут-мутациями во всех аллелях. Следующее вегетативное поколение картофеля также было проанализировано с помощью высокопроизводительного секвенирования для подтверждения наличия нокаут-мутаций. Инактивация гена *StLEAFY* привела к фенотипическим изменениям у растений картофеля, включая недетерминированному росту соцветий и развитию листовидных структур вместо цветков

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ Δ9-ДЕСАТУРАЗЫ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ ТОМАТОВ

Миловская И. Г.¹, Варламова Н. В.², Стариков А. Ю.¹, Павленко О.С.^{1,2}, Тюрин А. А.¹, Соболев Д. С.¹, Халилуев М. Р.², Голденкова-Павлова И. В.¹

*1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН), Москва 127276, Ботаническая, 35
E-mail: ifr@ippras.ru*

**2 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550, Тимирязевская, 42
E-mail: iab@iab.ac.ru**

Для получения трансгенных растений томата (*Solanum lycopersicum*), экспрессирующих $\Delta 9$ ацил-липидную десатуразу цианобактерии (*desC*), и оценки влияния данной десатуразы на жирнокислотный (ЖК) состав суммарных липидов были сконструированы вектора, несущие ген *desC*. Последовательность гена была слита с лидерными последовательностями, обеспечивающими локализацию белкового продукта в хлоропластах, ЭПР или цитоплазматической мембране. Полученными векторами трансформировали штамм *A.tumefaciens GV3101* для последующей агробактериальной трансформации растений томатов. ЖК анализ листьев показал, что для некоторых линий при локализации *desC* в цитоплазматической мембране или мембране ЭПР наблюдается увеличение содержания С16:1 и С16:2 жирных кислот. Для данных линий показано увеличение относительной представленности транскрипта *desC* по сравнению с трансгенными линиями, не показавшими изменения ЖК-состава. Полученные данные могут быть использованы для разработки стратегий направленной модификации жирнокислотного состава томатов.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЛИПИД-ТРАНСПОРТНОГО БЕЛКА NsLTP1 ИЗ *N. sativa* L. В РАСТЕНИЯХ ТОМАТА

Михель И.М.

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), 127550 Россия, г. Москва
E-mail: joseph.mikhel@gmail.com**

Томат является наиболее широко распространенной в мире овощной культурой. Заболевания томата, вызванные грибными, бактериальными и вирусными патогенами, наносят значительный экономический ущерб. Применение генно-инженерных стратегий, в частности, трансформация сельскохозяйственных растений генами других организмов, опосредующими устойчивость к биотическому стрессу, является распространенной стратегией улучшения культур. Для повышения устойчивости к грибным и бактериальным патогенам генно-инженерными методами наиболее часто применяют введение генов антимикробных пептидов и защитных белков [1].

Антимикробные пептиды и защитные белки обнаружены у многих растений, включая культурные виды. Сорняки, лекарственные, ароматические растения обладают высокой устойчивостью к патогенам и являются перспективным источником новых антимикробных пептидов для биотехнологии. Так, из семян черного тмина (*N. sativa* L.) был выделен липид-переносящий белок NsLTP1, обладающий в микромолярных концентрациях активностью против патогенов *P. infestans*, *P. debaryanum* и *F. oxysporum* [2]. Заболевания, вызываемые данными патогенами, наносят большой экономический ущерб при выращивании томата. Ранее было показано повышение устойчивости к патогенам трансгенных растений, экспрессирующих другие липид-переносящие белки [2], что делает NsLTP1 перспективным инструментом для повышения устойчивости к патогенам посредством введения в геном томата гена, кодирующего данный белок.

Белок NsLTP1 синтезируется в форме предшественника, сшитого с N-концевым сигнальным участком. В настоящее время отсутствуют данные о структуре гена,

кодирующего белок NsLTP1, последовательность данного гена не секвенирована. На основании ранее полученной аминокислотной последовательности белка NsLTP1 была синтезирована *de novo* последовательность кДНК, оптимизированная по составу кодонов для экспрессии в растениях томата, и клонирована в вектор pC2301 для проведения агробактериальной трансформации. В качестве регуляторного элемента был использован промотор гена гевеинподобного пептида SmAMP1 из *S. media* L, для которого ранее в конструкциях, содержащих ген GUS, была показана эффективность экспрессии целевого гена, сопоставимая с эталонным промотором вируса мозаики цветной капусты CaMV35S [3].

Исходным материалом для агробактериальной трансформации являются семядоли проростков томата селекционной линии ЯЛФ. Трансформация проводится посредством инокуляции эксплантов семядолей в разбавленной суспензии агробактерии штамма AGL0, содержащей сконструированный бинарный вектор с геном, кодирующим NsLTP1. После элиминации агробактерии путем промывки эксплантов в растворе антибиотика, трансформированные экспланты помещают на среду для каллусо- и морфогенеза, содержащую канамицин, для проведения селективного отбора, с постепенным повышением концентрации канамицина при культивировании с 25 мг/л до 100 мг/л. Полученные к настоящему времени регенеранты не показали устойчивости, проведены новые эксперименты по агробактериальной трансформации, в настоящее время экспланты находятся на стадии каллусогенеза.

Список литературы:

1. Khaliluev M.R., Shpakovskii G.V. Genetic engineering strategies for enhancing tomato resistance to fungal and bacterial pathogens. Russian journal of plant physiology. 2013 Nov;60:721-32.
2. Oshchepkova Y.I., Veshkurova O.N., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., Smirnov A.N., Odintsova T.I., Egorov T.A., Grishin E.V., Salikhov S.I. Isolation of the lipid-transporting protein Ns-LTP1 from seeds of the garden fennel flower (*Nigella sativa*). Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2009 May;35:315-9.
3. Efremova L.N., Strelnikova S.R., Gazizova G.R., Minkina E.A., Komakhin R.A. A synthetic strong and constitutive promoter derived from the stellaria media pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 promoters for effective transgene expression in plants. Genes. 2020 Nov 26;11(12):1407.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА VPg ВИРУСА PVY С ФАКТОРАМИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ СЕМЕЙСТВА eIF4E ТАБАКА

Никаноркина В.В.¹, Криолло Дельгадо Л.М.², Таранов В.В.¹, Лебедева М.В.¹

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия;

**2 – Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия.
vnikanorkina@mail.ru**

Вирус картофеля Y (PVY) является одним из наиболее распространенных и вредоносных растительных вирусов. PVY принадлежит к роду Potyvirus семейства Potyviridae, крупнейшему семейству РНК-содержащих вирусов, поражающих растения. PVY передается тлями и поражает широкий спектр растений-хозяев семейства Solanaceae, включая помидоры, картофель и табак. Геном PVY представляет собой одноцепочечную молекулу РНК длиной около 10000 оснований, полиаденилированной на 3'-конце и ковалентно связанной с вирусным белком VPg (viral genome linked protein) на 5'-конце.

При заражении полноразмерная РНК вирусного генома транслируется в полипротеин, преобразующийся затем в ряд функциональных белков. Завершение вирусного цикла потивирусной инфекции зависит от сложных взаимодействий между факторами, кодируемыми вирусом и хозяином. В случае с PVY, ранее в исследованиях было показано, что для инициации трансляции вирусных РНК в клетках, необходимо взаимодействие вирусного белка VPg с растительными факторами инициации трансляции семейства eIF4E. Факторы инициации трансляции eIF4E являются важными компонентами, которые кодируются небольшим мультигенным семейством и связываются с кэпированным 5'- концом мРНК. Белок VPg имитирует кэп-структуру мРНК клетки-хозяина, что позволяет начать синтез вирусных белков в растительной клетке. Именно отсутствие взаимодействия между вирусным VPg и растительным eIF4E и его изоформой eIF(iso)4E во многих случаях является основной причиной устойчивости к PVY, при этом для нарушения взаимодействия может быть достаточно единичных аминокислотных замен в факторе инициации трансляции. Поэтому растительные eIF4E/eIF(iso)4Es были идентифицированы как рецессивные гены устойчивости к потивирусу у различных видов растений. Однако потивирусы могут мутировать, восстанавливая взаимодействие VPg с мутантом-хозяином eIF4E, либо позволяют взаимодействовать с другим членом семейства eIF4E.

Табак представляет собой аллотетраплоид, унаследовавший свой геном от диплоидов *Nicotiana sylvestris* (S-геном) и *Nicotiana tomentosiformis* (T-геном). Из восьми вариантов факторов инициации трансляции eIF4E табака пять получены из генома *N.tomentosiformis* и три из генома *N.sylvestris*. Эти белки могут использоваться для инициации трансляции как растительных белков, так и белков вируса. Ранее было установлено, что из восьми факторов семейства eIF4E табака с PVY в основном связывается первый фактор (eIF4E-1). eIF4E-1 является главным фактором восприимчивости, как у табака, так и у картофеля, однако вирусом могут рекрутироваться и другие факторы, какие именно из оставшихся семи неизвестно. На данный момент не найдены мутантные варианты фактора eIF4E табака, нарушающие взаимодействие с VPg и при этом не влияющие на функциональность самого фактора eIF4E растения.

Некоторые штаммы вируса Y могут преодолевать устойчивость, что представляет собой серьезную угрозу для производства табака во всем мире, выяснение молекулярной основы их способности преодолевать резистентность является актуальной задачей. Необходимо детально изучить взаимодействие белка VPg вируса картофеля Y с различными факторами инициации трансляции eIF4E табака.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВЫСОКОКОНСЕРВАТИВНОГО ГЕНА RAS85D

Сивопляс Е.А.^{1,2}, Куликов А.М.¹

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН), 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26;*

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «*Московский педагогический государственный университет*» (МПГУ), 119991, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 1.

sivoplyas-ekater@mail.ru

Высококонтсервативный ген дрозофил *Dras1* имеет нуклеотидную последовательность, которая мало изменчива у различных таксонов от дрожжей до млекопитающих. Ген *Ras85D* имеет смешанный тип промотора – широкий с пиком, сочетающий свойства промоторов генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes) с

постоянной экспрессией, и генов «роскоши» (luxury/nonconstitutive genes). Синтез данного белка осуществляется в течение всей жизни у эукариот, а активность экспрессии меняется в различных тканях и на разных стадиях онтогенеза. Ошибки в последовательности таких генов при делении клетки, приводят к канцерогенезу. У человека гомологи этого гена - *HRAS*, *KRAS* и *NRAS*, являются протоонкогенами, онкогенные мутации которых представлены в различных типах опухолей.

Нами была проанализирована экспрессионная активность гена *Dras1* на модельных объектах *D.melanogaster* и *D.virilis*, для которых были известны данные полногеномного анализа, которые не дают представлений об особенностях регуляции. Тем не менее, у разных видов дрозофил для ортологов гена *Ras85D* показаны различия области промотора и межгенного района вплоть до предшествующего гена. Эволюционные перестройки и изменения последовательности при сохранении гомологии расположенного выше по цепи гена связаны с встраиванием мобильных генетических элементов, в частности ретротранспозонов и ДНК-транспозонов. У всех видов показано наличие дополнительных точек старта транскрипции, расположенных как правило выше основной. Конститутивные регуляторные последовательности гена *ras85D* представлены в выявленных эволюционно консервативных участках и обогащены сайтами связывания транскрипционных факторов, контролирующими различные этапы онтогенеза дрозофил.

В нашем эксперименте последовательность микроРНК связывается с матричной РНК гена, препятствуя началу синтеза белка на рибосоме. Были получены три линии дрозофил с гиперэкспрессией нескольких разновидностей микроРНК (*miR-312*, *miR-313* и *miR-92a*), из которых были выделены имагинальные глазные диски на личиночной стадии L3. Для подтверждения связывания микроРНК с мРНК мы использовали репортерный ген флюоресцирующего белка GFP под промотором Gal4. На конфокальном микроскопе была показана различная степень свечения у контрольной линии по сравнению с экспериментальными, несущими сайты связывания с микроРНК. Белковый анализ проводился методом вестерн-блот с использованием антител для флюоресцирующего белка GFP. Применение генетических конструкций с GFP в качестве гена-мишени, и несущих выявленные сайты связывания микроРНК в области 3'-UTR гена-мишени, подтвердило, что экспрессионная активность гена *Ras85D* различается в зависимости от стадии развития и регулируется с помощью микроРНК.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00840 мол_а.

Список литературы:

1. Von Roretz, C., and Gallouz, I. E. Decoding ARE-mediated decay: is microRNA part of the equation? *J. Cell. Biol.* 2008 181, 189-194
2. Lau, N. C., Lim, E. P. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *C. elegans*. *Science* 2001 294, 858-864
3. Goodsell D. S. The molecular perspective: the ras oncogene. 1999 *Oncologist* 263-264.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА *NICOTIANA TABACUM* С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ BASE EDITING

Сущенко А.С., Ражина О., Никаноркина В., Лебедева М.В., Таранов В.В.

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550
E-mail: andreysusch2000@mail.ru**

Одной из самых используемых технологий редактирования живых организмов является CRISPR/Cas9. Внедрение генетических конструкций в клетки растений позволяет

таргетно вносить indel-мутации, нокаутируя интересующие гены для повышения устойчивости растений к патогенам. Но система CRISPR/Cas9 имеет ограничения: необходимость наличия PAM последовательности рядом с сайтом разрезания, что сокращает варианты для подбора гидовых РНК. Одним из недостатков использования CRISPR/Cas9 являются неконтролируемые делеции и инсерции нуклеотидов. Более современный метод - base editing позволяет вносить точечные нуклеотидные замены, которые могут привести к изменению аминокислоты. Но данные по редактированию растений этим методом мало представлены в научной литературе. Поэтому генная модификация методом base editing является актуальным направлением исследований.

Для отработки методики трансформации и нокаута генов с помощью cas9 нами был выбрана фитоендесатураза модельного организма *Nicotiana tabacum*. Геном для редактирования оснований был выбран фактор инициации трансляции 4E1, так как он является геном восприимчивости к вирусу Y. Внесение мутаций в данном гене нарушает взаимодействие вирусных белков с растительными и растение приобретает устойчивость. После выбора гидовых РНК была проведена сборка конструкций и наработка их в клетках *E. coli*, а затем трансформация штамма агробактерий EHA105 данными векторами. Для контроля успешности трансформации использовался вектор 35S:RUBY, продукт экспрессии (беталаин) которого придает красную окраску табаку. Затем следовали этапы получения асептических растений *in vitro* и их агробактериальная трансформация. Далее индуцировали каллусогенез и органогенез. Полученные растения были пересажены в почву и выделена ДНК для анализа мутаций и контаминации агробактериями.

В результате нами были получены нокаутные растения *Nicotiana tabacum* по гену PDS, 280 регенерантов после трансформации конструкциями для base editing, нацеленные на ген 4E1 и растения, продуцирующие беталаин.

ПРОМОТОР ГЕНА ДЕФЕНЗИНА *Sm-AMP-D1* ИЗ РАСТЕНИЯ МОКРИЦА СРЕДНЯЯ (*STELLARIA MEDIA* L.)

Трофимов А.С., Комахин Р.А.

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550;
E-mail: recombination@iab.ac.ru**

Антимикробные пептиды являются важными компонентами врожденного иммунитета, которые борются с различными патогенами. Основные семейства растительных антимикробных пептидов включают дефензины, которые в низких концентрациях активны в отношении фитопатогенных грибов. В интактных растениях паттерны экспрессии генов дефензинов в основном тканеспецифичны, органоспецифичны или индуцируются патогенами. Несмотря на многочисленные данные о характере экспрессии генов дефензинов в интактных растениях, функциональная организация их промоторов остается плохо охарактеризованной.

У растения мокрица средняя (*Stellaria media*) защитные пептиды включают дефензины *Sm-AMP-D1* и *Sm-AMP-D2*, проявляющие высокую активность против грибковых патогенов[3]. В данной работе представлены экспериментальные результаты клонирования нуклеотидной последовательности промотора гена *Sm-AMP-D1*.

Промотор гена – последовательность нуклеотидов ДНК перед транскрибируемой областью, используемая ферментом РНК-полимеразой для инициации транскрипции. Промоторы, изолированные из интактного генома растений могут сохранять свои основные функции в гетерологичных растениях, однако качественные и количественные

вариации экспрессии рекомбинантных генов под их контролем не являются редкостью и должны быть изучены для каждого промотора[1].

Геном растения *S. media* не секвенирован, что не позволяет клонировать промотор традиционными методами. Поэтому первоначально, используя известную нуклеотидную последовательности гена *Sm-AMP-D1*, методом Modified inverse PCR (MiPCR)[2] была клонирована нуклеотидная последовательность «коровой» области и части проксимальной области промотора гена *Sm-AMP-D1*. Оказалось, геном растения мокрицы содержит две версии промотора гена *Sm-AMP-D1*, обозначенные pro-SmAMP-D1-1 и pro-SmAMP-D1-2, при длине 345-346 п.н. идентичные на 93%. Нуклеотидные последовательности этих промоторов содержат консервативные цис-действующие элементы ТАТА-бокс и СААТ-бокс. Нуклеотидный полиморфизм между двумя версиями промотора pro-SmAMP-D1-1 и pro-SmAMP-D1-2 приводит к различиям между ними в наборе цис-элементов. Например, pro-SmAMP-D1-1, в отличие от pro-SmAMP-D1-2 содержит WUN-motif, но в нём отсутствует последовательность для связывания транскрипционного фактора MYC, и один тот же цис-элемент ТАТА-бокс представлен разными нуклеотидами. Затем, в результате второго раунда амплификации методом MiPCR, полностью клонировали проксимальную и часть дистальной области обеих версий длиной 495 п.н. В результате в интактном геноме растения мокрица показали существование версий промотора pro-SmAMP-D1-1 и pro-SmAMP-D1-2 размером около 830 п.н., которые идентичны на 97% и различаются полиморфизмом «коровой» области.

В настоящее время делеционные варианты обеих версий промотора размером 345-346 п.н. клонировали в бинарный вектор для агробактериальной трансформации растений pCambia1381z, в котором они контролируют экспрессию репортерного гена *uidA*. Методом агробактериальной инфильтрации показали, что обе версии промотора способствовали продукции белкового продукта гена *uidA* в клетках растений *Nicotiana benthamiana*.

Список литературы:

1. Hernandez-Garcia C. M., Finer J. J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements //Plant Science. – 2014. – Т. 217. – С. 109-119.
2. Pogorelko, Gennady V., и Oksana V. Fursova. A Highly Efficient miPCR Method for Isolating FSTs from Transgenic Arabidopsis Thaliana Plants. Journal of Genetics 87, вып. 2 (1 август 2008 г.): 133–40.
3. Slavokhotova, Anna A., Tatyana I. Odintsova, Eugene A. Rogozhin, Alexander K. Musolyamov, Yaroslav A. Andreev, Eugene V. Grishin, и Tsezi A. Egorov. Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds. Biochimie 93, вып. 3: 450–56.

РАЗРАБОТКА НАБОРА ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРОВ С ЕДИНЫМ САЙТОМ КЛОНИРОВАНИЯ

Черняев К.А.^{1,2}, Карлов В.Д.², Лебедева М.В.²

**1 – МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия;
2 – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН, Москва, Россия.
skdw12345@gmail.com**

Стандартное клонирование генов в вектора с использованием реакций рестрикции и лигирования представляет собой длительную процедуру с необходимостью промежуточной очистки продукта. Помимо этого, для клонирования гена в отдельно

взятый вектор необходимо подбирать специфические сайты рестрикции и получать ПЦР-продукт, подобранный для каждого вектора, что приводит к увеличению затрат реактивов и времени. Поэтому в данной работе был создан набор векторов с единым сайтом клонирования, в которых входят векторы для двугибридного дрожжевого скрининга, экспрессии в дрожжевых клетках, экспрессии в бактериальных клетках, получения трансгенных растений. Единый сайт клонирования позволяет эффективно работать с большим набором генов и не производить подбор специальных условий для каждого клонирования. В данном наборе клонирование генов осуществляется по сайтам рестрикции BsaI по технологии Golden Gate. Технология Golden Gate позволяет осуществлять реакцию рестрикции и лигирования в одной пробирке без необходимости промежуточной очистки за счёт необратимости протекаемой реакции. При наличии единого сайта клонирования в каждом векторе, один ПЦР - продукт можно использовать для клонирования во все имеющиеся вектора, что позволяет исключить процесс подбора условий клонирования для имеющихся векторов и ампликонов. Дополнительно в единый сайт клонирования была добавлена кассета для экспрессии красного флуоресцентного белка. При эффективном клонировании ампликона происходит удаление кассеты, экспрессирующей красный флуоресцентный белок, за счёт рестрикции данной кассеты по двум сайтам BsaI, что позволяет проводить быструю селекцию клонов, содержащих целевую вставку на основе их морфологического признака.

Данный подход к конструированию генетических конструкций позволяет существенно ускорить и упростить дальнейшие исследования. Использование единственной рестриктазы и отсутствие этапа промежуточной очистки также снижает финансовые траты. Разработанный набор векторов с единым сайтом клонирования представляет особую ценность для исследователей, активно занимающихся молекулярной биологией.

ДНК-МАРКЕРЫ БЕСШИПНОСТИ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *ROSACEAE*

Э.Х. Шаймарданова², Р.С. Рахмангулов¹, Л.В. Погорелец¹, Д.Ю. Шаймарданов¹

1 – Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы»

В современных условиях, эффективное сельскохозяйственное производство невозможно без применения ресурсосберегающих сортов, поэтому все большую популярность в мире среди аграриев набирают сорта растений с отсутствием шипов на стеблях. В декоративном растениеводстве наличие шипов на стеблях также представляет собой важную проблему, поскольку шипы часто могут повреждать сам цветок и травмировать работников. Целью данной работы является обзор современного состояния знаний и освещение последних достижений в области молекулярной генетики и селекции бесшипности семейства Rosaceae.

Большое и разнообразное семейство Розовые (*Rosaceae*) включает в себя около 3000 видов и около 100 родов. До 90 видов растений этого семейства являются экономически важными и включают в себя фрукты (например, ежевика, яблоко) и декоративные растения (например, роза) (Longhi et al. 2014).

Известны множество генов, которые могут быть использованы в селекции розоцветных с актуальными задачами для центральных районов России: выведение

высокопродуктивных сортов с бесшипными побегами, хорошо адаптированных к неблагоприятным факторам внешней среды. Одним из таких генов является *TTG1*, который расположен на 5 хромосоме, 3 экзона (на примере арабидопсиса).

Гены, используемые при селекции на бесшипность. Трихомы представляют собой одноклеточные или многоклеточные придатки, которые происходят только из протодермы клеток воздушного эпидермиса и различаются в зависимости от местоположения, морфологии и секреции отдельного растения (Serna, Martin, 2006). Лежащие в основе генетические и молекулярные механизмы развития трихомы хорошо поняты на модели *Arabidopsis thaliana*. Кроме того, многочисленные гены были ранее идентифицированы с помощью голых мутантов и клонирования генов (Payne et al., 2000)

Alicia Kellogg et al., показывали, что колючки розы (*Rosa hybrida*), ежевики (*Rubus rubus*) и малины (*Rubus idaeus*) представляют собой модифицированные железистые трихомы, которые продолжают расти и в конечном итоге затвердевают до их окончательной морфологии колючек в виде разрастаний эпидермальной ткани (Kellogg et al., 2011).

TTG1 является одним из важных генов, контролирующих развитие трихом у *Arabidopsis*. Еще в 1999 году определили, что ген *TTG1* кодирует белок WD40 у рода *Arabidopsis* (Walker et al., 1999). По данным Huang X et al., ген *RrTTG1* совпадает со своими ортологами гена *TTG1* у лесной земляники (*Fragaria vesca*), розы (*Rosa rugosa*), персика (*Prunus persica*) и арабидопсиса. Филогенетический анализ подтвердил, что *RrTTG1* кластеризуется вместе с гомологами из семейства *Rosaceae*, демонстрируя, таким образом, теснейшую связь с гомологами *TTG1* у лесной земляники и розы, и в близкородственных последовательностях гомологичных генов малины и яблони (*Malus domestica*) (Huang X., 2022)

Известно, что ген *TTG1* регулирует инициацию трихом, а также дифференцировку клеток эпидермиса у *A. thaliana* путем образования связи комплекса транскрипционных факторов MBW с фактором транскрипции R2R3 MYB GLABRA1 (GL1) и фактором транскрипции bHLH GLABRA3 (GL3) или энхансером GLABRA3 (EGL3) для активации экспрессии гена *GLABRA2* (GL2) (Pattanaik et al., 2014).

Таким образом, гены, кодирующие белок TTG могут быть использованы в селекции бесшипных сортов розоцветных.

Список литературы:

1. Huang X, Yi P, Liu Y, Li Q, Jiang Y, Yi Y, Yan H. RrTTG1 promotes fruit prickles development through an MBW complex in *Rosa roxburghii*. *Front Plant Sci.* 2022 Aug 29;13:939270. doi: 10.3389/fpls.2022.939270. PMID: 36105707; PMCID: PMC9465040.
2. Kellogg, A. A., Branaman, T. J., Jones, N. M., Little, C. Z., and Swanson, J. D. (2011). Morphological studies of developing *Rubus* prickles suggest that they are modified glandular trichomes. *Botany* 89, 217–226.
3. Longhi S, Giongo L, Buti M, Surbanovski N, Viola R, Velasco R, Ward JA, Sargent DJ (2014) Molecular genetics and genomics of the Rosoideae: state of the art and future perspectives. *Hortic Res* 1:1
4. Pattanaik S., Patra B., Singh S. An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 5(e141), 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00259
5. Payne, C. T., Zhang, F., and Lloyd, A. M. J. G. (2000). GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* 156, 1349–1362. doi: 10.1093/genetics/156.3.1349
6. Serna L, Martin C: Trichomes: different regulatory networks lead to convergent structures. *Trends Plant Sci.* 2006, 11 (6): 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.04.008>
7. Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC: The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which

regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell*. 1999, 11: 1337-1349 <https://doi.org/10.1105/tpc.11.7.1337>

РЕЦЕПТОРПОДОБНЫЕ КИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА LRR-RLKIII КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ПАСЛЕНОВЫЕ, УСТОЙЧИВЫХ К ПЕКТОБАКТЕРИОЗАМ

Шруб Е.В., Колубако А.В., Бадалян О.А., Вычик П.В., Николайчик Е.А.

Белорусский государственный университет (БГУ), Минск, Республика Беларусь
E-mail: shrubkaterina@gmail.com

Бактерии рода *Pectobacterium* вызывают заболевание «черная ножка» стеблей и мягкие гнили различных органов у растений семейства *Solanaceae*, которые могут наносить существенный ущерб урожаю важных сельскохозяйственных культур, в особенности картофеля.

У растений, как известно, врожденный активный иммунитет представлен двумя глобальными механизмами: МТИ (МАМР-индуцируемый иммунитет) и ЕТИ (эффektor-индуцируемый иммунитет). Особый интерес вызывают *R*-гены (гены устойчивости), которые являются основными компонентами в эффektor-индуцированном иммунитете. В свою очередь *R*-гены являются весьма разнообразной группой, которая подразделена на 8 классов на основе различий в доменной структуре [1]. Одним из классов *R*-генов являются рецепторподобные киназы с лейцин-богатыми повторами (LRR-RLK). В геномах представителей семейства Пасленовых обнаружено более 600 генов LRR-RLK, которые выполняют самые разнообразные функции в сфере роста и развития растения. Большинство из них считаются ответственными за детекцию патогенов, однако функционально охарактеризованы единицы таких *R*-генов. На сегодняшний день специфических иммунных рецепторов к представителям рода *Pectobacterium* у Пасленовых не описано. Однако у *Malus x domestica* охарактеризованы 4 LRR-RLK из третьего подсемейства LRRIII (DIPM1-4), чьи киназные домены специфически взаимодействуют с эффektorным белком DspE и участвуют в распознавании *Erwinia amylovora* [2]. Так как ортолог DspE является основным эффektorом и у *Pectobacterium* spp. [3], логично было предположить, что у Пасленовых есть рецепторные киназы из подсемейства LRR-RLKIII, способные специфически связываться с этим эффektorом.

Мы провели филогенетический анализ рецепторов подсемейства LRRIII из основных видов Пасленовых, *Arabidopsis thaliana* и ещё нескольких экспериментально охарактеризованных рецепторов других видов растений. Опираясь на полученные данные, мы выбрали несколько генов-кандидатов для более детального исследования. Проведена проверка киназных доменов RLK в дрожжевой двухгибридной системе на способность связываться с DspE. Исследовалась также реакция растений с сайленсингом генов рецепторных киназ на заражение пектобактериями.

В результате были охарактеризованы рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5, взаимодействующие с эффektorом DspE *P. versatilis*. При связывании их киназных доменов с DspE происходит усиление реакции гиперчувствительности в месте внедрения фитопатогена и подавление жасмонатного сигнального пути, а сайленсинг генов данных киназ делает растения более устойчивыми к пектобактериозу [4]. Такие RLK можно отнести к *S*-генам, которые могут быть выгодными мишенями для генной инженерии. Был также обнаружен кандидат на роль *R*-гена из растения *Solanum bulbocastanum*: его продукт способен связываться с DspE, а сайленсинг этого гена приводит к потере устойчивости к пектобактериозу.

Таким образом, представители LRR-RLKIII могут являться как R-, так и S-генами, которые могут стать удобными мишенями для различных инструментов геномного редактирования с целью создания сортов растений сем. *Solanaceae*, устойчивых к *Pectobacterium* spp.

Список литературы:

1. Gururani, M. Plant disease resistance genes: Current status and future directions / M. Gururani // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2012. – Vol. 78 – P. 51-65.
2. Apple Proteins that Interact with DspA/E, a Pathogenicity Effector of *Erwinia amylovora*, the Fire Blight Pathogen / X. Meng [et al.] // *MPMI*. – 2006. – Vol. 19, № 1. – P. 53-61.
3. Николайчик Е.А., Овчинникова Т.В., Валентович Л.Н., Губич О.И., Шолух М.В., Евтушенко А.Н. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности // *Доклады НАН Беларуси*. – 2005. – т.49, №5. – с. 81-85.
4. Бадалян, О.А. Рецепторподобные киназы RLK2 и RLK5 *Nicotiana benthamiana* участвуют в регуляции экспрессии генов ключевых компонентов иммунной системы растения при контакте с *Pectobacterium carotovorum* / О.А. Бадалян, Е.А. Николайчик // *Известия национальной академии наук Беларуси*. – 2014. – Vol. 4 – P. 75-80.

**СЕКЦИЯ
«КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ, РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ
РАСТЕНИЙ»**

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ

Авакумов А.Д.¹, Голиванов Я.Ю.²

1 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

E-mail: info@rgau-msha.ru

2 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42

E-mail: iab@iab.ac.ru

Аллелопатия – это биохимическое взаимодействие между организмами, которое может иметь как положительное, так и отрицательное воздействие, имеющее характер защиты или конкуренции.

За аллелопатию отвечают четыре группы веществ: антибиотики – выделяются микроорганизмами, служат для подавления жизнедеятельности других микроорганизмов; маразмины – выделяются микроорганизмами, служат для подавления жизнедеятельности высших растений; фитонциды – выделяются высшими растениями, служат для подавления жизнедеятельности микроорганизмов; колины – выделяются высшими растениями, служат для подавления жизнедеятельности других высших растений. В данной статье рассматривается взаимодействие между растениями, поэтому нас интересуют соединения из группы колинов.

Аллелопатия может быть как моно-, так и полигенным признаком, слабо коррелирующим с урожайностью и иными характеристиками. Более того, синтез аллелохимических соединений кодируется одними генами, а их способность выходить в окружающую среду – другими, и также зависит от фазы развития и состояния растения. Растения, находящиеся в состоянии стресса, активнее синтезируют и выделяют аллелохимические соединения.

Считается, что дикие предки нынешних видов сельскохозяйственных культур обладали более высокой аллелопатической активностью, а в ходе селекции по хозяйственно-полезным признакам данное свойство было ослаблено. В 1973 году М.А. Панчук и Н.Л. Прутенская, а в 1974 году А.М. Гродзинский и М.А. Панчук провели эксперимент, в ходе которого выяснили, что экстракт растительных остатков пырея оказывает более токсичное влияние на корни редиса и кресс-салата, чем экстракт растительных остатков пшеницы. Полученный пшенично-пырейный гибрид в первых поколениях проявлял большую фитотоксичность, чем в более поздних, когда у растений было всё меньше признаков пырея и всё больше признаков пшеницы (Киселёва, 2000). Таким образом, чтобы не потерять хозяйственно-полезные признаки имеющихся сортов и гибридов, но при этом повысить их аллелопатическую активность, наиболее верным будет применение методов генной инженерии с целью переноса генов, ответственных за синтез и выделение аллелохимических соединений. Примеры повышения аллелопатической активности растений с помощью генной инженерии уже имеются. Так были получены трансгенные растения табака с введённым из растений фасоли геном, ответственным за синтез фермента фенилаланин-аммонийлиазы, являющимся ключевым в синтезе фенольных соединений, оказывающих аллелопатическое действие. У таких растений концентрация хлорогеновой кислоты в листьях была выше в 1,8-2,6 раза по сравнению с контрольными образцами (Киселёва, 2000).

Помимо того, что аллелопатически активные растения лучше подавляют сорняки и тем самым облегчают агротехнику, они могут оказывать положительное влияние на совместно произрастающие с ними растения, так как они, произрастая вместе,

подстраивают свои ритмы питания и выделения друг к другу, что формирует единый пул веществ, пополняемый и поглощаемый всеми компонентами ценоза (Кононов, 2018).

Список литературы:

1. Кононов, А. С. Гетерогенные посевы (экологическое учение о гетерогенных агроценозах как о факторе биологизации земледелия) : монография / А. С. Кононов, В. Е. Ториков, О. Н. Шкотова. — Санкт-Петербург : Лань, 2018. — 296 с. — ISBN 978-5-8114-2682-9.

2. Киселёва Н.А. Использование аллелопатии в генетике и селекции сельскохозяйственных растений // Агро XII. 2000. №2. – С. 12-13

ОРТОДОКСАЛЬНЫЕ И РЕКАЛЬЦИТРАНТНЫЕ СЕМЕНА – ДВЕ СТРАТЕГИИ АДАПТАЦИИ

Азаркович М.И.

*ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ФГБУН ИФР РАН), Москва 127276;
E-mail: m-azarkovich@ifr.moscow*

У большинства семян при созревании одновременно с накоплением запасных продуктов происходит генетически детерминированное снижение влажности, семена приобретают устойчивость к высушиванию и могут храниться долгое время, не теряя жизнеспособности. Такие семена называют ортодоксальными. Семена накапливают не один, а несколько запасных продуктов, причем не только белковые, но и крахмалистые, и масляные семена всегда содержат запасные белки. Запасные белки имеют сложную четвертичную структуру, которая дает возможность дегидратации при созревании и регидратации при прорастании семян. Откладываясь в вакуолях (которые в зрелых семенах становятся белковыми телами), запасные белки при созревании семян рано выводятся из метаболизма клетки, они не разрушаются собственными протеазами, при этом гидролитические ферменты тоже запасаются в алейроновых зернах (белковых телах). Для выживания в сухом состоянии семя должно избежать разрушения клеточных структур, как во время потери воды при созревании, так и при последующем набухании. Кроме высокоорганизованного процесса отложения в запас труднорастворимых соединений ортодоксальные семена обладают набором синергически действующих защитных механизмов, таких как синтез защитных молекул (пролин, ди- и олигосахариды), способность координировано приостанавливать метаболизм, а также синтез и накопление малых белков теплового шока и термостабильных LEA белков. Синтез и накопление LEA-белков, кодируемых *LEA*-генами, во время развития семян коррелирует с приобретением устойчивости к высушиванию. Установлено, что эти процессы контролируются АБК. Сверхэкспрессия LEA белков может вызывать накопление других защитных веществ. Сам процесс накопления запасных веществ в семенах организован таким образом, чтобы способствовать сохранению жизнеспособности в условиях обезвоживания. К настоящему времени многие процессы формирования ортодоксальных семян изучены подробно, на молекулярном уровне: определены транскрипционные факторы, участвующие в созревании семян: LAFL (сеть транскрипционных факторов LEC1, ABI3, FUS3, LEC2), белки, регулирующие различные этапы созревания: DOG1, DOG4, DOGL4. Показано, что DOG 1 (DELAY OF GERMINATION 1) – главный регулятор покоя семян, в то время как DELAY OF GERMINATION 1-LIKE 4 (DOGL 4) индуцирует накопление запасных веществ в созревающих семенах.

В то же время есть семена, которые не высыхают при созревании и неустойчивы к обезвоживанию, их называют рекальцитрантными. Рекальцитрантные семена имеют некоторые виды древесных растений (например, из родов *Panax*, *Corylus*, *Acer*, *Quercus*, *Castanea*, *Aesculus*, *Salix*, *Juglans*, *Hevea*), а также ряд важных хозяйственных растений: *Cocos nucifera* L., *Theobroma cacao* L., *Cola nitida* Vent., *Zizania aquatica* L. и ряд других. Рекальцитрантные семена распространены среди видов, обитающих в тропиках и субтропиках, где климатические условия позволяют семенам прорасти сразу после опадения. Выделяют еще интермедиантные (промежуточные по устойчивости к высыханию) семена, например, кофе (*Coffea arabica* L.), помело (*Citrus maxima* L.). Среди видов покрытосеменных растений около 75-80% продуцируют ортодоксальные семена, 10-15% - интермедиантные и 5-10% - рекальцитрантные.

С точки зрения сельскохозяйственного производства рекальцитрантность семян представляется серьезной проблемой, ведь единственным способом длительного хранения таких семян является дорогостоящая криоконсервация. В отличие от ортодоксальных семян, рекальцитрантные семена к моменту опадения с материнских растений сохраняют активный метаболизм и высокую влажность. Для тропических экосистем максимально быстрое прорастание семян – это возможность избежать поражения патогенными грибами и других проблем длительного пребывания в теплом влажном климате. Сохранение активного метаболизма, отсутствие высыхания при созревании (что ускоряет последующее прорастание) является таким же эволюционным приспособлением, как генетически детерминированное высыхание и устойчивость к потере воды у ортодоксальных семян. Таким образом, в жарком влажном климате рекальцитрантность семян дает виду существенные преимущества. Но при адаптации к более сложным климатическим условиям, например к зиме в средней полосе России, семенам (и целым растениям) придется вырабатывать дополнительные приспособления для выживания.

Анализ белков рекальцитрантных семян каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) выявил уникальные характеристики, которые отличают белковый комплекс рекальцитрантных семян каштана от большинства ортодоксальных семян. В протеоме зародышевых осей и семядолей обнаружено преобладание водорастворимых белков, локализованных в цитоплазме, и удивительно низкое содержание глобулинов. При этом в запасующих частях семени (семядолях) водорастворимых альбуминов оказалось больше, чем в растущих органах (зародышевых осях), а фракция некомпартментализованных термостабильных белков в семядолях составляла основную массу белка клеток. Термостабильные белки, среди которых выявляются и дегидрины - наиболее интересная особенность белков семян *A. hippocastanum*.

Среди белков фракции клеточных структур осей и семядолей семян каштана не обнаружено мажорных компонентов, которые могли бы быть отнесены к запасным белкам. С помощью световой микроскопии и специфического окрашивания белка и фитина также не удалось выявить типичных белковых тел в вакуолях клеток осей и семядолей.

После опадения с материнского растения рекальцитрантные семена растений умеренного климата (таких как каштан конский, дуб черешчатый) вынуждены длительное время находиться под снегом во влажном состоянии. И стратегия адаптации семян, не переносящих высыхания, рекальцитрантных, – это устойчивость к длительному низкотемпературному стрессу – зимним условиям. Семена каштана и дуба имеют совершенно другой фракционный состав белков – мало глобулинов, много альбуминов, большое количество белков, устойчивых к тепловой денатурации. Вполне может быть, что именно гидрофильные термостабильные LEA-белки не только предохраняют клеточные структуры семян от существенной потери влаги (что является фатальным для рекальцитрантных семян), но и обеспечивают устойчивость высокооводненных семян к длительному холодному стрессу. При этом только наличия LEA-белков, по-видимому,

недостаточно для обеспечения той устойчивости к высушиванию, которая характерна для ортодоксальных семян.

Отмеченные особенности белкового состава и ультраструктуры могут быть связаны с рекальцитрантным характером исследованных семян. Такие характеристики протеома, как отсутствие типичных запасных белков (и отсутствие белковых тел в клетках зародыша), накопление большого количества термостабильных белков, могут служить диагностическим признаком рекальцитрантности семян.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИСТЬЕВ DAUCUS CAROTA (МОРКОВИ) IN VITRO

Алжарамани Н.¹, Монахос С.Г.²

1 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет –МСХА имени К.А.Тимирязева», аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений. E-mail: naseemjihadja@gmail.com

2 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет –МСХА имени К.А.Тимирязева», заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений. E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru

Аннотация: Для использования потенциала применения технологии слияния протопластов для решения селекционных задач в рамках селекционных программ по созданию F1-гибридов моркови изучены факторы, оказывающие влияющие на качественные и количественные характеристики метода выделения протопластов: преплазмолиз и экспозиция ферментативной обработки тканей. В результате исследования установлено, что для плазмолиза является эффективным применение 0,3 М сорбита, показано, что высокий выход протопластов можно получить, используя комбинацию ферментов целлюлазы и пектиназы. Зафиксирован самый высокий выход протопластов при инкубации тканей моркови в ферментах в течение 5 ч.

Ключевые слова. *Daucus carota*, протопласт, жизнеспособность, преплазмолиз, регенерация.

Морковь (*Daucus carota* L. subsp. *sativus* Hoffm., $2n = 2x = 18$) является важной корнеплодной культурой во всем мире и одним из первых растений, успешно культивируемых *in vitro*. В настоящее время селекционное улучшение моркови во всем мире основывается на расширении генетического разнообразия с применением современных биотехнологических методов [1,6,7]. Культура протопластов моркови может послужить биотехнологической платформой для реализации альтернативных биотехнологических и молекулярных исследований и методов селекции. Протопласт – это растительная клетка, лишенная клеточной стенки ферментативным или иным методом, сохраняющая тотипотентность и жизнеспособность [2]; Целью данной работы является изучение основных факторов и разработка эффективной системы выделения и очистки протопластов моркови для решения селекционных задач.

Материалы и методы. Растительный материал, донор протопластов: линия моркови Виль-1 из генетической коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н.Тимофеева». Протопласты выделяли из листьев растений, выращенных из семян *in vitro*. Семена моркови стерилизовали трехэтапной процедурой: сначала семена инкубировали при 50°C 10 мин. на водяной бане, затем стерилизовали поверхность путем погружения в 70% и 95% этанол на 5 мин, затем в 5% NaOCl, содержащий 2 капли Твин 20 на 20 мин. Далее их трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Семена для проращивания

высеивали на твердую питательную среду MS [3] с витаминами, дополненную 30 г/л сахарозы и 6,5 г/л агара в чашки Петри диаметром 9 см, около 20 семян на чашку Петри, инкубировали при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в темноте.

Через 7 дней проростки переносили в чашки Петри, содержащие регенеративную среду, состоящую из макро- и микроэлементов MS, 0,1 мг/л тиамин HCl, 0,1 мг/л пиридоксин HCl, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 3,0 мг/л. глицин, мио-инозитол 100 мг/л, сахарозу 20 г/л и фитагель 2,5 г/л. Культуры хранили в климатическом помещении при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, фотопериоде 16 ч и интенсивности света 55 мкмоль м-2 с-1 [4].

Протопласты выделяли из листьев с черешками 5-недельных проростков моркови по протоколу [5] Varanski et al. (2007), с некоторыми изменениями.

Выделение протопластов. Для выделения протопластов из листьев с черешками 5-недельных проростков моркови, около 1 г ткани помещали в стеклянную чашку Петри с 8 мл раствора для преплазмолиза (0,3 М сорбита, 0,05 М CaCl₂·2H₂O), разрезали на мелкие кусочки и затем инкубировали в течение 1 часа в темноте при $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Ферментирование проводили в течение 3 и 5 часов при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ и осторожном встряхивании (30 rpm) в ферментной смеси, состоящей из 1% целлюлазы, 0,1% пектиназы, 20 mM 2-(N-морфолино) этансульфоновая кислоты (MES), 5 mM CaCl₂·2H₂O и 0,6 М маннита, pH 5,6, стерилизованной фильтрацией (0,22 мкм).

В чашку Петри добавляли 10 мл раствора W5, осторожно встряхивая вручную в течение 1 мин для высвобождения протопластов, затем смесь фильтровали через нейлоновые фильтры 40 мкм, оставшиеся в чашке кусочки листьев перемешивали и отжимали в чашку Петри. Стенки чашки ополаскивали 5 мл W5, чтобы получить больше протопластов, и фильтровали, чтобы получить весь раствор, который затем центрифугировали при 150 gcf в течение 10 минут при комнатной температуре в качающемся бакет-ротаторе.

После центрифугирования супернатант сливали, а протопласты в осадке ресуспендировали в 5 мл 0,5 М маннита два раза и к оставшемуся осадку добавляли 2 мл MMG.

Результаты. Условия изоляции чрезвычайно важны для эффективного высвобождения протопластов из листьев *D. carota in vitro*. Судя по результатам, наиболее подходящими условиями для выделения протопластов в исследовании были 0,3 М сорбита, комбинация 0,5% целлюлазы и 0,1% пектиназы и время инкубации 5 часов. Установленный протокол может быть использован для будущих исследований по манипулированию генами, особенно при изучении слияния протопластов.

Экспозиция ферментативной обработки является важным фактором, влияющим на эффективность изоляции протопластов. Если время слишком велико, ферментная жидкость повреждает плазматическую мембрану высвобождающегося протопласта и снижает стабильность протопласта, и слишком короткий ферментативный гидролиз не может обеспечить хорошего эффекта разделения.

Список литературы:

1. Philipp W., Roger E., Jairo V., Leonardo S., Mathilde B., Thomas N., Barbara M., and Young-Seok K., Carrot, published by USDA-ARS// University of Wisconsin, Department of Horticulture 2008. P.327
2. John M., Cell tissue and organ culture: Protoplast Culture. Encyclopedia of Rose Science// Section 5 - Chapter 6, Publisher: Academic Press. 2003. P.90-99
3. Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture// *Physiol Plant*, 1962. P.100–127
4. Ewa G., Marek S., Rafal B., An improved protocol for plant regeneration from leaf and hypocotyl-derived protoplasts of carrot// *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2012. P.101–109
5. Baranski R., Klocke E., Ryschka U., Monitoring the expression of green fluorescent protein in carrot// *Acta Physiol Plant*. 2007. P.239–246

6. Чистова А.В., Биотехнология в селекции моркови с использованием самонесовместимости// Картофель и овощи. 2014, № 10. С.33-36
7. Чистова А.В., Репродукция самонесовместимых линий моркови (*Daucus carota* L.) с использованием культуры тканей// Известия ТСХА.2014, №3, С.43- 50

РОЛЬ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ АГРОЦЕНОЗА НА ОСНОВЕ МИСКАНТУСА (*MISCANTHUS* SPP.)

Анисимов А.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская 49, E-mail: anisimov_a@rgau-msha.ru

Формирование агроценозов на основе многолетних сельскохозяйственных культур – сложный динамический процесс, который основан на комплексном взаимодействии множества разнообразных факторов. К ним относят, в том числе, аллелопатические взаимодействия между культурными и сорными растениями [1]. Аллелопатия – это прямое или косвенное воздействие одного растения на другое, которое осуществляется путём выделения различных химических соединений (аллелохимикалий) в окружающую среду. Аллелохимикалии способны оказывать как ингибирующее, так и стимулирующее действие на рост и развитие произрастающих рядом растений [2]. Существует мнение о том, что аллелопатическая активность в том или ином виде присуща большинству высших растений, однако для подавляющего большинства видов она остаётся крайне малоизученной [3].

Наиболее интенсивно аллелопатические взаимодействия проявляются при длительном выращивании растений на одной и той же территории. В условиях сельскохозяйственного производства и при соблюдении севооборотов подобная ситуация складывается лишь при выращивании многолетних культур. К ним относят и различные виды и сорта мискантуса (*Miscanthus* Anderss.). Все представители рода мискантус – многолетние травянистые растения, которые способны успешно произрастать на одном месте более 20 лет [4].

В 2012 году на Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева был заложен многолетний полевой опыт по изучению различных генотипов мискантуса. При анализе сорного компонента в сформированном агроценозе (начиная с 3 года жизни мискантуса) было отмечено практически полное отсутствие в посадках сорняков из семейства *Brassicaceae*, в то время как представители семейства *Poaceae* и *Asteraceae* присутствовали обильно. В связи с этим была выдвинута гипотеза о наличии у разных видов мискантуса потенциальной аллелопатической активности.

При анализе литературных источников было обнаружено упоминание о наличии в различных частях растений мискантуса биологически активных соединений. Так, в соцветиях мискантуса китайского обнаружены флавоноидные гликозиды, а в листьях, стеблях и корневищах – флавоноид трисин, фриделин, лупеол, ацетат лупеола, фриенол и изоарбориол [5]. Кроме того, существуют упоминания о использовании мискантуса в качестве лекарственного растения [6]. В связи с этим была поставлена цель – выявить и изучить потенциальную аллелопатическую активность представителей рода *Miscanthus*.

В качестве объектов исследования были выбраны различные виды и гибридные формы представителей рода *Miscanthus* - *M. sinensis*; *M. sacchariflorus*; *M. x giganteus*; *M. sinensis x M. sacchariflorus* (*M. x hybrid*). В работе изучали растения 8 года жизни.

В качестве потенциального источника аллелохимикалий у мискантуса были выбраны листья, поскольку они, с одной стороны, составляют существенную долю в его биомассе, а с другой стороны являются тем структурным компонентом, который массово остаётся на поверхности почвы даже при механизированной уборке биомассы. Вытяжку аллелохимикалий из листьев мискантуса готовили путём заливания 100 г сухой биомассы листьев мискантуса 100 мл горячей (90 °С) дистиллированной воды и последующим настаиванием в течение суток. Вытяжку из листьев мискантуса при необходимости разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:1 и 1:2, поскольку методика выявления аллелопатической активности предполагает проращивание тест – растений в различных по концентрации растворах, в которых предполагается наличие аллелопатически активных веществ [7].

В рамках лабораторного эксперимента по проращиванию семян различных тест – растений в вытяжках из листьев разных видов мискантуса отмечено подавляющее действие на ростовые процессы редиса, перца и огурца, и отсутствие воздействия на ростовые процессы пшеницы и гороха. Это позволяет предполагать избирательное действие аллелохимикалий мискантуса.

В рамках вегетационного опыта в лаборатории искусственного климата РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева изучали действие аллелохимикалий из листовых пластинок мискантуса китайского на наиболее восприимчивое к ним растение – редис посевной. Отмечено нарушение формирования корнеплодов редиса под воздействием аллелохимикалий мискантуса китайского.

Таким образом можно утверждать о наличии потенциальной аллелопатической активности у представителей рода *Miscanthus*, и о том, что они могут играть существенную роль в формировании агроценоза на его основе.

Список литературы:

1. Ларикова, Ю. С. Интродукция чужеродных растений и внедрение их в экосистемы / Ю. С. Ларикова, А. Н. Скороходова // Доклады ТСХА, Москва, 03–05 декабря 2019 года. Том Выпуск 292, Часть IV. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2020. – С. 107-109.
2. Кондратьев, М. Н. Аллелопатия как механизм взаимодействия между растениями, растениями и насекомыми, растениями и микроорганизмами / М. Н. Кондратьев, Ю. С. Ларикова // Аграрная наука. – 2019. – № S2. – С. 57-61. – DOI 10.32634/0869-8155-2019-326-2-57-61.
3. Роль экссудатов семян и корней во взаимодействиях между растениями разных видов в ценозе / М. Н. Кондратьев, Ю. С. Ларикова, О. С. Демина, А. Н. Скороходова // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 2. – С. 40-53. – DOI 10.26897/0021-342X-2020-2-40-53.
4. Анисимов, А. А. Особенности формирования урожая различными видами мискантуса (*Miscanthus spp.*) / А. А. Анисимов, М. С. Медведков, А. Н. Скороходова // Аграрная наука - сельскому хозяйству : Сборник материалов XVI Международной научно-практической конференции. В 2-х книгах, Барнаул, 09–10 февраля 2021 года. Том Книга 1. – Барнаул: Алтайский государственный аграрный университет, 2021. – С. 115-116.
5. Фруентов Н.К. Лекарственные растения дальнего востока. Хабаровск: Хабаровское Книжное Изд.. 1987. 344 с.
6. . Xi Q., Jezowski S. 2004. Plant resources of *Triarrhena* and *Miscanthus* species in China and its meaning for Europe. *Plant Breeding and Seed Science*. 49: 63-77
7. Ларикова, Ю. С. Современные представления об эколого-физиологической роли корневых экссудатов растений (обзорная статья) / Ю. С. Ларикова, О. Г. Волобуева // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2021. – № 4(40). – С. 93-101. – DOI 10.24412/2309-348X-2021-4-93-101.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ОТСУТВИЯ ОСВЕЩЕННОСТИ НА ИНДУКЦИЮ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК ОГУРЦА (*CUCUMIS SATIVUS L.*)

С.Н. Белов¹, Д.М. Зупарова², Е.А. Домблидес¹

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства» Россия, 143072, Московская область, Одинцовский г.о., пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14

2 – Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан Республика Узбекистан, 111215, Ташкентская область, Кибрайский район, ул. Университетская, E-mail: 2 belov.ser.nik@gmail.com

Создание оптимальных условий для культивирования семян огурца является ключевым этапом технологии получения гаплоидов методом гиногенеза. Для стимулирования эмбриогенеза неопыленные семяпочки огурца подвергают различным видам обработки. Чаще всего, используют термический шок, вызванный повышенными положительными температурами. Ученые изучавшие этот фактор, отмечают, что применение в течении 2-4 дней температурной обработки 35°C, способствует повышению индукции эмбриогенеза от 6,2 до 89,4% по сравнению с контролем [1–3].

В исследовании нами были изучены два температурных режима: +28°C и +32°C, в условиях отсутствия освещенности в течение 7 дней. Затем семяпочки были перенесены в температуру +25°C и фотопериод 16/8. В качестве контроля использовались условия культивирования при температуре +25°C и фотопериоде 16/8.

В качестве донорных растений использовались два генотипа огурца полученные в лаборатории селекции и семеноводства тыквенных культур ФГБНУ ФНЦО:103*231-ЭК и 133*13-МЛ. Донорные растения выращивались в вегетационной камере при температуре +23°C, и фотопериоде 16 часов света/8 часов темноты. Введение семяпочек в культуру *in vitro* проводилось, согласно разработанной в ФГБНУ ФНЦО методике [4]. Для культивирования семяпочек, использовались питательные среды MS [5], СВМ [1], ИМС [6] с добавлением TDZ в концентрации 0,04 мг/л и AgNO₃ в концентрации 10 мг/л. Для культивирования семяпочек использовали стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 60 мм и высотой 15 мм (ООО «Биомедикал», Москва, Россия). Семяпочки вводились в чашки Петри, по 25 семяпочек на чашку. Опыты были заложены в трехкратной повторности.

Для всех вариантов опыта наблюдалась индукция гинногенного развития. Семяпочки изменились по цвету, размеру и форме. В момент введения в культуру, мы наблюдали прозрачную, бесцветную структуру каплевидной формы. В дальнейшем окраска стала зеленого цвета, и клетки специализированной ткани начинали дифференцироваться.

В исследовании сравнивались результаты культивирования семяпочек двух разных генотипов – 103*231-ЭК и 133*13-МЛ - в различных условиях. Для каждого генотипа были определены оптимальные параметры культивирования и выявлены тенденции изменения эффективности в зависимости от изменения условий.

Для генотипа 103*231-ЭК оптимальными условиями культивирования были температура +25°C при фотопериоде 16/8. При отсутствии освещенности и повышенной температуры количество отозвавшихся семяпочек снижалось на 19,34% по сравнению с контрольным образцом. Повышение температуры с +28 °C до +32 °C приводило к снижению эффективности на 3,99%.

Максимальная эффективность для культивирования семяпочек была при использовании питательной среды MS (72%) в оптимальных условиях. Однако, изменение условий культивирования привело к снижению эффективности до 49,42%. При культивировании на питательных средах СВМ и ИМС эффективность индукции в условиях

температуры +25°C фотопериода 16/8 составила 57,32% и 58,58% соответственно. Изменение условий культивирования снизило эффективность использования этих сред до 45,32% (СВМ) и 30,68% (ИМС).

Для генотипа 133*13-МЛ, наоборот, оптимальные условия включают отсутствие освещенности и повышенную температуру (+32 °C). В таких условиях эффективность индукции увеличивается на 5,32% относительно контроля. Повышение температурного режима от +28°C до +32°C увеличило количество индуцированных семян на 15,54%.

В контексте питательных сред, исследование показало, что максимальную эффективность демонстрирует среда ИМС при отсутствии света и температуре +32°C градуса, обеспечивая отзывчивость семян до 53,32%. В то же время, для среды MS, аналогичные условия являются оптимальными, однако отзывчивость семян снижается на 12%. Для среды СВМ, оптимальными условиями являются контрольные условия опыта (48%). Семена на данной среде, проявляют наибольшую чувствительность к отсутствию света, снижая свою эффективность на 25,32% при +28°C и на 12% - при +32°C.

В результате исследования, использование питательной среды MS при фотопериоде 16/8 и температуре +25°C показало наилучшую эффективность индукции для генотипа 103*231-ЭК, в то время как для генотипа 133*13-МЛ наилучшие результаты были получены на питательной среде ИМС при отсутствии освещенности и температуре 32°C. Эффективность индукции для этих условий составила 72% и 53,52% соответственно. Не смотря на индукцию гиногенного развития растения – регенеранты были получены только у генотипа 103*231-ЭК.

Список литературы:

1. Gémes-Juhász A. et al. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // Plant Cell Rep. 2002. Vol. 21, № 2. P. 105–111.
2. Diao W.-P. et al. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers // Scientia Horticulturae. 2009. Vol. 119, № 3. P. 246–251.
3. Moqbeli E. et al. In vitro cucumber haploid line generation in several new cultivars // Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 2013. Vol. 21, № 1. P. 18–25.
4. Белов С.Н. Улучшенный способ введения в культуру in vitro неопыленных семян огурца (*Cucumis sativus* L.). ФГБНУ ФИЦ 'Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени НИ Вавилова' // Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР: материалы Всероссийской. 2022. P. 145.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. 1962. Vol. 15. P. 437–497.
6. Domblides E. et al. Production of doubled haploid plants of Cucurbitaceae family crops through unpollinated ovule culture in vitro // VI International Symposium on Cucurbits 1294. 2019. P. 19–28.

ПОЛУЧЕНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ОГУРЦА (*CUCUMIS SATIVUS* L.) В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯНОЧЕК

Белов С.Н., Коротцева И.Б., Домблидес Е.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО), Россия, 143072, Московская область, Одинцовский г.о., пос. ВНИИССОК. E-mail: belov.ser.nik@gmail.com

Оптимизация этапов технологии получения удвоенных гаплоидов огурца, позволит повысить эффективность технологии и внедрить ее в традиционный селекционный процесс, для ускорения создания линий огурца, обладающих комплексом хозяйственно-ценных признаков.

В качестве донорных растений использовали коллекционные образцы и селекционные линии огурца полученные лабораторией селекции и семеноводства тыквенных культур ФГБНУ ФНЦО. Донорные растения выращивали в условиях кондиционируемой вегетационной камеры при 23°C и фотопериоде 16 часов день/8 часов ночь, освещенности 9 тыс. люкс. Сбор женских завязей и закладку опытов выполняли с середины февраля по середину сентября, с растений, возраст которых не превышал 10 недель. Опыт проводился на питательных средах MS [1], СВМ [2], ИМС [3]. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием общепринятых математико-статистических методов с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2016 для Windows 10.

Исследование показало, что используя семяпочки из завязей, размером от 2,1 до 2,6 см, в день цветения, образуется на 30% больше эмбриоподобных структур по сравнению с завязями, размером от 1,6 до 2,0 см введенных в культуру за сутки до цветения [4].

Для получения стерильной культуры, достаточно провести поверхностную стерилизацию завязи в течение 5-7 минут в 5% растворе гипохлорита натрия. Увеличение времени стерилизации до 15 минут, позволяет дополнительно размягчить стенку завязи и облегчить извлечение семяпочек [4].

Экспериментальным путем был подобран оптимальный способ механического раскрытия завязи с использованием препаровальной иглы, который упрощает процесс извлечения семяпочек и позволяет уменьшить количество поврежденных семяпочек, по сравнению с традиционным методом поперечного и продольного разрезания завязи скальпелем [5].

При изучении влияния компонентов питательной среды ИМС на развитие семяпочек, было установлено, что при культивировании семяпочек на среде, где в качестве гелеобразующего агента используется Phytigel, площадь семяпочек увеличивается быстрее на 0,06 мм² в сутки, чем при использовании агар-агара. Однако, на агар-агаре удалось получить на 12% больше индуцированных семяпочек, чем на средах с Phytigel [6].

Добавление в питательную среду регуляторов роста, таких как TDZ (тидазурон) и 2,4-D (2,4 - дихлорфеноксиуксусная кислота), позволяет увеличить процент индуцированных семяпочек. При использовании TDZ в концентрации 0,1 мг/л максимально удалось получить 83,5% индуцированных семяпочек, в то время как использование 2,4-D в концентрации 0,2 мг/л индуцировало 73,6% семяпочек.

Эксперименты по изучению влиянию добавления нитрата серебра, проведенные на индукционных питательных средах MS, СВМ и ИМС с добавлением TDZ в концентрации 0,04 мг/л, показали, что AgNO₃ в концентрации 10 мг/л способствует увеличению числа индуцированных семяпочек, образующих морфогенный каллус (до 11,97%).

Для регенерации побегов из гиногенного каллуса при использовании питательной среды MS с добавлением ВАР (6-бензиламинопурин) в концентрации 3 мг/л и NAA (1-нафтилуксусная кислота) в концентрации 0,05 мг/л эффективность регенерации составила 37% и были получены растения огурца.

Оценка растений – регенерантов с использованием проточной цитометрии показала присутствие в выборке диплоидных (71 %), тетрапоидных (25 %) и эндополиплоидных (4 %) образцов.

В результате проведенной работы в культуре неопыленных семяпочек огурца были получены 103 растения, и лишь для 18 из них удалось получить семенное потомство, давшее начало гомогенным линиям. Полученные линии огурца в условиях весенней

пленочной теплицы продемонстрировали высокую степень выровненности по морфологическим признакам. Одна из лучших гомозиготных линий была вовлечена в скрещивания для оценки ее комбинационной способности. Гибридная комбинация, полученная с участием этой линии, отличалась очень крупными, мощными и выравненными растениями, а также: женским типом цветения, завязываемостью плодов 56% и более, урожайностью на уровне стандарта и др. хозяйственно полезными признаками.

Финансирование: «Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Фонда имени Геннадия Комиссарова».

Список литературы:

1. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant*. 1962. Vol. 15. P. 437–497.
2. Gémes-Juhász A. et al. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *Plant Cell Rep*. 2002. Vol. 21, № 2. P. 105–111.
3. Domblides E. et al. Production of doubled haploid plants of Cucurbitaceae family crops through unpollinated ovule culture in vitro // VI International Symposium on Cucurbits 1294. 2019. P. 19–28.
4. Домблидес Е.А. et al. Получение ДН-растений огурца (*Cucumis sativus* L.) в культуре неопыленных семяпочек in vitro: 6 // *Овощи России*. 2019. № 6. P. 3–9.
5. Белов С.Н. Улучшенный способ введения в культуру in vitro неопыленных семяпочек огурца (*Cucumis sativus* L.). ФГБНУ ФИЦ ‘Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени НИ Вавилова’ // *Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР: материалы Всероссийской*. 2022. С. 145.
6. Белов С.Н. Влияние различного гелеобразующего агента в составе питательной среды на индукцию гиногенного развития неопыленных семяпочек огурца (*Cucumis sativus* L.): 5 // *Овощи России*. 2022. № 5. С. 15–23.

ЭМБРИОКУЛЬТУРА - ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ В SPEED BREEDING ОСНОВНЫХ ПОЛЕВЫХ КУЛЬТУР

**Бизякина Д.О.^{1,2}, Алкубеси М.^{1,2}, Крупина А.Ю.¹, Свистунова Н.Ю.¹,
Радзенице С.Б.¹, Канунникова В.Ю.¹, Блинков А.О.¹, Кочешкова А.А.¹,
Дивашук М.Г.¹**

**1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550;
E-mail: dasha.biz@mail.ru**

**2 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА
имени К.А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева)**

В настоящее время Speed Breeding является активно развивающейся технологией, способствующей ускоренной вегетации растений. С его помощью возможно получать вдвое больше поколений сельскохозяйственных культур в год по сравнению с классическим выращиванием в поле и теплице. Speed Breeding имеет большое значение для массовой гибридизации, при получении чистых селекционных линий, в создании картирующих популяций. Также технология позволяет быстро выявлять фенотипические признаки у растений при изучении новых аллелей, найденных в коллекциях или целенаправленно созданных с помощью геномного редактирования [1].

Для сокращения генеративной фазы развития растений в технологии Speed Breeding используют высушивание незрелых семян. Подход заключается в том, что на 10-20 сутки (в зависимости от культуры) после начала цветения срезают соцветия с завязавшимися на них незрелыми семенами, подвергают высушиванию при температуре 28-35°C в течение недели, обмолачивают незрелые семена и сразу же готовят к посеву. Данный подход удобен своей простотой, однако имеет ряд ограничений, связанных с продолжительной сушкой, а также потерей времени на обмолачивание, закладку семян на проращивание и стратификацию. К тому же, из-за незавершённого послеуборочного покоя семян не удаётся получить массовых дружных всходов. Культура изолированных зародышей уже давно является распространённым методом в сокращении времени вегетации растений. Этот метод способен сокращать циклы размножения растений за счёт очень раннего изолирования зародышей и доращивания их на питательных средах. Совместное использование эмбриокультуры со Speed Breeding способно предоставить гораздо более продуктивные результаты в экономии времени, чем использование их по отдельности. В связи с этим **целью** нашей работы являлось активное внедрение и изучение основных параметров эмбриокультуры в технологии Speed Breeding яровых и озимых злаков, кукурузы и подсолнечника.

Исследования были проведены на подсолнечнике (гибриды F₁ Клеопатра и Корона), кукурузе (сорта Ранняя лакомка 121, Лакомка Белогорья), яровых злаках (тритикале сорта Дублет, мягкая пшеница сорта Новосибирская 67, твёрдая пшеница сорта Ясенка), и озимых злаках (тритикале сортов Илия, Венец, Хлебобоб; мягкая пшеница сортов Московская 39, Каравай, Азотофиксирующая; твёрдая пшеница селекционных линий 3596h56, Цель, Кордон). Донорные растения выращивали в условиях Speed Breeding, подобранных нами для каждой конкретной культуры. Для всех генотипов изолирование зародышей проводили на 15 сутки после цветения. Все культуры подвергали единой поверхностной стерилизации семян: в течение 15 минут семена выдерживали в 50% растворе коммерческого средства «Белизна» при постоянном помешивании на шейкере, после чего промывали три раза по пять минут в стерильной воде. Для подсолнечника в стерилизующий раствор добавляли 1 каплю поверхностно-активного вещества Tween 20 для эмульгации липидов. Культивирование проводили в чашках Петри, содержащих среду MS. Чашки Петри с зародышами помещали в условия световой комнаты. Выросшие зародыши отмывали от питательной среды и высаживали в торф, первую неделю выращивали при повышенной влажности, после чего помещали в оптимальные для каждой из культур условия.

Применение стерилизации, описанной выше способствовало минимизированию возможной контаминации, а также низкой цитотоксичности. В процессе культивирования инфекция наблюдалась на единичных зародышах, многие из которых несмотря на заражение проявляли хорошую регенерационную способность и дальнейший активный рост в почве. В среднем по сортам частота регенерации составляла для подсолнечника 82,2±14%, для яровых злаков 93,9±5,8% и для кукурузы 100%. В основном гибель зародышей на питательной среде наблюдалась из-за механического повреждения колеоптиля или колеоризы у злаков, а также зачаточного корешка или апикальной меристемы побега у подсолнечника в процессе изолирования.

Приживаемость при пересадке в почву в пробных экспериментах составляла 100% для всех культур. Однако, при использовании эмбриокультуры для конкретных практических целей и массовых постановок (было изолировано 4500 зародышей) приживаемость в почве уменьшилась, однако эффективность подхода от этого не пострадала.

Дополнительным преимуществом эмбриокультуры является также то, что чашки Петри с изолированными зародышами озимых культур возможно подвергать классической яровизации. Более того, был обнаружен тот факт, что изолированные зародыши проходят яровизацию быстрее, чем пророщенные семена. Также, было

обнаружено, что растения, выращенные из зародышей по размеру и озернённости уступают растениям, выращенным из семян. Однако, для задач Speed Breeding это не является проблемой.

В конечном итоге, при совместном использовании технологии Speed Breeding и эмбриокультуры период вегетации 1 поколения (от посева до изолирования зародыша) составлял для яровой мягкой пшеницы сорта Новосибирская 67 в среднем 56 суток, для гибрида F₁ подсолнечника Корона в среднем 60 суток, для кукурузы сорта Лакомка Белогорья в среднем 70 суток, для озимой твёрдой пшеницы сорта Кордон в среднем 79 суток. Таким образом, вегетационный период ускоряется более чем на 47 дней для яровых злаков, более чем на 42 дня у подсолнечника и на более чем 30 дней у кукурузы по сравнению с выращиванием растений в поле.

Список литературы:

1. Bhatta M., Sandro P., Smith M.R., Delaney O., Voss-Fels K.P., Gutierrez L., Hickey L.T. Need for speed: manipulating plant growth to accelerate breeding cycles. 2021. 60: 101986.

СКВАЛЕН В ЭКСУДАТЕ РЫЛЬЦА ПЕСТИКА *LILIUM LONGIFLORUM* L. И *NICOTIANA TABACUM* L.

Воронков А.С.¹, Иванова Т.В.¹, Брейгина М.А.², Клименко Е.С.², Бабушкина К.²

**1 – ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН),
127276 Москва, Ботаническая 35; E-mail: voronkov_as@mail.ru**

**2 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ), 119991
Москва, Ленинские Горы 1-12**

Методом газовой-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в эксудате рылец лилии (*Lilium longiflorum* L., сорт Белое небо) и табака (*Nicotiana tabacum* L., сорт. Маленькая Гаванна SR1) был обнаружен сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен). Данное вещество идентифицировано в эксудате цветковых впервые. Концентрацию сквалена в эксудате можно выразить на среднюю массу рыльца (у табака она составляет в среднем 2,7 мг, для лилии около 60 мг), которую определяли гравиметрическим методом в ходе эксперимента. Таким образом, на 1 мг массы рыльца табака приходится 0,18 нг сквалена, а для лилии 0,29 нг.

Мы проверили возможное влияние на *in vitro* прорастания пыльцы *L. longiflorum* и *N. tabacum* сквалена. В широком диапазоне концентраций обнаружена лишь слабая стимуляция (5%) при его внесении экзогенно в количестве, превышающем в 100 раз концентрацию в табачном эксудате, а более низкие дозы не оказывали сколь либо заметного эффекта на прорастание и рост пыльцы.

Известно, что сквален является предшественником биосинтеза стероидов в растительных клетках, а так же участвует в их ответе на абсцизовую кислоту (АБК). Сообщается о случаях, когда увеличение эндогенного образования сквалена или ингибирование ферментов, метаболизирующих сквален, приводило к изменению экспрессии ферментов биосинтеза АБК и способствовало увеличению содержания этого фитогормона в вегетативных тканях растений. В свою очередь, АБК-зависимые элементы присутствуют в генах сквалениназы, генах ферментов, которые метаболизируют сквален и генах транскрипционных факторов, регулирующих синтез сквалена и тритерпеноидов. Однако, влияние АБК на биосинтез сквалена сложно и неоднозначно: известны примеры, когда экзогенная АБК как усиливает, так и подавляет накопление сквалена в тканях растений.

Вероятно, что сквален может являться предшественником других веществ и обеспечивать защитную, механическую функцию, а также контролировать баланс активных форм кислорода (АФК) в эксудате рылец. Сквален обладает антиоксидантными свойствами, в частности, способность гасить свободные радикалы и, таким образом, может участвовать в поддержании баланс АФК во время опыления.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 21-74-10054) и поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (122042700043-9).

Список литературы:

1. Breygina M., Kochkin D.; Voronkov A., Ivanova T., Babushkina K.; Klimenko E. Plant hormone and fatty acid screening of *Nicotiana tabacum* and *Lilium longiflorum* stigma exudates. *Biomolecules* 2023, 13, 1313. <https://doi.org/10.3390/biom13091313>
2. Breygina M., Voronkov A., Ivanova T., Babushkina K. Fatty acid composition of dry and germinating pollen of gymnosperm and angiosperm plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 9717. <https://doi.org/10.3390/ijms24119717>
3. Voronkov A.S. and Ivanova T.V. Fatty acids composition of the epiphytic ferns, *Platyserium bifurcatum* and *Asplenium nidus*, and the terrestrial fern, *Asplenium trichomanes*. *American Fern Journal*, 2021. 111(2):117–128. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-111.2.117>
4. Cowan A.K., RAILTON I.D. The biosynthesis of abscisic acid in a cell-free system from embryos of *Hordeum vulgare*. *J. Plant Physiol.*, 1987, 131, 423–431. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80285-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80285-7)
5. Romero P., Lafuente M.T. The combination of abscisic acid (ABA) and water stress regulates the epicuticular wax metabolism and cuticle properties of detached citrus fruit. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 10242. <https://doi.org/10.3390/ijms221910242>
6. Mansouri H., Asrar Z., Szopa J. Effects of ABA on primary terpenoids and D9-tetrahydrocannabinol in *Cannabis sativa* L. at flowering stage. *Plant Growth Regul.*, 2009, 58, 269–277. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9375-y>
7. Micera M., Botto A., Geddo F., Antoniotti S., Bertea C.M., Levi R., Gallo M.P., Querio G. Squalene: More than a Step toward Sterols. *Antioxidants*, 2020, 9, 688. <https://doi.org/10.3390/antiox9080688>

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ПОИСКА НОВЫХ СЕМЕЙСТВ СИГНАЛЬНЫХ ИММУННЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ

Ганаева Д.Р., Ляпина И.С., Фесенко И.А.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН), 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;
Email: fesignor@gmail.com*

Сигнальные пептиды выполняют множество различных функций в растениях, от регуляции процессов роста и развития до участия в ответе на заражение фитопатогенами. Отдельные семейства коротких секретлируемых пептидов (КСП) были найдены почти у всех покрытосеменных, однако более масштабный анализ все еще затруднен [1, 2]. Кроме того, поиск принципиально новых регуляторных пептидов представляет собой сложную задачу, поскольку большинство разрабатываемых соответствующих инструментов основаны на гомологии с последовательностями уже известных пептидных семейств и не позволяют выполнять поиск видоспецифичных пептидов [3].

Мы разработали алгоритм поиска пептидов, участвующих в регуляции иммунного ответа, у разных таксонов растений, используя транскриптомы растений, полученные после заражения фитопатогенами. Мы опробовали этот алгоритм на модельном растении мхе *Physcomitrium patens* (заражение *Botrytis cinerea*), а также применили его для поиска новых и неизвестных пептидов в нескольких видах сельскохозяйственно важных растений, таких как *Zea mays* (заражение *Colletotrichum graminicola*), *Brassica napus* (заражение *Sclerotinia sclerotiorum*), *Solanum tuberosum* (заражение *Pectobacterium carotovorum*). Пайплайн нашего алгоритма включает в себя предсказание открытых рамок считывания, способных кодировать короткие белковые последовательности, предсказание сигнальной последовательности, трансмембранных и известных белковых доменов, а также поиск консервативных мотивов, связанных с активностями известных семейств пептидов. Кроме того, были выполнены предсказание третичных структур и дальнейший структурный поиск с использованием баз данных белковых последовательностей.

Разработанный алгоритм позволил нам обнаружить пептиды, относящиеся к известным семействам, вовлеченным в регуляцию иммунного ответа растений, такие как nsLTP, CAPE, RALF, PIP и др. Кроме того, были обнаружены пептиды из известных семейств, для которых не было подтверждено участие в иммунном ответе (MEG, EPFL, CEP, TAX и др.), а также были найдены совершенно новые кандидаты последовательностей, которые могут играть роль в ответе растений на биотический стресс. Предсказание третичных структур позволило получить дополнительную информацию о новых кандидатах, предположить их функциональность, а также провести сравнительный анализ структур пептидных семейств, обнаруженных в разных таксонах растений. Для подтверждения участия новых кандидатов иммунных пептидов в защитном ответе, модельное растение *Physcomitrium patens* было обработано синтетическими последовательностями. В случае успешного экспериментального подтверждения предполагаемых нами функций в перспективе представляется возможным использовать предобработку растений синтетическими сигнальными пептидами для повышения устойчивости растений к фитопатогенам, что может служить достойной альтернативой существующим средствам защиты растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Грант 23-74-10048 “Функции цистеин-богатых пептидов в иммунном ответе растений”).

Список литературы:

1. Boschiero, C., Dai, X., Lundquist, P.K., Roy, S., Bang, T.C. de, Zhang, S., Zhuang, Z., Torres-Jerez, I., Udvardi, M.K., Scheible, W.-R., et al., MtSSPdb: The Medicago truncatula Small Secreted Peptide Database. *Plant Physiology* 2020, 183, 399–413.
2. Lyapina, I., Filippova, A., Kovalchuk, S., Ziganshin, R., Mamaeva, A., Lazarev, V., Latsis, I., Mikhalechik, E., Panasenko, O., Ivanov, O., et al., Possible role of small secreted peptides (SSPs) in immune signaling in bryophytes. *Plant Mol Biol* 2021, 106, 123–143.
3. Liu, Z., Hou, S., Rodrigues, O., Wang, P., Luo, D., Munemasa, S., Lei, J., Liu, J., OrtizMorea, F.A., Wang, X., et al., Phyto cytokine signalling reopens stomata in plant immunity and water loss. *Nature* 2022, 605, 332–339.

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СПОСОБНОСТЬ ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛИ (*SCHIZAPHIS GRAMINUM* R.)

Голиванов Я.Ю.

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

Одна из важных областей в биологии – поиск и изучение модельных объектов для разнообразных областей исследований, которые могут быть связаны с экологическими, биологическими, биохимическими и генетическими аспектами жизни организмов. В отношении тлей такими исследованиями могут быть учеты численностей, оценки эффективности борьбы, а также различного рода лабораторные опыты, для которых имеет значение методики содержания модельных объектов [6].

Особенности онтогенеза являются главными факторами, которые определяют успешность содержания и разведения лабораторных объектов. В связи с чем методики содержания должны быть пластичными и подходить под разные аспекты исследований. Тли – одни из модельных объектов, которые имеют большое значение для сельского хозяйства и обладают многими адаптивными особенностями, что делает их изучение всесторонне важным. Сложность и динамичность жизненных циклов заставляет искать разные подходы к содержанию данных насекомых в лабораторных условиях, а перманентные трофические отношения с растениями делает невозможным изучение тлей без оценки растения-хозяина и их взаимодействия. Известно, что в лабораторных условиях некоторые показатели онтогенеза злаковых тлей могут различаться с природными популяциями [4, 5]. Также известно, что репродуктивная способность сильно дифференцирована даже внутри вида, на разных образцах и сортах злаков [2, 3]

Оптимизация сельского хозяйства всего стремится к поиску новых средств совершенствования аграрного процесса, в связи с чем все чаще можно встретить исследования по влиянию регуляторов роста растений на качество и количество урожаев. Отмечается повышение иммунного ответа к различного рода болезням и усиление устойчивости к абиотическим стрессам. Однако, неизвестно влияние данных агрохимикатов на сосущих вредителей, которые напрямую связаны с растением и зависимы от его биохимического состава.

В данном исследовании тлей содержали по оригинальной методике Голиванов, Я. Ю. Содержание злаковых тлей в лабораторных условиях [1], которая, по другим нашим исследованиям, показала возможность поддержания стабильной популяции с оптимальной численностью для лабораторных исследований. А также проводили обработку двумя регуляторами роста растений Вэрва, ВЭ и Экопин, ТПС, методом опрыскивания с использованием закрепителя (Твин 25), после чего проводили оценку репродуктивной способности обыкновенной злаковой тли (*Schizaphis graminum* R.) на обработанных растениях в сравнении с контролем. Контролем выступили те же растения, но без использования регуляторов роста.

Исследования показали, что при использовании регуляторов роста численность обыкновенной злаковой тли увеличивается вдвое, а некоторых образцах втрое по сравнению с контролем (те же растения, но без обработки регуляторами).

Существенных различий между препаратом Вэрва и Экопин не было выявлено.

Также один образец не имел существенных различий между средней численностью тлей на обработанных и необработанных растениях. Один образец показал наименьшую численность тлей в условиях регуляторов, вероятно, это может быть связано с частичной устойчивостью данного образца к обыкновенной злаковой тле.

Список литературы:

1. Учебно-методическое пособие / Я. Ю. Голиванов. – Москва : Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. – 32 с.
2. Голиванов, Я. Ю. Оценка репродуктивной способности обыкновенной злаковой тли (*Schizaphis graminum* Rondani, 1852) на сортообразцах яровой тритикале (*Triticosecale* Wittm & Camus) в лабораторных условиях / Я. Ю. Голиванов // Доклады ТСХА, Москва, 03–05 декабря 2019 года. Том Выпуск 292, Часть IV. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2020. – С. 96-98.
3. Голиванов, Я. Ю. Оценка репродуктивных показателей злаковой тли на разных генотипах яровой тритикале / Я. Ю. Голиванов, С. А. Блинова, А. А. Соловьев // Вавиловские чтения - 2016 : сборник статей международной научно-практической конференции, посвященной 129-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова, Саратов, 24–25 ноября 2016 года. – Саратов: Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, 2016. – С. 192-194.
4. Голиванов, Я. Ю. Оценка заселения злаковыми тлями коллекции сортообразцов яровой тритикале / Я. Ю. Голиванов, С. А. Блинова, В. В. Гриценко // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 6. – С. 42-51.
5. Голиванов, Я. Ю. Особенности биологического развития черемухово-злаковой тли (*Rhopalosiphum padi*) в лабораторных условиях / Я. Ю. Голиванов, В. В. Зелененко, В. В. Гриценко // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 4. – С. 142-148.
6. Siddique, H.R.; Saleem, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. *Life Sci.* 2011, 88, 285–293.

УСТОЙЧИВОСТЬ *AGROBACTERIUM RADIOBACTER* 204 К РАЗЛИЧНОМУ УРОВНЮ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛЕЙ

Грицевич К.С., Абдурашитов С.Ф.

**ФГБУН Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма
(ФГБУН НИИСХК) Симферополь 295043 E-mail: priemnaya@niishk.site**

Засоленность представляет собой постоянную угрозу урожайности, особенно в странах, где орошение является важным подспорьем в сельском хозяйстве. Хотя устойчивость растений к засолению различна, виды сельскохозяйственных культур, как правило, не переносят одну треть концентрации солей, содержащихся в морской воде. Попытки улучшить солеустойчивость сельскохозяйственных культур с помощью обычных программ селекции имели очень ограниченный успех из-за сложности признака: солеустойчивость сложна генетически и физиологически [1]. Таким образом, поиск симбиотических микроорганизмов влияющие на устойчивость растений к солям и засухе, является актуальной задачей. Гены, отвечающие за синтез холина и бетаина, обнаруживают у *Sinorhizobium melliloti*, *Agrobacterium radiobacter*, ген *betB* не оказывает существенного влияния на симбиотическую эффективность ни в стандартных условиях, ни под действием стресса, тогда как ген *betB2*, расположенный на симбиотической плазмиде, влияет на адаптивность растений и симбиотическую эффективность в условиях солевого стресса. Следовательно, копии *bet* генов, закрепленные на разных репликациях, претерпевают функциональную диверсификацию, что, несомненно, влияет на адаптивный потенциал ризобий [2]. При анализе генома *A. radiobacter* 204 [3], были обнаружены гены, отвечающие за синтез бетаина. Штамм *A. radiobacter* 204 является агентом биопрепаратов разработанных на базе НИИСХ Крыма и входит в Крымскую

Коллекцию Микроорганизмов (<http://www.ckp-rf.ru/usu/507484/>), увеличивает продуктивность, ростовые качества и обладает защитными свойствами для растений [4]. Цель исследования изучение солеустойчивости агента биопрепаратов *Agrobacterium radiobacter* для расширения адаптивного потенциала растений.

Изучение свойств коллекционного штамма проводили в жидких средах LB (пептон 10г, дрожжевой экстракт 5 г, NaCl (в зависимости от концентрации соли) на один литр) и горохового отвара (горох 200 г/л, сахароза 15 г /л), концентрацию NaCl устанавливали от 0 М до 1 М. Культивирование проводилось в спектрофотометре FlexA 200 (AllGene, Китай) в 96 луночном планшете. В каждую лунку вносили по 120 μ l жидкой культуры штамма с концентрацией $1,48 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Режим культивирования при среднем встряхивании и температуре 28°C. Рост культуры оценивали по показателю OD₆₀₀ с интервалом 2 часа в течении четырех суток.

В ходе исследований выявлено, что бактерии развиваются в условиях содержания соли вплоть до 0,6 М, однако большая скорость развития наблюдается в концентрациях до 0,3 М NaCl. При культивировании *A. radiobacter* 204 на гороховой среде было выявлено, что lag-фаза у образцов с концентрацией соли 0 М и 0,1 М NaCl длилась 12 часов, а у 0,2 М, 0,3 М и 0,4 М NaCl 14, 16 и 18 часов соответственно. Для бактерий, культивируемых при 0,5 М NaCl, была характерна lag-фаза продолжительностью в 20 часов. Фаза логарифмического роста у вариантов 0-0,4 М NaCl длилась 10 часов. А в пробе с концентрацией 0,5 М, фаза логарифмического роста длилась 30 часов. Стационарная фаза до снижения численности бактерий длилась для образцов с концентрацией соли 0-0,3 М NaCl 6 часов, в вариантах с концентрацией 0,4 М NaCl эта фаза длилась 20 часов. Образец 0,5 М NaCl в течении всего времени наблюдения медленное увеличение численности бактерий, по итоговому графику количество микроорганизмов достигала $2,1 \cdot 10^9$ КОЕ. При культивировании *A. radiobacter* 204 на среде LB, были получены сопоставимые данные, однако количество микроорганизмов было выше на 12% по сравнению с гороховой средой. Что, возможно, говорит о более подходящем компонентном составе среды LB. Анализ РНК, выделенной из образцов, показал, активность генов, отвечающих за синтез choline dehydrogenase (BetA) и betaine aldehyde dehydrogenase (BetB) в вариантах 0 М и 0,2 М. Было выявлено, что *A. radiobacter* 204 может культивироваться при концентрации 0,5 М NaCl, а нормально развиваться при 0,3М. Такой уровень солей соответствует содержанию в почве 2,5% NaCl. Известно, что почва считается засоленной, при содержании солей от 0,25% [5].

Таким образом, *A. radiobacter* 204 обладает высокой устойчивостью к засолению при высоких значениях концентрации NaCl в среде. Это обосновывает актуальность изучения солеустойчивости штамма и осмопротекторных свойств при симбиозе с растениями, а также генетического аппарата синтеза осмопротекторов.

Список литературы:

1. Flowers T.J. Improving crop salt tolerance // Journal of Experimental Botany. – 2004. – Vol. 55. – No. 396. – P. 307-319.
2. Румянцева, М. Л., Мунтян В.С. Клубеньковые бактерии *Sinorhizobium meliloti*: солеустойчивость и ее генетическая детерминированность 2015. 84.263.
3. Puzanova E., Abdurashytov S., Aksenova T. Complete Genome Sequence of the *Agrobacterium radiobacter* 204, Obtained Using Oxford Nanopore Technologies Sequencing 2021. S1:2029.
4. Каменева И.А., Мельничук Т.Н., Якубовская А.И. Комплексный биопрепарат для оптимизации минерального питания растений, защиты от фитопатогенов, повышения продуктивности и способ получения этого биопрепарата Патент № 2777194 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А01N 63/20, С05F 11/08.: № 2022100801: заявл. 13.01.2022: опубл. 01.08.2022.

5. Носиров Н.К., Кобули З.В., Амирзода О.Х. Засоление почв, как эколого-географическая проблема и пути её решения по восстановлению вторично засоленных земель, на примере Бешкентской долины Хатлонской области 2021.76:81

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТИПА ЭКСПЛАНТА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ КЛЕЩЕВИНЫ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Демиденко Д.В.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550
E-mail: Frankenvini1998@mail.ru

Клещевина (*Ricinus communis* L.) является широко возделываемой коммерческой сельскохозяйственной культурой. Это обусловлено присутствием в ее семенах большого количества касторового масла. В состав касторового масла входит рицинолевая кислота, обеспечивающая его высокую стабильность и вязкость, что позволяет использовать его в качестве сырья для целого ряда производств [1]. Касторовый жмых – субпродукт, образующийся после экстракции масла из семени, является потенциально ценным кормовым объектом для сельскохозяйственных животных благодаря наличию целого ряда ценных белков и клетчатки [2]. Однако из-за присутствия в ее составе белкового компонента рицина, инактивирующего рибосомы и, как следствие, синтез белков, касторовая мука может использоваться только в качестве удобрения [3].

Поскольку химическое или тепловое воздействие на семена для детоксикации рицина значительно снижает их питательные свойства, возникает необходимость получения сортов с пониженным содержанием этого белка или с его полной редукцией как методами классической селекции, так и посредством инструментов генетической инженерии. В настоящей работе была проведена оценка регенеративной способности и морфогенетического потенциала растений клещевины сорта Занзибар Грин в зависимости от типа экспланта и состава питательной среды, что является подготовительным этапом к генетической трансформации.

Первоначально в эксперименте участвовали четыре типа эксплантов (черешки семядолей, черешки листьев, фрагменты стеблей и фрагменты гипокотилей) в трех повторностях. Экспланты помещались на среды следующего состава: 1) Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением 1 мг/л зеатина, 0,1 мг/л ИУК, 5 мг/л AgNO₃; 2) MS + 0,25 мг/л тидиазурона (TDZ) + 0,1 мг/л ИУК + 5 мг/л AgNO₃.

По прошествии 42 суток были получены следующие результаты: несмотря на обильное каллусообразование на обеих средах, у черешков семядолей и фрагментов гипокотилей регенерации не наблюдалось. Для черешков листьев и фрагментов стеблей частота регенерации на среде с зеатином не превышала 1%, на среде с TDZ регенерация наблюдалась только у фрагментов стеблей и ее частота составила 0,7%. Данные показатели свидетельствуют о том, что у выбранных эксплантов низкий морфогенетический потенциал независимо от состава среды.

Исходя из полученных первичных результатов, был выбран новый тип экспланта – 7-ми суточный гипокотиль. В данном случае использовали среду с зеатином в качестве гормона цитокинина, так как на этом типе среды регенерационная способность эксплантов в предварительном эксперименте была выше. В качестве эксплантов помимо 7-ми суточных гипокотилей были выбраны более крупные фрагменты стеблей и черешки листьев так же в трех повторностях.

На 42 сутки были получены следующие результаты: для черешков листьев средняя эффективность регенерации для трех повторностей составила 2,6%, для фрагментов стеблей – 27,78%, для 7-ми дневных гипокотелей – 74,36% от общего количества заложённых эксплантов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что регенерационная способность эксплантов клещевины существенно зависит от их типа, при этом наблюдалось резкое повышение морфогенетического потенциала фрагментов стеблей при увеличении их первоначального размера. После отработки протокола регенерации будет проведена постановка генетической трансформации клещевины с типами эксплантов и составом среды, показавшими себя наиболее эффективно.

Список литературы:

1. Sousa N.L., Cabral G.B., Vieira P.M., Baldoni A.B., Aragão F.J. Bio-detoxification of ricin in castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds. 2017. 7:15385.
2. Patel V.R., Dumancas G.G., Viswanath L.C.K., Maples R., Subong B.J.J. Castor oil: properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. 2016. 9:1-12.
3. Worbs S., Köhler K., Pauly D., Avondet M.A., Schaer M., Dorner M.B., Dorner B.G. Ricinus communis intoxications in human and veterinary medicine-A summary of real cases. 2011. 3:1332-1372.

УСКОРЕНИЕ СЕЛЕКЦИИ КАБАЧКА И ПАТИССОНА (*CUCURBITA PEPO* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Ермолаев А.С., Домблидес Е.А., Коротцева И.Б., Химич Г.А., Кан Л.Ю., Широкова А.В., Слетова М.Е., Домблидес А.С.

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО), 143080, Московская область, Одинцовский район, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14
e-mail: Ermolaevalexeystanislavovich@gmail.com**

Создание линейного материала кабачка и патиссона методами классической селекции является достаточно трудоемким и длительным (5-7 поколений инбридинга) процессом. Использование биотехнологических подходов, а именно культуры неопыленных семяпочек *in vitro* для *Cucurbita pepo* L. является одной из перспективных гаплоидных технологий, позволяющих добиться полной гомозиготности за одно поколение и ускорить селекционный процесс. Изучение влияния критических факторов на индукцию гиногенеза и регенерацию растений в культуре *in vitro* позволит повысить эффективность технологии и поставить на поток создание линий удвоенных гаплоидов для получения конкурентноспособных гибридов F₁ кабачка и патиссона.

Цель исследования – оптимизируя этапы технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* получить исходный гомозиготный материал кабачка и патиссона.

Исследование проводилось в 2019-2023 годах и индуцировать гиногенное развитие и получить растения-регенеранты удалось у 30 из 42 изученных генотипов *C. pepo*. Впервые в культуре изолированных семяпочек *in vitro* были получены гомозиготные растения патиссона за один вегетационный период.

Проведенные на двух генотипах (Голдкрэш F₁ и Камили F₁) эксперименты с бутонами разной степени раскрытия цветка (2 суток до распускания (FL-2), 1 сутки (FL-1) и полностью раскрывшийся цветок (FL) показали, что оптимальной стадией для введения

в культуру будет – FL (17,3% и 12,0% индукции гиногенного развития). В четыре раза меньше эмбриоидов было получено из бутонов на стадии (FL-1) и полное отсутствие гиногенного развития наблюдалось из бутонов FL-2.

Был оптимизирован этап стерилизации и предложен вариант с краткосрочным обжиганием завязи после обработки 96% спиртом. Это позволило сократить временные затраты с 50 минут (при ступенчатой стерилизации с использованием 5% раствора гипохлорита натрия) до 1 минуты для получения эксплантов со 100% отсутствием контаминации и без потери эмбриогенного потенциала семяпочек.

Предобработка завязей при +4⁰С в течение 1 суток оказалась неэффективной и значительно снижала количество индуцированных семяпочек (в 2-10 раз) у всех изученных генотипов, а увеличение времени холодовой предобработки до 2 суток ингибировало гиногенез и образование эмбриоидов было отмечено только у одного (Голдкрэш F1 - 1,3 индуцированных семяпочек/чашку Петри) из восьми генотипов.

При тестировании индукционных питательных сред (MS, CBM, IMC) наилучшие результаты были получены на питательной среде IMC (Induction Medium for Cucurbitaceae), разработанной в ФГБНУ ФНЦО, и содержащей повышенное содержание KNO₃ (2496,3 мг/л), увеличенное количество никотиновой кислоты (5 мг/л) и обогащённый аминокислотный состав. На 30 генотипах было изучено влияние на эмбриогенез наиболее часто используемых для индукции гиногенеза у *C. pepo* регуляторов роста (2 мг/л 2,4 D; 0,2 мг/л TDZ; 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК). Для девяти генотипов образование эмбриоидов происходило только на среде с добавлением 2 мг/л 2,4 D; для восьми генотипов на среде с 0,2 мг/л TDZ; для четырех на среде с 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК; восемь генотипов отзывались как на питательной среде с 2 мг/л 2,4 D, так и с 0,2 мг/л TDZ, а один генотип на среде с 0,2 мг/л TDZ и на среде с 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК. Было отмечено, что первые эмбриоиды на среде с 2 мг/л 2,4 D появлялись через 5 недель культивирования, а на среде с 0,2 мг/л TDZ и на среде с 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК появляются через 6-7 недель. При культивировании семяпочек как на агаризованных (7 г/л), так и на жидких питательных средах образование эмбриоидов через 45 суток происходило только на средах с концентрацией сахарозы 20 г/л и 40 г/л, а использование 60 г/л и 80 г/л было неэффективным. Отмечалась разница в изменении размеров культивируемых семяпочек уже после 7 дней культивирования (семяпочки на питательных средах с сахарозой 20 г/л были в 1,4 раза меньше, чем на питательных средах с сахарозой 80 г/л). После оптимизации основных этапов технологии максимальный выход эмбриоидов для образцов патиссона составил до 16 шт на 100 культивируемых семяпочек, а для генотипов кабачка – до 55 эмбриоидов.

На основе трех методов (проточной цитометрии, прямого подсчета хромосом и по параметрам абаксиального эпидермиса) среди проанализированных растений-регенерантов кабачка и патиссона, успешно прошедших этап адаптации к условиям *ex vitro*, было определено: диплоидов – 32,35%, триплоидов – 26,47%, тетраплоидов – 33,82%, октаплоидов – 4,41%, анеуплоидов – 2,94%. Гаплоидные растения были обнаружены только в культуре *in vitro*. *C. pepo* оказался трудным в цитологическом плане объектом ввиду большого количества хромосом ($2n=2x=40$), мелкого их размера (около 2 мкм), малой частоты митозов и небольшого числа метафаз с хорошим разбросом хромосом. При использовании пропион - лакмоидного способа окраски (не требует предварительной фиксации) были получены микрофотографии гаплоидных, диплоидных, триплоидных и тетраплоидных клеток из растений-регенерантов кабачка и патиссона. Наиболее стабильным показателем абаксиального эпидермиса для идентификации пloidности, не зависящим от условий выращивания, является количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Для диплоидных образцов патиссона и кабачка он составляет в среднем от 9,41 до 11,31 шт, для триплоидных от 14,84 до 16,3 шт, а у тетраплоидных до 17,58 шт. По результатам оптимизации протокола проточной цитометрии клеточных ядер, было установлено два цитотипа для диплоидных образцов *C.*

pero с содержанием ДНК $2C=1,07\pm 0,03$ пг для образцов кабачка, и второй цитотип $2C=0,95\pm 0,03$ пг для образцов патиссона. Впервые с использованием сканирующего электронного микроскопа были получены изображения и изучены морфометрические показатели пыльцевых зерен (ПЗ) гиногенных линий кабачка и патиссона с различным уровнем ploидности. У диплоидных растений (2n) кабачка и патиссона диаметр ПЗ составлял $109,09\pm 0,85$ мкм и $103,26\pm 2,00$ мкм, соответственно, а у тетраплоидных (4n) – $148,13 \pm 0,25$ мкм и $135,54\pm 0,78$ мкм.

Из 10 протестированных SSR-маркеров, было отбрано два (СМТm61 и СМТmС27), которые могли быть использованы у изученных генотипов для оценки происхождения полученных растений-регенерантов кабачка. Среди проанализированных растений 70% были гомозиготными и подтвердили гиногенное происхождение из гаплоидных клеток.

Были проведены скрещивания между гомозиготными диплоидными и тетраплоидными растениями и впервые получены триплоидные бессемянные гибриды кабачка.

Среди растений-регенерантов кабачка и патиссона, проведенная иммунологическая оценка позволила выявить шесть слабовосприимчивых линий к *Podosphaera xanthii*, со степенью развития болезни не более 20%.

В результате, проведенной работы и оценки по хозяйственно-ценным признакам было выделено 19 перспективных ДН линий (кабачка (10 шт) и патиссона (9 шт)), а также две тетраплоидные линии кабачка, которые будут включены в скрещивания. Внедрение гаплоидных технологий в селекционный процесс будет способствовать построению уникальных селекционных схем и ускоренному созданию сортов и гибридов нового поколения, отвечающих требованиям рынка.

ПОЛУЧЕНИЕ ГОМОЗИГОТНЫХ РАСТЕНИЙ СВЕКЛЫ САХАРНОЙ И СТОЛОВОЙ В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК IN VITRO

Заячкова Т.В., Алёхина К.Г., Тукусер Я.П., Домблидес Е.А.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр овощеводства", Московская область, Одинцовский городской округ, посёлок ВНИИССОК, 143080
E-mail: taivka34@mail.ru*

В настоящее время с увеличением потребления сельскохозяйственной продукции наиболее важных овощных и технических культур семейства Amaranthaceae, в частности рода Beta – свеклы столовой (*Beta vulgaris* L. ssp. *europaea* Krass. var. *atrorubra* Krass.) и сахарной (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* convar. *crassa* var. *altissima*), возникла острая необходимость разработки технологий, ускоряющих процессы селекции этих культур. Одной из самых перспективных технологий, интенсивно разрабатываемых во многих странах мира и позволяющих существенно ускорить селекционный процесс создания полностью гомозиготных растений свеклы до 1-2 лет, является технология получения удвоенных гаплоидов методом гиногенеза (ДН-технологии) [3,5]. В результате проведенных исследований за последние годы уже были получены удвоенные гаплоиды сахарной свеклы, опубликованы протоколы получения ДН-растений свеклы сахарной и столовой; однако, несмотря на это, процесс получения гаплоидов этих культур связан с низкой эффективностью на этапах индукции гиногенеза, а также процесса регенерации и требует оптимизации элементов этой технологии [1,2,6,7].

В наших исследованиях использовались фертильные линии-опылители для гибридов Рубин F1 и Корвет F1 свеклы сахарной № 37130, № 37131 и перспективный сортобразец № 36764, а также гибридные популяции свеклы столовой сортотипа Бордо и

сортопопуляции – Нежность и Добрыня. Для успешной индукции гиногенеза у свеклы использовали семяпочки, содержащие зрелый зародышевый мешок, что соответствовало бутонам, расположенным на участке колосовидного цветоноса донорных растений сразу за недавно раскрытым бутонем. Для успешной индукции гиногенеза как свеклы сахарной, так и столовой рекомендуется использовать твердую индукционную питательную среду ИМВ с добавлением тидиазурона (TDZ) в концентрации 0.4 мг/л и культивирование при температуре 28 °С в темноте в течение четырех недель, что позволяет увеличить количество отзывчивых семяпочек свеклы столовой в среднем в зависимости от генотипа до 9%, а в лучшем варианте эксперимента у наиболее отзывчивого генотипа свеклы Нежность до 25% [9]. Наиболее эффективная индукция гиногенеза была достигнута у свеклы сахарной, составившая в среднем 16,7%, а максимально у наиболее отзывчивого генотипа № 37130 - 27%. При использовании TDZ в более высокой концентрации 0.8 мг/л индукционная способность семяпочек свеклы сахарной снижалась в 1,9 раза или вовсе отсутствовала. Отмечено, что наибольшая эффективность индукции гиногенеза у всех изученных генотипов свеклы сахарной достигнута в варианте без применения предобработки бутонов холодом и составила 16%. Показано, что наибольшая индукционная активность семяпочек всех исследуемых генотипов достигнута при концентрации сахарозы в питательной среде 5%. Снижение концентрации сахарозы до 2%, либо увеличение до 8% было не эффективно. Выявлено, что лучшие результаты гиногенного развития свеклы сахарной достигнуты на твердой питательной среде, а использование жидкой индукционной питательной среды оказалось менее эффективным у всех генотипов и приводило к уменьшению выхода отзывчивых семяпочек у генотипа № 37130 в 1.7 раза; у генотипа № 36764 в 2 раза; а у № 37131 к полному отсутствию индукции гиногенеза [8]. В ходе исследования выявлено, что гиногенное развитие свеклы столовой на твердой питательной среде проходило, преимущественно, по пути каллусогенеза, а у свеклы сахарной – через прямой эмбриогенез, часто с одновременным образованием эмбрионидных и каллусных структур, а в редких случаях образованием сросшихся эмбрионидов в результате полиэмбрионии. Гиногенное развитие свеклы сахарной на жидкой питательной среде проходило только по пути прямого эмбриогенеза без образования каллусных структур. Определено, что эмбриониды и каллусные структуры свеклы успешно развивались с формированием микророзеток на твердой регенерационной питательной среде MS [4] с 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГК. В отличие от свеклы столовой, у всех исследуемых генотипов свеклы сахарной удалось инициировать регенерацию и получить микророзетки/микроробегии. Наибольший выход растений, адаптированных к условиям *ex vitro*, в количестве 24 штук, отмечен у двух генотипов - № 37130 и № 36764, у которых из большинства индуцированных семяпочек удалось получить растения-регенеранты, причем с одной семяпочки в среднем было получено до 7,2 микроробегов. У свеклы столовой отмечена более низкая регенерационная способность, только у четырех из шести генотипов удалось инициировать побегообразование и получить микророзетки/микроробегии, из которых только у трех генотипов (Нежность, Добрыня, № 128) получены растения, адаптированные к условиям *ex vitro*. Использование безгормональной питательной среды MS приводило к укоренению только 5% микроробегов свеклы столовой. Развитие корневой системы у 80% микроробегов было достигнуто только погружением основания побегов на 10-15 с в раствор индолилмасляной кислоты в концентрации 50 мг/л. Дополнительного этапа укоренения для микроробегов свеклы сахарной не требовалось. С использованием проточной цитометрии, прямого подсчета хромосом и замыкающих клеток устьиц эпидермиса с абаксиальной поверхности листьев гиногенных растений свеклы сахарной и столовой показано, что все полученные растения-регенеранты были гаплоидами ($2n=x=9$).

Список литературы:

1. Gurel, S.; Pazuki, A.; Aflaki, F.; Gurel, E. Production of Doubled Haploid Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Plants through Gynogenesis. In *Doubled Haploid Technology: Emerging Tools, Cucurbits, Trees, Other Species; Methods in Molecular Biology*; Segui-Simarro, J.M., Ed.; Humana: New York, NY, USA, 2021; Volume 3, pp. 313–323.
2. Kiszczak, W.; Burian, M.; Kowalska, U.; Gorecka, K.; Podwyszynska, M. Production of Homozygous Red Beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) Plants by Ovule In Doubled Haploid Technology: Emerging Tools, Cucurbits, Trees, Other Species, *Methods in Molecular Biology*; Segui-Simarro, J.M., Ed.; Humana: New York, NY, USA, 2021; Volume 3, pp. 301–312.
3. Mezei, S.; Kovacev, L.; Nagl, N. Sugar beet micropropagation. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2006, 20, 9–14.
4. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 1962, 15, 473–497.
5. Pazuki, A.; Aflaki, F.; Gürel, E.; Ergül, A.; Gürel, S. Gynogenesis Induction in Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Improved by 6-Benzylaminopurine (BAP) and Synergized with Cold Pretreatment. *Sugar Tech.* 2017, 20, 69–77.
6. Sohrabi, S.; Abdollahi, M.R.; Mirzaie-Asl, A.; Koulaei, H.E.; Aghaezadeh, M.; Seguí-Simarro, J.M. A refined method for ovule culture in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2021, 146, 259–267.
7. Weich, E.W.; Levall, M.W. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Published protocols for other crop plant species. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*; Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szareiko, J., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 255–263.
8. Zayachkovskaya, T.; Alyokhina, K.; Mineykina, A.; Romanova, O.; Vjurtts, T.; Tukuser, Y.; Zayachkovsky, V.; Ermolaev, A.; Kan, L.; Fomicheva, M.; Domblides, E. Optimizing Different Medium Component Concentration and Temperature Stress Pretreatment for Gynogenesis Induction in Unpollinated Ovule Culture of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Horticulturae* 2023, 9 (8), 900.
9. Zayachkovskaya, T.; Domblides, E.; Zayachkovsky, V.; Kan, L.; Domblides, A.; Soldatenko, A. Production of Gynogenic Plants of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) in Unpollinated Ovule Culture In Vitro. *Plants* 2021, 10, 2703.

ВЛИЯНИЕ РЕАГЕНТА ЯРИВА (3-D-GLC, 3-ФЕНИЛГЛИКОЗИД) НА РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ТОМАТА (*S. LYCOPERSICUM* СОРТА БЛАШ) В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Иброгимов Р.Ф., Голиванов Я.Ю., Натыров А.Н., 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

Мужской гаметофит растений (пыльцевое зерно и пыльцевая трубка) обеспечивает доставку мужских гамет к месту оплодотворения. Рост пыльцевой трубки сопровождается отложением нового материала клеточной стенки в ее кончике, что приводит к увеличению ее длины. Полагают, что арабиногалактаны могут функционировать в процессах сигнализации, связанных с организацией роста пыльцевой трубки. Арабиногалактаны могут действовать как сорцепторы для восприятия внеклеточных сигналов и взаимодействовать с трансмембранными белками, возможно, рецепторными киназами или

ионными каналами, чтобы инициировать сигнализацию запуска различных внутриклеточных событий.

Основной целью настоящей работы было выявление роли арабиногалактанов в прорастании и росте пыльцевых трубок томата (*S. lycopersicum* сорта Блаш), благодаря специфической преципитации арабиногалактанов с реактивом Ярива (3-D-Glc, 3-фенилгликозид), синтезированным специально для этих целей.

Согласно плану обработки, пыльцу томата проращивали на среде культивирования (сахароза, борная кислота) 1,5 часа, переносили в среду культивирования с добавлением реактива Ярива (концентрация 50 мкМ) на 1,5 часа, и снова переносили на среду культивирования. Длину пыльцевых трубок измеряли через различные интервалы времени на микроскопе Primo Star Carl Zeiss.

Длина пыльцевых трубок, выращенных *in vitro*, была значительно уменьшена добавлением реагента Ярива к питательной среде по сравнению с контролем. После инкубации с реагентом Ярива, кончики пыльцевых трубок имели аномальную морфологию, сопровождавшуюся потерей прозрачной зоны на кончике; чистая зона — это показатель нормального роста. Ингибирующий эффект реагента Ярива в большинстве случаев можно преодолеть путем переноса обратно пыльцевых трубок в свежую среду для проращивания: новые трубки выступали из боков «неподвижного» наконечника и возобновляли нормальный рост.

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ПЕСТИКОВ ИНГИБИТОРОМ КАСПАЗО-3-ПОДОБНОЙ ПРОТЕАЗЫ (АС-DEVД-СНО) НА РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК В ПРОГРАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У *SOLANUM PENNELLII*

Иброгимова В.К., 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*

Исследования молекулярных механизмов самонесовместимости у растений активно проводятся на представителях различных семейств, включая Solanaceae. В предыдущих исследованиях механизма гаметофитной самонесовместимости у петунии (*Petunia hybrida* E. Vilm.) был установлен важнейший факт того, что гибель самонесовместимых пыльцевых трубок происходит вследствие функционирования механизма программируемой клеточной смерти. Остановка роста самонесовместимых пыльцевых трубок петунии происходит при повышении уровня активности каспазо-подобных протеаз в первые часы опыления. Методом прижизненной визуализации каспазо-3,7-подобных протеаз было показано, что активация CLP происходит непосредственно в самонесовместимых трубках, а не в окружающих тканях пестика (Zakharova et al., 2023).

Основной целью настоящей работы было снять самонесовместимость у томата *Solanum pennellii*, заингибирав PCD в самонесовместимых пыльцевых трубках. Это нам удалось через воздействие на каспазо-3-подобную протеазу/DEVДазу ее ингибитором Ас-DEVД-СНО.

Согласно плану обработки на рыльце цветка наносили 2 мкл ингибирующего раствора с разной концентрацией Ас-DEVД-СНО (0,125, 0,25, 0,5 мМ) за 2 часа до опыления, через 2 часа после опыления и в одновременно с опылением. Контролем в данном опыте служили неопыленные цветки, на рыльца пестиков которых наносили каплю дистиллированной воды. Сбор и фиксацию материала (опыленных пестиков) производили через 2, 4, 6 и 24 часа после опыления.

Визуализация растущих в тканях пестика пыльцевых трубок томатов, с окрашиванием анилиновым голубым и флуоресцентной микроскопией, показала, что после перекрестного совместимого опыления и самонесовместимого опыления почти все пыльцевые зерна прорастают, а пыльцевые трубки растут в рыльце и в тканях столбика. В совместимом варианте (*S. lycopersicum* сорта Блаш) пыльцевые трубки после 24 часов опыления достигали завязи, при самонесовместимом опылении пыльцевые трубки достигали длины 1898 ± 102 мкм, что составляло 31,2% от всей длины пестика.

Наиболее интересные результаты получены при обработке Ас-DEVD-СНО в концентрации 0,125 мМ. Во всех вариантах обработок (за 2 часа до опыления, одновременно с опылением, через 2 часа после опыления) длина самонесовместимых пыльцевых трубок увеличивалась до уровня совместимых, а на рост совместимых пыльцевых трубок данная обработка практически не оказывала влияния. Во всех вариантах совместимого опыления завязались семена.

Список литературы:

1. Zakharova, E., Khanina, T., Knyazev, A., Milyukova, N., & Kovaleva, L. V. (2023). Hormonal Signaling during dPCD: Cytokinin as the Determinant of RNase-Based Self-Incompatibility in Solanaceae. *Biomolecules*, 13(7), 1033.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* PAEONIA L.

А.А. Иванов, Р.С. Рахмангулов

**ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР),
Санкт-Петербург 190000, e-mail: a.ivanov@vir.nw.ru**

Традиционная селекция пионов *Paeonia* L. — это трудоемкий процесс ввиду длительного вступления сеянцев в генеративную фазу, низкой всхожести гибридных семян и жизнеспособности сеянцев от скрещивания, непредсказуемой вариации целевого признака в потомстве. В связи с этим отбор ценных образцов, обладающих определенными признаками, может занимать порядка 10 лет. Вследствие этого, как и в случае со многими декоративными растениями, методы биотехнологии становятся неотъемлемой частью селекции пионов, которые позволяют значительно ускорить работу, за счет существенного облегчения процесса размножения с получением на выходе генетически однородного материала (Cheng, 2007; Kamenetsky, Dole, 2012; Yang et al., 2020; Yang et al., 2020; Рахмангулов, Тихонова, 2021; Рахмангулов, 2022; Kamenetsky, Yu, 2022).

В этой связи актуальным является изучение этапа введения в условия *in vitro* эксплантов травянистого пиона. В рамках нашего исследования в культуру *in vitro* было введено 10 сортов травянистых пионов из коллекции ВИР с целью оценки регенерационного потенциала. Исходным растительным материалом послужили части стеблей с боковой почкой. Протокол стерилизации эксплантов заключался в поэтапной экспозиции в растворах стерилизующих агентов с последующей отмывкой стерильной дистиллированной водой. В качестве стерилизующих агентов использовали растворы 70% этилового спирта и 10%-й раствор белизны. В качестве питательной среды была использована среда по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 0,5 мг/л БАП, 30 г/л сахарозы, 6 г/л агар-агара, и pH 5,8. При апробации данного метода стерилизации наименьшая эффективность введения составила 37% для сорта «Белый парус», наилучшую эффективность регенерационной способности показал сорт «Карнавал» (50%). На приживаемость серьезную проблему оказало потемнение

эксплантатов — это серьезная проблема с культурами пионов в *in vitro*. Все типы эксплантов пионов, использованные в исследовании, выделяли фенольные соединения в питательную среду, что приводило к потемнению среды и экспланта. В нашей работе для смягчения потемнения эксплантов использовался поливинилпирролидон – 1 г/л (Shen, 2012; Rather et al., 2014; Wang et al., 2016). В дальнейшем наша работа будет заключаться в подборе питательных сред для индукции и последующего стабильного роста сортов пионов в культуре *in vitro*.

Благодарности. Тезисы подготовлены в рамках государственного задания ВИР согласно тематическому плану НИР по теме № FGEM-2022-0011 «Разработка подходов ускоренной селекции для улучшения хозяйственно ценных признаков декоративных и ягодных культур».

Список литературы

1. Рахмангулов Р.С., Тихонова Н.Г. Селекция декоративных растений в России. Биотехнология и селекция растений. 2021. 4:40–54. DOI: 10.30901/2658-6266-2021-4-04
2. Cheng F. Advances in the breeding of tree peonies and a cultivar system for the cultivar group. International Journal for Plant Breeding. 2007. 1:89-104.
3. Kamenetsky R., Dole J. Herbaceous peony (*Paeonia*): Genetics, physiology and cut flower production. Floriculture and Ornamental Biotechnology. 2012. 6:62-77.
4. Kamenetsky R., Yu X. Cut peony industry: the first 30 years of research and new horizons. Horticulture Research. 2022. 9. DOI: 10.1093/hr/uhac079
5. Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962. 15:473–497.
6. Rather Z., Nazki I., Qadri Z., Mir M., Bhat K., Hussain G. In vitro propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) cv. Sara Bernhardt using shoot tips. Indian Journal of Horticulture. 2014. 71:385-389.
7. Shen M., Wang Q., Yu X., Teixeira da Silva J. Micropropagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). Scientia Horticulturae. 2012. 148:30-38. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.09.017
8. Wang X., Cheng F., Zhong Y., Wen S., Li L., Huang N. In vitro culture and technology of rapid reproduction of lepidoptera of peony. Forestry Science. 2016. 52:101-110.
9. Yang Y., Sun M., Li S., Chen Q., Teixeira da Silva J., Wang A., Yu X., Wang L. Germplasm resources and genetic breeding of *Paeonia*: a systematic review. Horticulture Research. 2020. 7. DOI: 10.1038/s41438-020-0332-2

ВЛИЯНИЕ РЕАГЕНТА ЯРИВА (3-D-GLC, 3-ФЕНИЛГЛИКОЗИД) НА РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ПЕТУНИИ (*PETUNIA HYBRIDA* E. VILM.) В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Киприн М.Е. Голиванов Я.Ю., Натыров А.Н., 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*

Двойное оплодотворение цветковых растений требует целенаправленной доставки спермиев по пыльцевой трубке. После попадания на совместимые клетки рыльца, пыльца прорастает и образует трубку, которая растет глубоко внутри специализированной проводниковой ткани пестика, чтобы точно достичь определенной цели - зародышевого мешка. В отличие от большинства растительных клеток, пыльцевые трубки растут

поляризованным способом, ограниченным областью кончика. Рост кончика ПТ становится возможным благодаря координированной клеточной активности, включая динамическую систему актинового цитоскелета, экзоцитоз и эндоцитоз (Kovaleva et al., 2016). Рост ПТ строго регулируется и зависит от сложной сети сигнальных событий, в основном неидентифицированных и включающих различные молекулы. Среди них большое внимание привлекают арабиногалактаны (АГ). АГ - необходимый элемент в процессе полового размножения покрытосеменных и голосеменных растений. Исследования последнего десятилетия показали, что АГ найдены в экссудате рыльца, проводниковых тканях пестика, пыльце, показано их влияние на образование пыльцы и гидратацию пыльцевых зерен.

Основной целью настоящей работы было выявление роли АГ в прорастании и росте пыльцевых трубок петунии (*P. hybrida*), благодаря специфической преципитация АГ с реактивом Ярива (3-D-Glc, 3-фенилгликозид), синтезированным специально для этих целей. Реактив Ярива способен образовывать комплексы с АГ.

Согласно плану обработки, пыльцу петунии проращивали на среде культивирования (сахароза, борная кислота) 1,5 часа, переносили в среду культивирования с добавлением реактива Ярива (концентрация 50 мкМ) на 1,5 часа, и снова переносили на среду культивирования. Длину пыльцевых трубок измеряли через различные интервалы времени на микроскопе Primo Star Carl Zeiss.

Длина пыльцевых трубок, выращенных *in vitro*, была значительно уменьшена добавлением реагента Ярива к питательной среде по сравнению с контролем. После инкубации с реагентом Ярива, кончики пыльцевых трубок имели аномальную морфологию, сопровождавшуюся потерей прозрачной зоны на кончике; чистая зона — это показатель нормального роста. Ингибирующий эффект реагента Ярива в большинстве случаев можно преодолеть путем переноса обратно пыльцевых трубок в свежую среду для проращивания: новые трубки выступали из боков «неподвижного» наконечника региона и возобновляли нормальный рост.

Список литературы:

1. Kovaleva L, Voronkov A, Zakharova E, Minkina Y, Timofeeva G, Andreev I (2016) Regulation of petunia pollen tube growth by phytohormones: identification of their potential targets. J Agric Sci Technol A 6:239–254.

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОСПОР ПЕРЦА (*CAPSICUM ANNUUM L.*)

Козарь Е.В., Домблидес Е.А.

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр овощеводства», 143072, Московская область,
пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14
e-mail: koz.leno4ek@gmail.com**

Для ускоренного создания гибридов необходимо применение современных биотехнологических методов получения гомозиготных линий [1]. Наиболее перспективным методом является получение удвоенных гаплоидов в культуре микроспор, ввиду отсутствия в препарате соматических тканей, что позволяет избежать дополнительный этап – проверку полученных растений-регенерантов на гаплоидное происхождение.

На эффективность метода влияет большое количество факторов, ключевым из которых является стадия развития микроспор, т.к. не все микропоры способны переключаться с гаметофитного пути развития на спорофитный.

Как правило, перед введением микроспор в культуру, проводят рекогносцировочный цитологический анализ популяционного состава микроспор в бутонах разного размера для того, чтобы определить оптимальный размер бутона. Однако не у всех культур/генотипов существует высокая корреляция между длиной бутона или его морфологическими признаками со стадией развития микроспор, что существенно осложняет процесс отбора бутонов с отзывчивой к эмбриогенезу стадией развития [2]. У таких культур при стандартном способе изоляции, где выделение микроспор производится из группы бутонов, отобранных по схожим морфологическим признакам и размеру, однородный популяционный состав микроспор не обеспечивается, что приводит к массовой гибели не индуцированных микроспор на 10-14 день культивирования, выделению токсинов в питательную среду и, как следствие, к не стабильному выходу эмбриоидов. Для того, чтобы преодолеть проблему разнокачественности стадий микроспор в препарате, мы предлагаем изолировать микроспоры из каждого бутона индивидуально. Однако помимо качественно популяционного состава микропор на эффективность эмбриогенеза влияет плотность культуры. Поэтому для соблюдения оптимальной концентрации микроспор в культуре *in vitro*, микроспоры изолированные из одного бутона рекомендуется культивировать в 1 мл индукционной питательной среды в культуральных 12 луночных планшетах, с лунками диаметром 1,2 см. Такой способ культивирования повышает вероятность «попадания» в необходимую стадию развития микроспор, что в свою очередь, позволяет повысить шансы получения эмбриоидов.

Список литературы:

1. Supena EDJ. An Efficient Anther Culture on Double-Layered Media to Produce Doubled Haploid Plants of Pepper (*Capsicum annuum*). *Methods Mol Biol.* 2021;2288:267-278. doi: 10.1007/978-1-0716-1335-1_16. PMID: 34270017.

2. Irikova T (2008) Obtaining and genotype investigations of androgenic haploids from Bulgarian pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. PhD thesis, University of Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria, p 199

ИДЕНТИФИКАЦИЯ SIX-ГЕНОВ В ГЕНОМАХ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *FUSARIUM*

Костенникова З.С.¹, Назифулла М.², Марданова А.М.¹

**1 – ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии» (ФГАОУ ВО КФУ, ИФМуБ), Казань 420008;
E- mail: medbiol@kpfu.ru**

2 – Farah Higher Education Institute, Farah; E- mail: farah.university123@gmail.ru

Фузариоз, вызываемый фитопатогенными грибами рода *Fusarium*, наносит серьезный ущерб картофелеводству. Потери урожая от фузариоза могут достигать 30-50% [1]. Учитывая значимость картофелеводства для аграрного сектора и продовольственной безопасности России, борьба с этим заболеванием приобретает важнейшее экономическое и стратегическое значение. Для проникновения в ткани растения-хозяина и колонизации его сосудистой системы фитопатогенные *Fusarium* используют как универсальные, так и специфические механизмы вирулентности. Особая роль принадлежит белкам-эффекторам, синтезируемым непосредственно в ксилеме (SIX-белки) [2]. Они обеспечивают адаптацию гриба к обитанию в сосудах растения и определяют способность того или иного вида

Fusarium вызывать трахеомикозы и сосудистые увядания. Изучение молекулярных детерминант патогенности фузариев позволит глубже понять механизмы их взаимодействия с растением-хозяином и разработать эффективные методы защиты картофеля от фузариоза.

Целью работы явилось выделение из растений картофеля разных сортов изолятов микромицетов рода *Fusarium*, определение их видового состава и идентификация SIX-генов.

Материалы и методы. Объектом исследования были штаммы *Fusarium sp.*, выделенные из растений картофеля сортов Жуковский ранний, Ред Скарлетт и Регги. Картофель выращивали на опытных полях ФГБНУ Татарского Научно-исследовательского института сельского хозяйства «ТатНИИСХ» в Республике Татарстан. Изоляты фитопатогенных грибов выделяли из условно-здоровых клубней картофеля, из клубня, пораженного сухой гнилью, корневой шейки и стебля растений картофеля методом посева материала на среды КГА и Чапека-Докса. Посевы культивировали в течение 7 суток при 28-29 °С. Отбирали колонии с характерной для *Fusarium* морфологией спор и мицелия и проводили пересев для получения чистых культур. Контроль чистоты осуществляли микроскопированием. Выделенные изоляты хранили при 4 °С.

Молекулярно-генетическую идентификацию видовой принадлежности выделенных штаммов провели на основании 98-100% гомологии секвенированных амплификатов ITS участков гена 5.8S рРНК со штаммами соответствующих видов из базы данных NCBI. Проводили скрининг 15 предполагаемых эффекторных генов (SIX1-SIX15), ассоциированных с вирулентностью фузариев, в геномах выделенных изолятов методом ПЦР с использованием разработанных праймеров.

Результаты. Всего было выделено 10 изолятов чистых культур микромицетов рода *Fusarium*. Молекулярно-генетическая идентификация видовой принадлежности выделенных изолятов позволила установить принадлежность 8 штаммов (sGaO103, sVnO104, sVgO108, sVgO110, tJrO112, tRsO117) к виду *Fusarium oxysporum*, штамма tJuO120 к *Fusarium solani*, штамма DR36 к *Fusarium sambucinum*. Таким образом, наиболее часто выделяемым видом возбудителей фузариоза картофеля на территории Республики Татарстан является *F. oxysporum*.

Проведенный скрининг показал, что исследуемые изоляты фузариев различаются как по количеству, так и по набору идентифицированных генов SIX-эффекторов. Все 15 генов были обнаружены только в изоляте *F. oxysporum* tRsO117, выделенном из условно здорового клубня без признаков сухой гнили. В геноме штамма *F. oxysporum* tJuO131, выделенного из условно здорового клубня без признаков сухой гнили, идентифицировано 12 генов, а в геномах штаммов *F. oxysporum* tJrO112 и *F. solani* tJuO120 – по 11 генов. Меньше всего генов было идентифицировано в геномах штаммов *F. oxysporum* sGaO103 и *F. oxysporum* tJuO126, выделенных из стебля растения картофеля с признаками фузариозного увядания и из условно здорового клубня без признаков сухой гнили. В геномах этих штаммов обнаружено только по три SIX-гена. Исследуемые SIX-гены также различались по частоте встречаемости. Чаще всего встречался ген SIX 11. Он был обнаружен в геномах у 9 из 10 исследованных изолятов. Затем по частоте встречаемости шли гены SIX 9 и 10, которые были выявлены у 8 из 10 изолятов. Ген SIX 1 был идентифицирован только у трех изолятов из 10: *F. sambucinum* DR36, *F. oxysporum* sVgO108 и *F. oxysporum* tRsO117. Известно, что этот ген является фактором вирулентности фузарий [3]. Реже других обнаруживался ген SIX 14. Он был идентифицирован только у 2 штаммов – *F. oxysporum* tRsO117 и *F. solani* tJuO120.

Таким образом, из различных частей растений картофеля разных сортов, пораженных фузариозом, выделены и доведены до чистой культуры 10 изолятов фитопатогенных грибов рода *Fusarium*, 8 из которых были идентифицированы как *F. oxysporum*, 1 - *F. solani*, 1 - *F. sambucinum*. Штаммы различаются по количеству и дизайну

SIX-генов, что свидетельствует о генетической гетерогенности популяции возбудителей фузариоза картофеля. Полученные результаты могут быть использованы для разработки ПЦР-диагностики наиболее агрессивных изолятов на основе выявления специфических наборов генов вирулентности. Также скрининг коллекции штаммов по присутствию ключевых SIX-генов позволит подобрать наиболее патогенные изоляты для изучения взаимодействия возбудителя с растением-хозяином в модельных системах. Полученные данные закладывают основу для дальнейшего исследования роли отдельных SIX-генов в развитии фузариоза картофеля и разработки эффективных методов контроля этого опасного заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 22-16-00138

Список литературы:

1. Trabelsi B.M, Abdallah R.A, Ammar N, Kthiri Z, Hamada W. Bio-suppression of *Fusarium* wilt disease in potato using nonpathogenic potato-associated fungi. *J Plant Pathol Microbiol.*, 2016.347:2.
2. Srinivas C, Devi D.N, Murthy K.N, Mohan C.D, Lakshmeesha T.R, Singh B, Kalagatur N.K, Niranjana S.R, Hashem A, Alqarawi A.A, Tabassum B. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity—A review. *Saudi journal of biological sciences.* 2019. 26:1315-2.
3. Selim E.M., El-Gammal N.A. Role of Fusaric acid mycotoxin in pathogenesis process of tomato wilt disease caused by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques.* 2015.5:255.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *HAIRY ROOTS* ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *FABACEAE*

Кузнецова Е.С., Соловьева А.И., Степанова А.Ю.

**ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук» (ФГБУН ИФР РАН), Москва 127276
E-mail: kate.kitty@inbox.ru**

Культуры *hairy roots* – это быстрорастущие на безгормональной питательной среде корни, индуцированные с помощью *Rhizobium rhizogenes* [1,2]. Благодаря наличию дифференцировки и вставке агробактериальных *rol*-генов, они обладают генетической и биосинтетической стабильностью и являются уникальной *in vitro* системой, отличающейся, как от недифференцированных культур, так и дифференцированных, таких как побеги и адвентивные корни [3-6]. Установлено, что *hairy roots* способны продуцировать метаболиты на уровне целого растения [7]. Кроме того, в них могут появляться соединения, не найденные в исходном растении [8]. Список возможного применения *hairy roots* в настоящее время расширяется и не ограничивается фармацевтикой [5,9]. Например, *hairy roots* имеют большие перспективы в качестве компонентов функционального питания. В этом отношении интерес представляют *hairy roots*, полученные из растений, имеющих пищевое значение, например, представители семейства *Fabaceae*. Они содержат большое количество белка и незаменимых аминокислот, а также витаминов группы В и Е, калия, фосфора, магния, железа и клетчатки, и биологически активных соединений, в том числе изофлавоноидов. Изучение ростовых характеристик и содержания общего белка в *hairy roots* представителей *Fabaceae* является первой ступенью для определения возможностей их использования для нужд человека.

В нашей работе мы исследовали *hairy roots* *Medicago sativa* L., *Lupinus polyphyllus* Lindl. и две линии *Ononis arvensis*, полученные с помощью штаммов А4 и 1601. Выращивание проводили в течение 42 дней на среде В5 (среда Гамборга) [10].

По результатам измерения индекса роста (I) исследуемые культуры выстроились в следующем порядке: *L. polyphyllus* (33,3) > *O. arvensis* 1601 (28,6) > *M. sativa* (17,2) > *O. arvensis* А4 (13,9). Примечательно, что *hairy roots* *O. arvensis*, полученные с помощью разных агробактериальных штаммов, имели разные ростовые показатели.

Содержание белка измеряли на стационарной фазе по методу Брэдфорд. Было показано, что наибольшее содержание белка наблюдалось в *hairy roots* *O. arvensis* 1601 (69,3 мкг/мл). В *hairy roots* *L. polyphyllus* оно было примерно в 5 раз меньше (14,4 мкг/мл). Содержание белка в культурах *O. arvensis* А4 и *M. sativa* было примерно одинаковым и составляло 31,1 мкг/мл и 32,2 мкг/мл, соответственно, что было в 2,2-2,4 раза меньше, чем в *hairy roots* *O. arvensis* 1601.

Таким образом, среди исследуемых линий по содержанию белка и ростовым характеристикам наиболее перспективной оказалась линия *O. arvensis* 1601, которую в дальнейшем планируется исследовать более детально.

Список литературы:

1. White, F.F.; Garfinkel, D.J.; Huffman, G.A.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature* 1983, 301, 348–350, doi:10.1038/301348a0.
2. Su, W.W.; Lee, K.T. Plant Cell and Hairy Root Cultures-Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocess. Value-Added Prod. from Renew. Resour. New Technol. Appl.* 2006, 263–292, doi:10.1016/B978-044452114-9/50011-6.
3. Kiselev, K. V.; Dubrovina, A.S.; Veselova, M. V.; Bulgakov, V.P.; Fedoreyev, S.A.; Zhuravlev, Y.N. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *J. Biotechnol.* 2007, 128, 681–692, doi:10.1016/J.JBIOTECH.2006.11.008.
4. Bulgakov, V.P. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Adv.* 2008, 26, 318–324, doi:10.1016/j.biotechadv.2008.03.001.
5. Stepanova, A.Y.; Malunova, M.V.; Gladkov, E.A.; Evsyukov, S.V.; Tereshonok, D.V.; Solov'eva, A.I. Collection of Hairy Roots as a Basis for Fundamental and Applied Research. *Molecules* 2022, 27, 8040.
6. Stepanova, A.Y.; Solov'eva, A.I.; Malunova, M.V.; Salamaikina, S.A.; Panov, Y.M.; Lelishentsev, A.A. Hairy roots *scutellaria* spp. (lamiaceae) as promising producers of antiviral flavones. *Molecules* 2021, 26, doi:10.3390/molecules26133927.
7. Gabr, A.M.M.; Sytar, O.; Ghareeb, H.; Brestic, M. Accumulation of amino acids and flavonoids in hairy root cultures of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 2019, 25, 787, doi:10.1007/S12298-019-00669-1.
8. Pollier, J.; Morreel, K.; Geelen, D.; Goossens, A. Metabolite profiling of triterpene saponins in *Medicago truncatula* hairy roots by liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Nat. Prod.* 2011, 74, 1462–1476, doi:10.1021/NP200218R.
9. Gutierrez-Valdes, N.; Häkkinen, S.T.; Lemasson, C.; Guillet, M.; Oksman-Caldentey, K.-M.; Ritala, A.; Cardon, F. Hairy Root Cultures-A Versatile Tool With Multiple Applications., doi:10.3389/fpls.2020.00033.
10. Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 1968, 50, 151–158, doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5.

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭТАПА УДВОЕНИЯ ХРОМОСОМНОГО НАБОРА ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ МОРКОВИ СТОЛОВОЙ

Кулаков Ю.В.^{1,2}, Фомичева М.Г.¹, Чичварина О.А.¹, Киракосян Р.Н.², Домблидес Е.А.¹

1 – ФГБНУ «Федеральный Научный Центр Овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО),
Московская обл., Одинцовский городской округ, поселок ВНИИССОК 143080;

E-mail: ykulakov12@yandex.ru

2 – 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 127434

Технологии удвоенных гаплоидов (ДН-технологии) позволяют получать чистые линии сельскохозяйственно ценных растений за одно поколение. Однако полученные растения-регенеранты возможно использовать в селекции только в случае, если произошло удвоение ДНК, т.к. растения-гаплоиды стерильны или обладают очень ограниченной фертильностью. Для культур, у которых не происходит спонтанного удвоения ДНК, в частности, у ряда представителей семейства зонтичных (*Apiaceae Lindl.*), необходимо обрабатывать гаплоидные растения антимиотическими агентами, которые нарушают веретено деления, в результате чего хромосомы не расходятся, и в клетке остается двойной набор хромосом. Методы удвоения ДНК с помощью химических агентов осложнены их токсическим эффектом, а также возникновением миксоплоидных и полиплоидных растений, поэтому этот этап становится одним из главных ограничивающих факторов ДН-технологии.

На сегодняшний день существует мало достоверных исследований об индуцированном удвоении хромосом у растений из семейства зонтичных (*Apiaceae Lindl.*), полученных в культуре *in vitro* при использовании гаплоидных технологий (Seguí-Simarro et al., 2021). Поэтому основной целью данного исследования являлась разработка методов удвоения генома растений моркови столовой, полученных в культуре изолированных микроспор *in vitro*.

Для достижения данной цели была поставлена задача подобрать антимиотический агент и время обработки для успешного удвоения генома гаплоидов моркови столовой и минимизации их негативного влияния на выживаемость растений-регенерантов.

В качестве антимиотических агентов, были выбраны наиболее часто используемый для этих целей агент - колхицин (Leung et al. 2015), а также трифлуралин, который успешно применялся для удвоения ДНК, в частности, у рапса (*Brassica napus cv.*) (Zhao, Simmonds, 1995). По нашим сведениям, трифлуралин не тестировался в качестве антимиотического агента для видов семейства *Apiaceae Lindl.*

Эксперименты проводились на гаплоидных растениях-регенерантах, плоидность которых была определена при помощи анализа клеточных ядер с использованием проточного цитометра Beckman Coulter (USA).

Обработку водным раствором колхицина (500 мг/л) проводили на 16 клонах гаплоидного растения генотипа моркови столовой Минор (размножен за счет вторичного эмбриогенеза) в течение 24 или 48 часов.

Обработке водным раствором трифлуралина (3,35 г/л) в течение в 24 или 48 часов подвергали микроклонально размноженные растения-регенеранты генотипа Минор, Алтайская лакомка и с.о. 44. Эксперимент был проведен на 18 растениях-регенерантах (по шесть растений на каждый генотип).

Спустя две недели после проведенных опытов плоидность обработанных растений анализировались на проточном цитометре. Было выявлено, что обработка колхицином в концентрации 500 мг/л не влияла на плоидность ни одного из растений-регенерантов при

использовании всех временных экспозиций. Повторный цитометрический анализ растений, обработанных колхицином, спустя шесть недель показал, что использование временной экспозиции в 48 часов повлияло на плоидность данных растений и у них произошло увеличение хромосомного набора: два растения стали диплоидными (25 %), а шесть – тетраплоидными (75 %).

При использовании водного раствора трифлуралина временная экспозиция в 24 часа не приводила к удвоению хромосомного набора у всех растений-регенерантов. Однако при использовании временной экспозиции в 48 часов у всех растений произошло увеличение хромосомного набора до диплоидного уровня.

Данные результаты демонстрируют, что обработка колхицином и трифлуралином в используемых концентрациях и времени экспозиции не оказывает токсического действия на растения моркови. Впервые для моркови столовой применялся трифлуралин для удвоения хромосомного набора. При этом было показано, что трифлуралин с большей эффективностью и скоростью приводит к удвоению генома по сравнению с колхицином.

Выводы о том, насколько будет сохранено диплоидное состояние растений, можно будет сделать лишь только после прохождения растениями последующих фаз развития и (адаптации к условиям *ex vitro*, яровизации, получения семян от самоопыления) и их повторного анализа на проточном цитометре.

Список литературы:

1. Leung Y.Y., Hui L.L.Y., Kraus V.B. Colchicine—update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum*. 2015. Vol. 45. №3. P. 341-350.
2. Seguí-Simarro, J.M., Jacquier, N.M.A., Widiez, T. Overview of in vitro and in vivo doubled haploid technologies. In *Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology*. Seguí-Simarro, J.M., Ed. // Humana: New York, NY, USA. 2021. Vol. 2287. P. 3-22.
3. Zhao J.-P., Simmonds D.H. Application of trifluralin to embryogenic microspores to generate doubled haploid plants in *Brassica napus*. // *Physiol Plant*, in Press. 1995.

АНАЛИЗ ПРОТЕОМА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ

Макеева А.А., Мамаева А.С., Азаркина Р.А., Фесенко И.А.

**ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова» (ФГБНУ ИБХ РАН), Москва 117997**

E-mail: aryamakeeva@gmail.com

Недостаток влаги - это одна из наиболее распространенных причин потерь урожая во всём мире, которые могут достигать 50% [1]. Ответ растений на недостаток влаги является сложным процессом, включающим в себя разнообразные физиологические и молекулярные реакции, а именно: биосинтез абсцизовой кислоты, синтез дегидринов, ферментов окислительного стресса и осмотиков для повышения водного потенциала, активация и перераспределение аквапоринов. Идентификация белков и пептидов, регулирующих стрессовый ответ растений позволит лучше понять механизмы адаптации сельскохозяйственных культур к абиотическим стрессам и, разработать новые агротехнологии для повышения урожайности.

Целью данной работы являлся количественный протеомный и пептидомный анализ растений мягкой пшеницы сорта Н2455/2 в ответ на недостаток влаги. Для проведения экспериментов, растения выращивали на среде Хогланда в течение 6 дней, после чего в среду добавляли полиэтиленгликоль (20%) для имитации условий засухи, материал на анализ отбирали спустя 4 дня инкубации. Белок экстрагировали фенольным методом,

далее проводили трипсинолиз в растворе. Триптические пептиды были помечены изобарными меток для качественного и количественного анализа (iTRAQ). Методика масс-спектрометрического анализа описана в опубликованной ранее статье [2]. Анализ полученных данных проводили при помощи программного обеспечения PEAKS Studio.

В результате работы было показано, что в условиях засухи у пшеницы ингибируется рост корня и листьев. При анализе протеома было выявлено 3498 белковых групп в корнях и 3264 - в листьях. Среди белков, представленность которых менялась в корнях в условиях засухи, были обнаружены антиоксидантные ферменты (пероксидаза, алкоголь дегидрогеназа, GDSL эстераза-липаза, FeO₂ диоксигеназа) и белки биосинтеза полисахаридов клеточной стенки (SGNH гидролаза, бета-фруктофуранозидаза, UDP-глюкуронат декарбоксилаза), что соответствует ранее обнаруженным закономерностям ответа на засуху [3]. И в корнях, и в побеговой части обнаружено изменение содержания рибосомных белков (L35, L15). В то же время в побеговой части меняется содержание белков, вовлеченных в апоптоз (RPM1), ответ на абиотический стресс (тауматин-подобный белок, неспецифический липид-транспортирующий белок) и деградацию аминокислот (серин карбоксипептидаза), что фенотипически сопровождается образованием хлорозов на концах листьев.

Таким образом, мы показали, что при засухе у растений пшеницы меняется представленность таких групп белков, как антиоксидантные белки, белки рибосом и белков, вовлеченных в формирование клеточной стенки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Грант № 23-66-10013).

Список литературы:

1. Ahmed, H. G. M., Zeng, Y., Shah, A. N., Yar, M. M., Ullah, A., & Ali, M. (2022). Conferring of drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using seedling indices. *Frontiers in plant science*, 13, 961049.
2. Fesenko, I., Shabalina, S. A., Mamaeva, A., Knyazev, A., Glushkevich, A., Lyapina, I., et al. (2021). A vast pool of lineage-specific microproteins encoded by long non-coding RNAs in plants. *Nucleic Acids Res.* 49, 10328–10346.
3. Tenhaken R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 5, 771.

КАРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИТОФАГОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ НА ПРИМЕРЕ ЧЕРЕМУХОВО-ЗЛАКОВОЙ ТЛИ (*RHOPALOSIPHUM PADI* L.)

Мкртычян Д.Э.

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

Жизненный цикл тлей относят к числу самых интересных из всех групп животных. Он включает партеногенетические и половые поколения, сложные полифенизмы, а также обязывает тлей перемещаться в течение жизни на разные растения [8].

Тли, как отдельная систематическая группа, появилась около 200 миллионов лет назад, однако неизвестно, были ли эти предки партеногенетическими. Некоторые виды мелового периода показывают укорочение яйцеклада, например, у *Aniferella bostoni* эти изменения, возможно, ведут к становлению партеногенеза [9].

Полифенизм, или появление множественных фенотипов или морф у генетически идентичных индивидов, характерен для тлей и занимает центральное место в эволюции

этой группы животных. В рамках партеногенетической линии самки могут проявлять до восьми дискретных фенотипов, которые могут отличаться по различным признакам, включая морфологию [11], физиологию [5], сроки размножения и численность потомства [6, 7], продолжительность жизни [12], способность использовать альтернативные источники пищи [10]. Также наблюдается высокая дифференциация по репродуктивной способности на растениях внутри одного вида [1, 2, 3, 4]

Для цитогенетики и геномики тли также представляют большой интерес, так как они имеют голоцентрические хромосомы. Организмы с таким типом хромосом, встречаются как среди животных, так и среди растений. Несмотря на их радикальные отличия от классического типа хромосом (моноцентрические), они не были достаточно изучены (не считая нематод). Количество хромосом ($2n$) у представителей одного и того же рода (*Amphorophora*) может варьировать от 4 до 72, но при этом в другом роде (*Dysaphis*) количество хромосом удивительно стабильно, $2n=12$. Это вызывает вопросы в фундаментальных аспектах эволюции этого таксона и об организации его генома [13].

В данном исследовании были проведены опыты по сравнению известных методов выделения хромосом чермухово-злаковой тли (*Rhopalosiphum padi* L.) и модификации этих методов с целью анализа кариотипа, так как вся информация по количеству и составу хромосом сильно устарела. Также, в процессе подготовки препаратов может произойти фрагментация хромосом, что приводит к трудностям в идентификации отдельных хромосом и интерпретации информации о кариотипе. Загрязнение препарата клеточным дебрисом, органеллами и другими клеточными компонентами может привести к затруднениям при визуализации хромосом и их интерпретации, что также приводит нас к актуальности оптимизации методик.

Нами были проверены методики выделения хромосом с использованием лизирующего буфера, физиологического раствора, гомогенизации, центрифугирования, использованием водяной бани и помещения объекта на лед. Препараты приготавливались двумя методиками, методом раздавленной капли и распластыванием клеток.

В полученных постоянных препаратах были отчетливо видны границы клеток, внутри которых находились хромосомы. По литературным данным известно, что диплоидное число хромосом у данного вида равно 14, а в некоторых клетках число хромосом превышало это значение. В связи с этим появилось предположение, что это может быть связано с наличием эндомитоза у чермухово-злаковой тли. Анализ литературных данных по данной тематике подтвердил наличие данного процесса в нескольких специфических тканях организма тлей. В связи с этим было сделано предположение, что нами были обнаружены полиплоидные клетки.

Список литературы:

7. Голиванов, Я. Ю. Оценка репродуктивной способности обыкновенной злаковой тли (*Schizaphis graminum* Rondani, 1852) на сортообразцах яровой тритикале (*Triticosecale* Wittm & Camus) в лабораторных условиях / Я. Ю. Голиванов // Доклады ТСХА, Москва, 03–05 декабря 2019 года. Том Выпуск 292, Часть IV. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2020. – С. 96-98.

8. Голиванов, Я. Ю. Оценка репродуктивных показателей злаковой тли на разных генотипах яровой тритикале / Я. Ю. Голиванов, С. А. Блинова, А. А. Соловьев // Вавиловские чтения - 2016 : сборник статей международной научно-практической конференции, посвященной 129-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова, Саратов, 24–25 ноября 2016 года. – Саратов: Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, 2016. – С. 192-194.

9. Голиванов, Я. Ю. Оценка заселения злаковыми тлями коллекции сортообразцов яровой тритикале / Я. Ю. Голиванов, С. А. Блинова, В. В. Гриценко // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 6. – С. 42-51.

10. Голиванов, Я. Ю. Особенности биологического развития черемухово-злаковой тли (*Rhopalosiphum padi*) в лабораторных условиях / Я. Ю. Голиванов, В. В. Зелененко, В. В. Гриценко // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 4. – С. 142-148.
11. Elliott, H. J. Corpus allatum and ovarian growth in a polymorphic paedogenetic insect / H. J. Elliott // Nature. – 1975. – Vol. 257. – P. 90–91.
12. Dixon, A.F.G. Fecundity of brachypterous and macropterous alatae in *Drepanosiphum dixonii* (Callaphidinae, Aphididae) / A.F.G. Dixon // Entomol. Exp. Appl. – 1972. – Vol. 15. – P. 35–40.
13. Dixon, A.F.G. Laboratory studies on aggregation, size and fecundity in the black bean aphid *Aphis fabae* / A.F.G. Dixon, S.D. Wratten // Scop. Bull. Entomol. Res. – 1971. – Vol. 6. – P. 97–111.
14. Eisenbach, J., Mittler. T. E. An aphid circadian rhythm: factors affecting the release of sex pheromone by oviparae of the greenbug, *Scizaphis graminum* / J. Eisenbach, T. E. J. Mittler // Insect Physiol. – 1980. – Vol. 26, № 5. – P. 11–15.
15. Heie, O. E. Palaeontology and phylogeny. In Aphids, Their Biology, Natural Enemies, and Control / O. E. Heie // 1987. – Vol. 2A. – P. 367–391.
16. Kennedy, J.S. Host alternation in *Aphis fabae* Scop. II. Changes in the aphids / J.S. Kennedy, C.O. Booth // J. Appl. Bioi. – 1954. – Vol. 4, № 1. – P. 88–106.
17. Lambers, H.R. Polymorphism in Aphididae / H.R. Lambers // Annu. Rev. Entomol. – 1966. – Vol. 1, № 1. P. 47–78.
18. Leather, S.R. Growth, survival and reproduction of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, on its primary host / S.R. Leather, A.F.G. Dixon // Ann. Appl. BioI. – 1981. – Vol. 99, №1. – P. 15–18.
19. Manicardi, G.C. The cytogenetic architecture of the aphid genome / G.C. Manicardi, M. Mandrioli, R.L. Blackman // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. – 2015. – Vol. 90, № 1. – P. 112-125.

ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ЗЛАКОВ ДЛЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ

Нагамова В.М.^{1,2}, Бизякина Д.О.^{1,2}, Муратов Т.Р.^{1,2}, Митронова А.Д.^{1,2}, Щелканов Д.А.^{1,2}, Алкубеси М.^{1,2}, Крупина А.Ю.¹, Разумова О.В.^{1,3}, Федорова Т.А.⁴, Козарь Е.В.⁵, В.С. Рубец², Блинков А.О.¹, Дивашук М.Г.¹

- 1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550**
2 – ФГБОУ ВО «Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА им.К.А. Тимирязева), Москва 127550
3 – ФГБУН «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН» (ФГБУН ГБС им. Н.В. Цицина РАН), Москва 127276
4 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова), Москва 119991
5 – ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», ВНИИССОК 143080

Получение удвоенных гаплоидов злаков играет огромное значение как для прикладных задач селекции, так и для фундаментальных целей в генетике, биотехнологии, физиологии растений и эмбриологии. Удвоенные гаплоиды активно используют для создания чистых родительских линий в селекции на гетерозис у перекрёстноопыляемых культур или для изучения чистых линий на пригодность использования в качестве сорта для самоопылителей. Также возможности удвоенных гаплоидов активно используются в

генетике и биотехнологии для создания картирующих популяций, получения форм с интересующим аллельным составом в гомозиготном состоянии, а также в генетической инженерии. В физиологии растений и эмбриологии активно изучают процессы, связанные с прямым эмбриогенезом.

Нами ведётся активная работа по получению удвоенных гаплоидов для твёрдой пшеницы, мягкой пшеницы и тритикале. Используются как яровые, так и озимые генотипы. В зависимости от задач работа ведётся либо с изолированными пыльниками, либо с микроспорами (посредством флотирующей культуры). Пloidность полученных растений проверяем с использованием проточного цитофлюориметра (CyFlow Space Sysmex, Germany). Среди основных, проводимых нами работ, можно выделить 1) модификацию уже разработанных протоколов, создание собственных подходов для индукции эмбриогенеза и оценка эффективности различных факторов, способствующих повышению выхода зелёных растений и снижению растений-альбиносов; 2) подходы, направленные на успешную полиплоидизацию полученных гаплоидных растений; 3) изучение эмбриологических процессов, а также особенностей дифференцировки органов у сформировавшихся зародышей; 4) создание линий с заданным аллельным составом для последующих генетических исследований и 5) передача полученных линий в селекционные питомники для их оценки.

Наиболее простой культурой в получении удвоенных гаплоидов является тритикале. Нами проанализировано большое количество подходов, способствующих увеличению эффективности получения зелёных растений. В настоящее время в работе применяются 2 метода получения гаплоидных растений: культура изолированных пыльников на агаризованной среде и флотирующая культура. Индукция андрогенеза более эффективна во флотирующей культуре в сравнении с культурой пыльников: количество зародышей, каллуса, а также количество растений-регенерантов во флотирующей культуре намного выше, чем у культуры пыльников. Однако подавляющее количество растений является альбиносами во флотирующей культуре, в то время как культура пыльников приводит к получению большего числа зелёных растений. Также в ходе исследования зародышей и регенерирующих из них растений, полученных во флотирующей культуре, замечена проблема, связанная с каллусообразованием, начинающимся со стороны щитка и приводящем в дальнейшем к трудностям с укоренением. Несмотря на недостатки флотирующей культуры, данный метод позволяет проводить цито-эмбриологические исследования по изучению процессов прямого эмбриогенеза от первых митотических делений микроспоры, заканчивая дифференцировкой колеоптиля, колеоризы и щитка. Культура изолированных пыльников, в связи с возможностью использования её для массового получения растений, применяется для селекционных задач: получении удвоенных гаплоидов с гибридов F_1 - F_3 , а также для выравнивания популятивных перспективных сортов.

Мягкая пшеница является чуть сложнее в получении удвоенных гаплоидов, чем тритикале, однако культура изолированных пыльников на агаризованной питательной среде, используемая нами, также обладает определённой эффективностью. Эффективность метода во многом варьирует в зависимости от генотипа, так, при получении удвоенных гаплоидов с гибридных популяций F_2 , полученных от скрещивания сорта Иволга с различными линиями Thatcher, получено в среднем от 0,3 зелёных растения с колоса до 4 зелёных растения с колоса в зависимости от генотипа. Наибольшие трудности с получением зелёных гаплоидных растений проявляются при использовании в качестве донорных растений фертильных гибридов, полученных в результате отдалённой гибридизации. В данном случае формируется небольшое количество каллуса и зародышей, которые отличаются низкой регенерационной способностью и формируют огромное количество (до 100%) альбинозных растений. Однако, несмотря на описанные сложности, была проделана большая работа по получению чистой линии озимой мягкой пшеницы с различным составом *waxy*-генов. Полученные линии генотипированы по

аллельному составу и используются для изучения качества крахмала и пригодности их использования в селекционных целях.

Твёрдая пшеница в нашей работе является проблемной культурой, поскольку имеет очень низкий процент формирования эмбриогенных пыльников, полученный каллус и зародыши практически не регенерируют в полноценные растения, а регенерировавшие растения в 100% случаях альбиносы. Ряд экспериментов, включающих в себя различные по типу и длительности стрессовые предобработки, использование разнообразных питательных сред, варьирующих по содержанию макро- и микроэлементов, а также гормональному составу и различные методы культивирования изолированных пыльников позволили выявить ряд параметров, не решающих данную проблему, но способствующих улучшению ситуации. На данный момент к наиболее оптимальным параметрам относятся: одновременная холодовая и осмотическая стрессовая предобработка в течение 2 недель с последующим культивированием пыльников на агаризованной питательной среде по прописи 190-2 с добавлением 2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина.

Совместно с селекционерами нами адаптирована программа по быстрому внедрению полученных линий в селекционные процессы: в первый год первичное изучение и размножение, на второй год предварительное сортоиспытание, на третий год конкурсное сортоиспытание с последующим размножением лучших линий. В настоящее время, полученные нами линии удвоенных гаплоидов мягкой пшеницы и тритикале, высеяны и проходят изучение в 5 селекционных центрах России.

СРОДСТВО ФЕРМЕНТА γ -ГИДРОКСИБУТИРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ *ZEA MAYS L.* К СУБСТРАТУ

Плотникова Е.В., Анохина Г.Б.

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

ГАМК–шунт — это биохимический путь, который растения используют для катаболизма гамма–аминомасляной кислоты. Он может быть активирован при стрессовом воздействии (засолении, гипоксии), для защиты растений от негативных воздействий [2].

Одним из критических этапов ГАМК-шунта является реакция, катализируемая сукцинатсемиальдегиддегидрогеназой (ССАДГ, КФ 1.2.2.16). В условиях продолжительного дефицита кислорода данный фермент перестает функционировать, что приводит к возникновению ряда метаболических реакций [3].

Для детоксикации янтарного полуальдегида и обеспечения функционирования растительной клетки существует альтернативный путь, включающий фермент γ – гидроксibuтиратдегидрогеназу – фермент класса оксидоредуктаз (ГБДГ, КФ 1.1.1.61), катализирующий реакцию превращения γ –гидроксibuтирата до сукцинилового полуальдегида, при этом НАД⁺ восстанавливается до НАДН [1].

γ –гидроксibuтиратдегидрогеназа является перспективным объектом научных исследований, поскольку биохимические особенности и физиологическая роль данного фермента у растений еще недостаточно изучены. Актуальность исследования молекулярных механизмов влияния γ –гидроксibuтиратдегидрогеназы на устойчивость кукурузы в условиях действия различных стрессовых факторов заключается в обнаружении перспективных методов выращивания данной культуры.

В связи с этим, целью работы являлось получение гомогенного препарата γ – гидроксibuтиратдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы и определение некоторых кинетических характеристик этого фермента.

В качестве объекта исследований были использованы 14-дневные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская-76, выращенные гидропонно при десятичасовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м² (климатическая камера “LabTech”, Корея) и температурой окружающей среды 25°C.

Очистку ГБДГ проводили в четыре стадии при +4°C. Гомогенизированный со средой экстракции растительный материал (1:5) центрифугировали в течение 3 минут при 5000 об/мин, после чего фракционировали (NH₄)₂SO₄ в две стадии: от 0 до 40% насыщения раствора и от 40 до 80%. Удаление солей аммония осуществляли путем гель-фильтрации через сефадекс G-25. Полученный препарат подвергали ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-Sephacel (GE Healthcare, Швеция). Десорбцию производили линейным градиентом NaCl от 0.05 до 0.3 М.

Активность ГБДГ определяли по скорости образования НАДН путём измерения оптической плотности раствора, содержащего 16 мМ гидроксibuтирата натрия, 1 мМ НАД⁺, 100 мМ Tris-HCl буфер (рН 9.0). Реакцию инициировали добавлением препарата фермента. Контролем служила среда спектрофотометрирования без добавления энзима [4].

Установление константы Михаэлиса осуществляли при помощи метода Лайнуивера–Берка для реакции образования ССА. Кинетические параметры рассчитывали путем определения скоростей реакции для различных концентраций гидроксibuтирата натрия и НАД⁺. Обработку результатов проводили с использованием программ линейной аппроксимации по методу наименьших квадратов [5].

Использование четырехстадийной очистки позволило получить гомогенные препараты изоформ ГБДГ из листьев кукурузы. Фракционирование сульфатом аммония (до 80% насыщения) и гель-фильтрация на Sephadex G-25 позволили получить ферментную вытяжку с величиной общей активности 56,57 Е, при этом, значение удельной активности составляло 5.3 Е/мг белка. Проведение ионообменной хроматографии с использованием ДЭАЭ-Sephacel позволило обнаружить 2 пика активности ГБДГ, которые были десорбированы хлористым натрием. ГБДГ1 была очищена до удельной активности 637,03 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 344 раза, выход – 23 %. Вторая форма (ГБДГ2) получена с удельной активностью 700 Е/мг белка, степенью очистки 378 раза и выходом 18 %.

Установлено, что две изоформы ГБДГ имеют отличные друг от друга значения К_м к ГОМК и НАД⁺. Для ГБДГ1 она составила по ГОМК 3,9 ммоль, по НАД⁺ 0,7ммоль. Для ГБДГ2 по ГОМК 1,6 ммоль, по НАД⁺ 0,9ммоль.

Таким образом, в ходе проведенного исследования нами была разработана схема очистки гамма-гидроксibuтиратдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы, состоящая из четырех стадий. В результате получены два высокоочищенных препарата фермента, что позволило изучить сродство разных изоформ энзима к субстратам.

Список литературы:

1. Breitkreuz K. E. et al. A novel γ -hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency //Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Т. 278. – №. 42. – С. 41552-41556. 18
2. Fait A. et al. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants //Trends in plant science. – 2008. – Т. 13. – №. 1. – С. 14-19. 27
3. Ji J. et al. Roles of γ -aminobutyric acid on salinity-responsive genes at transcriptomic level in poplar: Involving in abscisic acid and ethylene-signalling pathways //Planta. – 2018. – Т. 248. – С. 675-690. 44
4. 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. 6
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. – Мир, 1966.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO СОРТОВ AMELANCHIER MEDIK.

Раева-Богословская Е.Н.

*ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН (ГБС РАН), Москва 127276;
katyaraeva@rambler.ru*

Род Ирга (*Amelanchier* Medik.) относится к семейству Rosaceae Juss. и включает 23 вида. Она является малораспространенной и перспективной для промышленного выращивания культурой. Кустарник используют как плодое и декоративными растением.

Сорта ирги размножают как традиционными способами (черенкованием и прививкой), так и современными биотехнологическими методами. Клональное микроразмножение считается одним из наиболее эффективных и используется для массового производства однородного посадочного материала. Важным этапом в культивировании растений *in vitro* является этап укоренения. Подбор оптимального состава питательной среды способствует повышению укореняемости микропобегов.

Цель работы - оптимизация гормонального состава питательной среды и изучение влияния активированного угля на ризогенез сортов ирги.

Объекты исследования: сорта 'Красноярская', 'Thiessan', 'Prince William' и 'Ballerina'. В качестве минеральной основы питательной среды использована $\frac{1}{2}$ Murashige-Skoog (1962). Проведено сравнение питательных сред с добавлением индолилмасляной (ИМК) и индолилуксусной (ИУК) кислот в концентрациях 0,5 мг/л и 1,0 мг/л, а также с активированным углем в концентрациях 0,1 г/л и 0,2 г/л. В качестве контроля использовали питательную среду с 1,0 мг/л ИМК без добавления активированного угля. Культивирование проводили при температуре 25°C и фотопериоде 16/8.

Установлено, что на этапе укоренения оптимальным является сочетание регуляторов роста - 1,0 мг/л ИМК с 1,0 мг/л ИУК. При этом укореняемость у исследованных сортов составила 73%, число корней $4,1 \pm 0,9$ шт., длина корней $0,9 \pm 0,1$ см.

Микропобеги, культивируемые на питательных средах с 0,2 г/л активированного угля, характеризовались максимальной длиной корней ($2,7 \pm 0,1$ см), низкой укореняемостью (65%) и минимальным числом корней ($2,2 \pm 0,2$ шт.). При снижении концентрации угля до 0,1 мг/л и применении индолилмасляной кислоты совместно с индолилуксусной в концентрации 1,0 мг/л, укореняемость повысилась до 71%, а число корней и длина корней составили $3,7 \pm 0,3$ шт. и $1,6 \pm 0,2$ см.

Таким образом, использование при укоренении микропобегов ирги активированного угля способствовало уменьшению числа корней и увеличению их длины в 1,5-2 раза. Также установлено, что добавление в питательную среду активированного угля способствовало снижению образования каллуса у основания экспланта.

Таким образом, оптимальным составом питательной среды для укоренения сортов *Amelanchier* является питательная среда с 1,0 мг/л ИМК и ИУК и добавлением активированного угля в концентрации 0,1 г/л.

Список литературы:

1. Хромов, Н. В. Особенности промышленного возделывания ирги в условиях Тамбовской области. Селекция и сорторазведение садовых культур. 2016. 3. 1. 153-155.
 2. Pruski K., Nowak J., Grainger G. Micropropagation of four cultivars of Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* NUTT.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1990. 21. 103-109.
- Контекст

ОПТИМИЗАЦИЯ РАБОТЫ ПЛОСКОТНОГО ФОТОБИОРЕАКТОРА С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Савиных Г.А.^{1,2}, Габриелян Д.А.^{1,2}, Габель Б.В.¹, Синетова М.А.¹, Лось Д.А.²

1 – Институт Физиологии Растений Российской Академии Наук имени К.А.

Тимирязева (ИФР РАН), 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д.35

E-mail: ifr@ippas.ru

*2 – Московский Авиационный Институт (Научный Исследовательский Университет)
(МАИ НИУ), 125993, г Москва, Волоколамское шоссе, д 4*

E-mail: mai@mai.ru

Микроводоросли – одноклеточные фотосинтезирующие организмы, играющие важную роль в образовании кислорода и органических соединений на нашей планете, поэтому их экологическое значение неопределимо. Микроводоросли нашли свое применение в многих сферах деятельности человека. Их потенциальные возможности в продуцировании ценных метаболитов, витаминов и ряда иных органических соединений вызывают к микроводорослям большой интерес. Культивирование микроводорослей в перспективе может создать альтернативу сельскому хозяйству из-за высокой продуктивности производства, отсутствия зависимости от условий окружающей среды и погодных условий, и возможности выращивать микроводоросли в условиях непригодных для высших растений [1].

Для интенсивного культивирования микроводорослей используются фотобиореакторы различного типа. Это аппараты, способные создавать и поддерживать оптимальные условия для эффективного процесса культивирования.

В промышленных масштабах целесообразно использовать режим полупроточного культивирования, в ходе которого часть суспензии регулярно заменяется на свежую питательную среду, поддерживая оптимальную плотность культуры в реакторе и уменьшая самозатенение клеток культуры [2]. Таких циклов может быть множество, но со временем на стенках реактора образуется биопленка, которая мешает прохождению света. В настоящем докладе представлены результаты интенсивного культивирования *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1 в плоскостных фотобиореакторах объемом 5 литров в трёх биологических повторностях [3]. В ходе работы выявлено что, длительность культивирования в полупроточном режиме составляет приблизительно 17 суток, после чего интенсивность роста падает и культивирование становится неэффективным. Чтобы избежать контаминации в циклах залива/слива суспензии вследствие воздействия окружающей средой, предлагается использовать методы очистки стенок, при которых не нужно открывать крышку реактора.

При использовании реактора объемом 5л за 17 суток можно получить 114 г сухой массы, которая будет стоить по 229 руб за г, соответственно 26083 руб с реактора за 17 суток. При масштабировании до объема в 100 литров цена за литр суспензии уменьшается приблизительно в 6 раз, затраты на заработную плату не изменяются, а разница в расходах на сырье незначительна. За цикл в 17 суток с реактора объемом 100 литров при полупроточном режиме с заменой 3/4 объема суспензии можно получить 2278 г сухой массы, и при цене 43.04 руб за грамм получить 98 045 руб. Чем больше объем реактора и время непрерывной работы реактора, тем процесс культивирования выгоднее.

Каждый перезапуск реактора занимает оплачиваемое время сотрудников, требует затрат на промывку реактора, затрат времени и сырья на разгон суспензии в установках интенсивного культивирования. Так, затраты на цикл работы в 17 суток реактора в полупроточном режиме составляют 34709 руб, а затраты на цикл работы в накопительном режиме (с перезапуском каждые 3 дня) составляют 51167 руб, поэтому так важно

увеличить время непрерывной работы реактора, что, в частности, достигается уменьшением зарастания, сбиванием биопленки со стенок.

В ходе работы, был предложен метод очистки от биопленки, основанный на распылении воды и питательной среды на стенки реактора при замене части суспензии через форсуночную головку, установленную в крышке реактора. Испытания форсуночной головки подтвердили, что биопленка успешно удаляется со стенок реактора. Эта технология позволит увеличить продолжительность непрерывной работы фотобиореактора в полупроточном режиме, что увеличит производительность установки и уменьшит количество затрат на производство, за счет отсутствия необходимости полного перезапуска реактора.

Список литературы:

1. Sinetova, M.A.; Sidorov, R.A.; Starikov, A.Y.; Voronkov, A.S.; Medvedeva, A.S.; Krivova, Z.V.; Pakholkova, M.S.; Bachin, D.V.; Bedbenov, V.S.; Gabrielyan, D.A.; et al. Assessment of the biotechnological potential of cyanobacterial and microalgal strains from IPPAS culture collection. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020, 56, 794–808.

2. Shcherbakova N.V., Gabrielyan D.A., Sinetova M.A., Gabel B.V., Gabrielian A.K., Markelova A.G., Los D.A. Optimization of the intensive cultivation modes for *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1 in the laboratory flat-panel photobioreactors // Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PLANTGEN 2023): тезисы докладов / Под ред. А.А. Калачева, Т.А. Горшковой, М.Л. Пономаревой; ФИЦ «КазНЦ РАН» // VII Международная научная конференция (10–15 июля 2023 г., Казань, Россия). – Казань: ФЭН, 2023. – 472 с. ISBN 978-5-9690-1133-5

3. Gabrielyan, D.A.; Gabel, B.V.; Sinetova, M.A.; Gabrielian, A.K.; Markelova, A.G.; Shcherbakova, N.V.; Los, D.A. (2022) Optimization of CO₂ Supply for the Intensive Cultivation of *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1 in the Laboratory and Pilot-Scale Flat-Panel Photobioreactors. *Life* 2022, 12, 1469.

КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЁННЫХ СЕМЯПОЧЕК ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM L.*)

Тукусер Я.П., Чичварина О.А., Алехина К.Г., Заячковская Т.В., Домблидес Е.А.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр овощеводства», 143072, Московская область,
пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14
e-mail: yana-tukuser@mail.ru*

Томат - важнейшая сельскохозяйственная культура с годовым производством продукции 180 млн т в мире и с количеством занимаемых площадей 5 млн га [1]. Культура широко применяется в качестве модельного объекта в различных фундаментальных, а также прикладных исследованиях, например при получении гаплоидных и трансгенных растений, основанных на использовании методов культуры клеток и тканей *in vitro* [2].

Ускоренное получение выровненных родительских линий возможно с помощью ДН-технологий (double haploid – удвоенные гаплоиды). Гаплоидные растения получают методом партеногенеза *in situ*, стимулированного опылением обработанной/облученной пыльцой, а также в культуре неопылённых семяпочек *in vitro* или при культивировании мужского гаметофита (культура пыльников и изолированных микроспор *in vitro*). После удвоения хромосомного набора, полученные гаплоидные эмбриониды/растения становятся полностью гомозиготными. ДН-растения методом гиногенеза были получены у различных

видов, таких как лук [3], лук-порей [4], лук-шалот [5], сахарная свекла [6], огурец [7], кабачок [8].

Впервые гаплоидные растения томата в культуре *in vitro* из неопылённых семяпочек были получены у сорта Мэрглоуб в 1930 году при партеногенетическом развитии яйцеклетки [9], проведенное цитологическое исследование выявило присутствие гаплоидных, диплоидных, тетраплоидных форм [10]. Для индукции гаплоидии также использовали опыление чужеродной пылью *Solanum sisymbriifolium* Lam. [11;12]. Методы индукции гиногенеза *Solanum lycopersicum* L. ещё недостаточно разработаны, поэтому настоящее исследование направлено на разработку элементов методики получения гаплоидных растений томата культурного в культуре *in vitro* из неопылённых семяпочек.

Исследования проводили на томате (*Solanum lycopersicum* L.) сорта Розовый бутон из коллекции лаборатории селекции и семеноводства пасленовых культур ФГБНУ ФНЦО. Для введения в культуру *in vitro* в качестве эксплантов использовали полураскрытые бутоны (в стадии за 1 сутки до распускания цветка). Бутоны промывали водопроводной водой с моющим средством «АОС» (5 мин.). Поверхностную стерилизацию проводили в 96 % этаноле (30 с), затем в 50 % водном растворе препарата «Белизна» с добавлением 2-3 капель Твина-20 (15 мин), с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде (10 мин.). У бутонов стерильным пинцетом и скальпелем удаляли лепестки и переносили для дорастивания на индукционную агаризованную (7 г/л) питательную среду минерального состава MS [13] с концентрацией сахарозы 2 % и добавлением 2 мг/л зеатина и 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК).

Культивирование проводили на стеллажах со смешанным освещением люминесцентными лампами двух типов: OSRAM Fluora L36W/77 (с преобладанием синего и красного спектра) и Philips 36W/54-765 (с преобладанием белого спектра), при общей освещенности $24 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, фотопериоде 16 / 8 часов (день / ночь) при 25°C круглосуточно.

На 21 сутки практически у всех введенных в культуру завязей, основание значительно увеличивалось в размере (в 3-5 раз) и приобретало шарообразную форму, напоминая «микроплод» томата, из которого уже было возможно с помощью препаровальных игл под стереомикроскопом при 10× увеличении изолировать семяпочки. Размер семяпочек не превышал 1 мм в диаметре. Культивирование семяпочек продолжали в стеклянных банках (100 мл) с пластиковыми воздухопроницаемыми крышками на свежей индукционной питательной среде того же состава, которая использовалась для бутонов.

Через 7 суток у семяпочек без признаков повреждения светло-зеленая окраска сменялась на темно-зеленую, а к 14 дню культивирования они бурели. Более 70 % семяпочек увеличивались в размерах до 2-3 мм.

Нам удалось добиться индукции каллусообразования у 50% введенных в культуру семяпочек. Каллус светло-зеленой окраски появлялся в месте растрескивания оболочки семяпочки и достаточно быстро разрастался. Индуцированные семяпочки с каллусом и отделенный каллус каждые 10 дней переносили на свежие питательные среды различного состава с несколькими вариантами регуляторов роста растений, однако в настоящий момент добиться формирования точек роста и побегообразования нам не удалось.

Список литературы:

1. FAOSTAT. Statistics Database. 2022. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed on 11 October 2022).
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК Пресс, 1999. 160 с.
3. Bohanec B., Jakše M. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions // Plant Cell Reports. – 1999. – Т. 18. – №. 9. – P.737-742.

4. Schum A. et al. Regeneration of dihaploids via gynogenesis in *Allium porrum* L //Gartenbauwissenschaft. – 1993. – Т. 58. – №. 5. – P. 227-232.
5. Cohat J. Production of gynogenetic plants by *in vitro* culture of flower buds in shallot (*Allium cepa* L varaggregatum). – 1994
6. Ferrant V., Bouharmont J. Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L //Sexual Plant Reproduction. – 1994. – Т. 7. – №. 1. – P. 12-16.
7. Шмыкова Н. А., Супрунова Т. П. Индукция гиногенеза в культуре *in vitro* неопыленных семяпочек *Cucumis sativus* L //Гавриш. – 2009. – №. 4. – С. 40-44.
8. Домблидес Е. А., Ермолаев Е. А., Белов С. Н. Получение удвоенных гаплоидов *Cucurbita pepo* L //Овощи России. – 2021. – №. 4. – С. 11-26.
9. Boswell V. R. GENETICS OF TOMATOES //Yearbook of Agriculture. – 1937. – P. 176.
10. Lindstrom E. W. Genetics of polyploidy //The Botanical Review. – 1936. – Т. 2. – P. 197-215.
11. Chambonnet D. Essais d'haploidisation de la tomate //Rapport D'Activite. – 1995. – Т. 1996. – P. 84-85.
12. Bal U., Abak K. Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a critical review //Euphytica. – 2007. – Т. 158. – P. 1-9.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia plantarum. – 1962. – V.15. – №3. – P.473-497. <https://doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

АСПЕКТЫ АДАПТАЦИИ И ДОРАЩИВАНИЯ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ ПОСЛЕ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ

Тураева О.А.

ФГБНУ ФНЦ Садоводства, Москва, Россия

Введение. Земляника является одной из ведущих культур в ягодоводстве. Популярность земляники садовой объясняется ее востребованностью. Однако сегодня остро стоит вопрос обеспечения достаточным количеством сертифицированного посадочного материала при промышленном производстве земляники садовой. Биотехнологические методы имеют решающее значение в восстановлении и воспроизводстве растительного материала на промышленном уровне, благодаря чему сохраняются современные сорта земляники садовой.

Размножение растений в культуре ткани (*in vitro*) дает возможность получить посадочный материал, свободный от вирусных, бактериальных и грибных болезней.

Цель и задачи. Повысить эффективность адаптации и доращивания земляники садовой после клонального микроразмножения; изучить влияние корневой системы и внешних факторов среды в период адаптации растений, а также определить необходимость доращивания растений.

При пересадке микрорастений в нестерильные условия необходимо учитывать целый ряд факторов:

- 1.Сортовые, видовые и физиологические особенности растения. Состояние корневой системы;
2. Световые факторы;
3. Температура;
4. Влажность;
5. Субстрат;
6. Применение минеральных удобрений.

Микрорастения можно переносить в нестерильные условия после того, как в пробирке сформировалось хорошо развитое микрорастение с хорошей корневой системой. Если корневая система не соответствует растения, погибают.

Субстрат для высадки стерилизуют в сушильном шкафу, или автоклавированием в стерилизаторе паровом.

Растения для адаптации к нестерильным условиям целесообразно высаживать в условиях, позволяющих создать 100% влажность. По прошествии 2-3 недель влажность воздуха постепенно снижают и доводят до 60-70%.

Наибольшим значением для роста и развития растений являются световые факторы и температура. Существенное значение для регуляции морфогенеза имеет качество света. , Фотопериод составляет 16 часов. Оптимальная температура +22...+26 °С.

Для лучшего развития растений необходимо внесение минеральных микро и макро удобрений.

После окончания этапа адаптации к нестерильным условиям растения доращивают в тепличных условиях, перед их высадкой в поле параллельно проводят тестирование на наличие вирусов.

Заключение. Важным этапом клонального микроразмножения является перевод растений из условий *in vitro* в нестерильные условия. Адаптация регенерантов земляники обычно проводится в два этапа: первый этап – в адаптационной комнате, второй – в теплице. Полив производится водопроводной водой. Земляника является одной из тех культур, которая обладает высокой адаптивностью и стрессоустойчивостью при переводе из условий *in vitro* в *ex vitro*.

Список литературы:

1. Методические рекомендации по клональному микроразмножению плодовых культур [Бьядовский И.А., Упадышев М.Т. 2020],
2. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям.[В.И. Деменко, В.А. Лебедев. 2011]
3. Морфогенетическая регуляция роста и развития земляники садовой (*Fragaria x ananassa* Duch.) в условиях светокультуры [Яковцева М.Н.]
4. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro*. [Кухарчик Н., Кастрицкая М., Семенов С. – Litres, 2021.]

РОСТ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА В ПРОВОДНИКОВЫХ ТКАНЯХ ПЕСТИКА ПРИ МЕЖРОДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ♀ *PETUNIA HYBRIDA* E. VILM. X ♂ *NICOTIANA TABACUM* L.

Ульянов А.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***

Механизм опыления включает в себя не только способ доставки функционально действенной пыльцы от структуры, в которой она образуется, к поверхности восприимчивой семязачатка, но и физиологические барьеры, препятствующие оплодотворению. Несовместимость половых элементов при опылении и оплодотворении у растений выражается в неспособности пыльцевых трубок проникать на всю длину столбика и осуществлять оплодотворение, хотя и пыльца, и пестик полностью функционально активны. Половая несовместимость часто проявляется при межвидовых и межродовых скрещиваниях, благодаря чему обеспечивается сохранение единства и

воспроизведения вида. Изучение этого явления особенно важно селекционерам для получения новых сортов и гибридов.

Целью данной работы было изучить рост пыльцевых трубок табака (*Nicotiana tabacum* L.) в проводниковых тканях петунии (*Petunia hybrida* E. Vilm.). Для этого накануне эксперимента проводили кастрацию цветков петунии на стадии бутонов с антоцианом и изолировали кастрированные цветки. На следующий день подготовленные цветки опыляли свежей пылью табака. Сбор опыленных пестиков осуществляли через 2, 4, 6 и 24 часа после опыления. Материал фиксировали в уксусном спирте (спирт:уксусная кислота (3:1)). Перед приготовлением препаратов для флуоресцентной микроскопии, зафиксированные пестики мацерировали 20% спиртовым раствором КОН и окрашивали анилиновым голубым (красителем, способным связываться с каллозой пыльцевых трубок). Визуализацию и измерение пыльцевых трубок в проводниковых тканях пестика проводили на инвертированном микроскопе БиОптик СИ-300.

В результате эксперимента, мы определили, что большинство пыльцевых зерен табака прорастают на рыльце пестика петунии, растут по проводниковым тканям пестика и останавливают свой рост через 6-8 часов после опыления, на расстоянии 1283 ± 32 мкм от поверхности рыльца. Через 2 часа после опыления длина пыльцевых трубок составляла 277 ± 23 мкм, через 4 часа достигала длины 760 ± 56 мкм, к шести часам - 1114 ± 68 мкм и оставалась примерно на этом же уровне до 24 часов после опыления. Завязывания семян не происходило.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *HYSSOPUS OFFICINALIS* СОРТА ИНЕЙ

Федотова П.А., Жданова М.В., Чередниченко М.Ю.

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва 127434

Семейство *Lamiaceae* Martinov (яснотковые) богато различными видами растений, содержащих важные и полезные биологически активные вещества (БАВ) для косметической, фармацевтической, пищевой и других отраслей промышленности. Так, иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) – многолетнее травянистое эфиромасличное растение, обладает значительным количеством биологически активных веществ. В его состав входят такие соединения, как лимонен, флавоноиды, дубильные вещества, камедь, фенольные кислоты и витамины и др. (Цицилин, 2014). Также сырье иссопа лекарственного богато макро- и микроэлементами, среди которых 10 являются эссенциальными, а 4 – условно эссенциальными (Никитина, Попова, 2006). Как и во многих других лекарственных растениях, иссоп содержит такие элементы, как Al, P, Mg, K, Ca, Na, в особенности повышено содержание Zn. Эфирное масло *H. officinalis* относят к пинокамфеновому хемотипу: в различных сортах отмечают содержание *транс*-пинокамфена (25,47-37,34 %), пинокарвона (21,59 %), β-пинена (10,76-13,07 %), отвечающего за антимикробную активность, и других химических веществ (Курамагомедов и др., 2020). Благодаря своему богатому составу растение обладает антисептическими, муколитическими, противовоспалительными, успокаивающими, миорелаксирующими, противовирусными, антиоксидантными, противоопухолевыми и другими полезными свойствами, может выступать в качестве лекарства для борьбы с гипергликемией (Khazaie et al., 2008; Franchomme, Rénoël, 1990; Malencic et al., 2000; Makino et al., 2000; Miyazaki et al., 2003).

Используя метод клонального микроразмножения, можно добиться ускорения

прироста биомассы, тем самым сделать получение БАВ из растений более эффективным. Этот метод позволяет выращивать растения на протяжении всего года вне зависимости от погоды и других стрессовых факторов внешней среды. Благодаря этому методу биоматериал и содержание в нем БАВ стандартизируется, а сами растения свободны от болезней без использования пестицидов и гербицидов. В данной работе было проведено исследование влияния экзогенных регуляторов роста на эффективность процесса клонального микроразмножения.

Для определения влияния гормонального состава питательной среды на эффективность клонального микроразмножения *H. officinalis* сорта Иней одноузловые черенки *H. officinalis* от полученных ранее асептических растений помещали в пластиковые контейнеры, содержащие различные варианты питательной среды Мурасиге и Скуга (МС): МС без добавления фитогормонов и регуляторов роста, МС + 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), МС + 0,5 мг/л индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). Так, при наличии некоторых различий в форме кривых роста достоверной разницы по высоте между контрольным (без фитогормонов) и опытными (с добавлением БАП или ИУК) вариантами у асептических растений *H. officinalis* сорта Иней не наблюдали. Однако на безгормональной среде асептические растения чаще ветвились, а также обладали более крупными листьями.

В ходе исследования было выявлено преимущество выращивания *H. officinalis* сорта Иней на безгормональной среде МС в связи с упрощением и удешевлением процесса клонального микроразмножения и незначительной разницей в тенденции роста на гормональных средах, а также присутствующими внешними положительными характеристиками растений, таких как крупные листья, так как именно в данной части растения было обнаружено преобладание содержания эфирного масла, содержащего ценные для фармацевтической, косметической и пищевой промышленности БАВ, обуславливающие актуальность выращивания данного вида (Работягов, 2017).

Таким образом, асептические растения *H. officinalis* сорта Иней оказались нечувствительны к добавлению в питательную среду фитогормонов в исследованной концентрации; необходимо дальнейшее изучение действия данного фактора.

Список литературы:

1. Цицилин А.Н. Лекарственные растения на даче и вокруг нас: полная энциклопедия». М.: Эксмо, 2014. С. 28-32.
2. Работягов В.Д. Изучение содержания эфирного масла в различных органах *Hyssopus officinalis* L. // Бюллетень ГНБС. 2017. № 125. С. 46-49.
3. Никитина А.С., Попова О.И. Элементный состав змееголовника молдавского и иссопа лекарственного, культивируемых в Ставропольском крае // Экология человека. 2006. № 12. С. 12–13.
4. Курамагомедов М.К., Алиев А.М., Исламова Ф.И. и др. Компонентный состав эфирных масел и антиоксидантная активность сортов *Hyssopus officinalis* L., интродуцированных в горных условиях Дагестана // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020. № 12. С. 24-30.
5. Khazaie H.R., Nadjafi F., Bannayan M. Effect of irrigation frequency and planting density on herbage biomass and oil production of thyme (*Thymus vulgaris*) and hyssop (*Hyssopus officinalis*) // Industrial Crops and Products. 2008. Vol. 27. P. 315–321.
6. Franchomme P., Péroël D. L'aromathérapie exactement. Jollois, Limoges, 1990. P. 28-50.
7. Malenčić D., Gasic O., Popović M., Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem // Phytotherapy Research. 2000. Vol. 14. No. 7. P. 546-548.
8. Makino T., Ono T., Muso E., Yoshida H., Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells // Nephrology Dialysis Transplantation. 2000. Vol. 15. No. 8. P. 1140-1145.

9. Miyazaki H, Matsuura H, Yanagiya C., Inhibitory Effects of Hyssop (*Hyssopus officinalis*) Extracts on Intestinal α -Glucosidase Activity and Postprandial Hyperglycemia // Journal of nutritional science and vitaminology. 2003. Vol. 49. No. 5. P. 346-349.

БАКТЕРИИ РОДА *PSEUDOMONAS*, КАК СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ. ОТ СВЕТОПЛОЩАДКИ ДО ПОЛЯ

Феоктистова А.В., Тимергалин М.Д., Рамеев Т.В., Четвериков С.П.

Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УИБ УФИЦ РАН), Уфа 450054, e-mail: feoktistova.arisha@yandex.ru

За последнее время во всем мире, в том числе и в России неизмеримо вырос интерес к использованию микроорганизмов в сельском хозяйстве. Микробиологические препараты известны уже более ста лет, однако, зачастую их эффективность оказывалась недостаточной или нестабильной, из-за чего они не смогли сыграть значимую роль в повышении продуктивности сельскохозяйственного производства. Колонии ризосферных бактерий, формирующиеся на поверхности корней, способны обеспечить растениям ряд преимуществ [1]. Из всех полезных свойств ризосферных бактерий наименее известной является их способность влиять на стрессовые реакции растения. Условия выращивания часто вызывают стрессовые реакции у растений, которые опосредуются определенными биохимическими сигналами.

Засуха представляет собой одну из важнейших проблем, стоящих перед современным агропромышленным производством. Одним из наиболее эффективных направлений защиты посевов от засухи является усиление естественной засухоустойчивости сельскохозяйственных растений. Наряду с выведением новых засухоустойчивых сортов растений, велика также роль использования ростостимулирующих ризосферных бактерий [2].

Эксперименты проводили на растениях мягкой яровой пшеницы с использованием штаммов бактерий из коллекции УИБ УФИЦ РАН *Pseudomonas koreensis* ИБ-4, *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D [3] и *Pseudomonas protegens* DA1.2 в условиях дефицита почвенной влаги и в сочетании с гербицидным стрессом, как в лабораторных, так и в полевых условиях [4].

В лабораторных опытах мы наблюдали снижение эвапотранспирации под влиянием дефицита воды, к чему могло привести замедление роста побегов, в то время как у растений, в ризосфере которых мы интродуцировали бактерии *P. koreensis* ИБ-4 и *P. plecoglossicida* 2.4-D, транспирация на фоне прекращения полива была выше. Механизм адаптации растений к дефициту воды проявлялся в активации роста корней, как на фоне дополнительной бактериализации ризосферы, так и без нее. Изученные штаммы по-разному проявляли стимулирующую активность при разных вариантах засухи. Действие *P. koreensis* ИБ-4 было более эффективным при временном прекращении полива, а *P. plecoglossicida* 2.4-D - на фоне умеренной засухи. Штамм бактерий *Pseudomonas protegens* DA1.2, выделенный из антропогенной почвы и устойчивый к гербицидам, в сравнении со штаммом *P. koreensis* ИБ-4, так же по-другому проявлял свою ростостимулирующую активность в условиях дефицита воды и химического воздействия гербицидов. При засухе различной интенсивности оба штамма приводили к увеличению массы корня и проявляли свою эффективность в равной степени. Но в условиях гербицидного стресса штамм *P. protegens* DA1.2 проявил больший стимулирующий эффект за счет увеличения массы корня и побега. Также мы установили положительное действие данного штамма бактерий

на рост растений пшеницы в условиях комбинированного стресса «гербицид + засуха». В условиях дефицита воды обработка растений гербицидом ауксиновой природы тормозила рост растений по сравнению с аналогичными вариантами без гербицида, что было связано с угнетением роста корней и снижением содержания эндогенных ауксинов в растениях. В условиях комбинированного стресса обработка растений штаммом *P. protegens* DA1.2 увеличила соотношение ауксины/абсцизовая кислота и предотвратила подавление роста корней ауксиноподобным гербицидом, обеспечивая поглощение воды корнями, а также повышение транспирации. В результате было снижено содержание маркера окислительного стресса малонового диальдегида. Положительное действие штамма бактерий *P. protegens* DA1.2 на растения пшеницы, выращенных на светоплощадке, при комбинированном стрессе также подтверждалось и в засушливых полевых условиях. Бактеризация улучшила водный баланс растений пшеницы, добавление штамма бактерий *P. protegens* DA1.2 в баковую смесь с гербицидом увеличило относительное содержание воды в листьях пшеницы по сравнению с растениями, обработанными только гербицидом. Положительный эффект обработки растений бактерией *P. protegens* DA1.2 сочетался как с повышением урожайности, так и с увеличением количества клейковины в зерне. Однако влияние фитогормонов, синтезируемых бактериями, на этот процесс все еще нуждается в изучении. Таким образом, ауксиноподобный гербицид и ауксинпродуцирующая бактерия *P. protegens* DA1.2 могут по-разному влиять на баланс фитогормонов. Это может быть потенциальной причиной улучшения роста растений пшеницы в засушливые периоды, когда бактерия *P. protegens* DA1.2 добавлена в смеси для химической прополки сельскохозяйственных растений.

Список литературы:

1. Singh, I. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Their Various Mechanisms for Plant Growth Enhancement in Stressful Conditions—A Review. *Eur. J. Biol. Res.* 2018. 8:191–213.
2. Chandra, P.; Wunnava, A.; Verma, P.; Chandra, A.; Sharma, R.K. Strategies to Mitigate the Adverse Effect of Drought Stress on Crop Plants—Influences of Soil Bacteria: A Review. *Pedosphere* 2021. 31:496–509.
3. Тимергалин М.Д., Феоктистова А.В., Рамеев Т.В., Иванов Р.С., Четвериков С.П. Влияние штаммов ризосферных бактерий *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 и *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D на рост растений пшеницы при дефиците воды разной интенсивности. *Экобиотех.* 2019. Т. 2. 4:545-552.
4. Bakaeva M, Chetverikov S, Timergalin M, Feoktistova A, Rameev T, Chetverikova D, Kenjeva A, Starikov S, Sharipov D, Hkudaygulov G. PGP-Bacterium *Pseudomonas protegens* Improves Bread Wheat Growth and Mitigates Herbicide and Drought Stress. *Plants.* 2022. 11(23):3289.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ОБРАБОТКИ ЛАТРУНКУЛИНОМ В РЫЛЕЦ ПЕТУНИИ (*PETUNIA HYBRIDA* E. VILM.) НА АКТИВНОСТЬ КАСПАЗО-ПОДОБНЫХ ПРОТЕАЗ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Ханина Т.П.¹, Тимофеева Г.В.², Захарова Е.В.¹

¹ – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42,
E-mail: iab@iab.ac.ru

**2 – Государственное образовательное учреждение высшего образования
Московской области «Государственный социально-гуманитарный
университет», 140411, г. Коломна, ул. Зеленая 30,
E-mail: mo_gsgu@mosreg.ru**

Прорастание пыльцы и поддержание полярного роста пыльцевой трубки требуют как временной, так и пространственной координации многих клеточных функций, в том числе динамической организации элементов цитоскелета, внутриклеточного транспорта везикул, несущих материал для построения клеточной стенки в ходе экзо- и эндоцитоза, трансмембранного транспорта основных физиологически важных ионов, а также транзиторных изменений параметров внутриклеточного ионного гомеостаза, таких как рН и рСа. Актиновый цитоскелет обеспечивает доставку секреторных веществ и мембранных везикул в апикальную зону пыльцевой трубки благодаря активности актиновых филаментов в ходе их полярного роста. Центральная роль актинового цитоскелета мужского гаметофита в регуляции прорастания и роста подтверждается данными о том, что ингибитор актина Латрункулин В блокировал оба процесса. Латрункулин В (Лат В) — органическое соединение, токсин группы латрункулинов из морских губок, обитающих в Красном море *Latrunculia magnifica*. Широко используется в клеточной биологии в качестве ингибитора актиновой полимеризации, блокирующего образование микрофиламентов. Обработка Лат В приводит к разрушению актиновых волокон цитоскелета пыльцевой трубки до точечных очагов (Kovaleva et al., 2016).

Целью данного исследования было выяснить запускает ли разрушение актинового цитоскелета программируемую клеточную смерть в пыльцевых трубках, а именно активность каспазо-подобных протеаз. Нами был предпринят ряд экспериментов с обработкой Лат В *in vitro*.

Пыльцу самосовместимого клона петунии проращивали на среде культивирования 1,5 часа. К этому моменту длина пыльцевых трубок петунии достигала $123 \pm 8,1$ мкм. Затем пыльцу с пыльцевыми трубками переносили в среду с Лат В (5 нМ) и помещали на проращивание еще на 1 час. Длина пыльцевых трубок за этот час культивирования не изменилась.

Исследование активности CLP после всех манипуляций по протоколу *Image-iTTM Live Green Caspase Detection Kit* показало, что в обработка растущих пыльцевых трубок Лат В, запускала активность каспазо-подобных протеаз. Зеленый флуоресцентный сигнал наблюдали в пыльцевых трубках петунии самосовместимого клона после обработки Лат В.

Таким образом, разрушение актинового цитоскелета под действием Лат. В активирует каспазо-подобные протеазы и влияет на запуск процесса программируемой клеточной смерти *in vitro*.

Список литературы:

1. Kovaleva L, Voronkov A, Zakharova E, Minkina Y, Timofeeva G, Andreev I (2016) Regulation of petunia pollen tube growth by phytohormones: identification of their potential targets. *J Agric Sci Technol A* 6:239–254.

**СТИМУЛИРОВАНИЕ РОСТА ПРОРОСТКОВ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР ПОСЛЕ
ОБРАБОТКИ *BACILLUS SUBTILIS* И-5/6**

Хигерович Л.А., Новикова И.И.

ФГБНУ «Всероссийский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР), Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш.Подбельского, 3, 196608; E-mail: info@vizr.spb.ru

Современное состояние фитопатологической обстановки в овощеводстве требует более внимательного подхода к организации защиты культур от грибных и бактериальных болезней. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области является разработка биопрепаратов на основе природных штаммов-продуцентов.

В серии лабораторных опытов, проведенных за предыдущие года исследования, из исходной культуры природного изолята *Bacillus subtilis* И5 было получено 50 изолятов первого поколения. По результатам опытов по определению антагонистической активности в отношении ряда фитопатогенных тест-культур из государственной коллекции ВИЗР на чашках Петри, по совокупности показателей были отобраны изоляты И-5 № 5 и И-5 № 6. Далее отобранные изоляты проверили на ростостимулирующую активность и защитные свойства в отношении проростков овощных культур. Для этого провели серию модельных лабораторных опытов на семенах овощных культур – томата и огурца. Исследование подразумевало три этапа. На первом этапе осуществлялся подбор концентрации суспензии продуцента с наибольшим стимулирующим и наименьшим токсическим эффектом. На втором этапе был осуществлен подбор концентрации суспензии фитопатогена, соответствующего культуре растения – *Fusarium oxysporum* и *F.culmorum* для семян огурца и *Clavibacter michiganensis* для томата. На третьем этапе семена замачивали в суспензии фитопатогена, после чего обрабатывали суспензией И-5/6 с подобранными на предыдущих этапах титрами.

Опыты на семенах огурца показали, что увеличение длины корешка проростков по сравнению с контролем составило 27,1% (+9,9 мм), 37,6% (50,1 мм против 36,4 в контроле) и 31,3% при использовании для обработки семян суспензий с титрами 10^9 , 10^8 и 10^7 КОЕ/мл, соответственно, масса корешка при этом увеличилась на 20,5%, 23,5%, 17,6%, соответственно. Опыт с искусственным инфекционным фоном показал, что изолят *B.subtilis* И-5/6 снижал негативное влияние фитопатогенов на накопление массы корневой системы. Отмечено восстановление показателя массы корешка после обработки изолятом *B.subtilis* И5/6 по сравнению с зараженным контролем: убыль массы корешка в опыте без обработки *B.subtilis* И-5/6 составила 42,9 % для *F.oxysporum* и 14,3% для *F.culmorum*. В вариантах с обработкой *B.subtilis* И-5/6 негативное влияние на накопление массы уменьшилось в 2 раза (7,1 против 14,3% в контроле с заражением *F.culmorum*). При заражении *F.oxysporum* снижение массы корешка составило 42,9 %, тогда как последующая обработка *B.subtilis* И5/6 полностью нивелировала негативное действие фитопатогена на накопление массы корня. Также отмечено, что при обработке изолятом *B.subtilis* И-5/6 зараженных семян значения длины корня и ростка превышали длину в контроле в среднем на 30% для корня и на 5% для ростка. Также отмечено, что на 3 сутки после окончания опыта на отделенных ростках образовались корни (наибольшее количество и длина новообразованных корней отмечена при титрах изолята 108 КОЕ/мл), а на верхней части корешка появились зеленые участки, что также свидетельствует о стимуляции изолятом *B.subtilis* И-5/6 процессов регенерации растения.

При обработке семян томата суспензией *B.subtilis* И-5 с титром 10^8 КОЕ/мл длина корня увеличивалась на 16,6% по сравнению с контролем, замоченным в воде (59,8 против 51,3 мм), длина проростка увеличилась на 13,2% (36,8 мм против 32,5 в контроле). Опыт с искусственным инфекционным фоном *C.michiganensis* показал, что обработка семян томата культуральной жидкости клона *B.subtilis* И-5/6 в концентрации 108 КОЕ/мл повышала энергию прорастания на 13% (73,3% против 65% в контроле с водой), всхожесть – на 7% (97% против 90% в контроле), и среднюю массу корня – на 11% (9 мг против 10 мг).

Данные опыты демонстрируют наличие ростостимулирующей активности у культуры *B.subtilis* И-5/6 в отношении проростков огурца и томата. Аналогичные опыты в отношении капусты белокочанной находятся в стадии исполнения.

Список литературы:

1. ГОСТ 12044-93. Межгосударственный стандарт. Семена Сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями (с изменениями). Группа С09. Дата введения 1995-01-01 (поправка от 2011).
2. Novikova I.I., Titova Yu.A., Boykova I.V., Zeyruk V.N., Krasnobaeva I.L., Serova T.A. Biological justification for the optimization of preparative forms of biological preparations based on antagonist microbes to control populations of phytopathogenic fungi and bacteria – causative agents of plant diseases // Bulletin of Plant Protection. 2017. No. 3. P. 16-23.
3. Сидорова Т.М., Асатунова А.М., Хомяк А.И. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов. Сельскохозяйственная биология, 2018, том 53, № 1, с. 29-37.

ЭКСПРЕССИЯ SIX-ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С ПРИЗНАКАМИ ФУЗАРИОЗНОГО УВЯДАНИЯ

Холиков С.И.¹, Марданова А. М.²

*1 – ФГАОУ ВО «Российский государственный аграрный университет –
Московская сельскохозяйственная академия имени Тимирязева, Институт
агробиотехнологии» (ФГАОУ ВО РГАУ–МСХА имени Тимирязева), Москва 127434, E-
mail: info@rgau-msha.ru*

*2 – ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии» (ФГАОУ ВО КФУ, ИФМиБ),
Казань 420008; E- mail: medbiol@kpfu.ru*

Фитопатогенные виды *Fusarium*, вызывающие увядание растений картофеля в поле и сухую фузариозную гниль клубней во время хранения, в настоящее время становятся глобальной угрозой при производстве картофеля [1]. Актуальной проблемой является изучение молекулярных механизмов взаимодействия растений картофеля с фитопатогенами и выяснение роли различных факторов вирулентности в патогенезе фузариозной инфекции. Известно, что SIX-гены кодируют эффекторный белки, секретируемые в ксилеме, некоторые из которых играют роль в вирулентности фузариий [2]. Однако в настоящее время отсутствуют данные о функциональной роли большинства SIX-генов.

Целью работы был сравнительный анализ экспрессии SIX-генов *Fusarium* в тканях условно-здоровых растений картофеля и растений с признаками фузариозного увядания.

Материалы и методы. Объектом исследования были ткани корневых шейек двух условно-здоровых растений (Г31 и Г35) и одного растения картофеля сорта Гала с признаками фузариозного увядания (ГБ3), выращенных на экспериментальных полях Татарского НИИ сельского хозяйства (Республика Татарстан). Корневые шейки использовали для выделения микромицетов рода *Fusarium* и анализа экспрессии SIX-генов. Вирулентность выделенных изолятов оценивали по их способности вызывать образование сухой гнили при искусственном инфицировании клубней методом укола. Зараженные клубни инкубировали в течение 2 недель и затем оценивали степень повреждения клубней. Для выделения и культивирования микромицетов использовали среду Чапека. Для выделения РНК растительные ткани перемалывали в жидком азоте и затем из 100 мг выделяли суммарную РНК («ExtractRNA», ООО Евроген, Россия). Концентрацию РНК определяли с использованием NanoDrop 2000 (Thermo, США). Экспрессию генов определяли по количеству копий, получаемых мРНК [3], с использованием CFX384Touch Real-Time PCR System (Bio-Rad). Условия ПЦР: 95°C - 3 мин, 39 циклов: 95°C - 10 с, 55°C - 30 сек с детекцией флуоресценции после каждого

цикла. Анализировали 100 нг кДНК с использованием по 200 нМ каждого праймера и 100 нМ 5x qPCRmix-HS SYBR (Evrogen). Экспрессию мРНК нормировали по 18S рРНК. Использовали праймеры, разработанные для последовательностей SIX-генов. Полученные данные анализировали с помощью программы Excel версия 14.0.

Результаты. Из корневых шеек растений картофеля были выделены в чистые культуры 3 изолята микромицетов, идентифицированные по морфологии конидий как *Fusarium* sp. Выделение микромицетов из тканей условно-здоровых растений свидетельствует о наличии латентной инфекции или о присутствии сапрофитных штаммов фузарий. Все выделенные изоляты проявляли вирулентность хоть и в разной степени при искусственном инфицировании клубней. Можно отметить, что изоляты, выделенные из корневой шейки условно-здоровых растений картофеля, вызывали сухую гниль клубней в меньшей степени, чем изолят, выделенный из растения с признаками фузариозного увядания. Анализ экспрессии фузариозных SIX-генов в тканях условно-здоровых и больных растений выявил различия в спектре и количестве экспрессирующихся генов. В тканях картофеля с фузариозом обнаружена экспрессия 7 SIX-генов, а в тканях условно-здоровых растений – 2 и 5 SIX-генов, что также может свидетельствовать о латентной инфекции или наличие сапрофитных микромицетов. Только в тканях растений с фузариозным увяданием экспрессировались гены SIX-1 и SIX-15, которые не были выявлены в тканях условно здоровых растений. Известно, что ген SIX-1 играет важную роль в полной вирулентности *Fusarium oxysporum*. Так же в тканях больного растения экспрессировались гены SIX-5, SIX-11 и SIX-13, которые также экспрессировались в корневой шейке растения с латентной инфекцией. Всего два гена (SIX-7 и SIX-9) экспрессировались во всех трех образцах корневых шеек картофеля. Таким образом, в тканях растений с признаками фузариозного увядания экспрессируется более широкий спектр SIX-генов, чем в тканях растений с латентной инфекцией или с сапрофитными микромицетами. Дальнейший анализ взаимосвязи фузариозной инфекции с экспрессией определенных генов необходим для выяснения их роли в вирулентности штаммов *Fusarium*, а также создания тестов для контроля фузариоза картофеля.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-16-00138.

Список литературы:

1. Tiwari R. K., Kumar R., Sharma S. *et al.* Potato dry rot disease: current status, pathogenomics and management. 3 Biotech. 2020. 10:11, P. 503.
2. van Dam P., Fokkens L., Ayukawa Y. *et al.* A Mobile pathogenicity chromosome in *Fusarium oxysporum* for infection of multiple cucurbit species Sci. Rep. 2017. 7:1, P. 9042.
3. Sanders R., Bustin S., Huggett J., Mason D. Improving the standardization of mRNA measurement by RT-qPCR. Biomolecular Detection and Quantification. 2018. V.15, P. 13-17.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ УКОРЕНЕНИЯ *CATTLEYA GASKELLIANA* (N.E.BR.) B.S. WILLIAMS В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Хуссиен Мусаб^{1,2}, Молканова О. И.¹, Орлова Е. Е.²

1 – Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва, 127276, Россия

2 – ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, 127550, Россия

Cattleya один из самых уникальных родов орхидей. Представители этого рода отличаются большими, красивыми, яркими, иногда ароматными цветами, которые пользуются значительной популярностью как на рынке срезанных цветов, так и на рынке комнатных растений. Эти свойства делают их выращивание и размножение ключевой коммерческой целью.

Клональное микроразмножение орхидей является наиболее перспективным способом для получения безвирусных и высококачественных укорененных растений и на долю которого приходится около 70% производства саженцев орхидей. Укоренение орхидей *in vitro* по-прежнему остается актуальной проблемой, затрудняющей их производство, поскольку это влияет на жизнеспособность регенерантов и их дальнейший рост и развитие *ex vitro*.

При культивировании *in vitro* каждый вид растений требует индивидуального подбора состава питательной среды. Питательная среда может быть твердой, полутвердой или жидкой, в зависимости от наличия или отсутствия желирующих агентов. Полужидкая среда обеспечивает достаточный контакт между эксплантами и средой. Кроме того, она способствует лучшей диффузии питательных веществ среды и легко удаляется с проростков перед их переносом в условия *ex vitro*. Целью нашего исследования является усовершенствование метода укоренения *Cattleya gaskelliana* и выявление особенностей анатомического строения корней этого вида при условиях *in vitro*. Объектами данного исследования послужили регенеранты *C. gaskelliana* размерами 1,0-1,2 см. В качестве минеральной основы использовали $\frac{1}{2}$ Murasige and Skoog (1962) с добавлением 50,0 г/л бананового пюре. Проведено сравнение различных сочетаний концентраций агара (3,0 и 7,0 г/л) и ауксинов (Индолил-3-масляная кислота (ИМК) и Индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрациях (1,0 и 2,0 мг/л). Срезы фиксированных корней делали с помощью микротомы МС-2 (Точмедприбор, Харьков, Украина) с подключенным замораживающим столиком ОМТ-2802Е (ООО «КБ ТЕХКОМ», Екатеринбург, Россия). Толщина срезов составила 40-60 мкм. Для выделения деталей лигнификации клеточных стенок корней срезы окрашивали альциановым синим и сафранином. Фотографирование анатомических срезов корней осуществлено при помощи светового микроскопа Olympus CX41.

В настоящем исследовании результаты показали, что система питательных сред, тип ауксинов и их концентрации оказали эффективное влияние на рост и укоренение проростков *C. gaskelliana*. Процент укоренения составил 89-100%, но значительное различие не наблюдалось между различными вариантами. Установлено, что при культивировании регенерантов на обеих питательных средах (твердой и полутвердой) с добавлением 1,0 мг/л ИУК было обнаружено наибольшие значения корневой системы и роста. Но на полутвердой среде наблюдали значительные показатели (длина растения $3,04 \pm 0,41$ см, число корней $5,21 \pm 0,95$, число листьев $5,07 \pm 0,19$ и длина корней $5,30 \pm 0,44$ см) по сравнению с другими вариантами. В то же время установлено строение корней *C. gaskelliana in vitro*, образованных на питательных средах с различным содержанием агара. На питательной среде с меньшей концентрацией агара отмечено более упорядоченное строение филломена, состоящий из двух слоев клеток. Экзодерма образована одним слоем клеток, лигнификация клеточных стенок отсутствует. Паренхима занимает основной объем кортекса. Эндодерма состоит из одного слоя клеток, клеточная стенка не лигнифицирована. Стела представляет собой полиархный с паренхимной сердцевинной пучок с 7-8-ью ребрами, внутри которых расположены крупные сосуды первичной ксилемы. На питательной среде с большей концентрацией агара у корней *C. gaskelliana* наблюдали 2-3 слоя филломены. Паренхима занимает основной объем кортекса. Эндодерма состоит из одного слоя клеток с образованием пояса Каспари. Стела представляет собой полиархный пучок со склеренхимной сердцевинной с 5-ью ребрами и небольшим количеством сосудов первичной ксилемы.

Впервые была выявлена особенность анатомического строения корней *C. gaskelliana* при культивировании *in vitro*. Результаты данного исследования могут служить

общие рекомендации при укоренении *in vitro*, что позволяет повысить эффективность коммерческого производства и сохранения этого вида.

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН (№122042700002-6)

Список литературы:

1. Menezes-Sá T. S. A. et al. In vitro propagation and conservation of *Cattleya tigrina* A. Rich. *Ciência Rural*. 2021. Т. 52:5
2. Nongdam, P., Beleski, D. G., Tikendra, L., Dey, A., Varte, V., El Merzougui, S., & Vendrame, W. A. Orchid Micropropagation Using Conventional Semi-Solid and Temporary Immersion Systems: A Review. *Plants*, 2023. Т. 12. №. 5. С. 1136.

**СЕКЦИИ
«ЦИТОЛОГИЯ И ЦИТОГЕНЕТИКА» ,
«ЦИФРОВОЕ ФЕНОТИПИРОВАНИЕ»**

СРАВНИТЕЛЬНОЕ FISH-КАРТИРОВАНИЕ 45S И 5S рДНК РОДА *ILEX*

Гонсалес Франко М.Х¹, Разумова О.В.^{1,2}

*1 – ФГБНУ ВНИИСБ, Лаборатория прикладной и частной селекции сельскохозяйственных растений, Курчатowski геномный центр ВНИИСБ.
2 – Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН*

Изучение филогенетических отношений между видами растений является очень актуальной темой, поскольку это позволяет понять эволюцию и взаимосвязь между растениями, которые обитают по всему миру. Для изучения эволюции генома и филогенетической реконструкции в различных таксономических группах используется рДНК из-за ее высокого количества копий в геноме и особого расположения сохраненных кодирующих регионов. Рибосомная ДНК (45S и 5S) обычно используется для идентификации отдельных хромосом растений из-за ее универсального распространения и избыточности.

Целью данной работы было изучение полиморфизма 45S и 5S рДНК рода *Ilex*. Этот двудомный род является одним из самых крупных в мире. Существует около 600 видов, обитающих по всему миру, 3 вида происходят из России. Виды рода *Ilex* известны своим использованием в качестве декоративных растений благодаря ярким плодам и листьям. Кроме того, во многих местах некоторые виды используются в качестве напитков, так как они содержат большое количество кофеина. В других местах, таких как Китай, используются в медицинских целях из-за содержания различных химических свойств.

На молекулярном уровне мы изучали полиморфизм 5S рДНК в видах и сортах рода *Ilex*, представленных на Российском рынке, а на цитогенетическом уровне с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*, при котором детектируется и определяется положения специфической последовательности ДНК. Мы использовали в качестве зонда 45S и 5S рДНК, меченные флюорофорами биотином и дигоксигенином. Хромосомы были окрашиваны DAPI. Следовательно, при использовании флуоресцентного микроскопа мы смогли определить физическое местоположение этих генов на хромосомах следующих видов и сортов: *Ilex maimowicziana* Loes., *Ilex aquifolium* Linnaeus. сорт *Pyramidalis*, *Ilex aquifolium* Linnaeus. сорт *Golden van tol*, *Ilex x meserveae* S.Y Hu. сорт *Mondo*, *Ilex crenata* Thunb., сорт *Golden rock* и *Ilex rotunda* Thunb., сорт *Red Dot*. Важно отметить, что ранее никогда не проводилось исследований этого рода на цитогенетическом уровне.

В результате исследования на молекулярном уровне с использованием гена 5S рДНК в изучаемых видах и сортах, при сравнении нетранскрибирующих спейсеров этого гена и сравнении их с данными других видов, которые были в базе данных NCBI, мы обнаружили гомологию между видами рода *Ilex* и внутри каждого вида. Флуоресцентная гибридизация *in situ* на метафазных хромосомах показала, что у всех образцов 20 пар хромосом, во всех исследованных сортах и видов локусы 45s рДНК расположены в сателлитных участках на 2-х парах хромосом, а локусы 5s рДНК в субтеломерных участках на 1 паре хромосом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке ГЗ № 122042700002-6

Список литературы:

1. Sultana S., Lee S-H., Bang J-W., Choi H-W. Physical Mapping of rRNA Gene Loci and Inter-specific Relationships in Wild *Lilium* Distributed in Korea. *Journal of Plant Biology*. 2010. Vol 53, P. 433–443.
2. Kadereit J.W. and Bittrich V. Flowering Plants. Eudicots. The Families and Genera of Vascular Plants // Springer International Publishing Switzerland .2016. Vol 14, P. 31-36.

3. Loizeau P-A., Barriera G., Manen J.-F. and Broennimann O. Towards an understanding of the distribution of *Plex L.* (Aquifoliaceae) on a World-wide scale // Biol. Skr. 2005. Vol 55, P. 501-520.

АВТОМАТИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАРАЖЕННОЙ ОБЛАСТИ ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ ПО ФОТОГРАФИЯМ ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДОВ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ

Онежко Н.Н., Ермолаев А.С., Дивашук М.Г.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва
E-mail: vesennyi_les@mail.ru***

В таких областях, как селекция и фитопатология, существует проблема воспроизводимости анализа из-за проведения оценок при фитопатологических учётах методом визуального осмотра. Зачастую расчет балла поражения состоит из оценки сразу нескольких признаков, что может увеличивать время оценки и, соответственно, ее трудоемкость и неточность. Например, при расчете балла поражения альтернариозом картофеля учитывается диаметр некроза, степень спороношения и инкубационный период в днях [1]. Так как в полевых условиях, в отсутствии подобной информации о заражении листа, невозможно определить точный балл, возникает задача определения степени заражения на основе исключительно визуальных данных, в частности, фотоизображений.

Целью данной работы является разработка эффективного способа обработки фотографий зараженных растений для автоматического расчета площади поражения, что позволит сделать результаты учётов и исследований более точными, подробными и независимыми от человеческого фактора, а также сократить время обработки данных и получения результатов при полевых и лабораторных учётах.

В данной работе были использованы фотографии листьев картофеля, полученные в лабораторных условиях, представляющие из себя изображения трех и более листовых пластинок, повернутых нижней стороной вверх, на фоне белых альбомных листов. В центр каждой из долей наносили суспензию с одним из патогенов - возбудителем альтернариоза (*Alternaria solani*) или фитофтороза (*Phytophthora infestans*) [1]. Листья фотографировали в день последнего учёта.

Существующие программы [2] для автоматического вычисления пораженной площади листа, на наших данных показавшие неудовлетворительные результаты, поэтому были разработаны собственные методы сегментации долей листьев и классификации степеней заражения с помощью компьютерного зрения.

Так как в методике [1] оценивания и в случае с альтернариозом, и с фитофторозом, учет велся по трем верхним долям листа, необходимо было разделить каждый лист на его доли – для этого была разработана и обучена свёрточная нейронная сеть, использующая архитектуру энкодер-декодер. Для обучения данной сети был разработан собственный набор данных, содержащий 89 пар исходных изображений и соответствующих масок. В целях увеличения набора данных для обучения нейронной сети были использованы методы аугментации [3], такие как отражение по вертикальной и горизонтальной осям, добавление шума, повороты и искажения.

Задача классификации степеней заражения была сведена к задаче классификации пикселей по цветам (RGB; Red, Green, Blue) при помощи SVM (Support Vector Machine - Метод опорных векторов). Для обучения SVM были использованы экспертно размеченные данные в размере нескольких сотен тысяч пикселей по четырём для альтернариоза и пяти для фитофтороза классам заражения.

Для преобразования полученной моделью шкалы степеней заражения в шкалу экспертных (балльных) оценок был дополнительно использован метод случайного леса (Ансамбль деревьев решений), показавший для тестовой подвыборки коэффициент корреляции Спирмана 0.79 (доверительный интервал 0.71-0.85) с экспертной оценкой.

Результатом данной работы можно считать комплекс автоматических методов, объединяющий решение задач сегментации долей листа, классификации полученных долей по степени заражения и приведение полученных оценок к экспертной шкале. В дальнейшем планируется работа по оценке динамики заражения во времени; замене SVM на другие методы, учитывающие не только особенности конкретных пикселей, но и их окрестности; совершенствование методов сегментации долей; разработке портативного программного обеспечения для экспериментального использования селекционерами и фитопатологами; а также расширению классов заболеваний и культур.

Список литературы:

1. Ганнибал Ф. Б., Гасич Е. Л., Орина А. С. Оценка устойчивости селекционного материала крестоцветных и пасленовых культур к альтернариозам //Методическое пособие.–СПб.–2011.–40 с. – 2011.

2. <https://github.com/johri-lab/Automatic-leaf-infection-identifier>

3. Albuumentations library. URL: <https://albuumentations.ai/docs/>

ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ОКРАШИВАНИЕ DAPI ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХРОСОМОМ *CHONDRILLA JUNCEA* И *C. GRAMINEA* (ASTERACEAE)

Пархоменко А.С.¹, Ефименко С.Ф.¹, Разумова О.В.², Кашин А.С.¹

1 – ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» (СГУ им. Н.Г. Чернышевского),

Саратов 410012, E-mail: parkhomenko_as@mail.ru

2 – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва 127550

Род *Chondrilla* L. (Asteraceae) насчитывает примерно 30 видов. До сих пор нет однозначного представления о его таксономической структуре [1, 2]. Известно, что большая часть таксонов рода *Chondrilla*, – в том числе и являющиеся объектом исследования в данной работе, – относятся к факультативно апомиктичным [3], с ярко выраженной поли-, анеу- и миксоплоидией [4], что затрудняет филогенетические исследования и установление таксономической структуры рода. В настоящее время хромосомный анализ является единственным надежным способом выявления и идентификации хромосомных аберраций, однако у растений после гибридизации *in situ* хромосомы обычно окрашиваются DAPI монохромно. Только у растений с небольшими хромосомами, если исследование проводится на естественно или искусственно неконденсированных хромосомах, выделяются рисунки DAPI-дифференциального окрашивания [5]. У представителей рода *Chondrilla* размер хромосом находится в пределах от 3 до 10 мкм [6]. Поэтому нам было интересно попробовать на представителях рода *Chondrilla* краситель DAPI в качестве дифференциального окрашивания хромосом для их детекции.

В качестве объекта исследования использовали апикальные меристемы корешков проростков *C. juncea* L. и *C. graminea* Vieb., семена которых были собраны в августе 2023 года в пределах г. Саратова (УНЦ «Ботанический сад») (*C. juncea*) и в окрестностях г. Хвалынска, Саратовской области (гора Беленькая) (*C. graminea*).

Для выявления DAPI-бэндов перед изготовлением препаратов корни предварительно обрабатывали 0,2% раствором соляной кислоты и 5% водным раствором Ba(OH)₂, а затем двукратно отмывали в 0,2% растворе HCl, с последующим заключением в фотозащитную среду, содержащую DAPI (Solarbio). Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия). Детекция сигнала была осуществлена с использованием камеры Axio Cam MRc 5 (Германия) на увеличении ×100 с помощью программного обеспечения Zen (Германия).

Так как гаплоидное число хромосом *Chondrilla* равно 5, а образцы *C. juncea* и *C. graminea* являются триплоидами (2n=3x=15), то и все хромосомы мы делили на пять групп (по три хромосомы в каждой группе).

Дифференциальное окрашивание флуоресцентным красителем DAPI позволило визуализировать четко различимые бэнды в структуре всех 15-ти хромосом *C. juncea*. Хромосомы первой группы были длинными метацентриками и отличались наличием вторичной перетяжки и спутника. Остальные группы хромосом были субметацентриками, причем хромосомы пятой группы являлись самыми короткими в кариотипе. На хромосомах первой, второй, четвертой и пятой групп DAPI-бэнды были локализованы в прицентромерных участках коротких плеч, которые, по всей видимости, богаты (-AT-) повторами. На трех хромосомах, относящихся к третьей группе, были визуализированы по две флуоресцирующие полосы на каждой из хроматид. Причем, один из AT-богатых участков находится в прицентромерном районе короткого плеча субметацентрической хромосомы, а второй – локализован ближе к теломерному концу длинного плеча той же хромосомы.

У образцов *C. graminea* на шести метацентрических хромосомах (хромосомы первой и пятой групп) краситель DAPI не проявил дифференциальной окраски (равномерно окрашены). При этом хромосомы первой группы отличались от хромосом пятой группы крупными размерами, наличием вторичной перетяжки и спутника. Вторая, третья и четвертая группы были представлены субметацентрическими хромосомами. На хромосомах второй и третьей групп DAPI-бэнды были локализованы в прицентромерных участках короткого плеча, а на двух хромосомах четвертой группы – ближе к теломерному концу короткого плеча. Одна из хромосом четвертой группы отличалась по рисунку DAPI-бэндинга от двух других – ярко светились короткие плечи и прицентромерные участки длинных плеч каждой хроматиды.

Между собой кариотипы образцов *C. juncea* и *C. graminea* были близки только по хромосомам второй группы (субметацентрики с локализацией DAPI-бэндов в прицентромерных участках коротких плеч). Все остальные хромосомы у образцов этих таксонов отличаются друг от друга. Столь существенные межвидовые различия в структуре их кариотипов могут быть связаны со специфичными для каждого таксона перестройками хромосом в ходе эволюции. С другой стороны, – по крайней мере, часть наблюдающихся отличий может быть следствием гибридизации между *C. graminea* и *C. canescens* Kat. et Kir. в симпатрических популяциях с которой они сосуществуют в биотопе на г. Беленькая [4].

Проведение дополнительной флуоресцентной гибридизации *in situ* ДНК-проб, даст возможность уточнить и, при необходимости, исправить описание кариотипов, что, в свою очередь, позволит точно и надежно идентифицировать хромосомы образцов рода *Chondrilla*, а также внести ясность в представление об эволюционной истории данного рода.

Источники финансирования работы. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00340, <https://rscf.ru/project/22-24-00340/>.

Список литературы:

1. Ильин М. М. Критический обзор рода *Chondrilla* L. // Бюллетень отделения каучуконосов. 1930. Т. 3. С. 1–61.

2. Nasseh Y. A revision on the genera *Chondrilla* and *Heteroderis* (Asteraceae) in Iran // American Journal of Botany. 2010. Vol. 16, № 1. P. 92–95.
3. Кашин А. С., Попова А. О., Кочанова И. С., Угольников Е. В., Полякова Ю. А. Некоторые параметры системы семенного размножения в популяциях видов *Chondrilla* L. Нижнего Поволжья // Ботанический журнал. 2015. Т. 100, № 8. С. 828–840. <https://doi.org/10.1134/S0006813615080074>
4. Пархоменко А.С., Кашин А.С. Особенности кариотипической изменчивости у некоторых видов рода *Chondrilla* (Asteraceae) // Ботанический журнал. 2018. Т. 103, № 6. С. 726 – 739. <https://doi.org/10.1134/S0006813618060030>
5. Муравенко О.В., Зеленин А.В. Исследование хромосом организации геномов мелкохромосомных растений // Генетика. 2009. Т. 45, № 11. С. 1516 – 1529.
6. Пархоменко А.С., Кашин А.С., Гребенюк Л.В. Полиморфизм хромосом видов *Chondrilla* (Asteraceae) Европейской части ареала // Ботанический журнал. 2019. Т. 104, № 4. С. 626 – 643. DOI: 10.1134/S0006813619040069

СОЗДАНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ХРОМОСОМ ЦИТРУСОВ

**Романов Д.В., Коробкова В.А., Разумова О.В., Боне К.Д., Александров О.С.,
Дивашук М.Г.**

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва
E-mail: akabos1987@gmail.com**

Плоды цитрусовых имеют высокие вкусовые, диетические и пищевые качества, несвойственные ни одной другой плодовой культуре. Плоды растений рода *Citrus* - важный источник витамина С [1], однако их пищевая ценность не исчерпывается этим компонентом. В плодах цитрусовых содержатся витамины А, В1, В2, Р, каротин, 32 гликозида (понцирин, нарингин, гесперидин, цитронин, нарингенин, рутиноид, диосмин, лимонитрин, цитромитин, танжеридин и др.), обладающие свойствами Р-активных веществ (флавоноиды), сахара, органические кислоты, пектиновые вещества, минеральные соли, эфирные масла и в семенах - масло. Современные эпидемиологические исследования указывают также на связь между потреблением в пищу цитрусовых и предотвращением развития хронических заболеваний, в том числе болезней сердечно-сосудистых заболеваний, неврологической недостаточности, рака, катаракты и остеопороз [2]. Цитрусовые входят в число основных сельскохозяйственных культур мира.

В настоящее время нет единого мнения о классификации цитрусов. Разные ученые выделяли разное количество видов. По системе Свингла (1943 г.) род *Citrus* состоит всего из 16 видов, разделенных на разновидности, сорта и гибриды. По системе Танаки (1954 г.) в роде *Citrus* идентифицировано 159 видов. В 2020 году Оллитро, Курк и Крюгер предложили новую таксономическую систему с целью согласования традиционных систем с новыми данными. Эта система была сосредоточена на видах, являющихся предками большинства коммерческих гибридов и разновидностей, и другие цитрусы были охарактеризованы как гибриды предковых форм. Однако Оллитро, Курк и Крюгер признали, что на сегодняшний день недостаточно данных для характеристики всех цитрусов по их системе [3]. Таким образом, до сих пор систематика цитрусов является довольно сложной, ученые еще не пришли к единой таксономической системе.

Что касается цитогенетических маркеров на хромосомы растений рода Цитрус, то это направление практически не развито. Группа ученых под руководством Andrea Pedrosa-Harand гибридизовали несколько ВАС-клонов и рДНК на хромосомы *Citrus*

maxima, *C. medica*, *C. reticulata* и *Poncirus trifoliata* [4] для нахождения гомеологичных хромосом этих растений и прослеживания их эволюции. Группа ученых под руководством Guolu Liang гибридизовали 3 tandemных повтора и рДНК вместе с центромероподобным и теломерным повтором на хромосомы *C. sinensis*, *C. clementina* и гибрид Carrizo citrange [5, 6] для идентификации хромосом, однако такого количества повторов недостаточно для однозначного различения хромосом указанных видов, и некоторые хромосомы приходилось кариотипировать по длине и центромерному индексу, что очень неточно и недостаточно для некоторых целей.

Для более точной идентификации хромосом и конкретных регионов хромосом, на многих видах сельскохозяйственно-важных растений разрабатывается большое количество цитогенетических маркеров. Благодаря им удается не только безошибочно определить интересующую хромосому, различить плечи метацентрических хромосом, но и найти определенную область хромосомы, понять пути эволюции и обнаружить хромосомные перестройки [7-8].

Для идентификации хромосом цитрусов нами планируется получить большое количество цитогенетических маркеров для идентификации геномов, отдельных хромосом и участков хромосом, а также локализовать протеин-кодирующие гены на хромосомах изучаемых растений рода Цитрус. Эти знания помогут в понимании эволюции и уточнении систематики цитрусов, а также в проведении селекционной работы по созданию новых хозяйственно-ценных гибридов цитрусов и по переносу генов хозяйственно-ценных признаков: устойчивости к болезням и вредителям, химического состава, питательной ценности и др., от одних цитрусов к другим сельскохозяйственно-важным представителям цитрусов.

В ходе первого этапа нашей работы был проведен сбор коллекции растений рода Цитрус и разработан высокоэффективный метод приготовления препаратов хромосом цитрусов, пригодных для флуоресцентной *in situ* гибридизации, что является 70% гарантии успешного проведения FISH. Были получены цитологические препараты метафазных хромосом изучаемых растений рода Цитрус (всего в коллекции более 50 различных геномов - видов, сортов, межвидовых гибридов (зависит от используемой классификации)).

Обсуждаются этапы разработанного метода приготовления хромосом и их влияние на качество цитологических препаратов, а также отличия от классического метода приготовления препаратов хромосом [9].

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-16-00234).

Список литературы:

1. Matheyambath, A. C., Padmanabhan, P., & Paliyath, G. (2016). Citrus fruits.
2. Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety*, 11(6), 530-545.
3. Ollitrault, Patrick; Curk, Franck; Krueger, Robert (2020). "Citrus taxonomy". In Talon, Manuel; Caruso, Marco; Gmitter, Frederick G. Jr. (eds.). *The Citrus Genus*. Elsevier. pp. 57–81.
4. Costa Silva, S., Mendes, S., Régis, T., Passos, O. S., Soares-Filho, W. S., & Pedrosa-Harand, A. (2019). Cytogenetic map of pummelo and chromosome evolution of true citrus species and the hybrid sweet orange. *Journal of Agricultural Science*, 11(14).
5. Deng, H., Xiang, S., Guo, Q., Jin, W., Cai, Z., & Liang, G. (2019). Molecular cytogenetic analysis of genome-specific repetitive elements in *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. and its taxonomic implications. *BMC plant biology*, 19(1), 1-11.
6. Deng, H., Tang, G., Xu, N., Gao, Z., Lin, L., Liang, D., ... & Lv, X. (2020). Integrated karyotypes of diploid and tetraploid Carrizo Citrange (*Citrus sinensis* L. Osbeck × *Poncirus*

trifoliata L. Raf.) as determined by sequential multicolor fluorescence in situ hybridization with tandemly repeated DNA sequences. *Frontiers in Plant Science*, 11, 569.

7. Badaeva, E. D., Ruban, A. S., Zoshchuk, S. A., Surzhikov, S. A., Knüpfper, H., & Kilian, B. (2016). Molecular cytogenetic characterization of *Triticum timopheevii* chromosomes provides new insight on genome evolution of *T. zhukovskyi*. *Plant Systematics and Evolution*, 302(8), 943-956.

8. Cao, H. X., Vu, G. T. H., Wang, W., Appenroth, K. J., Messing, J., & Schubert, I. (2016). The map-based genome sequence of *Spiridella polyrhiza* aligned with its chromosomes, a reference for karyotype evolution. *New Phytologist*, 209(1), 354-363.

9. Houben, A., Demidov, D., Gernand, D., Meister, A., Leach, C. R., & Schubert, I. (2003). Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *The Plant Journal*, 33(6), 967-973.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНЕСЕНИЯ АЗОТНЫХ УДОБРЕНИЙ НА РАЗНЫЕ СОРТА ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ

Ульянова А. А., Ульянов Д.С., Кочешкова А. А., Литвинов Д.Ю.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва
E-mail: shurf116@gmail.com***

Эффективное применение азотных удобрений играет очень важную роль в повышении урожайности и качества сельскохозяйственных культур. Пшеница, как основная зерновая культура, является одним из главных объектов подобных исследований. Традиционные методы оценки влияния азотного удобрения на сорта пшеницы являются трудоемкими и часто субъективными, а также деструктивными для растений. Однако с развитием цифрового фенотипирования подход к изучению реакций растений на внешние факторы существенно изменился.

Было проведено исследование влияния концентрации азотных удобрений на морфологические и спектральные параметры пшеницы разных сортов. Было взято 84 растения пшеницы 14 сортов, далее проводилась обработка азотными удобрениями в трёх вариантах: с концентрацией нитрата 0 г/л, 0,1 г/л и 1 г/л.

В качестве отслеживаемых параметров при цифровом фенотипировании брались цифровая биомасса и NDVI (нормализованный разностный вегетационный индекс). Для статистической обработки и анализа полученных данных цифрового фенотипирования использовались программы Phenoboard и StatFarmer.

Были построены графики динамики роста с объединением по сортам и по обработкам, а также с кластеризацией по временным точкам. Также были построены графики вида boxplot и посчитана значимость отличий параметров между группами по Anova.

Результаты эксперимента показывали, что растения положительно реагировали на добавление нитратов в количестве 0,1 г/л, но дополнительная подкормка уже не приносила статистически значимого увеличения цифровой биомассы и NDVI.

Данные NDVI показывают различие между обработками 0 г/л, 0,1 г/л и 1 г/л уже на следующий день после обработки, тогда как результаты измерений цифровой биомассы изменения отражают не так быстро.

Таким образом, можно утверждать, что спектральные параметры растений могут показывать их состояние быстрее традиционных методов и поэтому имеют наибольший потенциал для отслеживания их реакции на изменение условий выращивания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания FGUM-2022-0008.

Список литературы:

1. Omari M. et al. Digital image-based plant phenotyping: a review. 2020.
2. Li L., Zhang Q., Huang D. A Review of Imaging Techniques for Plant Phenotyping: 11 // Sensors. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2014. Vol. 14, № 11. P. 20078–20111.
3. 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.
4. Phenospex FAQ [Electronic resource]. URL: <https://phenospex.helpdocs.com/> (accessed: 01.11.2023).

РАЗРАБОТКА ИНТЕРАКТИВНЫХ СТЕНДОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ R И SHINY

Ульянов Д.С., Ульянова А. А., Кочешкова А. А., Литвинов Д.Ю.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва
E-mail: uldas1508@gmail.com***

Цифровое фенотипирование играет все более важную роль в сельском хозяйстве. Однако, существует необходимость в разработке инструментов для эффективного анализа данных, полученных в результате фенотипирования. В данной работе мы представляем разработку интерактивных стендов для анализа данных цифрового фенотипирования, используя среду программирования R и платформу Shiny. Наша цель - создать гибкий и удобный инструмент, который позволит проводить анализ данных в динамике и взаимодействовать с ними.

Для достижения этой цели, мы провели обзор существующих исследований и практик в области цифрового фенотипирования и анализа данных. Используя полученные знания и методики, мы разработали интерактивные стенды, которые позволяют производить визуализацию и анализ данных цифрового фенотипирования. Ключевыми методиками, примененными в нашей работе, являются кластеризация данных с использованием алгоритма DBSCAN и фильтрация выбросов для повышения точности анализа. Мы также обеспечили возможность хранения результатов анализа и быстрого доступа к полученным выводам и графикам.

Результаты нашего исследования показывают эффективность наших разработанных стендов. Мы продемонстрировали возможность кластеризации объектов по временным данным с использованием алгоритма DBSCAN. Наша методика фильтрации выбросов также позволила повысить точность анализа данных цифрового фенотипирования. Более того, мы предоставили возможность интерактивного проведения статистического анализа, используя ANOVA и метод post hoc сравнений Tukey. Наш стенд опубликован с открытым исходным кодом и примером данных двух проектов: https://github.com/Stathmin/Wheat_Nitrates_2022

В заключение, разработанные нами интерактивные стенды на основе R и Shiny представляют собой удобный и эффективный инструмент для анализа данных цифрового фенотипирования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания FGUM-2022-0008.

Список литературы:

1. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R., Grolemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the tidyverse//Journal of Open Source Software, 2019, Т. 4, N 43, С. 1686.
2. Chang W., Cheng J., Allaire J.J., Sievert C., Schloerke B., Xie Y., Allen J., McPherson J., Dipert A., Borges B. shiny: Web Application Framework for R, 2023.
3. Allaire J.J. quarto: R Interface to «Quarto» Markdown Publishing System. – 2022.
4. Dowla M. Genetic architecture of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenology to maximize yield in water limited environments, 2017.
5. Ульянов, Д. С. Wheat_Nitrates_2022 / Д. С. Ульянов. — Текст : электронный // github : [сайт]. — URL: https://github.com/Stathmin/Wheat_Nitrates_2022 (дата обращения: 09.09.2023).

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ *THINOPYRUM BESSARABICUM* W6 21890

Юркина А.И., Крупин П.Ю., Карлов Г.И., Дивашук М.Г.

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550
E-mail: aaaaaa3197@gmail.com**

Thinopyrum bessarabicum — дикорастущее злаковое растение, обладающее рядом полезных признаков, что делает его ценным генетическим ресурсом для пшеницы [1]. В ряде исследований используется образец W6 21890 ($2n = 10x = 70$), однако всё ещё ведется дискуссия о его геномной конституции [2,3].

Нами было проведено полногеномное секвенирование изучаемого образца ($2n = 10x = 70$, W6 21890), а также диплоидной формы *Th. bessarabicum* ($2n = 2x = 14$, J^bJ^b, PI 531711). В результате биоинформатического анализа репитома изучаемых образцов были выявлены и охарактеризованы 9 новых сателлитных повторов, которые были локализованы на *Th. bessarabicum* W6 21890 с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

Повтор CL2 не показал локализацию на хромосомах. CL16 и CL44 имеют диспергированный характер распределения, при этом CL44 дает яркие сигналы в прицентромерной области у 11 пар хромосом. CL148 локализуется у 2 пар хромосом прицентромерно, у 2 пар – субтеломерно, длинное плечо; у 2 пар – субтеломерно, короткое плечо. CL149 – субтеломерный повтор, располагается на 14 парах хромосом. Повтор CL170 локализуется на 1 паре хромосом прицентромерно, короткое плечо. CL192 – локализуется на 2 парах хромосом: на 1 терминально, короткое плечо, на 2 – проксимально, длинное плечо. CL193 дает теломерные сигналы на коротком плече у 1 пары хромосом. Повтор CL198 локализуется на 16 парах хромосом: 2 пары хромосом с сигналом в прицентромерной области и субтеломерным на коротком плече. На 1 паре повтор локализуется прицентромерно и субтеломерно на длинном плече. У 13 пар хромосом повтор локализуется прицентромерно.

Анализ распределения локализованных сателлитных повторов на хромосомах подтвердил гипотезу о том, что *Th. bessarabicum* W6 21890 не является автополиплоидным видом и, вероятно, обладает, как минимум, одним индивидуальным субгеномом, близким к геному J^b. Данные маркеры, основанные на сателлитных повторах, можно использовать как для цитогенетической характеристики хромосом *Th. bessarabicum*, так и для эволюционных и популяционных исследований. Данное

исследование подчеркивает важность проведения не только ботанической верификации используемого материала, но и цитогенетической, основанной на использовании сателлитных повторов в качестве проб.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 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;3:409-425.

2. Dai Y., Huang S., Sun G., Li H., Chen S., Gao Y., Chen J. (2021). Origins and chromosome differentiation of *Thinopyrum elongatum* revealed by *PepC* and *Pgk1* genes and ND-FISH. *Genome*, 2021;64(10):901-913.

3. Zheng Q., Klindworth D. L., Friesen T. L., Liu A. F., Li Z. S., Zhong S., Jin Y., Xu S.S. Characterization of *Thinopyrum* species for wheat stem rust resistance and ploidy level. *Crop Science*, 2014;054(6):2663-2672.

**СЕКЦИЯ
«МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА, ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ»**

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ РАЗВИТИЯ ТЕРМИНАЛЬНОГО ЦВЕТКА У ЛЬВИНОГО ЗЕВА (*A. MAJUS*)

И.В. Барабанов, Р.С. Рахмангулов

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт
генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург,
Россия,
e-mail: ivanbarabanov88@gmail.com

Рынок декоративных культур занимает значимое место в сельском хозяйстве многих стран. В Российской Федерации, однако, большая часть культивируемых сегодня сортов имеет зарубежное происхождение. Ускоренное создание конкурентноспособных и превосходящих зарубежные аналоги сортов требует вовлечения в селекционный процесс молекулярно-генетических и биотехнологических методов. Первоочередное значение имеет изучение генетического контроля значимых декоративных признаков, среди которых важнейшие – устойчивость к стрессогенным факторам среды, окраска цветка, время и сроки цветения и другие. На декоративную ценность сорта значительное влияние оказывает также форма соцветия. Соцветия различают по типу ветвления, типу распускания цветков (от основания к вершине или же наоборот) и иным признакам.

Для одного из модельных генетических объектов – *Antirrhinum majus* L, характерно соцветие кисть (рацемозное соцветие с моноподиальным ветвлением и акропетальным (от основания к вершине) распусканием цветков).

Рацемозные соцветия можно разделить на два класса по наличию или отсутствию терминального цветка. Эти соцветия описываются либо как закрытые и открытые, либо как детерминантные и индетерминантные [Weberling, 1989]. Для львиного зева характерны открытые соцветия.

Тип соцветия и, соответственно, развитие терминального цветка у львиного зева контролирует гомолог гена *TFL1* арабидопсиса – *CEN*, кодирующий фосфатидилэтаноламин-связывающий белок *CENTRORADIALIS*. *CEN* действует как антагонист генов *FLO* и *SQUA* [Coen et al., 1990; Huijser et al., 1992] (контролируют цветение и развитие цветка), подавляя их экспрессию в центральной части апикальной меристемы и препятствуя, таким образом, развитию терминального цветка [Крылова, 2020].

Известны, однако, и мутантные генотипы, например, *centroradialis (cen)* [Bradley et al., 1996]. Фенотипически мутация *cen* проявляется развитием терминального цветка.

Мутантный аллель *cen* контролирует структуру соцветия, обеспечивая, в отличие от *tfl1*, относительно постоянное число латеральных цветков. Мутантный аллель *cen* является неустойчивым – в потомстве наблюдаются растения сходные с диким типом. У таких растений, однако, могут развиваться вторичные соцветия с терминальным цветком.

У *A. majus* подобная вариабельность гена *CEN* вызвана встраиванием в последовательность мобильного элемента – *Tam10*. Дальнейшая некорректная эксцизия транспозона оставляет в четвертом экзоне «след» длиной в три пары нуклеотидов (АТТ), в результате, между аспарагиновой кислотой (148) и глицином (149) исходной последовательности белка *CENTRORADIALIS* встраивается изолейцин. Такой тип мутации получил название *cen-2r (dtf* или *delayed terminal flower*). Растения с подобным генотипом демонстрируют отложенное развитие терминального цветка, притом скорость такого развития и, соответственно, количество боковых цветков зависят от условий произрастания (температура, длина светового дня и освещенность) [Cremer, 2001].

Индетерминантное соцветие с точки зрения флористики имеет значительный недостаток – со временем удлиняясь, оно постепенно теряет декоративные свойства. Изучение механизмов формирования терминального цветка у модельных растительных

объектов позволит в дальнейшем разработать механизмы получения растений с требуемой формой соцветия. Таким образом скрининг коллекции *A. majus* ВИР на наличие форм-носителей мутантных аллелей *cen* или же *cen-2r(dtf)* и дальнейшее их исследование представляется исключительно актуальным для отечественной селекции декоративных культур.

Благодарности. Тезисы подготовлены в рамках государственного задания ВИР согласно тематическому плану НИР по теме № FGEM-2022-0011 «Разработка подходов ускоренной селекции для улучшения хозяйственно ценных признаков декоративных и ягодных культур».

Список литературы:

1. Coen E.S., Carpenter R., Martin C. Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell*. 1986;47(2):285-296. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90451-4.
2. Bradley D., Carpenter R., Copley L., Vincent C., Rothstein S., Coen E. Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*. 1996;379(6568):791-797. DOI: 10.1038/379791a0.
3. Weberling F. Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1989.
4. Huijser P., Klein J., Lonig W.E., Meijer H., Saedler H., Sommer H. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the *MADS*-box gene *SQUAMOSA* in *Antirrhinum majus*. *EMBO Journal*. 1992;11:1239–1249.
5. Krylova E.A. The Role of *TFL1* Orthologs in Determining Plant Architectonics. *Russian Journal of Genetics*. 2020;56(11): 1262-1278. Крылова Е.А. Роль ортологов гена *TFL1* в определении архитектоники растений. *Генетика*. 2020;56(11):1262-1278. DOI: 10.31857/S0016675820110053.
6. Cremer F., Lonig W.E., Saedler H., Huijser P. The delayed terminal flower phenotype is caused by a conditional mutation in the *CENTRORADIALIS* gene of Snapdragon. *Plant Physiology*. 2001; 126.

ДИНАМИКА LTR РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ СУПЕРСЕМЕЙСТВА СОPIA И GYPSY У РОДА CITRUS.

Боне К.Д.¹, Разумова О. В.^{1,2}, Коробкова В. А.¹, Дивашук М. Г.¹, Романов Д. В.¹

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

2 – Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук (ГБС РАН), Москва 127276

Общеизвестно что большая часть генома у растений состоит из повторяющейся ДНК (1). Существуют два типа повторяющейся ДНК: мобильные элементы и тандемные повторы. В свою очередь мобильные элементы делятся на ретротранспозоны и ДНК транспозоны. Мобильные элементы имеют свойства перемещаться, самовоспроизводиться и утрачиваться внутри генома. Что приводит к диверсификации и адаптации генома (2). Исследования показали, что избыток мобильных элементов приводит к расширению генома (1) они так же участвуют в регуляции экспрессии генов (3).

В общей сложности 607,696 LTR-RT были извлечены из 13 сборок генома видов цитрусовых, которые, в свою очередь, были сгруппированы в суперсемейства с 321,129 и 283,010 LTR-RT для *Soria* и *Gypsy* соответственно. Извлеченные последовательности

LTR-RT были разделены на два класса (Copia и Gypsy) в зависимости от порядка кодирующих белок доменов с использованием DANTE (4).

Линии Torк и Ale почти одинаково представлены в суперсемействе Copia и являются крупнейшими - 25,93% и 25,36% соответственно. В надсемействе Gypsy самая крупная линия — Athila с 52,01%, а самые маленькие — Ogre с 0,28% и Tat с 0,15%.

Идентичность нуклеотидов между 5' и 3' LTR ретроэлементов полезна для оценки времени его вставки, поскольку два LTR одного ретротранспозона идентичны во время вставки, но впоследствии независимо накапливают мутации (5). Изучение геномов цитрусовых раскрывает интригующие аспекты временных вставок и динамики элементов LTR в суперсемействах Copia и Gypsy. В семействе Copia активная пролиферация LTR - элементов началась примерно 1-3 млн лет назад, что указывает на относительно недолгую историю присутствия этих элементов в геномах цитрусовых. В семье Gypsy пролиферация LTR-элементов продолжалась в геномах цитрусовых в течение последних 6 миллионов лет. Эти временные рамки говорят о долгой истории взаимодействия между LTR - элементами в геномах цитрусовых и указывают на сложную эволюционную динамику, происходящую в их геномах.

Анализ распределения и сроков распространения LTR -элементов помогает нам лучше понять эволюцию и структуру геномов цитрусовых.

Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда (Проект № 23-16-00234).

Список литературы:

1. Du J, Tian Z, Hans CS, Laten HM, Cannon SB, Jackson SA, et al. Evolutionary conservation, diversity and specificity of LTR-retrotransposons in flowering plants: Insights from genome-wide analysis and multi-specific comparison. *Plant J.* 2010. 63(4):584–98.

2. Sinzelle L, Izsvak Z, Ivics Z. Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. *Cell Mol Life Sci.* 2009. 66:1073–93.

3. Butelli E, Licciardello C, Zhang Y, Liu J, Mackay S, Bailey P, et al. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *Plant Cell.* 2012. 24(3):1242–55.

4. Neumann P, Novák P, Hošťáková N, Macas J. Systematic survey of plant LTR-retrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification. *Mob DNA.* 2019. 10:1–17.

5. Sanmiguel P, Bennetzen JL. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Ann Bot.* 1998. 82:37–44.

АКТИВАЦИЯ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННОГО САЙЛЕНСИНГА ГЕНОВ

Власова А.В.^{1,2}, Камараули Е.Д.^{1,2}, Перевозчиков Д.В.¹, Киров И.В.^{1,2}

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

E-mail: biotech@iab.ac.ru

**2 – ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет)» (ФГАОУ ВО МФТИ НИИ), Долгопрудный 141701;**

E-mail: info@mipt.ru

Мобильные элементы обнаружены почти во всех организмах и часто составляют основную часть генома. Они (МЭ) представляют собой фрагменты ДНК способные перемещаться по геному, и интегрироваться в новые места, приводя к увеличению

генетического разнообразия и получению новых признаков, включающих вариации окраски плодовых и бобовых, а также приобретение устойчивости к биотическим и абиотическим факторам [1,2]. Эти признаки могут стать ценными материалом для селекции сельскохозяйственных растений.

Однако МЭ находятся под жестким контролем, чтобы ограничить их мутационное воздействие на организм и защитить от летальных мутаций в геноме. Благодаря активному изучению мобильных элементов стали известны механизмы и гены участвующие в их регуляции. В 2016 был описан уникальный механизм регуляции мобильных элементов растений посредством РНК-зависимого ДНК метилирования (RdDM), в котором участвуют РНК-полимеразы IV и V, RDR2 и RDR6, дайсер-подобный белок DCL3, а также метилтрансфераза DRM2 [3]. Кроме этого, важную роль в эпигенетической регуляции активности МЭ играет ген DDM1, кодирующий ремоделер хроматина. С его помощью обеспечивается доступ ДНК-метилтрансфераз к гетерохроматину, что позволяет стабильно подавлять мобильные элементы [4]. Благодаря знаниям, о механизмах контроля мобильных элементов и генах, участвующих в этих процессах, можно активировать мобильные элементы, путем воздействия на гены их репрессии.

В качестве инструмента для временного подавления экспрессии генов регуляции мобильных элементов возможно использовать вирус-индуцированный сайленсинг генов (VIGS) [5]. В основе VIGS лежит РНК-опосредованный механизм противовирусной защиты растений, приводящий к посттранскрипционному сайленсингу генов (PTGS). Этот метод представляет собой природный инструмент регуляции активности генов с помощью малых двухцепочечных РНК. С помощью VIGS возможно таргетно воздействовать на гены, участвующие в эпигенетической регуляции мобильных элементов.

Используя VIGS в нашей работе, мы осуществили вирус-индуцированный сайленсинг гена *ddm1* Арабидопсиса, который участвует в пути метилирования мобильных элементов в гетерохроматине, и обнаружили снижение экспрессии гена *ddm1* с помощью qPCR. Кроме того, мы подавили экспрессию гена *nrpe1*, кодирующего большую субъединицу Pol V, которая участвует как в каноническом, так и в неканоническом путях РНК-зависимого метилирования ДНК (RdDM). А также детектировали активацию ретротранспозона ONSEN в ответ на вирус-опосредованный сайленсинг гена *nrpe1* в комплексе с обработкой тепловым стрессом.

Таким образом, в нашей работе представлен подход для активации мобильных элементов растений, основанный на вирус-опосредованном сайленсинге генов (VIGS), вовлечённых в их регуляцию, который позволит открыть новые возможности в изучении мобильных элементов.

Работа была профинансирована Российским научным фондом (грант № 22-64-00076).

Список литературы:

1. Gilbert C., Feschotte C. Horizontal acquisition of transposable elements and viral sequences: patterns and consequences //Current opinion in genetics & development. – 2018. – Т. 49. – С. 15-24.
2. Quadrana L. et al. The Arabidopsis thaliana mobilome and its impact at the species level //elife. – 2016. – Т. 5. – С. e15716.
3. Cuerda-Gil D., Slotkin R. K. Non-canonical RNA-directed DNA methylation //Nature plants. – 2016. – Т. 2. – №. 11. – С. 1-8.
4. Zemach A. et al. The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin //Cell. – 2013. – Т. 153. – №. 1. – С. 193-205.

5. Burch-Smith T. M. et al. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants //The Plant Journal. – 2004. – Т. 39. – №. 5. – С. 734-746.

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ И СТРУКТУРЫ ДОМЕСТИЦИРОВАННОГО БЕЛКА GAG (dGAG) *ARABIDOPSIS THALIANA*

Еремина М. Ю.¹, Полховский А. В.^{1,2}, Парыгина А. Д.¹, Киров И. В.^{1,2}

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

E-mail: biotech@iab.ac.ru

2 – НИУ «Московский физико-технический университет» (НИУ МФТИ),
Долгопрудный 141701; E-mail: info@mipt.ru

LTR-ретротранспозоны (LTR-RT) — мобильные элементы, занимающие значительную часть генома большинства видов растений. Жизненный цикл LTR-RT очень похож на жизненный цикл ретровирусов и включает сборку вирусоподобной частицы из белков GAG, которые взаимодействуют и инкапсулируют РНК LTR-RT. В ходе эволюции гены ретротранспозонов могут мутировать и в конечном итоге приобрести новую функцию полезную для организма хозяина. В геноме *A. thaliana* был обнаружен ген dGAG который предположительно, является доместичированной версией белка GAG LTR ретротранспозона. Известно, что доместичированные gag-гены у животных участвуют в защите клеток от вирусной инфекции [6], оксидного стресса [2,4], а также используются для переноса мРНК из одной клетки в другую [5]. У растений процесс доместикации, и сами доместичированные белки ретротранспозонов не изучены. Таким образом, изучение гена dGAG у *A. thaliana* поможет подробнее узнать о функциях доместичированных белков мобильных элементов у растений.

Для определения клеточной локализации белков GAG и dGAG производилось выделение протопластов из листьев *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia-0 (Col-0) с последующей трансформацией с помощью PEG-4000. После трансформации плазмидами, содержащими гены GAG и dGAG, тагированные GFP, протопласты изучались на флуоресцентном микроскопе. Были получены следующие данные: флуоресцентная микроскопия трансформированных протопластов *A. thaliana* выявила наличие в цитоплазме клеток зерноподобных белковых структур GAG. Независимо от положения метки GFP (N- или C-конец) характер локализации белка GAG оставался прежним. В случае dGAG мы могли видеть ту же картину для C-концевой метки GFP, но не для N-концевой – при данном типе тагирования сигнал dGAG был локализован в ядрах растительных клеток. Также подобным образом были протрансформированы растения табака (*Nicotiana benthamiana*) и подсолнечника (*Helianthus annuus*) и наблюдались схожие результаты.

Была исследована доменная структура белка dGAG. dGAG состоит из 4 доменов. На N-конце находится домен DEK-C, структура которого гомологична семейству транскрипционных факторов E2F/DP. Далее следует домен p15*, который вместе с DEK-C образует доменную структуру, схожую с белком KELP. После p15* следует домен gag-polyurptide, общий с белком GAG. Данный домен, собственно, формирует мономер капсида ретротранспозона. На C-конце расположен домен Zink knuckle, который может связываться с нуклеиновыми кислотами. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков KELP и dGAG выявило высокую степень схожести их последовательностей. Поиск гомологов dGAG у других видов растений показал их наличие в широком спектре видов растений семейства двудольные, а также и однодольные, что может свидетельствовать о важности функции выполняемой данным

геном. Анализ аминокислотных последовательностей гомологов dGAG также показал наличие доменов KELP в их последовательностях.

Известно, что белок KELP участвует в позитивной регуляции инициации транскрипции РНК-полимеразой II, а также образует гомо- или гетеродимеры с белком KIWI. KELP и KIWI участвуют в активации генов во время защиты от патогенов и развития растений [1]. На основании литературных данных о связи белка KELP с ответом на вирусную инфекцию и наличии его белковых доменов в dGAG, мы предполагаем, что dGAG также может участвовать в ответе растения на вирусную инфекцию непосредственно через влияние на транскрипцию других генов, через взаимодействие с белком KIWI либо напрямую взаимодействуя с вирусной РНК посредством её связи доменами Zink knuckle [3].

Работы выполнены при финансовой поддержке РФФ (грант №22-74-10055).

Список литературы:

1. Cormack R. S., Hahlbrock K., Somssich I. E. Isolation of putative plant transcriptional coactivators using a modified two-hybrid system incorporating a GFP reporter gene //The Plant Journal. – 1998. – Т. 14. – №. 6. – С. 685-692.

2. Makhnovskii P. et al. Domesticated gag gene of Drosophila LTR retrotransposons is involved in response to oxidative stress //Genes. – 2020. – Т. 11. – №. 4. – С. 396.

3. Matsushita Y. et al. The tomato mosaic tobamovirus movement protein interacts with a putative transcriptional coactivator KELP //Molecules and cells. – 2001. – Т. 12. – №. 1. – С. 57-66.

4. Nefedova L., Gigin A., Kim A. Domesticated LTR-Retrotransposon gag-Related Gene (Gagr) as a Member of the Stress Response Network in Drosophila //Life. – 2022. – Т. 12. – №. 3. – С. 364.

5. Nikolaienko O. et al. Arc protein: a flexible hub for synaptic plasticity and cognition //Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2018. – Т. 77. – С. 33-42.

6. Yan Y. et al. Origin, antiviral function and evidence for positive selection of the gammaretrovirus restriction gene Fv1 in the genus Mus //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Т. 106. – №. 9. – С. 3259-3263.

АНАЛИЗ АКТИВИРУЮЩИХСЯ В ОТВЕТ НА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТРЕСС ТРАНСПОЗОНОВ РАПСА (*BRASSICA NAPUS*)

Ивахненко А.С^{1,2}, Тюрин К.Н^{1,2}, Киров И.В^{1,2}

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

**2 – ФГАО УВО «Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет)» (ФГАО УВО МФТИ)**

e-mail: ivakhnenko.as@phystech.edu

Ретротранспозоны оказывают значительное влияние на организацию и эволюцию генома растений. Благодаря своей способности к транспозиции они способны вносить различные изменения в геноме и в условиях меняющегося климата становятся одним из основных инструментов повышения селекционного разнообразия [1].

Благодаря многочисленным системам сайленсинга, мобильные элементы (МЭ) в геноме находятся в неактивном состоянии и, следовательно, не способны к транспозиции. Технология «TEgenesis» позволяет активировать транскрипцию ретротранспозонов используя два типа химических веществ – альфа – аманитин и зебуларин в комбинации с

тепловым стрессом, тем самым мы можем получить растения с множеством новых уникальных инсерций [2].

На последнем этапе жизненного цикла есть стадия формирования внехромосомных кольцевых молекул ДНК (вкДНК), маркеров на мобильную активность. Поскольку, МЭ обеспечивают мощную связь между стрессом и формированием вкДНК, мы решили выяснить, может ли ингибирование путей сайленсинга совместно с обработкой тепловым стрессом стимулировать образование кольцевых у рапса [3].

Детекция данных молекул осуществлялась с помощью технологии Oxford Nanopore с модификациями. В результате секвенирования были обнаружены 8 транспозонов, которые продуцируют вкДНК в ответ на стресс, относящиеся к суперсемейству *Ty3/Gypsy* кладе *del/TeKay*. На основании анализа идентичности LTR был сделан вывод, что они относятся к одной линии, которая получила название ANTARES. Анализ числа копий также подтвердил мобильную активность элементов ANTARES в процессе селекции сортов рапса и его низкую копийность, что свидетельствует о высокой мобильной активности данных элементов. Также мы выяснили, что элементы ANTARES являются относительно молодыми элементами наряду с Ale, Ivana, Tork, CRM, Tekay и Athila. Это позволяет предположить, что хромовирусы являются мобильно активными транспозонами у рапса.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание) № 075-03-2023-106, номер проекта FSMG-2023-0015.

Список литературы:

1. Paszkowski J. Controlled activation of retrotransposition for plant breeding // Current Opinion in Biotechnology. – 2015. – V. 32. – P. 200-206.

2. 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 Biol. – 2017. – Vol. 18. – Issue 134. – P. 1-10.

3. Lanciano, S. Sequencing the extrachromosomal circular mobilome reveals retrotransposon activity in plants / S. Lanciano, M.C. Carpentier, C. Llauro, E. Jobet, D. Robakowska-Hyzorek, E. Lasserre, A. Ghesquière, O. Panaud, M. Mirouze // PLoS Genet. – 2017. – Vol. 13. – Issue 2. – e1006630.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ОПОСРЕДОВАННОГО АГРОБАКТЕРИЯМИ ВИРУС-ИНДУЦИРОВАННОГО САЙЛЕНСИНГА ГЕНОВ (VIGS) У ПОДСОЛНЕЧНИКА *HELIANTHUS ANNUUS* L.

**Ивойлова Э.А.¹, Уткина В.В.¹, Мардини М.^{1,3}, Казанцев М.Ю.^{1,2}, Власова А.В.^{1,2},
Киров И.В.^{1,2}**

**1 – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии, Москва, Россия**

2 – Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

**3 – Российский государственный аграрный университет — Московская
сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева, Москва, Россия**

E-mail: mr.majdmardini@gmail.com, viktoriia.rus02@mail.ru, ivoilovaelina@yandex.ru

Вирус-индуцированный сайленсинг генов (VIGS) находит применение в исследовании функциональной геномики, изучении динамики взаимодействия хозяина и патогена, изучении механизмов адаптации к абиотическому стрессу и т.д.[1,2]. Число исследовательских проектов, посвященных технологии VIGS, стремительно растет, что

свидетельствует о ее широком внедрении и признании мощным инструментом в селекции и биотехнологии.

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) имеет высокую сельскохозяйственную ценность, занимает важное место среди масличных культур. Сложность при работе с подсолнечником заключается в том, что он хорошо известен своей устойчивостью к генетическим модификациям. В последние годы лишь в нескольких исследованиях механизм VIGS применялся для изучения свойств подсолнечника. Например, Basile *et al.* [3] использовали VIGS в качестве дополнительного метода для подтверждения значимости гена Ha-ROXL в развитии цветка. Аналогичным образом, Jiang *et al.* [4] использовали VIGS для подавления гена OcQR1, известного своим участием во взаимодействиях с паразитом *Orobanche cumanana*. В обоих случаях процедуры VIGS были проведены с использованием модифицированной формы вируса табачной погремушки (TRV), который был введен в ткани растения путем инфильтрации агробактериями.

В нашей лаборатории уже были проверены и хорошо зарекомендованы протоколы VIGS для многих видов растений. Однако при применении данной методологии на подсолнечнике стали очевидны заметные недоработки в технических деталях. Чтобы устранить данную проблему, мы изначально стремились воспроизвести протоколы VIGS, описанные в существующей литературе. К сожалению, мы столкнулись с несколькими неудачами. Признавая наш ограниченный опыт работы с данным конкретным видом, мы пришли к осознанию необходимости разработки и оптимизации надежного протокола, подходящего для подсолнечника.

Систематически проводилась серия оптимизационных экспериментов для оценки влияния различных ключевых параметров на эффективность VIGS: стадии роста зараженного растения, использования вакуума во время совместного культивирования агробактерий и растительного материала, продолжительности совместного культивирования, использования инфильтрации с помощью шприца, втирания, различных генотипов растений. Каждый из этих факторов был исследован изолированно или в сочетании с другими, чтобы оценить его влияние на эффективность подавления генов. Ген фитоэндезауразы (PDS) послужил мишенью для нашего эксперимента вследствие его хорошо идентифицируемого фенотипа. Эффективность каждой обработки оценивалась как процент растений, проявляющих симптомы фотообесцвечивания, а также степень проявления симптомов на листьях отдельного растения. Кроме того, на фотообесцвеченных тканях были проведены ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR) и количественная ПЦР (qPCR), чтобы подтвердить наличие вируса TRV и оценить изменения в экспрессии гена PDS.

Мы успешно разработали простой и воспроизводимый протокол VIGS для подсолнечника. Мы установили, что применение вакуума для непроросших семян является ключевым фактором успешного выращивания. Наш протокол был воспроизведен на пяти различных коммерческих сортах и одной селекционной линии. Эффективность подавления генов, проявляющаяся симптомами фотообесцвечивания, у некоторых сортов достигала более 90%.

Работа была профинансирована Российским научным фондом (грант № 22-64-00076).

Список литературы:

1. Bekele D., Tesfaye K., Fikre A. Applications of virus induced gene silencing (VIGS) in plant functional genomics studies // *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*. 2019. Vol. 7 № 1. P 1-7.
2. Zulfiqar S., Farooq M. et al. Virus-induced gene silencing (VIGS): a powerful tool for crop improvement and its advancement towards epigenetics // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. № 6. P 5608. DOI: 10.3390/ijms24065608

3. Basile A., Fambrini M. et al. (2019). The Ha-ROXL gene is required for initiation of axillary and floral meristems in sunflower// genesis. 2019. Vol. 57. № 9. e23307. DOI: 10.1002/dvg.23307
4. Jiang Z., Zhao Q. et al. Host sunflower-induced silencing of parasitism-related genes confers resistance to invading *Orobanche Cumana* // Plant Physiology. 2021. Vol. 185. № 2. P. 424-440. DOI: 10.1093/plphys/kiaa018

ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННАЯ АКТИВАЦИЯ МОБИЛОМА *ARABIDOPSIS THALIANA*

Камаурали Е.Д.^{1,2}, Власова А.В.^{1,2}, Перевозчиков Д.В.¹, Киров И.В.^{1,2}

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

**2 – «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский
университет)» (МФТИ), Долгопрудный 141701; E-mail: info@mipt.ru**

Мобильные элементы составляют значительную часть геномов у многих эукариот, в том числе и у растений, являясь одним из главных факторов их эволюции благодаря своей способности встраиваться в различные области ДНК и влиять на работу генов [1].

Мутагенной способностью обладают только активные транспозоны, работа которых контролируется эпигенетическими механизмами защиты. Одним из таких механизмов у растений выступает РНК-зависимое метилирование ДНК (RdDM), основанное на активности РНК-полимераз Pol IV и Pol V [2].

Для активации мобильных элементов необходимо ослабление механизмов защиты путем воздействия на белки, участвующих в метилировании. Это достигается снижением экспрессии генов, отвечающих за синтез данных белков. В нашей работе для нокдауна был выбран ген NRPE, кодирующий большую субъединицу Pol V.

В качестве платформы для таргетного воздействия на ген был использован метод вирус-опосредованного сайленсинга генов (VIGS), позволяющий транзиторно нокаутировать целевые гены с помощью вирусного генома [3].

Для детекции активности мобилома *Arabidopsis thaliana* мы анализировали ретротранспозон ONSEN, активирующийся благодаря комплексному воздействию на системы метилирования и влиянию теплового стресса.

В данной работе был оптимизирован метод VIGS для растения *Arabidopsis thaliana* на примере гена PDS (фитоендесатураза) для наиболее эффективного нокдауна целевых генов, после чего был проведен сайленсинг гена NRPE для снижения действия RdDM метилирования, затем растения были подвержены тепловому стрессу для активации транспозона ONSEN, активность которого была подтверждена благодаря детекции внехромосомных кольцевых молекул ONSEN, которые являются маркером мобильной активности ретротранспозона, а также благодаря детекции внехромосомной линейной ДНК транспозонов методом SIRT (Sequence Independent Retrotransposon Trapping).

Работа была профинансирована Российским научным фондом (грант № 22-64-00076).

Список литературы:

1. Slotkin R. K., Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome //Nature reviews genetics. – 2007. – V. 8. – №. 4. – P. 272-285.
2. Matzke M. A., Kanno T., Matzke A. J. M. RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants //Annual review of plant biology. – 2015. – V. 66. – P. 243-267.

3. Zulfikar S. et al. Virus-induced gene silencing (VIGS): a powerful tool for crop improvement and its advancement towards epigenetics //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – №. 6. – P. 5608

НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ *ARABIDOPSIS THALIANA* НА ОСНОВЕ МОБИЛЬНЫХ ТРАНСКРИПТОВ CRISPR-CAS9 СИСТЕМЫ

Парыгина А. Д.¹, Полховский А. В.^{1,2}, Киров И. В.^{1,2}

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

2 – НИУ «Московский физико-технический университет» (НИУ МФТИ),
Долгопрудный 141701; E-mail: info@mipt.ru

CRISPR-Cas системы – прокариотический инструмент для защиты от фаговых инфекций. Cas-9 белок обладает эндонуклеазной активностью и в комплексе с гидовой молекулой способен распознавать чужеродные геномные последовательности и разрезать их, тем самым предотвращая распространение инфекции^[1]. Эта система показала свою эффективность и в эукариотических организмах, став перспективным инструментом для геномного редактирования^[2].

Эффективность геномного редактирования растений бывает существенно ограничена, так как в основе метода лежит необходимость создания трансгенных растений. Стандартные методики получения трансгенов, такие как биобаллистика и агробактериальная трансформация, дают достаточно низкий выход, особенно если основные манипуляции проводятся на культурах растительных тканей^[3]. Для решения этих проблем на основе CRISPR-Cas был создан метод VIGE (virus-induced genome editing), который позволяет вводить компоненты системы вместе или по отдельности без необходимости получения трансгенных растений^[4]. Этот метод дает возможность совершать геномное редактирование растений по упрощенной схеме, быстрее и эффективнее по сравнению со стандартными методами.

Целью нашей работы является создание системы направленного мутагенеза на основе мобильных транскриптов CRISPR-Cas9 и ее опробирование на модельном объекте - *A. Thaliana*, в дальнейшем возможна корректировка методики для использования на экономически важных культурах растений.

В качестве мишени для CRISPR-Cas системы был выбран ген PDS, кодирующий фермент фитоин-десатуразу. Фермент участвует в синтезе ксантофиллов, тем самым имеет опосредованную роль в восстановлении хлорофиллов. Нарушение функции этого гена имеет выраженное фенотипическое проявление – утрата зеленой окраски хлоренхимы, поэтому его нокаут можно будет легко диагностировать.

Путем агробактериальной трансформации методом floral dip плазмидой PKSE401, содержащей ген Cas9, были протрансформированы бутоны *A. thaliana*. После созревания стручков были собраны семена T1 и были посажены в условиях *in vitro* на селективную среду.

Выжившие проростки T1 были пересажены в почву и проверены на наличие гена и транскрипта Cas9. В 12 растениях были обнаружены соответствующие гены и транскрипты. С трансформантов были собраны семена T2 и высажены в почву для дальнейшего секвенирования, подбора праймеров и определения количества вставок в геноме каждой линии.

В бактерии *E. coli* dh5α в плазмиде SPDK3888, созданной на основе генома вируса TRVII (*Tobacco rattle virus*), была собрана конструкция, содержащая участок sgРНК на ген

PDS, сшитый с геном тРНК, чтобы обеспечить мобильность транскрипта по флоэме, в частности, в апикальную меристему. Данной плазмидой путем электропорации были протрансформированы бактерии *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание) № 075-03-2023-106, номер проекта FSMG-2023-0015.

Список литературы:

1. Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science* (1979). 2014. V. 346., № 6213.

2. Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Wolf Y.I., Yakunin A.F., Oost J. Van Der, Koonin E. V. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems // *Nature Reviews Microbiology* 2011 9:6. 2011. V. 9., № 6. - P. 467–477.

3. Oh Y., Kim H., Kim S.G. Virus-induced plant genome editing // *Curr Opin Plant Biol.* 2021. V. 60., - P. 101992.

4. Paul J.W., Qi Y. CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35., № 7. - P. 1417–1427.

ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННЫЙ САЙЛЕНСИНГ ГЕНА DDM1 У *ARABIDOPSIS THALIANA*, ВОВЛЕЧЕННЫЙ В МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

Перевозчиков Д.В.¹, Власова А.В.^{2,3}, Камараули Е.Д.^{2,3}, Киров И.В.^{2,3}

1 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева), Москва

E-mail: info@rgau-msha.ru

2 - ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва

E-mail: biotech@iab.ac.ru

3 – ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (ФГАОУ ВО МФТИ НИИ), Долгопрудный

Метилирование ДНК (5mC) играет важную роль в регуляции биологических процессов и служит важнейшим механизмом эпигенетического контроля мобильных элементов растений. Особое место в метилировании ДНК растений имеет ген снижения метилирования ДНК (*ddm1*), кодирующий ремоделер хроматина. С его помощью обеспечивается доступ ДНК-метилтрансфераз к гетерохроматину, что позволяет стабильно подавлять мобильные элементы (Lippman et.al., 2004).

Для исследования функциональной роли гена *ddm1* и последствий его сайленсинга в *Arabidopsis thaliana* была снижена его экспрессии с использованием метода VIGS (вирус-опосредованный сайленсинг генов) (Shi et.al., 2021). Этот метод основан на посттранскрипционном замалчивании при помощи РНК интерференции (Becker and Lange, 2010).

В данной работе была произведена оптимизация протокола заражения VIGS и оценено влияние на эффективность заражения таких параметров, как способ заражения, возраст растения и длина светового дня для *Arabidopsis thaliana* с использованием конструкции, включающей ген PDS, сайленсинг которого вызывает фотообесцвечивание.

После оптимизации растения были заражены агробактериями, содержащие плазмиды вируса TRV, в состав которых был встроен участок гена *ddm1*. После

выделения РНК из зараженных растений и синтеза кДНК было произведено qPCR, по результатам которого удалось детектировать снижение экспрессии гена *ddm1*.

В дальнейших исследованиях будет производиться оценка метилирования ДНК в полученных растениях со сниженной экспрессией гена *ddm1*.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-64-00076

Список литературы:

1. Becker, A. and Lange, M. (2010) VIGS genomics goes functional. *Trends Plant Sci.* 15, 1–4
2. Lippman, Z., Gendrel, AV., Black, M. et al. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control// *Nature* 430, 471–476 (2004)
3. Shi, G.; Hao, M.; Tian, B.; Cao, G.; Wei, F.; Xie, Z. A methodological advance of tobacco rattle virus-induced gene silencing for functional genomics in plants. *Front. Plant Sci.* 2021, 12, 671091.
4. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome// *Nature Reviews Genetics* 2007;8:272–85.

АКТИВНЫЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ *SOLANUM PERUVIANUM*, ИНТРОГРЕССИРОВАННЫЕ В ГЕНОМ ТОМАТА (*S. LYCOPERSICUM L.*)

М.А. Серганова^{1,2}, П.Ю. Меркулов^{1,2}, Г.А. Петров¹, И.В. Киров^{1,2}

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

2 – Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

Геном большинства сельскохозяйственных растений в значительной мере представлен мобильными элементами (МЭ, транспозоны), способными к перемещению и пролиферации внутри генома, что также может приводить к появлению генов нового функционального значения. Мобилом растений в большей степени представлен LTR-ретротранспозонами, активность которых сыграла важную роль в адаптации и эволюции растений (Lisch, 2013). У томата наиболее известными примерами МЭ-опосредованных модификаций является вытянутая форма плода, вызванная дупликацией локуса *SUN* (Xiao et al., 2008), а также образование жёлтой мякоти плода опосредованное инсерцией в локусе *PSY1* (Jiang et al, 2012).

Несмотря на важную роль МЭ в увеличении генетического разнообразия растений, их активность может привести к накоплению вредных или летальных мутаций, ввиду чего в клетках растений функционируют системы эпигенетического сайленсинга мобильных элементов. Однако потеря эпигенетического контроля МЭ может происходить при гибридизации различных видов, что было описано как теория ‘геномного шока’ (McClintock, 1984).

Известно, что в селекции адаптивных и устойчивых сортов томата широкое применение получило скрещивание *S. lycopersicum* с дикими видами томата. Помимо генетического разнообразия, дикие виды томата характеризуются значительно большим многообразием активных семейств МЭ, которые также могут быть привнесены и закреплены в геноме культурного томата в процессе рекуррентной гибридизации (Dominguez et al., 2020). Однако полногеномный масштаб и особенности мобилома современных сортов томата к настоящему времени не изучен.

Высокоэффективным и универсальным методом идентификации и изучения активных МЭ является секвенирование внехромосомных кольцевых ДНК (вкДНК),

предложенное Lanciano et al. (2017) как метод Mobilome-seq. Принято считать, что МЭ-образованные вкДНК являются побочным продуктом активности мобилома, однако недавние работы позволяют предполагать об их образовании, как о необходимом этапе жизненного цикла (Yang et al., 2023). Первоначально Mobilome-seq был проведён с использованием секвенирования Illumina, но недавними работами с использованием технологий длинных прочтений продемонстрирована возможность структурного анализа вкДНК (Merkulov et al., 2023, Zhang et al., 2023).

В данной работе нами был проведен полногеномный анализ активного мобилома томата с целью выявления новых активных семейств ретротранспозонов. Для этого мы провели нанопоровое секвенирование внехромосомных кольцевых ДНК (вкДНК) томата, выращенного в условиях релаксации эпигенетического контроля. В результате нами были обнаружена активность ретротранспозонов двух линий происхождения – *Tork* и *Bianca*. В то же время последовательности секвенированных вкДНК содержали серьёзные структурные отличия относительно последовательностей геномной сборки SL3.0. Используя геномные сборки диких видов томата, мы обнаружили высокое сходство детектированных последовательностей и ретротранспозонов *S. peruvianum*. Для оценки генетических изменений, которые могли возникнуть в результате активности обнаруженных элементов, мы провели нанопоровое секвенирование используемой линии томата. Нами были обнаружены значительные структурные отличия значительной доли последовательностей, картированных на хромосомы 6 и 9, что позволяет предположить о наличии крупных участков, привнесённых в результате интрогрессии. Кроме того, нам удалось детектировать новые инсерции ретротранспозонов, принадлежащим тем же семействам, что и продуцирующие вкДНК элементы. Полученные результаты могут свидетельствовать о сохранившейся транспозиционной активности детектированных элементов, которая может быть стимулирована нарушением или релаксацией систем эпигенетического контроля. Кроме того, элементы, предположительно привнесённые из генома *S. peruvianum* могут позволить изучить такие явления, как пролиферация ретротранспозонов в новом геномном окружении, а также установление генетического контроля над ними.

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

Список литературы:

1. Damon L. How important are transposons for plant evolution? // Nature Reviews Genetics. – 2013. – Vol. 14. – №1. – P. 49-61
2. Jiang N. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution // Nature. – 2012. - Vol. 485. – P. 635–641.
3. Lanciano S. et al. Sequencing the extrachromosomal circular mobilome reveals retrotransposon activity in plants // PLoS genetics. 2017. Т. 13. №. 2. с. e1006630.
4. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // Science. – 1984. – Vol. 226. – P. 792–801.
5. Merkulov P. et al. Composition and Structure of *Arabidopsis thaliana* Extrachromosomal Circular DNAs Revealed by Nanopore Sequencing // Plants. - 2023. – Vol. 12. - №. 11 P. 2178.
6. Xiao et al. Genome organization of the tomato sun locus and characterization of the unusual retrotransposon *Rider* // the plant journal. – 2008. – Vol. 60. – №.1. – P. 181-193.
7. Yang M. et al. eccDB: a comprehensive repository for eccDNA-mediated chromatin contacts in multi-species // Bioinformatics. - 2023. – Vol. 39. №. 4. btad173
8. Zhang et al. Purification, full-length sequencing and genomic origin mapping of eccDNA// Nature Protocols. – 2023. – Vol.18. P. 683–699.

**МАТЕРИАЛЫ САТЕЛЛИТНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ТЕМАТИЧЕСКОМУ
НАПРАВЛЕНИЮ**

**«ТРИТИКАЛЕ: ГЕНЕТИКА, БИОТЕХНОЛОГИЯ, СЕЛЕКЦИЯ И
СЕМЕНОВОДСТВО, ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ И ПЕРЕРАБОТКИ»**

НОВЫЙ СОРТ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ БОТАНИЧЕСКАЯ 4

Аленичева А.Д., Щуклина О.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва 127276

Тритикале (*×Triticosecale* Wittm. & A.Camus.) представляет собой новую сельскохозяйственную культуру, полученную учеными с помощью экспериментального скрещивания пшеницы и ржи [1,6]. Эта культура обладает уникальным сочетанием биологических и хозяйственных признаков, что позволило ей найти свое место в сельскохозяйственном производстве [3,9]. В настоящее время тритикале возделывают в 42 странах мира, но основной валовой сбор зерна обеспечивают Польша, Германия, Франция и Беларусь. Хотя площади, выделенные под тритикале в России, несколько меньше по сравнению с другими зерновыми культурами, доля собранного урожая все еще остается на прежнем уровне благодаря повышению урожайности новых сортов [5,7].

Ранее в России селекционерами основной упор делался на создание озимых форм тритикале. Это позволило в настоящее время включить в Реестр селекционных достижений 105 сортов озимой тритикале. Однако за последние 10 лет возрос интерес к созданию сортов ярового типа. В результате, на ноябрь 2023 года в Реестре селекционных достижений зарегистрированы 26 сортов яровой тритикале. [2,4].

Целью исследований являлось создание нового конкурентного сорта яровой тритикале, обладающего высокой устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам, отзывчивостью на агротехнические мероприятия, стабильной урожайностью и качеством зерна.

Исследования выполнены в 2004–2021 годах в ФГБОУ ВО «РГАУ–МСХА имени К. А. Тимирязева» (г. Москва), ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН (отдел отдаленной гибридизации Московская область, Истринский р-н) и ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (г. Москва).

В качестве исходного материала для создания нового сорта использовались сортообразцы гексаплоидной тритикале, полученные из коллекции ВИР, селекционных учреждений страны и авторские линии, отобранные из гибридных популяций, созданных с помощью внутривидовой и отдаленной гибридизации.

Результатом селекционной работы стало получение перспективной линии с селекционным номером 1656. Первые гибриды от скрещивания первичных и вторичных форм гексаплоидной тритикале S2/к-1242//к-1185 были получены в 2005 году. Далее методом индивидуального отбора была отобрана линия 1656.

В конкурсном сортоиспытании (2016-2018 гг.) линия 1656 обладала средней урожайностью 7,96 т/га, что выше стандарта Ровня на 0,83 т/га. Технологические характеристики зерна, в среднем за три года превышали стандарт: натура составила 803 г/л (Ровня 798 г/л), масса 1000 зерен 47,6 г (Ровня 45,6 г.), содержание сырой клейковины 38,1% (Ровня 36,4%). Содержание белка было несколько ниже, чем у сорта-стандарта 13,7% против 14,5% у сорта Ровня. [8-10]. В 2019 году сорт был передан на Государственное сортоиспытание, в 2022 году включен в Государственный реестр селекционных достижений по Волго-Вятскому (4) региону.

Куст полупрямостоячий – промежуточный. Растение среднее – высокое. Время колошения ранее – среднее. Восковой налет на влагалище флагового листа средний – сильный. Густота опушения шейки стебля сильная. Колос белый при созревании, средний – длинный, средней плотности, полностью остистый. Ости над кончиком колоса средние-длинные. Опушение наружной поверхности колосковой чешуи отсутствует. Соломина на срезе выполнена слабо-средне [8].

В Волго-Вятском регионе средняя урожайность зерна составила 38,1 ц/га, прибавка к стандарту 1,4 ц/га. Масса 1000 семян 35,5 г. Максимальная урожайность 66,1 ц/га получена на Большеболдинском ГСУ в Нижегородской области в 2020 г. Сорт зернового использования.

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН «Гибридизация у растений в природе и культуре: фундаментальные и прикладные аспекты» № Госрегистрации 122042500074-5.

Список литературы:

1. Абделаал Х.К., Энзекрей Е.С., Соловьев А.А., Щуклина О. А., Градсков С. М., Завгородний С. В. Урожайность зерна и зелёной массы нового сорта яровой тритикале Тимирязевская в зависимости от применения разных доз азотных удобрений в условиях ЦРНЗ // Кормопроизводство. 2019. № 2. С. 18-22.
2. Абделькави Р.Н., Щуклина О.А., Ермоленко О.И., Соловьев А.А. Стабильность и пластичность генотипов яровой тритикале по урожайности и качеству зерна // Аграрный научный журнал. 2020. №4, С. 4-9.
3. Аленичева А.Д., Щуклина О.А. Эффективность внесения различных доз азотного удобрения на яровой тритикале в условиях Московской области // Российская сельскохозяйственная наука. 2023. № 3. С. 55-58.
4. Аленичева А.Д., Щуклина О.А., Квитко В.Е., Клименкова И.Н., Груздев И.В., Лангаева Н.Н., Гарибян Ц.С., Завгородний С.В. Влияние азотных удобрений на рост, развитие и урожайность новых сортов яровой тритикале (×Triticosecale Wittm.) // АгроЭкоИнфо. 2022. № 6(54).
5. Кочурко В.И., Савченко В.Н. Урожайность, качество и кормовая ценность ярового тритикале // Аграрная наука. 2000. №9. С. 14-15.
6. Соловьев А., Щуклина О. В пользу синтетики // Новое сельское хозяйство. – 2022. № 5. С. 38-41. EDN LFSYCG.
7. Тысленко А.М. Инновационные сорта и технологии возделывания ярового тритикале / Тысленко А.М. и др. – Иваново: ПресСто. 2017. 295 с.
8. Щуклина О.А., Аленичева А.Д., Квитко В.Е., Груздев И.В., Клименкова И.Н., Завгородний С.В., Гарибян Ц.С., Соловьёв А.А. Продуктивность, качество и питательная ценность зерна яровой тритикале (×Triticosecale Wittm. ex. A. Camus) нового сорта Ботаническая 4 // Кормопроизводство. 2022. № 8. С. 19-24.
9. Щуклина О.А., Соловьев А.А., Полховская Е.С., Квитко В.Е., Клименкова И.Н., Завгородний С.В. Тимирязевская 42 – новый сорт яровой тритикале (×Triticosecale Wittm. ex. Camus) // Кормопроизводство. 2021. № 8. С. 43-46.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ОЗИМОЙ ГЕКСАПЛОИДНОЙ ТРИТИКАЛЕ В ПРЕДВАРИТЕЛЬНОМ СОРТОИСПЫТАНИИ В УСЛОВИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОГО РАЙОНА НЕЧЕРНОЗЕМНОЙ ЗОНЫ РОССИИ

Ворончихина И.Н., Ворончихин В.В.

***ФГБУН Главный ботанический сад имени Н. В. Цицина (ГБС РАН), Москва, 127276;
E-mail: VoronchikhinaYarinka@yandex.ru***

Центральный район Нечерноземной зоны России относится к зоне рискованного земледелия [1, 2]. Для таких условий тритикале является подходящей культурой, показывающей преимущество перед пшеницей и рожью. Установлено, что чем хуже природно-климатические условия, тем явственнее проявляются преимущества тритикале. Кроме того, бесспорным достоинством тритикале является ее высокой устойчивости к

болезням. Это позволяет экономичнее вести производство и получать экологически-чистую продукцию [3].

Сорт как средство сельскохозяйственного производства является одним из важнейших элементов научно-технического прогресса в сельском хозяйстве, поскольку он обеспечивает получение продукции высокого качества и в необходимых количествах [4]. Заключительным этапом селекционного процесса является испытание новых линий в предварительном и конкурсном сортоиспытаниях [5]. В связи с этим целью данной работы было проведение комплексного изучения новых высокопродуктивных линий озимой тритикале в условиях ЦРНЗ при различных уровнях естественного инфекционного фона по основным листовым болезням.

В качестве материала для исследований послужили 9 селекционных линии озимой тритикале, которые в течение последних двух лет испытаний показали лучшие результаты по хозяйственно-полезным признакам. Опыты проведены в 2023 г. в отделе отдаленной гибридизации ГБС РАН и кафедре генетики, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. В качестве стандарта использовали сорт Немчиновский 56. Площадь делянки 5 м², повторность четырехкратная, размещение рандомизированное. Агротехника, общепринятая для зоны. Полевые оценки проведены согласно методике Государственного сортоиспытания [6].

В 2023 г. урожайность исследуемых линий оказалась очень высокой – 10,6 – 13,4 т/га, при этом достоверных различий между образцами выявлено не было. На этом фоне самые высокие значения были у сорта Академическая и линии 323h-19.

В 2023 г. не наблюдался естественный инфекционный фон по основным листовым болезням. При этом было отмечено поражение нетипичной для зоны болезнью – желтой ржавчиной. Наибольшее поражение было отмечено у линий 321h/1-20 (2 балла), 278h-18 (4 балла) 323h-19 (5 баллов).

Масса 1000 зерен всех линий была высокой и варьировала в пределах от 46,9 до 61,8 г. Наиболее крупным оказалось зерно линии 323h-19.

В 2023 г. сложились естественные провокационные условия для оценки образцов по устойчивости к предуборочному прорастанию зерна в колосе. На этом фоне высокая устойчивость была выявлена у линий 322h-18, 395h/2-20, 321h/1-20 и 323h-19. Сорт-стандарт Немчиновский 56 также характеризовался высокой устойчивостью – у него ППЗ составил 1,8 %. Сильнее всего проросло зерно у сорта Тимирязевская 150 и линия 278h-18.

Зерно всех образцов характеризовалось высокой натурой (больше 700 г/л). Максимальная натура сформировалась у сорта Академическая (760 г/л). Отмечено низкое содержание белка (10-12 %) и относительно невысокое содержание клейковины в зерне (10-13%).

Заключение:

По результатам испытаний планируется для дальнейшего размножения и передачи на Государственное сортоиспытание линия 278h-18, характеризующаяся высокой урожайностью зерна, безостостью и легким обмолотом. А также линия 323h-19, характеризующаяся крупным стекловидным зерном и высокой устойчивостью к предуборочному прорастанию зерна в колосе.

Список литературы:

1. Ворончихина И.Н., Рубец В.С., Клименкова И.Н., Щелканов Д.А., Пыльнев В.В. Итоги испытаний линий озимой гексаплоидной тритикале, полученных путем внутривидовой и межродовой гибридизации // Вавиловские чтения - 2022 – Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 135-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова. Саратов, 2022. С. 69-75.

2. Грабовец А.И., Крохмаль А.В. Итоги и особенности селекции озимой тритикале в условиях нарастания аридности климата // Тритикале России: Материалы заседания секции тритикале РАСХН. Ростов-на-Дону, 2008. Вып. 3. С. 18–29.

3. Ворончихина И.Н. Селекционная оценка коллекции озимой гексаплоидной тритикале в условиях ЦРНЗ // Аграрная наука XXI века: проблемы и перспективы развития. Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию кафедры селекции и семеноводства и 135-летию со дня рождения доктора сельскохозяйственных наук, профессора, заслуженного деятеля науки РСФСР Н.А. Успенского. Воронеж, 2022. С. 73-78.

4. Щуклина О.А., Аленичева А.Д., Квитко В.Е., Груздев И.В., Клименкова И.Н., Завгородний С.В., Гарибян Ц.С., Соловьев А.А. Продуктивность, качество и питательная ценность зерна яровой тритикале (*×Triticosecale* Wittm. ex. A. Camus) нового сорта Ботаническая 4 // Кормопроизводство. 2022. №8. С. 19-24.

5. Грабовец А.И. Селекция тритикале на Дону // Тритикале. Материалы 8-й Международной научно-практической конференции «Тритикале и стабилизация производства зерна, кормов и продуктов их переработки». - Ростов -на-Дону, 2018. -С. 7-22.

6. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Выпуск первый. Общая часть / Под общей ред. М. А. Федина. – М., 1985. – 270 с.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ИНДУКЦИОННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГАПЛОПРОДУКЦИИ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ТРИТИКАЛЕ *IN VITRO*

Жилин С.В., Хомякова О.В., Акинина В.Н., Дьячук Т.И., Калашникова Э.В., Куликова В.П.

ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока» (ФАНЦ Юго-Востока), Саратов 410010; ул. Тулайкова, д.7; e-mail: cell_selection@list.ru

Тритикале (*× Triticosecale* Wittm.) – синтетический ботанический род семейства мятликовых (Poaceae), объединяющий в одном геноме хромосомы пшеницы и ржи. В настоящее время тритикале является коммерческой культурой с многоцелевым использованием зерна, обладающей огромным потенциалом в качестве продукта питания человека и корма для животных (Mergoum, 2019).

Для улучшения сортового разнообразия в селекции тритикале наряду традиционными методами применяется гаплоидия. У большинства злаков для получения гаплоидных растений *in vitro* применяются три метода – культура пыльников, культура изолированных микроспор и отдаленная гибридизация, сопровождающаяся селективной элиминацией хромосом вида-опылителя (Niazian and Shariatpanahi, 2020). Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. Для таких злаковых культур, как ячмень, пшеница и рис разработаны и включены в рутинные селекционные программы эффективные протоколы получения гаплоидных растений (Humphreys and Knox, 2015). У тритикале использование гаплоидных технологий в селекции сдерживается низкой эффективностью стандартных протоколов (Würshum et al., 2014).

Андрогенез *in vitro* (гаплоидный эмбриогенез, микроспоровый эмбриогенез, андроклиния) в культуре изолированных пыльников является одним из наиболее распространенных и технически несложных методов получения гаплоидных растений. Подбор оптимальных условий культивирования играет существенную роль в получении гаплоидных растений. Одним из важных факторов успеха является состав индукционных питательных сред. Для инициации андрогенеза в культуре пыльников успешно

используются различные варианты питательных сред с добавлением картофельного экстракта (Першина и др., 2013).

Целью исследований явилась оценка эффективности гаплопродукции в культуре пыльников *in vitro* перспективных линий озимой гексаплоидной тритикале селекции ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока». Эффективность андрогенеза оценивали по следующим показателям: число эмбриогенных структур на 100 культивируемых пыльников (ЭС/100КП), общее число регенерантов на 100 ЭС (Р/100ЭС), число зеленых растений на 100ЭС (ЗР//100ЭС) и их долю (ДЗР) в общем числе регенерантов. Сравнение отдельных показателей андрогенеза *in vitro* показывает на неодинаковую реакцию разных генотипов, что согласуется с данными других исследователей (Niazian and Shariatpanahi, 2020). Среднее значение показателя «ЭС/100КП» составило 23,3 при варьировании 6,4-75,1. С учетом разности частных средних значений среда Р-2 оказала достоверное положительное влияние на общее число эмбриогенных структур у четырех генотипов из шести изученных – в зависимости от генотипа значение показателя увеличилось в 1-3 раза. Выраженность показателя по величине «Р/100ЭС» отражает «качество» полученных эмбриогенных структур, т.е. степень их дифференцированности. У различных генотипов варьирование составило 3,4-22,1 растений на 100ЭС. Статистически значимого влияния индукционной питательной среды на регенерацию растений не выявлено у четырех генотипов. Из сформированных новообразований развивались зеленые и альбиносные проростки. Важным показателем эффективности метода является выход зеленых растений (ЗР/100КП). Максимальное значение этого показателя составило 2,5. Доля зеленых растений у изученных генотипов от их общего числа варьировала в зависимости от генотипа от 5,0 до 76,9%. В общей сложности из 7538 ЭС получено 949 растений, из которых 326 зеленых и 623 альбиносных с соотношением 1:2.

Для выявления зависимости показателей андрогенеза от генотипа и состава индукционных питательных сред был проведен двухфакторный дисперсионный анализ. Установлена доминирующая роль генотипа на всех этапах гаплопродукции. Наибольшее влияние генотипа проявилось на показатель «ЭС/100КП» и составило 86,2%, питательной среды – 2%, взаимодействие генотипа и питательной среды – 11,3%. Показатель «Р/100ЭС» обусловлен влиянием генотипа на 64,2%, питательной среды - на 8,0% и взаимодействием этих факторов – на 26,6%. Вклад генотипа в долю зеленых растений составил 71,4%, питательной среды 6,7% и взаимодействия факторов – 21,2%. Доля влияния питательной среды была статистически достоверной, но незначительной в сравнении с генотипом по всем показателям андрогенеза. Наиболее значительный вклад взаимосвязи генотип x питательная среда выявлен на показатель Р/100ЭС. Влияние изученных факторов и их взаимодействия было статистически значимым.

Выводы.

1. Проведена оценка параметров гаплопродукции у шести генотипов на двух питательных средах – С-17 и Р-2. Неотзывчивых к андрогенезу генотипов не было выявлено. Частота индукции эмбриогенных структур варьировала от 6,4 до 75,1/100КП, регенерация растений – 3,4 до 22,1 на 100ЭС. Доля зеленых растений в зависимости от генотипа составила 5,0-76,9%.

2. Кроме генотипической зависимости и высокой частоты альбинизма, важным сдерживающим фактором метода культуры пыльников тритикале является низкая частота регенерации ЭС. Из 7538 ЭС получено 949 растений, из которых 326 зеленых и 623 альбиносных с соотношением 1:2.

3. Установлена доминирующая роль генотипа на всех этапах получения гаплоидных растений тритикале. Доля влияния генотипа на индукцию эмбрионидных структур составила 86,2%, регенерации растений – 64,2% и выход зеленых растений – 71,4%. Доля влияния питательной среды была статистически значимой, но незначительной в сравнении с генотипом на всех этапах гаплопродукции.

Список литературы:

1. Mergoum M., Sapkota S., ElFatih A., Naraghi S.M., Pirseyedi S., Alami M.S., and AbuHammad W. Triticale (\times Triticosecale Wittmack) Breeding // J.M. Al-Khayri et al (eds.). Advances in Plant Breeding Strategies: Cereals. Springer Nature Switzerland. 2019. Pp. 405–451. DOI: 10.1007/978-3-030-23108-8_11.
2. Niazian M and Shariatpanahi M.E. In vitro-based doubled haploid production: recent improvements// Euphytica. 2020. Vol. 216. P. 69. Doi.org/10.1007/s10681-020-02609-7.
3. Humphreys D.G. and Knox R.E. Doubled Haploid Breeding in Cereals. J.M. Al-Khayri et al. (eds). Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding Biotechnology and Molecular Tools. Springer Int. Publishing Switzerland, 2015. Pp. 241-289. DOI:10.1007/978-3-319-22521-0_9.
4. Würschum T., Matthew R. Tucker, H.P. Maurer. Stress treatment influence efficiency of microspore embryogenesis and green plant regeneration in hexaploid triticale (\times Triticosecale Wittmack L.) // In vitro Cell Dev. Biol. 2014. Vol. 50. Pp. 143-148. DOI: 10.1007/s11627-013-9539-3.
5. Першина Л.А., Осадчая Т.С., Бадаева Е.Д., Белан И.А., Россева Л.П. Изучение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы западно-сибирской селекции, различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродных транслокаций // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т.17. №1. С.40-49.

ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗЕЛЕННОЙ МАССЫ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ УДОБРЕНИЙ В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Квитко В. Е.¹, Щуклина О. А.¹, Соловьев А. А.^{1,2}

1 – ФГБУН Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН

2 – ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»

E-mail: lera.kvitko@mail.ru, oashuklina@gmail.com, a.soloviev70@gmail.com

В современном мире остро стоит проблема продовольственной безопасности, в основе решения которой лежит высокий уровень развития растениеводства и животноводства [4]. На сегодняшний день необходимо получать высокие урожаи не только зерна, но и зеленой массы для кормления скота. Для этого аграрии выращивают определенные культуры, имеющие высокий потенциал урожайности при укосах, одной из которых является яровая тритикале [1, 2]. Биохимическая характеристика зерна и зеленой массы данной культуры позволяют использовать ее для нужд животноводства [6]. В связи с этим является актуальным изучение аспектов ее возделывания на почвах с различной агрохимической характеристикой [5]. Целью данного исследования является оценка урожайности зеленой массы и сухого вещества яровой тритикале на разных агрохимических фонах при применении различных доз азотного удобрения.

Исследования выполнены на полях отдела отдаленной гибридизации ФГБУН Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН на дерново-подзолистой тяжелосуглинистой почве. Объектом исследований являлся сорт яровой тритикале Тимирязевская 42 [3]. Опыт заложен на двух различных по агрохимической характеристике участках с различным фоном. На первом участке под осеннюю обработку почвы в 2021 году было внесено 550 кг/га азофоски, содержание подвижного фосфора составляло 260,0 мг/кг, подвижного калия – 132,8 мг/кг, органического вещества – 2,0 %. На втором участке удобрения осенью не вносились, содержание подвижного фосфора было равно 86,2 мг/кг, подвижного калия – 18,1 мг/кг, органического вещества – 1,3 %. Схема опыта включала следующие варианты внесения азотных удобрений в виде

аммиачной селитры (NH_4NO_3): N_{60} , N_{90} , N_{120} – по всходам; N_{90} (по всходам) + N_{30} (в фазу - выход в трубку); N_{90} (по всходам) + N_{60} (в фазу - выход в трубку). Опыт закладывался в 4-кратной повторности, размещение делянок рандомизированное, площадь учётной делянки 15 м². Отбор растений для учета урожайности зеленой массы был произведен в фазы выход в трубку, колошение – цветение, молочная спелость зерна.

В весенний период 2022 года температура опускалась ниже среднемноголетней на 2-3 °С, тогда как в июне-июле эти показатели были чуть выше многолетних показателей, и в августе достигали максимального значения. Количество осадков в весенне-летний период сильно отличалось по месяцам, однако часто было меньше многолетних значений. Большое количество осадков выпало в начале апреля, конце мая.

На первом участке урожайность зеленой массы в фазу выхода в трубку колебалась от 13,1 т/га (N_{60}) до 19,2 т/га ($\text{N}_{90} + \text{N}_{60}$). Значения данного показателя на втором участке в тот же период составляла от 13,3 (N_{60}) до 17,3 т/га ($\text{N}_{90} + \text{N}_{60}$). Однако статистической разницы между вариантами не было ни на одном из участков. В фазу колошения – цветения урожайность зеленой массы на первом участке возросла в 1,2-2,5 раза и достигала максимума при внесении азота в дозе $\text{N}_{90} + \text{N}_{60}$ (38,5 т/га). Наименьшее значение составило 19,3 т/га в контроле. Существенно его превышали урожайности зеленой массы, полученные в вариантах N_{120} , $\text{N}_{60} + \text{N}_{30}$, $\text{N}_{90} + \text{N}_{60}$, $\text{N}_{120} + \text{N}_{60}$, $\text{N}_{60} + \text{N}_{60}$. На втором участке этот показатель варьировал от 15,4 т/га (контроль) до 25,2 т/га ($\text{N}_{120} + \text{N}_{60}$). Существенно прибавку имели варианты с внесением N_{60} , N_{90} , и $\text{N}_{120} + \text{N}_{60}$. В фазу молочной спелости зерна на первом участке урожайность зеленой массы яровой тритикале составила 28,5-40,2 т/га. Наибольший укос зеленой массы отмечался при дробном внесении удобрения $\text{N}_{90} + \text{N}_{60}$, однако статистически данная прибавка не имела значимости. На втором участке наименьшая урожайность зеленой массы была отмечена в контрольном варианте в 19 т/га. Значительную разницу с ним имели варианты с внесением $\text{N}_{120} + \text{N}_{60}$ (27,9 т/га) и N_{60} (32 т/га). Урожайность сухой массы имела другие тенденции на обоих участках. Так, на первом участке в фазу выхода в трубку наблюдалось пониженное содержание сухого вещества в растениях при применении аммиачной селитры. При достижении фазы колошения – цветения внесение азота в дозе от 90 кг/га давало стабильную прибавку сухого вещества на единицу площади. Максимальное значение было отмечено в варианте $\text{N}_{90} + \text{N}_{60}$ (10,5 т/га). К концу вегетации данный показатель достигал 20,7 т/га (N_{60}). На втором участке в фазу выхода в трубку, а так же в фазу молочной спелости этот показатель в вариантах опыта был ниже, чем в контроле, однако не имел статистической значимости. В середине вегетации наблюдалась существенная прибавка при внесении N_{90} , $\text{N}_{90} + \text{N}_{60}$ и $\text{N}_{120} + \text{N}_{60}$.

Таким образом, на почве с более благоприятным агрохимическим составом применение азотных удобрений позволяло получить прибавку урожайности зеленой массы и сухого вещества. Наилучший эффект достигался при единоразовом внесении дозы N_{120} , либо при дробном внесении $\text{N}_{90} + \text{N}_{60}$. На бедной по агрохимическому составу почве применение удобрений дало положительный эффект при внесении N_{90} , либо $\text{N}_{120} + \text{N}_{60}$. Однако даже при использовании удобрений урожайность зеленой и сухой массы на втором участке была в 1,5-2,0 раза ниже, чем на первом.

Список литературы:

1. Абделаал Х.К., Энзекрей Е.С., Соловьев А.А., Щуклина О. А., Градсков С. М., Завгородний С. В. Урожайность зерна и зелёной массы нового сорта яровой тритикале Тимирязевская в зависимости от применения разных доз азотных удобрений в условиях ЦРНЗ // Кормопроизводство. 2019. № 2. С. 18-22.

2. Аленичева А.Д., Щуклина О.А. Эффективность внесения различных доз азотного удобрения на яровой тритикале в условиях Московской области. // Российская сельскохозяйственная наука. – 2023. – № 3. – С. 55-58.

3. 9. Щуклина О.А., Соловьев А.А., Полховская Е.С., Квитко В.Е., Клименкова И.Н., Завгородний С.В. Тимирязевская 42 – новый сорт яровой тритикале (×Triticosecale Wittm. ex. Camus) // Кормопроизводство. 2021. № 8. С. 43-46.

4. Добродомова Л.А., Ходорцевич Н.Г. Зерновое производство – основа продовольственной безопасности России // Современная экономика: обеспечение продовольственной безопасности: сборник научных трудов V Международной научно-практической конференции. Кинель: РИО СГСХА, 2018. С. 115-119.

5. Щуклина О.А., Полховская Е.С., Соловьев А.А. Отзывчивость нового сорта яровой тритикале Тимирязевская 42 на элементы технологии возделывания // Тритикале: Материалы международной научно-практической конференции, Ростов-на-Дону, 07–08 июня 2022 года. Том Выпуск 10. – Ростов-на-Дону: Общество с ограниченной ответственностью "Издательство "Юг", 2022. С. 232-237.

6. Энзекрей Е.С., Щуклина О.А., Завгородний С.В. Влияние метеорологических условий и азотных удобрений на биологическую урожайность яровой тритикале сорта Тимирязевская 42 // Зерновое хозяйство России. – 2021. – № 2(74). – С. 88-93.

7. Shchuklina O., Alenicheva A., Klimenkova I., Kvitko V., Zavgorodniy S. Morphophysiological features of the reaction of the cv. ×Triticosecale Wittm. ex. Camus on nitrogen fertilizers in contrasting agrometeorological conditions // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2022. – 1010. – P.012109.

АНАЛИЗ РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ ЗЕРНОВКИ ТРИТИКАЛЕ

Полховская Е.С.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550
e-mail: ekaterina_enzekrey@mail.ru***

Необходимым условием для анализа функционально значимых признаков является полная аннотация всех элементов генома (белок-кодирующие гены, промоторы, некодирующие РНК). Однако на данный момент известно, что размер генома гексаплоидной тритикале составляет около 17 Гб, в то время как около 2% генома состоит из последовательностей, кодирующих белок, а более 80% генома представлено повторяющимися последовательностями, из которых 70% являются ретроэлементами.

В настоящее время одним из важнейших направлений интенсивной селекции тритикале является поиск ценных источников генетической изменчивости для получения желаемых агрономических признаков (Reif et al., 2005). Эти источники новых генов обладают потенциалом для повышения урожайности, качества зерна, стрессоустойчивости и ресурсоэффективности современных сортов сельскохозяйственных культур.

За последние 25 лет исследования выявили четко выраженную корреляцию между высокомолекулярными субъединицами глютеина и качеством производимого хлеба (Liu, 2007). Следовательно, определение их состава является важным мероприятием в рамках программ селекции пшеницы, конечной целью которых остается повышение качества зерна и прогнозирование хлебопекарных характеристик.

Существуют различные методы идентификации субъединиц глютеинов. Как правило, идентификация высокомолекулярных субъединиц глютеина проводится методом электрофореза в полиакриламидном геле. И сейчас этот метод используется в селекционной практике для выявления аллелей глютеинов, ассоциированных с хорошими технологическими качествами (Nucia et al., 2019). Однако SDS-PAGE не

обеспечивает высоко достоверную идентификацию всех аллельных вариаций в генах глютенина, и, как правило, не содержит данных об уровнях экспрессии конкретных глутенинов и структурных вариаций в их промоторах.

Скрининг популяции на предмет вариаций генов глутенинов остается затруднен. Методы полногеномного секвенирования ДНК могут быть использованы для выявления нуклеотидных последовательностей генов глутенинов. Это помогает идентифицировать аллельные вариации и мутации в этих генах. Одним из оптимальных подходов в изучении глутенинов является использование нанопорового секвенирования, так как есть возможность получать длинные прочтения, что решает проблемы с повторами, покрывая полностью целевой регион.

В связи с этим стало развиваться и продолжает набирать обороты целевое секвенирование, которое заключается в выделении и секвенировании определенной области генома или подмножества генов. В нашем исследовании CAS9-опосредованное нанопоровое секвенирование (nCATS) на линии Л8665 яровой тритикале продемонстрировало, что данный метод можно использовать в качестве потенциального инструмента для таргетного секвенирования культур со сложным геномом (Kirov et al., 2021). Полученная глубина секвенирования была достаточной для различных задач, включая обнаружение вставок/делеций (InDels) и однонуклеотидных вариаций (SNP), гаплотипирование и профилирование метилирования. Однако уровня покрытия и разрешения полногеномного секвенирования не хватает для обнаружения всех изменений в образцах с большим размером генома, таких как тритикале и пшеница.

Дополнительный метод, который мы применили для изучения генов глутенинов является таргетное секвенирование, основанное на ампликонах, т.е. для выборочной амплификации и секвенирования конкретных интересующих участков ДНК. Этот метод становится особенно привлекательным при оценке различий, как в кодирующей части генов глютенина, так и в промоторных областях. В нашем исследовании были разработаны праймеры для 6 субъединиц глютенина (А, В, D субгеномов пшеницы X- и Y-типов). После амплификации ПЦР-продукты 6 субъединиц глютенина были объединены в один образец в соответствии с сортами. Объединенные ампликоны были баркодированы и подвержены сборке библиотеки для секвенирования.

В данном исследовании осуществлена разработка и апробация технологии ONT Amplicon-seq на коллекции мягкой пшеницы, состоящей из 23 сортов. Нанопоровое секвенирование полноразмерных субъединиц глютенина даёт возможность получить однозначные последовательности, позволяющие идентифицировать соответствующие аллели и их структурные вариации.

На основании полученных последовательностей и структурных вариаций был проведен филогенетический анализ. Так в 23 образцах яровой пшеницы был идентифицирован 21 аллель генов глутенинов. Примечательно, что три из этих аллелей отличались от тех, которые ранее были задокументированы в общедоступных базах данных. Результаты выявили четкое разделение в филогенетическом дереве генов X- и Y-типов, образующих шесть первичных кладов, каждая из которых соответствует определенной субъединице.

Секвенирование ампликонов с помощью нанопор оказывается более эффективным методом, требующим меньше времени на подготовку образцов. Разработка и валидация праймеров с использованием биоинформатических инструментов может быть завершена всего за пару часов. Продолжительность амплификации с разработанными праймерами зависит от длины участка-мишени. А для секвенирования достаточно всего одного часа для получения необходимого количества прочтений.

Этот период времени очень важен для нашего эксперимента, где также с помощью нанопорового секвенирования мы выявили более 7000 ранее неаннотированных генов яровой тритикале (Polkhovskaya et al., 2023), анализ которых может привести к

идентификации определенных генов, обладающих потенциалом для влияния на хозяйственно ценные признаки.

В целом наше исследование подчеркивает эффективность секвенирования ампликонов с помощью нанопора. Следовательно, его возможно применять для анализа растений с большими и сложными геномами, таких как пшеница и тритикале. Полученная глубина секвенирования дает возможность для идентификации различных структурных вариаций, таких как InDels и обнаружение SNP. Основным преимуществом этого метода является его применимость в практической селекции для выявления желательных аллелей и комбинаций, повышающих качество выпечки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (№ GUM-2022-005).

Список литературы:

1. Kirov I., Polkhovskaya E., Dudnikov M., Merkulov P., Vlasova A., Karlov G., Soloviev A. Searching for a needle in a haystack: Cas9-targeted Nanopore sequencing and DNA methylation profiling of full-length glutenin genes in a big cereal genome // *Plants*. 2021. Т. 11. №. 1:5. DOI: 10.3390/plants11010005

2. Liu Y.; Xiong Z.-Y.; He Y.-G.; Shewry P.R.; He G. Genetic diversity of HMW glutenin subunit in chinese common wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces from Hubei province. // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2007, 54, 865–874. doi:10.1007/s10722-006-9154-9.

3. Nucia A.; Okoń S.; Tomczyńska-Mleko M. Characterization of HMW glutenin subunits in European spring common wheat (*Triticum aestivum* L.). // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2019, 66, 579–588. doi:10.1007/s10722-018-00733-x.

4. Reif J.C.; Zhang P.; Dreisigacker S.; Warburton M.L., Ginkel M. van; Hoisington D.; Bohn M.; Melchinger A.E. Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2005, 110, 859–864. doi:10.1007/s00122-004-1881-8.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА НЕКРАХМАЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ ТРИТИКАЛЕ ПРИ ОЦЕНКЕ КРАХМАЛИСТОСТИ ЗЕРНА

Семенова А.В.^{1,2}, Соловьев А.А.^{1,3}

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), Москва 127550;

E-mail: semnast97@mail.ru

2 – Всероссийский научно-исследовательский институт крахмала и переработки крахмалсодержащего сырья – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха» (ВНИИК – филиал ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»), Московская обл. 140051

3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), Московская обл. 140150

Зерно тритикале содержит внушительное количество слизистых веществ (в среднем 2...8 % массы зерна), главным образом, пентозанов. Слизи представляют собой некрахмальные полисахариды, в большинстве случаев растворимые в воде. Подвергаясь гидролизу, они разлагаются до пентоз – арабинозы и ксилозы – то есть до простых сахаров. Олигосахариды тритикале представлены мальтотриозами, мальтотетраозами, мальтопентаозами, трифруктозаном. Такую особенность важно учитывать в технологии

получения крахмала, так как эти вещества оказывают влияние на эффективность извлечения конечного продукта, а также могут искажать точность показателей при оценке крахмалистости зерна. Снизить степень влияния слизей и увеличить выход крахмала из зерна стало возможным благодаря применению ферментов, разделению водно-мучной суспензии на фракции, а также очистке суспензии от водорастворимых и взвешенных частиц [1, 2].

Установлено, что ферментные препараты целлюлолитического действия интенсифицируют экстракцию растворимых веществ из зерна тритикале и способствуют активному разжижению зерновой пульпы. Эффект продемонстрировали следующие ФП: Viscoferm (Эндо-1,4-β-D-глюканаза; эндо-1,3-β-D-глюканаза; эндо-1,4-β-D-ксиланаза; целлюлаза), Distizum GL (Эндо-1,4-β-D-маннаназа; эндо-1,4-β-D-ксиланаза; эндо-1,3-β-D-ксиланаза; экзо-1,4-β-D-ксиланаза; экзо-1,3-β-D-ксиланаза; термостойкая β-глюканаза), Optimash TBG (Эндо-1,4-β-D-глюканаза; эндо-1,3-β-D-глюканаза) и Optimash VR (Экзо-1,4-β-D-ксиланаза; эндо-1,4-β-D-ксиланаза; целлюлаза). При этом лучшие результаты по повышению выхода растворимых веществ из зерна и разжижению дробленой зерновой пульпы установлены при следующих концентрациях ФП: Viscoferm – 300–400 г/т; Distizum GL – 75–100 г/т; Optimash TBG – 50–100 г/т; Optimash VR – 75–100 г/т. Также на примере ФП Distizum GL и Viscoferm выявлен синергизм действия при использовании двух целлюлолитических ФП. Это указывает на возможность комплексного использования целлюлолитических ФП.

Для оценки массовой доли крахмала в зерновых культурах, как правило, используется метод Эверса [3]. Анализ по данному методу основан на измерении оптического угла вращения плоскости поляризации света продуктами кислотного гидролиза крахмала. На показатели по методу Эверса также влияют и растворимые простые сахара, содержащиеся в зерне. Для их идентификации анализ проводится с поправкой на растворимые углеводы. Однако помимо крахмала гидролизу подвергаются также другие полисахариды. В связи с этим, необходимо исследование подходов к определению истинного содержания крахмала в зерновых культурах с высоким содержанием некрахмальных полисахаридов.

Оценена эффективность предварительной очистки цельносмолотой муки тритикале от пентозанов с помощью целлюлолитических ФП. В основе способа также лежит механизм гидролиза [4] некрахмальных полисахаридов. Эксперимент проводили на образце тритикале Тимирязевская 42 [5], с использованием ферментного препарата Optimash TBG [6], способствующего расщеплению некрахмальных полисахаридов оболочек зерна.

Для этого в исходном образце цельносмолотой муки тритикале определяли общее содержание углеводов методом Эверса ($70,3 \pm 0,6\%$) с поправкой на растворимые углеводы ($67,9 \pm 0,6\%$). Затем среднюю пробу цельносмолотой муки смешивали с дистиллированной водой (гидромодуль 2). Полученную суспензию подкисляли раствором серной кислоты до $\text{pH}=5,4$. Добавляли ферментный препарат Optimash TBG из расчета 200 г фермента на 1 т суспензии. Проводили термостатирование полученной суспензии в течение 3 часов при температуре 40°C при периодическом перемешивании. Далее смесь центрифугировали в течение 15 мин при 4000 мин^{-1} . Весь осадок без потерь собирали, высушивали и затем измельчали. По йодной пробе проконтролировали отсутствие мелких зерен крахмала в супернатанте.

В полученной после очистки муке (влажность муки составила $6,07 \pm 0,3\%$) также определяли общее содержание углеводов методом Эверса с поправкой на растворимые углеводы. По разнице между показателями находили содержание крахмала в зерне тритикале.

Обработка цельносмолотой муки ферментным препаратом целлюлолитического действия не повлияла на значение общего содержания углеводов в зерне, полученное методом Эверса: $70,3 \pm 0,6\%$ СВ. Однако массовая доля растворимых углеводов существенно возросла по сравнению с исходным их содержанием в зерне: с $2,39 \pm 0,1\%$

СВ до $5,44 \pm 0,2\%$ СВ. Это объясняется ферментативным расщеплением некрахмальных полисахаридов до простых сахаров. В связи с этим, истинное содержание крахмала снижалось на 3 % по сравнению с предполагаемым (с 67,9% до 64,9%).

Таким образом, принцип ферментативного расщепления некрахмальных полисахаридов может быть использован как для повышения выхода крахмала из зерна тритикале, так и для более точного определения истинного содержания крахмала в зерне.

Список литературы:

1. Андреев Н.Р., Костенко В.Г., Кривцун Л.В., Носовская Л.П., Адикаева Л.В. Исследование процесса переработки зерна тритикале как сырья для производства крахмала и крахмалопродуктов. Инновационные технологии производства и хранения материальных ценностей для государственных нужд. 2015. 4: 7–23.

2. Гильмуллина Л.Ф., Пономарева М.Л., Пономарев С.Н., Маннапова Г.С. Методы качественного и количественного определения арабиноксиланов в зерне злаков (обзор). Химия растительного сырья. 2021. 1: 27–43. DOI: 10.14258/jcprm.2021017713

3. ГОСТ 10845-98 «Зерно и продукты его переработки. Метод определения крахмала».

4. Santos J., Moreira L., Ferreira Filho E. Cellulose-degrading enzymes: key players in biorefinery development. *Biologia*. 2022. DOI: 10.1007/s11756-022-01274-6

5. Шуклина О.А., Соловьёв А.А., Полховская Е.С., Квитко В.Е., Клименкова И.Н., Завгородний С.В. Тимирязевская 42 – новый сорт яровой тритикале (\times Triticosecale Wittm. ex. Camus). Кормопроизводство. 2021. 8: 43–46. DOI: 10.25685/krm.2021.8.2021.008

6. Liu X., Unaegbunam E., Stuart D.T. Co-production of isobutanol and ethanol from prairie grain starch using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation*. 2021. 7(3): 150. DOI: 10.3390/fermentation7030150

ИЗУЧЕНИЕ МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО И ЯРОВОГО ОБРАЗА ЖИЗНИ В ОСЕННЕМ ПОСЕВЕ В УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ

Хлебникова А.А.¹, Ковтуненко В.Я.², Кузенко М.В.¹

1 – ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет» научно-исследовательский институт сельского хозяйства (ФГБОУ ВО «МГТУ» НИИСХ), Майкоп 385000, nish@mkgtu.ru

2 – ФГБНУ «Национальный центр зерна имени П.П. Лукьяненко» (ФГБНУ НЦЗ им. П.П. Лукьяненко), Краснодар 350012

Культура тритикале, являясь гибридом пшеницы и ржи, сочетает в себе биологические и хозяйственные признаки своих родителей. Направление использования – кормовое (зеленый корм, сенаж, сено, гранулы) и зерновое (хлебобулочные изделия, комбикорм, крахмал, производство спирта). В сравнении с другими культурами имеет меньшую требовательность к почве, климату, надежную зимостойкость, высокий потенциал урожайности зерна и зеленой массы. Благодаря этим признакам и свойствам тритикале составляет конкуренцию традиционным зерновым культурам, что способствует расширению посевных площадей тритикале в мире.

Однако имеется немало факторов, которые сдерживают дальнейший рост урожайности и улучшения качества этой культуры. Одна из причин – слабая изученность технологии возделывания новых сортов.

Поэтому грамотный выбор сортов с комплексом хозяйственно-полезных признаков и свойств, посев их в лучшие агротехнические сроки с научно обоснованными нормами высева

являются определяющим фактором получения стабильных урожаев тритикале, этому и посвящена диссертационная работа «Морфо-биологические особенности сортов тритикале ярового и озимого образа жизни в осеннем посеве в условиях Республики Адыгея». Цель нашей работы установить наилучшие сроки сева и нормы высева для получения наивысшего коэффициента размножения семян тритикале в семеноводстве.

Для изучения взяты пять современных сортов тритикале селекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко; озимые - Глеб, Пахарь, Гимн, яровые - Тимур и Орден. Выбраны три срока посева: 5-7 октября (1-я декада), 15 октября (2-я декада), 25 октября (3-я декада), и три нормы высева: 2 млн/га, 3 млн/га, 5 млн/га.

В соответствии с постановленной целью диссертационной работы нами будут решаться следующие задачи: выявление закономерности формирования потенциала урожайности разных генотипов (озимых и яровых) в подзимнем посеве в зависимости от природных факторов Республики Адыгея. Изучение основных количественных признаков структуры зерновой продуктивности и характер корреляционных связей между ними у современных сортов тритикале. Изучение и обоснование особенностей роста и развития сортов тритикале разных генотипов в подзимнем посеве, обоснование нормы реакции изучаемых генотипов на сроки и нормы высева и подготовка рекомендаций производству при выращивании тритикале на семена. Оценить технологические качества зерна, пригодность использования муки из зерна изучаемых сортов тритикале в хлебопечении. Определить биоэнергетическую и экономическую эффективность сортов разных генотипов.

Характеристика сортов тритикале, взятых для изучения:

Глеб – озимый, раннеспелый, короткостебельный, устойчив к полеганию, колос средней длины и плотности со средним восковым налетом, полуостистый, ости над кончиком колоса короткие, морозостойкость выше средней, на фоне искусственного заражения проявляет иммунитет к желтой ржавчине, мучнистой росе, пыльной головне, высоко устойчив к твердой головне, устойчив к септориозу. Умеренно восприимчив к бурой ржавчине. К фузариозу колоса проявляет восприимчивость, относится к группе сортов с высокой зерновой продуктивностью, рекомендуется высевать на высоком и среднем агрофоне по пропашным и колосовым предшественникам.

Пахарь – озимый, среднеспелый, короткостебельный, высота в зависимости от условий выращивания от 95 до 100 см, устойчив к полеганию, колос средней длины, среднеплотный, полностью остистый, с короткими остями, антоциановая окраска остей в фазу колошения отсутствует. Ости над кончиком колоса короткие, морозостойкость повышенная. На фоне искусственного заражения показывает иммунитет к бурой и желтой ржавчине, мучнистой росе и пыльной головне. Устойчив к септориозу и твердой головне. Умеренно восприимчив к фузариозу колоса и зерна. Относится к группе зерновых сортов с высокой зерновой продуктивностью для выращивания на высоком и среднем агрофоне. Пригоден для использования на зернофураж, зеленый корм в зеленом конвейере, для приготовления сенажа, сена, гранул, брикет

Гимн – озимый, позднеспелый, короткостебельный, высота в зависимости от условий выращивания от 105 до 115 см, устойчив к полеганию, колос длинный, среднеплотный, безостый, остевидные отростки на верхней части колоса до 3 см Лист короткий, средней ширины, со средним восковым налетом, морозостойкость и зимостойкость – высокая, на фоне искусственного заражения проявляет иммунитет к пыльной головне и мучнистой росе. Высоко устойчив к желтой ржавчине, септориозу, твердой головне. Устойчив к бурой ржавчине. Умеренно восприимчив к фузариозу колоса и стеблевой ржавчине. Относится к группе зерновых сортов с высокой зерновой продуктивностью. Пригоден для использования на зернофураж, зеленый корм в зеленом конвейере. По технологическим и хлебопекарным свойствам не выделяется. Мука может использоваться на выпечку хлеба по ржаной технологии. Предназначен для посева на среднем и низком агрофонах.

Тимур – яровой тритикале, относится к группе среднеспелых сортов, среднерослый (до 115 см), устойчивость к полеганию высокая, колос остистый, ости негрубые, средней длины, над верхушкой колоса короткие. Засухоустойчивость, жаростойкость сорта высокие. Обладает высокой интенсивностью начального роста. На фоне искусственного заражения показывает иммунитет к мучнистой росе, твердой и пыльной головне. Высоко устойчив к желтой ржавчине и септориозу. Устойчив к бурой ржавчине. Умеренно устойчив к фузариозу колоса. Потенциал продуктивности высокий.

Орден – яровой тритикале, относится к группе среднеспелых сортов, среднерослый (до 115 см), устойчивость к полеганию высокая, колос остистый, ости негрубые, средней длины, над верхушкой колоса короткие. Засухоустойчивость, жаростойкость сорта высокие. Обладает высокой интенсивностью начального роста. На фоне искусственного заражения абсолютно не поражается твердой и пыльной головней, мучнистой росой; проявляет высокую устойчивость к бурой ржавчине и септориозу; устойчив к желтой ржавчине; умеренно устойчив к фузариозу колоса. Потенциал продуктивности высокий.