

Анализ содержания малонового диальдегида в проростках *Hordeum sativum* после гамма-облучения

Научный руководитель – Комарова Людмила Николаевна

Астахина Светлана Олеговна

Аспирант

Обнинский институт атомной энергетики, филиал «Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Факультет естественных наук, Обнинск, Россия

E-mail: astakhina@list.ru

Ионизирующее излучение оказывает сложное воздействие на живые организмы. При косвенном действии радиации образуются радиотоксины - заряженные ионы, радикалы, высокоактивные вещества перекисного типа, которые повреждают мембранные структуры, и, как следствие, происходит увеличение содержания малонового диальдегида (МДА) [1].

Целью работы являлась оценка действия гамма-излучения в диапазоне доз от 2 до 50 Гр на количественное содержание МДА у пророщенных семян ячменя посевного (*Hordeum sativum*). Для эксперимента было выбрано 2 сорта - Витязь и Ладный. Облучение семян проводили на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» (ФГБНУ ВНИИРАЭ г.Обнинск) на установке «ГУР-120» с источником излучения ^{60}Co в дозах: 2, 5, 10, 15, 20, 25 и 50 Гр с мощностью дозы 58 Гр/ч. После облучения семена проращивались в рулонных культурах по 30 семян в термостате, по 3 рулона на каждую дозу гамма-излучения. На 5 день проращивания переносили рулонные культуры под фитолампу. На 10 сутки проводили измерения количественного содержания МДА в ростках ячменя посевного с помощью тиобарбитуровой кислоты и последующим определением оптической плотности на фотометре КФК-3-01 при длине волны 532 нм.

У пророщенных семян сорта Витязь статистически значимое повышение уровня МДА происходит при облучении в дозах 2, 5, 10, 25 и 50 Гр на 18, 41, 31, 36 и 32% соответственно. У ростков сорта Ладный процесс перекисного окисления липидов идет интенсивнее при гамма-облучении в дозах 2, 5, 10, 25 и 50 Гр на 24, 57, 23, 28 и 42% соответственно.

Можно предположить, что при низких дозах с увеличением поглощенной дозы ионизирующего излучения повышается количество свободных радикалов, что является следствием нарушения антиоксидантно-прооксидантного гомеостаза и представляет собой важный компонент фенотипической адаптации [2]. При облучении в дозах 15 Гр и 20 Гр формируются адаптационно-приспособительные признаки: модулируется антиоксидантная и фитогормональная системы, усиливается интенсивность работы пентозофосфатного пути окисления глюкозы, который участвует в защите клетки от радиационно-индуцированного апоптоза [3]. Дальнейшее увеличение поглощенной дозы ионизирующего излучения вызывает крупномасштабные повреждения в мембранах, нарушая их функции и повышая содержание МДА.

Источники и литература

- 1) Кияк Н.Я. Действие свинца на интенсивность процессов ПОЛ на разных этапах развития гаметофита мха *Fumaria hygrometrica* Hedw // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: тез. докл. науч. конференции. Сыктывкар. 2007. С. 187-189.

- 2) Ерофеева Е.А. Гормезис и парадоксальные эффекты у растений в условиях автотранспортного загрязнения и при действии поллютантов в эксперименте. дис. д. биол. наук. Нижний Новгород, 2016. 184 с.
- 3) Волкова П.Ю. Адаптивные реакции растений на действие ионизирующего излучения в низких дозах: дис. д. биол. н. Обнинск. 2020. 390 с.

Наночастицы оксида железа (Fe_3O_4) снимают ингибирующее действие солевого стресса на фотохимическую активность фотосистемы 2 в растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

Научный руководитель – Креславский Владимир Данилович

Дижун В.В.¹, Моисеевкова А.А.², Кузнецова А.С.³, Строкина В.В.⁴

1 - Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина, Естественно-географический факультет, Рязань, Россия, *E-mail: vikadikvit578@gmail.com*; 2 - Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина, Естественно-географический факультет, Рязань, Россия, *E-mail: vikadikvit578@gmail.com*; 3 - Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина, Рязань, Россия, *E-mail: vikadikvit578@gmail.com*; 4 - Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия, *E-mail: vikadikvit578@gmail.com*

Наночастицы (НЧ) находят все более широкое применение в сельском хозяйстве, однако их использование ограничено слабым знанием механизмов и путей их действия. Одним из таких перспективных наноэлементов является железо, которое используется в форме оксида железа (Fe_2O_3 или Fe_3O_4) [1,2]. Известно, что железо играет ключевую роль в регуляции роста и развития растений и многочисленных процессах метаболизма, включая биосинтез хлорофилла, фотосинтез и темновое дыхание [2]. В меньшей степени изучено действие наножелеза, снимающее негативный эффект тех или иных стрессовых факторов, в частности засоления. В этой связи было исследовано одновременное действие НЧ оксида железа (Fe_3O_4) и солевого стресса, индуцированного NaCl , на рост, фотосинтетическую активность, дыхание и про-/антиоксидантную активность в проростках пшеницы.

Использовали растворы наночастиц (НЧ) оксида железа в концентрации 200 и 500 мг/л. Семена пшеницы обрабатывали с использованием шейкера в течение 3 ч. Затем выращивали в чашках Петри в течение 6 дн. на белом свете. После чего часть семян выращивали в растворе NaCl (0.1 и 0.25 М) в течение 6 дн. и в 12-дн. растениях определяли физиологические параметры.

Показано, что параметры флуоресценции - максимальный квантовый выход (F_v/F_m) и индекс производительности фотосистемы 2 (ФС2) (PIABS), характеризующие активность ФС2, снижаются в вариантах, где проростки обрабатывали 0.25 М NaCl . Так величина PIABS снижалась с 28.8 ± 1.8 до 13.1 ± 0.6 . Обработка семян 200 мг/л Fe_3O_4 мало влияла на эти параметры. Однако совместная обработка 0.25 М NaCl и 200 мг/л Fe_3O_4 приводила к достоверно меньшему снижению PIABS до 19.9 ± 2.2 , чем обработка только 0.25 М NaCl . Аналогичные тенденции обнаружены и по другим параметрам, таким как тепловая диссипация (D_{I_0}/RC), эффективный квантовый выход ФС2, скорость электронного транспорта, и нефотохимическое тушение NPQ. Скорости фотосинтеза и дыхания, а также сырой вес проростков снижались только во всех вариантах с обработкой 0.25 М NaCl . При этом не обнаружено снятие ингибирующего действия NaCl у проростков в вариантах с обработкой семян 200 и 500 мг/л НЧ.

Показано, что содержание хлорофилла а и b, а также каротиноидов в 9 и 12-дн. растениях не зависит от обработки семян НЧ (200 и 500 мг/л) и от обработки растений NaCl (0.1 М и 0.25 М).

Совместная обработка пшеницы 0.25 М NaCl и семян 200 мг/л Fe_3O_4 приводила к снижению содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой с 184 нмоль/г до 107 нмоль/г, то есть снижению окислительного стресса. Другие варианты мало отличались друг от друга.

Таким образом, обнаружено снятие ингибирующего действия солевого стресса на фотохи-

мическую активность ФС2 в проростках пшеницы при обработке НЧ.
Работа поддержана грантом РФФИ №21-54-53015 ГФЕНа.

Источники и литература

- 1) Alkhatib R., Alkhatib B., Abdo N. // BMC Plant Biology. – 2019. – V. 19. – P. 53.
- 2) Farooqui A., Tabassum H., Ahmad A. et al. // International Journal of Pharmaceutics. – 2016. – V. 7. – P. 22–37.

**Индукция защитной системы картофеля энтомопатогенными бактериями
Bacillus thuringiensis при заражении *Rhizoctonia solani***

Научный руководитель – Цветкова Вера Павловна

Масленникова Владислава Сергеевна

Аспирант

Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирская область, Россия

E-mail: vladislava.maslennikova@mail.ru

Бактерия *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) используется в мире в качестве продуцента инсектицидных средств защиты растений. На её основе разработан ряд отечественных и зарубежных препаратов: битоксибациллин, лепидоцид, дипел, и др. Обнаружены штаммы *Bt*, запускающие в растениях системную устойчивость к патогенам [1] и характеризующиеся определенной степенью эндофитности [2]. Имеются также данные об антибиотическом действии на фитопатогенные грибы спорокристаллического комплекса *Bt* [3] и дельта-эндотоксинов подвидов *finitimus*, *wuhanensis* [4]. Тем не менее, возможности применения *Bt* в борьбе с грибными фитопатогенами остаются малоизученными. Изучение ответных реакций растений на воздействие грибных патогенов представляет научный интерес и позволяет лучше понять закономерности функционирования растительного организма и его иммунитета.

Целью работы является оценка биохимических показателей картофеля при заражении *Rhizoctonia solani* и воздействии *Bacillus thuringiensis*.

Опыты были проведены на базе лаборатории биологической защиты и биотехнологии НГАУ в 2020 году. Объектами исследований являлись: фитопатогенный гриб *Rhizoctonia solani*, энтомопатогенный штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* spp. *morrisoni* ($2,7 \times 10^6$ КОЕ/мл), сорт картофеля Тулеевский). Клубни культивировались в пластиковых горшках в боксах при температуре $+24 \pm 1$ °C, фотопериоде 16/8 часов: свет/темнота. Схема эксперимента включала контрольный вариант (без заражения), клубни, заселенные *Rhizoctonia solani* и обработку клубней (заселенных *Rhizoctonia solani*) *B. thuringiensis* перед посадкой.

Пробы для определения биохимических показателей отбирались у растений на 4-ю неделю после посадки. Определение биохимических показателей (фотосинтетические пигменты, ферменты, малоновый диальдегид) [5] проведено методом спектрофотометрии с помощью планшетного ридера Thermo Scientific Varioskan LUX. Данные анализировали с помощью GraphPad Prism v8.0.

При искусственном заражении растений картофеля фитопатогенным грибом отмечено снижение концентрации хлорофилла а и b в 1,1-1,2 раза, а так же белка - на 11%, относительно контроля. Установлено, что гриб *Rhizoctonia solani* вызывает в листьях картофеля окислительный стресс, выявленный по усилению активности пероксидазы, которая возрастала в 1,4 раза ($p < 0,05$). Концентрация малонового диальдегида увеличилась на 42,5 % ($p = 0,0009$) относительно контроля. Этот факт может свидетельствовать о фитоиммунологическом ответе клеток на контакт с микробным агентом. При обработке *B. thuringiensis* vs. *morrisoni* отмечено увеличение концентрации хлорофилла а в листьях картофеля до 30,7 мг/г по сравнению с контрольным вариантом, где его концентрация составила 25,3 мг/г. Активность полифенолоксидазы как без заражения, так и на фоне *Rhizoctonia solani* была на уровне с контролем ($p = 0,0121$), что не позволяет считать данный фермент биохимическим маркером патологического процесса при ризоктониозе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-316-90006.

Источники и литература

- 1) Hyakumachi M., Nishimura M., Arakawa T., Asano S., Yoshida S., Tsushima S., Takahashi H. Bacillus thuringiensis suppresses bacterial wilt disease caused by Ralstonia solanacearum with systemic induction of defense-related gene expression in tomato // Microbes Environ. 2013. Vol. 28(1). P. 128-134
- 2) Melatti VM, Praça LB, Martins ES, Sujii E, Berry C, Monnerat RG (2010). Selection of Bacillus thuringiensis strains toxic against cotton aphid, Aphis gossypii Glover (Hemiptera: Aphididae), BioAssay, 5(2):1-4
- 3) Гришечкина, С.Д. Перспективы применения Bacillus thuringiensis против некоторых фитопатогенных грибов / С.Д. Гришечкина, О.В. Смирнов, Н.В. Кандыбин // Тезисы докладов 2-го Всероссийского съезда по защите растений. - СПб. - 2005. - С.155-157.
- 4) Юдина, Т.Г. Антимикробная активность белковых включений различных бактерий/ Т.Г.Юдина, Н.С.Егоров //Доклады Академии Наук. 1996. - Т.349. -№2. - С.283-286.
- 5) Курганова Л.Н., Веселов А.П., Сеницына Ю.В., Еликова Е.А. Продукты перекисного окисления липидов как возможные посредники между воздействием повышенной температуры и развитием стресс-реакции у растений // Физиология растений. 1999. -Т. 46. -№ 2. - С. 218-222

Разработка тест-системы для определения аллельных вариантов локусов, отвечающих за окраску луковиц *Allium* сера L.

Научный руководитель – Усатов Александр Вячеславович

Митюков В.Д.¹, Стручкова А.В.²

1 - Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра генетики, Ростов-на-Дону, Россия, *E-mail: vd.mityukov@yandex.com*; 2 - Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра генетики, Ростов-на-Дону, Россия, *E-mail: vd.mityukov@yandex.com*

Окраска луковиц у *Allium* сера L. контролируется пятью локусами (I, C, G, R и L), в результате сложного эпистаза проявляются различные варианты красной, желтой и белой окраски. На данный момент науке точно не известны все гены-кандидаты, отвечающие за различные проявления окраски, а также их аллельные варианты [1]. Так, например, локусы R и L отвечают за проявление различных вариантов красной окраски, доминантный генотип RRLl отвечает за красную окраску, рецессивный rrlL отвечает за желтую, различные варианты гетерозигот отвечают за различные варианты розовой.

Одной из проблем в селекции, как красного, так и желтого лука является появление при гибридизации в потомстве розового лука. Это затрудняет получение селекционных линий, а также в случае линий желтого лука, негативно отражается на продаже готовых луковиц, так как невозможно по внешним признакам определить внутреннюю окраску луковицы [1]. Существует потребность со стороны селекционеров России и всего мира в тест-системе, определяющей аллельные варианты локусов, отвечающих за окраску лука репчатого для массового генотипирования.

В связи с этим, целью данной работы являлась разработка тест-системы для определения локусов, отвечающих за окраску луковиц.

Объектом исследования служили отечественные селекционные линии лука репчатого с различными окрасками луковиц: красного, розового, желтого и белого. ДНК выделяли согласно инструкции с помощью коммерческого набора DNeasy Plant mini (Qiagen, США). Для ПЦР использовали набор ScreenMix HS, а для ПЦР в режиме реального времени - qPCRMixSYBR HS (Евроген, Россия). Полученные ПЦР продукты разделяли в 1.5% агарозном геле.

Изменение цвета луковиц связано с мутациями в структурных генах пути биосинтеза флавоноидов. В ходе данной работы мы сравнили эффективность ДНК-маркеров на различные гены этого пути: *DFR*, *ANS* и *F3H*, а так же маркеров, которые заявлены как связанные с локусами I, C и G. Мы исследовали различные варианты маркеров InDel, CAPS и HRM доступные на данный момент. В результате исследования все маркеры на локусы I и C показали доминантный генотип во всех контрольных образцах, что теоретически невозможно. Поэтому нам не удалось включить в тест-систему маркеры для определения белой окраски.

Напротив, маркеры на локусы R (ген *DFR*) и L (ген *ANS*) показали различные результаты. Наиболее эффективными показали себя маркеры HRM-DFR и HRM-ANS. Они показали точность 94 и 93% соответственно. Наименее эффективными оказались маркеры ANS-h и DFR-D, точность 64 и 62% соответственно.

Интересно отметить, что в ходе апробации различных маркеров локуса R на отечественных линиях лука нами был обнаружен новый, ранее не охарактеризованный аллельный вариант гена *DFR*.

Нами предлагается использование маркеров HRM-DFR и HRM-ANS, как маркеров для массового генотипирования растений, так как они показали наиболее точные результаты при наименьших временных затратах.

Источники и литература

- 1) Khandagale K., Gawande S. Genetics of bulb colour variation and flavonoids in onion //The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. – 2019. – Т. 94. – №. 4. – С. 522-532.

Влияние дефицита кислорода на метильный статус промотора гена *gdh-2* глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы (*Zea mays* L.)

Научный руководитель – Епринцев Александр Трофимович

Москвина П.П.¹, Анохина Г.Б.², Оя П.С.³

1 - Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, *E-mail: polinamoskvina2001@gmail.com*; 2 - Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, *E-mail: polinamoskvina2001@gmail.com*; 3 - Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, *E-mail: polinamoskvina2001@gmail.com*

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, L-глутамат: NAD(P)-оксидоредуктаза, КФ 1.4.1.3) - энзим класса оксидоредуктаз, катализирующий обратимую реакцию восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до L-глутамата [1]. Ген *gdh-2* (LOC100193614) локализован в 10 хромосоме и кодирует α -субъединицу ГДГ кукурузы.

В качестве объекта использовались 10-дневные проростки кукурузы сорта Воронежская-76, выращенные гидропонно. Контрольная группа помещалась в вакуум-эксикатор с постоянным притоком кислорода воздуха. Опытная группа находилась в вакуум-эксикаторе, куда непрерывно подавался азот. Активность ГДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм по реакции аминирования путем регистрации окисленного НАД⁺ [2]. Конверсия ДНК проводилась с использованием NaHSO₃ [3]. Для исследования метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в промоторах исследуемых генов проводили метил-специфичную ПЦР с применением ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва), используя в качестве матрицы ДНК, модифицированную NaHSO₃.

В ходе исследования было установлено, что инкубация проростков в условиях гипоксии вызывает увеличение ферментативной активности ГДГ. Анализ динамики относительного уровня транскриптов гена, кодирующего α -субъединицу ГДГ - *gdh-2* показал, что в первые часы дефицита кислорода ген инактивируется (Рис. 1). На 6 час воздействия зарегистрирован минимальный уровень мРНК данного гена.

Транскрипция генов может регулироваться за счет изменения величины метильного статуса как отдельных CpG - динуклеотидов, так и целых CpG-островков [4]. Анализ промотора гена *gdh-2* на наличие CpG-островков показал, что в нем находится два островка размером 404 и 383 п.н.

В результате проведения метил-специфичной ПЦР выявили корреляцию между динамикой транскрипционной активности гена *gdh-2* и модуляциями метильного статуса исследуемых CpG-динуклеотидов. Инактивация гена *gdh-2* с первого часа нахождения в условиях гипоксии была обусловлена метилированием CpG-динуклеотидов в составе его промотора до 75% (Рис. 1). У контрольной группы растений степень метилирования промотора в условиях нормоксии составляла 25%.

Таким образом, модуляции в метильном статусе исследуемых CpG-динуклеотидов промотора гена *gdh-2* в условиях действия гипоксии, сопряженные с изменением их транскрипционной активности, указывают на существенную роль эпигенетического механизма в регуляции активности глутаматдегидрогеназы.

Источники и литература

- 1) Forde B. G., Lea P. J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling // Journal of experimental botany. – 2007. – V. 58. – №. 9. – P. 2339-2358.

- 2) Sarasqueta Gómez A. et al. Nitrogen Source and External Medium pH Interaction Differentially Affects Root and Shoot Metabolism in Arabidopsis// Front. Plant Sci.. 2016. – V. 7. – P. 1–12.
- 3) Hsieh C. L. Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation //Molecular and cellular biology. – 1999. – V. 19. – №. 1. – P. 46-56.
- 4) Кирнос М. Д., Александровичкина Н. И., Ванюшин Б. Ф. 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования //Биохимия. – 1981. – Т. 46. – №. 12. – С. 1458-1474.

Иллюстрации

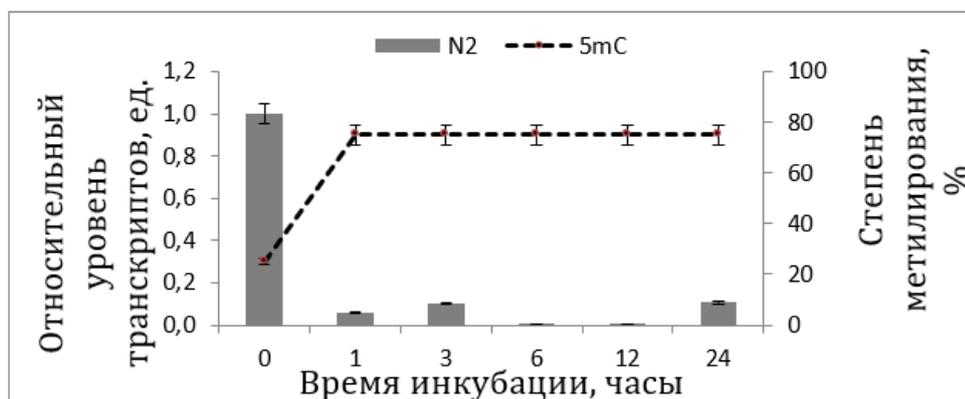


Рис. 1. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *gdh-2* (N2) от степени метилирования его промотора (5mC) в проростках кукурузы в условиях дефицита кислорода

Оценка свободнорадикальных процессов у *Hordeum vulgare* при воздействии оксида и нанooksида цинка

Научный руководитель – Вечканов Евгений Михайлович

Нефедова Анна Сергеевна

Студент (бакалавр)

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра биохимии и микробиологии, Ростов-на-Дону, Россия
E-mail: amanchenko@sfedu.ru

В настоящее время проблема загрязнения окружающей среды стоит достаточно серьезно, поскольку результатом активной деятельности человека является попадание и дальнейшая аккумуляция поллютантов в почве, например, тяжелых металлов и их нанoформ. Ячмень является важной сельскохозяйственной культурой для Ростовской области, так, в 2020 году урожай озимого и ярового ячменя в ходе уборочной кампании в сумме по региону составил 9,285 тысяч центнеров. *H. vulgare* активно используется как тест-объект, так как имеет большое значение для сельского хозяйства. На данный момент в связи с активным развитием промышленных предприятий и увеличения автотранспортного потока, проблема загрязнения почв тяжёлыми металлами является весьма актуальной. Однако информации о воздействии наноматериалов и частиц на окружающую среду по-прежнему недостаточно. Цель работы заключалась в исследовании биохимических показателей свободнорадикальных процессов у *H. vulgare* при воздействии оксида цинка и нанooksида цинка. Был заложен модельный вегетационный опыт, тестовой культурой был избран *H. vulgare*. Растения выращивались в условиях гидропоники на питательном растворе в течение 7 дней. Загрязнение почвы осуществлялось оксидом цинка и нанooksидом цинка в концентрации 300 мг/кг и 2000 мг/кг металла, контрольный образец не загрязнялся. Определение активности СОД проводилось методом Сироты Т.В. [1] с использованием нитротетразолия синего. Интенсивность окраски измеряли при 540 нм.

По результатам оценки зависимости активности биохимических показателей от концентрации оксида цинка и его нанoформы было выявлено наличие окислительного стресса у ячменя обыкновенного при воздействии оксида цинка и его нанoформы. *H. vulgare* накапливает тяжелые металлы в корнях, что проявляется в виде повышения активности СОД именно в корнях, по сравнению с листьями. При концентрациях 2000 мг/кг и 2000 нано мг/кг наблюдается падение активности СОД относительно контроля. Нанoформа оксида цинка влияет на исследуемые показатели неоднозначно. Для того, чтобы сделать однозначные выводы о влиянии нанoформы оксида цинка на *H. vulgare*, необходимо продолжить исследование и получить больше данных. Полученные результаты имеют большую практическую значимость ввиду широкого использования ячменя в сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по поддержке молодежной лаборатории “Агробиотехнологии для повышения плодородия почв и качества сельскохозяйственной продукции” в рамках программы развития межрегионального научно-образовательного центра Юга России (ЛабНОЦ-21-01АБ).

Источники и литература

- 1) Сирота Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т 45, № 3. – С. 109–116.

**Биохимический состав плодов томата при выращивании в условиях
светокультуры**

Научный руководитель – Тараканов Иван Германович

Товстыко Дарья Андреевна

Аспирант

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева,
Агрономии и биотехнологии, Физиологии растений, Москва, Россия

E-mail: tov.dasha@mail.ru

В целях достижения максимальной продуктивности растений и высокого качества с.-х. продукции в настоящее время широко применяют светокультуру растений. Появляющиеся новые технологии светодиодного освещения стимулируют исследования по разработке оптимизированных источников облучения для получения биомассы растений, биосинтеза целевых соединений и других биотехнологических применений [1,2].

Наши фотобиологические исследования были направлены на изучение возможности регуляции физиолого-биохимических процессов растений томата с использованием светодиодного освещения. Научно-исследовательскую работу проводили в Лаборатории искусственного климата РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева. Томат выращивали вегетационным способом, используя светодиодные источники облучения, отличающиеся между собой по фотопериоду (от 12 до 24 часов) и интенсивности облучения (220 и 400 мкмоль/м²*с). Объектом исследования послужили растения томата линии № 1, которая была выведена в Лаборатории искусственного климата РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева. Томат крупноплодный, детерминантного типа, низкорослый и ультраскороспелый.

Проведенное исследование показало, что повышение интенсивности облучения от 220 до 400 мкмоль/м²*с может способствовать высокому накоплению аскорбиновой кислоты (до 69,3 мг/100 г) и снижению сахаристости плодов томата (с 7% до 5%). А по мере сокращения светового периода (с 24 ч до 12 ч) и при интенсивности облучения 220 мкмоль/м²*с в плодах томата увеличивалось содержание β-каротина (от 131,9 до 156,7 мг/л) и ликопина (от 222,6 до 331,8 мг/л). По физиологическому развитию растений и лучшему накоплению сухих веществ можно выделить наиболее оптимальные режимы для растений томата это - фотопериоды 12 и 18 часов с интенсивностью облучения 400 и 220 мкмоль/м²*с соответственно. Полученные данные дают материалы для физиологического обоснования технологии светокультуры томата в системах интенсивного культивирования.

Источники и литература

- 1) Prikupets L.B. Photobiological research – a way to optimize LED’s plant lighting / Prikupets L.B., Boos G.V., Shakhparunyants A.G., Bartsev A.A., Terekhov V.G., Tarakanov I.G. / Proceedings of 29th CIE session, Washington, DC, 2019, p. 1823-1831.
- 2) Tarakanov, I.G.; Kosobryukhov, A.A.; Tovstyko, D.A.; Anisimov, A.A.; Shulgina, A.A.; Sleptsov, N.N.; Kalashnikova, E.A.; Vassilev, A.V.; Kirakosyan, R.N. Effects of Light Spectral Quality on the Micropropagated Raspberry Plants during Ex Vitro Adaptation. Plants 2021, 10, 2071. [https:// doi.org/10.3390/plants10102071](https://doi.org/10.3390/plants10102071)

Сравнительный анализ эффективности ДНК-маркеров локуса Ms, контролирующего восстановление фертильности пыльцы у лука репчатого (*Allium cepa* L.)

Научный руководитель – Усатов Александр Вячеславович

Шлык А.Е.¹, Неуров А.М.², Фаддеева Е.А.³

1 - Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра генетики, Ростов-на-Дону, Россия, *E-mail: shlyk.nastya@inbox.ru*; 2 - Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра генетики, Ростов-на-Дону, Россия, *E-mail: shlyk.nastya@inbox.ru*; 3 - Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра генетики, Ростов-на-Дону, Россия, *E-mail: shlyk.nastya@inbox.ru*

Лук - широко используемая культура; кроме того, это двулетнее растение, что делает процесс селекции более сложным и трудоемким. Тем не менее, маркерная селекция с использованием ЦМС линий позволяет решить эту проблему, но для ее использования важно не только определение типов ЦМС, но также и аллельных вариантов генов-восстановителей [1]. Кроме того, большинство разработанных маркеров малоэффективны или требуют много времени и ресурсов, что делает их неприменимыми в процессе массового генотипирования растений. Основная селекция на луке ведется с использованием ЦМС S типа. Ms локус восстанавливает данный тип цитоплазмы, и на данный момент существует множество ДНК-маркеров для определения его аллельных вариантов [2].

Поэтому целью данной работы являлось определение наиболее эффективных ДНК-маркеров локуса Ms, для дальнейшего их использования в массовом генотипировании отечественных сортов и гибридов лука репчатого.

Материалом исследования служили отечественные сорта и гибриды лука репчатого. Для исследования эффективности ДНК-маркеров локуса Ms как контроли использовали 18 селекционных линий с заранее известным генотипом. ДНК выделяли из сочной чешуи с помощью коммерческого набора DNeasy Plant mini (Qiagen, США). Для ПЦР использовали набор ScreenMix HS, а для ПЦР в режиме реального времени - qPCRMixSYBR HS (Евроген, Россия). Для CAPS маркеров обработку ферментами рестрикции производили согласно инструкции. ПЦР продукты разделяли в 1.5% агарозном геле.

В ходе исследования нами были проанализированы следующие маркеры InDel: PMS1, SKP1, AcCN, OPT, PsaO, RF 15334, RF 28184, RF 31446, jnurf 13; CAPS: RF 23881, RF 25191, RF 26780; Realtime: HRM1, HRM5, HRM7, HRM8. В результате было обнаружено, что маркеры HRM1 и HRM2 во всех образцах показывали генотип MsMs, а RF 25191 - генотип msms. В ходе амплификации маркеров RF 26780 и RF 28184 отсутствовал специфический продукт реакции. Наиболее низкую эффективность показали маркеры RF 26780, OPT и PsaO - 75, 64 и 60% соответственно.

Интересно отметить тот факт, что маркеры AcCN и SKP1, состоящие из 4 праймеров, показали эффективность 80%, а если реакцию на каждую аллель проводить индивидуально, то эффективность повышалась до 90 и 95%, соответственно.

В результате наиболее эффективными оказались маркеры PMS, HRM7, RF 23881, RF 25191, jnurf 13, они показали точность более 94%. Так как маркер jnurf 13 требует очень трудоемкого разделения в полиакриламидном геле, а маркеры RF 23881, RF 25191 требуют пост-амплификационной обработки рестриктазами, что значительно увеличивает время на получение результата генотипирования. Поэтому нами предлагается использование двух маркеров PMS1 и HRM7 для массового генотипирования растений лука репчатого.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в области научной деятельности № 0852-2020-0029.

Источники и литература

- 1) Khosa J. S. et al. Enhancing onion breeding using molecular tools // Plant Breeding. – 2016. – Vol. 135. – №. 1. – P. 9-20.
- 2) Yu N., Kim S. Identification of Ms2, a novel locus controlling male-fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.), and development of tightly linked molecular markers // Euphytica. – 2021. – Vol. 217. – №. 10. – P. 1-11.

Методика сравнительного анализа проростков табака *in vitro* на устойчивость к засолению

Научный руководитель – Баранова Екатерина Николаевна

Южаков Денис Дмитриевич

Аспирант

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Почвоведения, агрохимии и экологии, Микробиологии и иммунологии, Москва, Россия
E-mail: dragon_slave95@mail.ru

При сравнительной оценке растений на солеустойчивость необходимо создавать и поддерживать контролируемые постоянные условия для получения достоверных экспериментальных данных. Метод *in vitro* позволяет выращивать растения в контролируемых условиях, но тем не менее, у данной системы имеется свой недостаток, так как неоднородный по габитусу и стадии развития растительный материал существенно искажает получение соответствующих экспериментальных данных. Целью данной работы было апробирование методики для сравнительного изучения *in vitro* солеустойчивости табака с использованием верхней части проростка на стадии формирования первого листа с отсечёнными корнями. Ранее он применялся на растениях томата [2]. Объектами исследований были нетрансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.), сорт Petit Havana, и его трансгенная линия, экспрессирующая ген *FeSOD1* из *Arabidopsis thaliana* (L.) [1].

Через неделю культивирования на питательной среде Мурасиге и Скуга у асептических проростков на стадии формирования первого настоящего листа отсекали корни и часть гипокотыля, после чего переносили на питательную среду 1/2 Мурасиге и Скуга с добавлением 0 - 150 мМ NaCl. Через 8 дней культивирования оценивали ряд морфологических характеристик и содержание хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов.

В ходе морфометрического исследования были выявлены резкие генотипические различия по количеству регенерирующих корней и их длине. Наименьшая концентрация NaCl (25 мМ) приводила к достоверному снижению количества регенерированных корней у нетрансгенных растений и уменьшению их длины. Показатели сырой и сухой массы корней трансгенных и нетрансгенных растений изменялись при добавлении соли, как и соответствующие показатели побеговой части - показано, что наиболее резко между собой трансгенные и нетрансгенные растения табака различаются по показателю по сухой биомассы проростка. Достоверное снижение содержания хлорофилла *a* у нетрансгенных растений по сравнению с трансгенными происходило при культивировании проростков табака на среде 150 мМ NaCl. Засоление не изменило содержание хлорофилла *b* и значительно повысило концентрацию каротиноидов у обоих генотипов.

Таким образом, предложенная методика позволила выявить достоверные различия между трансгенными и нетрансгенными растениями табака по морфологическим и физиолого-биохимическим параметрам. Представленный метод может быть использован при оценке *in vitro* других видов растений.

Источники и литература

- 1) Baranova E. N. et al. Activity of the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* plants, with *FeSOD1* gene // Russian agricultural sciences. 2010, №4 (36). p. 242-249.

- 2) Khaliluev, Marat R., Liliya R. Bogoutdinova, Galina N. Raldugina, and Baranova E. N.: 2022. A Simple and Effective Bioassay Method Suitable to Comparative In Vitro Study of Tomato Salt Tolerance at Early Development Stages // Methods and Protocols. 2022, №1 (11). p.11

Особенности энергетического метаболизма митохондрий клубней картофеля сорта Скарб трансформированного геном глюкозооксидазы (GOX) *Penicillium funiculosum*

Научный руководитель – Яковенко Ксения Витальевна

Яковенко Ксения Витальевна

Выпускник (бакалавр)

Иркутский государственный университет, Биолого-почвенный факультет, Иркутск,
Россия

E-mail: ksenkayak20214@mail.ru

Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) митохондрий растений содержит НАД(Ф)Н-ДГ типа II и альтернативную цианид-резистентную оксидазу (АО), которые вместе с разобщающими белками (рUCP) могут регулировать образование активных форм кислорода (АФК) в клетках растений [3]. Увеличение содержания H_2O_2 в клетках можно вызвать путем введения гена глюкозооксидазы *gox* в геном растения [1, 2]. В связи с этим, целью работы явился сравнительный анализ функциональной активности митохондрий и альтернативных ферментов дыхания в клубнях картофеля сорта Скарб с измененным уровнем экспрессии гена глюкозооксидазы (*gox*) из *Penicillium funiculosum* в разные периоды хранения.

В задачи исследования входило: охарактеризовать митохондрии из свежих и хранящихся клубней с измененным уровнем экспрессии *gox*; оценить влияние различий в активности GOX на вклад в дыхание и содержание в митохондриях NDB, АО, UCP белков, определить содержание АФК и активность антиоксидантного фермента каталазы в хранящихся клубнях картофеля.

В работе использовали клубни 4-х линий картофеля: СК (не трансформированный картофель сорта Скарб), рVI-трансформированный пустым вектором, L-трансформированный геном с векторной конструкцией рVI-L-GOX, M-с конструкцией рVI-GOX-mod. Трансгенные растения картофеля были получены методом агробактериальной трансформации [1]. Качественное определение GOX проводили с помощью чашечного теста [2]. Для количественного - растительный экстракт инкубировали 1 ч. в буфере, содержащем 50 мМ KI, 1% крахмала и 200 мМ D-глюкозы, и измеряли ОП при 595 нм. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования. Интенсивность их дыхания регистрировали полярографически. Содержание белков в митохондриях определяли с помощью электрофореза в ПААГе с ДДС-Na с последующим вестерн-блоттингом.

Активность GOX была выявлена в клубнях картофеля линий L и M.

Митохондрии из свежесобранных клубней линий рVI и L с высокой скоростью окисляли НАДН и сукцинат, в хранящихся клубнях эта тенденция сохранялась, но скорость окисления снижалась. Хранение клубней на холоду приводило к увеличению содержания в митохондриях NDB и UCP и снижению содержания белка теплового шока.

В клубнях линии M было выявлено низкое содержание H_2O_2 , несмотря на высокую активность GOX. Выявлена сниженная активность каталазы у линий L и M.

Введение в геном картофеля сорта Скарб гена *gox* приводит к увеличению содержания в митохондриях при хранении на холоду белков, участвующих в реализации защитной программы клеток растений при стрессах.

Источники и литература

- 1) Савчин Д.В. Оптимизация кодового состава грибного гена *gox* *Penicillium funiculosum* для эффективной экспрессии в растениях *Solanum tuberosum* // Весці НАН Беларусі. Сер. Біял. навук. 2015. № 1. С. 50–55.
- 2) Савчин Д.В. Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном *gox* *Penicillium funiculosum* // Савчин Д.В. Сб. науч. тр. Минск, 2011. Т. 12. С. 49–55.
- 3) Grabelnych O.I. Biological effects of potato plants transformation with glucose oxidase gene and their resistance to hyperthermia // Journal of Stress Physiol. & Biochem. 2017. V. 13, N 1. P. 5–14.