

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

---

**Студенческое научное общество имени Н.И. Вавилова**

**61-я СТУДЕНЧЕСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ**



**им. Н.И. Вавилова**

**Секция «ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦИЯ И  
БИОТЕХНОЛОГИЯ»**

**19 марта 2008 г.**

**Сборник тезисов**

**Москва, 2008**

УДК 575:573.6:631.524

**Сборник тезисов участников 61 студенческой научной конференции секции «Генетика, селекция и биотехнология», состоявшейся 19 марта 2008 г. – М.: РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2008. 88 с.**

**Руководители секции:** доц. В.С. Рубец, проф. В.В. Пыльнев, проф. Е.А. Калашникова, доц. А.А. Соловьев, студ. Е.В. Поверенная, студ. И.В. Киров

**Выпуск подготовили:** проф. В.В. Пыльнев, доц. А.А. Соловьев, асс. А.Н. Князев, студ. Е.В. Поверенная, студ. И.В. Киров

В сборнике научных трудов представлены материалы 61 студенческой научной конференции секции «Генетика, селекция, биотехнология».

**ФГОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ДЛИТЕЛЬНОГО  
КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА ГЕНОМ ГОРОХА  
(*Pisum sativum L.*)**

**А.В. Алешин**

Кафедра генетики Московского государственного университета им.  
М. В. Ломоносова

Научные руководители – **С.А. Гостимский**, д.б.н., профессор;  
**З.Г. Кокаева**, к.б.н., научный сотрудник

За последние годы было получено четыре последовательных поколения двух генетически маркированных линий карликового гороха (*Pisum sativum L.*), выращенных в течение полного цикла онтогенеза в космической оранжерее «Лада» на борту Российского Сегмента Международной космической станции (РС МКС). Одним из приоритетных направлений на настоящем этапе при исследовании растений в условиях космического полета становится изучение генетических последствий длительного культивирования растений в космосе. Для обнаружения молекулярно-генетических изменений использовали 2 системы ПЦР – анализа: 10 SSLP ((Simple Sequence Length Polymorphism) - и 7 IRAP (Inter-Retrotransposon Amplification Polymorphism) - праймеров. В работе было исследовано 28 растений линии L-131 и 12 растений линии L-102, в том числе 10 и 7 контрольных растений каждой линии соответственно. Анализ полученных SSLP-фрагментов в индивидуальных контрольных растениях показал, что линия 131 однородна по всем исследованным маркерам, а линия 102 проявила внутрелинейный полиморфизм по 20% SSR-маркерам. Присутствие этих фрагментов в опытных растениях совпадает с контролем. Данные маркеры были исключены из исследования изменчивости. Сравнение спектров опытных и контрольных растений по маркерам, мономорфным в контроле, выявило отсутствие видимых отличий. Анализ спектров показал, что в каждом опытном растении амплифицируется ожидаемый фрагмент, при этом появление новых фрагментов не наблюдается. При IRAP-анализе с праймером Trp 3 было выявлено отличие между “космическими” и контрольными растениями. Было обнаружено отсутствие фрагмента 500 н.п. у растений 2-4-го космического поколения. В настоящее время проводится молекулярно-генетическое исследование данного фрагмента, его клонирование и секвенирование. Проведенное исследование показало, что влияние условий космического полета на уровень изменчивости генома гороха может быть обнаружено при данном объеме исследований.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 07-04-00652).

## ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА *IN VITRO*

**А.З. Багдалова**

Саратовский государственный аграрный университет  
им. Н.И. Вавилова

**Научный руководитель – О.В. Ткаченко, доцент**

Внедрение в сельское хозяйство высоких технологий, основанных на последних достижениях биотехнологии способно качественно изменить ситуацию в агросфере. Клеточная биотехнология и биоинженерия ООН объявлены важнейшими научными и производственными приоритетами XXI века. С помощью биотехнологии можно значительно сократить затраты на создание высокоурожайных форм и сортов растений. В селекции сельскохозяйственных культур, в том числе подсолнечника все большее значение приобретают биотехнологические методы и приемы, такие как культуры соматических клеток и тканей *in vitro*. Наибольшее распространение получили методы эмбриокультуры зародышей отдаленных гибридов, клеточной селекции на устойчивость к возбудителям болезней и абиотическим стрессам, а также генетическая трансформация клеток и тканей подсолнечника. Практическое использование этих методов сдерживается отсутствием универсальной и эффективной технологией культивирования клеток и регенерации растений *in vitro*.

**Целью данной работы** являлось изучение влияния генотипа экспланта и гормонального состава питательной среды на каллусогенез у подсолнечника. В качестве материала для исследований использовали пять сортов подсолнечника: ЮВ-28Б, Саратовский 82, Саратовский 85, Скороспелый 87, Саратовский 20.

Семена подсолнечника очищали от лузги, стерилизовали в хлорсодержащем растворе в течение 7 мин. Зрелые зародыши вычленили из семян в стерильных условиях ламинар-бокса и инокулировали на питательную среду Мурасиге-Скуга без гормонов. Полученные культуры переносили на стеллаж с освещением для получения стерильных проростков. Гипокотили стерильных проростков делили на фрагменты размером 3-5 мм в стерильных условиях ламинар-бокса и инокулировали на питательную среду Мурасиге-Скуга с двумя вариантами фитогормонов: 1) 2,4Д 4 мг/л в сочетании с 6БАП 1 мг/л; 2) 6БАП в концентрации 6 мг/л и ИУК – 0,5 мг/л. Тканевые культуры выдерживали в термостате в течение 7 дней, затем переносили на стеллаж с освещением. Кроме изучения влияния фитогормонов оценивали эффективность образования каллуса, в зависимости от ориентации экспланта на питательной среде.

Фрагменты гипокотилия помещали на поверхность питательной среды в горизонтальном и вертикальном положении. На горизонтально ориентированных эксплантах делали поперечные насечки скальпелем, кусочки побега естественно направленные помещали без насечек.

Анализ полученных культур показал, что каллус образуется у всех генотипов с разной эффективностью. На первом варианте среды отмечается низкая эффективность каллусогенеза. Каллус образовывался на эксплантах в единичных случаях, при этом величина каллуса не превышала 2мм в диаметре. Наблюдался некроз тканей, они были не пригодны для дальнейшей регенерации растений. Тем не менее, у сортов ЮВ-28Б и Скороспелый 87 выход каллуса в 2-3 раза превышал соответствующие показатели остальных сортов. На втором варианте среды значительно лучше каллус образовывался у сорта Саратовский 20 (выход каллуса составляет 80%), а также у сорта Скороспелый 87 (выход каллуса составляет 79%). У сорта ЮВ-28Б (выход каллуса составляет 44%), что значительно хуже, чем у остальных сортов на этом варианте среды, а также чем у сорта ЮВ-28Б на первом варианте среды.

Среди всех образовавшихся каллусов выделяли несколько типов: 1) крупные – более 1см в диаметре, рыхлые, оводненные; 2) крупные – до 1см в диаметре неоднородные, окрашенные; 3) мелкие до 0,5см в диаметре плотные зеленые каллусы.

У сорта ЮВ-28Б при значительно меньшей способности к образованию каллуса формировались только мелкие плотные зеленые каллусы. У остальных 4 сортов разные типы каллусов образовались примерно с одинаковой частотой.

Все полученные каллусы были перенесены на среду Р8 для регенерации растений. Отмечалось образование корешков из плотных участков каллусов, но регенерация растений ни в одном случае не произошла.

Изучение влияния ориентации фрагментов гипокотилей на питательной среде показало, что для генотипов Саратовский 85, Скороспелый 87 и Саратовский 20 не имеет принципиального значения положения экспланта на питательной среде. Для генотипа ЮВ-28Б достоверно лучшие результаты по каллусогенезу получены при горизонтальной ориентации фрагментов гипокотилей на среде, а у сорта Саратовский 82 – при вертикальной ориентации. Можно предположить, что для большинства генотипов более приемлемой является горизонтальная ориентация экспланта на питательной среде, как более технологически удобная.

**Вывод.** Таким образом, установлено, что среди пяти сортов подсолнечника лучшей способностью к каллусогенезу на различных средах обладает сорт Скороспелый 87. Каллус подсолнечника на фрагментах гипокотилия, возможно, получать достаточно эффективно

на питательной среде содержащей 6БАП – 6 мг/л в сочетании с ИУК – 0,5 мг/л. Для регенерации полученных каллусов необходимо подбирать фитогормональный состав среды и условия культивирования.

## АНАТОМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ СТЕБЛЯ ГЕКСАПЛОИДНОЙ ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ В СВЯЗИ С ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КОЛОСА

**М.С. Баженов**

Кафедра селекции и семеноводства полевых культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Научные руководители – **Е.А. Комарова**, к.б.н., н.с.;

**В.С. Рубец**, к.б.н., доцент

Тритикале представляет собой амфидиплоидный гибрид между пшеницей и рожью [2]. Это сравнительно новая сельскохозяйственная культура, и поэтому она нуждается в подробном, всестороннем изучении с целью повышения урожайности и качества её продукции.

В стебле тритикале осуществляется распределение продуктов фотосинтеза между различными органами, которые их потребляют. Точные знания механизмов, регулирующих распределение ассимилятов, особенно их поступление в семена, плоды, запасающие органы, важно для контролирования продуктивности растений [3].



*Рис. 1. Устройство стенки соломины*

Исследования второго сверху междоузлия проводились мною самостоятельно, данные о продуктивности колоса и анатомическом строении подколосового и второго снизу (от узла кушения) междоузлия были предоставлены научным сотрудником Е.А. Комаровой.

### **Методика.**

Исследовались 10 сортов гексаплоидной озимой

тритикале, высеянных на одном поле в 2004 г (Водолей, Талисман, Антей, Виктор, линия 21406/96, Кентавр, Гармония, АДМ-9, Стрельна 11 и Никлап). Опыт имел три повторения, образцы размещались

систематически. На каждой делянке в фазу полного цветения подбирались пары сходных растений по высоте главного стебля, длине колоса, числу колосков и помечались этикетками. Одно растение из каждой пары срезалось в ту же фазу, его междуузлия фиксировались в спирте. Другое растение оставлялось в поле до полной спелости и использовалось для анализа структуры продуктивности главного колоса. С делянки было взято по 5 пар растений (для каждого сорта – 15 пар).

Из середины каждого зафиксированного в спирте междуузлия вырезался кусочек, из которого на ручном микротоме изготавливались тонкие поперечные срезы. Срезы окрашивались в различных красителях.

Под микроскопом при увеличении примерно в 100 раз с использованием окуляр-микрометра определялись размеры различных элементов анатомического строения, подсчитывалось число проводящих пучков, островков хлоренхимы (Рис. 1). Площади поперечного сечения различных структур рассчитывались на основе предположений об их геометрической форме.

**Результаты.** Проводящие пучки паренхимы, или крупные пучки, являются листовыми следами, то есть продолжениями проводящих пучков листа. Из листа они внедряются в нижележащее междуузлие, а также могут проникать в междуузлия, расположенные ниже [1]. Проводящие пучки первичной коры, или мелкие пучки, являются собственными пучками стебля. В ходе исследования установлено, что из всех параметров анатомического строения, именно суммарная площадь поперечного сечения проводящих пучков паренхимы имеет наиболее тесную положительную корреляцию с массой зёрен в колосе. Причём, чем ниже расположено междуузлие, тем выше коэффициент корреляции (табл. 1).

Таблица 1  
Коэффициенты корреляции массы зерна в колосе с суммарной площадью пучков

	В подколосовом	Во втором сверху	Во втором снизу
Пучков паренхимы	0,653*	0,694*	0,780**
Всех пучков	0,590	0,629	0,778**

\* - значимы на 95% уровне, \*\* - значимы на 99% уровне.

Наименьший коэффициент корреляции имеется с проводящими пучками подколосового междуузлия. Кроме того, площадь поперечного сечения проводящих пучков в нём наименьшая по сравнению с другими междуузлиями. Из этого можно сделать вывод, что проводящая система, сама по себе, не накладывает

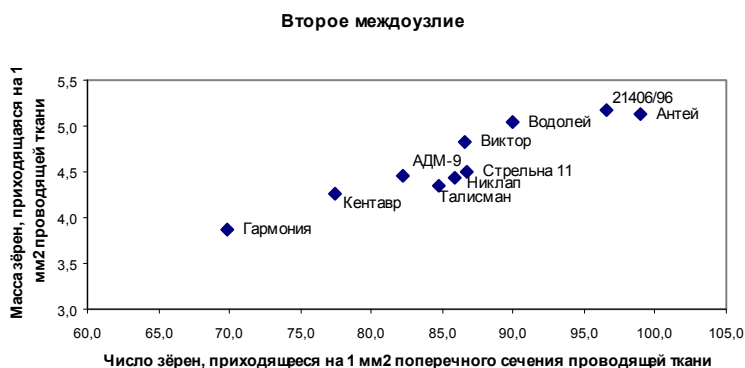
ограничения на импорт продуктов фотосинтеза в колос, и это согласуется с данными других исследований [4].

Так как проводящие пучки паренхимы – это продолжения пучков листьев, то можно предположить, что суммарная площадь их поперечного сечения является косвенным показателем уровня развития фотосинтетического аппарата побега. Этим можно объяснить более тесную связь степени развития проводящих тканей нижних междоузлий с массой зерна в колосе.

Если рассматривать отдельно второе сверху междоузлие, то можно заметить, что число колосков в колосе обнаруживает тесную положительную корреляцию с числом проводящих пучков паренхимы ( $r=0,75^*$ ) и отрицательную корреляцию с толщиной стенки соломины ( $r=-0,64^*$ ).

Если рассчитать количество зёрен и их массу, приходящуюся на 1 мм<sup>2</sup> поперечного сечения проводящих тканей 2-го сверху междоузлия для 10 сортов, то получается следующая картина (диаграмма 1).

Диаграмма 1



Судя по этой диаграмме можно сделать вывод, что существует некий предел массы зерна, которую может обеспечить 1 мм<sup>2</sup> поперечного сечения проводящих пучков. А также, что такие сорта, как 21406/96, Антей, Водолей и Виктор более полно используют потенциал своего фотосинтетического аппарата, чем Гармония, Никлап и другие. Данная картина наблюдается только для второго сверху междоузлия.

В данной группе сортов можно заметить тенденцию к повышению продуктивности колоса с увеличением длины стебля. Исключением является сорт Виктор, который при средней длине стебля имеет самую высокую продуктивность колоса (3,31 г).



#### **Выводы:**

- Проводящая система стебля, по-видимому, не ограничивает поступление ассимилятов в колос.
- Суммарная площадь пучков паренхимы в междоузлии характеризует продукционный потенциал стебля, а соотношение между массой зерна в колосе и площадью пучков паренхимы второго междоузлия может служить характеристикой эффективности его использования.
- Короткостебельность может способствовать повышению продуктивности только в том случае, если она обусловлена пониженной активностью интеркалярных меристем, а не пропорциональным уменьшением всех частей растения тритикале.

#### **Литература**

1. Лазаревич С.В. Эволюция анатомического строения стебля пшеницы. – Мн.: Бел. Изд. Тов-о «Хата», 1999. – 296 с.
2. Ригин Б.В., Орлова И.Н. Пшенично-ржаные амфидиплоиды. – Л.: "Колос", 1977. – 279с.
3. Физиология растений: Учебник./ Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. Изд. 2-е, перераб. и доп. - М.: Высш. шк., 2006. - 742с.
4. Частная физиология полевых культур / Под ред. Е.И. Кошкина. – М.: КолосС, 2005. – 344 с.

### **ТЕХНОЛОГИЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ РОЗЫ, *ROSA X*, В ПРОМЫШЛЕННОМ ЦВЕТОВОДСТВЕ**

**А.А. Балакина**

Кафедра сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА имени  
К.А. Тимирязева

Научный руководитель – **О.Ю. Миронова**, к.б.н., доцент

В настоящее время постоянно увеличивается спрос на декоративно-цветочные культуры, которые используются в озеленении, ландшафтном дизайне, при создании парков и садов. В связи с этим актуальной становится проблема сокращения импорта посадочного материала и разработка технологий массового размножения цветочных культур у нас в стране. Низкокачественный и зараженный патогенами посадочный материал не только теряет свои декоративные качества, но зачастую становится источником распространения опасных болезней и вредителей. Проблема может быть успешно решена методом клонального микроразмножения, который позволяет не только получить качественный посадочный материал, но и дает возможность изучить морфогенетические и

физиологические особенности роста и развития растений в культуре *in vitro*.

Растения одного рода и разные сорта могут в значительной степени отличаться уровнем тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом, что вызывает необходимость дифференцированного подхода к применению и совершенствованию технологий клонального микроразмножения. Выявление оптимальных условий роста и развития растений в культуре *in vitro* позволяет не только реализовать высокие коэффициенты размножения, получить адаптированные к условиям *in vivo* растения-регенеранты, но и снизить материальные затраты на химические реактивы, гормоны, питательные среды.

Метод клонального микроразмножения роз нашел широкое применение в мире, однако разработанные технологии не являются универсальными для всех групп сортов и видов растений рода *Rosa*. Сведения в литературе часто противоречивы, в большинстве работ объектом исследований является только один сорт, что не дает возможности использовать полученные данные при размножении других сортов, а также выявить общие закономерности развития близких групп и видов.

Целью работы является разработка новых и усовершенствование существующих технологий клонального микроразмножения растений рода *Rosa*, а также выявление особенностей роста и развития растений в культуре *in vitro*. Достижение этой цели связано с решением следующих задач: разработка методики введения в культуру *in vitro* различных эксплантов и изучение зависимости прямой регенерации от типа экспланта; изучение роста и развития растений на разных этапах клонального микроразмножения; подбор оптимальных питательных сред и условий культивирования эксплантов на разных этапах клонального микроразмножения; изучение факторов, влияющих на процессы ризогенеза; разработка эффективных способов адаптации растений-регенерантов к почвенным условиям; сравнительная оценка вегетативного и клонального микроразмножения роз.

Объектами исследований являлись растения рода *Rosa* X. В стерильную культуру были введены наиболее популярные сорта чайно-гибридных (*R. hybrid tea*), флорибундных (*R. floribunda*), плетистых (*R. Rambler* и *R. large-flowered climber*), полуплетистых (*R. shrub*) роз.

Были выявлены зависимости активности побегообразования на первичном экспланте, поражения внутренними и внешними инфекциями, интенсивности выделения фенолов от периода развития материнского растения, состава и консистенции питательной среды и размера первичного экспланта. Был проведен сравнительный анализ

скорости роста побегов у различных групп сортов роз на различных этапах клонального микроразмножения. В результате проведенных исследований были определены оптимальные условия для ризогенеза и влияние на этот процесс интенсивности освещения, температуры, состава питательной среды и размера экспланта. Особое внимание в работе уделялось ускорению процесса клонального микроразмножения, что позволяет не только снизить материальные затраты, но и получить растения-регенеранты быстро проходящие период адаптации к почвенным условиям.

Питательная среда была приготовлена на основе сред MS и WPM. В качестве регуляторов роста использовали фитогормоны: ИУК, ИМК, БАП, ЦЕТОДЕФ в различных концентрациях. Было показано, что для введения в культуру *in vitro* наиболее подходят черенки, отобранные в период с начала активного роста до цветения, что связано не только с тем, что в этот период они имеют наибольшую активность роста, но и с наименьшей пораженностью внутренними инфекциями, а также с низким содержанием фенолов. Однако оптимальные питательные среды для различных групп сортов существенно различались как по концентрации питательных веществ и гормонов, так и по консистенции. Например, плетистые и полуплетистые розы проявили слабую чувствительность к выбору консистенции и состава среды, в то время как для чайно-гибридных роз положительные результаты были получены только на твердой среде.

В результате проведенных исследований по каждой группе роз были определены оптимальные условия культивирования эксплантов на всех этапах клонального микроразмножения. Проведенные исследования показывают, что применяемая методика может быть перспективной для ее использования в промышленном цветоводстве.

## **ВЛИЯНИЕ ТЕПЛООВОГО ШОКА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПЛАСТОМА ЯЧМЕНЯ**

**Д.А. Барташевич**

Институт физиологии растений имени К.А.Тимирязева РАН

Научные руководители – **В.В. Кузнецов**, д.б.н.;

**Е.А. Лысенко**, к.б.н.; **Я.О. Зубо**, к.б.н.

Повышенная температура является одним из наиболее распространенных неблагоприятных факторов, с которыми сталкиваются растения. Тепловой шок угнетает многие процессы, в том числе, приводит к повреждению фотосинтетического аппарата.

Для адаптации фотосинтетического аппарата к повышенной температуре растения используют широкий спектр молекулярных реакций. Нами было изучено, каким образом в условиях теплового шока изменяется транскрипция генов пластома, кодирующих фотосинтетический комплекс и пластидный аппарат экспрессии генов. Изучение транскрипции проводили на первых листьях 7-дневных проростков ячменя. Обработку повышенной температурой (40<sup>0</sup>С) проводили *in vivo*, в течение 1,5 и 3 ч.

Среди фотосинтетических генов наибольший интерес вызывает реакция генов, кодирующих апопротеины реакционных центров ФС I и ФС II (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbD*): транскрипция этих генов значительно усиливалась через 1,5 ч. после начала воздействия повышенной температуры, а еще через 1,5 ч. уменьшалась, возвращаясь к контрольному уровню. После 3 ч. воздействия теплового шока наблюдали активацию транскрипции генов, кодирующих субъединицы НАД(Ф)-Н пластохинон-оксидоредуктазы, рибосомных белков и генов мультисубъединичной РНК-полимеразы (РЕР). Также наблюдалась тенденция к активации гена *clpP1* – единственного пластомного гена, кодирующего протеазу. Наблюдаемая активация транскрипции распространяется не на все гены электрон-транспортной цепи фотосинтетических мембран. Гены, кодирующие периферийные белки ФС II, не проявили подобной реакции: их транскрипция практически не изменяется. Вероятно, активация транскрипции генов белков реакционных центров фотосистем является одной из самых первых реакций растений, направленных на поддержание активности фотосинтетического аппарата при гипертермии. Полученные данные позволяют предполагать, что активация транскрипции затрагивает только гены белков реакционных центров фотосистем и, возможно, небольшое число других генов, продукты которых сильно повреждаются при тепловом шоке.

Активация транскрипции генов *rpl23-rpl2* и *rps16*, наблюдаемая в интактных растениях и изолированных хлоропластах, позволяет предполагать, что в условиях теплового шока изменяются свойства транскрипционных факторов внутри хлоропластов, в связи с этим можно сделать вывод о наличии внутри хлоропластов механизма регуляции активности транскрипционного аппарата и/или транскрипционных факторов.

Для того чтобы понять роль активации транскрипции пластомных генов, была изучена динамика стационарного уровня мРНК генов *psbA* и *rbcL*. Уровень мРНК гена *rbcL*, для которого не обнаружена активация транскрипции, не изменялся через 1,5 ч. и резко падал через 3 ч. теплового шока. Уровень мРНК гена *psbA*, для которого обнаружена активация транскрипции, не изменяется в

течение 3 ч. По-видимому, усиление транскрипции некоторых генов пластома направлено на поддержание стационарного уровня мРНК этих генов в условиях теплового шока.

## ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДОПОЛНЕННЫХ ЛИНИЙ КУЛЬТУРНОГО ТОМАТА С ХРОМОСОМОЙ XI *S. lycopersicoides*

**А.А. Бессонова**

Кафедра генетики РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Научный руководитель – **А.Н. Князев** к.б.н., ассистент

Генетическое усовершенствование культурного томата возможно при интрогрессии признаков от дикорастущих родственных видов. Однако получение плодовых гибридов с ними зачастую затруднено. Преодолеть барьеры нескрещиваемости при интрогрессии возможно при использовании дополненных линий с хромосомами диких видов. В настоящее время созданы серии дополненных линий содержащих хромосомы *S. lycopersicoides*. Этот вид обладает уникальными признаками, включая холодостойкость и устойчивость к некоторым заболеваниям. Мы исследовали дополненные линии с XI хромосомой *S. lycopersicoides*, в которой локализованы гены устойчивости к *Botrytis cinerea*, *Cladosporium fulvum* и к *Stemphylium*.

Цель исследования заключалась в выявлении дополненных растений томата с хромосомами XI *S. lycopersicoides* и их цитологическая характеристика. В работе использовали семена от самоопыления дисомно дополненного растения, выделенного из расщепляющейся популяции, любезно предоставленной R. Chetelat (Центр генетических ресурсов томата, США).

Подсчет числа хромосом у 24 растений показал наличие одной дополнительной хромосомы у 2 растений и двух хромосом – у 3 растений. Частота таких растений составила моносомно дополненных (МДР) – 8,3% и дисомно дополненных (ДДР) – 12,5%. Эти результаты свидетельствуют, что ДДР являются цитологически нестабильными и расщепляются по числу хромосом. В то же время присутствие дисомно дополненных растений свидетельствует о передаче чужеродных хромосом, не только через яйцеклетки, но и через пыльцу.

Анализ мейотического деления 25 и 26 хромосомных растений выявил асинхронность делений, которая не наблюдалась у исходной формы. Так у МДР половина материнских клеток пыльцы находилась на стадии анафазы I, а остальные в других стадиях

деления. Аналогичные результаты получены и у ДДР, где на стадии метафазы I находились 56,4% МКП, остальные – на других стадиях.

В диакинезе у моносомно дополненных растений 28,9% МКП имели 12 бивалентов и 1 унивалент. У ДДР 31,1% МКП имели 13 бивалентов. В остальных клетках присутствие чужеродной хромосомы приводило к нарушениям в процессе конъюгации.

В анафазе I выявлен высокий процент клеток с нарушениями в виде отставания хромосом и мостов. У МДР клеток с отставанием 28,4%, с мостами 14,8%. У ДДР соответственно 17,9 и 22,0.

При образовании тетрад у МДР в 6,3% МКП наблюдали триады и в 7,2% клеток – пентады. У ДДР в 2,3% МКП – триады и в 5,6% пентады. Нарушения на разных стадиях мейоза приводят к низкой фертильности пыльцы.

Цитологический анализ линий культурного томата, дополненных хромосомой XI *S. lycopersicoides*, выявил значительные нарушения в мейотическом делении МДР и ДДР, что является фактором стерилизации пыльцы и снижении репродуктивной способности.

## **АНАЛИЗ СЕМЕНОВОДСТВА ЯРОВЫХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ И ПУТИ ЕГО УЛУЧШЕНИЯ**

**Д.М. Бочкова**

РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Научные руководители – **А.Н. Березкин**, д.б.н., профессор;

**А.М. Малько**, д.с.-х.н. (ФГУ «Россельхозцентр РФ»)

При анализе данных по используемым семенам определенных сортов ярового ячменя можно с большой долей вероятности судить о занимаемых ими площадях. Так, основными сортами являются Нутанс 642 (год включения в Госреестр – 1994), Донецкий 8 (год включения в Госреестр – 1978). В балансе семян на 2006 г. на долю первого сорта приходилось 54%, второго сорта – 30%. За последние несколько лет сорт Нутанс 642 вышел в лидеры, а сорт Донецкий 8 очень сильно снизил площади. В последние годы набирают обороты сорта Лакомбе и Нутанс 553.

Представляют большой интерес данные по репродукционному составу высеянных семян яровых зерновых и зернобобовых культур. В 2003 г. из общего количества проведенных и высеянных семян 250,3 тыс. т элиты использовано 9,8 тыс. т. (3,9%), I-IV репродукций – 190,7 тыс. т. (76,2%), массовых репродукций – 49,8 тыс. т. (19,9%). Положение со средними показателями по Приволжскому федеральному округу значительно хуже, где высев

семян массовых репродукций составил 37,6%. Однако, показатели по использованию большого процента семян массовых репродукций в хозяйствах Саратовской области говорят о больших резервах улучшения семеноводства в этом регионе.

В 2004 г. процент высеянных элитных семян в области составил 4,9; I-IV репродукций – 76,4; массовых репродукций – 18,7 (235,1 тыс. т. – общее количество семян; 11,5 тыс. т. семян элиты; 179,6 тыс. т. - I-IV репродукций и 44 тыс. т. – семян массовых репродукций). При этом наблюдается определенная тенденция увеличения процента элитных семян и снижения процента семян массовых репродукций.

Общие выводы, которые можно сделать из полученных результатов, следующие:

1. В Саратовской области наблюдается закономерность, что в сельскохозяйственном производстве наибольшую площадь занимает небольшое число сортов;

2. В данном регионе последней репродукцией, используемой в семеноводстве, должна быть третья. Когда семена массовых репродукций в общем обороте семян занимают 19%, это говорит о больших резервах роста урожайности и качества продукции.

### **ПОЛИМОРФИЗМ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ У ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ РАЗНЫХ ЛЕТ УРОЖАЯ**

**С.В. Голубцов**

Кафедры генетики и селекции и семеноводства полевых культур

Научные руководители – **В.В. Пыльнев**, д.б.н., профессор;

**В.Н. Игонин**, к.с.-х.н., научный сотрудник; **А.А. Соловьев**, д.б.н.,  
доцент

Анализ запасных белков семян злаковых широко используются в семеноводческой работе и селекционно-генетических исследованиях. Он позволяет надежно идентифицировать сорта, а также вести целенаправленную селекцию. Особый интерес представляет изучение запасных белков тритикале вследствие с эволюционной молодостью и полигеномной природой этой культуры. В связи с особенностями размножения тритикале в процессе семеноводства также желателен контроль полиморфизма запасных белков.

В исследовании взяты семена трех лет урожая (2005, 2006 и 2007 гг.) сортов Александр, Стрельна 11, Гармония и Валентин.

Анализ выполнен на базе Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Анализ спектров запасных белков показал, что сорта Александр и Стрельна 11 имеют одинаковый основной биотип, что объясняется родственным происхождением этих сортов. Сорт Александр создан методом индивидуального отбора из сорта Стрельна 11. В то же время доля этого биотипа варьирует. У сорта Стрельна 11 она составляет 81%, у сорта Александра – 96% (семена урожая 2007 года).

Анализ семян урожая 2007 г. показал, что сорт Стрельна 11 представлен 15 биотипами с частотой преобладающего 81%. Остальные 14 биотипов встречаются с частотами от 1 до 3%. Сорт Александр представлен всего 3 биотипами. Частота преобладающего – 96%, двух остальных – по 2%. Присутствие одного основного биотипа у этих сортов объясняется созданием сорта Александр отбором из сорта Стрельна 11.

Сравнительный анализ спектров запасных белков в течение трех лет испытаний показал, что частота преобладающего биотипа у сорта Стрельна 11 снижается, а само число биотипов увеличивается. Так, в семенах урожая 2005 г. выявлено всего 3 биотипа с частотой основного 94%, в урожае 2006 года – 3 биотипа с частотой основного 86%, в урожае 2007 года – 15 биотипов и частотой основного биотипа 81%.

Другая группа родственных сортов – Гармония и Валентин (сорт Валентин создан методом индивидуального отбора из сорта Гармония) так же характеризуются идентичным спектром преобладающего биотипа, составляющего в 2007 года 61 и 59 % соответственно. У сорта Гармония выявлено 5 биотипов (частоты: 61, 21, 9,6, 3%), у Валентина – 9, с частотой 3-х преобладающих – 59, 22, 9%, остальные биотипы представлены частотами от 1 до 2%. Анализ семян сорта Гармония трех лет урожая показал сходные результаты, с полученными на сорте Стрельна 11. В 2005 г. – 1 биотип, 100%. 2006 – 2 биотипа, 98%. 2007 год – 5 биотипов, с частотами преобладающих биотипов 61, 21, 9%.

Полученные данные свидетельствуют, что при размножении сортов тритикале наблюдается снижение частоты преобладающего биотипа. Причинами этого могут являться переопыление в связи с недостаточной пространственной изоляцией, расщепление, механическое засорение. Тщательное изучение причин изменения биотипического состава у тритикале может помочь разработать регламенты семеноводства этой культуры и способствовать получению семян с высокой сортовой чистотой.



## **МЕЛАФЕН – НАНОРЕГУЛЯТОР РОСТА, ВЛИЯЮЩИЙ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ПЛАСТОМА ПРИ ДЕЭТИОЛЯЦИИ**

**В.А. Гущин, В.А. Корнеева, Е.В. Филиппенко, Д.А. Барташевич,  
П.В. Кузьменков, Н.К., Зубкова**  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН  
Научные руководители – **А.К. Кравцов**, аспирант;  
**Я.О. Зубо**, к.б.н.

Деэтиоляция – процесс перехода растительного организма с гетеротрофного питания за счет запасов семени на автотрофное питание органическими веществами, образующимися в процессе фотосинтеза. Изучение этого этапа жизни растения, чрезвычайно важно, так как именно от него во многом зависит качество и, что не менее важно, количество будущего урожая. Задержка наступления деэтиоляции приводит к необратимым последствиям. Ранее нами было показано, что если проросток ячменя находится более 9 дней (после прорастания зерновки) без освещения, то наступает необратимая этиоляция, когда образование хлорофилла и начало фотосинтеза становится невозможным из-за очень слабой интенсивности транскрипции многих генов (Кравцов, 2007). Возможно, существуют способы активации экспрессии генов пластома в ходе деэтиоляции. Несомненно, в этом процессе важную роль играет свет, фитогормоны и другие регуляторы роста.

В 2000 году синтезирован мелафен, препарат нового поколения, действующий как регулятор роста растений. Он представляет собой меламиновую соль бис(оксиметил) фосфиновой кислоты, которая получается в одну стадию с высоким выходом из промышленно доступных продуктов (патент РФ №2158735).

Мелафен – регулятор роста, действующий на растение в наноконцентрациях, он хорошо растворим в воде, стабилен, прост в применении и экологически безопасен (Загоскина и др., 2007; Фаттахов и др., 2001). Ранее было установлено, что предпосевная обработка семян значительного числа с.-х. культур мелафеном в концентрациях  $3 \times 10^{-10}\%$  -  $3 \times 10^{-9}\%$  приводит к увеличению урожайности на 12-18% при одновременном улучшении качества и питательной ценности получаемой продукции. Такая прибавка, возможно, обеспечивалась повышением энергии прорастания семян на 5-25%, что могло привести к более ранней деэтиоляции.

В связи с этим важно было изучить действие мелафена на транскрипцию хлоропластных генов в процессе деэтиоляции.

В первую очередь мы оценили динамику накопления хлорофилла в листьях шестидневных деэтиолированных проростков

ячменя, так как это является хорошим косвенным показателем влияния на фотосинтетический аппарат и, возможно, на транскрипцию хлоропластных генов. Результаты показали, что наиболее заметное влияние мелафена ( $10^{-8}$  М) на накопление хлорофилла наблюдалось через 6-9 часов после начала экспозиции на свету листьев, отделенных от шести дневных этиолированных растений ячменя.

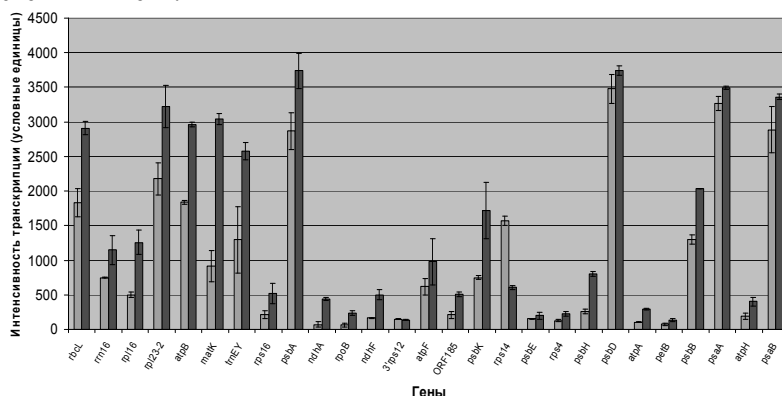


Рисунок 1. Влияние мелафена на интенсивность транскрипции генов пластома в ходе деэтиоляции 6-ти дневных листьев ячменя. На оси ординат приведена интенсивность транскрипции в условных единицах. По оси абсцисс -изученные при трех часовой инкубации в растворе мелафена (темный цвет)  $10^{-8}$  М (М-3) и воде (светлый цвет) (Н-3).

Основываясь на полученных результатах, мы изучили влияние мелафена на интенсивность транскрипции хлоропластных генов шести дневных листьев ячменя в ходе деэтиоляции, используя метод *gun-on* транскрипции (Зубо и Кузнецов, 2008). Для эксперимента было выбрано 28 генов пластома, которые входят во все опероны и кодируют функционально различные белки и РНК.

Было показано (рис 1), что из 28 изученных генов, через 3 часа после начала экспозиции на свету, у 16 увеличивалась интенсивность транскрипции под действием мелафена ( $10^{-8}$  М). Возможно, именно это является одной из причин ускорения перехода проростков к фотоавтотрофному питанию.

Однако не у всех генов увеличивалась скорость транскрипции. Например, интенсивность транскрипции гена *rps14* ингибируется мелафеном и причины этого пока неизвестны.

Полученные результаты позволяют предположить, что мелафен ускоряет процесс деэтиоляции, возможно, активируя экспрессию пластидных генов на уровне транскрипции.

Поскольку формирование фотосинтетического аппарата определяется не только пластидными, но и ядерными генами, то в

будущем предстоит изучить влияние мелафена на экспрессию ядерных генов, кодирующих белки хлоропластов. Кроме того, будет изучена регуляция мелафеном экспрессии белков светового стресса, которые должны играть большую роль на первых этапах деэтиоляции растений.

## **ИЗУЧЕНИЕ МУТАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГИБРИДОВ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ В М<sub>3</sub> ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛАЗЕРНОГО КРАСНОГО СВЕТА**

**Л.Н. Двинских**

Вятская государственная сельскохозяйственная академия  
Научный руководитель – **Г.П. Дудин**, д.б.н., профессор

Метод экспериментального мутагенеза является эффективным способом создания генетического разнообразия растений. Его преимущества заключаются в возможности улучшения отдельных признаков растения без изменения остальных.

Ранее было установлено мутагенное действие на растения лазерного красного света. Данные по лазерному мутагенезу свидетельствуют об изменении наследственности растений в сторону повышения индукции форм, сочетающих высокую продуктивность с высоким качеством зерна (Усманов П.Д. и др., 1969; Володин В.Г., 1984; Дудин Г.П., 1985).

В 2005г. был заложен опыт по облучению лазерным красным светом ( $\lambda = 632,8\text{нм}$ ) с плотностью мощности  $0,1 \text{ мВт/см}^2$  и экспозицией воздействия 120 минут семян ярового ячменя сорта Луч, мутанта  $\frac{1}{4}$ , полученного путем ночного лазерного облучения из сорта Луч, формы №84 (двойной дителосомик по первой хромосоме) и 5 гибридов, полученных ранее путем скрещивания мутанта  $\frac{1}{4}$  и формы 84: 16<sup>1</sup>, 16а<sup>1</sup>, 16а<sup>2</sup>, 17<sub>1</sub>, 17а, отличающихся по длине стебля и остей. В качестве контроля выступали необлученные семена.

Во втором поколении высевались посемейно семена с главного колоса растений первого поколения с целью изучения мутагенного действия ЛКС на растения ячменя.

В 2007г. третье поколение (М<sub>3</sub>) высевалось посемейно семенами с главного колоса растений второго поколения для проверки наследования хлорофилльных и морфофизиологических изменений, выявленных в М<sub>2</sub>.

При индуцированном мутагенезе отклонения в фенотипе, выделенные в М<sub>2</sub> и которые наследуются в дальнейшем, относятся к видимым макромутациям (Шевцов В.М., 1981). По объему видимых изменений можно определить эффективность изучаемых мутагенов и

реакцию генотипа на факторы воздействия. В М<sub>3</sub> частота хлорофилльных мутантов снижается по сравнению со вторым поколением (Козаченко М.Р., 1989).

Таблица 1

Частота морфофизиологических изменений ярового ячменя

Вариант	Проанализировано семей	Частота изменений			
		М <sub>2</sub>		М <sub>3</sub>	
		абс	%	абс	%
Луч	137	0		0	0
Луч ЛКС	233	6	2,58±1,04	3	1,29±0,74
¼	117	1	0,85±0,85	0	0
¼ ЛКС	283	18	6,36±1,45**	15	5,3±1,33**
№84	89	0		0	0
№84 ЛКС	265	9	3,40±1,11*	5	1,89±0,84
16 <sup>1</sup>	131	0		0	0
16 <sup>1</sup> ЛКС	227	9	3,96±1,30*	5	2,20±0,97
16a <sup>1</sup>	135	0		0	0
16a <sup>1</sup> ЛКС	237	14	5,91±1,53**	10	4,22±1,31*
16a <sup>2</sup>	78	1	1,28±1,28	0	0
16a <sup>2</sup> ЛКС	232	19	8,19±1,80**	16	6,90±1,66**
17 <sub>1</sub>	127	1	0,79±0,79	0	0
17 <sub>1</sub> ЛКС	244	13	5,33±1,44*	5	2,05±0,91
17a	130	1	0,77±0,77	0	0
17a ЛКС	248	12	4,84±1,36*	5	2,02±0,89

**Примечание:** – уровень вероятности: \* - P > 0,95, \*\* - P > 0,99

Наибольшая частота хлорофилльных мутаций наблюдалась в вариантах № 84 ЛКС – 1,13% – 3 мутации двух типов *claroviridis* и *viridostriata* из 10 выделенных в М<sub>2</sub> изменений, ¼ ЛКС – 0,71% - 2 мутации типов *claroviridis* и *viriduloalba* из 6 изменений. В вариантах Луч ЛКС, 16<sup>1</sup> ЛКС, 17<sub>1</sub> ЛКС наследовалось по одному изменению типа *claroviridis*. В вариантах 16a<sup>1</sup>, 16a<sup>2</sup>, 17a в третьем поколении не

было выявлено хлорофилльных мутаций. Это может быть объяснено тем, что мутации произошли в плазмогенах и не наследовались в М<sub>3</sub>.

Выявленные во втором поколении морфофизиологические изменения также проверялись в следующем поколении.

Наибольшее число семей с сохранившимися изменениями выделено в вариантах 16a<sup>2</sup> ЛКС, ¼ ЛКС, 16a<sup>1</sup> ЛКС, частота мутаций их составила, соответственно, 6,9, 5,3 и 4,2 %. Наименьшая частота мутаций наблюдалась в вариантах 17<sub>1</sub> и 17a – 2,05 и 2,02%, соответственно, что указывает на более низкую восприимчивость этих генотипов к воздействию фактору. Среди различных морфофизиологических изменений, выявленных в М<sub>2</sub>, в третьем поколении сохранилось большое количество мутаций по длине стебля и незначительное число изменений, связанных со сроками созревания, общей и продуктивной кустистостью. Отсутствие мутаций по длине остей может быть связано с генетическим контролем признака большим числом генов.

Таким образом, под влиянием лазерного красного цвета возникают формы, отличные от родительских по сочетанию признаков. Степень воздействия фактора в значительной степени зависит от генотипа гибрида и проявляется различно: хлорофилльные мутации чаще появляются у мутантов 1/4, 16<sup>1</sup>, 17<sub>1</sub>, а морфофизиологические – у мутантов 16a<sup>2</sup>, 16a<sup>1</sup>. У остальных изучаемых мутантов, вероятно, изменчивость носит в основном модификационный характер и связана с реакцией генотипа на изменение внешних условий, в которых развивались растения.

#### **ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VITRO* НА СЕМЯДОЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТАХ *BRASSICA INTEGRIFOLIA***

**С.Т. Динь**

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН Научный  
руководитель – **Г.Н. Ралдугина**, к.б.н.

*Brassica integrifolia* – один из самых популярных овощей во Вьетнаме и как продукт питания занимает особое место в рационе человека. Его питательные достоинства обусловлены сбалансированным содержанием всех питательных веществ, необходимых человеку. Этот овощ также широко используется и в западном мире. Свойства *Brassica integrifolia*, как правило, улучшают традиционными методами селекции растений, основанными, главным образом, на половой гибридизации и отборе. Однако применение методов биотехнологии, в частности, методов культуры ткани может в значительной мере ускорить процесс получения новых

сортов растений, устойчивых к действию различных биотических и абиотических факторов.

Целью нашей работы было исследование способности к регенерации двух сортов *Brassica integrifolia*, так как для этого вида растения таких работ выполнено ещё очень мало.

Семена *Brassica integrifolia* сортов Tosakan (east-west seed company, Vietnam) и TG (vegetable and fruit seed company, Vietnam), стерилизовали 70% этанолом 3 мин. и 40 мин. 20% гипохлоритом натрия, затем их 5-6 раз отмывали стерильной дистиллированной водой. После этого семена высаживали на среду для прорастания семян (МС 0.5, сахароза 0.5%), помещали на сутки в темноту (температура 26°C, влажность 70%), после чего переносили в световую климокамеру (температура 23°C, влажность 70%). С 5-дневных или 7-дневных проростков срезали семядоли, высаживали на среду для каллусогенеза (МС, 3% сахароза) и помещали на 2 дня без освещения. На третий день экспланты переносили на среду для морфогенеза без АБК или в присутствии АБК (3 мг/л) с различным соотношением цитокининов (БАП) и ауксинов (НУК). Далее экспланты через 2-3 недели переносили на среду для морфогенеза без АБК и затем на безгормональную среду. Среда MS была желирована 0,7% агаром (Serva), pH 5,6-5,8. Среда для морфогенеза содержала 1% сахарозу и была дополнена разным количеством БАП и НУК в каждом варианте: D4/0 (4 мг/л БАП и 0 мг/л НУК), D4/1 (4 мг/л БАП и 1 мг/л НУК), D4/2 (4 мг/л БАП и 2 мг/л НУК), D5/1 (5 мг/л БАП и 1 мг/л НУК), D6/2 (6 мг/л БАП и 2 мг/л НУК).

Вариант среды	Сорт <b>Tosakan</b>	Питательная среда	Сорт <b>TG</b>
	Частота регенерации, %		Частота регенерации, %
D 4/0	0	D 4/0	0
D 4/0+ АБК	0	D 4/0+ АБК	0
D 4/1	1.6	D 4/1	3.1
D 4/1 + АБК	9.4	D 4/1 + АБК	4.7
D 4/2	0	D 5/1	0
D 4/2 + АБК	10.9	D 6/2	1.6

Известно, что регенерация побегов сильно зависит от ряда факторов. Это зависимость от генотипа, от возраста растения, с которого взяты экспланты, а, самое главное, от присутствия в среде культивирования определенного количества и соотношения регуляторов роста. Ни на одном из вариантов использованных сред

мы не наблюдали регенерацию на эксплантах, срезанных с 7-дневных проростков. Побегообразование мы наблюдали только на эксплантах, срезанных с 5-дневных проростков. Из данных, представленных в таблице, видно, что в отсутствие ауксина регенерации побегов не было ни у одного из сортов даже в присутствии АБК. Для обоих сортов добавление в среду культивирования АБК значительно повышало частоту регенерации. Способность к регенерации у сорта **Tosakan** больше, чем у сорта **TG**.

Таким образом, мы показали, что можно получать растения-регенеранты на семядольных эксплантах *Brassica integrifolia*. При этом способность к регенерации так же, как и у других видов растений зависит от генотипа, от присутствия в среде НУК и АБК.

## УСТОЙЧИВОСТЬ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ К ПОЛОСАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ (*DRECHSLERA GRAMINEA*)

**М.В.Дудников**

Вятская государственная сельскохозяйственная академия

Научный руководитель – **Т.К. Шешегова**

Среди множества заболеваний ячменя существенный урон производству зерна в Северо-Восточном регионе РФ наносят гельминтоспориозные пятнистости листьев: полосатая, сетчатая, темно-бурая. Среди них наиболее распространенная и вредоносная – полосатая пятнистость (*Drechslera graminea*). Болезнь проявляется уже в фазу всходов в виде желтых, а позднее коричневых полос на листьях и нарастает до колошения.

В настоящее время в производстве отсутствуют иммунные к болезни сорта, мало сортов высокоустойчивых. Селекция в этом направлении затруднена в связи с отсутствием доноров и эффективных источников признака. Поэтому поиск источников устойчивости ячменя к полосатой пятнистости является началом селекционной работы по созданию устойчивых сортов.

Исходя из вышеизложенного, целью наших исследований являлось – выявить иммунные и высокоустойчивые к полосатой пятнистости сортообразцы ячменя для селекции.

Исследования проводили на опытных участках НИИСХ Северо-Востока им Н.В. Рудницкого. Материалом исследований являлись 67 образцов ярового ячменя из коллекции ВИР и 6 перспективных сортообразцов селекции НИИСХ Северо-Востока. Изучение данного набора образцов осуществлялось в коллекционном питомнике и на фитопатологическом участке. Заражение растений *Dr. graminea* и учет развития болезни проводили по методике Н.А.

Родиной и З.Г. Ефремовой (1986 г.). Полученные экспериментальные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа по Б.А. Доспехову (1985г.), с помощью пакета программ Agros.

Изучение коллекционных образцов ярового ячменя выявило большую дифференциацию их по устойчивости и продуктивности. Поражение полосатой пятнистостью изменялось от 0 до 100 %, а уровень развития достигал 57 %, что характеризует естественный инфекционный фон как достаточно жесткий. Среди изучаемых образцов практическим иммунитетом к болезни отличались пять. Это сорта Хаджибей и Горинский из Белгородской области; Галатея и Феникс из Украины и местный сорт (к-2930) из Китая. Кроме того высокой устойчивостью (поражение не более 40%) обладали сорта отечественной селекции: Адонис, Кайзер, Зерноградец 770; линия 421 из Новосибирской области; сорта Тандем, Дина и селекционный номер 1007-99 из Кировской области, а также зарубежные сорта: Джерелло, Бадьорый, Patty, Соорер, Вросх, Соquest, Emir, Korona. Урожайность изучаемых образцов изменялась от 194 до 635 г/м<sup>2</sup>. Наибольшая урожайность отмечена у следующих: Lacombe, Ctuades, Лель, Добрый. Сочетание высокой устойчивости выявлено у Феникса и Patty.

При искусственном заражении *Dr. graminea* перспективных сортообразцов ячменя селекции НИИСХ Северо-Востока, достоверно меньшее по отношению к одному или обоим стандартам поражение выявлено у четырех: 752-96, 102-97, 92-97, 63-98 (табл.1). В контрольном варианте все образцы проявили слабую восприимчивость к болезни.

Таблица 1  
Оценка перспективных сортообразцов ячменя селекции НИИСХ Северо-Востока по устойчивости к полосатой пятнистости.

Сорт/ селекцион- ный образец (фактор А)	Контроль (без заражения)		Инфекционный фон (фактор В)			
	Поражение (распростра- нение), %	Развити е болезни, %	Пораже ние (распр- е), %	Развити е болезни, %	+/- к контролю	
					поражение (распр-е)	развитие болезни
Дина – ст.	12,5	5,5	38,1	25,5	+15,6	+20,5
Биос 1 – ст.	33,6	10,8	75,5	31,8	+31,9	+21,0
Фермер	6,7*	2,5*	#76,7*	#65,8*	+70,0	+63,3
752-96	16,7	9,2*	#33,3	17,5*	+16,6	+8,3
102-97	10,0	2,5*	#30,0	#21,7	+20,0	+19,2
351-96	20,0*	6,7*	#75,4*	#45,8*	+54,4	+39,1
92-97	19,7*	6,7*	22,8*	#18,3*	+6,1	+11,6
63-98	20,0*	13,8*	31,2	17,8*	+11,2	+4,0

\* - достоверно к стандарту Дина по фактору А при  $P \geq 0,95$

# - достоверно по фактору В при  $P \geq 0,95$



При статистической обработке экспериментальных данных выявлено различное влияние изучаемых факторов на изменчивость иммунологических признаков. Так, на распространение болезни влияние генотипа и патогена практически одинаковое (37,7% и 36,6 %). Однако по мере развития болезни вклад генотипа существенно увеличивался и составил 67,5%, а доля патогена – 7,8%. Данное обстоятельство свидетельствует об отсутствии у изучаемого генофонда факторов пассивного иммунитета к болезни, но предполагает наличие генетических и биохимических механизмов устойчивости.

Таким образом, получены предварительные данные об уровне устойчивости изучаемого генофонда ярового ячменя к полосатой пятнистости; установлен высокий вклад генотипа в развитие болезни и не значительное его влияние на поражение.

### **СТАБИЛЬНОСТЬ ЭЛЕМЕНТОВ ВСТРОЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ В ГЕНОМЕ ТРАНСГЕННОЙ ГРУШИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

**В.В. Елькова, А.С. Климентов, М.А. Митронина, Т.Н. Чалых**  
Лаборатория молекулярной диагностики и генно-инженерных  
конструкций ВНИИСБ РАСХН  
Научный руководитель – **О.Л. Воронина**, к.б.н.

В решении актуальной задачи повышения урожайности важное место занимает выведение новых сортов. Главное достоинство получения новых сортов на основе генно-инженерных методов заключается в возможности передавать определенное количество хозяйственно-ценных генов, не ориентируясь на близкородственность растений донора и реципиента.

Однако при генетической трансформации наряду с полным встраиванием наблюдается не только неполное встраивание конструкции, но и включение отдельных регуляторных элементов в геном растения. Частота встраивания элемента конструкции напрямую зависит от расстояния от точки встраивания, поэтому в большем количестве в геноме трансформированных растений накапливаются промоторные элементы. Последствиями таких событий может быть нарушение регуляции отдельных генов. Известно, что наиболее часто используемый 35S промотор, может оказывать влияние на гены растения, находящиеся на расстоянии 164 п.н. от места вставки, вызывая сверхэкспрессию генов. Поэтому актуальной задачей является оценка количества всех встроенных элементов генно-инженерных конструкций в трансформированном

растении и стабильности этих элементов при длительном культивировании.

В работе использовали растения трансформированной груши *Pyrus communis*, полученные и предоставленные В.Г. Лебедевым и С.В. Долговым (филиал ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Среди 17 растений было 16 трансгенных клонов и одно контрольное растение. Часть растений была трансформирована вторично. В обеих конструкциях, использованных для трансформации, гены (*bar*; *gus*) находились под 35S-промотором и NOS-терминатором.

В настоящей работе для количественной оценки компонентов конструкции, встроенной в геном *Pyrus communis* методом агробактериальной трансформации, мы воспользовались методом ПЦР в реальном времени в варианте TagMan. В качестве гена-референса, представленного в гаплоидном геноме одной копией, был выбран ген ферредоксина I.

Измерения и расчеты, выполненные в 2004 г., показали, что из 16 проанализированных образцов 4 содержат по 1 копии *bar*-гена на гаплоидный геном, 4 образца – по 2 копии, 3 образца – по 3, и по одному образцу содержат 4, 5, 6, 10 и 20 копий гена. Количество терминатора варьировало от 0 до 23 копий, а промотора от 1 до 63 копий.

Повторные измерения были проведены в 2007 г. Протестированные растения культивировались как в открытом грунте, так и в теплице. Все растения выдерживали проводимую регулярно обработку гербицидами, что подтверждает стабильное присутствие в геноме *bar*-гена.

Для оценки активности глюкуронидазы, кодируемой *gus*-геном, мы измеряли активность фермента в лизатах листьев трансгенных растений, используя в качестве субстрата p-Nitrophenyl-b-D-glucuronide. Фермент был активен, как в листьях трансгенных растений, выращиваемых в теплице, так и открытом грунте. В контрольных растениях активность глюкуронидазы отсутствовала.

Оценка количества 35S-промотора и NOS-терминатора показала, что за годы культивирования в большинстве растений количество копий регуляторных элементов снизилось. Особенно значимо в растении T-BO: с 63 до 10 копий 35S-промотора на гаплоидный геном. В растении T2-ES количество 35S-промотора осталось прежним.

Таким образом, при культивировании трансформированных растений груши не произошло элиминации или замолкания встроенных генов (*bar* и *gus*), но существенно снизилось количество регуляторных элементов, явившихся результатом неполного встраивания.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДИКИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСФОРМАЦИИ ПЕТУНИИ СПОСОБОМ ОПЫЛЕНИЯ- ОПЛОДОТВОРЕНИЯ С МОДИФИКАЦИЯМИ

**В.В. Елькова, Т.Н. Чалых**

Лаборатория молекулярной диагностики и генно-инженерных  
конструкций ВНИИСБ РАСХН

Научный руководитель – **О.Л. Воронина**, к.б.н.

Одним из наиболее распространенных способов трансформации растений является агробактериальная трансформация. Данный подход применяют не только для трансфекции растительных эксплантов, но и при вакуумной инфльтрации, опылении-оплодотворении в других методиках. Однако помимо затрат на культивирование и трансформацию агробактерий такой подход осложнен проблемой контаминации растений агробактериями, сопутствующей истинной трансформации.

В качестве альтернативного метода трансформации сотрудниками лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных конструкций и лаборатории генной инженерии растений ВНИИСБ РАСХН был предложен метод опыления-оплодотворения с использованием плазмидной ДНК и мультидоменного белка VLRecA. VLRecA содержит ДНК-связывающий домен и домен С-концевого сигнала ядерного транспорта из белка VirD2 агробактерий, что обеспечивает защиту ДНК от деградации нуклеазами, в большом количестве присутствующими в прорастающей пыльцевой трубке, и целевую доставку ДНК в ядро растительной клетки.

Первичное испытание методика прошла на растениях томатов. Для дальнейшей отработки и подтверждения универсальности метода нами был выбран другой объект – петуния гибридная (*Petunia hybrida*), которая широко используется как декоративное однолетнее растение и пользуется большой популярностью у цветоводов и ландшафтных дизайнеров. Работу проводили на растениях двух сортов петунии гибридной - Alderman и Rose of Heaven. Для трансформации использовали плазмиды pBa3 и pA2042. Обе плазмиды содержали последовательность гена prtII.

После определения времени прорастания пыльцы петунии было проведено опыление 282 цветков петунии гибридной. Процент образовавшихся в результате опыления коробочек с семенами был невысоким как у трансформированных растений, так и у растений, не подвергавшихся трансформации. В целом 42,55% цветков образовались коробочки с семенами.

Поскольку ген *nptII* кодирует фермент неоминифосфотрансферазу, обуславливающую устойчивость к антибиотику канамицину, первичный отбор растений поколения To повели на среде, содержащей данный антибиотик. Селективному отбору предшествовал анализ природной устойчивости растений петунии к канамицину. При концентрации антибиотика 10 мг/л в среде Мурасига и Скуга нетрансформированные растения петуний заметно отставали в росте, однако не погибали. Только увеличение концентрации канамицина до 75-100 мг/л приводило к гибели растений, поэтому селективный отбор трансформированных растений вели на канамицине в концентрации 75 и 100 мг/л.

Для количественной оценки элементов встроенных генноинженерных конструкций мы предполагали использовать ПЦР в реальном времени в варианте TagMan. Такой подход требует подбора референсного гена, присутствующего в одной копии на гаплоидный геном растения. Ранее при анализе растений трансгенной груши мы показали, что таким референсом может служить ген ферредоксина. Для доказательства универсальности референсного гена мы провели ПЦР анализ ДНК петунии с праймерами, фланкирующими фрагмент гена ферредоксина. Полученный ПЦР-продукт свидетельствовал о консервативности выбранных участков праймеров.

Поскольку для эффективной работы системы в варианте TagMan важным фактором является взаимодействие зонда с целевой ДНК, было проведено секвенирование фрагмента гена ферредоксина петунии.

Фрагмент гена ферредоксина петунии амплифицировали в ПЦР, клонировали в векторе pGEM-T Easy и секвенировали с использованием Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit с последующим электрофоретическим анализом на приборе ALF Express II (Amersham BioSciences). Сравнение последовательностей пяти клонов показало их сходство на 99-100%, что косвенным образом подтверждает присутствие в геноме петунии 1 копии гена ферредоксина на гаплоидный геном.

В настоящий момент GeneBank содержит последовательности фрагмента гена ферредоксина следующих растительных организмов: *Pyrus pyrifolia*, *Prunus persica*, *Solanum tuberosum*, гибрида *Malus x domestica* x *Malus sieversii*, *Citrus sinensis* и *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*. Анализ последовательностей позволил заключить, что идентичность фрагмента гена ферредоксина петунии составляет 93% - с фрагментом гена груши, 71% - картофеля, 60-65% - с последовательностями других организмов.

Таким образом, выбранный фрагмент гена ферредоксина может быть использован в количественном анализе в ПЦР в реальном времени в варианте TagMan.

Анализ растений, отобранных на селективной среде, показал, что только 2 из них содержат ген *gus* в одной копии, в большинстве растений копияность встроенного гена была менее одной копии на геном. При оценке количества гена *prtIII* мы получили сходные результаты. Такой итог свидетельствует о химерности полученных трансформированных растений.

Таким образом, мы можем констатировать, что использование мультидоменного белка при трансформации растений обеспечивает защиту ДНК от нуклеаз и доставку ее в растительные клетки. Однако встраивание кассеты в геном клетки не происходит до момента деления, поэтому не все клетки растений содержат копии перенесенных генов. Мы полагаем, что только трансформирование соматических клеток с последующим отбором на селективной среде и последующее выращивание растений из отобранных клеток может обеспечить получение растения, содержащего перенесенный ген во всех клетках.

## **ИТОГИ КОНКУРСНОГО ИСПЫТАНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ В УСЛОВИЯХ ЦРНЗ**

**С.Д. Жихарев**

Лаборатория селекции озимой тритикале НИИСХ ЦРНЗ  
Научные руководители – **А.Н. Березкин**, д.б.н., профессор;  
**Н.Г. Пома**, заведующий лабораторией

Урожайность современных сортов тритикале достигает 10,4...11,6 т/га. Ценное качество многих зерновых сортов этой культуры – способность сформировать высокую долю зерна в накопленной биомассе растений, выше других сельскохозяйственных культур «оплачивать» сбором зерна вносимые удобрения. Хлебопекарные качества зерна тритикале, как правило, хуже, чем у пшеницы, но по многим параметрам они превосходят аналогичные показатели ржи. Солод из ее зерна по многим показателям превосходит ячменный, и зерно тритикале уже используют в пивоварении.

По усвояемости протеина животными тритикале превосходит пшеницу, рожь и ячмень.

Благодаря быстрому росту стеблей и высокой густоте их стояния посевы тритикале прекрасно справляются с сорняками. Выращивают эту культуру и как кормовое растение. Скот охотно поедает ее зеленую массу, она пригодна для производства сенажа, травяной муки, травяных брикетов и гранул, раннего силоса. В 100 кг

зеленой массы содержится 23...30 корм. ед. и 2,3...2,7 кг переваримого протеина, что несколько выше, чем у озимой ржи и пшеницы. Она отличается повышенным содержанием сахаров и каратиноидов.

С 2004 года лаборатория селекции озимой тритикале НИИСХ ЦРНЗ занимается созданием и накоплением нового селекционного материала, позволяющего получить высокоурожайный, зимостойкий, неполегающий сорт тритикале, пригодный для использования в комбикормовой, пищевой и спиртовой промышленности.

В 2007 году в селекционных питомниках было изучено 8648 номеров, получено 207 комбинаций скрещивания и 6,6 тыс. гибридных зерен.

В конкурсном сортоиспытании 20 номеров из 48 превысили стандарт Виктор по урожайности зерна. По данным за 4 года лучшими были номера 43-2846, 80-2628, 56-2817, 8-5400 и АД 5901, которые превзошли стандарт по густоте продуктивного стеблестоя, выходу зерна, зимостойкости и устойчивости к снежной плесени. Сбор зерна с 1 м<sup>2</sup> у перечисленных тритикале составил в среднем за годы изучения 641 г., а у стандарта – 616, максимум наблюдался у номера 43-2846 и составлял 664 г. Средний балл по зимостойкости – 6,5 (st – 5,6). В случае со стандартом снежной плесенью поражалось 67 % растений, в случае с номерами – 58 %. Номера 17-5239, 8-6146, 28-6202, 2-5522, 15-5548 и 1-5896 только начали испытываться, они достаточно перспективны. Сбор зерна с 1 м<sup>2</sup> у них составил в среднем 663 г., максимум у номера 28-6202 – 678 г.

Качество зерна, муки и хлеба лучших сортов тритикале по данным конкурсного сортоиспытания следующее: по числу падения выделяются номера 56-2817 и 8-5400. По процентному содержанию клейковины в муке – 43-2846 и 8-5400. Причем хороший объемный выход хлеба имеют как сорта, имеющие довольно высокий процент клейковины в муке, так и низкий.

В контрольном питомнике выделено в конкурсное сортоиспытание 32 номера из 123, а 11 оставлено на повторное изучение. Они существенно превысили сорт Виктор по урожайности зерна, зимостойкости, меньше были поражены снежной плесенью. Девять номеров имели высоту растений ниже стандарта на 9 - 26 см. Ряд номеров в меньшей степени были поражены септориозом.

## **ИСКУССТВЕННЫЕ НЕЙРОННЫЕ СЕТИ: ТИПЫ, ФУНКЦИИ, ПРИМЕНЕНИЕ**

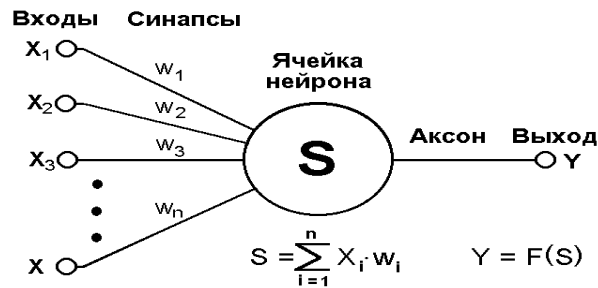
**А.Д. Золотаренко**

Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН  
Научные руководители – **В.П. Упелниек**, к.б.н., в.н.с.;  
**В.А. Пухальский**, д.б.н., г.н.с.

Искусственные нейронные сети (ИНС, Artificial neural networks) – это развивающийся класс математических моделей, ориентированных на тиражирование опыта экспертов в слабо формализованных областях, где качество принятого решения традиционно зависит от качества экспертизы. Актуальность исследований в данной области подтверждается универсальностью применений нейросетей. ИНС решают такие проблемы, как классификация и распознавание образов, аппроксимация функций, предсказание/прогноз, управление, создание экспертных систем, организация ассоциативной памяти и многие другие. Кроме того, современные нейронные сети обладают рядом дополнительных возможностей – они позволяют оценивать сравнительную важность различных видов входной информации, уменьшать ее объем без потери существенных данных, распознавать симптомы приближения критических ситуаций и т.д.

Работа с результатами, полученными в ходе биологических исследований, имеет свои особенности. Большинство данных в этой области знаний имеют описательный характер и выражаются с помощью формализмов, оценка которых нередко субъективна. В частности результаты, получаемые при анализе молекулярно-генетических маркеров (биохимические, ДНК, хромосомы), как правило, представлены в виде изображений: электрофореграмм, метафазных пластинок, фотографий и т.п. Их интерпретация – сложный, трудоемкий и субъективный процесс. В то же время нейронная сеть подходящей конфигурации способна быстро и с заданной степенью точности проанализировать и интерпретировать результаты. Поэтому исследование нейронных сетей в применении к биологии – важное и перспективное направление.

Нейронная сеть по своей структуре аналогична нервной системе организма и состоит из простейших процессорных элементов – искусственных нейронов. На вход искусственного нейрона поступает некоторое множество сигналов, каждый из которых является выходом другого нейрона. Каждый вход умножается на соответствующий вес, аналогичный синаптической силе, и все произведения суммируются, определяя уровень активации нейрона.



**Рис.1 Искусственный нейрон**

В зависимости от конфигурации и архитектуры связей выделяют несколько типов нейронных сетей – однослойный перцептрон, многослойный перцептрон, сеть Кохонена, соревновательные сети, сеть Хопфилда и так далее. Для решения той или иной проблемы можно подобрать сеть, оптимальную именно для имеющихся условий.

Процесс настройки сети включает в себя обучение, то есть поиск оптимальных значений всех переменных весовых коэффициентов. Обучение ведется на базе примеров, и может проходить как с учителем, так и без него – в зависимости от типа сети. Важно отметить, что вся информация о задаче, которую имеет сеть, содержится в наборе примеров. Поэтому качество обучения сети напрямую зависит от количества примеров в обучающей выборке, а также от того, насколько полно эти примеры описывают данную задачу.

## **ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ *TANACETUM VULGARE L.* В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

**А.А. Иванникова**

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и  
ароматических растений

Научные руководители – **О.А. Буко**, к.б.н., доцент;

**М.Ю. Грязнов**, к.б.н.

*Tanacetum vulgare* L. – перспективное многолетнее лекарственное растение, используемое в медицине России и других стран. Надземные части обладают выраженными инсектицидными и репеллентными свойствами. Растение является источником сырья для производства фитопрепаратов танацехол, танафлан, полифитохол,



сибектан, беллацехол применяемых в медицинской практике как желчегонные средства. В народной медицине это растение используют при лечении эпилепсии, головной боли, гастритах, желтухе, ломоте, холециститах, язвенной болезни желудка и других заболеваниях. Наружно промывают долго незаживающие раны, язвы, делают компрессы при подагре.

У пижмы обыкновенной лекарственным сырьем являются цветочные корзинки *Flores Tanacetii*. Товарным сырьем пижмы являются высушенные цветочные корзинки – щитковидные соцветия – цветки с цветоножкой не более 4 см. длины. Согласно ГФ-ХІ (1990) ФС 42-2482-87 основным показателем качества сырья пижмы является содержание суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот не менее 2,5% в пересчете на лютеолин.

**Целью работы** являлось изучение биологических особенностей коллекционного материала и выделение перспективных образцов для дальнейшего создания высокопродуктивных сортов пижмы обыкновенной в Московской области.

**Материал и методика:** Объектом исследований служили коллекционные образцы, полученные через экспедиции и по обменному фонду из ботанических садов и биологических учреждений РФ и зарубежных стран. Контрольным объектом являлась популяция пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), собранная в Московской области в окрестностях ВИЛАР.

Коллекционный питомник заложен на полях селекционного севооборота лаб. селекции и семеноводства ВИЛАР в 2006 году рассадой по схеме 60x30 см, по 25-35 растений на делянке.

Фенологические наблюдения за растениями осуществляли по методике И.Н. Бейдеман (1974). Отмечали следующие фазы развития: отрастание, бутонизация, цветение, созревание семян.

Биометрические учеты проводились в фазу массового цветения на 25 растениях каждой делянки. При этом измеряли высоту растений, число генеративных побегов, диаметр соцветий, число корзинок в соцветиях, диаметр корзинок. Учитывали продолжительность вегетационного периода. Для статистической обработки полученных данных использовали общепринятые методики (Доспехов, 1985).

Урожайность сырья определяли в фазу массового цветения. Для этого соцветия срезали, сушили в проветриваемых помещениях, взвешивали. Посевные качества определяли по ГОСТ Р 51096-97.

Содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот определяли в группе массового анализа ВИЛАР, по методике ФС 42-2482-87 ГФ – ХІ.

Таблица

Характеристика перспективных коллекционных образцов  
пижмы обыкновенной (2007 г.)

Номер образца (популяции) и происхождение	Продолжи- тельность вегетационного периода, сутки	Содержание флавоноидов, %	Урожайность	
			сырья, т/га	семян, кг/га
Контроль (популяция ВИЛАР)	135	3,18 ±0,14	1,61	194
467-05, Нидерланды	131	4,01±0,21	2,01	261
504-03, Польша	134	3,78±0,18	2,36	217
275-04, Франция	129	3,27±0,15	2,43	272
809-04, РФ, Якутия	120	3,44±0,16	2,25	204
700-05, Германия	118	3,52±0,19	2,20	206
НСР <sub>05</sub>		0,25	0,21	23

**Результаты:** В процессе проведенной работы из 20 коллекционных образцов были отобраны 5 номеров, превышающих по хозяйственно-ценным признакам стандарт. Лучшие коллекционные образцы пижмы обыкновенной 467-05 (Нидерланды), 504-03 (Польша), 275-04 (Франция), 700-05 (Германия) и 809-04 (РФ, Якутия) представляют интерес для дальнейшей работы и будут включены в селекционный процесс.

### ХЛОРОФИЛЛЬНЫЕ МУТАНТЫ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

**И.В. Исупова, Е.С. Кислицына**

Вятская государственная сельскохозяйственная академия  
Руководитель – **И.В. Пуртова**, к.с.-х.н., доцент

Хлорофилльные мутации – это группа, включающая многочисленные мутации, изменяющие пластиды и пластидные пигменты. В результате которых может происходить нарушение синтеза хлорофилла, аминокислот, витаминов или структуры хлоропластов. Причиной их возникновения могут быть генные мутации (Володин В.Г., 1975) или крупные хромосомные перестройки (Хвостова В.В., 1973). Такие мутации часто появляются под действием различных мутагенных факторов. Хлорофилльные мутации используются в качестве теста оценки генетического действия факторов, а хлорофилльные мутанты являются важными объектами при изучении процессов фотосинтеза, обмена веществ растений.

При создании исходного материала ярового ячменя методом экспериментального мутагенеза на кафедре селекции и семеноводства Вятской ГСХА наряду с хозяйственно-ценными формами ячменя были выделены разнообразные хлорофилльные мутанты. Они объединены в коллекцию и проводится их комплексное изучение.

Полевые опыты закладывались в 2005-2007 годах на Опытном поле Ботанического сада ВГСХА. В коллекции представлены семь мутантов сорта Эльф, один - сорта Дина, три – сорта Биос-1, четыре – сорта Зазерский 85. В течение вегетационного периода уточнялся характер мутаций по классификации Ю. Калама и Т. Орав (1974), проводились фенологические наблюдения, описание форм по классификатору рода *Hordeum* (1983), оценки на устойчивость к полеганию, продуктивность, определялось содержание пигментов в высушенных образцах (Ярош Н.П., 1988, Третьяков Н.Н., 1990).

Из 15 изученных хлорофилльных форм наибольший интерес представляют следующие:

5-3-1 *tigrina* (АБК 0,2 мг/л, 12 час, Эльф) - листья с желтыми поперечными полосами на зеленом фоне, раскидистая форма куста;

10-10 *tigrina* (ГК-10+Лазер, Эльф) – короткостебельные растения с узкими листьями, с поперечными белыми полосами или пятнами на зеленом фоне;

5-6 *alboviridoterminalis* (avt) (ДКС, семена сухие, Дина) – первые листья белые, начиная со второго или третьего – зеленые, стебель белый;

3-14 *chlorotica* (фенорам супер 6 кг/т, Биос-1) - бледные желтовато-зеленый листья.

Характерная окраска сохранялась до молочной спелости у всех мутантных форм.

Рост и развитие хлорофилльных мутантов по сравнению с исходными сортами значительно отличались и сильнее зависели от погодных условий года. Все хлорофилльные мутанты имели более длительный вегетационный период по сравнению с исходными сортами. Самый короткий вегетационный период (85 дней) имел мутант 5-6 avt, полученный из сорта Дина, он же отличался стабильным началом колошения (через 44 дня от всходов). Самым позднеспелым (96 дней) является мутант сорта Эльф 5-3-1 *tigrina*. Также продолжительным вегетационным периодом характеризуются мутантные формы 10-10 *tigrina* и 3-14 *chlorotica* (91 и 90 дней). Образец 3-14 *chlorotica* имеет иные сроки колошения, которые наступает на 10 дней позднее, чем у исходного сорта Биос-1. В 2007 году мутанты сортов Эльф и Биос-1 имели длительный период налива зерна, что было связано с влажной и холодной погодой первой половины августа. Зависимость хлорофилльных мутантов от погодных условий свидетельствует об их широкой норме реакции.

Мутантные растения характеризуются достоверно низкими показателями основных элементов продуктивности по сравнению с исходными сортами, что связано с нарушением фотосинтетических процессов. Наибольшей общей кустистостью (2,42 стебля) обладает форма 5-6 avt. Наиболее низкая кустистость была отмечена у мутанта 10-10 tigrina. Хлорофилльные мутанты имеют более короткий стебель от 46 см у формы 10-10 tigrina до 51 см у 5-3-1 tigrina. Наиболее продуктивными за 3 года изучения оказались образцы 10-10 tigrina и 5-6 avt (по 1,19 г со всего растения).

Считается, что оценка потенциальной продуктивности по содержанию пигментов во всех фотосинтезирующих органах является перспективной, так как реальнее отражает фотосинтетическую реакцию целого растения. Поэтому было проведено определение содержания пигментов в сухих листьях мутантов и сортов. Количество пигментов зависело от типа хлорофилльной мутации. У растений с неоднородной окраской листьев отмечено пониженное содержание пигментов: у мутантов tigrina - 1,8 – 3,3 мг/100 г, у alboviridoterminalis – 3,7 мг/100 г. А у формы 3-14 chlorotica, имеющей равномерную окраску листьев, содержание пигментов было выше (до 4,40 мг/100 г). Для сортов характерно содержание пигментов от 3,3 до 4,8 мг/100 г. Такая тенденция повышения содержания пигментов в хлорофилльных мутантах, имеющих однородную окраску листьев, возможно, связана с увеличением содержания в них хлорофилла b и каротиноидов. Анализ одного из основных элементов продуктивности «масса зерна с главного колоса» показал его прямую зависимость от содержания пигментов: у образцов с меньшим содержанием пигментов отмечена и меньшая масса зерна.

Таким образом, изучение коллекции хлорофилльных мутантов в течение трех лет дополнило их характеристику по разным показателям, позволило уточнить характер хлорофилльных мутаций на самих растениях.

## **ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ БЕЛЛАДОННЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*Atropa belladonna* L.) В УСЛОВИЯХ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

**И.В. Караваева**

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений

Научные руководители – **О.А. Буко**, к.б.н., доцент;

**Ф.М. Хазиева**, к.б.н.

*Atropa belladonna* L. – многолетнее травянистое перекрёстноопыляемое растение семейства паслёновых. Основным

видом, используемым в фармакологии является белладонна обыкновенная или европейская, или красавка. В кариологическом отношении этот вид имеет диплоидное число хромосом  $2n=72$ .

Свежие листья белладонны обладают наркотическим запахом, вкус солоноватый и очень горький. Вкус корня сначала сладковатый, затем жгуче-горький.

Все части растения содержат тропановые алкалоиды (атропин, гиосциамин, скополамин и др.): корни 0,40-1,30 %, листья 0,14-1,20 %, стебли 0,20-0,65 %, цветки 0,24-0,60 %, зрелые плоды 0,70 %. Их используют для получения препаратов спазмолитического и болеутоляющего действия. В 1866 г. белладонна как лекарственное растение, признанное научной медициной, была включена в первую Российскую фармакопею.

Ареал белладонны – Приатлантическая зона, Средиземноморье, Балканы, Крым. В естественных условиях встречается в Карпатах и в других районах Западной Украины, в горно-лесных районах Крыма и на Северном Кавказе – по Кубани и Тереку, в Западном Закавказье, в Абхазии, в Грузии, в Азербайджане. Изредка встречается в Молдавии.

Дикорастущие запасы белладонны практически сведены к минимуму и не обеспечивают потребности в сырье этой культуры. Кроме того, это растение находится под охраной и включено в Красную книгу (1978). Потребность в сырье белладонны удовлетворяется исключительно за счет её промышленного возделывания.

Сорта белладонны в настоящее время в РФ отсутствуют. Селекционная работа должна быть направлена на создание высокопродуктивного сорта, пригодного для промышленного возделывания. Основные селекционные признаки, на которые следует вести отбор: высокая урожайность травы и семян, повышенное содержание суммы алкалоидов, устойчивость к основным видам вредителей и болезней.

#### **Цель и задачи исследований**

Цель работы - мобилизация и изучение биологических особенностей коллекционного материала и выделение перспективных образцов для создания высокопродуктивных сортов белладонны в Московской области.

Основные задачи:

-мобилизация и изучение генетического разнообразия белладонны отечественного и зарубежного происхождения;

-выделение в процессе оценки лучших коллекционных образцов, сочетающих высокую урожайность и содержание биологически активных веществ и представляющих интерес для селекции этой культуры;

-изучение особенностей сезонного ритма роста белладонны в условиях Московской области;

#### **Материалы и методы исследования**

Объектом исследований служили коллекционные образцы, полученные чрез экспедиции и по обменному фонду из ботанических садов и биологических учреждений РФ и зарубежных стран. В качестве контроля была использована улучшенная популяция белладонны обыкновенной, выращенная в Московской области.

Коллекционный питомник заложен на полях селекционного севооборота Лаборатории селекции и семеноводства ВИЛАР в 2006 г. рассадой по схеме: 60 x 30 по 25 растений на делянке. Площадь однорядковой делянки 4,5м<sup>2</sup>.

В течение вегетационного периода на опыте проводились фенологические наблюдения по методике И.Н. Бейдеман (1974 г.). Отмечали следующие фазы развития: всходы, отрастание, бутонизация, цветение и плодоношение. Учитывали также процент перезимовавших растений. Биометрические учеты проводили в фазу массового цветения на 25 растениях с каждой делянки. Измеряли высоту растений, число боковых побегов и листьев. Определяли также размеры листьев.

Учет урожайности сырой массы растений белладонны определяли в период цветения. Уборку белладонны на сырье осуществляли путем скашивания растений на высоте 10 см от поверхности земли.

Кроме этого, определяли урожайность семян, массу 1000 семян и содержание биологически активных веществ.

#### **Результаты исследования**

Среди коллекционных образцов наблюдалось значительное разнообразие по окраске цветков (желтые, фиолетовые, промежуточные), листьев (от светло-зеленой до темно-зеленой). Наблюдалось значительное варьирование по высоте растений, площади листьев, числу боковых побегов, а также по длительности прохождения различных фенологических фаз.

Таблица 1

**Характеристика лучших образцов коллекционного  
питомника белладонны обыкновенной в Московской области**

Образец, страна происхождения	Урожайность		Содержание суммы алкалоидов в траве, %
	сырья, ц/га	семян, ц/га	
25-05, Дания	39,31	5,78	0,470
554-04, Польша, Люблин	69,84	6,02	0,437
676-05, Казань	70,6	6,4	0,391
НСР <sub>05</sub>	2,89	0,39	0,03

В результате двухлетнего изучения исходного селекционного материала коллекционного питомника, было отобрано три перспективных образца 25-05 (Дания); 554-04 (Польша, Люблин); 676-05 (Казань) по таким хозяйственно-ценным признакам как урожайность сырья и семян и содержание биологически активных веществ (табл.1). Образец 25-05 из Дании характеризуется еще и скороспелостью, что, несомненно, представляет интерес для дальнейшей селекционной работы. Наиболее высокими параметрами массы 1000 семян, энергии прорастания и всхожести обладает образец 676-05, Казань.

Данные образцы будут включены в дальнейшие звенья селекционного процесса.

**ПОДХОДЫ К ФИЗИЧЕСКОМУ КАРТИРОВАНИЮ ПРОТЕИН-КОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК**

**И.В. Киров**

Центр молекулярной биотехнологии  
РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Научный руководитель – **Л.И. Хрусталева**, д.б.н., профессор

В настоящее время взгляды широкого круга учёных прикованы к изучению структуры и функционированию геномов высших растений. Особое место в данном вопросе занимает исследование непосредственно самих генов, как протеин – кодирующих единиц. С тех пор как стало ясно, что гены имеют определённое положение на хромосомах и оно оказывает непосредственное влияние на их функционирование, начался поиск методов по определению локализации генов на хромосомах. К нашему времени учёным удалось создать ряд методов, позволяющих

определять положение протеин-кодирующих последовательностей в геноме. Среди таких методов можно выделить метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), ознаменовавший новую эпоху в области фундаментальной цитогенетики и её практическом применении в селекции сельскохозяйственных растений ( Jiang J., Gill G.L., Wang B.S. et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; Fuchs J., Kloos D-U., Ganai M.V., Schubert I. // *Chromosome Res.*, 1996)

FISH технологии основаны на гибридизации меченой флюорохромом ДНК пробы с комплементарной ей последовательностью ДНК хромосомы, что позволяет физически картировать на хромосомах различные последовательности ДНК и визуализировать их расположение (Zhong X.B, Bodeau J., Fransz P.F. et al. // *Theor Appl Genet*, 1999). FISH показала свою эффективность и была с успехом применена для определения расположений на хромосомах сельскохозяйственных растений определённых последовательностей ДНК. Благодаря FISH стало возможным ответить на очень важный и давно стоявший вопрос - где на физической хромосоме расположены протеин кодирующие гены? Для ответа на этот вопрос в качестве пробы для FISH используют так называемые EST (Expressed sequence tag) клоны. Главные характеристики EST клонов – это небольшой размер (от 1 тыс. до 2,5 тыс. п.н.), отсутствие некодирующих последовательностей в их составе (интронов) и, что самое главное, они являются секвенированными последовательностями ДНК генов (экзонов). Таким образом, стало реальностью прямое картирование протеин-кодирующих последовательностей на хромосомах. Одна из самых больших трудностей физического картирования генов при помощи FISH, связана с ограниченностью в чувствительности метода. Размер кодирующих областей генов на хромосомах часто лежат за пределом чувствительности FISH (>10 Kb). Но выход нашёлся, благодаря использованию модификации FISH – tyramide-FISH, основанной на усилении сигнала с помощью использования фенольных соединений – тирамидов, конъюгированных с флюорохромом (Khrustaleva L.I., Kik S. // *Plant J.*, 2001). Этот процесс можно условно разбить на несколько этапов:

1) Приготовление препаратов растительных метафазных хромосом. Этот этап является одним из главных для FISH, т.к. от него во многом зависит точность визуальной оценки расположения EST на хромосомах. При отборе препаратов для FISH мы предъявляли следующие требования:

- практически полное отсутствие цитоплазмы вокруг метафаз;



- хороший разброс хромосом, без перекрываний и слипаний хромосом и сохранения целостности метафазной пластинки .
  - сохранность структуры самих хромосом.
- 2) Амплификация и мечение ДНК пробы – EST клон. Этот этап может быть достаточно просто реализован, благодаря ПЦР.
- 3) Непосредственно сама гибридизация *in situ*, которую, избегая методических сложностей, можно разделить на три этапа:
- денатурация ДНК пробы и ДНК хромосом для получения одноцепочечной ДНК.
  - ренатурация с образованием мест гибридизации пробы и хромосомной ДНК.
  - детекция сгибридизовавшейся меченой ДНК.

Используя этот метод нам удалось картировать на хромосомах лука *Allium fistulosum* EST клон гена пектинэстеразы , где в качестве положительного контроля использовали 45S рДНК.

Прямое картирование протеин кодирующих ДНК сиквенсов на физической хромосоме позволило бы уже сейчас найти ответы на вопрос о локализации генов и значительно пополнить наши знания об эволюции и организации геномов растений.

## **ПОИСК НУЛЬ-АЛЛЕЛЕЙ *WAXU* ГЕНОВ СРЕДИ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ И ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ**

**М.В. Климушина**

Центр молекулярной биотехнологии

Научные руководители – **М.Г. Дивашук**, к.б.н., ассистент;

**Г.И. Карлов**, к.б.н., доцент

Крахмал эндосперма зерновых культур представлен: амилозой и амилопектином. Количественное содержание амилозы в крахмале оказывает значительное влияние на его качества и свойства. Ключевым ферментом в синтезе амилозы эндосперма является *granule-bound starch synthasa (GBSS)*, которую кодируют гены, получившие название *Waxy* (Shure *et al.* 1983).

Исследование структуры и функции *waxy*-генов имеет важное значение в связи с предполагаемой коммерческой выгодностью низкоамилозной (*Waxy*) пшеницы в определенных отраслях пищевой промышленности. Пшеница, имеющая один или два нуль-аллеля *wx*-генов, обладает рядом характеристик важных для производства лапши и бисквитов. Есть данные, что пониженное содержание амилозы положительно коррелирует с увеличением срока хранения

хлебобулочных изделий. Также это может найти применение в получении модифицированного пищевого крахмала.

Встречаются два типа *GBSS* генов: *GBSSI* и *GBSSII*. В пшенице три гомеологичных *GBSSI* гена расположены в хромосомах 7AS (*Wx-A1*), 4AL (*Wx-B1*), и 7DS (*Wx-D1*) (Nakamura *et al.* 1993). Показано что, наибольшее влияние на содержание амилозы и качество продукции оказывают *Wx-B1* гены, затем *Wx-D1* и *Wx-A1*. Наличие трех гомеологичных генов в геноме пшеницы с одинаковой функцией мешает поиску мутантов, имеющих нуль-аллели.

Идентифицировать частично *waхu* пшеницы или линии *waхu* пшениц можно путем измерения содержания амилозы (используется Rapid Visco Analyser [RVA]) или методом SDS-PAGE. Однако возникает проблема идентификации конкретных генов. Преодолеть эту проблему можно с помощью SDS-PAGE. Однако, белки, имеющие одинаковую молекулярную массу, не удастся отличить. В этом случае используют систему 2D PAGE, где молекулы разделяются по величине их изоэлектрической точки (IEF), а затем по молекулярной массе белков. Однако этот метод является очень трудоемким и непригодным для исследования большого количества образцов (Nakamura *et al.*, 1993). Метод ПЦР (полимеразная цепная реакция) является простой и эффективной альтернативой обычно используемому методу SDS-PAGE для идентификации нуль-аллелей.

В нашей работе была оценена возможность применения ряда молекулярных маркеров для быстрого поиска нуль аллелей *waхu* генов, а так же проведен поиск данных аллелей среди коллекции 44 сортов мягкой пшеницы.

#### Материалы и методы

Исследуемые сорта и линии мягкой пшеницы: 1) Московская 39, 2) Новосибирская 67, 3) Иволга, 4) Мироновская 808, 5) Волжская 100, 6) Харьковская 107, 7) Безенчукская 380, 8) Московская 39, 9) Белгородская 12, 10) Краснодарская 99, 11) Коротышка, 12) Синтетик, 13) Донецкая 48, 14) Селянка одесская, 15) Львовская 4, 16) Перлина лісостепу, 17) Финт, 18) Ариадна, 19) Одесская 267, 20) Крыжинка, 21) № 500, 22) Херсонская безостая, 23) Фея, 24) Белгородская 16, 25) Копилівка, 26) БелНИИСХ 1, 27) Старшина, 28) Юбилейная 100, 29) Зимородок, 30) Пал Пич, 31) Уманка, 32) Селянка Краснодарская, 33) Золотоколосая, 34) Дельта, 35) Лира, 36) Памяти Калиненко, 37) Повага, 38) Светоч, 39) Батько, 40) Дон 85, 41) Красота, 42) Богданка, 43) Харус, 44) Дея.

#### Праймеры и условия ПЦР:

wx-гены	Праймеры
<i>wx-A1</i>	AFC, AR2
<i>wx-B1</i>	BDFL, BRD
<i>wx-D1</i>	BDFL, DRSL

Праймеры были разработаны на основе сиквенсов мутантных и нормальных *waхu* аллелей (Nakamura T., 2002).

Денатурация 5 минут при 95°C, затем 32 цикла: 95°C/30 с; 65°C/30 с; 72°C/2 мин; и 1 цикл 72°C в течение 7 мин.

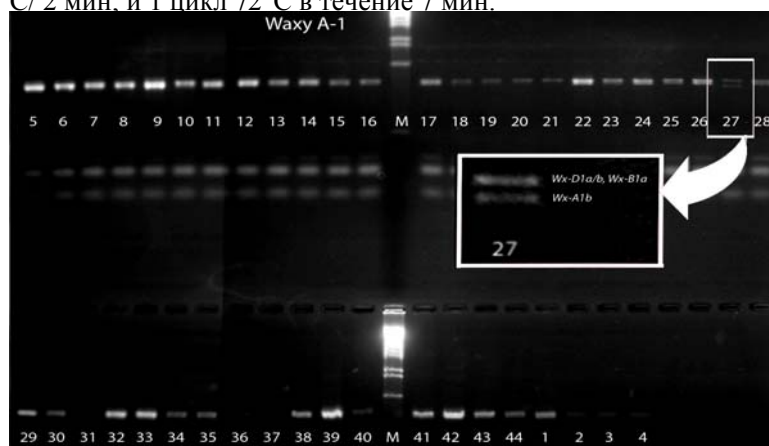


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами AFC и AR2 (M – маркер размеров, номерами 1-44 отмечены исследуемые сорта).

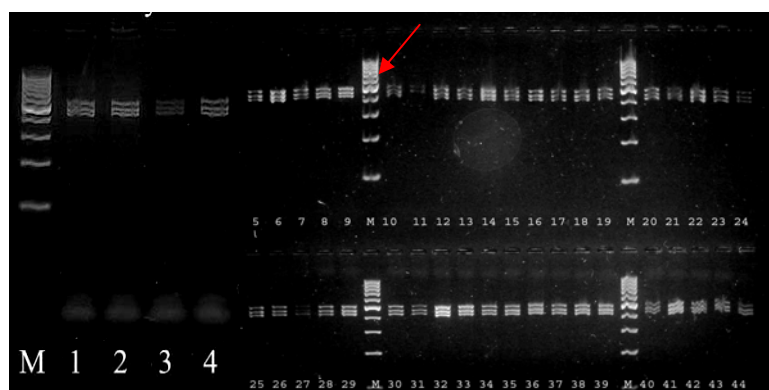


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами BDFL и BRD (M – маркер размеров, номерами 1-44 отмечены исследуемые сорта).

#### Результаты и обсуждение

При проведении ПЦР-анализа на наличие нуль-аллелей по *wx-A1*, было выявлено, что один из исследуемых сортов – Старшина (№27) возможно несет в своем геноме нуль-аллель по данному локусу (рис.1). ПЦР-анализ на наличие нуль-аллелей гена *wx-B*, показал, что сортов Коротышка (№ 11) возможно несет в своем геноме нуль-аллель по данному локусу (рис.2).

Что касается *Wx-D1* специфичного маркера, к сожалению, с праймерами для этого маркера амплификации не было. Это

согласуется с данными создателей данного маркера, которые отмечали, что он работает только на их собственном растительном материале. То есть при идентификации данного нуль-аллеля требуется использовать другие методы или нужно создать новый молекулярный маркер.

В данный момент формируется новый набор сортов и линий, для дальнейшего поиска нуль-аллелей, ведется исследование сортов Коротышка и Старшина, на содержание амилозы и другие хлебопекарные качества.

## **ОЦЕНКА СОРТОВ ЖИМОЛОСТИ СИНЕЙ НА ЗИМОСТОЙКОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ В УСЛОВИЯХ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

**С.Ю. Корзунина**

Вятская государственная сельскохозяйственная академия  
Научный руководитель – **Г.А. Пленкина**, к.с.-х.н., ст. преподаватель

Жимолости синей (*Lonicera L.*) в последние десятилетия отводится большое значение в садах Северо-Востока Нечерноземной зоны России. Этому способствуют достоинства культуры: сверхдлительный срок созревания, повышенное содержание в плодах Р-активных веществ и аскорбиновой кислоты, нетребовательность к количеству тепла в период вегетации (Куклина А.Г., 2001).

Но ввиду суровых климатических условий региона еще много нерешенных вопросов: низкая урожайность большинства сортов, многие из них проявляют такие отрицательные качества, как недостаточная зимостойкость, осыпаемость и посредственный вкус ягод. В связи с тем, что садоводство области в основном любительское, большим спросом у населения пользуются сорта, сочетающие урожайность, крупноплодность и десертный вкус ягод.

В условиях Кировской области за последние 20 лет изучено 64 сорта и формы жимолости синей, выведенных в 80-90е годы 20 века (Косолапова Г.Н., Фирсова С.В., 2001). Авторы указывают, что основным лимитирующим фактором для возделывания жимолости синей в Кировской области является зимостойкость культуры, поэтому необходимо постоянное изучение вновь создаваемых сортов.

Целью наших исследований явилось изучение поведения ряда современных сортов культуры в условиях области и выделения наиболее зимостойких и продуктивных.

Погодные условия в зиму 2005-2006 гг. были в целом благоприятные для жимолости. В январе 2006 года наблюдались оттепели с 0°C до +1°C. Абсолютный минимум температур

понижался до  $-35^{\circ}\text{C}$ . По зимостойкости сорта жимолости распределились в две группы:

1) зимостойкие (подмерзание 1 балл), куда входит большая группа сортов, в том числе Голубое веретено, Сувенир, Виола и т.д.;

2) среднезимостойкие сорта (подмерзание 1,5-2 балла), такие как Кувшиновидная, Ленинградский великан, Волхова.

В экстремальных погодных условиях зимы 2006-2007 гг., когда ранние зимние оттепели до  $+5^{\circ}\text{C}$  при небольшом снеговом покрове сменялись резкими похолоданиями до  $-25-30^{\circ}\text{C}$ , не выявлено ни одного сорта со слабой степенью подмерзания (1 балл). Наиболее многочисленная группа сортов с гибелью верхушечных почек до 100% и части нижележащих почек (2 балла подмерзания), в том числе Нижегородская ранняя, Ленинградский великан, Фиалка, Томичка, Волхова.

В благоприятных погодных условиях 2006 года оценили сорта по урожайности. Хороший уровень урожайности на 5 год после посадки отмечен у пяти сортов: Нижегородская ранняя (2,4 т/га), Виола (2 т/га), Богдана (1,6 т/га), Славянка (1,6 т/га) и Морена (1,3 т/га). Урожайность остальных сортов была на уровне контроля. Наибольшую прибавку урожайности к контрольному сорту Голубое веретено наблюдали у сорта Сувенир (4 т/га).

В экстремальных условиях 2007 года ни один из изученных сортов по урожайности не превзошел контрольный сорт Голубое веретено (0,9 т/га). У пяти сортов плодоношения не было: Нижегородская ранняя, Волхова, Томичка, Ленинградский великан.

В среднем за два года по урожайности выделен сорт Сувенир (2,1 т/га).

Наиболее крупной ягодой в 2006 году (благоприятный для плодоношения год) отметились сорта Сувенир (1 г); Морена, Богдана, Нимфа (0,9 г), Голубое веретено (0,8 г).

Положительным качеством у сортов жимолости является неосыпаемость ягод. Сильная степень осыпаемости (4 балла) выявлена только у контрольного сорта Голубое веретено. У выделенных шести сортов (Сувенир, Славянка, Морена, Кувшиновидная, Нимфа, Ленинградский великан) отмечено слабое осыпание ягод (2 балла).

Важен и вкус ягод. Выделено восемь сортов с десертным вкусом ягод (4,5-5 баллов): Сувенир, Виола, Волхова, Морена, Нимфа, Фиалка, Ленинградский великан, Лебедушка. У контрольного сорта Голубое веретено вкус ягод хороший - 3,5 балла.

Таким образом, проведенные нами исследования показали существенное влияние погодных условий в раннезимний период на урожайность жимолости синей в Кировской области. Выделена

группа достаточно зимостойких сортов (Голубое веретено, Сувенир, Виола и т.д.).

Хорошим уровнем урожайности на пятый год после посадки отметились сорта Сувенир, Нижегородская ранняя, Виола и т.д.

Десертный вкус ягод отмечен у сортов Сувенир, Виола и т.д.

Выявлен сорт Сувенир, сочетающий хороший уровень урожайности, крупноплодность, устойчивость ягод к осыпанию и десертный вкус ягод.

Для использования в селекционной работе в регионе выделено 8 сортов – источников ценных признаков (Виола, Богдана, Славянка, Морена, Голубое веретено, Кувшиновидная, Лебедушка, Нимфа), в том числе 1 комплексный – Сувенир.

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОРТА ЗВЕЗДА И ЛИНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ЕЁ ОСНОВЕ

**П.Ю. Крупин**

Центр молекулярной биотехнологии,  
кафедра генетики РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева  
Научные руководители – **М.Г. Дивашук**, к.б.н., ассистент;  
**А.А. Соловьев**, д.б.н., доцент

Звезда – сорт озимой мягкой пшеницы, полученный методом отдаленной гибридизации с использованием ступенчатых скрещиваний  $F_1$  [*Triticum durum* (Харьковская 46) × *Elytrigia intermedia*] × *T. aestivum*  $F_1$  (Мироновская 808 × Лютесценс 329). С 1992 года районирован в Московской области. Сорт Звезда обладает достаточно высокой морозостойкостью и выгодно отличается по хлебопекарным качествам. Главное преимущество этого сорта – его высокая устойчивость к полеганию. По темпам роста и развития растения сорта Звезда резко отличаются от распространенных сортов и очень близки к пырею. Сорт Звезда характеризуется высоким полиморфизмом по разным признакам. Из него были отобраны линии Звезда низкостебельная, характеризующаяся небольшой высотой стебля, и Звезда одностебельная, отличающаяся преимущественным развитием главного стебля (Кондратьев, Кондратьева, 1993).

Целью работы было проведение цитогенетического анализа сорта Звезда и линий, полученных на её основе.

Ранее С-методом дифференциального окрашивания, широко используемого для изучения хромосомных перестроек и полиморфизма среди видов семейства Злаковых, был выявлен полиморфизм по ряду бэндов (на рис. 1 обозначены короткими стрелочками) на хромосомах 2A, 5A, 3B, 6B, что согласуется с

данными анализа морфологических признаков (М.Г. Дивашук, А.А. Соловьёв, 2004). Полиморфизм заключался как в варьировании размера, так и в наличии/отсутствии отдельных бэндов. Для выявления полиморфизма линий Звезда одностебельная и Звезда низкостебельная нами была использована стандартная С-методика дифференциального окрашивания (Бадаева и др., 1984) с некоторыми модификациями.

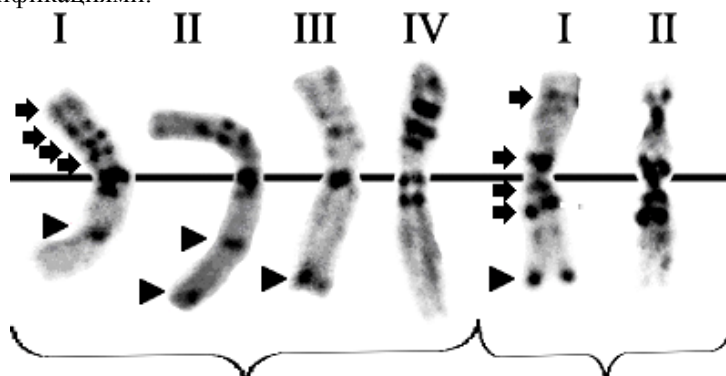


Рис. 1. Полиморфизм С-бэндинга хромосом 3В и 6В сорта Звезда (М.Г. Дивашук, А.А. Соловьёв, 2004).

При анализе кариотипа линии Звезда одностебельная установлены специфические бэнды: небольшой теломерный бэнд на длинном плече хромосомы 2В, не обнаруженный у исходного сорта (на рис. 2 обозначен короткой стрелочкой); интерстициальный бэнд на длинном плече хромосомы 3В среди полиморфных для Звезды бэндов; теломерный бэнд на длинном плече хромосомы 6В, полиморфный для сорта Звезда. Таким образом, хромосома 3В линии Звезда одностебельная соответствует первому типу хромосомы 3В, а хромосома 6В – первому типу хромосомы 6В сорта Звезда в ряду полиморфизма (рис. 1). Наличие в кариотипе линии Звезда одностебельная хромосомы 2В с теломерным бэндом, отсутствовавшей в кариотипе сорта Звезда, может свидетельствовать как о неполном охвате всех биотипов при скрининге исходного сорта, так и о том, что данный бэнд является маркерным для данной линии, полученной методом индивидуального отбора.

Анализ кариотипа линии Звезда низкостебельная позволил выявить следующие характерные бэнды: интерстициальный бэнд на длинном плече хромосомы 3В, полиморфный у исходного сорта; теломерный бэнд на длинном плече хромосомы 6В, полиморфный у сорта Звезда. Таким образом, хромосома 3В линии Звезда низкостебельная соответствует первому типу хромосомы 3В, а

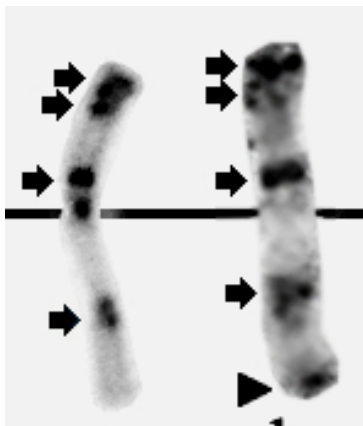


Рис. 2. Хромосома 2В сорта Звезда (а) и линии Звезда одностебельная (б).

хромосома 6В – первому типу хромосомы 6В сорта Звезда в ряду полиморфизма (рис. 1).

Интрогрессия генетического материала пырея среднего *E. intermedia* в геном мягкой пшеницы сорта Звезда в ранее проведенных работах (М.Г. Дивашук, А.А. Соловьев, 2004) методом С-дифференциального окрашивания не установлена. В настоящей работе с этой целью была использована геномная *in situ* гибридизация в соответствии с методикой Karlov et al. (1999) с модификациями; в качестве блока использовали ДНК мягкой пшеницы, а в качестве пробы – ДНК *E. intermedia*. В качестве

положительного контроля проводили геномную *in situ* гибридизацию с использованием 56-хромосомной линии ППГ 3202 (*T. aestivum* × *E. intermedia*), любезно предоставленной Отделом отдаленной гибридизации Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Цитологический анализ метафазных пластинок ППГ 3202 выявил наличие 42 пшеничных и 14 пырейных хромосом по цвету флюоресценции (красный и зелёный соответственно, рис. 3а). Интрогрессий генетического материала *E. intermedia* в геноме сорта Звезда с помощью данного метода не установлено (рис. 3б). Полученные результаты можно объяснить как отсутствием рассматриваемой интрогрессии, так и тем, что размеры интрогрессированного участка меньше предельно допустимой разрешающей способности метода GISH, составляющей 10 kbp.

Таким образом, отчасти раскрыта наследственная основа полиморфизма сорта Звезда как совокупности биотипов и, следовательно, её экологической пластичности. Интрогрессий генетического материала пырея среднего *E. intermedia* в геном мягкой пшеницы сорта Звезда методом геномной *in situ* гибридизации выявлено не было.



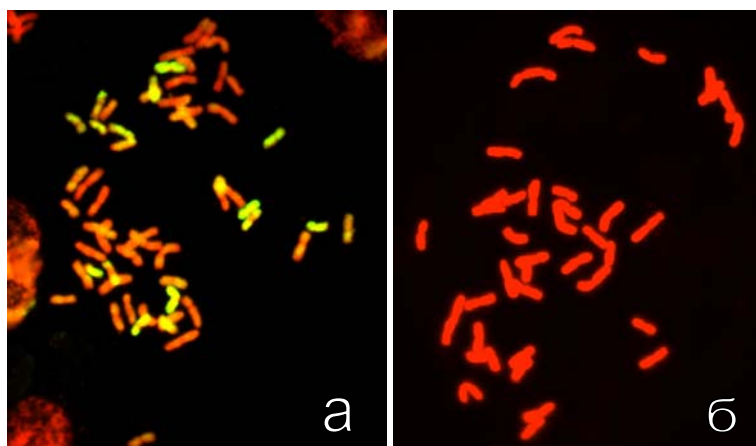


Рис.3. Геномная *in situ* гибридизация линии пшенично-пырейного гибрида 3202 (а) и сорта Звезда (б)

#### Литература

1. Бадаева Е. Д., Бадаев Н. С., Созинова Л. Ф., Турбин Н. В. Метод дифференциального окрашивания для создания «хромосомного паспорта» хлебных злаков // Сельскохозяйственная биология, №1, 1989.
2. Дивашук М.Г., Соловьев А.А. Цитогенетическая характеристика сорта озимой пшеницы Звезда. – Вавиловские чтения – 2004. Материалы Всероссийской научно- практической конференции, посвященные 117-й годовщине со дня рождения академика Николая Ивановича Вавилова. Саратов, 24-26 ноября 2004 г. Секция селекции и генетики. – Саратов, 2004, с.14-17.
3. Кондратьева Н.Н., Кондратьев А.А. Озимая пшеницы Звезда. // Селекция и семеноводство, №1, 1993, pp. 37-40.
4. Karlov G.I., Khrustaleva L.I., Lim K.B., Van Tuyl J.M. Homoeologous recombination in 2n-gametes producing interspecific hybrids of lillium (Liliaceae) studied by genomic *in situ* hybridization (GISH). // Genome, vol 42, 1999, 681-686.

### ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЧНО-ПЫРЕЙНЫХ ГИБРИДОВ

**П.Ю. Крупин**

Центр молекулярной биотехнологии, кафедра генетики РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Научные руководители – **М.Г. Дивашук**, к.б.н., ассистент;  
**Г.И. Карлов**, к.б.н., доцент; **А.А. Соловьев**, д.б.н., доцент

Выполнен цитогенетический анализ линий пшенично-пырейных гибридов, полученных в Отделе отдаленной гибридизации Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН методом

отдаленной гибридизации от скрещивания *Triticum aestivum* × *Elytrigia intermedia* с последующими беккроссированием и отбором (В.Д. Артамонов, неопубликованные данные).

Первым этапом в исследовании цитогенетики отдаленных гибридов является определение числа хромосом. Среди исследуемых линий есть как образцы, находящиеся в конкурсном сортоиспытании (Лютесценс 147, ППГ 151, ППГ 194), так и линии, обладающие рядом фенотипических признаков *Elytrigia intermedia* и предположительно являющиеся амфидиплоидами (ЗП26 и 3202). Анализ числа хромосом, выполненный на временных препаратах с использованием фазового контраста, показал наличие среди изученных образцов одного октаплоида и четырех гексаплоидов (табл. 1).

Для выявления генетического материала пырея на линии 3202 выполнена геномная гибридизация *in situ* в соответствии методикой Karlov et al. (1999) с модификациями.

Таблица 1

Число хромосом (2n) анализируемых форм ППГ

Линия пшенично-пырейного гибрида	Число хромосом
Лютесценс 147	2n=42
ППГ 151	2n=42
ППГ 194	2n=42
ЗП26	2n=42
3202	2n=56

При проведении процедуры GISH в качестве блока использовали ДНК мягкой пшеницы, а в качестве пробы – ДНК *E. intermedia*. Цитологический анализ отчётливо показал присутствие на метафазных пластинках 42 хромосом *T. aestivum* и 14 хромосом *E. intermedia*.

Таким образом, линия 3202 представляет собой амфидиплоид с набором хромосом 2n=56 и присутствием 14 хромосом *E. intermedia*. В остальных линиях, включая предполагаемый амфидиплоид ЗП26, в процессе беккроссирования и отбора, вероятно, произошла стабилизация генома на 42-х хромосомном уровне.

## ИЗУЧЕНИЕ ПОКОЛЕНИЙ T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> И T<sub>2</sub> ТРАНСГЕННОГО ТАБАКА С ГЕНОМ *rec-A* ИЗ *E.coli*

**О.А. Майер**

Кафедра генетики РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева  
Научный руководитель – **А.А. Соловьев**, д.б.н., доцент

Генетическая инженерия растений представляет собой новое направление в деятельности человека, позволяющее целенаправленно модифицировать геном растений. Однако трансгенные, или

генетически модифицированные, организмы требуют тщательного изучения. Важной характеристикой созданных человеком растений является их цитогенетическая нестабильность. Оценка влияния вставки чужеродной ДНК на геном растения возможна с использованием цитологических и генетических характеристик, которые позволяют зафиксировать отклонения от нормы.

Целью работы являлся цитологический анализ трансгенных растений табака поколений  $T_0$ ,  $T_1$ , и  $T_2$ .

В качестве материала использовали трансгенные растения табака, полученные в лаборатории индуцированного рекомбиногенеза ВНИИСБ (коллекция  $T_0$ ). В векторную генетическую конструкцию, использованную в этом эксперименте, были включены: целевой ген *recA*, селективный ген *nptII*. Поколения  $T_1$  и  $T_2$  получены самоопылением исходных растений на кафедре генетики РГАУ-МСХА им. Тимирязева.

ПЦР-анализ показал наличие экзогенной вставки, содержащей *recA*-ген, у части исследуемых растений  $T_0$ -поколения. VIR-область не была обнаружена ни у одного растения.

Для получения поколения  $T_1$  семена от самоопыления растений  $T_0$  высевали на экспериментально подобранную селективную среду. Проростки семян нетрансгенных растений на селективной среде белели и погибали в течение 4 – 5 недель. Расщепление потомства  $T_0$  трансгенных растений на селективной среде с канамицином в большинстве случаев соответствовало 3:1.

Наиболее интересным для исследования оказалось растение E35MSV VIII.5-11, потомство, от самоопыления которого, давало на селективной среде необычное расщепление: 38 (устойчивые):13 (неустойчивые) : 4 (мозаики). Возможно это связано с нарушением экспрессии маркерного гена *nptII*, и активность фермента NPTII в разных частях листа различна. В потомстве от самоопыления таких растений выделены устойчивые, неустойчивые и мозаичные формы.

Таблица 1

Результаты статистической обработки нарушений в митозе поколения

Образец	$\phi$	Критерий t
E35VII.5-2a	0,382	3,99
E35MSV VII.5-9	0,298	3,45
E35NLSV <sub>1</sub> 10-12	0,142	1,73
E35 V <sub>1</sub> 10-14	0,318	3,14
E35 V <sub>1</sub> 10-14a	0,336	3,16
E35 V <sub>1</sub> 10-4	0,185	2,35
E35MSV VII.5-11	0,354	4,12

Табличное значение на уровне 99%  $t=2,58$  и на уровне 95%  $t=1,96$ .

Цитологический анализ митоза у растений  $T_1$  выявил значительное количество нарушений в делении на стадии анафазы. У данных растений обнаружены отставание как одной так и нескольких хромосом, преждевременное расхождение хромосом. В потомстве нетрансформированного растения сорта Samsun нарушений не выявлено. Это дает возможность предполагать, что именно наличие чужеродной инсерции является причиной нарушений деления у трансгенных растений табака.

Статистическая обработка результатов цитологического анализа с использованием критерия Стьюдента показала, что каждое трансгенное растение (кроме E35NLSV<sub>1</sub>10-12) достоверно отличается от нетрансформированного растения (табл. 1). Таким образом, трансгенные растения табака имеют достоверно больше нарушений в митозе, чем нетрансгенные.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА СОРТОВ И ЛИНИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*Pisum sativum* L.) С ПОМОЩЬЮ ISSR-МАРКЕРОВ**

**Ю.В. Милехин**

Кафедра генетики Московского государственного университета им.  
М.В.Ломоносова

Научные руководители – **С.А. Гостимский**, д.б.н., профессор;  
**З.Г. Кокаева**, к.б.н., научный сотрудник

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – широко распространенный генетический модельный объект, одновременно являющийся ценной сельскохозяйственной культурой.

Целью данной работы являлось исследование межлинейного и внутрилинейного полиморфизма ДНК гороха посевного (*Pisum sativum* L) с помощью ISSR-маркеров.

Для изучения межлинейного полиморфизма для гороха посевного было проведено исследование ДНК с помощью ISSR–метода 23 сортов, 9 мутантов, и 10 линий гороха с использованием праймера M1. Для определения надежности анализируемых данных были поставлены контрольные эксперименты с использованием ДНК сорта Торсадаг и линии L-102.

В результате амплификации с ДНК разных линий было получено от 7 до 11 фрагментов размером от 250 до 2500 п.н., всего было получено 21 маркер, 20 из которых проявили межлинейный полиморфизм.

Среди полиморфных маркеров было выявлено 3 фрагмента, амплифицирующихся только в одной линии (M1#850, M1#480,

M1#280), и 2 фрагмента (M1#1500, M1#380), присутствующих в спектрах двух форм. Маркер M1#410 присутствовал в спектрах всех образцов, кроме линий L-108 и L-577. ISSR-фрагменты, специфичные для определенных мутантов, линий или сортов, могут быть использованы для их идентификации, а также в дальнейшей работе по картированию хромосом.

Для количественной оценки полиморфизма и определения уровня дивергенции между изученными формами данные, полученные при изучении ISSR-полиморфизма, были представлены в виде матрицы состояний 21 бинарного признака, и использованы для построения дендрограммы и определения генетических расстояний между исследуемыми формами.

Максимальная степень генетических различий наблюдалась между сортом Виола и линией L-577, а также между сортом Король Гурманов и линией L-577. Уровень различий составил 95,24. Для большинства линий процент изменчивости варьировал в среднем от 26% до 56%. Степень различий между мутантами и исходными сортами составила 7,7 – 37 %, в среднем 24 %, что заметно меньше межлинейных различий.

На основе полученных данных были определены маркерные линии, наиболее подходящие для молекулярно-генетического картирования изученных сортов. Для большинства форм таковой является линия L-577. Эти данные можно использовать для планирования скрещиваний.

Анализ внутрилинейного полиморфизма проводился у 11 форм гороха (Афилла, Люпиноид, Московский Деликатес, Немчиновский, Торсаг, Флагман, Штамбовый, НФ42, Хл42, L-102, L-1238), по 5-10 растений каждой линии.

В результате проведенной работы была обнаружена неоднородность у 7 из 11 исследованных линий. Наибольший внутрилинейный полиморфизм был обнаружен у сортов Люпиноид и Афилла и у линии L-102. Мономорфными оказались маркерная линия L-1238, сорта Немчиновский, Флагман и полученный из Немчиновского мутант Хлорофилл-42.

Полученные данные были использованы для построения дендрограммы и определения генетических расстояний между индивидуальными растениями исследуемых форм.

Так как построенная дендрограмма отражает реальное происхождение исследованных форм, то можно сделать заключение, что ISSR-метод позволяет с удовлетворительной точностью определять сортопринадлежность образцов.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 07-04-00652.

## ТЕХНОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ГЛАДИОЛУСА *IN VITRO*

**Е.Ю.Осипова**

Кафедра сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА имени  
К.А. Тимирязева

Научный руководитель – **О.Ю. Миронова**, к.б.н., доцент

На современном этапе возрастают требования к исходному посадочному материалу цветочно-декоративных растений, которые в соответствии с последними стандартами должен быть свободен от различных вредителей и болезней. В этой связи биотехнологические методы приобретают лидирующую роль в получении высококачественного материала гладиолуса.

Гладиолус является популярной высокодекоративной цветочной культурой, выращиваемой по всему миру. Ускоренное размножение гладиолуса в течение последних 15-20 лет вызывает огромный интерес, как исследователей – биологов, биотехнологов, селекционеров, так и производителей. Традиционный вегетативный метод не позволяет размножить быстро и в достаточном количестве новые сорта и гибриды. Многие гибриды имеют низкий коэффициент размножения, что препятствует их аттестации. Обычно для выведения нового сорта селекционеру требуется 10-12 лет. Все это сдерживает процесс сортосмены и обедняет ассортимент цветочной продукции. При дефиците исходного материала значительно ускорить размножение позволяет метод клонального микроразмножения.

Целью работы является оптимизация технологии размножения гладиолуса *in vitro* для промышленного цветоводства и определение возможности удешевления и ускорения процесса. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: подбор первичного экспланта; подбор гормонов и выбор наиболее оптимальной и дешевой питательной среды; сокращение периода культивирования.

Объектами исследований являлись различные сорта гладиолуса. В стерильную культуру были введены части клубнелуковиц и клубнепочки. Экспланты помещались на искусственные питательные среды, как агаризированные, так и жидкие с различными концентрациями гормонов. Испытывались среды с минеральными солями по рецептам Мурасиге-Скуга, WPM, Гамборга. Так же применялся ряд регуляторов роста в различных концентрациях: 6-БАП (0,5-2,0 мг/л), ЦЕТОДЕФ (0,5-2,0 мг/л), ИУК (0,5-1,5 мг/л), ИМК (0,5-1,5 мг/л).

В процессе работы была выявлена зависимость коэффициента размножения как от гормонального состава среды, вида первичного

экспланта, типа среды, так и от генетических особенностей определенного сорта. Были определены наиболее оптимальные среды (лучшие результаты были показаны на WPM и Гамборга), концентрации регуляторов роста и показана возможность ускорения технологии клонального размножения.

Полученные результаты по микроклональному размножению гладиолусов возможно использовать в производственных масштабах, что позволит сократить расходы за счет увеличения коэффициента размножения, а так же сократить сроки получения посадочного материала ценных сортов.

## **ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ДАЛЬНЕГО КРАСНОГО СВЕТА НА РАСТЕНИЯ КОЧАННОГО САЛАТА (M<sub>2</sub>)**

**Н.А. Охупкина**

Вятская государственная сельскохозяйственная академия

Научный руководитель – **Е.А. Шиляева**, к.с.-х.н.

Салат (семейство *Asteraceae*) – однолетнее растение, образующее розетку листьев и цветоносный стебель высотой до 120 см с многочисленными мелкими семенами серебристо-серого или черного цвета в соцветии корзинка.

В настоящее время салат – одна из широко распространенных овощных культур. Возделывают пять разновидностей салата (*secalina*, *acerphala*, *capitata*, *romana*, *angustana*), среди которых встречаются листовые, кочанные и полукочанные формы. Он имеет большое цветовое разнообразие окрасок листьев – от светло-зеленой до серо-зеленой, иногда красной или коричневой, которые высоко ценятся в производстве.

Салат является ценным диетическим овощем, в нем содержатся калий и натрий в оптимальном соотношении, что оказывает регулирующее действие на водный баланс организма. По содержанию солей кальция он занимает первое место среди овощных культур. В зеленых листьях салата присутствуют витамины, органические кислоты (яблочная, щавелевая, лимонная и др.), алкалоиды, каротиноиды.

Существующий сортимент салата не всегда отвечает требованиям интенсивных технологий, в том числе круглогодичного его производства. Необходимы новые сорта с узким спектром хозяйственно-биологических характеристик. Современная селекция листовых и кочанных форм салата в северных регионах России ведется на скороспелость, устойчивость к цветущности и грибным заболеваниям, на холодостойкость. Сорта должны обладать высокими

товарными качествами при хорошей урожайности, иметь высокое содержание биологически активных веществ и минеральных солей, отличаться пониженным содержанием нитратов.

Для достижения этих целей селекцию салата ведут методами отбора, гибридизации и мутагенеза. Метод гибридизации затруднен из-за малого размера цветков. В последнее время используют мутагенные факторы, вызывающие изменения признаков, но не оказывающие сильного угнетающего влияния на растения. Одним из таких факторов является дальний красный свет, мутагенность которого была доказана ранее на других культурах (ячмене, пшенице).

Целью данной работы стало изучение мутагенного действия дальнего красного света (ДКС) при разных экспозициях и создание с его помощью исходного материала кочанного салата. Задачи состояли в изучении морфологических и физиологических изменений салата в  $M_2$ , возникающих в результате действия ДКС на намоченные семена и в установлении хозяйственно-ценных признаков.

Схема опыта:

1. Контроль – семена, намоченные в воде;
2. Семена, намоченные в воде + ДКС 15 минут;
3. Семена, намоченные в воде + ДКС 30 минут;
4. Семена, намоченные в воде + ДКС 60 минут;
5. Семена, намоченные в воде + ДКС 90 минут;
6. Семена, намоченные в воде + ДКС 120 минут.

Обработке подвергали семена кочанного салата сорта Надя.

Из семян растений  $M_1$  делали выборку по каждому варианту из 400 штук семян. Метод выращивания – рассадный, схема посадки 70x20 см.

Наблюдения за растениями вели как в рассадный период, так и во время вегетации их в поле. Несмотря на разное время воздействия на семена дальним красным светом, всходы во всех вариантах наступили в одни сроки с контролем.

Фаза 3-4 настоящих листьев зафиксирована на 2 дня позднее в вариантах с продолжительностью обработки ДКС 90 и 120 минут. До фазы цветения все растения, подвергнутые воздействию ДКС, опережали контроль в развитии на 1-9 дней. Цветение и созревание по исследуемым вариантам было близко к контролю и наступило на 90-93 и 119-122 день, соответственно.

В отличие от первого поколения, во втором поколении не было выявлено хлорофилльных мутаций в фазу всходов. В процессе развития, начиная с фазы роста розетки листьев и до массового цветения, наблюдали морфологические и физиологические изменения у растений (нетипичную форму листьев, укороченные цветоносы, фасциации цветоносов и изменение их окраски и др.).



Процент семей с изменениями варьировал от 0,75 до 5,31%, а число типов изменений – от 1 до 5. Больше число семей с изменениями (5,31%) и число типов изменений (5 шт.) вызывала обработка намоченных семян дальним красным светом в течение 60 минут.

Выводы:

1. Дальний красный свет ускорил прохождение фенологических фаз развития растений салата в  $M_2$  до фазы цветения и не оказал существенного влияния на их продолжительность в период цветения растений – созревания семян.

2. Дальний красный свет обеспечил появление морфофизиологических изменений растений кочанного салата в  $M_2$ . Наибольшее количество растений с изменениями и число типов изменений выявлено с экспозицией ДКС 60 мин.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ГИБРИДОВ И ОБРАЗЦОВ КАРТОФЕЛЯ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ПОЛЕВОЙ СТАНЦИИ РГАУ- МСХА ИМЕНИ К.А. ТИМИРЯЗЕВА**

**С.А. Пастухов**

Кафедры генетики и селекции и семеноводства полевых культур  
РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Научные руководители – **С.С. Баженова**, к.б.н., доцент;

**А.А. Соловьев**, д.б.н., доцент

Ни одно другое культурное растение не поражается столь многими болезнями и отчасти вредителями, как картофель. Неудивительно поэтому, что основным направлением селекции картофеля является выведение сортов, устойчивых к болезням и вредителям, обладающих групповым иммунитетом. Особенно актуальна проблема выведения сортов, устойчивых к фитофторе (*Phytophthora infestans*), альтернариозу (*Alternaria solani*, *Alternaria alternata*), раку (*Synchytrium endobioticum*), вирусам, и к нематоду (*Heterodera rostochiensis*). В то же время сочетать в одном сорте устойчивость ко всем возбудителям болезней картофеля пока невозможно.

Наряду с устойчивостью к болезням к сортам картофеля предъявляются высокие требования по форме клубня, мелкому заложению глазков, высокому содержанию крахмала, белка и каротина. Сорта должны отличаться хорошими лежкостью и вкусовыми качествами, пригодностью к переработке.

Целью работы являлось изучение селекционной ценности гибридов и оценка коллекционных образцов для выбора лучших родительских форм.

В ходе работы произведен подбор комбинаций с высокой завязываемостью плодов и выходом семян, проведены оценки устойчивости коллекционных образцов к альтернариозу в полевых условиях и фитофторозу лабораторным методом.

Сравнение завязываемости ягод в различных комбинациях скрещивания и от самоопыления выявило сильные различия между сортами по завязываемости ягод при самоопылении и комбинации скрещивания. Результаты скрещиваний показывают возможность повышения эффективности при правильном подборе родительских пар. Оценка гибридности семян проводили по морфологии гибридов и с использованием молекулярных маркеров. Морфологические признаки для идентификации гибридов пригодны не во всех случаях, в отличие от микросателлитных. С помощью микросателлитного маркера STM0019 проведена оценка гибридности в комбинациях Чародей x Жуковский ранний и Чародей x Скарб.

## СОХРАНЕНИЕ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

**И.В. Перегудова**

Лаборатория биотехнологии растений ГБС РАН  
Научный руководитель – **О.И. Молканова**, к.с.-х.н.

Одной из главных задач по сохранению биоразнообразия является сохранение редких и исчезающих видов растений.

Существует несколько способов решения этой задачи: коллекции ботанических садов, частных лиц и культура *in vitro* (банки стерильных культур).

Целью нашего исследования явилась оптимизация условий культивирования выбранных объектов на основных этапах *in vitro*. Для этого было необходимо провести сбор, идентификацию, изучение, разработать технологию репродукции и хранения растительного материала.

В качестве объектов исследования использован экспедиционный материал трех редких видов растений:

- 1.) семейство Amaryllidaceae *Galanthus nivalis* L., статус редкости 2 (V) (популяция окрестностей города Пятигорска);
- 2.) семейство Liliaceae *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow, статус редкости 2 (V) (популяция Калачевского района Волгоградской области);

3.) семейство Araliaceae *Aralia cordata* (*A. schmidtii* Pojark.) Thunb., статус редкости 4 (I) ( Дальний Восток).

Для исследования в качестве эксплантов были выбраны: 1.) луковицы у подснежника узколистного; 2.) луковицы и семена у бельвалии сарматской; 3.) апикальные и латеральные почки с вегетирующих побегов аралии сердцевидной.

Использовали следующую схему стерилизации:

• для семян:

- 1) обработка фунгицидом -20 минут;
- 2) промывка дистиллированной водой;
- 3) стерилизация в 70%-ном этаноле – 2-3 минуты.
- 4) стерилизация в 7%-ном растворе гипохлорита натрия – 8-10

минут;

- 5) промывка стерильной дистиллированной водой;

• для луковиц и латеральных почек :

- 1) обработка фунгицидом –30 минут;
- 2) промывка дистиллированной водой;
- 3) стерилизация в 70%-ном этаноле – 2-3 минуты.
- 4) стерилизация в 7%-ном растворе гипохлорита натрия –15

минут;

- 5) промывка стерильной дистиллированной водой.

В качестве питательных сред в эксперименте использовались среды с минеральной основой по MS, дополнительно вводились сахара – 30 г/л, агар-агар – 7 г/л, мезоинозитол – 0,1 г/л. В качестве регуляторов роста использовались цитокинины – БАП ( 1 мг/л для латеральных почек аралии сердцевидной и 10 мг/л для луковиц бельвалии сарматской и подснежника узколистного) и ауксины – НУК (0,1 для луковиц бельвалии сарматской и подснежника узколистного). Уровень pH питательной среды доводили до 5,7 – 6,0. Для культивирования семян использовалась безгормональная питательная среда.

В данном опыте экспланты выращивали при температуре 21-23°C, освещенности 1500 лк и фотопериоде 16 часов.

В настоящее время подснежник узколистный находится на стадии размножения (получены микролуковицы), часть полученного растительного материала заложена на хранение в генетический банк *in vitro*. У бельвалии сарматской получены стерильные экспланты, для которых подбираются среды для пролиферации. Аралия сердцевидная успешно размножена и адаптирована к условиям фитотрона, где растет и развивается.

В дальнейшем планируется провести молекулярный анализ данных объектов, реинтродукцию.

## **АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ КАЧЕСТВА СЕМЯН ПОДСОЛНЕЧНИКА В РОССИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА СЕРТИФИКАЦИИ ДЛЯ ЕГО ПОВЫШЕНИЯ**

**Е.В. Пентюхова, Л.А. Греченкова**

Кафедра селекции и семеноводства полевых культур РГАУ-МСХА  
имени К.А. Тимирязева

Научные руководители – **А.Н. Березкин**, д.б.н., профессор;  
**С.С. Баженова**, к.б.н., доцент; **А.М. Малько**, д.с.-х.н.

В условиях формирования рынка семян особое значение приобретает контроль за их сотовыми и посевными качествами, от которых в значительной степени зависит эффективность всего растениеводства. Переход экономики Российской Федерации к рыночным отношениям негативно повлиял на состояние системы семеноводства. Зачастую вместе с этим игнорируются действующие стандарты и технические нормативы производства семян, нарушаются элементарные агротехнические требования, правила документирования, подработки, хранения и упаковки. Это повлекло за собой выброс на рынок большого количества партий семян сомнительного качества, появление в обороте сортов и гибридов, не приспособленных для возделывания в конкретных почвенно-климатических зонах России, не имеющих соответствующих документов о сортовых и посевных качествах. На данный момент в нашей стране распространенным явлением стало определение сортовых качеств семян методами апробации, грунтового и лабораторного контроля. Массовый характер приобретает преднамеренное распространение вместо гибридов первого поколения – последующих. Низкая платежеспособность большинства производителей товарной продукции способствует распространению этих нарушений во всех регионах страны и в тоже время высокая стоимость семян сортов и гибридов с относительно небольшой нормой высева, ограниченная территория производства семян и высокий спрос на них делает фальсификацию семян высокорентабельным, хотя и незаконным делом. Несмотря на это семена многих культур, например кукурузы и подсолнечника, с точки зрения удобства фальсификации семян, являются практически идеальным объектом, неслучайно, именно по этим культурам Госсеминаспекции отмечают наибольшее число указанных выше нарушений.

За время проведенное на практике мы занимались анализом материалов Госсеминаспекций по всей России за 2003 год с целью оценки состояния качества семян подсолнечника в стране и выработки предложений по его улучшению. Несмотря на большое

разнообразии сортов и гибридов подсолнечника в Государственном реестре селекционных достижений (245 единиц в 2003 году), в использовании их потенциала выявлено немало существенных проблем, лидирующие же сорта должны соответственно иметь и важное экономическое значение. Из этого следует, что именно эти сорта с наибольшей вероятностью подвергаются фальсификации и нуждаются в особо тщательной проверке сопроводительных документов со стороны потребителей и контролирующих органов. С другой стороны, из 245 сортов и гибридов подсолнечника, находящихся в Государственном реестре на 2003 год 136 единиц массовой репродукции составляют 20,4% - существенно меньше, чем в среднем по всем высеянным сортам. Кроме того, установлены сорта с чрезвычайно высокими объемами высева семян (свыше 3 тонн), из диаграммы видно, что доля их в зависимости от объемов высева колеблется от 1,5 до 28,2% от общего количества основных сортов подсолнечника. Можно предположить, что именно эти сорта имеют существенное экономическое значение и подобное многосортие можно считать положительным фактором только для определенного региона, что свидетельствует об использовании семян внутрихозяйственного производства без поступлений элитных семян соответствующих сортов на мировой рынок, что существенно затрудняет развитие семеноводства.

Таким образом, значительные средства, вложенные в селекционный процесс подсолнечника, этими сортами окупаются не полностью. Основную же нагрузку по финансово возвратной работе селекции в области подсолнечника обеспечивают малочисленные сорта-лидеры. На данный момент состояние сортообновления семян основных сортов подсолнечника, высеянных в хозяйствах были представлены 1-4 репродукциями более чем на 72,1% в среднем по России, массовая репродукция (14%) показывает нам, что в 2003 году в хозяйствах не выдерживались и рекомендуемые нормы сортообновления подсолнечника. Например, сорт Енисей, который занимает лидирующее положение по объемам высева, практически полностью представлен репродукционными семенами (50,6%), в т.ч. и массовыми на 45,4%. В целом же по хозяйствам представлены гибриды, которые, как мы видим из таблицы, полностью репродукционные.

Перечисленные выше проблемы должны негативно отражаться на сортовых качествах используемых семян подсолнечника. В соответствии со статьей 26 Федерального Закона «О семеноводстве» определение сортовых качеств семян с.-х. растений проводится посредством апробации посевов, грунтового и лабораторного сортового контроля. Апробации подлежат семенные посевы сортов и гибридов, включенных в Государственный реестр

сортов, допущенных к использованию в производстве, на которые оформлены соответствующие документы (заявка, договор на проведение апробации и т.д.) и урожай с которых предназначен для реализации. Заявка на апробацию посевов по установленной форме подается производителем семян до посева в обслуживающую его Государственную семенную инспекцию, которая рассматривает ее и заключает договор на проведение апробации. По результатам апробации составляется акт, первый экземпляр которого направляется в орган по сертификации, второй передается заявителю, а третий остается у апробатора. На основании акта апробации орган по сертификации оформляет сертификат сортовой идентификации и регистрирует его в журнале. Оригинал передается заявителю, копия остается в органе по сертификации. При смешивании партий семян, полученных из более, чем одного источника, обязательным требованием является чтобы семена были одного сорта и одной категории. Сертификат на смешанную партию семян выдается при условии наличия сертификатов сортовой идентификации на все вошедшие в нее порции семян, с учетом результатов испытаний отобранной от нее пробы, подтверждающих соответствие показателей установленным нормам. Что касается смеси семян, то отдельный сертификат на нее не выдается – действуют сертификаты, выданные на семена, входящие в ее состав. Не должен выдаваться сертификат и на семена гибридов подсолнечника второго и последующих поколений. На основании сертификата вносятся в этикетку и сопроводительные документы характеристики партии семян. Маркировка партий семян осуществляется в соответствии с действующей нормативной документацией. Сертификат на семена, а также сертификат сортовой идентификации, выданные любым органом по сертификации семян, признаются действительными на всей территории страны. Однако это не исключает проведения инспекционного контроля при поставках семян из одного региона в другой. Грунтовой и лабораторный методы контроля являются относительно новыми для практики отечественного семеноводства и требуются усилия по их широкому внедрению. Задачей грунтового контроля является заблаговременное (до посева) установление пригодности выращенных семян стерильных аналогов материнских форм гибридов подсолнечника. При грунтовой контроле определяется уровень генетической чистоты по показателю типичности и стерильности. Параллельно с учетом полноты стерильности устанавливаются и отмечают растения. Отличающиеся по внешним признакам от основной исследуемой формы. Процент таких растений по отношению к общему количеству учетных растений каждой конкретной формы укажет на уровень сортовой чистоты (типичности) исследуемой партии. Грунтовой контроль осуществляет

комиссия в составе: селекционера и семеновода научно – исследовательского учреждения, представителя Госсеминаспекции.

Учреждение-оригинатор вправе применять для определения уровня гибридности, другие методы установления генетической чистоты, прошедшие апробацию и обладающие достаточное надежностью и утвержденные в установленном порядке.

Опыт стран с развитым сельским хозяйством свидетельствует, что с середины XX-го века основным инструментом обеспечения качества семян, защиты прав потребителей и патентообладателей на сорта растений является сертификация. Анализ систем сертификации в области семеноводства идентичны, поскольку объект сертификации един- семена. Но, тем не менее, различия проявляются по целому ряду существенных вопросов, главное из которых – роль государства и источники финансирования.

### **СОЗДАНИЕ И АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ АРАБИДОПСИСА И ТАБАКА С ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМ ГЕНОМ ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗ**

**М.Н. Полякова**

Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН  
Научный руководитель – **Н.В. Хадеева**, к.б.н., ст.н.с.

Селекция растений на устойчивость к различным неблагоприятным факторам среды – одно из важнейших направлений селекционной работы. Часто именно она служит более эффективным способом борьбы, например, с болезнями и вредителями, чем другие, особенно если учесть, что химические методы вызывают загрязнение окружающей среды и самой продукции, а также ее удорожание. Заметный вклад в селекцию растений на устойчивость к неблагоприятным факторам среды вносят методы биотехнологии: клеточная и генетическая инженерия.

Перспективная стратегия использования природных защитных механизмов растений основана на экспрессии в их клетках генов ингибиторов протеиназ. Наиболее целесообразно применение гетерологичных генов растений, так как многие растения содержат в своих тканях, плодах и семенах ингибиторы протеиназ, специфически настроенные против протеиназ насекомых и грибов, но безвредные для человека и животных.

Табак и арабидопсис уже много лет используются в качестве модельных объектов генетики растений. В данном случае их использование дает возможность наиболее полно изучить процесс встраивания чужеродного гена в геном растения, его экспрессию, ее

влияние на метаболизм растения, а также свойства самого чужеродного белка.

Целью исследования являлось изучение трансформированных ранее растений табака и арабидопсиса с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* A281, несущего целевой ген ингибитора сериновых протеиназ IP гречихи и штамма, не несущего этот целевой ген, проверка трансформированных растений на устойчивость к различным фитопатогенам, изучение полученных трансформантов.

Большинство полученных ранее трансформированных растений арабидопсиса имели различные нарушения в морфологии, отставание в росте, карликовость, многие растения не были способны к образованию цветоноса, так и оставаясь на стадии розетки листьев.

Анализ фенотипа трансформированных растений арабидопсиса показал, в отличие от полученных ранее трансформантов табака сорта Самсун, наличие морфологических изменений у ряда растений. Больше всего разнообразных мутаций было получено при трансформации растений арабидопсиса вектором A 281 IP, содержащим ген ингибитора сериновых протеиназ гречихи, что может быть связано с размером этого вектора.

У трансформантов табака понижена фертильность пыльцы, а пыльцевые зерна сильно варьируют по размеру. У арабидопсиса – напротив – пыльца фертильна и однородна. Похожая картина наблюдается и при сравнении семян: у табака много мелких и щуплых семян различного размера, семена же арабидопсиса однородны. Всхожесть семян трансформантов и у табака, и у арабидопсиса значительно снижена.

Скорость и интенсивность регенерации трансгенных табаков сравнительно высока, в то время как у арабидопсиса получение регенерантов было крайне затруднительным.

Для изучения устойчивости к бактериальным патогенам полученных трансформированных растений были проведены биотесты. Растертые в стерильных условиях листья контрольных и трансформированных растений наносили в лунки на чашку Петри, предварительно засеянную бактериальной культурой (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis*) в лунки и инкубировали при комнатной температуре. Результаты теста оценивались через 24-48 часов.

Ранее проведенные биотесты подтверждали предположение о том, что трансформированные растения, в отличие от контрольных, производят функциональные белки, которые оказывают защитное действие и подавляют развитие бактерий. Однако разные трансформированные растения обнаруживают различную степень устойчивости к разным бактериальным патогенам. При этом у растений табака реакция на патоген более постоянна.



Можно отметить, что диаметр зон подавления у тканей мутанта арабидопсиса «Bushy» наибольший. Это может свидетельствовать о том, что трансформированные растения, «Bushy» в отличие от остальных, производят большее количество функциональных белков, оказывающих защитное действие и подавляющих развитие бактерий.

Таким образом, различные модельные объекты по-разному реагируют на вставку гетерологичного гена ингибитора сериновых протеиназ гречихи, это отражается как в морфологии растений, так и в их защитных свойствах при действии патогенных микроорганизмов.

## **СРОКИ И СПОСОБЫ УБОРКИ СЕМЕННЫХ ПОСЕВОВ ОВСЯНИЦЫ ТРОСТНИКОВОЙ**

**А.И. Пугачев**

ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса,

РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Научные руководители – **А.Н. Березкин**, д.б.н., профессор;

**В.Э. Рябова**, к.с.-х.н.

У овсяницы тростниковой период созревания по сравнению с овсяницей луговой несколько растянут. Оптимальный срок уборки наступает при достижении семенами физиологической спелости, до начала сильного осыпания семян. Физиологическую спелость определяют как период накопления семенами критической сухой массы (КСМ), то есть массы сухого вещества семян при стандартной влажности

Исследования проводились на опытных полях Всероссийского НИИ кормов им. В.Р. Вильямса. Опыт заложен в 2004 году. Схема: широкорядный семенной посев (междурядья 45 см) двухфакторным методом расщепленных делянок с систематическим размещением вариантов, 4-кратной повторности, площади делянок – 1 м<sup>2</sup>. Имитация уборки прямым комбайнированием осуществлялась обмолачиванием соцветий вручную непосредственно после их срезки, раздельной уборки – после просушки в течение 4-х дней.

В среднем за 3 года (2005-2007 гг.) продолжительность периода весенне-летней вегетации равнялась 114 дням, от начала цветения до полной спелости – от 35 до 36 дней с суммой активных температур (выше 5°C) - 672-680°C.

Установлено, что период достижения семенами влажности 35-40% является биологическим порогом в процессе семяобразования, когда происходят необратимые преобразования белковых коллоидов и прекращается поступление влаги и питательных веществ.

Энергия прорастания семян при прямом комбайнировании достигала наибольшего значения в 69% на 31 день от начала цветения, при раздельной уборке – 72-75% на 29-31 день при прямом комбайнировании и 95-97% на 27-29 день при раздельной уборке. Стандартная всхожесть (75%) уже отмечалась при уборке комбайнированием на 25-й день от начала цветения при влажности семян 48,1%, раздельным способом – на 21-й день при влажности семян 51,7%. Интенсивное осыпание семян начиналось в условиях опыта на 31-32 день от начала цветения.

Урожайность семян сформировалась практически в начале восковой спелости (25 дней от начала цветения) при обоих способах уборки, которая составляла 57,9-57,7 г/м<sup>2</sup>. Преимущество раздельного способа уборки проявилось, прежде всего, в более высокой энергии прорастания. В фазе полной спелости она была равной 75%, а при прямом комбайнировании – 69%. Получение устойчивых урожаев семян овсяницы тростниковой является возможным в условиях Центрального района Нечерноземной зоны РФ, при условии творческого неординарного подхода к этой деятельности агрономической службы, механизаторов и наличия соответствующей материально-технической базы.

### **НАРУШЕНИЕ КОДОМИНАНТНОГО НАСЛЕДОВАНИЯ ГЛИАДИНОВ В ПЕРВОМ ПОКОЛЕНИИ ПРИ МЕЖВИДОВЫХ СКРЕЩИВАНИЯХ ПШЕНИЦЫ**

**О.В. Разумова**

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН  
Научные руководители – **В.П. Упелниек**, к.б.н., в.н.с.;  
**А.В. Смиряев**, д.б.н., профессор

Реликтовые и дикорастущие сородичи мягкой пшеницы – неисчерпаемый источник новых и полезных генов для ее улучшения. Создание коллекций мягкой пшеницы с идентифицированным чужеродным материалом является важным шагом как в освоении генетических ресурсов, так и в ускорении селекционного процесса. Успехом в отдаленной гибридизации можно считать тот факт, что из более чем сорока известных на сегодняшний день генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине – 30 интрогрессированы из родственных видов.

В связи с возросшей в последнее время значимостью отдаленной гибридизации как метода селекции, особенно актуальным представляется исследование генетических процессов, происходящих при межвидовых скрещиваниях.

В зависимости от конкретной задачи, для изучения генетических процессов, происходящих в геномах отдаленных гибридов, могут быть использованы различные методы. Одним из них по праву может считаться электрофорез запасных белков пшеницы (глиадинов) в полиакриламидном геле.

По данным современной биохимии и генетики известно, что белок является первичным обязательным продуктом генетической системы, и путь от гена до белка значительно короче, чем до морфологического признака. Индивидуальный белковый компонент может быть маркером гена или группы сцепления в зависимости от его функциональных особенностей и положения в той или иной группе белков. Особенностью запасных белков пшеницы, в частности, глиадинов, является огромная генетическая изменчивость (полиморфизм) в пределах вида и отдельных популяций. Исследование глиадинов методом одномерного электрофореза в кислом буфере (рН 3,1) показало, что электрофоретический спектр этих белков специфичен и генетически детерминирован для генотипа (сорта, линии, биотипа) и не изменяется под влиянием окружающей среды и технологий возделывания. Компоненты глиадинов наследуются тесносцепленными группами (блоками). В первом поколении кодоминантно, в соответствии с дозой гена в триплоидном эндосперме, во втором – расщепление происходит в соотношении 1:2:1. В настоящее время выявлено, что для каждого глиадинкодирующего локуса характерно существование большого числа аллельных вариантов (от 12 до 25 по разным хромосомам). Однако механизм наследования глиадинов при отдаленных скрещиваниях до настоящего времени исследован недостаточно.

Работа выполнена в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова. Посевы размещали на полях полевой опытной и селекционной станции им. П.И. Лисицына РГАУ-МСХА и НИИСХ ЦРНЗ. В скрещиваниях участвовали следующие виды пшениц: *Triticum kicharae* (2n=42), *T.aestivum* (2n=42), *T.dicoccum* (2n=28) и *T.durum* (2n=28).

Анализ электрофоретических спектров глиадинов зерен F<sub>1</sub> показал, что часть семян, полученных в комбинации *Triticum dicoccum* x *Triticum aestivum*, а также в обратном скрещивании, оказалась результатом самоопыления. В остальных комбинациях было подтверждено гибридное происхождение семян. В результате реципрокных скрещиваний твердой и мягкой пшеницы нарушения кодоминантного наследования глиадинов не наблюдалось. В электрофоретических спектрах глиадинов зерен, полученных от скрещивания *Triticum kicharae* x *Triticum aestivum* нами выявлены изменения, характеризующиеся отсутствием отдельных компонентов. Аналогичные нарушения наследования наблюдали в комбинации

*Triticum dicoccum* x *Triticum aestivum* var. Condor. Гибридные растения, полученные от скрещивания *Triticum kichara* x *Triticum aestivum*, выращенные в тепличных условиях, имели промежуточный фенотип, во всех случаях формировали внешне нормальный, но всегда стерильный колос.

Таким образом, показано, что при отдаленной гибридизации в отдельных гибридных комбинациях в электрофоретических спектрах зерен первого поколения были обнаружены изменения, связанные с нарушением кодоминантного наследования глиадинов. Можно предположить, что это вызвано геномными нарушениями, вероятно делециями, транслокациями, а также возможной активацией транспозонов или изменением уровня экспрессии глиадинкодирующих генов.

В настоящее время проводится более детальное исследование генома гибридных растений с использованием молекулярных методов.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ КОНКУРСНОГО СОРТОИСПЫТАНИЯ СОРТООБРАЗЦОВ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*)**

**А.Ю. Сауткина**

Кафедра селекции и семеноводства полевых культур РГАУ-МСХА  
имени К.А. Тимирязева

Научный руководитель – **П.М. Конорев**, к.б.н., доцент

Люпин это легендарное растение, известно человечеству уже более 3 тысяч лет, он имеет огромный биологический и экономический потенциал, который до настоящего времени еще полностью не используется. Узколистный люпин способен произрастать на бедных песчаных почвах, переносить засуху, обогащать почву фосфором и азотом, использовать макро- и микроэлементы из подпочвы, кроме того, он обладает наивысшей азотфиксирующей способностью среди всех зернобобовых культур. Относительная скороспелость узколистного люпина, по сравнению с белым и желтым, позволяет успешно возделывать его на севере до 59° северной широты.

В семенах люпина в зависимости от условий выращивания содержится от 30% и выше высококачественного белка, которые используются как высокобелковая добавка в рационах всех видов сельскохозяйственных животных, птицы и рыбы, а также могут применяться во многих пищевых продуктах.

Вегетативная масса люпина тоже содержит в своем составе от 18 до 23% белка в переводе на сухое вещество, которая используется в корм животным, как в свежескошенном виде, так и для приготовления грубых и сочных кормов.

**Цель работы:** сравнение со стандартом 8 сортообразцов и выявление лучших из них превосходящих стандарт по хозяйственно ценным признакам, с целью передачи их на дальнейшее испытание.

**Материал и методика:** для работы в качестве стандарта был взят сорт Ладный зернового направления, созданный селекционерами РГАУ-МСХА им К.А. Тимирязева и НПО «Подмосковье» и 7 сортообразцов, полученные методом гибридизации и отбора на территории РГАУ-МСХА им К.А. Тимирязева.

В 2006 году на основе полученных данных были установлены сортообразцы превосходящие стандарт по уровню урожайности, так же определены сортообразцы, имеющие урожайность значительно ниже стандарта. Наибольший показатель урожайности был установлен у сортообразцов Куршевель и Денлад, а наихудший результат у сортообразцов №17/02 и №836, колебания показателя урожайности остальных сортообразцов не превысили НСР на 5% уровне.

Таблица 1

Урожайность зерна в конкурсном сортоиспытании за 2006 год (ц/га)

Название	Среднее значение
Ладный (st)	19,04
Куршевель	23,60
ТСХА 16	20,20
Денлад	22,18
Немчиновский 846	19,46
Кристалл	16,98
Надежда	19,88
№17/02	14,54
№836	15,46

НСР<sub>0,5</sub>=2,72

## **ВЛИЯНИЕ ФОРМЫ ЯЗЫЧКОВЫХ ЦВЕТКОВ НА ХОЗЯЙСТВЕННЫЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ПОДСОЛНЕЧНИКА**

**Г.Н. Семчишкина**

Саратовский государственный аграрный университет им.

Н.И. Вавилова

Научный руководитель – **Ю.В. Лобачев**, д.с.-х.н., профессор

Совместно сотрудниками ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова» и ГНУ НИИСХ Юго-Востока с целью изучения влияния формы язычковых цветков на хозяйственные и биологические признаки подсолнечника созданы наборы почти изогенных линий подсолнечника [1, 2]. В течение 2006 и 2007 гг. на полях ГНУ НИИСХ Юго-Востока высевали набор почти изогенных линий, включающий линии с короткими, средними, трубкообразными и скрученными язычковыми лепестками, а также их сестринские линии со стандартной формой язычковых лепестков. Изучаемые варианты высевали на делянках площадью 19,1 м<sup>2</sup> в трехкратной повторности. В качестве стандартов использовали районированный в регионе сорт ВНИИМК 8883 и линию ЮВ-28Б, которую использовали при создании почти изогенных линий. Почти изогенные линии фенотипически не различались как между собой, так и с линией-реципиентом ЮВ-28Б, за исключением формы язычковых цветков. За вегетационный период провели по стандартным методикам следующие учеты и наблюдения: высота растений, диаметр корзинки, количество цветков и семян в корзинке, масса 1000 семян, масса семян с корзинки, урожайность семян с единицы площади, натурная масса семян, лузжистость и панцирность семян, содержание масла в семенах, выход масла с единицы площади, содержание олеиновой кислоты в масле, устойчивость к ложно-мучнистой росе и заразице, период «всходы-цветение», период «цветение-полная спелость» и период «всходы-полная спелость». Полученные результаты подвергали статистической обработке методом однофакторного дисперсионного анализа.

Анализ полученных результатов показал, что как по годам исследований, так и в среднем за два года линия ЮВ-28Б и набор ее почти изогенных линий достоверно уступали сорту ВНИИМК-8883 по высоте растения, диаметру корзинки, количеству семян в корзинке, массе семян с корзинки, массе 1000 семян и выходу масла с единицы площади. В свою очередь сорт ВНИИМК-8883 достоверно уступал линии ЮВ-28Б и набору ее почти изогенных линий по продолжительности вегетационного периода, натурной массе семян, содержанию масла в семенах, содержанию олеиновой кислоты в

масле, панцирности семян, устойчивости к ложно-мучнистой росе и заразихе. По всем изучаемым признакам не установлено достоверных различий между изучаемыми почтой изогенными линиями, их сибсами и линией-реципиентом ЮВ-28Б.

На основании проведенных полевых и лабораторных исследований можно сделать следующий вывод: гены, контролирующие четыре разных типа формы язычковых цветков, не оказывают достоверного влияния на хозяйственные и биологические признаки подсолнечника. Гены, контролирующие короткую, среднюю, трубкообразную и скрученную формы язычковых лепестков можно использовать в селекции сортов и гибридов подсолнечника масличного, кондитерского и декоративного направления.

#### **Литература**

1. Лобачев Ю.В., Пимахин В.Ф., Лекарев В.М., Кудряшов С.П., Константинова Е.А., Коваленко А.В. Создание генетической коллекции подсолнечника // Репродуктивная биология, генетика и селекция. Сб. науч. тр. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2002. С. 102-106.

2. Пимахин В.Ф., Лобачев Ю.В., Лекарев В.М., Кудряшов С.П., Константинова Е.А. Использование генетической коллекции в селекции подсолнечника // Материалы международной конференции, посвященной 90-летию ВНИИМК. Сб. научн. тр. ВНИИМК. Краснодар, 2003. С. 72-77.

### **О ВОЗМОЖНЫХ ПРИЧИНАХ ПОДМЕРЗАНИЯ ОДНОЛЕТНИХ ПОБЕГОВ КАТАЛЬПЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*C. bignonioides*) В УСЛОВИЯХ г. САРАТОВА**

**Г.Н. Семчишкина**

Саратовский государственный аграрный университет им.

Н.И. Вавилова

Научный руководитель – **А.И. Перетятко**, к.с.-х.н., профессор

На территории Саратовской области произрастают растения-интродуценты, одним из таких является катальпа обыкновенная. Ежегодно однолетние побеги данной древесной культуры в условиях города Саратова подвергаются подмерзанию. [4]

В ходе наших исследований была сделана попытка выяснить возможные причины подмерзания однолетних побегов катальпы обыкновенной в зимний период. Пробы на анализ отбирали ежемесячно, начиная с июня по февраль в 2004-2007 г.г.

Степень лигнизации оболочек клеток древесины определяли на поперечных срезах верхней, средней и нижней частях годичного прироста катальпы при помощи двух наиболее характерных гистохимических реакций – перманганатной реакции (Меуле),

открывающей лигнин “М” и флороглюциновой реакции, открывающей лигнин “Ф”. О степени лигнизации оболочек клеток древесины судили по интенсивности окраски и оценивали по пятибалльной системе. Одновременно определяли степень дифференциации древесины [1, 2, 3].

Нами установлено, что в побегах катальпы обыкновенной содержится два лигнина - “Ф” и “М”. Лигнин “Ф” локализован в твердом лубе, сердцевинных лучах древесины, древесинной паренхиме, перимедулярной зоне. Лигнин “М” обнаружен также и в оболочках сердцевины.

Во все годы исследования мы не обнаружили лигнин “Ф” в сердцевине. Кроме того, суммарное содержание лигнина “М” превышало содержание лигнина “Ф” примерно в два раза. Склеренхимные пучки средне лигнизированы лигнинами “Ф” и “М”.

Следует отметить, что в нижней части годичного побега к концу вегетации на срезах обнаруживается резкая граница между камбием и древесиной что свидетельствует о завершении процесса дифференциации древесины. В средней, а особенно в верхней части побега прикамбиальной зоны дифференциация древесины незакончена, а степень лигнизации очень слабая.

Исследования показали, что в оболочках клеток древесины побега катальпы обыкновенной содержится лигнин “М” и “Ф”. Можно предположить, что подмерзание однолетних побегов катальпы обыкновенной в зимний период обусловлено как незаконченной дифференциацией древесины, так и недостаточной степенью лигнизации лигнином “Ф”.

#### **Литература**

1. Барская, Е.И. Изменения хлоропластов и вызревание побегов в связи с морозоустойчивостью древесных растений / Е.И. Барская. – М.: Наука, 1967
2. Любимов, В. Б. Интродукции деревьев и кустарников в засушливые регионы / В.Б. Любимов. – Белгород: БелГУ, 2002. - 224 с.
3. Сенкевич, Н. Г. Интродукция древесных растений в полупустыне Северного Прикаспия / РАН. Ин-т лесоведения / Н.Г. Сенкевич. – М., 1996. - 179 с.
4. Заигралова, Г.Н. Интродукция и устойчивость североамериканских древесных растений в зеленых насаждениях населенных пунктов Саратовской обл. / Г.Н. Заигралова. – Саратов: СГАУ им. Н.И. Вавилова, 2006.



## **ОЦЕНКА СОРТОВ ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ ПО ВЫПОЛНЕННОСТИ ЗЕРНА В СВЯЗИ С АНАТОМИЕЙ КОЛОСОВОГО СТЕРЖНЯ**

**Е.В. Тихонова**

Кафедра селекции и семеноводства полевых культур РГАУ-МСХА  
имени К.А. Тимирязева

Научные руководители – **В.С.Рубец**, к.б.н., доцент;

**Е.А. Комарова**, к.б.н., науч. сотр.

Для любой из зерновых сельскохозяйственных культур помимо урожайности, устойчивости к болезням и вредителям, склонности к полеганию, зимостойкости и т.д., существенным критерием при оценке и сравнении сортов является качество зерна.

Качество зерна - широкое понятие, характеризующее технологические, биохимические, органолептические свойства зерна. Форма и линейные размеры зерна существенно влияют на выбор режимов хранения и обработки, транспортирования и переработки. Крупность зерен характеризуют их линейные параметры: длина, ширина, толщина, причем длина зерна – наиболее стабильный показатель для данного сорта (Фирсанова М.К., Попова Е.П. Оценка качества зерна и семян. 1981г).

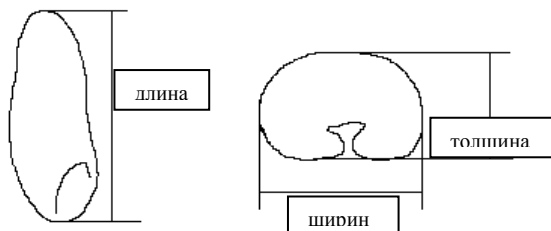
Тритикале отличается по сравнению с пшеницей большим, примерно в 1,4 раза, объемом зерновки. Удлиненная форма зерновки тритикале, очевидно, была унаследована от ржи. Известно, что чем больше отклоняется форма зерновки от шарообразной, тем меньше сыпучесть зерновой массы.

Тритикале превосходит пшеницу и по выравненности, что выгодно выделяет его в технологическом смысле. Крупное зерно отличается большим относительным содержанием в нём эндосперма, следовательно, может быть обеспечен из такого зерна больший выход муки. В технологических процессах особенно ценным считается зерно, крупное по ширине и толщине, в этом случае его сферичность выше, что определяет более высокое содержание эндосперма (Шулындин А.Ф. Тритикале – агротехника и урожай, 1981г).

**Цель работы:** Найти средние значения линейных параметров зерен 10 различных по урожайности сортов озимой тритикале: Виктор, Никлап, Кентавр, Гармония, АДМ-9, Водолей, Стрельна, 21406/96, Талисман, Антей, оценить различия между данными сортами по крупности и выполненности зерен, а также найти взаимосвязь между этими показателями и параметрами анатомического строения.

**Ход анализа:**

Для анализа были взяты зерна 30 растений каждого из сортов (по 10 растений с повторения). Зерна каждого растения высыпались на поверхность стола и из их массы случайным образом отсчитывалось 10 штук. Для каждого зерна при помощи штангенциркуля измерялись значения длины, ширины и толщины с точностью до десятых миллиметра и записывались в соответствующую таблицу.



шир

Объем выборки - 300 зерен с одного сорта (3 повторения \* 10 растений = 30 растений \* 10 зерен). Таким образом, был проанализирован урожай 2005 и 2006 года.

После того, как результаты были получены, можно было вычислить отношение ширины к длине, толщины к длине, толщины к ширине, а также приблизительной площади поперечного сечения зерновки:

$$S = \pi * (\text{ширина}/2 + \text{толщина}/2)^2$$

**Результаты:**

По результатам проведенного анализа можно отметить, что сорта Виктор, Никлап и Водолей отличаются наибольшими значениями длины зерновки (соответственно: 7,95 мм, 7,91 мм и 7,85 мм.). Отличия между исследованными сортами по площади поперечного сечения незначительны.

Значения показателей крупности зерна сильно варьируют в пределах года и разница между сортами не так существенна, если анализировать усредненные данные за каждый год.

Если в качестве показателя выполненности рассматривать отношение толщины к ширине, то лучшими показателями выполненности зерна обладают сорта Никлап (1,0) и Гармония (0,974).

Были найдены значения коэффициентов корреляции между показателями крупности зерна и параметрами анатомического строения колосового стержня данных сортов. Так, взаимосвязь отмечается между длиной зерновки и средним радиальным диаметром проводящего пучка (0,73), средней площадью пучка (0,78)

и общей площадью всех пучков (0,73); а также, между шириной зерновки и количеством проводящих пучков (0,61).

сорт	Длина	Толщина	Ширина	S
Никлап	7,91	3,20	3,23	1,599
Водолей	7,85	3,32	3,06	1,662
Талисман	7,84	3,19	3,02	1,593
Стрельна	7,46	3,29	2,96	1,644
Антей	7,75	3,07	2,96	1,536
Виктор	7,95	3,27	2,80	1,636
21406/96	7,84	3,15	2,96	1,576
Кентавр	7,79	3,25	3,01	1,627
Гармония	7,72	3,20	3,11	1,598
АДМ -9	7,64	3,22	2,96	1,608
НСР	0,184	0,047	0,115	0,82

**ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ТРАНСФОРМАНТОВ РАСТЕНИЙ  
ТАБАКА ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ АНТИМИКРОБНЫХ  
ПЕПТИДОВ *AMP* ИЗ  
*STELLARIA MEDIA***

**И.А. Трофимова**

Лаборатория индуцированного рекомбиногенеза ВНИИСБ РАСХН  
Научный руководитель – **Р.А. Комахин**, к.б.н., доцент

Сохранение сельскохозяйственной продукции является одной из приоритетных задач стоящей перед постоянно растущей популяцией человека. До сих пор эта задача решалась в основном за счет применения пестицидов (инсектицидов, фунгицидов и гербицидов). Однако столь масштабное применение химических соединений ведет к нарушению экологического баланса. Помочь решить эту задачу, наряду с агротехническими и селекционными мероприятиями, может использование методов генной инженерии, дающих возможность получить трансгенные растения, устойчивые к болезням и вредителям. В частности для защиты сельскохозяйственных растений, возможно использование генов из сорных растений, которые кодируют пептиды с антимикробной активностью.

Ранее в лаборатории гормональной регуляции онтогенеза сельскохозяйственных растений (зав. лаб. проф. А.В. Бабаков) из

семян *St. media* L был выделен пептид и клонирован кодирующий его ген (*Sm-AMP*). Было показано, что *Sm-AMP* проявляет высокую и специфичную антигрибную активность по отношению к ряду фитопатогенных грибов (*Alternaria solani*, *A. consortiale*, *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium sativum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* и *Thielaviopsis basicola*). При анализе аминокислотной и нуклеотидной последовательностей выяснилось, что кДНК гена *Sm-AMP* кодирует пропептид, который имеет в своем составе лидерный пептид, два антимикробных пептида, разделенные спейсером, и С-концевой фрагмент с высоким содержанием дикарбоновых аминокислотных остатков. На основании этих данных были созданы растительные экспрессионные векторы, содержащие различные варианты гена *Sm-AMP*: *AMP-2* (полная копия кДНК гена *Sm-AMP*), *AMP-1* (лидерный пептид, первый антимикробный пептид и С-концевой фрагмент) и *AMP-3* (лидерный пептид и первый антимикробный пептид). В качестве контроля эксперимента был использован растительный экспрессионный вектор содержащий только селективный ген *nptII*.

Целью нашей работы было получение растений табака сорта Samsun, экспрессирующих ген *Sm-AMP* или его фрагменты.

Для получения первичных трансформантов растений табака с генами *AMP-2*, *AMP-1*, *AMP-3* и *nptII* была проведена агробактериальная трансформация листовых эксплантов агробактериальными штаммами, содержащими соответствующие растительные экспрессионные векторы.

Получение побегов проводили на среде для регенерации, содержащей антибиотики канамицин и тиментин в концентрации 100 и 300 мг/л, соответственно. Регенеранты отделяли и переносили на среду для черенкования с тем же набором антибиотиков. Укоренившиеся растения подвергали молекулярно-биологическому анализу с помощью ПЦР на отсутствие агробактериального заражения и наличие селективного гена *nptII* и целевых генов *AMP-2*, *AMP-1* и *AMP-3*. В результате была получена популяция первичных трансформантов табака включающая растения линий *AMP2* (21шт.), *AMP1* (19 шт.), *AMP3* (16 шт.) и *nptII* (38шт.). Часть растений линий *AMP2*, *AMP1* и *nptII* были высажены в почву для получения семян и анализа экспрессии целевых генов.

С помощью обратной транскрипции была показана экспрессия гена *AMP1* у 12 и *AMP2* у 11 растений (работа выполнена в лаборатории проф. А.В. Бабаков).

В дальнейшем планируется провести оценку устойчивости полученных первичных трансформантов к ряду фитопатогенных грибов.

## ИЗУЧЕНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗНЫХ СОРТОВ СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ *SYRINGA VULGARIS*

Л.Л. Уткина

Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН  
Научные руководители – **О.И.Молканова**, к.с.-х.н.; **Н.В. Загоскина**,  
д.б.н., ИФР им. К.А.Тимирязева РАН

Обычные способы размножения сирени (черенками, отводками, корневыми отпрысками) не всегда позволяют получать необходимое количество посадочного материала в сжатые сроки. Поэтому в последнее время для размножения сирени все чаще используют метод клонального микроразмножения. Он лишен недостатков обычных методов и позволяет получать, по некоторым данным, до одного миллиона побегов год.

Фенольные соединения выполняют в растениях множество разнообразных функций и являются одними из наиболее распространенных в растениях представителями вторичного метаболизма. Несмотря на большое количество исследований до сих пор объем знаний об особенностях синтеза и накопления фенольных соединений в растениях невелик.

При выполнении данной работы перед нами стояли следующие цели:

1. Усовершенствовать технологию клонального микроразмножения интродуцированных сортов *S. vulgaris* L. для повышения их коэффициента размножения.

2. Установить, существуют ли различия у растений различных сортов сирени обыкновенной, находящихся на разных этапах клонального микроразмножения по содержанию фенольных соединений и хлорофилла в листьях.

3. Определить, существует ли взаимосвязь между окраской венчика цветка и содержанием в листьях хлорофилла и фенольных соединений.

Для достижения поставленных целей требовалось выполнить следующие задачи:

1. Оптимизировать и унифицировать состав питательной среды для интродуцированных сортов сирени обыкновенной на стадии размножения.

2. Определить содержание общей суммы растворимых фенольных соединений, флаванов, флавонолов и хлорофиллов *a* и *b* в листьях различных сортов сирени обыкновенной, размноженных черенкованием, выращенных в культуре и прошедших через цикл культивирования.

В эксперимент были включены следующие сорта: Экселлент, Моник Лемуан, Прим Роз, Сенсация, Мадам Казимир Перье, Ами Шотт, Красавица Москвы, Мирабо, Леди Линдсей, а также гибридная сирень китайская и сирень широколистная.

В качестве первичного экспланта были взяты верхушечные и боковые почки, а также фрагменты стебля с 1-2 почками. Стерилизация проводилась в 0,5%-ом растворе гипохлорита натрия с обработкой 70%-ным этанолом. За основу питательной среды взята среда Мурасиге-Скуга (MS). Для изучения влияния гормонального состава добавляли 6-бензиламинопурин (БАП) или изопентиладенин (2iP) в концентрации 0,5-3 мг/л. Эти гормоны использовались индивидуально или в сочетании с индолилуксусной кислотой (ИУК) в концентрации 0,3 мг/л.

Для проведения опытов физиологической части эксперимента растительный материал экстрактировали 96%-ным этанолом. Содержание хлорофилла, суммы растворимых фенольных соединений, флаванов и флавонолов определяли спектрофотометрированием при соответствующих длинах волн.

На основании проведенного анализа роста и развития побегов сирени обыкновенной в культуре *in vitro*, определения особенностей фенольного метаболизма сортов и видов сирени можно сделать следующие выводы:

1. Не обнаружено такого состава питательной среды, который обеспечивал бы нормальное развитие и максимальный коэффициент размножения для всех изучаемых в эксперименте сортов. Но по данным эксперимента для каждого сорта можно выделить среды, на которых развитие побегов угнетено. Такие среды не рекомендуется использовать для размножения данных сортов.

2. Была найдена среда, которая обеспечивает коэффициент размножения для всех сортов как минимум на уровне среднего по сорту, а для большинства сортов этот показатель значительно выше среднего. Это среда на основе MS с добавлением цитокинина 2iP в концентрации 2 мг/л. Использование этой среды позволяет в значительной степени унифицировать процесс размножения сирени *in vitro*.

3. Не выявлено четкой взаимосвязи между окраской лепестков венчика и содержанием хлорофилла и фенольных соединений в листьях.

4. Обнаружено более интенсивное накопление фенольных соединений в листьях вида сирень китайская, что, вероятно, является особенностью фенольного метаболизма этого вида.

5. Установлено, что сорт Сенсация отличается большим накоплением растворимых фенольных соединений и флавонолов в листьях, чем другие изученные сорта. Эта особенность может быть

связана с некоторыми отклонениями в фенольном пути у этого сорта из-за его мутантной природы.

6. В дальнейшем планируется провести эксперименты по определению содержания общей суммы растворимых фенольных соединений, флаванов и флавонолов в побегах, размножаемых *in vitro*, и прошедших через цикл культивирования.

## ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ В СОСТАВЕ ПЛАСТИДНЫХ ОПЕРОНОВ

**А.А. Фрадкина**

Лаборатория экспрессии генома Института физиологии растений им.

К.А. Тимирязева РАН

Научные руководители – **А.Ю. Алейникова**, аспирант,

**Я.О. Зубо**, к.б.н.

Известно, что большинство хлоропластных генов объединены в опероны. В состав оперонов могут входить гены, кодирующие белки с различной функцией, они могут содержать или не содержать интроны и могут транскрибироваться различными РНК-полимеразами. Причем, считается, что со всех генов оперона считывается единая молекула РНК-предшественник, которая в дальнейшем в ходе процессинга превращается в зрелые функционально активные мРНК. Однако этот сложный процесс экспрессии пластидных генов в составе оперонов изучен исключительно слабо. Задача нашей работы заключалась в исследовании особенностей регуляции транскрипции пластидных генов, объединенных в опероны.

Работу проводили на листьях первого яруса 3-х и 18-ти дневных растений ячменя сорта «Луч», выращенных при 20-23°C и при продолжительности светового периода 16 часов.

Интенсивность транскрипции *rrn*-оперона изучали методом *run-on* транскрипции. Было определено количество вновь синтезированной РНК, которая кодируется первыми двумя генами оперона *rrn16-trnI-trnA-rrn23-rrn5-trnR-ORF39-rps15-ORF56*. Интенсивность транскрипции была изучена для участков, приходящихся на начало (*rrn16-1*), середину (*rrn16-2*) и конец (*rrn16-3*) *rrn16* гена, а также на начало (*trnI-1*) и середину (*trnI-2*) гена тРНК (*trnI*). Причем, первая гибридационная проба (*trnI-1*) приходилась на первый экзон, а вторая (*trnI-2*) на интрон *trnI* гена. Кроме того, определена интенсивность транскрипции в районе межгенного спейсера *rrn16-trnI*. Полученные результаты представлены на рис. 1.

Наши данные подтверждают сложность регуляции транскрипции генов в пластидных оперонах и не могут быть объяснены только с позиции существования единого РНК-предшественника. Полученные результаты могут быть представлены следующим образом.

Во-первых, интенсивность транскрипции в *rrn16* опероне изменяется с возрастом растений: в хлоропластах листьев 3-х дневных растений скорость транскрипции для всех изученных последовательностей оперона значительно выше, чем для 18-ти дневных растений. Однако для фрагментов *trnI* гена падение транскрипции с возрастом более значительное (от 10,2 раз для *trnI-1* до 7,1 раза для *trnI-2*), чем для *rrn16* гена.

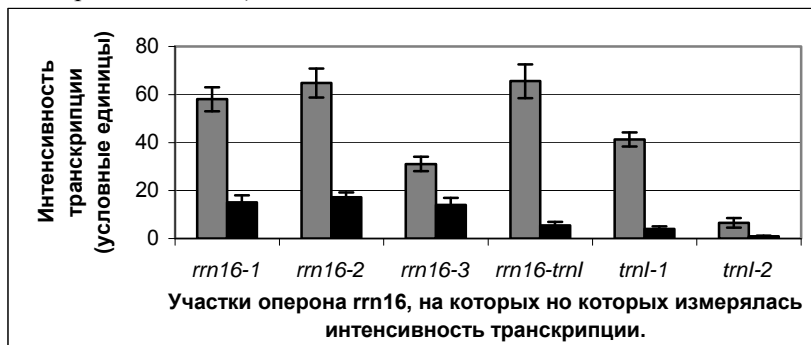


Рис. 1. Интенсивность транскрипции соответствующая разным фрагментам *rrn16* и *trnI* генов в первых листьях 3-х и 18-дневных растений ячменя. Серые столбцы – 3-х дневные растения, черные столбцы – 18-ти дневные растения.

Во-вторых, интенсивность транскрипции двух изученных нами генов различна, хотя они находятся в одном опероне. В среднем ген *rrn16* значительно сильнее транскрибируется, чем *trnI*, вне зависимости от возраста растений.

В-третьих, происходят изменения транскрипции и внутри одного гена. Если в 18-ти дневном возрасте *rrn16* ген транскрибируется сравнительно, равномерно, то в 3-х дневных растениях в 3'-области гена наблюдается значительное снижение интенсивности транскрипции. Для гена *trnI* пик транскрипционной активности приходится на начало гена для обоих возрастов, что в данном случае может быть обусловлено тем, что *trnI-2* фрагмент ДНК приходится на область интрона гена тРНК.

В-четвертых, было обнаружено, что довольно высокая транскрипция межгенного спейсера, в молодых листьях (на уровне



*rrn16* гена) значительно падает в листьях 18-ти дневных растений (интенсивность транскрипции снижениется в 12 раз).

Таким образом, данная работа показала, что транскрипция генов одного оперона пластома может происходить неравномерно. Более того, даже в пределах одного гена интенсивность транскрипции может значительно различаться. Интенсивность транскрипции межгенного спейсера с возрастом изменялась сильнее, чем транскрипция окружающих его генов.

Наша дальнейшая работа будет направлена на более детальное исследование экспрессии данного оперона, а так же на выяснение причин, которые могли вызвать наблюдаемые нами изменения транскрипции.

## **ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОБЕГОВ НА СЕМЯДОЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТАХ ГОРЧИЦЫ САРЕПТСКОЙ *Brassica juncea* L.**

**Т.Ж. Хоанг, Т.Т. Доан**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева

Научный руководитель – **Г.Н. Ралдугина**, к.б.н.

Горчица сарептская (*Brassica juncea* Czern) является одной из основных масличных и технических сельскохозяйственных культур. Из ее семян получают высококачественное пищевое масло, которое широко используется в пищевых, медицинских и технических целях. Значение этой культуры постоянно требует создания новых сортов, устойчивых к различным биотическим и абиотическим факторам. В настоящее время для создания устойчивых растений широко применяются методы биотехнологии, в частности, методы культуры тканей *in vitro*.

Целью нашей работы была разработка высокоэффективного метода регенерации побегов на семядольных эксплантах проростков различных сортов горчицы сарептской, чтобы получить в дальнейшем трансгенные растения, устойчивые к различным абиотическим факторам.

Известно, что частота регенерации почти для всех видов растений в значительной мере зависит от количества и соотношения регуляторов роста в среде культивирования, а также от генотипа. Известно, что частота и эффективность регенерации может существенно различаться между генотипами в пределах разновидностей.

Объектом исследования служила горчица сарептская пяти сортов (Лера, Славянка, Скороспелка, Люкс, Донская), полученные от сотрудников Ростовской сельскохозяйственной опытной станции.

Семядольные экспланты, срезанные с 5-дневных проростков культивировали на модифицированной питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей ауксины, цитокинины, абсцизовую кислоту (АБК), и борную кислоту ( $HBO_3$ ) в различных концентрациях и соотношениях. Агар Serva пластинчатый в концентрации 0,7% или пищевой чешуйчатый 0,5%. В качестве ауксинов применяли нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрациях 0, 1, 2, 4 мг/л, а в качестве цитокинина – 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрациях 1, 2, 4, 8 мг/л. Содержание АБК во всех вариантах сред 3 мг/л, содержание  $HBO_3$  – 15 мг/л.

Исследования показали, что способность к регенерации зависит главным образом от генотипических особенностей. Среди всех исследуемых генотипов наибольшей способностью к морфогенезу (14,81%) отличался сорт Лера. Экспланты, взятые с проростков сорта Люкс, совершенно не образовывали побегов на всех испытанных средах.

При изучении действия различных регуляторов роста на способность регенерации было установлено, что способность регенерации зависит не только от генотипических особенностей, но и от типа и концентраций регуляторов роста. Присутствие в среде культивирования НУК полностью подавляло побегообразование. Значимым фактором для морфогенеза являлось присутствие в среде БАП. При наличии в среде уже 2 мг/л БАП у всех генотипов кроме сорта Люкс происходила регенерация (3,13% - 6,98%). При увеличении концентрации БАП до 4 мг/л способность к побегообразованию почти у всех генотипов повышалась (9,38%), за исключением сорта Славянка. Добавление в питательную среду АБК значительно увеличивало частоту регенерации побегов при всех концентрациях БАП, достигая у сорта Лера 14,81% при концентрации БАП 4 мг/л и 11,11% при концентрации этого регулятора роста 8 мг/л. Добавление борной кислоты приводило к почти полному подавлению побегообразования. Таким образом, разработан метод получения побегов-регенерантов на семядольных эксплантах горчицы. В настоящее время начаты работы по созданию трансгенных растений *V. juncea*.

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ САЙТОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК У ЛУКА-БАТУНА *Allium fistulosum*

**А.Н.Яцкевич**

Центр молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени  
К.А. Тимирязева

Научный руководитель – **Л.И.Хрусталева**, д.б.н., профессор

Геном лука очень большой и составляет 11,7 пг (Ricroch et al., 2005), для сравнения у человека геном – 3,5 пг, у кукурузы 2,5 пг, у арабидопсиса – 0,16 пг (Патрушев, Минкевич, 2007), и содержит много некодирующей-белок ДНК. Процесс расшифровки генома у видов с крупным геномом – секвенирование - дорогостоящий и трудоемкий, поэтому создание карт сайтов метилирования позволит ускорить этот процесс посредством исключения сильно метилированных сайтов из процесса секвенирования.

Целью наших исследований было создание карты стабильных сайтов метилирования на луке *Allium fistulosum*. В задачу наших исследований входило: 1) отработать методы приготовления препаратов хромосом, пригодных для молекулярно-цитогенетических манипуляций; 2) провести иммунохимическую детекцию сайтов метилирования; 3) провести анализ цитологических препаратов, используя флуоресцентную микроскопию и цифровую обработку изображения с помощью программы AxioVision 4.6; 4) провести измерения сайтов метилирования с использованием программы MicroMeasure; 5) создать карты стабильных сайтов метилирования для 6 и 8 хромосомы лука-батуна.

Для изучения генома лука *Allium fistulosum* использовали семенной материал лука-батуна, взятый из коллекции Котовой и Андреевой. Семена проращивали в термостате при температуре 22° С, проводили предобработку корешков в  $\alpha$ -бром-нафталине с последующей фиксацией в фиксаторе Кларка (3:1). Хромосомные препараты готовили по стандартной методике, методом распластывания клеток. Препараты с хорошими метафазными пластинками использовали для изучения расположения сайтов метилирования. Для этого проводили иммунное детектирование антителами к 5-метилцитозину, конъюгированными с флуорохромом FITC, хроматин окрашивали DAPI. Просматривали препараты на флуоресцентном микроскопе Carl Zeise AxioImager. Нами был проведен количественный анализ сайтов метилирования на митотических метафазных хромосомах. На некоторых хромосомах каждая хроматида измерялась по отдельности, это было в тех случаях, когда по хроматидам наблюдались различия. Измерялись наиболее четкие сайты метилирования.

На хромосоме 6, имеющей спутник, стабильно метилирован дистальный конец короткого плеча, размер бэнда составил в среднем 10,3% хромосомы. Интеркалярных сайтов метилирования на коротком плече не было выявлено. Спутник не имеет четко выраженных сайтов метилирования. На длинном плече стабильно метилирован дистальный участок, длина составляет 16,1% от хромосомы, на трех хромосомах метилированы прицентромерные области – в среднем 18,5% длины хромосомы, на этих же хромосомах метилированы интеркалярные участки – 14,75% хромосомы. В целом по шестой хромосоме метилировано 36,4% длины хромосомы.

На хромосоме 8 стабильно метилирован дистальный конец короткого плеча, размер бэнда в среднем составил 13% от всей хромосомы. Имеется два случая, когда метилировано короткое плечо только на одной из двух хроматид, в этом случае у хроматиды с метилированным коротким плечом неметилированно длинное плечо. В двух случаях были метилированы прицентромерные участки, длина сайта метилирования составила 11,7%, имеется единичный случай интеркалярного метилирования короткого плеча. Длинное плечо стабильно метилировано дистально, длина сайта метилирования составила 15,3% хромосомы, в трех случаях метилированы прицентромерные области, длина участка 13,1%. В целом по восьмой хромосоме метилировано 33% длины хромосомы.

Работа продолжается, планируется создать карты стабильных сайтов метилирования для всех хромосом лука *Allium fistulosum*.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Алешин А.В.</b> Исследование влияния условий длительного космического полета на геном гороха ( <i>Pisum sativum</i> L.)	3
<b>Багдалова А.З.</b> Изучение особенностей культивирования соматических тканей подсолнечника <i>in vitro</i>	4
<b>Баженов М.С.</b> Анатомическое строение стебля гексаплоидной озимой тритикале в связи с продуктивностью колоса	6
<b>Балакина А.А.</b> Технология клонального микроразмножения сортов розы, <i>Rosa</i> x, в промышленном цветоводстве	9
<b>Барташевич Д.А.</b> Влияние теплового шока на экспрессию генов пластома ячменя	11
<b>Бессонова А.А.</b> Цитологическая характеристика дополненных линий культурного томата с хромосомой XI <i>S. lycopersicoides</i>	13
<b>Бочкова Д.М.</b> Анализ семеноводства яровых зерновых культур в саратовской области и пути его улучшения	14
<b>Голубцов С.В.</b> Полиморфизм запасных белков у озимой тритикале разных лет урожая	15
<b>Гущин В.А., Корнеева В.А, Филиппенко Е.В.</b> Мелафен – нанорегулятор роста, влияющий на интенсивность транскрипции генов пластома при деэтиоляции	17
<b>Двинских Л.Н.</b> Изучение мутационной изменчивости гибридов ярового ячменя в M <sub>3</sub> под действием лазерного красного света	19
<b>Динь С.Т.</b> Исследование регенерации <i>in vitro</i> на семядольных эксплантах <i>Brassica integrifolia</i>	21
<b>Дудников М.В.</b> Устойчивость сортов ячменя к полосатой пятнистости листьев ( <i>Drechslera graminea</i> )	23
<b>Елькова В.В., Климентов А.С., Митронина М.А., Чалых Т.Н.</b> Стабильность элементов встроенных конструкций в геноме трансгенной груши при длительном культивировании	25
<b>Елькова В.В., Чалых Т.Н.</b> Использование методики ПЦР в реальном времени для оценки эффективности трансформации петунии способом опыления-оплодотворения с модификациями	27
<b>Жихарев С.Д.</b> Итоги конкурсного испытания перспективных сортов тритикале в условиях ЦРНЗ	29
<b>Золотаренко А.Д.</b> Искусственные нейронные сети: типы, функции, применение	31
<b>Иванникова А.А.</b> Исходный материал для селекции <i>Tanacetum vulgare</i> L. в московской области	32

<b>Исупова И.В., Кислицына Е.С.</b> Хлорофилльные мутанты ярового ячменя	<b>34</b>
<b>Караваева И.В.</b> Изучение коллекции белладонны обыкновенной ( <i>Atropa belladonna</i> L.) в условиях московской области	<b>36</b>
<b>Киров И.В.</b> Подходы к физическому картированию протеин-кодирующих последовательностей днк	<b>39</b>
<b>Климушина М.В.</b> Поиск нуль-аллелей <i>waxy</i> генов среди различных сортов и линий пшеницы	<b>41</b>
<b>Корзунина С.Ю.</b> Оценка сортов жимолости синей на зимостойкость и продуктивность в условиях Кировской области	<b>44</b>
<b>Крупин П.Ю.</b> Цитогенетический анализ сорта Звезда и линий, полученных на её основе	<b>46</b>
<b>Крупин П.Ю.</b> Цитогенетическая характеристика некоторых линий пшенично-пырейных гибридов	<b>49</b>
<b>Майер О.А.</b> Изучение поколений T <sub>0</sub> , T <sub>1</sub> И T <sub>2</sub> трансгенного табака с геном <i>rec-A</i> из <i>E.coli</i>	<b>50</b>
<b>Милехин Ю.В.</b> Исследование генетического полиморфизма сортов и линий гороха посевного ( <i>Pisum sativum</i> L.) с помощью ISSR-маркеров	<b>52</b>
<b>Осипова Е.Ю.</b> Технология размножения гладиолуса <i>in vitro</i>	<b>54</b>
<b>Охалкина Н.А.</b> Изучение действия дальнего красного света на растения кочанного салата (M <sub>2</sub> )	<b>55</b>
<b>Пастухов С.А.</b> Результаты изучения гибридов и образцов картофеля из коллекции полевой станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева	<b>57</b>
<b>Перегудова И.В.</b> Сохранение редких и исчезающих видов растений	<b>58</b>
<b>Пентюхова Е.В., Греченкова Л.А.</b> Анализ состояния качества семян подсолнечника в России и оптимизация процесса сертификации для его повышения	<b>60</b>
<b>Полякова М.Н.</b> Создание и анализ трансгенных растений арабидопсиса и табака с гетерологичным геном ингибитора протеиназ	<b>63</b>
<b>Пугачев А.И.</b> Сроки и способы уборки семенных посевов овсяницы тростниковой	<b>65</b>
<b>Разумова О.В.</b> Нарушение кодоминантного наследования глиадинов в первом поколении при межвидовых скрещиваниях пшеницы	<b>66</b>

<b>Сауткина А.Ю.</b> Результаты конкурсного сортоиспытания сортообразцов люпина узколистного ( <i>Lupinus angustifolius</i> )	<b>68</b>
<b>Семчишкина Г.Н.</b> Влияние формы язычковых цветков на хозяйственные и биологические признаки подсолнечника	<b>70</b>
<b>Семчишкина Г.Н.</b> О возможных причинах подмерзания однолетних побегов катальпы обыкновенной ( <i>C. bignonioides</i> ) в условиях г. Саратова	<b>71</b>
<b>Тихонова Е.В.</b> Оценка сортов озимой тритикале по выполненности зерна в связи с анатомией колосового стержня	<b>73</b>
<b>Трофимова И.А.</b> Получение первичных трансформантов растений табака экспрессирующих гены антимикробных пептидов <i>amp</i> из <i>Stellaria media</i>	<b>75</b>
<b>Уткина Л.Л.</b> Изучение морфогенетического потенциала и физиологических особенностей разных сортов сирени обыкновенной <i>Syringa vulgaris</i>	<b>77</b>
<b>Фрадкина А.А.</b> Особенности регуляции транскрипции генов в составе пластидных оперонов	<b>79</b>
<b>Хоанг Т.Ж., Доан Т.Т.</b> Факторы, влияющие на регенерацию побегов на семядольных эксплантах горчицы сарептской <i>Brassica juncea</i> L.	<b>81</b>
<b>Яцкевич А.Н.</b> Генетическое картирование сайтов метилирования ДНК у лука-батуна <i>Allium fistulosum</i>	<b>83</b>

