

## **162. Разработка ускоренных методов для исследования микроорганизмов, новых сортов сельскохозяйственных растений, плодовых, ягодных и технических культур, оценки устойчивости технических культур к вирусам и вириодам методами электрофореза белков и ДНК-технологий, а также анализа кормовых добавок, отходов животноводства экспресс-методами //Отчет о НИР за 2014 г (ФГБОУ ВПО ОрелГАУ)**

**РАЗРАБОТЧИК:** ФГБОУ ВПО «ОрелГАУ» (Российская Федерация, 302019, Орловская обл, Орел г, Генерала Родина, 69. Тел./факс: +7 (4862) 429321. e-mail: [zakupki-osau@orelsau.ru](mailto:zakupki-osau@orelsau.ru))

Исследование протеома — совокупности белков клетки, составляющих транскрибируемую часть генома, открывает новые возможности для идентификации генов, связанных с определенными функциональными состояниями отдельной клетки и организма в целом.

Защитные белки определяют устойчивость растений к патогенам (грибам, бактериям, вирусам, вириодам) и насекомым-вредителям. Изучение защитных белков имеет фундаментальное значение для выяснения молекулярных механизмов врожденного иммунитета растений. Такие исследования имеют и большое практическое значение, поскольку потери урожая, вызванные патогенами, достигают 45% и оцениваются в трлн. рублей ежегодно.

Изучение пептидов, обладающих широким спектром антимикробного действия, представляет особый интерес для создания устойчивых форм растений, поскольку их гены могут быть непосредственно встроены в геном чувствительных к патогенам растений с использованием методов генетической трансформации. Кроме того, антимикробные пептиды растений рассматриваются в качестве альтернативы традиционно используемым антибиотикам и антимикотикам, что особенно актуально в связи с появлением большого количества устойчивых форм патогенов. В связи с этим поиск новых высокоактивных пептидов представляется чрезвычайно актуальным.

В последнее время, особенно важное значение приобрела мозаичная желтуха ячменя. Возбудителем болезни являются вирусы Barley yellow mosaic virus (BaYMV), Barley mild mosaic virus (BaMMV), Barley yellow mosaic virus-2 (BYMV-2), которые вызывают почти одинаковые симптомы болезни на растениях ячменя и переносятся грунтовым грибом *Polymyxa graminis* Led. В качестве единственной успешной меры борьбы с мозаичной желтухой, зарекомендовало себя внедрение устойчивых к вирусу сортов ячменя, в связи с чем нами проводится поиск доноров устойчивости ячменя к мозаичной желтухе, на основе ДНК-технологий.

Фитофтороз - болезнь, в том числе картофеля, против которой нет фунгицидов с лечебным действием, поэтому успех борьбы с болезнью зависит от проведения профилактических мероприятий, снижающих её вредоносность. В связи с этим методом ДНК-технологий и ИФА разрабатываются приемы довизуальной диагностики поражения растений возбудителями болезней. Это позволит проводить браковку потенциально больных растений, подбирать доноры устойчивости для селекции, контролировать создание биотехнологической продукции.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ:** разработать новую ускоренную методику идентификации по молекулярным маркерам и антигенной структуре биологического материала, сортов и образцов с/х растений и микроорганизмов.

**ЗАДАЧИ исследования:**

1. Провести электрофорез запасных белков семян ячменя, овса и картофеля и выявить белковые маркеры хозяйственно-полезных признаков.

2. Провести маркирование генов устойчивости ячменя к мозаичной желтухе, методом ПЦР-анализа ДНК.
3. Провести маркирование генов устойчивости картофеля к грибным заболеваниям, методом ПЦР-анализа ДНК.
4. Разработать иммуноферментный метод идентификации возбудителей болезней ячменя, овса и картофеля.

#### **В процессе работы:**

1. Проведены исследования и разработка новой ускоренной методики идентификации по молекулярным маркерам (белкам и отдельным парам нуклеотидов) и антигенной структуре биологического материала, сортов и образцов с/х растений и микроорганизмов.

2. Исследованы 8 сортообразцов ячменя различного географического происхождения. Все образцы отличаются по электрофоретическим спектрам. Среди данных образцов не встречаются генотипы с идентичным набором гордеинов. В сортообразцах Белогорский, Korona, Kleine содержатся проламины с электрофоретической подвижностью равной 0,15, а в сортах Белогорский и Korona, также дублируются гордеины с  $r_f$  0,18. Значение электрофоретической подвижности, равное 0,21, отмечено в сортах Белогорский, Korona, Местный (Дагестан). По остальным показателям  $r_f$  данные сорта различны.

3. Установлено что, у большинства протестированных сортов ячменя из коллекции ВИР выявлено присутствие гена *gum4* и отсутствие гена *gum5*. Ген *gum4* обеспечивает устойчивость к двум формам вируса, в то время как ген *gum5* обеспечивает устойчивость так же и к третьей форме. Соответственно, целесообразно привлечение в селекцию отечественных сортов ячменя доноров гена *gum5*. Выявлено, что сорт устойчив к желтой мозаике по гену *gum5* Токуо hataus, а сортообразцы Т-277, Мединум 1577, Белорусский 76, Местный, var.nudum (Дагестан), по гену *gum4* не устойчивые.

4. При анализе электрофореграмм продуктов реструкции на присутствие генов R1 и R3a обнаружено, что у изучаемого сорта картофеля Удача выявлены оба гена в зоне около 1280 и 1400 п.н. У сорта Розара выявлен ген R3a, а изучение сортов Редскарлет и Невский показало отсутствие данных генов. На основании этого материала можно сделать вывод, что Сорт Удача является устойчивым, сорт Розара - относительно устойчивым, сорта картофеля Невский и Редскарлет являются восприимчивыми к возбудителю фитофтороза.

5. Разрабатывается метод иммуноферментного анализа на трех видах растений: ячмене *Hordeum vulgare*; овсе *Avena sativa*, картофеле *Solanum tuberosum*. Методом гемагглютинации были определены устойчивые сорта ячменя, овса и картофеля и зараженные *F. oxysporum*.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА:** Впервые для идентификации новых сортов сельскохозяйственных культур, создаваемых в Орловской области, разработаны инновационные и усовершенствованы методы молекулярных маркеров, в том числе методом ИФА

**ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ:** Разработанные экспресс-методы позволяют ускорить молекулярную селекцию, проводить оценку и отбор перспективных образцов с/х растений, идентифицировать источники заболеваний животных и растений, решать арбитражные споры.

Защитные белки определяют устойчивость растений к патогенам (грибам, бактериям, вирусам, вироидам) и насекомым-вредителям. Изучение защитных белков имеет фундаментальное значение для выяснения молекулярных механизмов врожденного иммунитета растений. Такие исследования имеют и большое практическое значение, поскольку потери урожая, вызванные патогенами, достигают 45% и оцениваются в трлн. рублей ежегодно.

Внедрение метода в производство позволит проводить выбраковку неустойчивых растений, сокращать сроки селекции, прогнозировать урожай и получать экологически чистую продукцию.

Источник: Отчет о НИР за 2014 г (ФГБОУ ВПО «ОрелГАУ»)

За дополнительной информацией обращайтесь по электронной почте [agro-iks@mcx-consult.ru](mailto:agro-iks@mcx-consult.ru) (ФГБОУ ДПО «ФЦСК АПК»)

*Материал подготовлен Шиловой Е.П.*