

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

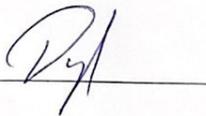
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ И  
АГРОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

### Отчет

по научно-исследовательской деятельности  
аспиранта второго года обучения

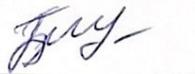
по направлению подготовки 36.06.01 Ветеринария и зоотехния  
(Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и  
технология кормов)

Преподаватель, д.б.н



Дускаев Г.К.

Аспирант :



Богданова О.В.

Оренбург 2021

## Содержание

Введение.....	3
1 Оценка всхожести и ростовых показателей ячменя .....	5
2 Молекулярно – генетические методы исследования .....	10
2.1 Выделение РНК из проростков ячменя.....	10
2.2 Проведение реакции обратной транскрипции .....	11
2.3 ПЦР в реальном времени.....	12
Заключение .....	15
Список используемой литературы.....	16

## Введение

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) считается четвертой по значимости зерновой культурой в мире, во многом благодаря его исключительной адаптации к выращиванию в различных условиях окружающей среды. Ячмень особенно способен адаптироваться к различным условиям, таким как засуха и соль, по сравнению с другими злаками (Туманян А.Ф и др., 2010). Такая полезная характеристика позволяет ячменю расти в регионах, где другие злаки, например, пшеница, не могут хорошо расти.

Абиотические стрессовые условия являются широко распространенной проблемой во всем мире, в то время как засуха является наиболее важным фактором, ограничивающим рост сельскохозяйственных культур, и становится все более распространенной, особенно в засушливых и полузасушливых регионах (Кондратьев М.Н и др., 2018). Влияние стресса от засухи очевидно на производительность и урожайность растений; фазы прорастания и развития проростков являются периодом, наиболее чувствительным к таким условиям у ячменя (Гамзаева Р.С и др., 2017), а также у большинства других культур. Стресс от засухи на очень ранней стадии развития задерживает прорастание семян и снижает скорость прорастания (Илли И.Э и др., 2014). Таким образом, понимание естественной изменчивости и генетического контроля всхожести и связанных с ней признаков в условиях стресса от засухи может помочь улучшить рост и урожайность ячменя.

Устойчивость сортов к дефициту почвенной влаги на начальных этапах онтогенеза имеет важное значение для дальнейшего развития растений. Для гарантий обеспечения сельского хозяйства от потерь в засушливые годы, необходимо иметь устойчивые к дефициту влаги сорта ячменя.

Прямая оценка засухоустойчивости в поле при всей ее объективности требует многолетних наблюдений. Засуха бывает не каждый год, меняется ее характер, периоды проявления. Для ускорения селекционного процесса в последнее время все чаще применяют косвенную оценку засухоустойчивости с помощью ла-

бораторно физиологических методов. Особый интерес представляют методы ранней диагностики на зерне и проростках, поскольку они дают возможность проводить исследования в течении года и анализировать большое количество образцов.

В Оренбургской области, где засухи различной интенсивности проявляются практически ежегодно, определяющее значение имеет засухоустойчивость сорта в сочетании с повышенной адаптивной способностью. Поэтому в местных условиях, всегда основным направлением селекции ячменя являлось и является дальнейшее, постепенное усиление засухоустойчивости новых сортов, их пластичности и хозяйственной ценности.

## 1 Оценка всхожести и ростовых показателей ячменя

Засуха - один из самых сильных абиотических стрессов, препятствующих прорастанию семян, росту растений и урожайности сельскохозяйственных культур. Высокая скорость и равномерность прорастания в стрессовых условиях жизненно важны для создания и роста сельскохозяйственных культур, а, следовательно, и для продуктивности. Лучшее понимание генетической архитектуры прорастания семян в условиях засухи является необходимым условием для дальнейшего повышения потенциала урожайности. Ячмень считается одним из наиболее устойчивых к абиотическим стрессам злаков. Выяснение засухоустойчивости ячменя во время прорастания семян действительно проложило бы путь к улучшению показателей всех зерновых культур. Однако еще относительно мало известно о генетическом контроле засухоустойчивости во время фазы прорастания семян.

Материалом для исследования послужили 120 образцов ячменя местных, отечественных и зарубежных сортов которые характеризуются как засухоустойчивые и рассматриваются как перспективные для возделывания в климатической зоне Оренбуржья, а также интенсивно используются в селекционных программах.

В качестве селективного агента использовали ПЭГ 6000, наиболее часто применяемый в качестве имитанта засухи. Для оценки влияния селективного агента на ростовые показатели проростков и выявления сублетальной концентрации семена изучаемых сортов проращивали согласно ГОСТ 12038-84 на растворе ПЭГ 6000 в концентрациях 20%. Контролем служило проращивание семян в дистиллированной воде.

Для определения коэффициента всхожести использовали метод проращивания семян в растильнях. Для проращивания отбирали три пробы по 10 семян в каждой.

Семена проращивали на фильтровальной бумаге, которую нарезали по размерам посуды, укладывали на дно и увлажняли. На рисунке 1 изображен процесс работы по закладке семян ячменя в растильни для оценки всхожести сортообразцов.



Рисунок 1 – Процесс закладки семян ячменя для проращивания

Предварительно нарезанную фильтровальную бумагу стерилизовали в сушильном шкафу при температуре 130°C в течение 1 часа. Перед проращиванием фильтровальную бумагу увлажняли до полной влагоемкости, опуская в воду, и давая стечь избытку влаги. Семена равномерно раскладывали. В каждую растительную помещают заполненную простым карандашом этикетку с указанием названия образца, даты учета энергии прорастания и всхожести, сверху накрывали крышками и помещали в термостат. Семена проращивали при температуре 21 ° С в течение 12 суток. Количество проросших семян в контрольных образцах считали начиная со второго дня, проросшие семена на 20% растворе ПЭГ 6000 считали начиная с 5 дня. Всхожесть оценивали с интервалом в 24 часа в течение 12 дней. Семена считаются проросшими при достижении побегом размера 2-3 мм, на рисунке 2 показаны проросшие семена ячменя на пятый день эксперимента.



Рисунок 2- Семена ячменя на пятый день эксперимента

Параметры всхожести оценивались в соответствии с правилами Международной ассоциации тестирования семян (ISTA) следующим образом:

Процент всхожести выражается как (G%)

$$G\% = \frac{n}{N} \times 100$$

Где  $n$  - количество проросших семян в конце эксперимента, а  $N$ -общее количество всего посеянных семян.

Скорость прорастания выражается как (GP)

$$GP = \frac{N}{\sum(n \times g)} \times 100,$$

Где  $N$  - общее количество проросших семян в конце эксперимента, а  $n$ -количество проросших семян в день  $g$  (1, 2, 3,...).

Индекс засухоустойчивости (DTI) был рассчитан для G% и GP в соответствии с уравнениями:

$$DTI (G\%) = \frac{G\% \text{ under drought}}{G\% \text{ under control}} \times 100$$

$$DTI (GP) = \frac{GP \text{ under drought}}{GP \text{ under control}} \times 100$$

Снижение G% и GP также были рассчитаны следующим образом:

$$\text{Reduction of G\%} = G\% \text{ under control} - G\% \text{ under drought}$$

$$\text{Reduction of GP} = GP \text{ under control} - GP \text{ under drought}$$

Для измерения длины побега и длины корня проращивали семена в рулонах по 10 семян в трех повторностях. Стресс от засухи вызывали добавлением ПЭГ- 6000 в концентрации 20% (мас./об.), в то время как в качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Семена проращивали в рулонах из фильтровальной бумаги. Для этого наре- зали полосы бумаги шириной 30-40 см и длиной 35-40 см и складывали по ширине вдвое, затем разворачивали, смачивали дистиллированной водой или раствором ПЭГ- 6000 и на половине полосы раскладывают семена рядами зародышем вниз. Количество полос бумаги соответствует количеству повторностей. Семена при- крывали второй частью полосы, бумагу сворачивали в рулоны, которые помещали

вертикально и неплотно один к другому по несколько штук в пластиковые емкости. Емкости помещали в термостат на 12 суток при температуре 21°C. На рисунках 3, 4 изображен процесс проращивания контрольных образцов семян ячменя в рулонах на 7 и 12 день эксперимента соответственно.



3)



4)

Рисунок 3, 4 – Процесс проращивания ячменя в рулонах для оценки ростовых показателей сортообразцов.

Через 12 дней для проведения учета рулоны вынимали из сосудов и разворачивали на столе, осторожно отделяя верхний слой бумаги, SL (длина побега) и RL (длина корня), (в см) измеряли вручную с помощью масштабированной линейки. Свежий вес (FW) проростков регистрировали (г) с использованием чувствительных весов. Соотношение побегов к корням (SRR) было рассчитано как отношение SL к RL. Снижение SL, RL и FW было рассчитано следующим образом:

$$\text{Reduction of SL} = \text{SL under control} - \text{SL under drought}$$

$$\text{Reduction of RL} = \text{RL under control} - \text{RL under drought}$$

Также был рассчитан индекс засухоустойчивости (DTI) для SL и RL:

$$\text{SL\_DTI} = \frac{\text{SL under drought}}{\text{SL under control}} \times 100$$

$$RL\_DTI = \frac{RL \text{ under drought}}{RL \text{ under control}} \times 100$$

Сравнение физиологических показателей проростков ячменя, обладающих различной полевой засухоустойчивостью, показало, что образцы существенно различаются по реакции на повышенное содержание хлорида натрия и осмотический стресс, вызванный полиэтиленгликолем. Это подтверждает возможность изучения механизмов устойчивости к засолению и засухе за счет генотипической изменчивости образцов. Способность семян прорасти является критическим моментом для получения ростков обладающих энергией роста.

## 2 Молекулярно – генетические методы исследования

### 2.1 Выделение РНК из проростков ячменя

Для выделения РНК из тканей ячменя использовали набор реагентов «РНК экстракт» (ООО «Синтол») (рисунок 6).



Рисунок 6 – набор реагентов «РНК – экстракт»

Первый этап – лизис клеток.

1. Образцы тканей помещали в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл и гомогенизировали.

2. К полученному гомогенату добавляли 300 мкл лизирующего раствора, перемешивали содержимое пробирок на вортексе кратковременно, затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течении 10 минут.

3. Центрифугировали смесь 10 минут при 12000 g и 2-8 °С. Отбирали супернатант и переносили его в новую пробирку 1,5 мл.

Второй этап – разделение фаз.

1. Добавляли в пробирки по 40 мкл осаждающего реагента 1 и перемешивали встряхиванием на вортексе трижды по 15 секунд.

2. Смесь инкубировали при комнатной температуре при комнатной тем- пературе в течении 10 минут.

3. Центрифугировали смесь 15 мин при 12000 g и 4-8 °С. Отбирали верхнюю водную фазу и переносили ее в чистую пробирку 1,5 мл.

На 7 рисунке изображен промежуточный результат после второго этапа выделения РНК из проростков ячменя.



Рисунок 7- Второй этап (разделение фаз) выделения РНК

Третий этап - осаждение РНК.

1. К водной фазе добавить равный объем Осаждающего реагента 2.
2. Перемешивали содержимое пробирок на вортекс и оставляли стоять при комнатной температуре 5-10 минут.
3. Центрифугировали смесь 8 минут при 12000 g и 4-8 °С. Осторожно удаляли супернатант.

Четвертый этап – промывка и осаждение РНК.

1. Добавляли 400 мкл промывочного раствора и перемешивали несколько раз переворачиванием.
2. Центрифугировали 8 минут при 12000 g и 4-8°С. Осторожно удаляли супернатант.
3. Открытые пробирки сушить на воздухе или при 37°С до видимого исчезновения капель влаги.
4. Добавляли к осадку 40 мкл воды свободной от нуклеаз содержащей 0,5 ед/мкл ингибитора РНКаз. Перемешивали и оставляли стоять при комнатной температуре 5-10 минут для растворения РНК.

Полученный раствор РНК хранили при -20°С.

На данный момент РНК выделено более чем из 50 сортов из 120 сортов выборки.

## **2.2 Проведение реакции обратной транскрипции**

Для проведения реакции обратной транскрипции использовали «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции» (ООО «Синтол»).

В отдельной чистой пробирке готовили реакционную смесь для исследуемых образцов. Полученную реакционную смесь перемешивали на микроцентрифуге – встряхивателе и центрифугировали в течении нескольких секунд.

Отбирали необходимое число микропробирок объемом 0,2 мл для проведения реакции ОТ. Готовую реакционную смесь вносили по 15 мкл в подготовленные 0,2 пробирки, установленные в штатив типа «IsoFreeze». Затем вносили в пробирки исследуемые образцы, перемешивали на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировали. Устанавливали пробирки в амплификатор и инкубировали при температуре 40°C 40 минут. Для инактивации фермента пробирки нагревали до 92°C и инкубировали 3-5 минут.

Полученную кДНК хранили при -20°C.

### **2.3 ПЦР в реальном времени**

В последние годы все больше молекулярно-биологических методов находят практическое применение в различных областях медицины, промышленности и сельского хозяйства. Один из таких методов — полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая нарабатывать в пробирке определенный участок молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) практически в неограниченных количествах.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (или количественная ПЦР, кПЦР, ПЦР-РВ, англ. *Real-time PCR, qPCR*) — лабораторный метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, позволяющий определять не только присутствие целевой нуклеотидной последовательности в образце, но и измерять количество её копий. Количество амплифицированной ДНК измеряется после каждого цикла амплификации с помощью флуоресцентных меток: зондов или интеркаляторов. Оценка может быть количественной (измерение количества копий матрицы) и относительной (измерение относительно внесённой ДНК или дополнительных калибровочных генов).

Открытие полимеразной цепной реакции стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это

позволило поднять данную область науки на качественно новый уровень. Внедрение полимеразной цепной реакции в медицину открыло новое диагностическое направление — ДНК-диагностику. Основные принципы полимеразной реакции и состав реакционной смеси для получения копий ДНК впервые были описаны Клеппе с соавт. в 1971 году (Kleppre et al, 1971). Однако исследователями не была продемонстрирована главная черта ПЦР — экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК.

Поскольку в ходе полимеразной цепной реакции происходит наработка определенного участка ДНК, по окончании реакции можно зарегистрировать полученный фрагмент при помощи ряда методов, первым и наиболее часто используемым из которых является метод электрофореза молекул ДНК в геле с окрашиванием бромистым этидием. Однако регистрация результата реакции по ее завершении не дает информации об эффективности процесса (если не использовать специальную постановку эксперимента), снижая тем самым потенциальную информативность ПЦР. Применение метода было ограничено задачами, в которых было достаточно ответа «да»—«нет». В начале 90-х годов прошлого столетия исследователи предложили регистрировать накопление ДНК непосредственно в ходе ПЦР (Higuchi et al, 1992). К этой идее их подтолкнуло желание использовать метод ПЦР для количественного определения исходного числа матриц, попавших в реакционную пробирку. Несмотря на то, что ПЦР и ранее использовали для количественного определения нуклеиновых кислот, изобретение ПЦР «в реальном времени» существенно упрощало технику измерения и делало подход более точным (Higuchi et al, 1993). С этого момента началось бурное развитие как приборной, так и реагентной базы для выполнения ПЦР с регистрацией накопления продуктов амплификации непосредственно в ходе реакции. Уже в середине 90-х годов появились первые детектирующие амплификаторы (термоциклеры), а к настоящему моменту их разнообразие перевалило за 30 (на рынке присутствует более 10 компаний, промышленно выпускающих приборы данного типа).

В основе полимеразной цепной реакции лежит природная способность термофильного фермента ДНК-зависимой Taq-ДНК полимеразы осуществлять копирование одной из цепей ДНК, стартуя с короткой ДНК-затравки (прямого праймера), комплементарной другой цепи.

Необходимыми компонентами реакционной смеси являются (праймеры ограничивают зону амплифицируемого участка ДНК - ампликон), смесь четырех Дезоксинуклеозидтрифосфатов (являются «строительными» ампликона), а также буфер, содержащий ионы двухвалентного магния. Протеканию ПЦР способствует быстрое и точное циклическое изменение температуры реакционной смеси.

Таким образом, в течение 1-2 часов исследователю удастся экспоненциально увеличить количество исходной нуклеиновой кислоты – мишени и из одной молекулы ДНК получить до нескольких десятков миллиардов копий ее фрагмента.

Для проведения ПЦР в режиме реального времени, была использована 2,5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green (ООО «Синтол»). Согласно протоколу, готовили реакционную смесь, затем подготавливали пробирки объемом 0,2 мл и вносили в них по 20 мкл подготовленной реакционной смеси и по 5 мкл образца кДНК. Готовые пробирки устанавливали в прибор и вводили условия проведения ПЦР.

#### Температурно-временной режим амплификации

№ п/п	Температурно – временной режим	Число циклов
1	95°C – 180 с	1
2	95°C – 15 с	40
3	62°C – 60 с	

## Заключение

В результате описанных в отчете исследований была проведена оценка всхожести и ростовых показателей 120 сортообразцов ячменя, для дальнейшего фенотипического анализа. Параметры всхожести рассчитали в соответствии с правилами Международной ассоциации тестирования семян (ISTA). Отработана методика выделения РНК из проростков ячменя и проведения реакции обратной транскрипции, выделили РНК и провели реакцию обратной транскрипции более шестидесяти сортов рабочей выборки. В настоящее время ведется отработка методики работы с ПЦР в реальном времени.

По результатам проведенной работы опубликованы одна обзорная статья в журнале «Животноводство и кормопроизводство» и тезис в постерной сессии 6-й Международной научной конференции «Генетика растений, геномика, Биоинформатика и биотехнология» (plantgen2021), 14-18 июня 2021 года, Новосибирск, Россия, запланирована публикация обзорной статьи.

1. Новикова А. А., Богданова О. В. ВОЗМОЖНОСТИ МАРКЕРОРИЕНТИРОВАННОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ, УСТОЙЧИВЫХ К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ (ОБЗОР) // Животноводство и кормопроизводство. – 2021. – Т. 104. – №. 1. – С. 138-148.

2. Новикова А. А., Богданова О. В. Молекулярно-генетические методы оценки засухоустойчивости ярового ячменя // Генетика растений, геномика, биоинформатика и биотехнология. – 2021. – С. 158-158. DOI 10.18699/PlantGen2021-142

## Список литературы

1. Higuchi R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences //Bio/technology. – 1992. – Т. 10. – №. 4. – С. 413-417.
2. Higuchi R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions //Bio/technology. – 1993. – Т. 11. – №. 9. – С. 1026-1030.
3. Kleppe K. et al. Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases //Journal of molecular biology. – 1971. – Т. 56. – №. 2. – С. 341-361.
4. Гамзаева Р.С. Влияние регуляторов роста на физиолого - биохимические показатели и продуктивность ярового ячменя // Известия СПбГАУ. 2017. №1 (46). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-regulyatorov-rosta-na-fiziologo-biohimicheskie-pokazateli-i-produktivnost-yarovogo-yachmenya>.
5. Илли И.Э., Клименко Н.Н., Абрамова И.Н., Кузнецова Е.Н., Половинкина С.В., Парыгин В.В. Влияние температуры при формировании семян на рост тканей прорастающего зародыша яровой пшеницы в условиях Предбайкалья // До-стижения науки и техники АПК. 2014. №7. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-temperatury-pri-formirovanii-semyan-na-rost-tkaney-prorastayuschego-zarodysha-yarovoy-pshenitsy-v-usloviyah-predbaykalya>.
6. Кондратьев М.Н., Роньжина Е.С., Ларикова Ю.С. Влияние абиотических стрессов на метаболизм вторичных соединений в растениях // Известия КГТУ. 2018. №49. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-abioticheskikh-stressov-na-metabolizm-vtorichnyh-soedineniy-v-rasteniyah>.
7. Туманян А.Ф, Хамдан Васим, Тютюма Н.В. Засухоустойчивость сортообразцов ярового ячменя // Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство. 2010. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/zasuhoustoychivost-sortoobraztsov-yarovogo-yachmenya>.