

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

**XVII ВСЕРОССИЙСКАЯ МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

***«БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ,
ЖИВОТНОВОДСТВЕ И ВЕТЕРИНАРИИ»***

6-7 апреля 2017 г.

***Конференция посвящается памяти
академика РАСХН
Георгия Сергеевича
МУРОМЦЕВА***

Москва – 2017

УДК 606; 63; 573.6; 57.088
ББК 28.087

«Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии»: 17-я Всероссийская молодежная научная конференция (Москва, 6-7 апреля 2017 г., ФГБНУ ВНИИСБ), сборник тезисов докладов.

**Конференция посвящается памяти
академика РАСХН
Георгия Сергеевича Муромцева**

17-я Всероссийская молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» проводится ежегодно Всероссийским научно-исследовательским институтом сельскохозяйственной биотехнологии. В сборник включены тезисы докладов научных работ аспирантов и молодых ученых научно-исследовательских институтов и ВУЗов.

Сборник тезисов представляет интерес для специалистов в области биотехнологии, молекулярной биологии, геномной инженерии, клеточной биологии.

© ФГБНУ ВНИИСБ, 2017 г.

© Издательство РГАУ-МСХА, 2017 г.

ISBN 978-5-9675-1642-9

СПОНСОР КОНФЕРЕНЦИИ



ИЗУЧЕНИЕ МОРФОГЕНЕЗА АШВАГАНДЫ (*WITHANIA SOMNIFERA*) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Алрашиди А.А.

***Российский государственный аграрный университет - МСХА
имени К.А. Тимирязева, кафедра генетики, биотехнологии,
селекции и семеноводства, Москва 127550***

E-mail: ahmad.aa.2013@mail.ru

В настоящее время интерес исследователей привлекают лекарственные растения как источник ценных веществ вторичного метаболизма, которые нашли свое широкое применение в фармакологии, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и в других областях народного хозяйства. Это связано с тем, что многие из вторичных метаболитов обладают широким спектром действия по отношению к микроорганизмам, фитопатогенам, а также к раковым клеткам. Однако, в последнее время, наметилась тенденция резкого сокращения численности ценных лекарственных растений, что обусловлено неконтролируемым сбором растительного сырья, ограниченностью ареала их распространения, а также воздействием факторов абиотической и биотической природы. Решить данную проблему возможно за счет применения современных методов биотехнологии, в частности, получение веществ вторичного метаболизма, путем выращивания в условиях *in vitro* каллусных или суспензионных культур.

Ашваганда (*Withania somnifera*), или зимняя вишня, индийский женьшень, физалис солнечнолистный является перспективной культурой для изучения в условиях *in vitro* с целью получения витоферина, обладающего противораковым действием.

Объектом исследования служили семена *Withania somnifera*, а также листовые сегменты, изолированные с растений-регенерантов. Для получения стерильной культуры семена стерилизовали 0,1%-ным раствором сулемы в течение 10 минут, трижды промывали дистиллированной водой, после чего их культивировали на безгормональной питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга (МС). На этапе микроразмножения изучали влияние 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрациях 0,5 1, 2 и 3 мг/л. Для получения каллусной ткани в питательную среду добавляли вещества с ауксиновой активностью (2,4-Д, ИУК) в различных концентрациях и сочетаниях с цитокининами.

Все исследования проводили в условиях световой комнаты, где поддерживалась температура 25°C, 16-ти часовой фотопериод и интенсивность освещения белыми люминесцентными лампами 3,5 тыс.лк.

Исследования показали, что выбранная схема стерилизации позволяет получать в среднем 94,2% стерильных проростков, которые в дальнейшем использовали в экспериментах по микроразмножению. Экспериментально установлено, что с увеличением концентрации БАП в питательной среде возрастает коэффициент размножения, который при концентрации 3 мг/л достигал значения 17-18. Однако в этих условиях формировались сильно витрифицированные побеги, которые в дальнейшем не были способны к размножению. Оптимальные условия для индукции образования адвентивных почек и их последующего роста была среда, содержащая БАП в концентрации 0,5 мг/л. Коэффициент размножения, составил 13-14, а средняя высота микропобегов – 4,7 см.

В экспериментах по получению каллусной ткани было установлено, что с увеличением концентрации 2,4-Д в питательной среде возрастает способность соматических клеток к формированию каллуса рыхлой консистенции, а замена 2,4-Д на ИУК стимулировала образование каллуса плотного типа. Кроме того, отмечено, что начало образования каллусной ткани различно, и этот процесс находится под контролем исследуемых гормонов и их концентраций. Так, на среде, содержащей 2,4-Д в концентрации 2 мг/л каллусогенез был отмечен уже на 4 сутки с начала культивирования, в то время как при концентрации этого гормона 1 мг/л образование каллуса начиналось только на 10 сутки. Что касается замены 2,4-Д на ИУК, то в этом случае начало каллусогенеза было отмечено лишь на 23 сутки. Следует отметить, что увеличение концентрации 2,4-Д в питательной среде приводило к значительному усилению пролиферативной активности каллусной ткани. Причем, максимальный прирост каллуса был отмечен в варианте, где 2,4-Д присутствовал в питательной среде в концентрации 2 мг/л.

При изучении морфогенеза каллусной ткани было показано, что начало морфогенеза в первичной каллусной ткани зависит от исследуемого гормона и его концентрации. Нами установлены некоторые закономерности: с увеличением концентрации цитокининов дифференциация меристематических очагов наступает раньше на 7 и 3 суток при использовании БАП и

кинетина, соответственно. Причем, дополнительное внесение в питательную среду ауксина (ИМК) не оказало существенного влияния на скорость морфогенеза. Кроме того, показано, что с повышением концентрации гормонов в питательной среде среднее количество образовавшихся адвентивных почек на один каллус так же возрастает.

Анализируя биометрические показатели адвентивных побегов, нами было установлено, что высокие концентрации цитокининов способствуют формированию укороченных микропобегов, высота которых не превышает 0,3-0,5 см, в то время как при концентрации 0,5 мг/л БАП учитываемый показатель был 2,5-3 см.

Таким образом, в результате многоплановых экспериментов установлено, что наиболее оптимальной питательной средой на этапе микроразмножения является среда, содержащая минеральные соли по прописи МС, а также БАП в концентрации 0,5 мг/л. Для быстрого получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани целесообразно добавлять в состав питательной среды 2,4-Д в концентрации 2 мг/л в сочетании с кинетином 0,5 мг/л, а для получения растений-регенерантов применять БАП в концентрации 0,5 мг/л. Подобранные условия культивирования каллусной культуры были применены нами в последующих экспериментах по получению суспензионной культуры *Withania somnifera*.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ГРУППЫ ФТОРХИНОЛОНОВ И ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* НА МИКРОБИОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ САЛЬМОНЕЛЛЁЗА ПТИЦ

Дубровин А.В.

***ВНИВИП – филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН, отдел
микробиологии,***

Санкт-Петербург, г. Ломоносов, ул. Черникова, д. 48, 198412

E-mail: vnivip@yandex.ru, vnivip@mail.ru

По данным Министерства сельского хозяйства РФ за 2014 год в птицеводческих хозяйствах Российской Федерации среди всех зарегистрированных инфекционных болезней птиц более 80% приходится на колибактериоз (376 656 случаев заболеваний) и сальмонеллёз (5122 случаев заболеваний). В 2015 году зарегистрировано 415 000 случаев колибактериоза, что на 10,2%

больше, чем в 2014 году. В 2012 году в России зарегистрировано 72445 случаев кишечных инфекций человека, при этом 72% пришлось на сальмонеллёз. Наиболее часто сальмонелл выделяли из продуктов птицеводства – в 52% случаев.

Вопрос о наиболее эффективном методе выращивания птицы с применением или без применения антибиотиков и пробиотиков стоит уже давно, поэтому было решено провести поэтапное исследование влияния на микрофлору кишечника цыплят бройлеров двух антимикробных препаратов группы фторхинолонов III поколения на основе левофлоксацина и на основе энрофлоксацина, а также пробиотика на основе штамма *Lactobacillus acidophilus*. Экспериментальную часть исследований проводили в виварии ВНИВИП. Для исследования были созданы условия выращивания, вакцинации и кормления птицы, максимально приближённые к производственным. Птицу в количестве 150 голов содержали с 1-го дня до 42-дневного возраста с разделением на группы-аналоги.

Заражение птицы смесью культур сальмонелл (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum-pullorum*, *Salmonella typhimurium*) проводили в 14-дневном возрасте внутримышечно суточной бульонной культурой в дозе 1,0 мл (≈ 1 млрд микробных клеток). Лечение начинали с первых суток после заражения (при проявлении клинических признаков – угнетения, депрессии, снижения аппетита). Препараты выпаивали в дозе 1 мл на 1 л воды в течение 5 дней.

Еженедельно проводили контроль веса птицы и отбор индивидуальных проб помёта для дальнейшего исследования микробиального состояния желудочно-кишечного тракта посредством молекулярно-генетического метода T-RFLP-анализа.

При падеже цыплят в ходе опыта и убое по его окончании проводили вскрытие и отбор проб содержимого слепых отростков для проведения молекулярно-генетического исследования.

Лабораторное исследование проб проводили в молекулярно-генетической лаборатории компании ООО «БИОТРОФ» методом T-RFLP. В компании создана лаборатория молекулярно-генетических исследований, включающих применение комплекса методик на основе молекулярно-генетических подходов, позволяющих максимально полно и точно определить состав микрофлоры кишечника сельскохозяйственных животных. Метод T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длин терминальных рестриктных фрагментов – один

из наиболее современных молекулярно-биологических методов для исследования видового состава микробных сообществ, основанный на изучении особенностей структуры ДНК. Применение T-RFLP-анализа позволяет дополнить данные, получаемые при помощи традиционных культуральных методов или заменить эти методы в тех случаях, где их разрешение оказывается недостаточным. Одна из основных областей применения метода T-RFLP – анализ структуры и динамики развития микробных сообществ. При изучении состава и динамики развития микробных сообществ метод T-RFLP нередко позволяет получать результаты, более высокой точности и разрешения, чем другие методы.

Предварительные результаты анализа динамики бактериального сообщества в помёте и в слепых отростках цыплят-бройлеров, заражённых сальмонеллами, выявили существенную разницу при лечении разными антибиотиками группы фторхинолонов с применением и без применения пробиотика на основе живой культуры *Lactobacillus acidophilus*.

Среди групп заражения наилучшие показатели были обнаружены у цыплят с антибактериальной терапией препаратом на основе левофлоксацина и пробиотика на основе *Lactobacillus acidophilus*. Средний показатель содержания представителей нормофлоры (целлюлозолитики, лактобациллы, бифидобактерии, бациллы, селеномонады) на момент убоя составил 78% от общего числа микрофлоры с прижизненной динамикой от 35 до 79%, в то время как доля патогенов и условных патогенов (стафилококки, микоплазмы, фузобактерии, пастереллы, кампилобактерии, клостридии, энтерококки, актинобактерии) составила в среднем 6,5% с прижизненными колебаниями от 7 до 37%. Весовые показатели у такой птицы также были наивысшими среди групп заражения со средним значением 1438,6 г. Группа цыплят контроля без заражения на момент убоя имела средний вес 2190 г.

Группа птиц с применением лечения антибиотиком на основе левофлоксацина без выпойки пробиотика после убоя показала в среднем 33% нормофлоры и 25% суммы патогенов и условных патогенов, однако анализ прижизненной динамики микробиома выявил колебания от 55 до 75% нормальной микрофлоры и от 4 до 19% патогенов и условных патогенов. Средний вес птицы на момент убоя составил 1344,2 г.

Группа птиц с применением лечения антибиотиком на основе энрофлоксацина и выпойкой пробиотика после убоя показала в среднем 61% нормофлоры с прижизненными

колебаниями в 52-73%, а сумма патогенов и условных патогенов составила 12% с прижизненными колебаниями в 3-18%. Средний вес птицы на момент убоя составил 1325,5 г.

Группа птиц с применением лечения антибиотиком на основе энрофлоксацина без выпойки пробиотика после убоя показала в среднем 59% нормофлоры с прижизненными колебаниями показателя в 41-68%, а сумма патогенов и условных патогенов составила 18% с прижизненными колебаниями в 8-36%. Средний вес птицы на момент убоя составил 1244 г.

Птица в группах заражённого контроля без лечения антибиотиками и без дачи пробиотика показала наихудший результат со 100% смертностью в течение 3-7 дней после заражения.

Таким образом, полученные результаты добавляют ценные сведения об эффективности сочетанного применения антибактериальных и пробиотических препаратов в случае заболевания.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА SSCP ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ВИРУЛЕНТНОСТИ AVR2 *RHYTORHNTHORA INFESTANS* (MONT.) DE BARY В ПОПУЛЯЦИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Чижик В.К.

*Московский государственный областной университет
лаборатория экологической биохимии, Москва 105005*

E-mail: chizhikvera@bk.ru

Метод SSCP (Single-strand conformation polymorphism – одноцепочечный конформационный полиморфизм) широко применяется для исследования полиморфизма первичной структуры относительно коротких фрагментов ДНК (ПЦР-ампликонов) благодаря тому, что является чувствительным, быстрым и недорогим. Выявленные с помощью этого метода полиморфные фрагменты ДНК могут быть в дальнейшем клонированы и секвенированы.

Принцип метода заключается в том, что полученные в результате ПЦР ампликоны подвергаются химической и термической денатурации, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК переходят в одноцепочечную форму. При последующем разделении в неденатулирующем

полиакриламидном геле (ПААГ) одноцепочечные фрагменты ДНК, одинаковые по длине, но отличающиеся по нуклеотидной последовательности, обладают разной электрофоретической подвижностью за счет образования различных вторичных конформаций, обусловленных их нуклеотидной последовательностью. Данные различия в электрофоретической подвижности позволяют выявить полиморфизм первичной структуры молекулы ДНК.

В настоящем исследовании метод SSCP был использован для изучения полиморфизма гена вирулентности *Avr2* фитопатогена *Phytophthora infestans* в популяции Московской области. Ген *Avr2* кодирует эффекторный белок, принадлежащий к семейству RXLR-dEER эффекторов, который позволяет патогену преодолевать защитную систему растения-хозяина. Ранее было показано, что ген *Avr2* представлен в геноме *Phytophthora infestans* двумя гомологами, *AVR2* и *AVR2-like*, кодирующими авирулентную и вирулентную форму белка, соответственно. Для ПЦР-амплификации этих гомологов нами были использованы праймеры, специфичные по отношению к *AVR2* и *AVR2-like*. Полученные ампликоны затем подвергали SSCP-анализу для выявления полиморфизма их первичной структуры.

Применение метода SSCP с последующим клонированием и секвенированием полиморфных зон электрофоретической подвижности позволило выявить в общей сложности 7 генотипов *Phytophthora infestans*, ассоциированных с полиморфизмом гена *Avr2*. Эти генотипы обладали неодинаковой встречаемостью, и их распределение в исследованной популяции носило территориальных характер.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ

Бочкарев В.С.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный научный центр Российской академии наук
«Всероссийский научно- исследовательский и технологический
институт птицеводства» - филиал Всероссийский научно-
исследовательский ветеринарный институт птицеводства
г. Санкт-Петербург, 198412*

E-mail: vladbochkarev@gmail.com

Метапневмовирусная инфекция птиц (МПВИ) птиц широко распространена в бройлерных птицеводствах РФ и отмечается тенденция обнаружения антител к метапневмовирусу у птиц яичных пород. Болезнь протекает со сложной симптоматикой в связи с многообразием подтипов А, В, С, Д возбудителя и его вирулентных свойств.

Целью настоящих исследований явилось изучение физико-химических свойств метапневмовируса птиц.

При выполнении работы использовали вакцинные штаммы 8544 подтипа А и VC-03 подтипа В метапневмовируса (МПВ) птиц, культивируемые в клетках Vero. Изучение чувствительности МПВ к действию температуры 56 °С, формальдегида и димерэтиленмина проводили по общепринятым методам (З. Лярски, 1980). Снижение титра вируса определяли в процессе воздействия физических и химических факторов через определенные интервалы и выражали отношением $\lg V_t/V_o$, где V_o – титр вируса до обработки; V_t – титр вируса после обработки в течение определенного времени. а константу скорости инактивации вычисляли пользуясь формулой $K = 2,3 P_t/P_o : t$, где 2,3 – основание натуральных логарифмов; P_o – исходный титр вируса; P_t – титр обработанного вируса по времени; t – время обработки вируса (мин).

При изучении терморезистентности вирусодержащую культуральную жидкость в пробирках по 1,0 см³ помещали в водяную баню при температуре 56 °С и через 10, 20, и 30 минут проводили титрацию в клетках Vero, начиная учет времени, когда температура в пробирках достигала температуры водяной бани. Данные опытов представлены в табл. 1.

Таблица 1
Сравнительная характеристика по терморезистентности штаммов 8544 и VC-03

Штамм вируса	Температура инактивации, град.	Время обработки, мин			Констан- та скоро- сти иначе., lg K _{ин}
		10	20	30	
		Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³			
8544	56	<u>2,5 ± 0,2</u>	<u>1,25± 0,15</u>	<u>0</u>	0,024 0,037
VC-03	56	6,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	
		<u>3,2 ± 0,25</u>	<u>2,1 ± 0,1</u>	<u>0</u>	
		6,5 ± 0,3	6,5 ± 0,3	6,5 ± 0,3	

Примечание: числитель- титр вируса после обработки; знаменатель- титр вируса до обработки.

Результаты, приведенные в таблице 1, показывают, что вакцинные штаммы 8544 и VC-03 МПВ птиц инактивировались при температуре нагревания 56 °С в течение 30 минут, однако штамм 8544 был наиболее чувствителен к повышенной температуре. Кривая инактивации была двухкомпонентной: в течение 10 минут снижение титра штаммов соответствовало 41,7% и 50%, а в последующие 20 минут процесс инактивации замедлялся. Вакцинные штаммы МПВ птиц оказались термолабильными (t_{56}^{+}).

Результаты изучения чувствительности штаммов к действию формальдегида и димера аминоксилот этиленмина (АЭЭИ) свидетельствовали, что скорость инактивации вакцинных штаммов 8544 и VC-03 МПВ птиц находится в прямой зависимости от концентрации (0,02; 0,05; и 0,1%) препаратов и времени (6, 12, 18 и 24 часа) их воздействия. Инактивация штаммов вируса происходила однотипно и следовала простой экспоненциальной кинетике. Штаммы вируса теряли свою инфекционную активность при воздействии формальдегида и АЭЭИ в конечной концентрации 0,1% при температуре 37 °С и экспозиции 24 часа полностью в режиме постоянного перемешивания.

Таким образом, вакцинные штаммы 8544 и VC-03 метапневмовируса птиц термолабильны (t_{56}^{+}) и чувствительны к инактивирующему действию формальдегида и АЭЭИ.

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЭМБРИОНОВ И ЛИЧИНОК ДАНИО РЕРИО (*Danio rerio*)

Полтева Е.А., Козикова Л.В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт генетики
и разведения сельскохозяйственных животных», 196625 г.*

Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, 55а

E-mail: ketlin.liselse@yandex.ru

Удобным методом анализа локализации и функции генов служит маркировка его экспрессии в клетках, для чего создают генетические конструкции, в которых промотор анализируемого гена «пришит» к репортерному гену. Необходимо отметить, что физиология и развитие клеток не изменяются при эктопической экспрессии репортерных генов. Одним из самых распространенных репортерных генов является ген зеленого флуоресцентного белка (*GFP*), который служит хорошей прижизненной детекторной системой для трансгенных клеток и организмов. С целью получения трансгенных эмбрионов и личинок данио рерио (в англоязычной литературе *zebrafish*) была использована генетическая конструкция *pCX-EGFP*, кодирующая флуоресцентный зеленый белок. Этот вектор любезно предоставил профессор М. Okabe (Университет г. Осака, Япония). В конструкцию входят последовательность гена *GFP*, В-актиновый промотор цыпленка, энхансер цитомегаловируса и поли-А сигнал В-глобина кролика. Достоинством этого вектора служит прижизненная экспрессия зеленого флуоресцентного белка при УФ облучении с определенной длиной волны.

При введении чужеродной генетической информации непосредственно в геном важно использовать самые ранние эмбриональные стадии развития организма. У эмбрионов *Danio rerio* стадии строго датированы по времени и доступны для анализа в течение всего периода эмбрионального развития благодаря прозрачным оболочкам, но эмбриональные стадии развития достаточно быстротечны. Оптимальная температура среды обитания *zebrafish* составляет 26-29°C, а период от зиготы до бластулы занимает 2 часа (Kimmel C. B. et al., 1995).

Взрослых рыб содержали при температуре 26°C и определенном световом режиме (13 часов день и 11 часов ночь). Для получения икры самок и самцов (в отношении 2:1) помещали в нерестовый аквариум при температуре 29°C. Введение генетической конструкции *pCX-EGFP* было осуществлено методом

микроинъекции в желток под бластодиск, начиная со стадии зиготы. Анализ экспрессии *GFP* гена проводили при помощи флуоресцентного прибора *SteReo Lumar V12 (Zeiss)* и фильтра ФИТЦ. Как в контроле, так в экспериментальных группах были выявлены эмбрионы с нормальной морфологией и несколько аномальных форм развития. Начальные стадии экспрессии *GFP* гена были замечены после сорока восьми часов эмбрионального развития, причем флуоресцентные клетки преимущественно наблюдали в области формирования пищеварительной системы.

Личиночная стадия у данио рерио начинается спустя четверо суток после оплодотворения. В этот период времени экспрессия репортерного гена хорошо выражена в области покровов кишечника и органов зрения. На данный момент наблюдение за локализацией флуоресцентных клеток ведётся на протяжении пяти недель, планируется дальнейшее прижизненное наблюдение. У всех трансгенных мальков следует отметить мозаичный паттерн экспрессии репортерного гена.

Таким образом, метод микроинъекции плазмид с флуоресцентными генами позволяет получать только мозаичные формы трансгенных рыб. Для получения полностью трансгенных рыб необходимы дальнейшие манипуляции, такие как получение потомства от особей, в половых клетках которых будет обнаружен трансген, или клонирование рыб с применением ядер, экспрессирующих флуоресцентные гены.

Трансгенная технология открывает широкие перспективы применения генетически модифицированных животных в различных отраслях биологии, сельского хозяйства и медицины. В настоящее время получены трансгенные виды рыб, которые находят применение в медицине как модели для анализа механизмов болезней человека; в сельском хозяйстве известны быстрорастущие трансгенные рыбы, у которых вес увеличен в 10 и более раз по сравнению с нетрансгенными (Devlin et al., 2001). Описаны генетически модифицированные лососи, обладающие повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам среды и болезням. Впервые на коммерческий рынок вышла трансгенная рыба – «супер лосось», созданная компанией *Akva Bountry Farms*.

Процесс создания трансгенных рыб позволяет апробировать и отбирать эффективные клоны генетических конструкций для успешного получения генетически модифицированных организмов. С другой стороны, благодаря репортерным генам можно проследить судьбу отдельных трансгенных клеток в процессе

органогенеза и эмбриогенеза. Трансгенных рыб можно использовать в качестве биореакторов биологически активных препаратов и лекарств. Рыбы часто подвержены различным заболеваниям, поэтому достаточно актуально создание трансгенных рыб, устойчивых к болезням, вызываемым бактериями, простейшими, вирусами и грибами. Важно подчеркнуть, что необходимо проведение контроля модифицированного генома и его возможного влияния на окружающую среду.

СТРУКТУРА, ФИЛОГЕНИЯ И ЭКСПРЕССИОННЫЕ ПАТТЕРНЫ НОВЫХ ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА ДИКОРАСТУЩИХ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ВИДОВ ТОМАТОВ (*SOLANUM SECTION LYCOPERSICON*)

Слугина М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.

*Группа молекулярных методов анализа генома Институт
биоинженерии*

ФИЦ Биотехнологии РАН

Наиболее важными хозяйственно-ценными признаками такой культуры, как томат, являются размер плодов, сроки созревания и вкусовые качества, которые зависят от апопластической доставки углеводов в нефотосинтезирующие органы и их качественного и количественного состава. Одним из основных ферментов, участвующих в процессе доставки сахарозы в клетку по апопластическому пути во время развития плодов, являются инвертазы.

В настоящей работе определены полноразмерные последовательности генов- гомологов кислой апопластической инвертазы *LIN7* у диких и культивируемых видов томатов (*Solanum section Lycopersicon*). Идентифицировано 12 новых генов-гомологов. Все гены состояли из шести экзонов и пяти интронов и включали высоко консервативный экзон 2, состоящий из 9 пн. Помимо интронного полиморфизма выявлен высокий уровень полиморфизма в экзонах (226 SNPs, 7.89%), что указывает на сильную межвидовую дивергенцию тестируемых видов томатов. Определены экспрессионные паттерны гомологичных генов *LIN7*. Показана специфичность экспрессии в зрелых плодах и цветках, что указывает на важную роль данного гена в формировании

плодов томатов. Биоинформатическое прогнозирование выявило первичную, вторичную и третичную структуру, характерную для семейства белков инвертаз, и показано наличие у всех консервативных каталитических сайтов, описанных ранее. Показана возможность использования генов-гомологов *LIN7* для установления филогении представителей секции *Lycopersicon* рода *Solanum*. С большой достоверностью все исследованные виды томатов сформировали два кластера, соответствующие самоопыляемым и перекрестноопыляемым, а также красноплодным и зеленоплодным видам. Найденные варибельные сайты, различия в уровнях экспрессии у отдельных видов томатов, наряду с выявленными радикальными замещениями аминокислот могут быть причиной функциональных различий в работе кислых инвертаз. Характеристика аминокислотной варибельности кислых инвертаз различных представителей секции *Lycopersicon* может быть полезна для оценки генетического потенциала генов-гомологов и будет использоваться в селекции новых сортов томата, так как *LIN7* имеет существенное значение для процесса закладки и развития плодов.

ПЕРЕДАЧА МУТАЦИИ PH1В В СОРТ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ КРАСНОДАРСКАЯ 99 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

**Миков Д.С., Давоян Э.Р., Давоян Р.О., Зубанова Ю.С.,
Болдаков Д.М.**

***ФГБНУ КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко, отдел биотехнологии, г.
Краснодар, Центральная Усадьба КНИИСХ, 350012
E-mail: d.mikov@kniish.ru***

Интрогрессия чужеродного хроматина в геном мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Является одним из наиболее эффективных способов обогащения генофонда этой культуры. Однако данный процесс может быть затруднён вследствие присутствия в геноме мягкой пшеницы системы генов *Ph*. Локус *Ph1*, расположенный на хромосоме 5В, препятствует конъюгации гомеологических хромосом, тем самым блокируя возможную передачу ценного генетического материала. Существует несколько способов вызвать конъюгацию гомеологов у пшеницы: 1) получение нуллисомиков по 5В хромосоме; 2) подавление действия

системы генов *Ph* за счёт генов-супрессоров данного локуса, которые присутствуют в некоторых геномах родственных форм мягкой пшеницы; 3) получение и использование мутантов *ph*.

Известно о передаче мутацией *ph1b* в сорт мягкой пшеницы Chinese Spring. Однако данный сорт, на базе которого была получена мутантная линия, является яровым и устаревшим, что вызывает определенные трудности в использовании его в селекционном процессе современных озимых сортов.

В связи с этим была поставлена задача за счёт серии беккроссов и последующего отбора с помощью молекулярных маркеров передать мутацию *ph1b* в один из местных сортов. В качестве реципиента был выбран сорт озимой мягкой пшеницы Краснодарская 99, так как он отличается цитологической стабильностью, высокой продуктивностью и рядом других положительных качеств.

Изучено 24 растения BC₂F₂ от скрещивания сорта Краснодарская 99 с линией Chinese Spring, несущей мутацию *ph1b*. Для оценки сохранения этой мутации в последующих поколениях, нами были использованы два молекулярных маркера ABC302.3 и PSR2120. Амплификация с праймерами к маркеру ABC302.3 выявляет фрагмент амплификации 920 п.н. Данный фрагмент является характерным для *Ph1* и отсутствует в мутантах *ph1b* и образцах с делецией на 5BL хромосоме. Из 24 проанализированных линий мутация *ph1b* была выявлена только у линий 9/4 и 9/8. Аналогичные результаты были получены с применением молекулярного маркера PSR2120.

Применяемые в работе молекулярные маркеры ABC302.3 и PSR2120, позволяют идентифицировать и отбирать линии, несущие мутацию *ph1b*. Отобранные растения 9/4 и 9/8 повторно беккроссированы сортом озимой мягкой пшеницы Краснодарская 99 и полученные семена высеяны в поле. В ближайшее время планируется получить ряд цитологически стабильных и высокопродуктивных линий с мутацией *ph1b* для индукции конъюгации гомеологических хромосом и в качестве генетических мостиков при передаче генетического материала от диких сородичей и различных форм пшеницы.

ИНДУКЦИЯ РТИ (PATTERN-TRIGGERED IMMUNITY) И ТРАНСКРИПЦИОННОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ В ПРОЦЕССЕ ПЕРСИСТЕНТНОЙ АЛЛЕКСИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Архипов А.В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Всероссийский научно-исследовательский институт*

сельскохозяйственной биотехнологии”,

Москва 127550, ул. Тимирязевская, д.42

E-mail: batler@yandex.ru

Растения постоянно подвергаются атакам со стороны разнообразных патогенов – вирусов, оомицетов, бактерий, грибов - и реагируют на эти атаки, используя сложно устроенную врожденную иммунную систему, которую в самом общем виде можно разделить на две подсистемы, или “слоя”: РТИ (Pattern-triggered immunity) и ЕТИ (Effector triggered immunity). Процесс РТИ “запускается” в результате специфического узнавания консервативных молекулярных структур (паттернов) патогена (PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns), например, флагеллина бактерий, клеточными рецепторами (PRRs, Pattern recognition receptors), локализованными на плазмменной мембране растительной клетки. В результате взаимодействия молекулярных паттернов с PRRs наблюдается немедленная и мощная индукция транскрипционного репрограммирования - избирательного и очень тонко регулируемого процесса, кардинально меняющего метаболизм растения.

В последнее время установлено, что фитовирусы, подобно другим патогенам, способны индуцировать РТИ и что индукторами РТИ при вирусной инфекции (вирусными PAMPs) служат двуцепочечные репликативные формы вирусных РНК (dsRNA). Таким образом, в растительной клетке функционируют, по меньшей мере, два антивирусных иммунных механизма, запускаемых при участии dsRNA – РТИ и РНК-сайленсинг.

Ранее мы показали, что белки, кодируемые Х вирусом шалота (ХВШ, род *Allexivirus*), не обладают супрессорной активностью, и, следовательно, вирус преодолевает иммунный барьер сайленсинга с помощью каких-то иных механизмов; мы предположили, что таким механизмом может быть индукция вирусом РТИ и, как следствие, специфическое транскрипционное

репрограммирование, в результате чего может избирательно изменяться уровень экспрессии целого ряда генов и, в частности, подавляться до критического уровня экспрессия факторов РНК-сайленсинга. Цель настоящей работы - экспериментальная проверка этой гипотезы.

В качестве модели при решении этой задачи была использована персистентная инфекция растений шалота XVIII. Включение в схему настоящего исследования, наряду с факторами РНК-сайленсинга, других генов-мишеней определялось необходимостью получить достаточные доказательства индукции РТИ и задачей выяснить, как в результате персистентной вирусной инфекции изменяется уровень экспрессии факторов ЕТИ и некоторых генов шалота, факт участия которых в репродукции фитовирусов установлен, хотя функции их в этих процессах детально пока не изучены. В соответствии с этим, список выбранных генов-мишеней включал, кроме Ago, RDR и DICER, классические маркеры РТИ, NBS-LRR рецепторы, факторы транскрипции, nsLTP и комплекс TCTP (TCTP-PIRL-GRF6-DBP1).

Уровни представленности транскриптов, кодирующих выбранные белки-мишени в корнях, проростках и листьях инфицированных растений шалота, определяли методом ПЦР в реальном времени в формате Comparative CT Experiment (алгоритм delta-delta CT; калибратор - сеянцы шалота, нормализатор – 18S РНК), используя The 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems или QuantStudio (APPLIED BIOSYSTEMS) и набор реагентов SYBR® Green Reagents (Syntol); образцы отбирали через 3 дня и через две недели после высадки луковиц.

На начальной стадии инфекционного процесса в проростках наблюдалась активация экспрессии всех (за исключением аргонавтов и PIRL) генов-мишеней, в том числе – и маркеров РТИ; через 2 недели инфекции ситуация в листьях оказывалась, в целом, противоположной: экспрессия большей части генов была подавлена: существенно снижены уровни экспрессии всех факторов РНК-сайленсинга (более всех – белков-аргонавтов), NB-LRR рецептора и белков CBP60g, контролирующих синтез салициловой кислоты; на достаточно высоком уровне поддерживалась экспрессия только ACRE132, nsLTP и комплекса [TCTP+GRF6]; в корнях экспрессия большей части генов-мишеней оказывалась в той или иной степени подавленной уже на начальной стадии инфекционного процесса, а через две недели инфекции

подавленной оказывалась экспрессия всех генов-мишеней, за исключением nsLTP и комплекса [TCTP+GRF6].

В целом, полученные результаты подтверждают нашу первоначальную гипотезу относительно природы механизма, с помощью которого ХВШ преодолевает иммунный барьер сайленсинга; эти результаты служат прямым доказательством вирусной индукции РТИ и позволяют в первом приближении представить следующую гипотетическую схему событий в процессе персистентной аллексивирусной инфекции в растениях шалота: репродукция ХВШ инициируется в клетках проростков; при этом двуцепочечные репликативные формы вирусной РНК взаимодействуют с неидентифицированными внутриклеточными сенсорами dsRNA (стадия перцепции); далее в процессе РТИ осуществляется передача сигнала от первичного иммунного комплекса к ядерному транскрипционному механизму, в результате чего осуществляется контролируемое во времени избирательное изменение уровней экспрессии ряда генов-мишеней в корнях и листьях инфицированных растений; процессы транскрипционного репрограммирования в этих органах различаются в деталях, однако общая тенденция сохраняется: в конечном итоге, ингибируется экспрессия всех (за исключением nsLTP и комплекса [TCTP+GRF6]), исследуемых факторов, как тех, которые контролируют защитные реакции растения-хозяина, так и тех, которые участвуют в репродукции вируса; возникшее равновесие разнонаправленных факторов и определяет, по-видимому, характер персистентной вирусной инфекции – отсутствие симптомов и невысокий уровень концентрации вируса; созоряющийся повышенный уровень экспрессии ACRE132 (одного из генов-маркеров РТИ) в листьях инфицированных растений отражает, возможно, тот факт, что в этих органах репродукция вируса и, соответственно, индукция РТИ еще продолжают, а в корнях эти процессы уже завершены.

Дальнейшие цели нашего исследования следующие: 1. идентификация и исследование спектра, динамики экспрессии и внутриклеточной локализации рецепторов вирусных двуцепочечных РНК, принимающих участие в функционировании двух различных антивирусных иммунных механизмов, индуцируемых dsRNA – РТИ и РНК-сайленсинга; 2. идентификация основных агентов сигнальных путей, осуществляющих передачу сигнала от первичного dsRNA-иммунного комплекса и принимающих участие в процессах транскрипционного

репрограммирования; 3. выяснение роли nsLTP и комплекса [TCTP+GRF6] в поддержании состояния персистентной аллксивиральной инфекции шалота.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ АЛЛЕЛОФОНДА И ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ТРЕХ ПОПУЛЯЦИЯХ РОМАНОВСКИХ ОВЕЦ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ

Денискова Т.Е., Соловьева А.Д., Зиновьева Н.А.
ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства имени академика
Л.К. Эрнста, отдел биотехнологии и молекулярной
диагностики животных, Дубровицы 142132
E-mail: horarka@yandex.ru

Характеристика состояния аллелофонда и установление уровня генетического разнообразия в популяциях сельскохозяйственных животных с помощью ДНК-маркеров является, с одной стороны, подготовительной основой для выбора селекционной стратегии, а, с другой стороны, важным этапом описания и консервации имеющихся генетических ресурсов. Микросателлитные маркеры (или короткие tandemные повторы, STR) представляют собой наиболее доступный, простой и нетрудоёмкий тип молекулярных маркеров, которые нашли широкое применение в популяционно-генетических исследованиях животных. Целью нашей работы явилось изучение основных параметров аллелофонда и оценка уровня генетического разнообразия в трех популяциях овец романовской породы в трехлетней динамике. Выборка была представлена 325 головами овец из трех племенных хозяйств за три года: хозяйство «ООО Агрофирма Авангард», AV (AV2014, n=32; AV2015, n=40; AV2016, n=35), «ООО Агрофирма Земледелец», ZEM (ZEM2014, n=29; ZEM2015, n= 39; ZEM2016, n=35) и «ООО Заречье», ZAR (ZAR2014, n=37; ZAR2015, n=46; ZAR2016, n=32). Выделение ДНК было произведено методом экстракции с использованием перхлората натрия и с помощью набора ДНК-Экстран» (ЗАО «Синтол», Россия). Для ПЦР-амплификации были выбраны 11 микросателлитных локусов (OarCP49, INRA063, HSC, OarAE129, MAF214, OarFCB11, INRA005, SPS113, INRA23, MAF65 и McM527). Разделение фрагментов проводили на генетическом анализаторе ABI3130xl (Applied Biosystems, США). Показатели аллелофонда, включающие среднее число аллелей на локус (Na),

эффективное число аллелей (N_e), число информативных аллелей ($N_a \geq 5\%$), и генетического разнообразия (уровни ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности, коэффициент инбридинга (F_{is}), были рассчитаны в программе GenAIEx 6.501. В «Авангарде» наибольшее число эффективных аллелей было зафиксировано в 2014 году: $4,30 \pm 0,52$ против $4,27 \pm 0,71$ в 2015 и $3,23 \pm 0,60$ в 2016, соответственно. В свою очередь, максимум информативных аллелей был выявлен в 2015 году и составил $4,89 \pm 0,54$ аллелей на локус. В «Земледельце» число эффективных аллелей на локус снизилось в 2015 году ($3,76 \pm 0,49$) по сравнению с 2014 ($3,76 \pm 0,49$), при этом в 2016 году была отмечена небольшая тенденция роста данного показателя аллельного профиля ($3,79 \pm 0,57$). Число информативных аллелей было стабильным в 2014 и 2015 гг. ($4,78$ аллелей) и снизилось в 2016 году ($4,33 \pm 0,67$). Для «Заречья» было характерно снижение числа как эффективных, так и информативных аллелей в течение 3 лет: N_e от $4,07 \pm 0,56$ до $3,87 \pm 0,71$ и $N_a \geq 5\%$ от $4,33 \pm 0,58$ до $4,11 \pm 0,66$ в 2014 и 2016 гг., соответственно. Интересным фактом явилось то, что в AV был зафиксирован умеренно высокий дефицит гетерозигот в 2014 году ($4,6\%$; $F_{is}=0,050$), который в 2015 г. перешел на наиболее высокий уровень ($16,5\%$; $F_{is}=0,224$), а на конец 2016 г. уже наблюдался умеренно высокий избыток гетерозигот (7% ; $F_{is}=-0,039$). В хозяйстве ZEM уверенно высокий избыток гетерозигот был зафиксирован в 2014 году ($11,9\%$; $F_{is}=-0,178$); 2015 г. характеризовался уже умеренно средним дефицитом гетерозигот ($8,6\%$; $F_{is}=0,139$). Однако на конец 2016 г. количество гетерозигот стало снова избыточным ($2,2\%$; $F_{is}=-0,013$). По генетическому разнообразию в хозяйстве ZAR наблюдались схожие тенденции с ZAR: избыток гетерозигот в 2014 г. ($8,4\%$; $F_{is}=-0,146$), сменившийся на дефицит в 2015 г. ($11,9\%$; $F_{is}=0,150$) и частично восстановившийся в 2016 г. ($1,0\%$; $F_{is}=-0,021$). Суммируя вышеизложенное, хотелось бы отметить, что на примере романовских овец мы продемонстрировали степень изменчивости показателей аллелофонда и генетического разнообразия с течением времени, что напрямую зависит от систем отбора животных и селекционных программ, принятых в том или ином хозяйстве.

Работа выполнена в рамках задания Федерального агентства научных организаций (ГЗ 14; 0600-2016-0005, подраздел 1 «Изучение функциональной и нейтральной изменчивости различных пород и гибридов овец с использованием микросателлитных маркеров и гена прионового протейна овец») в 2017 году.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПАСПОРТИЗАЦИЯ ГЕНОТИПОВ ЛОШАДЕЙ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТАМ ДНК

Гавриличева И.С., Блохина Н.В., Храброва Л.А, Царёва М.А.
***ФГБНУ ВНИИ коневодства, отдел генетики, Рязанская
область, 391105***

E-mail: labgenetics79@gmail.com

В настоящее время генетическая сертификация лошадей в большинстве стран является обязательной процедурой племенного учета и надежным методом идентификации животных. Повсеместное внедрение молекулярно-генетических методов типирования лошадей позволяет не только повысить надежность контроля происхождения практически до 100%, но и открывает широкие возможности для совершенствования генотипической оценки животных и внедрения методов маркерной селекции в практику племенной работы.

Сегодня лаборатория генетики является ведущей организацией по генетической экспертизе происхождения лошадей. За период с 1976 по 2016 годы сотрудниками лаборатории протестировано свыше 165 тысяч лошадей заводских и местных пород.

Контроль происхождения лошадей по генетическим маркерам, к которым относятся полиморфные системы белков, ферментов и групп крови, а также микросателлиты ДНК, основан на принципе генетического исключения. Генотип потомка должен соответствовать генотипам его отца и матери. Если у жеребенка “не проявляются” аллели отца или матери, делается закономерный вывод об исключении происхождения (отцовства) заявленных родителей данной лошади (4,5).

Эффективность генетической экспертизы происхождения лошадей напрямую зависит от числа используемых полиморфных локусов и от уровня полиморфности (количества аллелей) в каждом из них. Так как разнообразие генотипов лошадей по ДНК-маркерам существенно выше, чем по маркерам систем крови, возможны случаи, когда лошадь, «соответствующая» заявленным родителям по нескольким системам белков, «не пройдет» сертификацию по 17 локусам микросателлитов ДНК. В таком случае окончательным признается объективно более достоверный анализ ДНК.

Микросателлиты ДНК представляют собой сравнительно небольшие участки хромосом с определенной структурной последовательностью динуклеотидных повторов. Число таких последовательностей (размер аллеля) строго индивидуально и

наследуется в соответствии с законами Менделя. Весомым преимуществом микросателлитных локусов является большое число аллелей в анализируемых локусах, достигающее 20 и более. С практической точки зрения микросателлиты являются идеальными генетическими маркерами для генетической идентификации и паспортизации лошадей (1, 3, 4, 6).

Учитывая требования Международного общества генетики животных (ISAG), наша лаборатория в 2006 году приступила к работе по типированию лошадей по 17 локусам микросателлитов ДНК, успешно прошла Международные сравнительные испытания (Horse Comparison Tests) и получила право выдавать международные ДНК-сертификаты.

На сегодняшний день по микросателлитным маркерам ДНК протестировано более 23 тысяч лошадей заводских и местных пород. Это позволило максимально повысить эффективность контроля происхождения лошадей заводских пород и успешно использовать этот метод при разрешении вопросов спорного отцовства, свести к минимуму возможность ошибок и умышленных фальсификаций происхождения. Одновременно с проведением контроля происхождения тестирование лошадей по 17 микросателлитным локусам дает уникальную информацию о генотипе и позволяет контролировать передачу наследственного материала, сходство с родоначальником и эффективно разрабатывать вопросы использования маркерной селекции в коневодстве (3, 5, 6).

В настоящее время в нашей стране принято обязательное генотипирование по микросателлитным маркерам ДНК всех жеребят чистокровной верховой, чистокровной арабской, ахалтекинской и орловской рысистых пород. Жеребята, не прошедшие контроль достоверности происхождения, не допускаются к регистрации в Государственной книге племенных лошадей.

Изучение молекулярно-генетических характеристик лошадей отечественных пород выявило наличие определенных породных особенностей и достаточно стабильной породной структуры практически во всех обследованных популяциях. Сравнительно высоким уровнем генетического разнообразия и большим числом уникальных аллелей характеризуется ахалтекинская и орловская рысистая породы лошадей. Очень редкие аллели микросателлитной ДНК были обнаружены и у

многих местных лошадей – алтайской, башкирской, тувинской, хакаской и якутской (1, 2, 3).

Перспективным направлением лабораторных исследований является разработка методов ДНК-диагностики наследственных заболеваний. Сегодня у лошадей известно около трех десятков однолокусных мутаций, вызывающих наследственные болезни. Среди них особый интерес представляет тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), который встречается у 0,4-2% арабских жеребят, а также у лошадей с примесью арабской крови. ДНК-технологии открывают новые возможности для тестирования наследственных заболеваний, и очевидно, что селекционные программы должны быть направлены на ограничение распространения нежелательных мутаций.

Таким образом, современный этап генетической сертификации лошадей характеризуется повсеместным использованием унифицированных методов ДНК-диагностики, что позволяет надежно проводить идентификацию и генетическую экспертизу происхождения племенных животных. Генетические маркеры являются важнейшим ресурсом для мониторинга биологического разнообразия популяций и происходящих в них процессов. Значительный интерес представляют исследования по выявлению генов, ассоциированных с селекционируемыми признаками, и прежде всего с работоспособностью, плодовитостью и адаптивными качествами лошадей.

Список литературы

1. Калашников, В.В. Изучение полиморфизма сателлитной ДНК лошадей заводских и местных пород / В.В.Калашников, Л.А.Храброва, А.М.Зайцев и др. // Доклады РАСХН. - 2010. - № 6. – С. 48-50.

2. Калашников, В.В. Использование микросателлитных локусов ДНК для оценки генетического разнообразия орловской рысистой породы лошадей / В.В.Калашников., Л.А.Храброва, М.А.Зайцева и др. // Вестник РАСХН. - 2014. - №2. – С.30-33.

3. Калинкова, Л.В. Результаты генетического тестирования при контроле происхождения лошадей с использованием микросателлитных маркеров ДНК / Л.В.Калинкова, Н.В.Блохина, И.С.Гавриличева, Т.В.Калашникова // Коневодство и конный спорт. – 2017 - №1. – С.32-33.

4. Методы генетической сертификации лошадей по полиморфным системам крови (Л.А.Храброва, Р.М.Дубровская, И.С. Гавриличева, А.М. Зайцев). – Дивово, 2010. – 70 с.

5. Храброва, Л.А. Стратегия использования генетических маркеров и геномной селекции в коневодстве // – Дивово. – 2015. – 81 с.

6. Van de Goor, L.H.P. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci / L.H.P. van de Goor., H.Panneman, W.A.van Haeringen // Animal Genetics. – 2010. – Vol.41. – P.122-127.

СОЗДАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ КДНК ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА, ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

**Белова Н.В., Кутын И.В., Езерский В.А., Колоскова Е.М.,
Трубицына Т.П., Максименко С.В., Рябых В.П.
ФГБНУ ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных,
Боровск, Калужская обл., 249013
E-mail: navikbel@mail.ru**

Трансгенные сельскохозяйственные животные – самый удобный источник получения рекомбинантных белков фармакологического назначения в молочной железе. Лактоферрин человека (чЛФ) – один из перспективных биологически активных белков широкого спектра действия для экспрессии в молоке.

До сих пор основным способом получения трансгенных животных (ТЖ) является микроинъекция линейной генно-инженерной конструкции (ГИК) в один из пронуклеусов зиготы с последующей трансплантацией выживших эмбрионов подготовленным самкам-реципиентам. Низкий процент интеграции чужеродной ДНК в этой технологии – одна из самых больших проблем: его эффективность составляет не более 2% полученных ТЖ от количества пересаженных микроинъецированных эмбрионов. В связи с этим возникает необходимость отбора эмбрионов с интегрированным трансгеном до стадии пересадки реципиенту. Особенно актуально это в отношении малоплодных сельскохозяйственных животных – коз, овец, коров.

В минимальной комплектации линейная генно-инженерная конструкция включает в себя промотор, трансген и терминирующую последовательность, обеспечивающих транскрипцию трансгена при встраивании в геном, происходящем, как правило, случайным образом. Один из способов селекции эмбрионов на предимплантационной стадии – введение в состав

ГИК репортерных систем, подтверждающих наличие трансгена, например, генов флуоресцентных белков под промотором, обеспечивающим экспрессию на ранних стадиях развития. Использование селективных сред, содержащих в своем составе токсичный для эукариот антибиотик – основа другого принципа отбора: для этого в состав ГИК вводят ген устойчивости к этому антибиотику.

В нашей лаборатории ранее была создана ГИК, содержащая 5' и 3' фланкирующие области (2100 и 1500 п.н. соответственно) гена *αs1*-казеина крупного рогатого скота и кодирующую ДНК (2100 п.н.) лактоферрина человека (*hLf*) - *αs1Lf*. С использованием этой конструкции была получена трансгенная по ЧЛФ крольчиха, экспрессирующая белок в молоко и ставшая основательницей линии. Но эффективность интеграции *hLf* в этом случае составила 0,6%. С целью повышения эффективности трансгенеза на стадии отбора предимплантационных эмбрионов нами были созданы новые конструкции с использованием генов маркерных и/или селективного белков, слитых с *αs1Lf*.

Клонированием в плазмиду *pas1Lf* гена зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*) была получена ГИК *αs1LfcmvEGFP*. Ген *EGFP* с промоторной областью цитомегаловируса (*cmv*), и сайтом полиаденилирования был выделен из плазмиды *pcEGFP*. Изучение развития *in vitro* эмбрионов кролика и интеграции в их геном трансгена при введении в пронуклеус зигот конструкции *αs1LfcmvEGFP* показало, что способность кроличьих зигот развиваться до стадии бластоцисты существенно снижалась: число развившихся до стадии бластоциста эмбрионов составило 3,2% (1/31) против 87% (20/23) в контроле. Большее число трансгенных эмбрионов было среди остановившихся в развитии на стадии 2-16 клеток вследствие облучения ультрафиолетом в ходе определения экспрессии *EGFP* под люминесцентным микроскопом.

Как показала дальнейшая практика, в качестве репортерного предпочтительнее использовать ген красного флуоресцентного белка (*RFP*): при облучении синим цветом эмбрионы имеют собственное слабое зеленое свечение и при слабой экспрессии трансгенной конструкции с *GFP* результат может быть неверно интерпретирован. К тому же клетки, содержащие красный флуоресцентный белок, способны к длительному красному свечению после облучения видимым светом 540-560 нм, менее опасным для них. Клонированием в плазмиду *pas1Lf* гена красного

флуоресцентного белка была получена ГИК *as1LfcmvRFP*. Такая конструкция при интеграции должна обеспечивать экспрессию красного белка на ранней стадии эмбриогенеза и лактоферрина человека в молочной железе трансгенных животных на стадии лактации. Ген *RFP* под промотором *cmv* и сигналом полиаденилирования *sv40* методом ПЦР-амплификации получали из коммерческой плазмиды *pTurboRFP-N* («Евроген»).

Несмотря на относительно высокую эффективность интеграции ГИК с генами репортерных белков, выживание таких эмбрионов на предимплантационной стадии и в процессе вынашивания животными-реципиентами было низким, возможно, из-за высокой экспрессии флуоресцентного белка, обусловленной активным цитомегаловирусным промотором. С другой стороны, низкая экспрессия флуоресцентного трансгена в случае поздней интеграции, могла быть не отслежена. На следующем этапе использовали принцип отбора трансгенных клеток и эмбрионов выращиванием в селективной среде. Для этого в плазмиду *pas1Lf* клонировали прокариотический ген устойчивости к неомицину (ген неомицинфосфотрансферазы -*Neo*), обеспечивающий выживаемость трансфицированных клеток на среде с антибиотиком *G418*, аналогом неомицина. Ген *Neo* под ранним промотором *sv40* и сигналом полиаденилирования *HSVTK* (тимидинкиназа вируса простого герпеса) выделяли из плазмиды *pTurboRFP-N*. В результате получена плаزمида *pas1LfsvNeo*, содержащая ГИК из двух генов, с потенциально различным уровнем тканеспецифичной экспрессии: ген *hLf* с экспрессией в период лактации и ген *Neo* с экспрессией на ранних стадиях эмбриогенеза. Эксперименты с фетальными фибробластами кролика и крупного рогатого скота, трансформированными *as1LfsvNeo*, показали способность клеток с интегрированным трансгеном к образованию колоний с последующим их слиянием в монослой при культивировании в среде с *G418*. При реконструировании эмбрионов такие клетки могут использоваться в качестве источников трансгенных кариопластов.

Также нами была получена ГИК размером 9425 п.н., содержащая одновременно и селективный, и репортерный гены - *as1LfcmvRFPsvNeo*, которая успешно работала уже по двум критериям при отборе трансфицированных ею фетальных фибробластов

Использованный нами «блочный» подход модификации плазмиды *pas1Lf* для получения ГИК разного назначения может

быть применен при конструировании наборов, содержащих ген любого другого целевого белка.

ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИЛОКУСНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ СИСТЕМ АНАЛИЗА ДЛЯ РАЗЛИЧЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СОРГО (*SORGHUM*)

Мицурова В.С., Анискина Ю.В., Шилов И.А.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550,***

Москва, Тимирязевская, 42

E-mail: vmitsurova@gmail.com

Сорго является перекрестно опыляемой культурой и представлено многообразием сортов и дикорастущих форм. Видовое разнообразие сорго наиболее полно отражено в классификации по принципу хозяйственного использования, предложенной Е.С. Якушевским. В настоящее время для расширения генофонда сорговых культур с целью дальнейшего его использования при выведении сортов применяют межсортовую и межвидовую гибридизацию. В процессе селекции на основе культурных и дикорастущих видов сорго создаются наиболее перспективные линии, включающие в себя комплекс хозяйственно-полезных признаков. Важной задачей в селекции сорго является надежное различение и идентификация получаемых селекционных форм. Применение генетического анализа в дополнении к оценке по фенотипическим признакам позволит повысить достоверность идентификации растительных образцов, а также сократит сроки селекционного процесса.

Среди методов генотипирования наиболее широкое применение получил метод анализа полиморфизма микросателлитов, вследствие их кодоминантности, специфичности и равномерного распределения в геноме [1]. Применение мультилокусного микросателлитного анализа позволяет значительно сократить сроки генетического анализа и затраты на его проведение.

Целью данной работы являлось различение и идентификация представителей рода *Sorghum* с помощью мультилокусного микросателлитного анализа.

В ходе исследования было изучено 124 образца разных видов сорго (*Sorghum*), любезно предоставленных Е.В. Малиновской - старшим научным сотрудником группы сорго и

просовидных культур Кубанской опытной станции ВИР имени Н.И. Вавилова (п. Ботаника, Краснодарский край). Для проведения генетического анализа сорго были использованы 2 мультилокусные системы на основе 7 и 10 одновременно анализируемых микросателлитных локусов [2, 3]. Данные локусы в основном представлены динуклеотидными повторами, реже три- и тетрануклеотидными. Для одновременной детекции микросателлитных фрагментов использовали праймеры, меченные разными флуоресцентными красителями. Генетический анализ растений сорго включал следующие этапы: выделение ДНК, проведение ПЦР, фрагментный анализ в капиллярном анализаторе «Нанофор-05», анализ полученных данных с использованием компьютерных программ. Фрагментный анализ был проведен совместно с ЦКП «Биотехнология» ВНИИСБ.

В результате проведенного анализа были получены генетические характеристики каждого исследуемого образца сорго в виде набора фрагментов ДНК определенной длины - ДНК-профили, на основе которых были составлены генетические формулы. Полученные для каждого наименования сорго генетические формулы являются уникальными и могут быть использованы для надежного различения и идентификации сортов сорго.

В ходе работы был изучен аллельный состав микросателлитных локусов и исследована частота встречаемости выявленных аллелей в коллекции сорго. В большинстве локусов было выявлено более 17 аллелей, частота встречаемости которых составила от 0,007 до 0,377. Индекс полиморфности исследованных локусов (PIC) варьирует в диапазоне от 0,608 до 0,949, что свидетельствует о высоком уровне информативности используемых микросателлитных маркеров.

Следует отметить, что для надежного различения представителей коллекции сорго необходимо использовать две мультилокусные системы, включающие 17 микросателлитных локусов. Анализ совокупности локусов позволяет получить уникальные аллельные комбинации, которые достоверно различают растительные образцы.

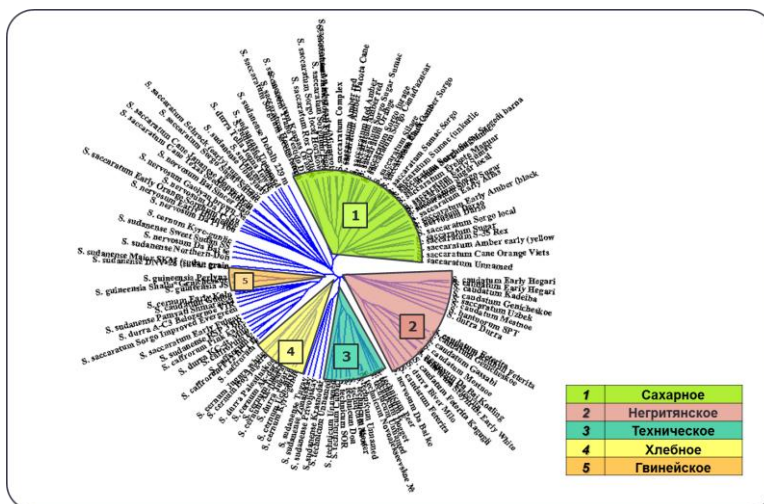


Рис. 1. Дендрограмма взаимосвязей между исследованными сортами сорго.

В результате фрагментного анализа коллекции сорго было выявлено 276 дескрипторов, на основе которых была построена дендрограмма, отражающая генетическое разнообразие растительных форм сорго (рис. 1). Было установлено, что большинство исследуемых образцов сорго группируются в кластеры согласно видовой принадлежности и в соответствии с классификацией, предложенной Е.С. Якушевским.

Литература:

1. Шилов И.А. Применение технологии микросателлитного анализа ДНК в растениеводстве.// Проблемы агробиотехнологии, под ред. П.Н. Харченко. - М., 2012. - С. 140 - 162.
2. Шалаева Т.В., Анискина Ю.В., Шилов И.А. Разработка системы микросателлитного анализа представителей разных видов сорго (*Sorghum*) на основе мультилокусной ПЦР. / Шалаева Т.В., Анискина Ю.В., Шилов И.А. // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: материалы из XVI Молодежной конференции ВНИИСБ. – Москва, 2016. – с. 26-27.
3. Kong L., Dong J., Hart G.E. Characteristics, linkage-map positions, and allelic differentiation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench DNA simple-sequence repeats (SSRs). // Theor. Appl. Genet. – 2000. V. 101. - P. 438–448.

ГЕНЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ МАСТЬ ЛОШАДИ, КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В КОНЕВОДСТВЕ

Курская В.А.

Российский государственный аграрный университет им.

К.А. Тимирязева

ул. Тимирязевская, 49, г. Москва, 127550

E-mail: pesada@mail.ru

Одной из самых серьезных проблем отечественного коневодства на современном этапе является сохранение малочисленных отечественных пород, таких как донская, буденновская, владимирская, русский и советский тяжеловоз, русская верховая и другие. При сокращении численности популяции неизбежным становится сокращение генетического разнообразия породы.

В коневодстве генетическое разнообразие генофонда пород определяется прежде всего по генам, отвечающим за белки крови (трансферрин Ts, альбумин Al, иногда постальбумин Xk) и системы крови (A, C, D и K), по гену сывороточной экстеразы Es, а также по микросателлитным маркерам. Однако, к сожалению, для большинства государственных племенных хозяйств генетические исследования производящего состава слишком дороги финансово. Поэтому в качестве альтернативы анализам ДНК в такой ситуации мы предлагаем селекцию по мастям, для чего в некоторых случаях можно делать выборочные анализы ДНК лошадям, входящим в производящий состав конных заводов.

Подчеркнем, что наша идея состоит не в том, чтобы традиционные направления селекции в отечественных породах разного назначения заменить селекцией по мастям. Смысл ее в том, чтобы при прочих равных параметрах при отборе и подборе отдавать предпочтение тому производителю или матке, использование которых позволит получить большее разнообразие мастей у приплода.

Поясним нашу идею на примере советской тяжеловозной породы. В начале своего существования в ней наблюдалось значительное мастевое разнообразие, которое заметно сократилось при уменьшении численности поголовья в 90-е годы. Так, в I томе ГПК советских тяжеловозов (1956, жеребцы) рыжие лошади составляют 43,9%, бурые — 9%, рыже-чалые — 16,4%, гнедые — 18,2%, гнедо-чалые — 8,6%, вороные — 0,9%, вороно-чалые — 1%, серые — 1,1%. Во II томе ГПК советских тяжеловозов (1960, кобылы) рыжие лошади составляют 41,6%, бурые — 7,4%, рыже-

чалые — 10,0%, гнедые (с караковыми) — 25,7%, гнедо-чалые — 6,2%, вороные — 3,1%, вороно-чалые — 0,5%, серые — 2,9%. В последнем, X, томе ГПК этой породы (2015) соотношение мастей следующее: рыжие — 81,1%, бурые — 0,7%, рыже-чалые — 10,2%, гнедые — 5,1%. В этом томе записан только 1 гнедо-чалый жеребенок под матерью, вороные лошади отсутствуют. В 2016 году мы исследовали маточный состав Починковского и Перевозского конных заводов. Из 65 голов рыжие составили 69,2%, бурые — 3,0%, рыже-чалые — 7,7%, гнедые — 16,9%, вороные — 3,0%. В Починковском заводе также используется жеребец-производитель Ратоборец (Рэкетир — Резонёрка) редкой серебристо-гнедой масти, до 2000-х годов в зоотехнической науке не выделявшейся, и в поэтому нет точных данных о ее распространении в породе в прошлом. К настоящему моменту нам удалось при помощи анализов ДНК выявить еще 5 кобыл-носительниц мутации гена Silver, определяющей редкие серебристо-гнедую и серебристо-вороную масти. Эти кобылы рыжие, на фоне рыжей масти указанный аллель не проявляется фенотипически. Серая же масть полностью исчезла из оветской тяжеловозной породы.

Необходимо отметить, что гены Al и Es входят в так называемую II группу сцепления, расположенную в 3-й хромосоме лошади. В эту же группу входит ген Extension, аллели которого определяют разницу между рыжей мастью (аллель e) и гнедой / вороной (аллель E), а также ген KIT, одна из мутаций которого отвечает за чалую масть. Внутри группы сцепления аллели из поколения в поколение передаются вместе. Таким образом, по нашему мнению, разнообразие мастей в породе может служить видимым невооруженным глазом показателем генетического разнообразия. Примечательно, что во вступительной статье к VI тому Государственной племенной книги русских тяжеловозов (1982) отмечено, что увеличение процента рыжих лошадей в породе указывает на продолжение типизации и увеличения степени однородности поголовья. С точки зрения генетики это верно, однако у генетической однородности генофонда есть и обратная сторона — опасность инбредной депрессии, предотвращение которой более актуально на настоящем этапе с учетом серьезного сокращения поголовья отечественных тяжеловозных пород.

Е.А. Игнатьева (1997) предлагала ввести отбор по мастям в советской тяжеловозной породе. Развивая эту идею, в целях поддержания и увеличения генетического разнообразия в указанной породе лошадей мы предлагаем направить отбор по

мастям в сторону увеличения доли лошадей гнедой, вороной и серебристо-гнедой мастей в противовес рыжим и бурым, а также в сторону увеличения доли чалых лошадей в противовес нечалым. При правильном подборе родительских пар можно получать приплод редких серебристо-гнедой и серебристо-вороной мастей, используя серебристо-гнедого Ратоборца преимущественно на гнедых и вороных кобылах, а также рыжих кобыл-носительниц мутации гена Silver в паре с гнедыми жеребцами.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Кочина Е.А., Шумилина Д.В.

***Московский Физико-Технический Институт (Государственный
Университет), Институтский переулок дом 9, строение 7, г.***

Долгопрудный,

Московская обл. Россия, 141700

kochina@phystech.edu

Объектом исследований стал подсолнечник (*Helianthus annuus* L.), потому как эта культура широко распространена и активно выращивается в России. Несмотря на важность подсолнечника, в настоящее время всё ещё слабо разработаны биотехнологические методы, которые можно было бы применить к данной культуре. Современное производство подсолнечника базируется на использовании гибридных семян. Для получения гибрида в традиционной селекции приходится затрачивать более 8 лет на создание родительских чистых линий. В то же время для многих культур уже разработаны технологии получения гомозиготных растений в культуре *in vitro*, при которой культивирование гаметных клеток донорного растения (микроспор или семяпочек) приводит к развитию гаплоидного растения. Поскольку гаплоиды обладают только одной копией аллеля каждого локуса, это дает возможность выявить рецессивные мутации, которые в обычных диплоидных растениях замаскированы немутантными доминантными аллелями генов. Удвоение хромосом у гаплоидных растений позволяет быстро создавать удвоенные гаплоиды, гомозиготные по всем генам. Эта технология широко используется в селекции рапса, сахарной свёклы, ряда других сельскохозяйственных культур.

В литературе имеются только единичные публикации о регенерации гаплоидных растений подсолнечника в культуре микроспор, исследований же по регенерации неопылённых семян почеч практически не проводилось.

Поскольку подсолнечник является сложной культурой для получения удвоенных гаплоидов в культуре *in vitro*, целью данного исследования стало изучение регенерации подсолнечника в культуре микроспор и неопылённых семян почеч и сравнение этих методик.

В работе использовали подсолнечник сортов Джин и Белочка; сорта относятся к кондитерскому типу подсолнечника. Работа состояла из двух частей: разработка методики получения гаплоидов в культуре микроспор и в культуре неопыленных семян почеч.

Для исследования отзывчивости сортов Джин и Белочка в культуре микроспор были использованы бутоны, содержащие микроспоры на стадии развития- поздняя одноклеточная. При культивировании микроспор были использованы различные режимы инкубирования, испытаны комбинации регуляторов роста и развития растений.

Каждые 3-4 дня инкубирования микроспор проводили учёты развития микроспор. Ни в одном из вариантов культивирования делений микроспор не было обнаружено, некоторые микроспоры увеличивались в объёме, но при последующем их окрашивании делений обнаружено не было.

Для культивирования семян почеч применяли среду Мурасиге-Скуга, Нитча, Гамборга с 3% сахарозы, 6 г/л агара. Было изучено влияние различных питательных сред и регуляторов роста и развития, активированного угля на регенерацию растений в культуре семян почеч. Наиболее значимые результаты развития семян почеч были получены с использованием сред с солями Мурасиге-Скуга и добавлением цитокининовых регуляторов роста и развития. Полученные ростки подсолнечника, как правило, после перенесения на безгормональную МС среду с 3 % сахарозой и 6г/л агара, развивались в розеточный тип растений, с укороченными междоузлиями или переходили к образованию соцветий. Получить нормальные растения-регенеранты удалось при переносе побегов с розеточным типом стебля на описанную ранее среду с добавлением 0,1 мг/л гибберелиновой кислоты, после чего побеги были укорены на питательной среде с добавлением нафтилуксусной кислоты в концентрации 0,1мг/л.

Проведенные исследования показали, что регенерация гаплоидных растений подсолнечника сортов Белочка и Джин более успешно проходит при культивировании семян по сравнению с культивированием микроспор.

Полученные растения после проверки на плоидность будут переданы селекционерам для выведения новых российских гибридов и сортов подсолнечника.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ПИРОПЛАЗМИДОЗОВ ЛОШАДЕЙ

Калашникова Т. В.

***ФГБНУ ВНИИ коневодства, отдел генетики, Рязанская
область, 391105***

E-mail: labgenetics79@gmail.com

Пироплазмидозы – облигатно-трансмиссивные заболевания животных, вызываемые беспигментными эндоглобулярными паразитами крови. Возбудителями являются 2 вида из семейства Piroplasmidae - Babesia caballi и Theileria (Babesia, Nuttallia) equi. Болезнь протекает в виде сезонных вспышек. Специфические переносчики – клещи родов Dermacentor и Hyalomma. Инвазия зарегистрирована во многих странах мира и наблюдается в большинстве регионов России. Пироплазмидозы наносят существенный ущерб коневодству, не только в виде гибели животных, но и снижения на длительный срок продуктивности и работоспособности, а также затрат на лечебно-профилактических мероприятий. Часто отмечается бессимптомное течение болезни и смешанная инвазия, поэтому своевременная постановка диагноза затруднена. Диагноз ставят комплексно, на основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, лабораторных исследований мазков крови и серологических методов (РСК, РДСК, РИФ, ELISA). Согласно инструкции МСХ РФ, при ввозе/вывозе лошадей на территорию РФ проверка на пироплазмидозы является обязательной. Учитывая важность высокочувствительной диагностики, была поставлена задача разработки молекулярно-генетических методов скрининга бабезиозов лошадей и их внедрение в ветеринарную практику.

Материалы и методы. В качестве материала для исследований послужили образцы крови 279 голов лошадей (Equus caballus), доставленных в лабораторию из различных регионов

РФ. Кровь брали из яремной вены или сосудов ушной раковины с соблюдением мер асептики и антисептики. В качестве антикоагулянта использовали Трифон. Б, кровь доставляли в лабораторию в течение 1-2 суток после взятия. Мазки крови окрашивали азур-эозином по Май-Грюнвальду. Мазки исследовали при помощи светового микроскопа OptiTech и системы фотодокументирования Webbers MyScope 300M. На основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 18S-рибосомальной РНК, представленных в международной базе данных «GeneBank» совместно с ООО «Лаборатория ИзоГен» были выбраны наиболее консервативные видоспецифичные последовательности ДНК *Babesia equi* и *Babesia caballi* и несколько вариантов часто цитируемых праймеров. ДНК выделяли по стандартной методике с использованием набора «Diatom DNA Prep 200». Полученную ДНК амплифицировали с использованием выбранных праймеров для обнаружения ДНК *Babesia equi* и *Babesia caballi* и набора DNA PCR Core на амплификаторе CycloTemp 107. Состав реакционной смеси включал 5 мкл исследуемой ДНК, 10 мкл PCR-diluent (0,2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 0,2 ед. Taq-полимеразы «HotStart», 16 пкМ праймера, деионизованной воды до 20 мкл, минерального масла 20 мкл), температура отжига праймеров составляла 58 оС. Продукты амплификации анализировали в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в гель. Видовую принадлежность возбудителя дифференцировали по массе конечных продуктов амплификации – 203 п.н. для *Babesia caballi* и 264 п.н. для *Babesia equi*. Интерпретацию результатов проводили визуально на трансиллюминаторе под УФ-излучением.

Полученные результаты. Проанализировано 279 мазков крови лошадей из различных хозяйств. При окраске азур-эозином по Май-Грюнвальду выявлена следующая цитологическая картина:

-234 образца (84,9%) не содержали посторонних включений в эритроцитах.

-34 образца (11,2 %) содержали единичные включения.

-11 (3,9 %) образцов содержали единичные каплевидные формы, специфичные для *Babesia caballi* (у 7 животных носительство пироплазмоза установлено методом РСК, (ВИЭВ).

При окраске 39 мазков по методу Дейси во всех образцах были выявлены единичные эритроциты с тельцами Гейнца. Тельца Гейнца представляют собой одиночные круглые гранулы фиолетового или темно-синего цвета при окрашивании метиловым

фиолетовым; появление телец Гейнца в эритроцитах в большом количестве (3 и более на эритроцит) свидетельствует о патологических нестабильных формах гемоглобина (метгемоглобин). Наличие в крови 0,1% эритроцитов с тельцами Гейнца является физиологической нормой. Для корректировки работы набора на выявления ДНК *Babesia caballi* с измененным дизайном праймеров были использованы образцы крови 11 голов лошадей, в эритроцитах которых были обнаружены формы, специфичные для *Babesia caballi*.

Исследовано 66 образцов ДНК лошадей на наличие *Babesia equi*. Все пробы дали отрицательный результат

Таблица 1 – Результаты скрининга поголовья лошадей на кровепаразитарные инвазии

Микроорганизм	Всего голов	ПЦР		Микроскопия мазка		% соответствия,	
		Положит. результат	Отрицат. результат	Положит. результат	Отрицат. результат	+	-
<i>Babesia equi</i>	66	0	0	0	66	0	100
<i>Babesia caballi</i>	279	0	0	11	268	100	-

Закключение. Разрабатываемая тест-система для обнаружения бабезий в биоматериале показала высокую чувствительность при носительстве. Важным преимуществом разрабатываемой тест-системы является ее пригодность для массового скрининга, возможность определять благополучие региона путем исследования материала от клещей переносчиков, возможность получения результатов в течение нескольких часов и невысокая стоимость массовых анализов

Список литературы

1. Заблочкий В. Т., Пироплазмидозы лошадей/ Ветеринария 2008 - №8- с. 17-21
2. Калашникова Т.В., Идентификация и распространение пироплазмидозов лошадей/ Коневодство и конный спорт. 2015. № 1. С. 25-28.
3. Робинсон Э. Болезни лошадей. Современные методы лечения. М., «Аквариум», 2007- 1007с.
4. Allsopp M. T., Lewis B. D., Penzhorn B. L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. Vet Parasitol. 2007; 148: 130-136

ИДЕНТИФИКАЦИЯ В ПРОМОТОРЕ PRO-SMAMP1 ИЗ *STELLARIA MEDIA* РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ЕГО ИНДУЦИБЕЛЬНОСТЬ В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА ПРИ АТАКЕ ФИТОПАТОГЕНОВ

Маджарова Н.В., Зайцев Д.В., Комахин Р.А.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва 127550,*

E-mail: recombination@iab.ac.ru

Выяснение взаимосвязи между первичной структурой нуклеотидной последовательности промоторной области и ее транскрипционными свойствами является актуальной задачей современных фундаментальных исследований в биологии растительной клетки. Новые промоторы генов растений с сильной и индуцибельной транскрипционной активностью в различных видах растений приоритетны для использования в генетической инженерии.

Ранее нами было установлено, что в растениях мокрицы *S. media* экспрессия гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP1* находится на высоком уровне и дополнительно возрастает от 10 до 70 раз при контакте с патогенными грибами [1]. Показано, что делеционные варианты промотора *pro-SmAMP1* до -1235 п.н. относительно сайта инициации трансляции ATG в гомозиготных трансгенных линиях растений табака (*Nicotiana tabacum*) поколения T₂ по эффективности примерно в 1,5-2 раза превосходят вирусный промотор CaMV35S [2]. С целью поиска участков промотора отвечающих за его индуцибельность в ответ на атаку фитопатогенов в лаборатории клеточной инженерии растений ФГБНУ ВНИИСБ были получены еще две генетические конструкции в составе плазмиды pCambia1381Z, содержащие репортерный ген *gus* под контролем делеционных вариантов -1469 и -2550 п.н. промотора *pro-SmAMP1*.

С использованием созданных генетических конструкций нами были получены гомозиготные трансгенные линии растений табака поколения T₂, экспрессирующие репортерный ген *gus* под контролем делеционных вариантов -1469 и -2550 п.н. промотора *pro-SmAMP1* и содержащих инсерцию Т-ДНК в одном локусе генома. Абсолютные уровни активности репортерного белка GUS в гомозиготных линиях с делеционными вариантами промотора *pro-SmAMP1* представлены на рис. 1.

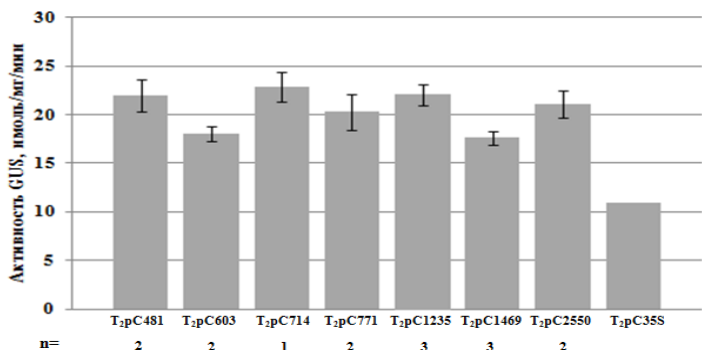


Рис. 1 – Активность GUS в листьях гомозиготных трансгенных линий табака поколения T₂ с инсерцией T-ДНК в одном локусе генома. n – число независимых линий в каждом варианте. Вертикальными линиями показаны стандартные ошибки.

Из рис. 1 следует, что уровни активности GUS в растениях со всеми делеционными вариантами промотора pro-SmAMP1 сопоставимы, составляют от 17,6 до 22,9 нмоль/мг/мин, что примерно в 1,5-2 раза выше, чем при использовании вирусного промотора CaMV35S (T₂pC35S).

Для оценки индуцибельности промотора pro-SmAMP1 асептические трансгенные растения табака с различными его делеционными вариантами были обработаны смесью конидий патогенных грибов *Fusarium sp.* и *Alternaria sp.* В качестве контроля использовали те же самые растения, но обработанные дистиллированной водой.

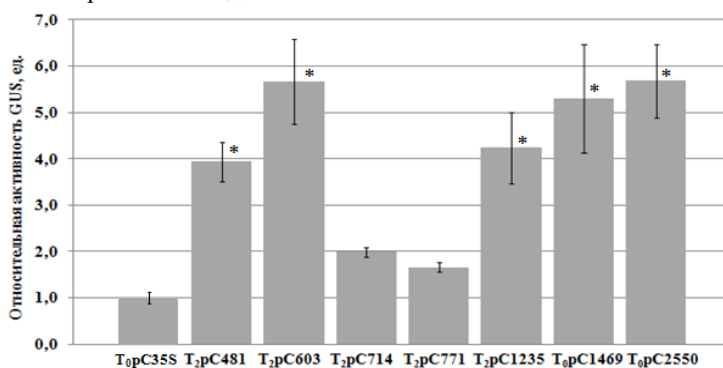


Рис. 2 - Относительные значения активности GUS в листьях трансгенных растений табака после контакта с фитопатогенными грибами. Вертикальными линиями показаны стандартные ошибки,

звездочками обозначены варианты, существенно отличающиеся от варианта с вирусным промотором CaMV35S (T₀pC35S).

Установлено, что при контакте с фитопатогенными грибами активность GUS в листьях трансгенных растений табака вариантов T₂pC481, T₂pC603, T₂pC1235, T₀pC1469 и T₀pC2550 возрастала от 3,9 до 5,7 раз, в вариантах T₂pC714 и T₂pC771 от 1,7 до 2 раз. Одновременно в растениях с конститутивным промотором CaMV35S (T₀pC35S) уровень активности не изменялся. Таким образом, даже самый короткий вариант промотора pro-SmAMP1 (-481 п.н.), вероятно, содержит цис-элементы необходимые для его активации в табаке при атаке патогенов. По-видимому, в последовательности делеционных вариантов -603 и -714 п.н. промотора proSmAMP1 имеются цис-элементы, негативно действующие на его активацию при заражении грибами.

Список литературы

1. Shukurov R.R, Voblikova V.D., Nikonorova A.K. et al. Transformation of tobacco and *Arabidopsis* plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens // Transgenic Res. - 2012. - Vol. 21. - № 2. - P. 313-25.
2. Высоцкий Д.А., Стрельникова С.Р., Ефремова Л.Н., Ветчинкина Е.М., Бабаков А.В., Комахин Р.А. Структурно-функциональный анализ нового растительного промотора pro-SmAMP1 из *Stellaria media* // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – №. 5. – С. 1-11.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА СОРТОВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*RIBE NIGRUM L.*)

Пикунова А.В., Князев С.Д.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт селекции
плодовых культур (ФГБНУ ВНИИСПК),***

Орел 302000

E-mail: pikuanna84@mail.ru

Черная смородина (*Ribes nigrum L.*) – ведущая ягодная культура в России. Успех селекционных исследований во многом зависит от изучения, подбора и систематизации исходного материала. Черная смородина имеет диплоидный набор хромосом ($n = 7$), что в определенной степени облегчает изучение ее генома

по сравнению с геномами полиплоидных видов. SSR (микросателлитные) маркеры используются как в фундаментальных исследованиях для оценки генетического полиморфизма, изучения филогенетических отношений, построения генетических карт для групп сцепления, так и в прикладных целях — для проверки родословных, при разработке систем идентификации и паспортизации, поиске маркеров, ассоциированных с хозяйственно полезными признаками, при маркер-опосредованном отборе интересующих генотипов на ранних стадиях развития растений.

Цель данной работы - разработать систему микросателлитного анализа сортов черной смородины.

Проведено генотипирование 27 сортообразцов черной смородины из коллекции ВНИИСПК (в т.ч. 16 сортов селекции ВНИИСПК) по 14 микросателлитным локусам, 13 из них картированы на различных хромосомах смородины черной. Для анализа полиморфизма микросателлитных локусов использовали электрофоретическое разделение в 6 % денатурирующем ПААГ с последующим окрашиванием нитратом серебра в камере Sequi-Gen GT System, 38x50 см (Био-Рад, США).

Все локусы, кроме одного (Ms09g03), изначально разработанного для яблони, оказались полиморфными, и амплифицировали на наборе исследуемых сортов от 3 до 8 аллелей, в среднем было амплифицировано 4,9 аллеля на локус. Разгонка в длинном ПААГ позволила различить фрагменты с разницей в размерах 1-2 п.н. Из 68 амплифицированных фрагментов 45 (66 %) являлись редким аллелями с частотой встречаемости равной или менее 0,2. Наблюдаемая гетерозиготность варьировала от 0,259 для локуса g2-H21 до 1 для локуса e4-D03 (в среднем составила 0,608). Средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности находились на одном уровне, что обусловлено высокой гетерозиготностью изучаемого объекта. Как известно, перекрестноопыляемые растения, к которым относится черная смородина, характеризуются большей гетерозиготностью по сравнению с самоопыляемыми. К тому же вегетативное размножение плодово-ягодных культур позволяет закрепить гетерозиготное состояние генотипа независимо от того, насколько стабильным будет проявление признаков в первом поколении. Поэтому к отличительным особенностям таких культур относится высокая гетерозиготность, которую только усиливает

использование метода отдаленной гибридизации и привлечение различных видов в селекцию.

По сочетанию аллелей в одном локусе можно было различить от 3 (g2-H21, e1-O21) до 15 (g2-G12) генотипов. Обнаружено восемь уникальных фрагментов, амплифицированных только на ДНК одного из протестированных сортообразцов. Минимальный набор из четырех локусов (e4-D03, g1-M07, g1-E03, g2-B20) позволил различить все протестированные сортообразцы, то есть для каждого образца был получен уникальный мультилокусный профиль.

Анализ потока аллелей через родословные родственных сортов, задействованных в анализе, показал, что в большинстве случаев распределение аллелей между родственными сортами не противоречило родословным, но были обнаружены и случаи расхождения данных родословных и SSR данных. Так у сорта Очарование (получен от скрещивания с.1168 X Экзотика) в трех локусах (e4-D03, g1-E03, g2-B20) не было общих аллелей с сортом Экзотика. Вероятно, что в действительности произошло опыление другой пылью. Сорта Оджебин и Бинар (получен от скрещивания Оджебин X Нарядная) так же не имели общих аллелей в двух локусах (g1-M07, g1-E03).

В данной работе впервые в России проведено генотипирование микросателлитных локусов у сортов черной смородины (*Ribes nigrum* L.). Установлен высокий полиморфизм микросателлитных локусов, выявлены редкие и уникальные аллели, что позволило получить уникальный мультилокусный профиль для каждого протестированного образца. Показана возможность проверки родства образцов на основе анализа распределения микросателлитных аллелей. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения протестированных маркеров при оценке генетического разнообразия отечественного генофонда черной смородины, а также при разработке методов идентификации и паспортизации сортов, что может быть использовано для защиты авторских прав селекционеров.

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ ГЕНОМА МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ МЕЖДУ *ALLIUM* *CEPA* L. И *ALLIUM FISTULOSUM* L. УСТОЙЧИВЫХ К СТЕМФИЛИОЗУ (*STEMPHYLLIUM VESICARIUM*) ИСПОЛЬЗУЯ GISH АНАЛИЗ

Кудрявцева Н.А., Хрусталева Л.И.

Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА
им. К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии

Аннотация. С помощью GISH метода была проведена работа по изучению поздних поколений межвидовых гибридов между *A. cepa* и *A. fistulosum*, устойчивых к стемфилиозу. На основе GISH анализа и кариотипирования были сделаны выводы о том, что все исследуемые линии являются амфидиплоидами.

Ключевые слова: *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, межвидовые гибриды, GISH.

До сих пор гибридная форма, обладающая морфологическими признаками (луковицей) репчатого лука (*Allium cepa*) и полезными хозяйственно-ценными признаками лука-батун (*Allium fistulosum*), не была получена. *A. fistulosum* является близкородственным видом, который обладает устойчивостью к луковой листовой гнили (Currah, Maude, 1984), розовой корневой гнили (Notzer et al. 1985), антракнозу (Galyan et al. 1997), луковой мухе (De Ponti et al. 1984).

Одной из значительных угроз для возделывания репчатого лука и других луковых является стемфилиоз – распространенное в мире заболевание, возбудителем которого является *Stemphylium vesicarium*, относящийся к плесневым грибам (Suheri and Price, 2000). *S. vesicarium*, часто сопровождаемый возбудителями из родов *Alternaria* и *Heterosporium*, наносит особенно большой ущерб (до 85%) производству семян лука, как в России, так и во всем мире (Aveling, 1992; Никитина, 2015).

Для характеристики структуры генома межвидовых гибридов между *A. cepa* и *A. fistulosum* был применен GISH (Геномная *in situ* гибридизация), который является надежным методом для идентификации генетического материала родительских форм.

Нами была проанализирована коллекция поздних поколений межвидовых гибридов между *A. cepa* и *A. fistulosum*, полученных из Всемирного центра овощеводства (World Vegetable Center). Все

межвидовые гибриды между диплоидными формами *A. sera* и *A. fistulosum* оказались амфидиплоидами. У некоторых линий отмечено наличие рекомбинантных хромосом, что свидетельствует о случаях кроссинговера между хромосомами *A. sera* и *A. fistulosum*. Обсуждаются механизмы полиплоидизации гибридных форм.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ проекта № 16-16-10031

СТАБИЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *I329L* ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В КЛЕТКАХ СНО

**Каторкин С.А., Каторкина Е.И., Мима К.А., Титов И.А.,
Малоголовкин А.С.**

***ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии, п. Вольгинский***

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) представляет собой ДНК-вирус с икосаэдрической морфологией и классифицируется как единственный представитель семейства *Asfarviridae*.

Вирус обладает широким перечнем механизмов уклонения от иммунной системы организма-хозяина. Один из используемых вирусом подходов в иммунной эвазии заключается в мимикрии Toll-подобных рецепторов (TLR). Изучение иммуномодулирующих белков вируса АЧС является источником потенциально ценных инструментов для понимания патогенеза заболевания и для создания средств борьбы с болезнью.

Одним из иммуномодулирующих белков вируса АЧС является рI329L-антагонист и ингибитор сигнального пути TLR3, уменьшающий синтез интерферона. рI329L ингибирует TLR3-опосредованную активацию NF-κB и индукцию INF-β, через активацию TLR3 с его лигандом – вирусной ДНК, РНК и poly(I:C). Удаление данного белка из вируса АЧС является рациональным подходом к разработке, ослабленной вирус - вакцины. Следовательно, рI329L характеризуется как вирусный антагонист TLR3, что негативно отражается на интерферон опосредованном противовирусном ответе.

Целью данной работы является получение клеточной линии СНО, стабильно экспрессирующая антагонист TLR3 - рекомбинантный белок I329L вируса АЧС.

При биоинформатическом анализе нуклеотидной и аминокислотной последовательностей изучаемого белка была показана его доменная организация, показывающая наличие в экстраклеточной части 2 лейцин богатых доменов (LRRs), а во внутриклеточной части идентифицированы 3 TIR-подобных домена, показывающее, по литературным данным, гомологию с Toll-подобными рецепторами. В подтверждение теории о pI329L, как о высокогликозилированным белке, были идентифицированы 9 сайтов N-гликозилирования, хотя при этом наличие сайтов O-гликозилирования не выявлено.

В ходе экспериментальной работы нами была получена плаزمид «pCMV-I329-His», несущая полноразмерный ген I329L с His-tag на С-конце. При помощи электропорации плазмидой pCMV-I329-His клеточной линии СНО и дальнейшей стабилизации на селективном антибиотике (5 мкг/мл пуромицин), была получена стабильная клеточная линия «СНО-I329-His». Встраивание гена I329L в геном клеток подтверждали постановкой ПЦР с геноспецифическими праймерами с последующим нуклеотидным секвенированием, используя в качестве матрицы ДНК, выделенную из клеток «СНО-I329L-His». С помощью Western Blot подтверждали наличие белка I329L-His в клеточных лизатах «СНО-I329L-His». В результате анализа установлено, что размер рекомбинантного белка составлял 55 кДа при расчетной 35 кДа. Последовательное дегликозилирование эндогликозидазами PNGase и EndoH целевого белка, приводило к увеличению его электрофоретической подвижности и детектированию специфических полос на уровне ~37 и ~35 кДа, соответственно. Данный факт подтверждает высокую степень гликозилирования целевой молекулы, что приводит к меньшей электрофоретической подвижности. Дополнительно, рекомбинантный белок I329L-His распознавался гипериммунными сыворотками против вируса АЧС, что свидетельствовало о его функциональности и аутентичности.

Полученная стабильная клеточная линия «СНО-I329L-His, депонирована в коллекции ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии и может быть использована для изучения механизмов действия иммуномодулирующих белков, таких как, I329L вируса АЧС, а, следовательно, получить новые ответы на

биологию сложноорганизованного вируса африканской чумы свиней.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ – 16-16-00090.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ A238L И I329L ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Шкаликова М.В., Титов И.А., Малоголовкин А.С.

ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, Вольгинский, 601125

E-mail: masha67111@mail.ru

Африканская чума свиней (АЧС) - геморрагическая смертельная болезнь домашних свиней и кабанов, вызванная сложным оболочечным дезоксивирусом. Геном вируса АЧС представляет собой линейную двухцепочечную молекулу ДНК с ковалентно закрытыми концами и терминальными инвертированными повторами (TIR), одинаковыми для обоих концов (Rodríguez J.M., 2015).

Вирус АЧС является макрофаго-тропным вирусом, и может манипулировать как врожденным, так и адаптивным иммунным ответом, модулируя функции макрофагов. По данным Dixon L.K., 2012 было идентифицировано несколько белков вируса АЧС, которые препятствуют защите хозяина. К ним относятся ген A238L, кодирующий белок 5EL, который выступает ингибитором активации транскрипции иммуномодулирующих генов хозяина и белок K11L (ген I329L), действующий как ингибитор сигнальных путей Toll-подобных рецепторов (de Oliveira et al., 2011). Кроме того, A238L ингибирует зависимые от кальцеинейрина пути хозяина путем непосредственного связывания кальцеинейрин фосфатазы (Granjaetal., 2008).

Изучение характеристик белков, участвующих в иммунном уклонении, позволит лучше раскрыть механизмы клеточного иммунного ответа и взаимодействия вируса с клеткой хозяина.

Целью данной работы является сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов A238L и I329L вируса АЧС, участвующих в иммунном уклонении с помощью секвенирования и филогенетического анализа различных изолятов.

Первым этапом нашей работы являлся анализ данных об изолятах и штаммах вируса АЧС, имеющихся в Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. На его основе были отобраны 12 изолятов, выделенных из разных регионов на территории Российской Федерации в 2016 году и 15 штаммов, принадлежащих к 7 сероиммуногруппам вируса АЧС.

Для выделения ДНК вируса АЧС применялся метод нуклеосорбции. Оптимизация температурных режимов ПЦР для синтеза копий генов A238L и I329L проводилась на термоциклере PalmCycler (CorbettResearch, Австралия). Полученные ПЦР продукты использовались для дальнейшего секвенирования генов вируса АЧС. Для построения филогенетических древ применялся метод максимального правдоподобия с дополнительным бутстрэп – анализом, используя 1000 случайных выборок, с помощью программы Mega 6.0 (Tamura, K. et al., 2013).

По результатам секвенирования гены I329L и A238L изолятов вируса АЧС, выделенных на территории РФ в 2016 году, являются идентичными родительскому штамму Georgia_2007/1, который является представителем II генотипа.

Согласно полученным результатам по гену I329L, в первый кластер входят вирулентный штамм F-32 и вакцинный FK-32/135 4 сероиммунотипа вместе с 6 полногеномными изолятами европейского происхождения, 1 изолятом африканского происхождения, а также вакцинным LK-111 и вирулентным L-57 штаммами 1 сероиммунотипа. Второй кластер составляют полногеномные изоляты Warmbaths и Mkuzi 1979 из Южной Африки с неопределенным сероиммунотипом. Третий кластер состоит из изолята Georgia_2007/1 и вакцинного штамма St-A₄C₂/9k-33 8 сероиммунотипа. Вирулентный штамм K-49 и вакцинный KK-262 создают четвертый кластер 2 сероиммунотипа. Вакцинный штамм МК-200 и вирулентный Мозамбик-78 (3 сероиммунотип) попадают в отдельный кластер с полногеномным изолятом из Южной Африки Tengani 62 (7 сероиммунотип). Штамм TS7, выделенный из Танзании и слабовирулентный TS-7/27-230 6 сероиммунотипа составляют шестой кластер вместе с изолятами Ken05/Tk1, Ken06.Bus. Вирулентный штамм Nanyuki (8 сероиммунотип) и полногеномный изолят Kenya 1950 из Юго – Восточной Африки создают седьмой кластер. Восьмой кластер состоит из штамма TKF (3 сероиммунотип), штамма TSP80 и TSP80/300 (5 сероиммунотип). Изолят Malawi Lil-20/1 8

сероиммунотипа не входит ни в одну из групп перечисленных кластеров.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования по генам I329L и A238L, можно сделать вывод, что эти гены являются вариабельными, при этом имеют внутри себя консервативные участки. Топология филогенетического древа по гену I329L полностью совпадает с филогенетическим древо, построенным на основе псевдопоследовательности из 7 иммуномодулирующих генов, что может говорить об эволюционной изменчивости. Данные штаммы будут использованы для дальнейшего изучения генов, участвующих в иммуномодуляции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 16-16-00090.

РЯСКА МАЛАЯ (*LEMNA MINOR L.*), КАК ЭКСПРЕССИОННАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГКСФ)

Аликина О.В.^{1,2}, Тарасенко И.В.¹, Фирсов А.П.¹, Митюшкина Т.Ю.¹, Долгов С.В.¹

***¹ Филиал Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биоорганической химии им.
М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова***

***Российской академии наук, г.Пушино, Московская область.
E-mail: fibkh@bibch.ru***

***² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биофизики клетки Российской академии наук, г.
Пушино, Московская область***

Ряска малая (*Lemna minor L.*) – многолетнее водное растение, которое размножается преимущественно вегетативно и отличается высокой скоростью роста и высоким уровнем накопления белка, а также дешевизной и удобством культивирования. Это делает ряску перспективным объектом для создания на её основе эффективной экспрессионной платформы для производства рекомбинантных белков.

В данной работе рассматривается получение трансгенных линий ряски малой, экспрессирующих ген гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ). ГКСФ человека – это О-

гликозилированный гликопротеин, массой 19,6 кДа, проявляющий биологическую активность в мономерной форме. Препараты на основе рекомбинантного ГКСФ человека стимулируют увеличение содержания в крови нейтрофильных гранулоцитов и используются при лечении рака и трансплантации костного мозга. В настоящее время человеческий рекомбинантный ГКСФ производится в *E.coli* и не гликозилирован. Гликозилирование повышает физико-химическую стабильность, предотвращая полимеризацию и/или конформационные изменения белка. Использование растительных экспрессионных систем может решить эту проблему и получить полноценный гликозилированный белок.

Целью нашей работы являлось изучение экспрессии гена ГКСФ в трансгенных растениях ряски малой (*Lemna minor* L.). Аминокислотная последовательность ГКСФ была получена из базы данных DrugBank (DB00099). Дизайн наборов, перекрывающихся олигонуклеотидов, выполнен при использовании программы «Primo Optimum 3.6 Optimal Gene Synthesis And Expression». Сборка синтетических олигонуклеотидов осуществлялась методом ПЦР. Полученная нуклеотидная последовательность с оптимизированным кодонным составом была клонирована в растительном экспрессионном векторе pBI121 под контролем 35S CaMV промотора вместо гена β -глюкуронидазы. Плазмида, обозначенная как pBIGCSF, была перенесена в штамм *A. tumefaciens* CBE21 и использована для трансформации.

В результате было получено 16 независимых линий ряски малой. Их трансгенный статус был подтвержден методом ПЦР. Методом вестерн-блот анализа с использованием антител к ГКСФ была показана экспрессия гена ГКСФ в 15 трансгенных линиях. Рекомбинантный ГКСФ детектировался в виде одной полосы с молекулярной массой около 20 кДа, которая соответствует ожидаемой. Методом иммуноферментного анализа проведена количественная оценка накопления ГКСФ в трансгенных линиях. Показан высокий уровень содержания ГКСФ в трех линиях из шестнадцати исследованных, а линия *L. minor* GCSF 19 с наибольшим содержанием целевого белка 66 мкг на г сырого веса была выбрана для проведения дальнейших работ по выделению и очистке ГКСФ.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ГЕНОМА КРС ДЛЯ КОНТРОЛЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ГАПЛОТИПОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАРУШЕНИЕМ ФЕРТИЛЬНОСТИ

Пантюх К.С.¹, Рукин И.В.^{1,2}, Груздев Д.С.¹

***¹Лаборатория молекулярно-генетической экспертизы «Мой
Ген», Москва, 143026***

E-mail: pantiukh@i-gene.ru

***²Московский Государственный Университет имени М.В.
Ломоносова, кафедра биотехнологии, Москва, 119192***

За последние 50 лет благодаря внедрению новых технологий в молочное животноводство показатели продуктивности возросли практически в 2 раза. Интеграция технологии искусственного осеменения, геномных технологий отбора высокопродуктивных животных, новых технологий кормления и содержания животных позволила увеличить средний удой молока на 1 корову в год в США с 4404 кг до 9307 кг (по данным Министерства сельского хозяйства США), а в Великобритании - с 4404 кг до 9307 кг по данным Министерство окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании. Однако увеличение молочной продуктивности неизбежно приводит к снижению показателей фертильности. Кроме того, возможность получения большого количества потомков от ограниченного круга животных с высоким генетическим потенциалом приводит к быстрому и широкому распространению мутаций, ассоциированных с моногенными рецессивными заболеваниями, в популяции. Поэтому комплексное тестирование племенных животных на носительство моногенных заболеваний и гаплотипов, ассоциированных с нарушением фертильности – крайне важная задача современного животноводства.

Целью данного исследования была разработка системы комплексного анализа генома КРС. Разработанная система базируется на анализе генотипа животного и включает 4 основных блока тестирований: определение статуса носительства моногенных заболеваний, определение статуса носительства летальных гаплотипов, анализ генов белков молока и получение SNP-профиля животного для подтверждения происхождения.

В список моногенных заболеваний для тестирования были включены наиболее распространенные генетические заболевания, такие как дефицит лейкоцитарной адгезии (BLAD), комплексный порок позвоночника (CVM), дефицит уридинмонофосфатазы (DUMPS), цитруллинемия (BC), дефицит фактора XI крови (FXID), брахиспина (BY), синдром белого симментала (GWFS), синдром Вивера (Weaver), субфертильность быков (BMS) и другие. В итоге в анализ было включено 35 моногенных заболеваний для 10 мясных и молочных пород КРС.

Тестирование носительства гаплотипов, ассоциированных с потерей фертильности, включило в себя анализ 12 гаплотипов пяти пород КРС. В анализ были включены гаплотипы, характерные для голштинской породы – HH1, HH2, HH3, HH4, HH5 и HCD, а также гаплотипы характерные для айрширской (AH1), бурой швицкой (BH1, BH2), породы монбельярд (MH2) и джерсейской (JH1, JH2) породы КРС.

Для комплексной оценки белкового состава молока в систему анализа генома КРС вошел анализ аллельных вариантов генов основных белков молока - альфа-, бета-, каппа-казеинов и лактоглобулина. Аллельные варианты генов белков молока влияют на важные хозяйственно-полезные признаки, такие как выход сыра и время сычужного свертывания.

Также в систему было выбрано 119 высокополиморфных однонуклеотидных полиморфизмов генома, которые утверждены международной ассоциацией генетики животных (ISAG) в качестве стандартных для подтверждения происхождения КРС на основании SNP-профилей.

Для апробации разработанной системы комплексного анализа генома КРС было проведено исследование животных из коллекции биологического материала лаборатории молекулярно-генетической экспертизы «Мой Ген». Для генотипирования были использованы микроматрицы ДНК BovineSNP50 Genotyping BeadChip (Illumina, США). В результате анализа генома были идентифицированы животные-носители таких моногенных заболеваний, как брахиспина и синдром белого симментала, а также носители летальных гаплотипов AH1, HCD, BY, HH1, HH2, HH3 и HH5. Статус всех идентифицированных носителей был подтвержден с помощью классических молекулярно-генетических методов.

Разработанная система генетического мониторинга КРС не имеет аналогов в мире. Внедрение разработанной системы

комплексного анализа генома КРС для контроля распространения моногенных заболеваний и гаплотипов, ассоциированных с нарушением фертильности на племенные предприятия имеет большой экономический потенциал.

РАЗРАБОТКА ВСЕРОССИЙСКОЙ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОЙ ОЦЕНКИ ПЛЕМЕННОЙ ЦЕННОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МОЛОЧНЫХ ПОРОД

**Рукин И.В.^{1,2}, Груздев Д.С.¹, Пантюх К.С.¹, Рысина М.С.¹,
Князева Т.А.³, Щеглов М.Е.³**

***¹ Лаборатория молекулярно-генетической экспертизы «Мой
Ген», Москва, 143026***

E-mail: rukin@i-gene.ru

***² Московский Государственный Университет имени М.В.
Ломоносова, кафедра биотехнологии, Москва, 119192***

***³ ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
племенного дела – ФГБНУ ВНИИПлем, Московская область,
141212***

Основой племенного молочного животноводства является максимально точная оценка племенной ценности животных с использованием современных математических моделей для ее расчета. В настоящее время в Российской Федерации используются устаревшие методы оценки племенной ценности, разработанные в конце 70-х годов прошлого столетия. В свою очередь, во всех странах с развитым животноводством вот уже 10 лет как происходит интеграция современных наукоемких технологий в племенное животноводство и комбинирование этих технологий с оценкой племенной ценности. Основным прорывом стала разработка и внедрение системы геномной оценки племенной ценности крупного рогатого скота. Новый метод, основанный на использовании информации о геноме племенных животных, позволяет более чем в два раза повысить темпы генетического улучшения продуктивных признаков, снизить затраты на проверку производителей и расширить возможности интенсивного отбора племенных животных.

Для внедрения активной системы геномной оценки племенной ценности в российское племенное скотоводство, необходимо организовать высокую культуру разведения и

племенной работы, в основе которой лежат лучшие современные селекционные методы и технологии, привлечь специалистов области молекулярной генетики, популяционной генетики, биоинформатики и селекции, обеспечить мотивацию для сотрудничества науки с производством, а также разработать комплексную информационную систему с соответствующими базами данных, программным обеспечением и техникой.

Целью данного исследования является разработка и внедрения национальной системы геномной оценки племенной ценности по признакам молочной продуктивности с использованием модели ssGBLUP. В качестве первичных данных использовалась информация о контрольных доениях и происхождении 1,3 миллиона коров. Для отбора достоверных данных была разработана уникальная система оценки достоверности данных о продуктивности животных и их происхождении. В результате анализа в итоговую базу данных вошла информация о происхождении и молочной продуктивности 915 681 коровы голштинской породы, принадлежащих сельскохозяйственным организациям 26 регионов РФ. На основании 20 541 300 контрольных доений были рассчитаны значения признаков молочной продуктивности для 1 756 312 лактаций. Для всех животных, включенных в базу данных, была построена матрица родства. Подготовленная база данных признаков молочной продуктивности и информация о происхождении животных будут использованы для расчета племенной ценности методом ST ssGBLUP AM. Использование разрабатываемой системы геномной оценки позволит уже при рождении оценивать племенную ценность животных, что сократит генерационный интервал при разведении племенных животных до 2 лет. Отсутствие в нашей стране такой системы делает отрасль молочного скотоводства неконкурентоспособной и приводит к необходимости закупки племенного материала из-за рубежа. Импортозависимость в этой отрасли не позволяет гарантировать продовольственную безопасность Российской Федерации

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ РИСА (*ORYZA SATIVA*) PI-TA И PI-B МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Шалаева Т.В., Колобова О.С., Шилов И.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Россия, Москва, 127550
E-mail: shalaeva.tv@mail.ru

Пирикуляриоз – одно из самых вредоносных заболеваний риса, распространенное во всех рисосеющих регионах мира. Возбудитель – несовершенный гриб *Pyricularia oryzae* Cav. Потери урожая при поражении растений могут составлять до 40%.

Поиск и введение генов устойчивости к пирикуляриозу - наиболее результативная стратегия борьбы с этим заболеванием. *Pi-ta* и *Pi-b* являются наиболее изученными генами, определяющими устойчивость к пирикуляриозу [1, 2]. Использование молекулярных маркеров генов устойчивости помогает ускорить отбор нужных генотипов и особенно значимо для стратегий пирамидирования генов.

Ген *Pi-ta* имеет однонуклеотидный полиморфизм, который вызывает нарушение узнавания белка комплементарного гена авирулентности *Avr-Pita*. Определение полиморфизма служит молекулярным маркером при определении устойчивых и восприимчивых генотипов. В 2015 году коллективом авторов лаборатории анализа геномов ФГБНУ ВНИИСБ была разработана технология анализа аллельного состояния гена *Pi-ta* методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

В отличие от *Pi-ta*, ген *Pi-b* не имеет четко выраженного сайта связывания с геном авирулентности и, возможно, служит медиатором для запуска других генов устойчивости. Неустойчивая форма содержит нефункциональный псевдоген из-за наличия стоп-кодона в открытой рамке считывания. Для определения аллельного состояния была разработана и валидирована технология анализа маркера на основе ПЦР-РВ с праймерами и зондами, позволяющими различить последовательности ДНК, характерные для устойчивых и неустойчивых форм.

Применение новых методов анализа позволило перевести технологию в формат 96-луночного планшета и автоматизировать часть операций. Это позволило сократить затраты труда и времени на анализ и увеличить количество анализируемых образцов, что важно при больших объемах выборки в селекции.

Разработанные системы применяются во ВНИИ зерновых культур им. И.Г. Калининко для отбора гомозиготных устойчивых форм среди селекционных образцов при создании сортов риса с пирамидированной устойчивостью к пирикулярриозу. Анализировались селекционные образцы, полученные от скрещивания донора с 5 генами устойчивости с перспективными сортами российской селекции Магнат и Кубояр.

В 2015 году в результате исследования 300 растений F_2 было выявлено 25 устойчивых гомозигот и 41 гетерозигота по гену Pi-ta, 61 устойчивая гомозигота и 21 гетерозигота – по гену Pi-b, 13 образцов имели оба гена устойчивости в гомозиготной форме.

В 2016 году при анализе 400 растений F_3 , полученных от самоопыления отобранных ранее селекционных образцов, было выявлено 89 устойчивых гомозигот и 61 гетерозигота по гену Pi-ta, по гену Pi-b – 91 устойчивая гомозигота и 84 гетерозигот, 29 образцов имели оба гена устойчивости в гомозиготной форме.

Гомозиготные по доминантным аллелям формы, найденные в результате анализа, будут использованы в дальнейшем селекционном процессе.

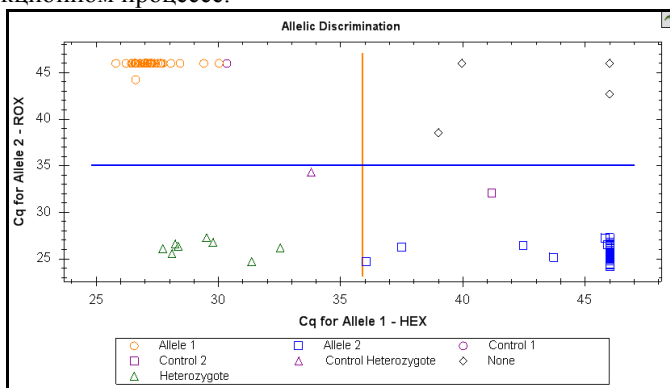


Рис. 1 Пример диаграммы распределения аллелей гена Pi-b в исследуемых образцах

Список литературы

1. A telomeric avirulence gen determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta / M. J. Orbach, L. Farrall, J.A. Sweigard, G.Ch. Forrest, B. Valent // The Plant Cell. 2000. V.12. Pp. 2021–2032.
2. Identification of the Rice Blast Resistance Gene Pib in the National Small Grains Collection / M. RoyChowdhury, Y. Jia, M.H. Jia, R.

Fjellstrom, R.D. Cartwright // *Phytopatology*. 2012. V. 102. № 7. Pp. 700–706.

3. Усовершенствование метода идентификации генов устойчивости к пирикуляриозу риса Pi-ta и Pi-b / И.А. Шилов, О.С. Колобова, Ю.В. Анискина, Т.В. Шалаева, Н.С. Велишаева, П.И. Костылев, Е.В. Дубина // *Достижения науки и техники АПК*. 2016. Т. 30. № 8. С. 45-48.

ОЦЕНКА ОДНОРОДНОСТИ И ГИБРИДНОСТИ СЕЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ СОРГО (*SORGHUM*) ПОСРЕДСТВОМ МУЛЬТИЛОКУСНОГО МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

Родионова Д.А., Анискина Ю.В., Шилов И.А.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Москва,
Тимирязевская, 42***

E-mail: alekseevna.dari@gmail.com

Сорго является одной из перспективных кормовых, хлебных и технических культур. Селекция сорго направлена на создание скороспелых сортов и гибридов с повышенной урожайностью и устойчивостью к неблагоприятным почвенно-климатическим факторам и представляет длительный и многостадийный процесс, требующий достоверной оценки как исходного материала, так и получаемых селекционных форм. В настоящее время для создания гетерозисных гибридов сорго используют сорта-популяции, самоопыленные линии, стерильные линии или гибриды. В зависимости от родительских компонентов, взятых для скрещивания, могут быть созданы межсортовые, сортолинейные и межлинейные простые, трехлинейные и двойные гибриды. Оценка полученных гибридов осуществляется преимущественно по фенотипическим признакам. Однако для проведения фенотипической оценки необходимо выращивать растения до стадии цветения и созревания, что требует дополнительных финансовых и временных затрат. Поэтому на настоящий момент особенно актуальна разработка и применение методов генетического анализа, которые позволят получать данные, независимые от влияния факторов внешней среды и стадии развития растений, а также значительно сократить сроки селекционного процесса.

Одним из перспективных методов генетического анализа селекционного материала является анализ полиморфизма длин микросателлитных фрагментов, позволяющий получать уникальные ДНК-профили растений. Микросателлитные маркеры равномерно распределены в геноме растений и отличаются высоким полиморфизмом, точностью воспроизведения результатов и кодоминантным типом наследования, что позволяет проводить идентификацию и контроль гибридности селекционного материала [1].

Целью данной работы являлась оценка однородности и гибридности коллекции гибридов сорго (*Sorghum*) с использованием мультилокусного микросателлитного анализа. В результате работы было проанализировано 44 гибрида сорго (*Sorghum*) и 38 соответствующих родительских форм, которые были предоставлены Е.В. Малиновской - старшим научным сотрудником группы сорго и просовидных культур Кубанской опытной станции ВИР имени Н.И. Вавилова (п. Ботаника, Краснодарский край).

Для проведения генетического анализа образцов сорго использовали две мультилокусные системы, позволяющие анализировать в одной ПЦР-пробе до десяти микросателлитных локусов генома сорго одновременно [2]. Для генотипирования растений были выделены образцы ДНК, проведена амплификация микросателлитных фрагментов и фрагментный анализ на капиллярном анализаторе «Нанофор-05» на базе центра коллективного пользования «Биотехнология» ВНИИСБ.

В ходе исследования для каждого растительного образца установлены индивидуальные наборы аллелей, на основе которых были составлены генетические формулы гибридов сорго и их родительских форм. В генотипах исследуемых гибридов выявлено кодоминантное сочетание аллелей их родителей (Рис. 1). Тем не менее, в ряде случаев обнаружено несоответствие аллелей в одном или нескольких микросателлитных локусах у гибридов и их родительских форм. Вероятнее всего такое несоответствие связано с тем, что для создания этих гибридов были использованы не выровненные линии, а сорта-популяции. Результаты проведенного нами анализа наглядно продемонстрировали, что неоднородность гибрида является следствием неоднородности одного из родителей. Таким образом, используемые мультилокусные системы позволяют осуществлять контроль однородности исследуемых селекционных форм.

Важным этапом при создании гибридов является воспроизводимость результатов скрещивания из года в год. В результате проведенного микросателлитного анализа установлено соответствие генетических профилей гибридов, созданных в разные годы, по всем исследуемым локусам.

В результате анализа 17 микросателлитных локусов у исследуемых селекционных форм было выявлено более ста аллелей, которые в совокупности позволили надежно различить представленные в коллекции гибриды сорго.

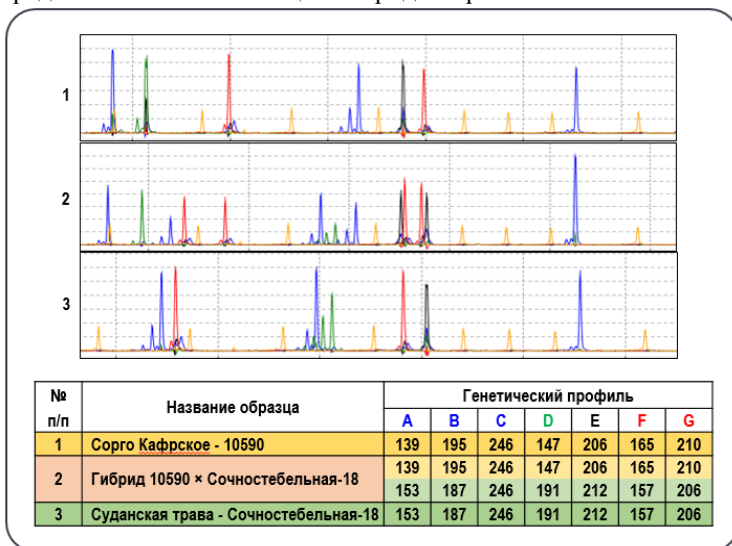


Рис. 1. Генетические профили, полученные в результате анализа гибрида 10590 × Сочностебельная-18 и его родительских форм, с использованием мультилокусной системы «Сорго-7». (Исследуемые микросателлитные локусы обозначены латинскими буквами и цветом, соответствующим каналу детекции на приборе «Нанофор-05»).

Литература:

1. Шилов И.А. Применение технологии микросателлитного анализа ДНК в растениеводстве // Проблемы агробиотехнологии; под ред. П.Н. Харченко. - М., 2012. - С. 140 - 162.
2. Шалаева Т.В., Анискина Ю.В., Шилов И.А. Разработка системы микросателлитного анализа представителей разных видов сорго (*Sorghum*) на основе мультилокусной ПЦР. //

Материалы XVI Молодежной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». – Москва, 2016. – с. 26-27.2.

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА 5-ГО СЕРОТИПА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА Т7

Ожаровская Т.А.¹, Данилюк А.В.^{1,2}, Картуесов А.Г.^{1,2}, Зубкова О.В.¹,

**¹ФГБУ «ФНИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, 123098,
г. Москва, ул. Гамалеи, д.18**

**²ФГБОУ ВПО МГАВМиБ им. Скрябина, 109472,
г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23**

E-mail: o.tatiana09@yahoo.com

Обратная генетика имеет огромное значение для создания новых вирусных вакцин путем конструирования рекомбинантных РНК-вирусов. Для получения РНК-вирусов из кДНК, кодирующей последовательность их полного антигена, зачастую используется система с вирусом-помощником, экспрессирующим ДНК-зависимую РНК-полимеразу бактериофага Т7. РНК-полимераза бактериофага Т7 обладает рядом преимуществ относительно других РНК-полимераз: строгая специфичность к промотору, высокая процессивность (скорость работы 200-260 нуклеотидов/сек), транскрипция проходит в цитоплазме, что важно для ряда вирусов. Поэтому для получения вирусов из кДНК разработана и широко используется система на основе вируса осповакцины, экспрессирующей РНК полимеразу бактериофага Т7. С применением данного вируса-помощника эффективно получают целый ряд рекомбинантных векторов на основе вируса бешенства, везикулярного стоматита, кори, Сендай, респираторно-синцитиального вируса и буниавируса.

Несмотря на то, что система с вирусом осповакцины эффективна (количество Т7 транскриптов составляет 30% от всех мРНК к концу первых суток после трансдукции клеток вирусом осповакцины с последующей трансфекцией плазмидной ДНК), цитопатическое действие, вызванное репликацией вируса осповакцины, ограничивает время и затрудняет получение целевых вирусов. Кроме того, целевой вирус необходимо очищать от вируса

осповакцины. Фильтрация через фильтры с размером пор 0,22 мкм не всегда эффективно, несмотря на то, что теоретически вирус оспы не способен проходить через поры данного размера. На практике полная очистка стока от осповакцины является затруднительным и крайне трудоемким процессом. Более того, при фильтрации снижается и без того низкий титр целевого вируса.

Исходя из вышеперечисленного для облегчения получения рекомбинантных вирусов из кДНК, мы предлагаем использовать альтернативный вирус-помощник. Для этого был сконструирован рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа (Ad5), экспрессирующий ген РНК-полимеразы бактериофага Т7. На первом этапе был создан плазмидный вектор pSh-T7, несущий правый и левый концы генома Ad5 и кассету с геном РНК-полимеразы бактериофага Т7 под контролем CMV-промотора. Плазмиду, несущую полный геном аденовируса, получали методом гомологичной рекомбинации в клетках *E.coli* штамма BJ5183 между вектором pSh-T7 и плазмидой, несущей полный геном Ad5. В результате была создана плазмидная конструкция pAd5-CMV-T7, несущая полный геном аденовируса и ген РНК-полимеразы бактериофага Т7. Данная конструкция охарактеризована методами ПЦР и рестрикционного анализа. Для получения рекомбинантного вируса клеточную линию НЕК293 (клетки эмбриональной почки человека) трансфецировали плазмидой pAd5-CMV-T7 методом липофекции. Для более быстрого получения рекомбинантного вируса на второй день после трансфекции проводили первый слепой пассаж. Через 5 дней после слепого пассажа наблюдали развитие цитопатического действия. Получение рекомбинантного вируса Ad5-CMV-T7 подтверждали ПЦР анализом. Для подтверждения экспрессии РНК-полимеразы бактериофага Т7 клетки НЕК293 были трансдуцированы аденовирусом Ad5-CMV-T7. Затем была поставлена трансфекция контрольной плазмидной конструкции, содержащей ген цветного белка под контролем Т7 промотора. Через 24 часа после трансфекции с помощью флуоресцентного микроскопа наблюдали свечение красного флуоресцирующего белка mCherry.

Таким образом, был получен рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий РНК-полимеразу бактериофага Т7, который затем будет использоваться при разработке системы для наиболее эффективного получения векторных вакцин на основе рекомбинантных РНК-содержащих вирусов.

РАЗРАБОТКА УЛУЧШЕННЫХ МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ НА ПОВЫШЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ АНТОЦИАНОВ, СКОРОСПЕЛОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИРУСНЫМ БОЛЕЗНЯМ

**Волобоева В.А. , Хабарова Л.Н. , Пастухов С.А. , Полякова М.Н.
*Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА
имени К.А. Тимирязева, Полевая опытная станция, Москва***

127550

E-mail: victoria.voloboeva@yandex.ru

Последние десятилетия мир стремительно меняется, изменяются климат и условия возделывания культур, распространяются новые заболевания, устойчивость к которым ранее не была актуальна. Важнейшим критерием развития селекции картофеля на различные цели остается устойчивость к наиболее опасным заболеваниям. Этот критерий особенно актуален в современных условиях постоянно возрастающей вредоносности большинства патогенов и появления новых рас и штаммов. Исходя из этого, в селекционных программах предусматривается сочетание различных типов устойчивости в создаваемых сортах – иммунитет, сверхчувствительность, толерантность используемых генетических источников устойчивости. Разработка и использование системы генетических и молекулярных маркеров ценных хозяйственных признаков, идентификация генотипов с использованием ДНК-маркеров генов *Rysto* и *Rychc* (иммунитет к У-вирусу) повышает эффективность селекционного процесса и перевод его на качественный инновационный уровень. Также немаловажно развитие селекционных программ в направлении повышения содержания антиоксидантов в клубнях и создания сортов с яркой антоциановой окраской мякоти. Полезные свойства антоцианов для человека: улучшение процессов кроветворения, укрепление стенок сосудов, сильные антиоксидантные свойства, связывающие свободные радикалы и препятствующие разрушению клеточных мембран. Также антоциан имеет антибактериальные свойства, помогая организму в борьбе с инфекционными и простудными заболеваниями, и необходим для здоровья сетчатки глаза.

Успех селекции прежде всего зависит от наличия разнообразных исходных форм растений, от степени изученности их генетического потенциала, от методов гибридизации и оценки, отбора перспективных гибридов. Также немаловажным является

ускорение селекционного процесса. Массовое заражение У-вирусом материала из питомника одноклубневок позволило нам выявить неустойчивые гибриды и ускорить отбор. Отбраковка сеянцев по окраске мякоти клубней сократила в несколько раз численность гибридов.

Подбор родительских пар был направлен на увеличение уровня устойчивости к У-вирусу у сортов с антоциановой окраской мякоти. Исходным материалом для скрещиваний являлись устойчивые к У-вирусу сорта: Метеор, Азарт и Барин, и Bora valley, имеющий фиолетово окрашенную мякоть и кожуру клубня.

РАЗРАБОТКА СРЕДСТВ ТИПИРОВАНИЯ ЭПИЗООТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ РОССИИ СЕРОТИПОВ ВИРУСА БЛЮТАНГА

Кольцов А.Ю.

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии*

*Россельхозакадемии, Владимирская обл., Петушинский р-н,
пос. Вольгинский, 601125*

E-mail: kolcov.andrew@gmail.com

Арбовирусы – это вирусы, передающиеся восприимчивым позвоночным через укусы кровососущих членистоногих: комаров, клещей, москитов, мошек и мокрецов. Ряд арбовирусных инфекций человека, таких как лихорадка денге, жёлтая лихорадка, энцефалиты и другие представляют огромную проблему для здравоохранения. Наряду с ними, арбовирусные инфекции животных ежегодно наносят значительный ущерб животноводству. Одной из наиболее экономически значимых болезней животных является блютанг или катаральная лихорадка овец, представляющая собой вирусную трансмиссивную инфекцию жвачных, передающаяся кровососущими насекомыми рода *Culicoides* и характеризующаяся поражением слизистой оболочки ротовой и носовой полостей, опуханием языка, отеком лицевой части головы, лихорадкой, поражением конечностей.

На территории нашей страны были зарегистрированы вспышки блютанга в 1996 г. в Республике Бурятия и в 2011-2012 гг. в Смоленской и Калужской областях, кроме того за период с 2008 по 2009 гг. неоднократно обнаруживали инфицированных животных среди импортированного скота.

Заболевание вызывает вирус блютанга (ВБ), относящийся к роду *Orbivirus*, семейства *Reoviridae*. Геном вируса состоит из 10 сегментов двухцепочечной РНК, упакованных в икосаэдрический нуклеокапсид, состоящий из семи структурных белков. Вероятно, одной из важнейших характеристик вируса является высокая генетическая и антигенная вариабельность. Такая изменчивость связана, в том числе, с широким распространением вируса в популяциях насекомых и диких животных. По данным на 2017 г. известно 27 серотипов вируса блютанга, причем практически ежегодно обнаруживают новые серотипы вируса. Определение серотипа ВБ является неотъемлемой процедурой в каждом случае его обнаружения для разработки плана мероприятий по ликвидации блютанга, а в частности для проведения противоэпизоотических мероприятий.

Целью нашей работы была разработка современных средств типирования вируса блютанга, позволяющих идентифицировать эпизоотически значимые для нашей страны серотипы вируса.

В ходе выполнения работы нами была предложена новая схема исследований с использованием молекулярно-генетических методов, позволяющая идентифицировать серотип ВБ в значительно более короткие сроки, в рамках которой на первоначальном этапе предлагается использовать определение нуклеотипа вируса с целью сужения круга потенциальных серотипов ВБ. Второй этап включает в себя использование серотипспецифических олигонуклеотидных праймеров и ДНК-зондов для точной идентификации серотиповой принадлежности вируса.

Анализ эпизоотической ситуации по блютангу в нашей стране, соседних странах, а также в странах – экспортеров в Россию племенного КРС и МРС позволил определить наиболее эпизоотически значимые серотипы вируса. Нами были разработаны 3 ПЦР-тест-системы, позволяющие идентифицировать нуклеотипы: А (4, 10, 11, 17, 20 и 24 серотипы), В (3, 13, 16 серотипы) и С (6, 14 и 21 серотипы).

Для определения аналитической специфичности тест-систем использована панель образцов биоматериала, включающая: референтные штаммы ВБ 1-24 серотипов, 26-ой серотип, кровь от животных инфицированных штаммом «Г244/11» и кровь от естественно инфицированных животных из Смоленской и Калужской областей, а так же интактные (кровь и культуры клеток VERO, БНК 21/13) и гетерологичные образцы (ЭГБО, АЧЛ).

В результате проведенных исследований установлено, что подобранные нами оригинальные системы олигонуклеотидных праймеров позволяют точно определить нуклеотипы А, В и С, так как амплификация специфического фрагмента кДНК наблюдалась только в образцах, содержащих РНК ВБ 4, 10, 11, 17, 20 и 24 серотипов для нуклеотипа А; 3, 13, 16 серотипов для нуклеотипа В и 6, 14 и 21 серотипов для нуклеотипа С. В ходе исследований отсутствовали перекрестные реакции с РНК других серотипов ВБ и РНК гетерологичных вирусов.

Для определения аналитической чувствительности реакций готовили десятикратные разведения культурального вируса каждого из определяемых серотипов, входящих в состав нуклеотипов А, В и С. Пределом чувствительности считали наибольшее разведение, при котором регистрировали положительный результат. Рассчитанное значение аналитической чувствительности систем составило для нуклеотипа А $1,0 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, для нуклеотипа В $1,0 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и для нуклеотипа С $0,75 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

С учетом неблагополучной эпизоотической ситуации с блютангом в ряде областей России после 2011 г., и принадлежности выделенного вируса к 14 серотипу, было принято решение разработать тест-систему для идентификации данного серотипа методом ОТ-ПЦР.

Выравнивание имеющихся в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей 2 сегмента геномов ВБ 14 серотипа позволили определить участок нуклеотидной последовательности размером 203 п.о., специфичный только для изолятов 14 серотипа ВБ. Для амплификации данного фрагмента генома подобраны специфическая система олигонуклеотидных праймеров и ДНК-зонда.

Для определения специфичности использовали панель образцов биоматериала, включающую: референтные изоляты 1-24 серотипов и 26 серотип вируса блютанга, образцы крови от инфицированных ВБ 14 серотипа животных, интактные культуры клеток и кровь от интактных жвачных животных, вирус ЭГБО.

Аналитическую чувствительность оценивали путем исследования образцов препаратов десятикратных разведений в крови КРС ВБ 14 серотипа (исходный титр вируса $5,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$). Пределом чувствительности считали наибольшее разведение, при котором регистрировали положительный

результат. Рассчитанное значение аналитической чувствительности ОТ-ПЦР составило $0,75 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Для определения диагностической специфичности и чувствительности разработанной тест-системы проводили исследование крови от инфицированных в эксперименте животных, а также полевых образцов (более 150 проб крови, отобранных в Калужской и Смоленской областях в 2011-2012 гг.).

По результатам проведенных исследований установлено, что разработанная тест-система для идентификации ВБ 14 серотипа позволяла обнаружить геном ВБ, начиная с 3-х суток после заражения животных и на протяжении 152 дней (срок наблюдения 180 дней).

Во всех экспериментах не выявлено ложноотрицательных и ложноположительных результатов. В ходе работы установлено, что разработанная тест-система обладает 100 % диагностической специфичностью и чувствительностью.

Таким образом, в ходе исследований были разработаны чувствительные и специфичные средства типирования вируса блютанга, позволяющие идентифицировать эпизоотически значимые для нашей страны серотипы вируса в кратчайшие сроки.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ PLUG МАРКЕРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ СЕЛЕКЦИИ КНИИСХ.

Соколов П. А.

*Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА
имени К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии,
Москва 127550*

E-mail: pav2395147@yandex.ru

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L., $2n=42$) является одной из самых востребованных культур в мировом производстве. По данным ФАО мировое производство пшеницы в 2015/16 годах составило 735, 2 млн. т. (<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/ru>). Но развитие биотических и абиотических стресс-факторов побуждает селекционеров создавать новые сорта пшеницы. В селекционные схемы включаются сорта и линии с содержанием хроматина сородичей пшеницы, несущих в себе новые гены устойчивости и

хозяйственно-ценных признаков. В КНИИСХ были созданы коммерческие сорта мягкой пшеницы, проявившие в ходе испытаний устойчивость к ряду заболеваний (Миков и др, 2014.; Аблова, 2008).

Цель нашего исследования заключалась в молекулярно-генетической характеристике с помощью маркеров PLUG коллекции из 8 сортов мягкой пшеницы селекции КНИИСХ.

Растительный материал: коллекция сортов КНИИСХ (Фишт, Кавказ, Половчанка, Тания, Красота, Восторг, Доля, Кн №8), *S. cereale* сорта Альфа, *T.aestivum* сорта Иволга, *T. durum*, *T. boeoticum*, *Ae. speltoides*, *Ae. tauschii*.

Геномная ДНК выделялась СТАВ-методом (Doyle and Doyle, 1990) с некоторыми модификациями. Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием отобранных 34 маркеров PLUG на разные делеционные участки всех 7 гомеологичных групп хромосом мягкой пшеницы. Сиквенсы праймеров взяты у их авторов (Ishikawa et al., 2009). Маркеры подбирались таким образом, чтобы происходило наиболее полное покрытие делеционных участков.

В ходе исследования обнаружено, что при постановке ПЦР с 9 PLUG-маркерами из 34 (2 маркера на 1L; 3- на 1S; 1- на 2L; 1- на 2S; 1- на 5L; 1- на 5S) паттерн сортов коллекции КНИИСХ отличается от паттерна мягкой пшеницы сорта Иволга по отсутствию фрагментов пшеничного типа (далее- отсутствие фрагментов) и / или наличию дополнительных фрагментов, отличных от пшеничного типа (далее- наличие дополнительного фрагмента).

В паттерне сорта Фишт имеется один дополнительный фрагмент на хромосоме 1L, 5L и 5S, отсутствие фрагмента на 5L. В паттерне сорта Кавказ имеется один дополнительный фрагмент на хромосоме 2L, отсутствие одного фрагмента на 1S. В паттерне сорта Половчанка имеется один дополнительный фрагмент на хромосоме 1L и 2L, отсутствие двух фрагментов на 1L. В паттерне сорта Тания имеется один дополнительный фрагмент на хромосоме 1S, отсутствие двух фрагментов на 1S и отсутствие одного фрагмента на 2S. В паттерне сорта КН №8 имеется отсутствие одного фрагмента на 2S. В паттерне сорта Красота имеется один дополнительный фрагмент на хромосоме 5S, отсутствие одного фрагмента на 1S. В паттерне сорта Восторг имеется один дополнительный фрагмент на хромосоме 1L и 2L, отсутствие одного фрагмента на 1S. В паттерне сорта Доля имеется один

дополнительный фрагмент на хромосоме 5S, отсутствие одного фрагмента на 2S.

Таким образом, в результате анализа 8 сортов с использованием PLUG-маркеров нами получены следующие результаты: в 7 сортах мягкой пшеницы выявлено отсутствие фрагментов, характерных для мягкой пшеницы и наличие дополнительных фрагментов; в одном сорте обнаружено отсутствие фрагмента типа мягкой пшеницы. Полученные нами результаты свидетельствуют о произошедшей в ходе селекционной работы интрогрессии чужеродного генетического материала в геном анализируемых сортов. Отобранные нами PLUG-маркеры могут быть использованы для дальнейшего изучения сортов с чужеродными интрогрессиями.

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОСНОВНЫХ ХВОЙНЫХ ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ПОРОД РФ В ЦЕЛЯХ УСТАНОВЛЕНИЯ ФАКТОВ НЕЗАКОННЫХ РУБОК

Волков В.А.^{1,2}

¹ *Всероссийский институт генетических ресурсов растений
имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург 190000*

² *Санкт-Петербургский Государственный Лесотехнический
Университет*

им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург 194021

E-Mail: vol-j@mail.ru

Согласно данным Рослесхоза по РФ за период 2014 года было зафиксировано 18,4 тыс. случаев незаконной рубки, было вырублено 1308,4 тыс. куб.м древесины, причинённый ущерб оценивается в 10,8 млрд рублей. Примечателен тот факт, что нарушители были выявлены лишь в половине случаев [1]. Учитывая колоссальность ущерба, причиняемого «чёрными» лесорубами, встаёт вопрос о необходимости разработки методов идентификации древесины, повышающих эффективность раскрытия подобных нарушений закона.

Современные методы молекулярной генетики могут способствовать решению этой проблемы. Молекулярные методы оказываются наиболее эффективными, если необходимо установить генетическую идентичность срубленного дерева и пня. В этом случае для анализа предоставляют спилы с пней деревьев и

древесный материал, изъятый у подозреваемых. Подобно методам, используемым в криминалистике для идентификации человека, для решения данной задачи могут применяться методы микросателлитного анализа (Simple Sequence Repeat – SSR). Благодаря высокому полиморфизму микросателлитных локусов, бывает достаточно проанализировать 5-10 микросателлитных маркеров для однозначной идентификации древесины по ДНК-профилю [2]. Возможность создания подобных систем была оценена в модельном эксперименте, цель которого заключалась в установление идентичности анонимных спилов с березы [3]. Наиболее серьезными проблемами в данной методике являются подбор полиморфных SSR-маркеров и выделение ДНК, пригодной для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР). Известно, что древесина содержит компоненты, ингибирующие ПЦР [4]. В случае свежеспиленного дерева ДНК хорошего качества можно получить из тканей камбия или флоэмы, содержащих живые клетки. Выделение ДНК из ядровой древесины более проблематично, однако, возможно. Так, например, Deguilloux et al. [5] на примере дуба показали, что, хотя ДНК, выделенная из древесины, часто бывает деградированной, с ее использованием можно провести успешную ПЦР. После того как в ходе экспертизы установлен факт совпадения ДНК-профилей, характеризующих объекты экспертизы, перед экспертом встает вопрос - если генотипические аллельные комбинации двух препаратов ДНК совпадают, то какова вероятность того, что это совпадение закономерно, а не произошло случайно. Для создания эффективной системы маркеров необходимо провести масштабные популяционные исследования и статистический анализ полученных данных.

Разрабатываемые тест-системы ДНК-маркеров будут удовлетворять количественным характеристикам, общепринятым для методов лабораторных исследований: специфичность – не менее 95%, воспроизводимость - не менее 95%. Вероятность случайного совпадения аллелей у неродственных генотипов, рассчитанная для каждого локуса, не должна превышать 5%, а при использовании всего набора маркеров, вероятность ошибочного установления генетической идентичности не должна превышать одну миллионную процента.

Система учитывает в себе возможность применения в лабораториях разного уровня оснащенности и пропускной способности, при подборе маркеров учитывается не только

показатели полиморфности, но и возможность создания мультиплекс системы с последующим анализом полученных данных на капиллярном секвенаторе. В качестве дополнительного модуля в анализе для вида *Picea abies* возможно использование маркеров, нацеленных на выявление полиморфизма в структуре митохондриального гена *Nad1*[6], что позволит выявлять примерный регион происхождения древесины.

На данный момент ведется исследования образцов Северо-Западных и Восточно-Европейских популяций, созданы предварительные макеты тест-систем, позволяющие установить идентичность древесины, ведутся разработки направленные на повышение эффективности методов анализа и создание компонентов программного обеспечения для автоматизированной обработки данных. Макеты системы уже применяются при проведении экспертизы древесины.

Исследование ведется при финансовой поддержки Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фонд содействия инновациям) Договор код 0024606.

Библиографический список

1. <http://www.rosleshoz.gov.ru/>
2. Nielsen L. R., Kjær E. D. Tracing timber from forest to consumer with DNA markers. – Museum Tusculanum, 2007.
3. Волков В.А. Использование микросателлитного анализа для установления фактов незаконной рубки лесных насаждений. Исследование лесных экосистем: материалы междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых, 9–11 ноября 2015 г. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2015. – 120 с. С.16-19
4. Lee AB & Cooper TA. 1995. Improved direct PCR screen for bacterial colonies: wooden toothpicks inhibit PCR amplification. *Biotechniques* 18, 225–226.
5. Deguilloux MF, Pemonge MH & Petit RJ. 2002. Novel perspective in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Science* 269, 1039-1046.
6. Е.К. Потокина, А.А. Киселева, М.А. Николаева. Использование маркеров оргanelльной ДНК для анализа филогеографии восточноевропейской популяции ели

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TOZ19 У *POPULUS*

Ульянич П.С.

***Всероссийский институт генетических ресурсов растений
имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург 190000
Санкт-Петербургский Государственный Лесотехнический
Университет***

им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург 194021

E-Mail: Ulianich.p@inbox.ru

Деревья рода *Populus* L. являются двудомными быстрорастущими деревьями. С учетом скорости роста достаточно сложно переоценить значение тополей в промышленном и лесном хозяйстве как источника биомассы. Также тополь является очень ценной породой при озеленении городов. Однако есть существенные минусы в посадке тополей в городе. Первый минус – это так называемый тополиный пух. Сам пух аллергии не вызывает, но он является очень хорошим переносчиком пыльцы и пыли, которая, в свою очередь, вызывает аллергическую реакцию у жителей мегаполисов. Также тополиный пух легко возгорается, что повышает вероятность пожаров. Второй минус – гниение ядра ствола, поражающее возрастные деревья. Очень часто тополя поражены ядовитыми заболеваниями, из-за чего ствол становится хрупким и при сильных порывах ветра может сломаться и упасть, нанося вред имуществу или здоровью человека. Для решения первой проблемы эффективным является изучение механизма формирования поля у тополей с целью высаживания в городах преимущественно мужских особей. Знание такого механизма не только поможет озеленителям, но также упростит работу селекционерам.

Исследователями из института лесной генетики в Германии был предложен ген кандидат TOZ19, который предположительно участвует в процессе формирования соцветия (серёжки) у осины (с) (Pakullatal., 2014). Аналогичный ген был ранее описан у арабидобиса, он инициирует процесс перехода меристемы из вегетативного состояния в репродуктивное. Ген TOZ19 находится на 19 хромосоме и имеет 15 экзонов (Рис. 1).

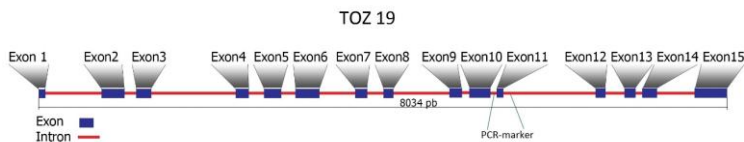


Рис. 1 Экзон-- интронная структура гена TOZ 19 у Populus.

Rakulletal (2014) предложили геноспецифичный ПЦР-маркер, с помощью которого можно достаточно точно определить пол осины на любой стадии развития. Предложенный ПЦР-маркер амплифицирует 11 экзон. У мужского дерева амплификация проходит успешно, а у женского продукт отсутствует (Рис. 2).

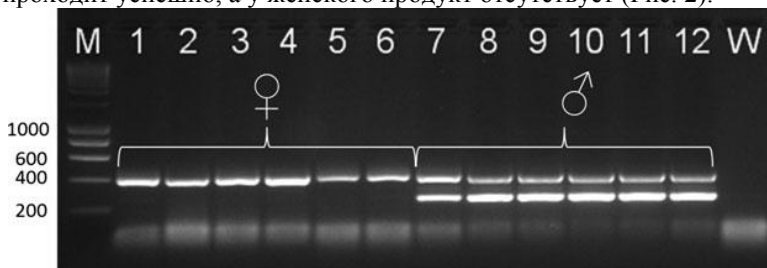


Рис.2 Визуализация результатов ПЦР с геноспецифичными праймерами экзона 11 гена TOZ 19 в агарозном геле. Верхний продукт – контроль, нижний – фрагмент экзона 11.

Мы проверили опубликованный ПЦР-маркер на разных видах тополей и выяснили, что маркер можно успешно использовать для определения пола у осин. Однако использовать данный маркер для других видов тополей невозможно по причине получения результатов, не согласующихся с морфологическими наблюдениями (Рис.3).

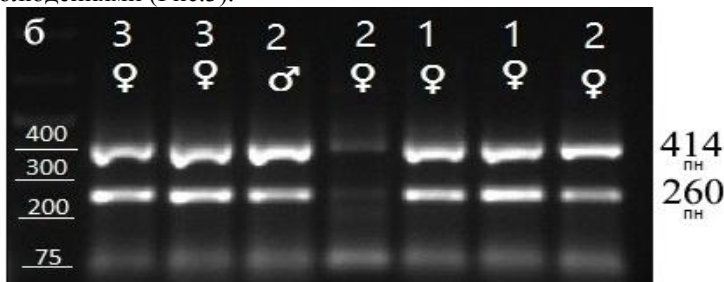


Рис. 3 1) Гибрид Тополя белого и Осины 2) Тополь сереющий 3) Тополь белый

Далее были смоделированы праймеры, покрывающие другие экзоны гена с длинной покрытия не более 1000 п.н. для дальнейшего секвенирования. В ходе анализа секвенированных последовательностей было обнаружено, что ген TOZ 19 характеризуется высоким полиморфизмом, который потенциально может быть использован для видовой идентификации в спорных случаях. Также идентифицированный полиморфизм TOZ 19 позволяет выявлять гибриды и устанавливать их родительские формы.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТРОМБОПАТИИ (ТР) У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА СИММЕНТАЛЬСКОЙ ПОРОДЫ

**Филипченко А.А., Форнара М.С., Костюнина О.В., Сермягин
А.А., Зиновьева Н.А.**

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
животноводства имени академика Л. К. Эрнста», Московская
область, городской округ Подольск, п. Дубровицы, д. 60
E-mail: filipchenko-90@mail.ru*

Изучение проблемы скрытого генетического груза у крупного рогатого скота рассматривается в качестве перспективного приема оздоровления племенного поголовья и повышения сохранности молодняка. Интенсивное использование в скотоводстве мирового породного генофонда лучших быков-производителей и репродуктивных технологий позволило не только значительно повысить генетический потенциал племенных животных, но и способствовало распространению наследственных заболеваний и прочих генетических нарушений. При этом наблюдается снижение жизнеспособности молодняка, продолжительности хозяйственного использования животных [1]. В связи с широким распространением наследственных мутаций и использованием ограниченного числа производителей оценка на наличие таких генетических вариантов получает широкое распространение в племенных предприятиях, способствует выявлению и исключению из воспроизводства быков - носителей нежелательных генов [4].

Тромбопатия (ТР) - миссенс-мутация в гене *RASGRP2*, наследуемая по аутосомно-рецессивному типу, в результате которой нарушается свёртываемость крови вследствие недостаточного высвобождения АДФ из тромбоцитов. У больных животных количество тромбоцитов находится в норме, но их функция нарушена, что приводит к низкой свертываемости крови. Общее состояние гомозиготных животных нормальное, без каких-либо патологических изменений, но такие животные страдают после травм, инъекций или хирургических вмешательств (непрекращающееся кровотечение из поврежденной кожи, слизистых оболочек носа), в результате которых может наступить смерть из-за несвертываемости крови. По литературным данным, в ходе проведённых исследований у телёнка симментальской породы, пораженного данной генетической аномалией, была обнаружена нуклеотидная замена, приводящая к изменению аминокислоты пролин на лейцин. Частота встречаемости мутации в гене *RASGRP2* внутри симментальской породы, приводящей к развитию тромбопатии, составляет 9% [2,3,5].

Целью исследований являлась разработка тест-системы, предназначенной для идентификации носителей гаплотипа ТРи проведение его предварительного скрининга в популяции скота симментальской породы.

В задачи исследований входило:

1. Разработать тест-систему для идентификации носителей гаплотипа ТР;
2. Сформировать группы животных для проведения предварительного скрининга;
3. Изучить распространение мутации в гене *RASGRP2* в исследуемых группах животных

Материалы и методы исследований. Исследования были выполнены в лаборатории молекулярных основ селекции Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л. К. Эрнста». Объектом исследований служили коровы (84 гол.) и быки-производители (84 гол) симментальской породы, принадлежащие различным племенным предприятиям Московской, Орловской, Липецкой и Воронежской областей.

Предмет исследований - пробы ткани (ушной выщип) и спермы крупного рогатого скота симментальской породы. Геномную ДНК выделяли при помощи набора «ДНК-экстран-2»

(Синтол, РФ) и с использованием колонок Nexttec (Nexttec Biotechnology GmbH, Германия), согласно рекомендациям производителя.

Разработанная тест-система предусматривает амплификацию фрагмента гена *RASGRP2* длиной 187 п.о., содержащего мутацию, с использованием двух специфических праймеров, с последующим гидролизом эндонуклеазой рестрикции *PspN4I* (Сибэнзим, Россия).

Результаты исследований. На рисунке 1 показаны результаты ПЦР-ПДРФ анализа вариантов гена *RASGRP2* с использованием разработанной тест-системы.

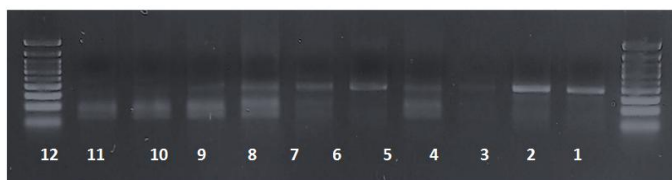


Рисунок 1 - Результаты генотипирования животных по *RASGRP2* с использованием тест-системы на основе ПЦР-ПДРФ. (дорожка 1, 12 маркер молекулярного веса; 2,3 вариант CC; 3, 4, 5, 7 вариант AC; 7, 9, 10, 11 нерестрицированный фрагмент)

В таблице 1 представлено распределение частот встречаемости аллелей и генотипов по гену *RASGRP2* в группе коров и быков симментальской породы.

Таблица 1 – Распределение частот встречаемости вариантов гена *RASGRP2*

Группа	Количество	Частота генотипов, %		Частота аллелей	
		CC	AC	C	A
Быки	84	86,90	13,10	0,935	0,065
Коровы	84	90,50	9,50	0,952	0,048
Всего	168	88,69	11,31	0,943	0,057

Частота встречаемости аллеля А фиксировалась на уровне 0,065 и 0,048 у быков и коров соответственно и в среднем по исследованной выборке составила 0,057. В исследуемых группах животных не был диагностирован гомозиготный вариант АА, частота генотипа АС составила 13,10 и 9,5% в группах быков и коров соответственно, а в целом по выборке фиксировалась на уровне 11,5%.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали эффективность разработанной тест-системы в выявлении носителей гаплотипа TP, обуславливающего возникновение

тромбопатии. Необходимо отметить, что в российской популяции симментальского скота встречаются особи, в генотипе которых присутствует аллель А, что свидетельствует о необходимости тестирования племенного поголовья на наличие данного генетического заболевания во избежание распространения мутации в стадах крупного рогатого скота.

Список литературы:

1. Кузнецов, А. В. Специфические генетические аномалии молочных симменталов австрийской селекции // А. В. Кузнецов. - 2016. - №8. - С.2-5.
2. Aebi, M., Wiedemar, N., Drögemüller, C., Zanolari, R. Inherited thrombopathia in Simmental cattle // Schweiz Arch Tierheilkd 158:102-8, 2016. Pubmed reference: 27145685.
3. Jansen, S., Aigner, B., Pausch, H., Wysocki, M., Eck, S., Benet-Pagès, A., Graf, E., Wieland, T., Strom, T.M., Meitinger, T., Fries, R. Assessment of the genomic variation in a cattle population by re-sequencing of key animals at low to medium coverage // BMC Genomics 14:446, 2013. Pubmed reference: 23826801. DOI: 10.1186/1471-2164-14-446.
4. Zerbin, I., Metzger, J., Dierks, C., Distl, O. Segregation of the hereditary thrombopathia-associated polymorphism in polled German Fleckvieh cattle. // Anim Genet 46:584-5, 2015. Pubmed reference: 26154292. DOI: 10.1111/age.12322.
5. <http://omia.angis.org.au/OMIA001003/9913/>

СОЗДАНИЕ ГОМОЗИГОТНЫХ ЛИНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ МЕТОДОМ ГАПЛОИДИИ

Сащенко М.Н., Подвигина О.А.

***Федеральное Государственное Бюджетное Научное
Учреждение «Всероссийский научно-исследовательский
институт сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова», 396030
Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИИСС, 86,
E-mail: samani84@mail.ru***

Основным этапом гетерозисной селекции является создание гомозиготных линий, обладающих высокой комбинационной способностью. У самоопыляющихся культур необходимость создания таких линий отпадает, так как вследствие естественного самоопыления каждый сорт представляет собой линию. Сорта перекрестноопыляющихся культур гетерозиготны. Гомозиготные линии из таких сортов получают путем принудительного

самоопыления и отбора константных форм с высокой комбинационной способностью. Создание линий методом самоопыления - очень трудоемкий и длительный процесс.

Кроме того, самоопыление сортов популяций в большинстве случаев оказывает отрицательное воздействие на растения: уменьшает число завязавшихся семян, снижает фертильность пыльцы, скорость роста, размеры и мощность растений. Иногда, в результате сильной инцухт - депрессии потомство гибнет, растения оказываются нежизнеспособными (Добросотсков, 1983). Кроме того, у перекрестноопыляющихся культур (в частности у сахарной свеклы) часто наблюдается явление самонесовместимости, что не позволяет получать линии от самоопыления.

В настоящее время широкое применение нашел способ получения гомозиготных линий методом культивирования генеративных органов. Полученные таким методом гомозиготные реституционные диплоиды в генетическом отношении являются эквивалентами линий, полученных длительным самоопылением.

Основным преимуществом использования гомозиготных реституционных линий является сокращение времени и затрат труда на их получение (Хохлов, 1976). Другим преимуществом можно назвать тот факт, что увеличение изменчивости признаков за счет гомозиготности позволило не только улучшить ранее созданные сорта и популяции, но и создавать новые при рекуррентной селекции (Gallais, 1978).

Поэтому с разработкой метода получения гаплоидных растений сахарной свеклы перед нами встала задача создания гомозиготных линий и возможность их применения в селекционном процессе.

Проведенные нами исследования в процессе формирования линий показали, что с одного растения сахарной свеклы в культуру тканей можно ввести до 250 неоплодотворенных семян. Но количество семян, дающих гаплоидные регенеранты, незначительно, и колеблется от 0 до 13 %. Стоит отметить, что у различных растений одного генотипа было получено разное количество гаплоидных проростков. На начальных этапах развития гаплоидные регенеранты имели незначительные размеры, одну-две пары листьев и отличались между собой только по окраске гипокотыля – розовый или зеленый. Гибель регенерантов на этой стадии была максимальной. Высокую гибель (более 50%) регенерантов отмечали и другие исследователи в своей работе (Van Geyt, 1985).

При дальнейшем культивировании в течение 3-4 недель регенеранты увеличивались в размерах, формировали листовой аппарат.

Наиболее ответственным этапом при дальнейшем культивировании полученных гаплоидных регенерантов является период стабилизации ростовых процессов, отборе наиболее жизнеспособных, активно растущих и хорошо размножающихся растений. Реакция регенерантов на смену питательной среды была однозначной у большинства и выражалась в образовании дополнительных побегов при культивировании. Дальнейшее культивирование растений на среде В₅ с гормональным комплексом 6-БАП, гиббереллин, кинетин по 0,2 мг/л вело к активному микроразмножению. Стабилизация ростовых процессов была достигнута на среде без гормонов.

Доказательством стабилизации и выравнивания гомозиготных линий является анализ плоидности. Для подтверждения гаплоидного происхождения регенерантов были проведены исследования материала на анализаторе плоидности и маркирование конкретных структурных генов по составу изоферментов. Исследуемые регенеранты показали стопроцентную гомозиготность по количеству ядерной ДНК и составу изоферментных локусов *Idn*, *Gdh*, *Me-1* (Федулова, Подвигина, 1994).

Регенеранты, прошедшие период стабилизации и оценку плоидности, являлись материалом для сформированных гаплоидных линий. Используя микроклональное размножение, количество регенерантов доводилось до необходимого уровня, при этом коэффициент размножения составлял 1,5-17,3 растения с одного введенного в зависимости от генотипа. Дальнейшее изучение морфологического развития растений гаплоидных линий показало, что характерными признаками являлись удлинение черешков листьев, сужение листовых пластинок и незначительная высота растений первого года жизни.

Гаплоидные растения второго года жизни по сравнению с диплоидными отличались также более слабым развитием, низкорослостью, узкими длинными листовыми пластинками, что в общем является характерными признаками гаплоидных форм (Иванова, Кучковская, 1999).

Анализ плоидности регенерантов в условиях *in vitro* и вегетирующих растений 1 и 2 года жизни показал, что гаплоидное

состояние клеток стабильно сохранялось на всех этапах роста и развития.

Таким образом, создание гомозиготных линий зависит от генотипических особенностей донорского материала, определяющих количество полученных гаплоидных регенерантов с различной изменчивостью признаков. При этом чередование питательных сред для проведения процесса стабилизации гаплоидных форм приобретает большое значение. Оценка материала морфологическими, цитологическими и биохимическими методами показала абсолютную гомозиготность сформированных линий.

Как известно, гаплоидные растения не способны давать потомство, поэтому для создания гомозиготных линий, способных участвовать в селекционном процессе, их необходимо перевести на более высокий уровень пloidности.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА У ЛАКТИРУЮЩИХ ТРАНСГЕННЫХ КРОЛЬЧИХ

**Кутын И.В., Белова Н.В., Езерский В.А., Максименко С.В.,
Трубицына Т.П., Колоскова Е.М., Рябых В.П..**

***ФГБНУ ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных,
Боровск, Калужская обл., 249013***

E-mail: Kurookami@mail.ru

Получение высокоактивных рекомбинантных белков человека из молока трансгенных сельскохозяйственных животных – одна из перспективнейших и сложнейших задач современной биотехнологии. Регуляторные последовательности генов основных белков молока - казеинов и сывороточных белков козы и крупного рогатого скота активно применяют в создании генно-инженерных конструкций (ГИК), предназначенных для получения трансгенных животных–продуцентов биологически активных веществ: они определяют тканеспецифический характер экспрессии в клетках молочной железы и, возможно, ее интенсивность. Наряду с получением трансгенных жвачных животных для производства некоторых высокоактивных рекомбинантных белков (ферментов, факторов роста, гормонов и др.) в ряде случаев целесообразно использование кроликов, которые - благодаря короткому

репродуктивному циклу, размеру, цене – могут стать альтернативой крупным трансгенным животным.

Лактоферрин человека (чЛФ) - один из перспективных белков для экспрессии в молоке сельскохозяйственных животных - может стать интересной моделью для изучения особенностей экспрессии трансгена в процессе лактации и лактаций для отдельной особи, для последующих поколений, изучения ее зависимости от копийности трансгена как в первом, так и в последующих поколениях.

Выделенная из созданной нами плазмиды линейная ГИК *pas1Lf*, содержащая 5'- и 3'- фланкирующие области гена α 1-казеина крупного рогатого скота и кДНК лактоферрина человека, была микроинъекцирована в пронуклеусы зигот кролика. Развившиеся до стадии бластоцист эмбрионы были трансплантированы подготовленным самкам-реципиентам. Родившиеся крольчата были ПЦР-тестированы на наличие гена *hLf*, в результате чего обнаружены три трансгенных крольчонка, два из которых оказались мозаиками (что впоследствии было подтверждено ПЦР-анализом внутренних органов), и одна самочка, ставшая основателем линии.

По достижении репродуктивного возраста трансгенная крольчиха (№36, F0) была скрещена с нетрансгенным кроликом. За три окрола при скрещивании крольчихи №36 с нетрансгенным самцом получен 21 здоровый потомок, у девяти из которых обнаружен ген *hLf*. От трех трансгенных дочерей (F1) было получено по 6 потомков (F2), у 64% которых найден трансген. При покрытии трансгенным самцом (F1) нетрансгенных самок интеграция трансгена обнаружена у половины потомства. Передача трансгена по наследству у потомков F1 обоих полов происходила нормально.

При скрещивании трансгенных кроликов первого поколения получили поколение F2, доля трансгенных животных в котором составила 69%. Определением копийности гена *hLf* была отобрана гомозиготная (19-22 копии трансгена *hLf* против 8-11 у родителей) крольчиха и скрещена с гетерозиготным самцом из F1. Потомство F3 было полностью трансгенным, но анализ копийности трансгена показал только 22% гомозигот. Потомство гомозиготных родителей F4 тоже было полностью трансгенным, но при оценке копийности трансгена у двух из 15 крольчат количество копий было в 2 раза меньшим, чем у обычных гомозигот (копийность трансгена у гомозиготных особей следующего поколения сохранялась).

На начальных этапах работы концентрацию рекомбинантного чЛФ в молоке трансгенных крольчих делали в ФГУ Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена методом твердофазного иммуноферментного анализа тест-системой, разработанной для определения чЛФ в биологических жидкостях человека. В нашей лаборатории была создана собственная ИФА тест-система, адаптированная для работы с молоком кролика, с помощью которой мы и определяли концентрацию чЛФ в молоке и сыворотке крови лактирующих трансгенных крольчих. Лактоферрин человека был обнаружен только в молоке, что говорит о тканеспецифичной экспрессии трансгена.

У крольчихи №36 (F0) содержание чЛФ в молоке снижалось с каждой последующей лактацией. Причем если к концу первой лактации концентрация чЛФ повышалась почти вдвое по сравнению с ее началом (от 0,4 до 0,8 мкг/мл), в последующие две лактации, наоборот, содержание чЛФ к концу лактации уменьшалось. При этом снижение концентрации трансгенного белка с каждой последующей лактацией начиналось раньше. У дочерей крольчихи №36 (F1) содержание чЛФ в молоке в первую лактацию резко различалось: у одной оно было в несколько раз выше, чем у матери (до 2 мкг/мл), снижаясь в конце лактации до 0,5 мкг/мл, у другой же концентрация чЛФ, незначительно повысившись в начальный период лактации (всего до 0,3 мкг/мл), далее только уменьшалась.

В следующих поколениях гетерозиготных животных содержание чЛФ в молоке было стабильно в 2-3 раза ниже, чем у гомозиготных крольчих (2-3 мкг/мл). Если у гетерозиготных крольчих наблюдали повышение чЛФ в первой трети лактации (около 20 суток), далее происходило почти двукратное ее снижение. Экспрессия трансгена у гомозиготных по гену *hLf* крольчих первого и последующих поколений практически не отличалась, достигая максимума в первой трети лактации и оставаясь с некоторыми колебаниями стабильно высокой на всем ее протяжении.

С каждой последующей лактацией отмечали снижение концентрации чЛФ в молоке как гомо-, так и гетерозиготных трансгенных крольчих.

Полученная в результате нескольких близкородственных скрещиваний линия трансгенных кроликов, гомозиготных по гену

лактоферрина человека, имеет невысокую, но стабильную экспрессию трансгенного белка в молоко.

Невысокий уровень экспрессии рекомбинантного белка, наблюдаемый у трансгенных кроликов, объясняется несколькими причинами, уже описанными в научной литературе: а) интеграция линейной конструкции в случайный сайт с возможными нарушениями важных генных локусов; б) использование в конструкции кДНК целевого белка вместо полноценной генной последовательности, нетранслирующие экзоны которой и интроны, особенно первые, могут иметь значимые регуляторные функции; в) включение в состав ГИК фланкирующих областей генов молочных белков чужого организма. Относительно недавно разработанная CRISPR/Cas-технология, интенсивно применяемая сейчас в передовых научно-исследовательских коллективах, очень перспективна для получения трансгенных животных сельскохозяйственного и биомедицинского назначения. Использование генно-инженерных конструкций, способных по механизму гомологичной рекомбинации встраиваться в строго определенный сайт – вместо дикого гена с его нокаутом, или в любой другой выбранный локус, - для применения с новой технологией позволит в ближайшее время добиться значительных успехов в получении трансгенных сельскохозяйственных животных с новыми свойствами.

ПОИСК В ПРОМОТОРЕ PRO-SMAMP2 ИЗ STELLARIA MEDIA РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ЕГО АКТИВАЦИЮ В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА ПРИ АТАКЕ ФИТОПАТОГЕНОВ

Казакова К.А., Зайцев Д.В., Комахин Р.А.
*Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва, 127550*

E-mail: recombination@iab.ac.ru

Ранее практически все трансгенные растения содержали два рекомбинантных гена, один из которых под контролем конститутивного промотора использовался для селективного отбора трансформированных клеток, а другой «целевой» ген - под

контролем промотора любого типа был предназначен для изменения фенотипа растения. В настоящее время возможности мультигенной трансформации делают доступными импорт в растения целых метаболических путей, требующих набора промоторов различного происхождения. В настоящее время поиск и изучение новых промоторов для генетической инженерии растений является актуальной задачей современных исследований.

Ранее во ФГБНУ ВНИИСБ из растения звездчатки (*S. media*) был клонирован новый промотор гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* [1]. Было показано [2], что этот промотор в трансгенных растениях табака поколения T_3 проявил себя как сильный и по эффективности превосходил известный вирусный промотор CaMV35S (рис. 1).

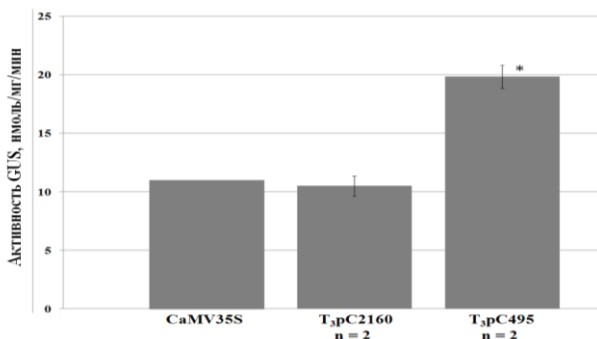


Рис. 1 - Уровни активности GUS в гомозиготных трансгенных линиях табака, экспрессирующих ген *gus* под контролем делеционных вариантов -2160 и -495 п.н. промотора *pro-SmAMP2*. Вертикальными линиями показаны стандартные ошибки, звездочкой обозначены существенные отличия от варианта с вирусным промотором CaMV35S [3]. n – число независимых линий в каждом варианте.

Из рис. 1 следует, что уровень активности GUS при использовании короткого делеционного варианта промотора был примерно в два раза выше, чем при использовании длинного делеционного варианта этого же промотора. Короткий делеционный вариант *pro-SmAMP2* был существенно более эффективным, чем вирусный промотор CaMV35S.

Ранее было установлено, что в растениях мокрицы *S. media* экспрессия гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* возрастает до 10 раз при контакте с патогенными грибами [1]. С целью поиска участков промотора отвечающих за его индуцибельность в ответ на

атаку фитопатогенов асептические трансгенные растения табака с делеционными вариантами -2160 и -495 п.н. промотора pro-SmAMP2 были обработаны смесью конидий патогенных грибов *Fusarium sp.* и *Alternaria sp.* В качестве контроля использовали те же самые растения, но обработанные дистиллированной водой.

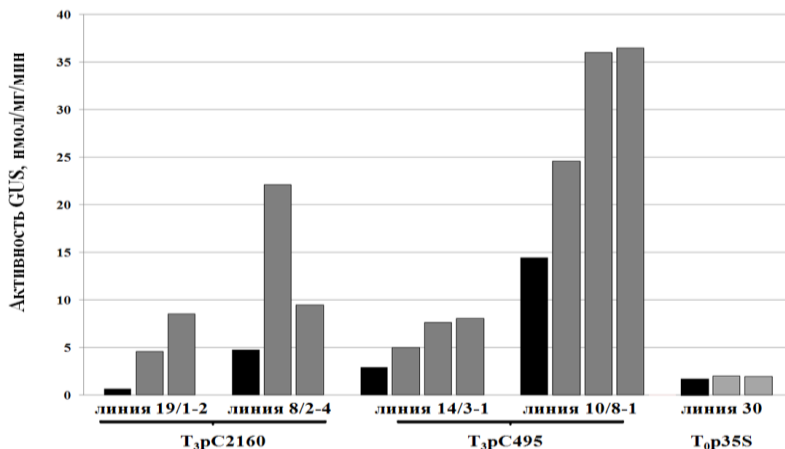


Рис. 2 - Уровни активности GUS в растениях табака с делеционными вариантами промотора pro-SmAMP2 и вирусным промотором CaMV35S при контакте с фитопатогенами. Черным цветом показан контроль (обработка дистиллированной водой), серым – обработка водной суспензией конидий *Fusarium sp.* и *Alternaria sp.*

Из рис. 2 следует, что при контакте с фитопатогенными грибами активность GUS в листьях трансгенных растений табака варианта T₃pC495 возросла до 4,8 раз, в варианте T₃pC2160 до 13 раз, в то время как в контроле с конститутивным промотором CaMV35S (T₀pC35S) практически не изменилась. Вероятно, самый короткий вариант промотора pro-SmAMP2 содержит цис-элементы необходимые для его активации в табаке при атаке патогенов. Длинный делеционный вариант промотора pro-SmAMP2, по-видимому, содержит дополнительные цис-элементы для активации в растениях табака при атаке грибов.

Список литературы

1. Shukurov R.R, Voblikova V.D., Nikonorova A.K. et al. Transformation of tobacco and *Arabidopsis* plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens // Transgenic Res. - 2012. - Vol. 21. - № 2. - P. 313-25.

2. Komakhin R.A., Vysotskii D.A., Shukurov R.R., Voblikova V.D., Komakhina V.V., Strelnikova S.R., Vetchinkina E.M., Babakov A.V. Novel strong promoter of antimicrobial peptides gene pro-SmAMP2 from chickweed (*Stellaria media*). // BMC Biotechnol. 2016 May 18;16(1):43. doi: 10.1186/s12896-016-0273-x.
3. Cazzonelli C.I., McCallum E.J., Lee R., Botella J.R. Characterization of a strong, constitutive mung bean (*Vigna radiata* L.) promoter with a complex mode of regulation in planta. // Transgenic Res. 2005;14(6):941–67.

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *PT-GFP* В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM* L. МЕТОДАМИ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ И СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИИ

М.С. Назарова¹, М.Н. Агеева¹, Г.Н. Ралдугина², Д.В. Беляев²,
А.А. Брилкина¹

*1 – Нижегородский государственный университет им. Н.И.
Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23;
E-mail: kbiohf@ibbm.unn.ru*

*2 – Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
РАН, Москва, 127276, Ботаническая ул., 35*

На данный момент генетическая трансформация предоставляет широкие возможности для создания модельных систем в физиологии растений. Для облегчения проверки трансгеноза при трансформации используются векторы, несущие кроме целевого гена гены устойчивости к антибиотикам. Однако только устойчивость полученных растений к антибиотикам не является доказательством успешного встраивания целевого гена. Полученные растения необходимо проверять на экспрессию целевого белка, поскольку иногда встраиваются не все гены, содержащиеся в генетической конструкции. Нами была проведена трансформация растений табака с помощью вектора, содержащего кроме гена *nptII* ген флуоресцентного белка *ptgfp*, который является ратиометрическим рН-индикатором. Для проверки трансгенности нами были использованы методы конфокальной микроскопии и спектрофлуориметрии.

Объектами исследования служили трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L. сорта *Samsun*) полученные методом кокультивирования листовых дисков с *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0, несущего бинарную векторную систему pART27-ptGFP (NanoLight Technologies). После инкубации экспланты пересаживали на среду для морфогенеза табака с антибиотиками канамицином (Км) и цефотаксимом (Цф). Флуоресцентные изображения клеток корней линий, регенерировавших после трансформации растений табака, получали с помощью системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия). Спектры возбуждения и флуоресценции получали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) с выносным блоком для детектирования флуоресценции твердых образцов “Лягушка” (ПКГ “Гранат”, Россия).

После культивирования эксплантов на средах с антибиотиками было отобрано 93 линии, которые были устойчивы к селективному антибиотику Км. Для 31 линии был проведен спектрофлуориметрический анализ, в результате которого было показано, что у растений 15 линий наблюдались пики при возбуждении 475 нм, и при испускании 508 нм, свойственные для PtGFP. Из них четкими и высокими пиками на полученных спектрах обладали растения 11 линий. У нетрансформированных побегов данные пики отсутствовали. Таким образом, успешная экспрессия гена ptGFP в проверенных линиях T₀ составила 48%.

В дальнейшем из табака этих линий планируется получить растения поколения T₂ для выявления изменений уровня pH при передаче сигналов в растительной клетке.

СКРИНИНГ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ НА НАЛИЧИЕ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К СЕТЧАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЕВ

Астапчук И. Л., Репко Н.В., Зеленский Г.Л.
**ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный
университет
имени И. Т. Трубилина» г. Краснодар 350044
E-mail: irina_astapchuk@mail.ru**

Маркер вспомогательная селекция (marker assisted selection - MAS) растений на устойчивость к болезням в настоящее время широко используется в Европе, США, Канаде, Австралии. Ее преимущества очевидны, особенно при пирамидировании генов устойчивости, при вовлечении в селекцию генов «взрослой» устойчивости, а также генетических детерминант количественной устойчивости растений к болезням. В Южном федеральном округе возрастающее распространение вредоносности сетчатой пятнистости листьев ячменя во многом связано с качественностью оценки на молекулярном уровне устойчивости отечественных сортов и селекционного материала культуры. Успехи в селекции толерантных сортов во многом определяются и наличием или отсутствием генетических коллекций источников и доноров устойчивости конкретного патогена. Между тем потери урожая от spot-формы сетчатой пятнистости (*Pyrenophora teres f. teres*) могут достигать от 23 до 44 % (Афанасенко, 2013).

Гены и QTL, детерминирующие устойчивость к возбудителю сетчатой пятнистости ячменя *P. teres f. teres* были локализованы почти на всех хромосомах ячменя: *Pt.a* на хромосоме 3HL (Graner et al., 1996), *QRpts2S* (на хромосоме 2HS), *QRpts3L* (3HL), *QRpts2L* (2HL), *QRpts3La* (3HL), *QRpts3Lb* (3HL), *QRpts4* (4H) and *QRpts6L* (6HL) (Raman et al., 2003), *Rpt-4H-5-7*, *Rpt-3H-4* and *Rpt-1H-5-6* (Yun et al., 2005), *Rpt5* (6H) (Manninen et al., 2006; Gupta et al., 2010), *QRpt6* (6H), *QRtts2* (2H), *QRtts4* (4H) (Grewal et al., 2008), *rpt.r* (6H) и *rpt.k* (6H) (Abu Qamar et al., 2008) и к другой форме этого возбудителя *P. teres f. maculata* на 4, 5, 6 и 7 хромосомах ячменя: *Rpt4* (7H) (Williams et al., 1999), *QRpts4* (4H), *QRpt7* (7H) и *QRpt6* (6H) (Grewal et al., 2008), *QRptms1* (1H), *QRptms4* (4H), *QRptms6* (6H), *Rpt6* (5H) (Manninen et al., 2006).

Основным источником пополнения новыми генами устойчивости являются аборигенные образцы из центров генетического разнообразия культур и дикие виды культурных растений. Анализ устойчивости около 300 образцов культурного

Hordeum vulgare ssp. *vulgare* и 400 дикого *H. vulgare* ssp. *spontaneum* ячменей из Израиля (Средиземноморский ген-центр) к возбудителю сетчатой пятнистости показал, что почти 50% образцов дикого ячменя были устойчивы к возбудителю, тогда как среди культурного ячменя выявлено только 5 % устойчивых форм (Афанасенко, 2009).

Мировая коллекция ВИР им. Н.И. Вавилова, представленная более 20 тысячами образцов ячменя от культурных до диких травянистых форм, является основным источником пополнения исходного материала для селекции по всем направлениям. Тысячи образцов из коллекции ВИР ежегодно проходят испытание в селекционных научных учреждениях и организациях, расположенных в разных регионах России, отличающихся по агроклиматическим условиям. На Северном Кавказе особо актуальна проблема поиска источников устойчивости к сетчатой пятнистости, так как складываются благоприятные климатические условия для развития патогена. Особую опасность представляет spot-форма сетчатой пятнистости *P. teres* f. *Maculata*, которая впервые была обнаружена в России в условиях Краснодарского края в 2010 г. (Афанасенко, 2013).

Коллегами из НИИ зерновых культур им. Калиненко, было установлено, что один из самых высокоэффективных, ген *Rpt5*, детерминирующий устойчивость к восьми изолятам гриба *Pyrenophora teres* различного происхождения, является и эффективным в условиях Южного федерального округа. Кроме этого, доказана эффективность системы микросателлитных маркеров (hvm74 и bmag0173) (Филиппов, 2016).

Цель нашей работы, установить, являются ли носителями гена *Rpt5*, микросателлитных локусов hvm74, bmag0173 (с аллелями 153 и 155 пн для локуса bmag0173 и 186, 188, 192 пн для локуса hvm74.) 24 сортообразца озимого ячменя селекции КубГАУ. В течении четырёх лет исследований в поле и в теплице на естественном и искусственном инфекционном фонах, отдельные формы показали высокую расонеспецифическую устойчивость с поражением до 15 % (Астапчук, 2016; 2017).

При использовании этих доноров в качестве родительских форм были получены гибриды F₂, которые также показывают высокую устойчивость к патогену. В дальнейшем они будут проанализированы на наличие «желательных» аллелей с целью создания сортов, устойчивых к поражению сетчатой пятнистостью.

Наряду с этим, нами ведется работа по молекулярному скринингу коллекции озимого ячменя на наличие генов *Rpt 1b*, *Rpt 5*, *Rpt 6*, контролирующих устойчивость к возбудителю сетчатого гельминтоспориоза, в условиях Северного Кавказа с целью выявления доноров, генетически устойчивых к поражению данным патогеном, а также поиск источников устойчивости к spot - форме.

Список литературы:

1. Астапчук И.Л. Оценка полевой устойчивости сортов и линий озимого ячменя к сетчатому гельминтоспориозу (возбудитель *Helminthosporium teres* (Sacc.)) / Репко Н.В., Зеленский Г.Л., Данилова А.В., Волкова Г.В. // IX Всероссийской конференции молодых ученых. 2016. С. 67-68.
2. Астапчук И.Л. Скрининг исходного материала озимого ячменя для селекции сортов, устойчивых к сетчатой пятнистости листьев / Репко Н.В., Зеленский Г.Л., Волкова Г.В. // X Всероссийской конференции молодых ученых. 2017. С. 64-65
3. Афанасенко О. С. Роль А. Я. Трофимовской в развитии исследований по иммунологической характеристике ячменя из генетических центров эволюции // Труды по прикладной ботанике, селекции и генетике. 2009. Т. 165. С. 1-5.
4. Афанасенко О. С., Современное состояние исследований генетики устойчивости ячменя к болезням // III Международной конференции в честь 110-й годовщины со дня рождения профессора А. Я. Трофимовской «Современные методы использования генетических ресурсов в селекции ячменя и овса». Т. 171. СПб.: ВИР, 2013. С. 298
5. Филиппов Е.Г., Перспективные направления в селекции ячменя /Донцова А.А., Донцов Д.П. // Таврический вестник аграрной науки * № 2(6) * 2016. С. 133-134.
6. Grewal T. S., Rossnagel B. G., Pozniak C. J. et al. Mapping quantitative trait loci associated with barley net blotch resistance // Theor Appl. Genet. 2008. Vol. 116. P. 529–539.
7. Gupta S., Li C. D., Loughman R. et. al. Quantitative trait loci and epistatic interactions in barley conferring resistance to net type net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) isolates. // Plant Breeding. 2010. Vol. 129. N. 4. P. 362-368.

8. Manninen O.M., Jalli M., Kalendar R. et al. Mapping of major spot-type and net-type net blotch resistance genes in the Ethiopian barley (*Hordeum vulgare*) line CI9819 // *Genome*. 2006. Vol. 49. P. 1564-1571

СКРИНИНГ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВИДОВ *PICEA L.*

Ковальков А.В.^{1,2}, Волков В.А.^{1,2}, Григорьева Е.А.^{1,2}

¹ *Всероссийский институт генетических ресурсов растений
имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург 190000*

² *Санкт-Петербургский Государственный Лесотехнический
Университет*

им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург 194021

E-Mail: AndreyVladimirov1ch@yandex.ru

В Российской Федерации проблема нелегальных рубок леса остаётся актуальной. Для наиболее точного определения субъектов нелегальных вырубок, достаточно собрать материал (листья, древесину) с места нелегальной вырубки и образец с исследуемого материала (брус, кругляк). Затем, аналогично методу, называемому в криминалистике ДНК-фингерпринтинг (DNA-fingerprinting), можно проанализировать определённые локусы генома для выявления количества простых tandemных повторов (микросателлитов), с помощью специально подобранных SSR-маркеров. В результате такого исследования можно практически со 100% точностью установить составляло ли срубленное дерево и пень на вырубке единое целое, так как вероятность наличия у двух растений одинакового количества микросателлитных повторов во всех локусах доступных для анализа крайне мала.

Нами был произведен обзор научных публикаций, касающихся различных методов, позволяющих выявлять микросателлитные повторы в геноме видов *Picea L.* Из более чем сорока SSR-маркеров были отобраны только те, которые обладают наибольшим показателем гетерозиготности (heterozygosity), отражающим вероятность наличия у двух разных индивидов в популяции разных аллелей по данному локусу. Затем, в ходе фрагментного анализа, были отобраны наиболее полиморфные и специфичные маркеры. Так же подбирались схожие параметры проведения ПЦР, для создания максимально эффективного и

удобного набора микросателлитных маркеров для диагностических целей. В настоящее время ведется работа, направленная на создание макета системы микросателлитных маркеров, позволяющих амплифицировать исследуемые локусы с использованием мультиплексной ПЦР. Разрабатываемый метод проходит проверку и адаптацию к различным способам детекции, таким как ПААГ, капиллярный электрофорез и фрагментный анализ на генетическом анализаторе Нанофор-05. Задача исследования заключается в получении универсальной системы маркеров, которые можно будет применять при расследованиях фактов незаконных рубок в лабораториях с различной приборной оснащенностью и пропускной способностью.

БИОХИМИЧЕСКОЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГАПЛОИДНЫХ РЕГЕНЕРАНТОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

**Карпеченко Н. А., Васильченко Е.Н., Жужалова Т.П.,
Землянухина О.А.**

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова» Россия, п.***

Рамонь, Воронежской обл.

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

В последние годы все более широкое применение в селекции культурных растений находят методы культуры изолированных тканей и органов, среди которых особое место занимает культивирование неоплодотворенных семязачатков для получения гомозиготных линий. Разработка метода гаплоидного партеногенеза у сахарной свеклы сопровождается совершенствованием специфических условий индукции неоплодотворенных семязачатков и культивирования гаплоидных регенерантов, выявлением новых генетических рекомбинаций и включением созданных дигаплоидных линий в селекционный процесс.

Необходимым условием при формировании реституционных линий сахарной свеклы является первоначальная оценка морфологических признаков растений-регенерантов, проведение цитофотометрического анализа уровня ploидности, исследование полиморфизма изоферментных спектров в культивируемых *in vitro* гаплоидных регенерантах. Использование ДНК-маркеров для

определения в культуре *in vitro* стерильных и фертильных генотипов имеет большое практическое значение, т.к. проведение молекулярного анализа, с использованием секвенирования позволяет значительно сократить время создания гомозиготных линий, различающихся по типу цитоплазмы, что является актуальным направлением исследований.

Экспериментальные исследования показали, что полученные регенеранты сахарной свеклы имели характерные морфологические признаки гаплоидных растений: розетку с узкими листовыми пластинками и более длинными черешками. Проведение цитофотометрической оценки уровня пloidности при стабилизирующем отборе выявила у полученных регенерантов гаплоидный ($n=9$) набор хромосом. Биохимическая оценка выявила различия распределения изоформ фермента 1- и 2- эстеразы (α - и β -эстеразы), свидетельствующие о разной регуляции активности генов в растениях-регенерантах сахарной свеклы, обусловленных, по-видимому, метилированием ДНК соответствующих участков генома.

Молекулярно-генетическое изучение гаплоидов с использованием анализа фрагментов митохондриального генома 2 пар праймеров (nad1 exonB – nad1 exonC, nad1 BF2 - nad1 BR3), амплифицирующих фрагменты второго интрона первой субъединицы гена фермента NADH dehydrogenase, выявило различия в нуклеотидной последовательности ДНК митохондрий, позволившие генотипировать их по стерильному и фертильному типам цитоплазмы. Это дало возможность, изученные гаплоидные регенеранты разделить на 2 кластера: образцы 1 кластера фертильны, образцы 2 кластера имеют цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитоплазматическая мужская стерильность у растений сахарной свеклы ассоциирована с изменениями структуры ДНК в митохондриальном геноме. Это дает возможность проводить целенаправленный отбор регенерантов по генотипическим признакам, облегчает задачу создания линий с ЦМС и формирования высокопродуктивных гибридов сахарной свеклы на стерильной основе.

МОРФОГЕНЕЗ STEVIA REBAUDIANA В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной

свеклы имени А.Л. Мазлумова, Рамонь, 396030,

E-mail: kolelkbk@mail.ru

Stevia rebaudiana – перспективная культура для интродукции в ЦЧР. Она обладает комплексом ценных веществ (гликозидов, антиоксидантов, дубильных веществ и др.), которые в особенности полезны людям с нарушенной толерантностью к углеводам и более серьёзными проблемами с обменом веществ.

В связи с необходимостью получения сортов с адаптивными свойствами для возделывания в нехарактерном для *Stevia rebaudiana* регионе целесообразно проведение работ по получению новых форм с использованием биотехнологических приёмов. Одним из резервов получения исходного материала является соматоклональная изменчивость, затрагивающая структуру ДНК и кариотипа, без переноса чужеродных геномов. Данная изменчивость связана со спонтанными изменениями в образующейся *in vitro* каллусной ткани, которая в дальнейшем даёт новые растения. При этом у соматоклонов обнаруживаются варианты, превосходящие исходные формы по различным хозяйственно ценным признакам. В связи с этим актуальным явилось выявление условий, способствующих получению соматоклонов *Stevia* из каллусных тканей в культуре *in vitro*.

Для получения каллусной ткани и соматоклонов применяли питательную среду MS с комплексом фитогормонов. В качестве эксплантов использовали молодые ткани культуральных растений.

Результаты исследований показали, что на питательной среде, не содержащей фитогормонов, у эксплантов не происходило процессов каллусогенеза и регенерации, что было связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению. Добавление в питательную среду 2,4 Д способствовало образованию дедифференцированных клеток у эксплантов. Высокие концентрации 2,4 Д вызывали образование бежевых рыхлых структур, состоящих из сильно обводнённых клеток, легко распадающихся на отдельные агрегаты. При старении у каллусов появлялась коричневая окраска, обусловленная накоплением фенолов. На средах с содержанием 2,4 Д 0,5 мг/л происходило образование светло-зелёного каллуса средней плотности с

меристематическими очагами. Гормон 2,4Д в концентрации 0,05 мг/л стимулировал корневой органогенез с частотой 25,0 %. Введение в среду с ауксином цитокинина 6-БАП в соотношении 1:1 вызывало 100 %-ное образование зелёного каллуса, имеющего плотную глобулярную структуру, развивающегося со средней интенсивностью. Регенерация при этом происходила редко (18,8%). При соотношении данных фитогормонов 1:3, частота регенерации увеличивалась до 39,0 %. Добавление гиббереллина в невысоких концентрациях способствовало повышению частоты регенерации каллусных структур до 53,7 %.

На процесс регенерации и изменчивость микроклонов *Stevia rebaudiana* также оказывала влияние длительность культивирования каллуса. При этом во время первого пассажа количество регенерирующих каллусов составило 53,7 %. Во втором и в третьем пассаже частота регенерации клонов с видимыми изменениями увеличивалась до 62,5 %. После четвёртого пассажа каллусы переставали регенерировать. Длительное культивирование каллуса повышало частоту регенерации на 8,8 % (до третьего пассажа), а частоту изменённых растений - на 10-30 %.

Однако не все выявленные морфологические изменения микроклонов оказываются в итоге результирующими. Поэтому полученные соматклоны подлежат изучению по количеству ядерной ДНК, оценке морфологического развития в условиях закрытого и открытого грунта, а также выявлению наследуемости изменений в последующих поколениях. Для увеличения генетической изменчивости соматклонов *Stevia rebaudiana* необходимо продолжать работу по подбору факторов, способствующих повышению эффективности образования морфогенного каллуса, склонного к регенерации в течение нескольких пассажей.

СОРТОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ ДНК ТОПОЛЕЙ И ОСИН

Кондратьева А.М., Ржевский. С.Г., Федулова Т.П.

**ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
лесной генетики, селекции и биотехнологии», 394087, г.**

Воронеж, ул. Ломоносова, 105

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Методы молекулярно-генетического анализа могут использоваться для идентификации различных пород деревьев, если морфологические признаки оказываются недостаточно

достоверными. К таковым относятся методы ДНК-маркирования, с использованием микросателлитных локусов, позволяющих выявлять специфические участки генома (Светлакова и др., 2012, Lefort F., 1999). Признанное лидерство принадлежит SSR-маркерам (Simple Sequence Repeats) (Vendramin G.G., Hansen O.K., 2005). Несомненными достоинствами микросателлитного анализа являются высокий индивидуальный полиморфизм, кодоминантный тип наследования, высокая воспроизводимость метода.

Одним из первых древесных видов, чей геном был полностью секвенирован, является представитель черных тополей – *Populus trichocarpa*. Благодаря этому открытию было разработано множество праймеров для кодирующих и не кодирующих микросателлитных локусов данного вида. Последовательности пар SSR-праймеров *P. trichocarpa* тестировались и на других видах рода *Populus*, в том числе и на *P. tremula*.

Для условий России осина европейская является одним из самых быстрорастущих и скороспелых, наиболее производительных ценных лиственных видов растений.

Таким образом, проблема подбора высоко полиморфных микросателлитных маркеров для исследования генетического разнообразия селекционно-ценных генотипов тополя и осины с использованием микросателлитного анализа является важной и своевременной.

Объектами исследований являлись 33 перспективных сортообразца тополя и осины, которые были проанализированы по 12-и микросателлитным локусам: ORPM127, ORPM344, PMGC2060, PMGC2163, PMGC2571, PMGC2679, PMGC2852, PMGC433, WPMS5, WPMS12, WPMS14, WPMS20 (Khasa D. P. e.a., 2003.; de-Lucas A. I. e.a., 2008; Lexer C. 2005, 2007; Smilga J. e.a., 2012). Материалы любезно предоставлены д.с.-х. н. А.П. Царёвым и к.с.-х.н. Р.П. Царёвой.

В микросателлитном локусе ORPM127 у исследованных образцов тополя и осины обнаружено 5 ДНК-фрагментов размером от 150 до 210 п. н., при этом фрагмент 210 п. н. отмечен только у образца № 6.

SSR-маркер WPMS12 у исследованных образцов характеризуется 5 ДНК-фрагментами, размер ампликонов составляет 140–210 п. н. При этом аллель 140 п. н. присутствует только у образца № 30, 150 п. н. – только у № 21, 210 п. н. – у №№ 10, 18. В локусе WPMS14 насчитывается 5 ПЦР-продукта с

размером от 220 п. н. до 280 п. н.. Аллель размером 280 п. н. отмечен только у образцов №№ 6, 17, 25.

Микросателлит WPMS5 отличается 4 ПЦР-продуктами с варьированием длин от 280 п. н. до 310 п. н. В микросателлите ORPM344 у исследованных образцов тополя и осины выявлено 4 аллеля, размер ампликонов составляет 210–240 п. н.

В локусе PMGC433 у исследованных образцов отмечено 4 ампликона, размер которых составляет 190–220 п. н. Фрагмент 200 п. н. присутствует у всех генотипов, кроме образца № 30.

У микросателлитного маркера PMGC2163 отмечено 4 аллеля (200–240 п. н.) Фрагмент размером 230 п. н. присутствует только у двух образцов (№ 3, 27).

В локусе WPMS20 обнаружено 3 ДНК-ампликона размах варьирования длин составляет от 220 п. н. до 260 п. н. Аллель 260 п. н. присутствует только у четырех образцов (№№ 1, 3, 15, 17).

В локусе PMGC2679 у исследованных образцов осины и тополя обнаружено 3 ДНК-ампликона, размер которых составляет 80–110 п. н. Локус PMGC2852 показал 3 фрагмента, размах варьирования длин составляет от 100 п. н. до 120 п. н. Для микросателлитного маркера PMGC2060 характерно наличие 3 ДНК-ампликонов размером от 140 до 160 п. Локус PMGC2571 характеризуется тремя аллелями (105–120 п. н.).

В результате проведенного анализа генотипов тополя и осины все 12 исследованных микросателлитных маркера отличаются 100 %-ным полиморфизмом.

У исследованных генотипов всего выявлен 561 SSR-фрагмент, все из которых – полиморфные. Длина полученных ДНК-фрагментов у исследованных образцов тополя и осины колеблется от 80 до 310 п. н. Среднее число ампликонов на локус – 46,8, максимальное – 64 (WPMS14), минимальное – 34 (PMGC2852).

По результатам проделанной работы выделен 31 уникальный генотип тополя и осины (из 33 исследованных образцов). Образцы № 20 (Э. с. 38 – гибрид М. М. Вересина) и № 19 (Э. с. 38 – гибрид М. М. Вересина, обработанный мутагеном) не показали между собой различий. Также отличий не обнаружено между образцами №№ 31 и 32.

Для трети исследованных генотипов установлены микросателлиты с уникальным аллелельным составом: локус ORPM127 – для образцов №№ 6 и 23; PMGC433 – № 1; PMGC2852 – № 2; PMGC2163 – №№ 3 и 27; WPMS12 – №№ 10 и 18; локусы

ORPM344 и WPMS5 – для образца № 15; WPMS12 и PMGC433 – № 30; WPMS12 и PMGC2060 – № 21.

Образец № 12 и э. с. 38 (№№ 19, 20) от остальных возможно отличить по набору аллелей в локусах WPMS14 и PMGC433, а между собой – по WPMS5, WPMS12, ORPM127, PMGC2163.

Образцы №№ 14, 25, 26, 29, 31 и 32 выделяются наличием аллеля 290 п. н. в локусе WPMS5, между собой их можно разделить по ORPM127, ORPM344, PMGC2163, PMGC433, PMGC2679, PMGC2571, WPMS14 и WPMS20.

Образец № 4 характеризуется комбинацией ДНК-фрагментов микросателлитов PMGC2852 и WPMS5; № 17 – комбинацией в локусах ORPM127 и WPMS14; № 9 – WPMS5 и ORPM127; № 16 – WPMS5 и ORPM344; № 22 – ORPM127 и PMGC2571; № 33 – WPMS5 и WPMS14; № 13 – ORPM344 и PMGC2571; № 28 – PMGC2163 и PMGC433; №№ 5, 7, 11 – ORPM127 и PMGC2163.

По 12 исследованным SSR-маркерам составлены мультилокусные паспорта генотипов тополя и осины, позволяющие на основе наличия (1) / отсутствия (0) 46 аллелей идентифицировать исследованные образцы.

В результате проведенной работы показана возможность диагностирования индивидуальных генотипов тополя и осины на основе полиморфизма микросателлитных маркеров.

Протестированные 12 SSR-локусов специфичных для тополя и осины (ORPM127, ORPM344, PMGC2060, PMGC2163, PMGC2571, PMGC2679, PMGC2852, PMGC433, WPMS5, WPMS12, WPMS14, WPMS20) рекомендованы для проведения молекулярно-генетической паспортизации и идентификации образцов данных пород. В результате проведенного анализа генотипов тополя и осины все 12-и исследованных микросателлитных маркера отличаются полиморфизмом 100 %.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛАТФОРМЫ ION TORRENT (PGM) ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

**Сыромятников М.Ю., Савинкова А.В., Паневина А.В.,
Попов В.Н.**

***ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,
Воронеж, 394018***

Метод баркодинга ДНК набирает всё большую популярность, как инструмент идентификации таксономической принадлежности организмов. Его суть заключается в амплификации и последующем секвенировании короткого участка ДНК и сравнении полученной нуклеотидной последовательности с уже имеющимися в базах данных. Одной из разновидностей баркодинга ДНК является метабаркодинг, который заключается в возможности параллельного массового секвенирования всех имеющихся последовательностей ДНК организмов разных таксономических групп в одном анализируемом образце. Данные о применении метабаркодинга при идентификации вредителей сельского хозяйства носят ограниченный характер.

Целью данной работы явилось апробация платформы Ion torrent (PGM) для выявления таксономической принадлежности смесей ДНК вредителей сельского хозяйства.

После выделения ДНК из вредителей проводили полимеразную цепную реакцию на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Секвенирование осуществляли на приборе Ion Personal Genome Machine (PGM) System (Thermo Fisher Scientific, США). Для поиска функциональных таксономических единиц использовался алгоритм USEARCH версии 9.1.13.

Основные результаты. Предварительно были получено 80 препаратов ДНК вредителей из различных таксономических групп, собранные нами, и идентифицированные энтомологически. Далее смешивали полученные ДНК. Предварительно нами был проведен скрининг с праймерами, которые бы являлись универсальными и которые были бы способными амплифицировать фрагмент ДНК длиной от 200 п.н. до 400 п.н. Были апробированы следующие праймеры: ZBJ-ArtF1c, ZBJ-ArtR2c, mlCOLintF, mlCOLintR, EPT-long-univR, Uni-MinibarR1, Uni-MinibarF1 [4]. Выявлено, что для праймеров ZBJ-ArtF1c/ZBJ-ArtR2 была наибольшая эффективность

гибридизации –51%, для остальных комбинаций праймеров процент гибридизации был менее 40%. По результатам проведенных метагеномных исследований наблюдался небольшой процент правильной видовой идентификации таксона. Так, в смеси 20 вредителей удалось до вида идентифицировать 4 вида вредителей, до рода ещё 3 вредителя, в смеси 40 вредителей до вида идентифицировано 4 вредителя, как и в предыдущем варианте, до рода идентифицировано 3 вредителя. В смеси 80 вредителей правильно до вида удалось идентифицировать 8 вредителей, до рода 2 вредителя. Таким образом, корректно до вида идентифицировать удалось не более 20% образцов в смеси.

Анализ видового разнообразия вредителей сельского хозяйства с помощью массового секвенирования на платформе Ion torrent (PGM) нуждается в дальнейшем совершенствовании. Необходим поиск новых универсальных праймеров для проведения метабаркодинга с использованием платформы Ion torrent (PGM). Работа поддержана грантом РНФ 16-14-00176.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛЫ СВЁКЛЫ

Федорин Д.Н., Федулова Т.П.

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», п. ВНИИСС
Воронежская обл., 396030***

E-mail: biotechnologiya@mail

Цель работы - выявление полиморфизма SSR-маркеров, характеризующих генетическую изменчивость селекционных материалов свёклы рода *Beta*.

В процессе исследований проводились скрещивания генетически маркированных мужско-стерильных растений сахарной свёклы с растениями кормовой красной и белой свёклы и дикой свёклы *Beta corolliflora* Zoss. Для выявления полиморфизма и генетической структуры родительских форм сахарной, кормовой свёклы и их гибридов использовали 5 SSR-праймеров серии Sb: Sb 04, Sb06, Sb07, Sb09, Sb10 (Richards, 2004).

Анализ результатов ПЦР геномной ДНК образцов свёклы №1015 (PC 1119), 16055 (F₁ PC 1119 х ОП - Кормовая белая) и №1054 (ОП - Кормовая белая) показал, что гибрид №16055 имеет

сходство с родительскими формами в плане наследования ампликонов, обусловленных праймерами Sb04, Sb06, Sb07, Sb09. Данный гибрид имеет характерный признак, свойственный только ему, проявляемый при амплификации с праймерами Sb10 длиной более 3 т.п.н. Появление в гибриде ДНК-ампликона, отличного от родительских форм, может быть вызвано формированием генетического материала при гибридизации путем комбинации родительских ДНК. Гибрид №16054 (F₁ РС 8 х №1054 (ОП-кормовая белая) имеет абсолютное сходство с МС - формой №1009 (РС 8) в плане наследования ДНК-фрагментов. При этом ампликоны, обусловленные праймерами Sb06 и Sb09, имеют такое же проявление и у отцовской формы №1054 ОП-кормовая белая. Гибрид №16054 унаследовал от материнской формы №1009 два ДНК-фрагмента 200 и 300 п.н, обусловленных праймерами Sb04 и Sb07.

В результате амплификации геномной ДНК образцов свёклы F₁ Шериф×Кормовая белая, Шериф и Кормовая белая выявлено, что родительские формы Шериф и Кормовая Белая характеризуются разнородностью продуктов амплификации со всеми используемыми праймерами. По локусам Sb04 и Sb09 выявлен одинаковый продукт амплификации размером 150 п.н. Для отцовской формы - Кормовая белая по микросателлитному локусу Sb07 характерен отличительный вариант ампликона размером 250 п.н., отсутствующий у образца Шериф. Для гибрида Шериф×Кормовая белая характерно отличие в наборе генетического материала от родительских форм, в частности, признак, обусловленный праймерами Sb06, передался ему от родительской формы Шериф. Установлено отсутствие проявления ДНК –фрагментов для праймеров Sb07 и Sb10, что тоже, вероятно, обусловлено передачей от родителя Шериф. Его отсутствие может быть результатом потери части генетического материала при гибридизации. Специфичный фрагмент 250 п.н. образца Кормовая белая по праймеру Sb07 при гибридизации не был передан гибриду.

ПЦР-анализ геномной ДНК гибрида свёклы №1606 (F₁ МС-90-47 Ар х ОП-кормовая красная) и родительских форм №1613(МС-90-47 Ар), 1628 (ОП-кормовая красная) показал, что по локусам Sb04 и Sb06 данные образцы имеют ПЦР-продукт сходной длины 150 п.н., что свидетельствует об однородности родительских форм и передаче его в гибридном поколении. У каждой из родительских форм наблюдается наличие ДНК-последовательности к локусам Sb07, Sb09 и Sb10, сходной для обоих родителей. В

гибриде данные ампликоны отсутствуют, что, вероятно, связано с потерей при передаче генетического материала. Анализ результатов ПЦР показывает частичное сходство генетического материала гибрида и родительских форм. Об этом свидетельствует ПЦР-продукт длиной 150 п.н. для SSR-локусов Sb04 и Sb06. При этом нет четкой корреляции в передаче данной ДНК - последовательности при скрещивании.

Установлено, что в растениях материнской формы №1618 (МС 2113) нет продуктов амплификации ни с одним из используемых праймеров, что может быть использовано как селективный признак для данного номера. На основании результатов амплификации со всеми используемыми в анализе праймерами можно заключить, что гибриду № 1604 (F1 МС2113 х *Beta corolliflora* Zoss.) не передались фрагменты ДНК от отцовской формы *B. corolliflora* Zoss., обусловленные наличием последовательностей к праймеру Sb04, специфичного для *B. corolliflora* Zoss. Отсутствие ампликонов с праймерами Sb04 и Sb07 может быть результатом наследования от материнской формы.

Родительские формы №1613 (МС-90-47-Ар) и *B. corolliflora* Zoss. характеризуются разнородностью продуктов амплификации со всем используемыми праймерами. Праймер Sb04 формирует одинаковый продукт амплификации размеров 150 п.н., однако, для праймера Sb07 образца №1613 характерен отличительный вариант ампликона размером 250 п.н. Для гибрида №1607 (F1 МС-90-47-Ар х *B. corolliflora* Zoss.) характерно отличие в наборе генетического материала от родительских форм, в частности, ДНК-фрагменты, обусловленные праймерами Sb04, Sb06 и Sb10, передаются в полной мере от материнского родителя. ДНК-ампликон для праймера Sb09 передался гибриду от отцовской формы *B. corolliflora* Zoss. Отличительной особенностью гибрида №1607 является несходный ни с одним из родителей признак, обусловленный праймером Sb07. В данном случае ампликон имеет размер 150 п.н., тогда как у обеих родительских форм размер составляет 250 п.н. На основании результатов амплификации со всеми используемыми в анализе праймерами можно заключить, что гибриду передались фрагменты ДНК от родительской формы *B. corolliflora* Zoss., обусловленные наличием последовательностей к праймерам Sb09. Гибрид и родительская форма *B. corolliflora* Zoss. имеют определенный уровень гомологии, связанный с отсутствием ампликонов, обусловленных праймером Sb09.

В результате ПЦР-анализа 20-ти селекционных номеров свёклы выявлено, что наименьшей полиморфностью обладает праймер Sb 06. При амплификации геномной ДНК всех исследуемых материалов свёклы был получен только один ПЦР-продукт длиной около 150 п.н. Следовательно, данный праймер не может быть использован в селекции для идентификации образцов свёклы. Праймер Sb10 показал наибольшую полиморфность, поскольку в разных образцах ДНК он имел продукт разной длины. В частности, он является специфичным при определении гибрида №16055, поскольку с его ДНК образуется уникальный ампликон длиной более 3000 п.н, что является селективным признаком для данного образца свёклы. Праймеры Sb06, Sb07, Sb09 имеют разную степень полиморфности в разных образцах ДНК свеклы, при этом не обнаруживается какой-либо определенной зависимости, как селективного признака, для всех исследуемых образцов. Вместе с тем, данные исследования требуют своего продолжения в плане увеличения количества используемых SSR-локусов и проведения фрагментного анализа ДНК.

В результате экспериментальных исследований установлена генетическая изменчивость селекционных материалов сахарной, кормовой свёклы, дикой свёклы *Beta corolliflora* Zoss. и гибридов с их участием, характеризующаяся полиморфизмом по 5-ти SSR-маркерам. По данным ПЦР-анализа рассчитаны генетические расстояния между изученными селекционными образцами и проведена их кластеризация. Селекционные материалы, находящиеся на большом генетическом расстоянии друг от друга, рекомендованы для гибридизации при создании высокопродуктивных гибридов свёклы.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИИ ЦВС-2 МЕТОДОМ ПЦР

Кудин. К.В., Кудина И.В., Прокулевич В.А.

*Белорусский государственный университет, биологический
факультет, НИЛ биотехнологии, Республика Беларусь, г.*

Минск, пр. Независимости 4, 220030

E-mail: kiryl.kudin@gmail.com

Цирковирус свиней типа 2 (ЦВС-2) является самым маленьким известным ДНК-вирусом млекопитающих. Его геном представлен одноцепочечной ковалентно замкнутой ДНК размером 1768-1769 нуклеотидов. ЦВС-2 является первичным возбудителем

группы системных заболеваний, совокупно обозначаемых в научной литературе как цирковиральные болезни свиней, и считается одним из наиболее экономически значимых свиных патогенов. Это обуславливает актуальность разработки диагностических и профилактических средств контроля эпизоотий ЦВС-2. Ранее при выполнении исследовательской работы по клонированию открытой рамки считывания, кодирующей белок капсида штамма ЦВС-2 дикого типа (Кудин К.В., Прокулевич В.А. Клонирование гена белка капсида белорусского штамма цирковируса свиней 2 типа // Вестник БГУ, сер. 2. – 2011. – № 2. – С. 37–41), был разработан метод «гнездовой» ПЦР для амплификации фрагмента генома вируса. В настоящее время возникла необходимость пересмотра способа применения данного метода в направлении лабораторной диагностики в связи с потребностью в скрининге инфекции ЦВС-2 в поголовье свиноводческих хозяйств и генотипировании вируса.

Целью настоящей работы являлась оптимизация разработанного ранее метода ПЦР для рутинной диагностики инфекций ЦВС-2 у свиней.

Для применения в диагностических целях была использована «внешняя» пара праймеров «гнездовой» ПЦР, обозначаемых условно PCV-F и PCV-R. Праймеры были подобраны на основании консервативных участков консенсусного генома, построенного в результате выравнивания геномов 685 штаммов ЦВС-2 из базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank и позволяет амплифицировать фрагмент генома ЦВС-2 размером ~980 п.о., включающий открытую рамку считывания, кодирующую белок капсида. Благодаря этому получаемый ампликон позволяет генотипировать штаммы ЦВС-2 путем секвенирования ОРС гена белка капсида без использования дополнительных праймеров. При конструировании специфичность праймеров была проверена с помощью программного онлайн-инструмента Primer-BLAST по отношению к геному свиньи (*Sus scrofa*, taxid 9823, non-redundant) при максимальных требованиях к строгости параметров: в качестве вариантов неспецифического отжига рассматривались мишени, имеющие 6 и более некомплементарных оснований в пределах 6 последних 3'-концевых нуклеотидов праймеров при размере ампликона до 4000 п.о. включительно; игнорировались мишени, имеющие 9 и более некомплементарных оснований. Анализ выявил 9 вариантов неспецифического отжига праймеров, потенциально приводящих к образованию побочных продуктов, однако все они

превосходили целевой ампликон по размеру, и каждый сайт посадки содержал минимум 6 некомплемментарных оснований.

Для упрощения процедуры проведения диагностического теста все компоненты реакции смешивались в виде готового двукратного (2X) концентрата. В связи с этим стандартная Taq ДНК-полимераза была заменена на Maxima Hot Start Taq ДНК-полимеразу (Thermo Fisher Scientific Inc.) и использовалась в концентрации, рекомендованной производителем. Концентрация нуклеотидов осталась прежней (0,2 мМ), а концентрация праймеров в однократном растворе была уменьшена с 0,5 до 0,2 мМ, поскольку их избыток никак не влиял на выход продукта. Далее была предусмотрена возможность непосредственной загрузки реакционной смеси в агарозный гель по окончании реакции для проведения электрофоретического анализа. Для этого в качестве уплотнителя в концентрат был добавлен глицерин, который дополнительно выступал стабилизирующим агентом с криопротекторными свойствами для полимеразы. Из диапазона исследованных концентраций глицерина 1-10 % (по объему) была выбрана концентрация 5 %, поскольку она не влияла критически на температуру отжига праймеров и при этом сообщала реакционной смеси достаточную плотность для удобной загрузки в агарозный гель. Далее была проверена совместимость ряда потенциальных электрофоретических красителей (ксиленоловый синий, тартразин, крезоловый красный и Orange G) с исследуемым ПЦР анализом. Концентрацию красителей подбирали исходя из их способности визуализировать процесс разделения продуктов ПЦР в агарозном геле при электрофорезе ДНК. Наименьший ингибирующий эффект в наибольшем диапазоне концентраций показали крезоловый красный и тартразин при оптимальных концентрациях 0,02 и 0,2 г/л соответственно. Поскольку в лабораторных условиях не наблюдалось неспецифических продуктов при амплификации тотальной ДНК, выделенной из образцов тканей лимфатических узлов инфицированных поросят, концентрацию хлорида магния повысили с 1,6 до 2 мМ на случай загрязнения матрицы ингибиторами ПЦР, поскольку валидация методики выделения ДНК для данного ПЦР анализа не производилась. В результате произведенных изменений в составе реакционной смеси оптимальная температура отжига повысилась на 5 °С и составила 61 °С. Готовый концентрат выдерживал до 5 циклов замораживания-оттаивания без заметного влияния на эффективность реакции.

Первичные испытания тест-система проходила в сертифицированной диагностической лаборатории отдела эпизоотологического и иммунологического мониторинга РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» (г. Минск, Республика Беларусь) на основе высевов из патологического материала и в сравнении в аналогичными импортными коммерческими наборами. Испытания показали пригодность ПЦР-анализа для выявления ЦВС-2 в патологическом материале. В дальнейшем предполагается проверить возможность амплификации фрагмента генома ЦВС-2 в образцах крови и сыворотки инфицированных животных, а также провести оценку специфичности и чувствительности разработанного метода анализа.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С ГЕНОМ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА БОМБИНИНА

**Фурс О.В., Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Шевчук Т.В.,
Дьяченко О.В., Бурьянов Я.И.**

*Филиал Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биоорганической химии им.
академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской
академии наук, Пущино, 142290*

E-mail: olya.furs.86@mail.ru

Антимикробные пептиды (АМП) проявляют высокую антимикробную активность и входят в состав врожденной иммунной системы всех эукариотических организмов. Экспрессия в растениях генов гетерологичных АМП перспективна для повышения устойчивости растений к фитопатогенам и для использования растений в качестве «биофабрик» АМП. Антимикробные пептиды, рассматривают как эффективную альтернативу классическим антибиотикам, поскольку микроорганизмы не обладают специфическими механизмами устойчивости против АМП. Методы генетической инженерии позволяют синтезировать в клетках растений гетерологичные белки, в том числе терапевтического назначения. Себестоимость АМП, выделенных из трансгенных растений, в 20-30 раз ниже по сравнению с другими методами их получения (твердофазный синтез, получение из других источников). Как продуценты

фармакологической субстанции, растения более безопасны, так как они свободны от патогенных вирусов человека и животных.

Антимикобный пептид бомбинин, выделенный из кожи лягушки *Bombina variegata*, относится к группе линейных α-спиральных пептидов, не содержащих остатки цистеина. Ген бомбинина кодирует 27-членную аминокислотную последовательность и обладает специфической активностью против грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *S. Similans*, *S. epidermis*, *S. saprophyticus*, *S. gemolyticus*, *S. hominis*, *S. cohnii*) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas spp.*, *Alcaligenes denitrificans*).

Целью данной работы было получение и анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих ген антимикробного пептида бомбинина.

Получены и исследованы трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорт Самсун поколения T₁c искусственным геном антимикробного пептида бомбинина (*bom*). Присутствие гена *bom* в геноме канамицин-устойчивых растений подтверждено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этого были использованы праймеры для гена *bom*:

1) 5'-CGGGATCCATGGGCATTGGC-3'

и

2) 5'-CGAGATTTTAGTTGGCAAAATGTTCCGG-3'.

Экспрессия гена *bom* подтверждена определением антимикробной активности растительных экстрактов. Биотесты на антибактериальную активность проводили методом диффузии в агар по определению ингибирующего влияния белковых экстрактов на рост клеток фитопатогенных бактерий *E. carotovora*.

Устойчивость растений к стрессовым воздействиям зависит от многокомпонентной антиокислительной системы, которая поддерживает уровень образовавшихся в клетках активных форм кислорода на уровне, оптимальном для их жизнедеятельности. Известно, что одной из первых защитных реакций клетки в ответ на микробную инфекцию является быстрое накопление активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-анион, гидроксильный радикал и пероксид водорода, которые снижают жизнеспособность фитопатогенов, приводя к окислительному повреждению их белков, нуклеиновых кислот и липидов.

В условиях биотического стресса, вызванного заражением *E. carotovora*, проводилось определение активности супероксиддисмутазы (СОД), уровня перекисного окисления

липидов (ПОЛ) и содержания пролина в клетках трансгенных и нетрансгенных растений. Активность СОД в стрессовых условиях заражения патогеном *E. carotovora* повышалась как в трансгенных, так и в нетрансгенных (контрольных) растений. Однако в листьях контрольных зараженных растений активность фермента возрастала в 5 раз, а у трансгенных зараженных растений лишь в 1,3 - 2,2 раза. Отмечено незначительное различие в повышении уровня перекисного окисления липидов между контрольными и трансгенными растениями. Определяли содержание пролина в трансгенных и контрольных растениях. Обнаружено значительное повышение уровня пролина – в 2 раза в листьях растений при воздействии патогена. Однако в листьях трансгенных растений содержание пролина колебалось в пределах дострессового уровня. Относительно низкое повышение активности СОД и содержания пролина у инфицированных трансгенных растений по сравнению с зараженными нетрансформированными растениями можно объяснить защитным действием бомбинина, инактивирующим патогены.

Экспрессия трансгена *bom* в растениях придавала повышенную устойчивость растений к фитопатогенам *Erwinia carotovora* и *Rhizoctonia solani*. Трансгенные растения, экспрессирующие ген антимикробного пептида бомбинина, перспективны для использования в сельскохозяйственной биотехнологии защиты растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-04-00623 и № 15-08-02050

ДНК-МАРКЕРЫ ГЕНА VF УСТОЙЧИВОСТИ ЯБЛОНИ (*MALUS MILL.*) К ПАРШЕ (*VENTURIA INAEQUALIS* (SKE.) WINT)

Должикова М.А., Пикунова А.В., Седов Е.Н.

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт селекции
плодовых культур (ФГБНУ ВНИИСПК),**

Орел 302000

**E-mail: dolzhikova.mari94@mail.ru, pikuanna84@mail.ru,
us@vniispk.ru**

Парша (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint) - одно из самых вредоносных заболеваний яблони (*Malus Mill.*). Снижение урожая

яблок в средней полосе России от поражения паршой составляет не менее 40 %, а в отдельные годы достигает 70-80 %. Возбудитель парши яблони – сумчатый гриб *Venturiainaequalis* (подкласс аскококулярные, порядок *Pleosporales*) с конидиальной стадией *Fusicladiumdendriticum* (Wallr.) Fuck., относящийся к классу *Deuteromycetes*, порядку *Hyphomycetales*. В настоящее время разработаны различные методы детекции генотипов с генами устойчивости на ранних этапах онтогенеза растения путем анализа полиморфизма ДНК.

Долгие годы во Всероссийском Научно-Исследовательском институте Селекции Плодовых Культур (ВНИИСПК) ведется селекция яблони на устойчивость к парше (*Venturia inaequalis*). Выведено свыше 30 иммунных сортов с геном *Vf*, а также сорта с геном *Vm*. В настоящее время ген *Vf* один из самых значимых и востребованных генов в селекции яблони на устойчивость к парше. Поэтому данный ген детально изучается с помощью молекулярно-генетических методов. Ген *Vf* был клонирован, и на данный момент разработан целый ряд ДНК маркеров, различных типов для его детекции. Для детекции наличия гена (независимо от гомо- или гетерозиготности) достаточно данных доминантного ДНК-маркера. Выявление гомозиготных доноров гена *Vf* способствует повышению эффективности селекции на устойчивость яблони к парше, поскольку использование доноров для скрещивания теоретически позволит получать в потомстве 100 % гибридов с геном *Vf*.

Мы использовали последовательности праймеров и ПЦР условия, описанные ранее для *VfC* основанного метода у Afunian et al. (2004), для детекции локуса *Hi07h02* у Patocchi et al. (2005), для детекции локуса *Ch-Vf1* у Vinatzer et al. (2004) с небольшими изменениями. В нашей работе всего 738 гибридных сеянцев из 22 гибридных семей гибридного фонда ВНИИСПК были протестированы на наличие ДНК-маркеров гена *Vf*. В семьях полученных от скрещивания гетерозиготных по гену *Vf* родителей (Кандиль Орловский (*Vfvf*) х Свежесть (*Vfvf*); Старт (*Vfvf*) х Свежесть (*Vfvf*); Имрус (*Vfvf*) х Приокское (*Vfvf*)) обнаружено тридцать взрослых плодоносящих гибридов гомозиготных о аллелю локуса *Ch-Vf1* сцепленному с геном *Vf*. Несколько гибридов обладают приемлемым вкусом плодов и могут быть вовлечены в дальнейшие селекционные скрещивания. В наших исследованиях впервые в России мы использовали анализ полиморфизма микросателлитного локуса *Ch-Vf1* для выявления гомозиготных

форм гена *Vf* в семьях, полученных от скрещивания гетерозиготных по гену *Vf* родителей (рис).

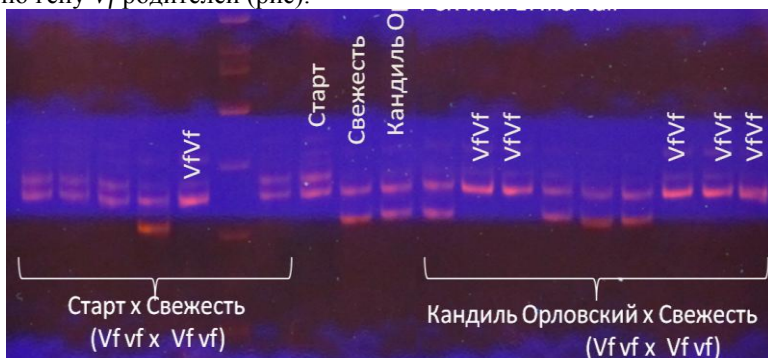


Рисунок.. Выявление гомозиготных по гену *Vf* генотипов. Электрофореграмма продуктов амплификации микросателлитного локуса *Ch-Vf1* у гибридов семей Старт х Свежесть и Кандиль Орловский х Свежесть, 10% ПААГ, ПЦР с 17 мерным дополнительным праймером.

Методы маркер-вспомогательной селекции будут способствовать повышению эффективности селекционных исследований. Маркер-вспомогательный отбор генотипов яблони на устойчивость к парше способствует быстрому выявлению как диплоидных генотипов с геном *Vf*, так и триплоидных генотипов с геном *Vf*, а также триплоидных и диплоидных колонновидных генотипов с геном *Vf*.

ИЗУЧЕНИЕ ИССОПА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*HYSSOPUS OFFICINALIS* L.) В КУЛЬТУРЕ *IN* *VITRO*

Кучина Т.Г., Лебедев И.К., Калашникова Е.А.

Российский государственный аграрный университет – МСХА
имени К.А. Тимирязева, факультет агрономии и биотехнологии,
Москва 127550

E-mail: Kuchina_t.g@mail.ru

Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) – многолетнее эфиромасличное пряно-лекарственное растение семейства *Lamiaceae*. В естественных условиях произрастает в Европе, Северной Африке, в верхнем и нижнем течении Днепра, на Дону, в Причерноморье, в Крыму, на Кавказе, в Средней Азии и на Алтае.

В настоящее время введен в культуру также в Северной Америке и европейской части России.

Иссоп содержит эфирное масло, которое используют в медицине, косметологии, парфюмерии. Также его масло широко используется для пищевых добавок и напитков (Murakami et al., 1998). Согласно литературным данным, иссоп лекарственный обладает отхаркивающим, спазмолитическим, противоотечным, тонизирующим действием, а некоторые его разновидности проявляют сильное противовирусное действие, особенно против вируса герпеса (Franchomme et al., 1990). Эфирное масло иссопа, полученное из растений разных географических и климатических условий, отличается по химическому составу. В связи с перечисленными выше свойствами, данная культура все большее привлекает внимание ученых по изучению вторичных метаболитов в культуре *in vitro*. На данный момент имеются некоторые данные по изучению влияния условий культивирования на клональное микроразмножение иссопа лекарственного, однако приведенные в литературе данные малочисленны, а представленные методики плоховоспроизводимы. В связи с этим, детальное изучение иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) в культуре *in vitro* остается актуальной задачей.

Объектом исследований служили семена иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) разных генотипов, полученных из Германии, Бельгии, Чехии и России. Для получения стерильной культуры семена стерилизовали раствором сулемы 0,1%-ной концентрации в течение 7 минут, после чего их промывали стерильной дистиллированной водой дважды. Стерильные семена культивировали на безгормональной питательной среде МС с целью получения стерильных проростков, которые в дальнейшем делили на сегменты (листья, междоузлия, сегмент гипокотилия, сегменты узлов с пазушной почкой) для изучения процессов каллусогенеза и морфогенеза. Изолированные экспланты культивировали на питательной среде МС, содержащей различные регуляторы роста. В качестве цитокининов изучили влияние БАП или кинетина в концентрациях 0,5 - 2 мг/л (ИУК во всех вариантах 0,5 мг/л) для морфогенеза, а в качестве ауксинов - 2,4-Д в концентрации 0,5 - 2 мг/л (БАП во всех вариантах 0,5 мг/л) для каллусогенеза.

В результате проведенных исследований установлено, что присутствие в составе питательной среды кинетина в концентрации 0,5 и 2 мг/л приводило к образованию хорошо растущих,

способных к укоренению микрорастений, в то время как в остальных вариантах этот эффект нами не был отмечен. Для всех исследуемых генотипов были отмечены закономерности, что применение БАП приводило к формированию аномальных по морфологии побегов вне зависимости от концентрации гормона.

Что касается каллусогенеза, то хорошей пролиферативной способностью обладал каллус, полученный на среде, содержащей 2 мг/л 2,4-Д. В вариантах с 0,5 мг/л 2,4-Д наблюдали формирование каллусной ткани слабой интенсивности, но с высоким морфогенетическим потенциалом – образование адвентивных почек. В варианте с 1 мг/л каллус формировался средней интенсивности и с единичными признаками морфогенеза.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ -А И –Г ОВЕЦ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ *E. COLI*

**Острикова К.В., Потапович М.И., Прокулевич В.А.
Белорусский Государственный Университет, НИЛ
биотехнологии кафедры микробиологии биологического
факультета, Республика Беларусь, Минск-220030
E-mail: kristiost@mail.ru**

Овцеводство – отрасль мирового продуктивного животноводства, с помощью которой получают сырьё для легкой промышленности и пищевые продукты. По численности сельскохозяйственных животных в мире овцы находятся на третьем месте после птицы и крупного рогатого скота.

Несмотря на регулярно проводимые противоэпизоотические мероприятия, количество новых инфекционных болезней животных в мире постоянно растет. К вирусным заболеваниям овец, которое наносят большой экономический ущерб относятся анаплазмоз, чума мелкого рогатого скота, ящур, браздот, инфекционный мастит.

Эффективных противовирусных препаратов для лечения животных не существует, по сравнению с заболеваниями бактериальной этиологии, для лечения которых используются антибиотики. В этом плане большие надежды связаны с препаратами на основе рекомбинантных интерферонов.

Интерфероны представляют собой гликопротеиды, вырабатываемые клетками человека и животных на вирусную

инфекцию. Также они обладают высокой видоспецифичностью и участвуют в регуляции роста клеток и в иммунном ответе.

Биопрепараты на основе рекомбинантных белков безопасны, а их производство является экономически выгодным. Для создания противовирусного биопрепарата для овец на основе рекомбинантных интерферонов наиболее эффективным будет использование смеси овечьего интерферона- α , обладающего антивирусной активностью и овечьего интерферона- γ , который является регулятором иммунного ответа.

На первом этапе работы триплетные составы структурных участков генов интерферона- α и - γ были оптимизированы для эффективной трансляции в клетках бактерий *E. coli*. Оптимизированные последовательности были синтезированы и клонированы в экспрессионный вектор pET24b. Полученными рекомбинантными плазмидами pET24b-sheep-ИФН- α и pET24b-sheep-ИФН- γ был трансформирован штамм бактерий *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Клоны, в которых наличие целевых последовательностей было подтверждено ПЦР и рестрикционным анализом исследовались на способность экспрессировать рекомбинантные гены. Для этого клетки бактерий *E. coli* BL21 sheep-ИФН- α (продуцент ИФН- α) и *E. coli* BL21 sheep-ИФН- γ (продуцент ИФН- γ) выращивались в присутствии индуктора экспрессии рекомбинантных генов – ИПТГ (изопропил- β -D-тиогалактопиранозид), те же клетки, выращенные без индуктора служили контролем. После индукции суммарные клеточные белки данных бактерий исследовались в 16 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В результате наблюдалось накопление белков по молекулярной массе равные 18,8 кДа и 17,4 кДа, что соответствует овечьим интерферонам - α и - γ . В контроле белки с такой молекулярной массой отсутствовали. Таким образом, получены высокоэффективные штаммы-продуцента овечьего интерферона- α и - γ продуцирующие путем добавления в среду индуктора ИПТГ по данным денситометрического анализа целевые белки до 40% и до 35% от общего количества белка клетки, соответственно.

АНАЛИЗ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *ESCSDP3* В ПРОЦЕССЕ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЯ

Шамустакимова А.О.

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

Домен холодового шока (CSD) – это широко распространённый среди бактерий, животных и растений РНК/ДНК связывающий домен. Отличительной особенностью белков с доменом холодового шока высших растений (CSDPs) от бактериальных (Csps), является наличие С-концевой части, представленной протяженным глицин-богатым участком и несколькими мотивами цинковых пальцев ретровирусного типа CCHC. На настоящий момент ряд исследований указывает на вовлечённость таких белков в процессы адаптации к абиотическому стрессу, участие в росте и развитии растения [1,2].

Целью настоящей работы было установление тканеспецифичности экспрессии гена одного из белков CSDP (*CSDP3*) растения-экстремофита *Eutrema salsugineum*, способного выживать в условиях засухи, солевого и холодового стресса [3].

Для этого в базе данных (GenBank) была идентифицирована нуклеотидная последовательность, соответствующая промоторной области гена *EsCSDP3* (3250 п.н.). Далее на основе плазмиды pCAMBIA1381Z была создана генетическая конструкция, содержащая репортерный ген *gusA* под контролем промотора гена *EsCSDP3*. В качестве объекта исследования было выбрано модельное растение *Arabidopsis thaliana*. Методом агробактериальной трансформации получали трансгенные растения. Первое поколение оценивали отбором на среде с селективным фактором гигромицином. Для оценки тканеспецифичности, брали семенное потомство второго поколения. Интенсивность экспрессии гена *EsCSDP3* оценивали путём гистохимического окрашивания продукта расщепления субстрата *gusA* в отобранных эксплантах на разных стадиях развития растений [4].

Было установлено, что в молодых 4-х дневных проростках экспрессия *gusA* детектировалась в жилках листа, устьицах, проводящей зоне корня (но отсутствовала в латеральных корнях). В

листьях 8-ми недельных растений экспрессия гена в устьицах сохранялась, но также была замечена в трихомах по всей поверхности листа.

Анализ бутонов на разных стадиях развития цветка показал, что ген экспрессируется в пыльцевых зёрнах на всех этапах развития мужского гаметофита (пыльцы). Наиболее сильная экспрессия наблюдалась в нераскрытых бутонах - на ранних стадиях формирования пыльцы. Далее она снижалась в ходе прорастания мужского гаметофита на рыльце пестика. В лепестках экспрессии *gusA* не наблюдали. Экспрессия этого гена также была замечена в месте отсоединения стручка.

- Исходя из полученных результатов, можно предположить, что активность промотора гена *EsCSDP3* в трихомах, по-видимому, указывает на участие белка *EsCSDP3* в защитных реакциях;
- в устьицах – о вовлечённости белка *EsCSDP3* в процессы адаптации к стрессам через регуляцию закрытия и открытия устьичного аппарата;
- в пыльце - на всех стадиях развития цветка, вплоть до выхода пыльцы из и пыльника и попадания на рыльце пестика – на роль белка в развитии мужского гаметофита;
- в проводящем пучке листьев и центральном цилиндре корня указывает на участие белка в транспорте веществ от корня к стеблю.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ - №14-04-00816

Литература

1. Kim J. S. et al. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli* //Nucleic Acids Research. – 2007. – Т. 35. – №. 2. – С. 506-516.
2. Chaikam V., Karlson D. Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa* //Plant, cell & environment. – 2008. – Т. 31. – №. 7. – С. 995-1006.
3. Inan G. et al. Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles //Plant physiology. – 2004. – Т. 135. – №. 3. – С. 1718-1737.
4. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion

АНАЛИЗ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ ДНК ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО МАРКИРОВАНИЯ

Александров О.С., Киров И.В.

***Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА
им. К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии,
127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49
E-mail: olegsandrov@gmail.com***

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L.) широко распространён в умеренном поясе и представляет собой многолетнюю двудомную вьющуюся лиану с одним или несколькими однолетними побегами. Его возделывают как ценную сельскохозяйственную культуру, дающую сырьё для пивоваренной, пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Хмель обыкновенный характеризуется одинаковым числом хромосом у мужских и женских экземпляров $2n=20$, однако мужские растения имеют XY половые хромосомы, а женские – XX. Благодаря ряду цитогенетических работ последних нескольких лет хмель стал одним из модельных объектов изучения половых хромосом у растений.

Большое хозяйственное значение хмеля и высокий фундаментальный интерес послужили тому, что с помощью рестрикционного анализа геномной ДНК был найден субтеломерный повтор хмеля HSR1, а потом и весь его геном был секвенирован. В настоящей работе массив данных полногеномного секвенирования был использован для поиска и изучения tandemных повторов хмеля (использованный для выделения HSR1 способ не применялся, так как он является весьма трудоёмким). С помощью программы Tandem Repeat Finder и специально созданного для сепарации высококопийных тандемов скрипта в геноме хмеля было выделено 197 повторов. BLAST анализ показал, что многие из них гомологичны друг другу на определённых участках. После исключения повторов, мономеры которых практически полностью соответствуют друг другу, но начинаются с разных точек, осталось 33 повтора. Длина мономеров оставшихся повторов варьировала в

пределах 50-380 п.о. На мономеры 10 из данных повторов с помощью программы Primer 3 были подобраны праймеры. Амплификация наблюдалась для каждой из 10 пар праймеров, однако только в случае с повторами HL-62, HL-117, HL-136, HL-174, HL-181 и HL-254 были выявлены лесницеобразные картины электрофоретических профилей, характерные для успешной амплификации tandemных повторов. С помощью тех же пар праймеров и набора для мечения DIG PCR Labeling Mix на каждый успешно амплифицированный повтор был синтезирован зонд.

В ходе FISH экспериментов было установлено, что 5 из изучаемых повторов не дают флуоресцентных сигналов на хромосомах хмеля. Это может быть связано с тем, что они хоть и являются высококопийными в геноме, однако могут быть распределены небольшими кластерами, длина которых меньше порога чувствительности FISH (для выявления таких кластеров нужно использовать более чувствительные модификации FISH, такие, как, например, Tyramide-FISH). Отчётливые FISH-сигналы на хромосомах хмеля были получены только в варианте опыта с повтором HL-117. Анализ метафазных пластинок показал, что данный повтор встречается только в прицентромерной области короткого плеча одной пары хромосом (предположительно, хромосома 1).

Таким образом, был получен цитогенетический хромосомспецифичный маркер, который может быть использован при сборке генома и построении физической карты хромосом хмеля обыкновенного.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ, Договор № 14.W01.17.121-МК от 22 февраля 2017 г.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА СИНДРОМА ЛАВАНДОВЫХ ЖЕРЕБЯТ

Калинкова Л.В., Шемарыкин А.Е.
ФГБНУ «ВНИИ коневодства», Дивово
E-mail: labgenetics79@gmail.com

Синдром лавандовых жеребят является наследственным летальным неврологическим расстройством, встречающимся у лошадей арабской породы. Клинические признаки синдрома

впервые были описаны A.Bowling в 1996 году [1]. Одним из характерных признаков расстройства является рождение жеребят с необычным осветлением пигментации покровных волос, в результате чего масть может выглядеть как «серо-розовая» или «бледно-лавандовая». Подверженные заболеванию новорожденные жеребята не способны встать и самостоятельно сосать молоко матери, несмотря на наличие ярко выраженного сосательного рефлекса. При этом они страдают от периодических тяжелых приступов тетании. Заболевание не поддается лечению и заканчивается гибелью жеребят в течение нескольких дней после рождения [1, 2, 3, 6].

Установлено, что синдром лавандовых жеребят наследуется по аутосомно-рецессивному типу, заболевание проявляется только у рецессивных гомозигот [1]. В 2010 году при анализе генома жеребят с клиническими признаками лавандового синдрома была обнаружена мутация гена MYO5A, локализованного в хромосоме 1 [2, 3]. Белок миозин Va, кодируемый данным геном, содержится в нейронах и меланоцитах и играет важную роль в осуществлении процессов внутриклеточного транспорта. Мутация, обнаруженная у лавандовых жеребят, представляет собой однонуклеотидную делецию, нарушающую структуру белка и нормальное функционирование нервных клеток и меланоцитов.

На основе открытия мутации гена MYO5A у лавандовых жеребят были разработаны ДНК-тесты, позволяющие выявлять гетерозиготных носителей наследственного дефекта и уточнять диагноз у жеребят с клиническими признаками заболевания [2, 3]. Установлено, что частота встречаемости дефектной мутации в европейской популяции чистокровных арабских лошадей составляет 1,62 % [4].

Изучение генетических дефектов, вызывающих определенные наследственные заболевания сельскохозяйственных животных, приобретает все большее значение. К настоящему времени у домашней лошади (*Equus caballus*) описано более двухсот наследственных факторов, большинство из которых ассоциированы с различными дефектами и заболеваниями [5]. Многие нежелательные мутации встречаются среди лошадей определенных пород [6]. Наибольшее количество генетических дефектов зарегистрировано в таких породах, как чистокровная верховая, четвертьмильная, чистокровная арабская и среди миниатюрных лошадей [7]. Принятый в коннозаводстве метод разведения по линиям с применением многочисленных

инбридингов на выдающихся родоначальников и широкое использование отдельных доминирующих в породе производителей может привести к неконтролируемому накоплению мутаций. Селекционные программы должны быть ориентированы на предотвращение распространения в современных породах лошадей нежелательных мутаций.

Генетическое тестирование позволяет обнаруживать в популяциях животных, являющихся скрытыми носителями рецессивного дефекта. При невысокой племенной ценности животных-носителей выбраковывают из производящего состава породы. В случае исключительной племенной ценности таких животных допускается их ограниченное использование, но при этом в подборках необходимо учитывать генотип родительских пар, чтобы предотвратить рождение нежизнеспособных рецессивных гомозигот. Как отмечает Nicholas, F.W., вне зависимости от частоты встречаемости нежелательной рецессивной мутации в конкретной популяции, благодаря правильным подборам вероятность рождения животных с выраженными клиническими признаками дефекта или заболевания можно свести к нулю [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Bowling, A.T. Horse genetics / Bowling A.T. – CABI, 1996. – 224 p.
2. Whole-Genome SNP Association in the Horse: Identification of a Deletion in Myosin Va Responsible for Lavender Foal Syndrome / Brooks, S.A., Gabreski, N., Miller, D., Brisbin, A., Brown, H.E., et al. // PLoS Genetics. – 2010. – Vol. 6(4): e1000909. doi: 10.1371/journal.pgen.1000909
3. Bierman, A. Lavender foal syndrome in Arabian horses is caused by a single-base deletion in the MYO5A gene / Bierman, A., Guthrie, A.J., Harper, C.K. // Animal Genetics. – 2010. – Vol. 41 (Suppl.2). – P. 199-201.
4. Gabreski, N.A. Investigation of allele frequencies for Lavender foal syndrome in the horse / Gabreski, N.A., Haase, B., Armstrong, C.D., Distl, O., Brooks, S.A. // Animal Genetics. – 2012. – Vol. 43. – P. 650.
5. <http://omia.angis.org.au/home>
6. Bailey, E.F. Horse genetics / Bailey, E.F., Brooks, S.A. – CABI, 2013. – 272 p.
7. Bettley, C.D. A review of scientific literature on inherited disorders in domestic horse breeds / Bettley, C.D., Cardwell,

- J.M., Collins, L.M., Asher, L. // Animal Welfare. – 2012. – Vol. 21. – P. 59-64.
8. Nicholas, F.W. Introduction to veterinary genetics / Nicholas, F.W. – Blackwell Publishing, 2003. – 282 p.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ МЕЗОФИЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ЛИСТА КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM*)

Куприна К.А., Князев А.Н.

*Российский Государственный Аграрный Университет - МСХА
имени К.А. Тимирязева, Москва 127550*

E-mail: kka.kuprina@gmail.com

Агробактериальная трансформация использовалась на протяжении более трех десятилетий. Тем не менее, практикуемые подходы остаются неэффективными для многих культур. Основные сложные моменты: 1) долгий период, требуемый для восстановления трансгенных растений, созданных путем генной инженерии из клеток и тканей; 2) низкая частота стабильной трансформации; 3) малое количество ДНК, доставляемое путем переноса чужеродной вставки агробактерией, что недостаточно для гомологичной рекомбинации. Каждая задача представляет собой научно-технические проблемы, которые, если решатся, то значительно сократят затраты времени и труда в генной инженерии и растениеводстве [2].

Часто клетки, которые легко трансформируются, не могут дать регенерацию, и наоборот. Внедрение одноклеточных технологий было бы полезно для высокоэффективного отбора. Протопласты уже давно используются в качестве инструмента в молекулярной биологии растений. В последнее время разрабатываются методы трансформации и редактирования генома на основе растительных протопластов [3].

Сегодня различные технологии получения из растений фармацевтических белков, таких, как антитела, вакцины, гормоны, регуляторы роста и др., находятся на стадии коммерческих разработок. Это перспективное направление лежит в области молекулярного сельского хозяйства, в котором необходимые человеку терапевтические белки будут синтезироваться растительными клетками. Такие технологии могут быть осуществлены только с применением протопластов, ферментные

методы выделения которых смогут обеспечить требуемые их объемы [1].

Целью данной работы является разработка эффективной методики получения изолированных протопластов из листьев картофеля (*Solanum tuberosum*). Изучена возможность применения ферментных препаратов целлюлазы и пектиназы для выделения протопластов из листьев пробирочных растений. Экспериментально подбирались концентрации ферментов.

Растительный материал помещали в растворы маннитола (в концентрации 8%, 8,5% и 9%), содержащие ферменты целлюлазу и пектиназу (0,02-0,04 г каждого на 5 мл раствора). Инкубировали при 100 об/мин и 37 °С. Степень мацерации оценивали визуально. Выход жизнеспособных протопластов зависит не только от применяемых концентраций раствора маннитола и ферментов, но и от сорта картофеля, возраста пробирочных растений.

В дальнейшем планируется провести агробактериальную трансформацию и оценить эффективность выхода трансформантов.

Библиографический список:

1. Михайлова Р.В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии / Р.В. Михайлова. – Минск: Белорус. наука, 2007. – 407 с.
2. Altpeter, F. et al. Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing // The Plant Cell. 2016, vol.28, № 7: 1510-1520
3. Dlugosz, E.M., Lenaghan, S.C., and Stewart, C.N., Jr. A robotic platform for high-throughput protoplast isolation and transformation from 'Bright-Yellow' 2 tobacco cultures // J. Vis. Exp. 2016, 115

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ 6– БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЮ У ГИБРИДОВ РИСА

**Савенко Е.Г.¹, Кострюкова Э.Н.², Глазырина В.А.¹,
Гончарова Ю.К.¹**

**¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
риса», лаборатория биотехнологии и молекулярной биологии,
г. Краснодар, п. Белозерный, 3, 350921**

E-mail: avena5@rambler.ru

**² ФГБОУ «Кубанский государственный аграрный университет
им. И.Т. Трубилина», магистратура агрономического
факультета, г. Краснодар, ул. Калинина, 13, 350044**

Изучали влияние на каллусогенез и регенерацию у гибридов риса Хазар / Фонтан и ВНИИР7718 / ВНИИР7887 в культуре пыльников *in vitro* трех концентраций 6-бензиламинопурина (6-БАП) - 2,0; 4,0 и 6,0 мг/л. Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверность влияния генотипа, состава питательной среды и взаимодействия генотип - питательная среда на эффективность культуры пыльников.

Установлена достоверность влияния факторов генотип и концентрация 6-БАП на каллусогенез и регенерацию гибридов риса (табл. 1).

Таблица 1 - Дисперсионный анализ достоверности влияния факторов генотип и концентрации 6-БАП на регенерацию гибридов риса

Факторы	Сумма квадратов	Критерий Фишера F	Число степеней свободы	Ошибка	p
Св. член	0,184453	201,1754	2	91	0,000000
Комбинация	0,869242	3,3024	4	182	0,012181
6-БАП, мг/л	0,181689	24,4980	10	182	0,000000
Комбинация* 6-БАП, мг/л	0,394014	5,3972	20	182	0,000000

p – уровень значимости

При использовании концентрации 6-БАП 2,0 мг/л в комбинации Хазар / Фонтан каллусогенез был недостоверно выше. Статистическая обработка данных подтвердила высокую отзывчивость пыльников и способность формировать каллус и регенерировать растения при концентрации 6-БАП 2,0 и 4,0 мг/л в комбинации Хазар / Фонтан. В комбинации ВНИИР7718 /

ВНИИР7887 как каллусогенез, так и регенерацию достоверно увеличивала концентрация 6-БАП 2,0 мг/л. Увеличение концентрации 6-бензиламинопурина в каллусообразующей среде до 6,0 мг/л негативно влияло на индукцию каллуса и регенерацию растений (табл. 2, 3). На регенерацию это влияние было достоверно для обеих изучаемых комбинаций.

Таблица 2 - Влияние концентрации 6-БАП на каллусогенез гибридов риса

Комбинация	6-БАП, мг/л	Среднее значение %	Ошибка средней, %	Min значение, %	Max значение %
Хазар / Фонтан	2	34,95	6,17	22,52	47,38
Хазар / Фонтан	4	30,10	6,17	20,67	45,53
Хазар / Фонтан	6	18,58	4,36	9,79	27,36
ВНИИР7718 / ВНИИР7887	2	32,20	6,17	19,77	44,63
ВНИИР7718 / ВНИИР7887	4	22,57	5,04	12,42	42,71
ВНИИР7718 / ВНИИР7887	6	12,75	4,36	9,96	41,54

Таблица 3- Влияние концентрации 6-БАП на регенерацию гибридов риса

Комбинация	6-БАП, мг/л	Среднее значение, %	Ошибка средней %	Min значение, %	Max значение %
Хазар / Фонтан	2	3,35	0,52	1,72	8,42
Хазар / Фонтан	4	2,21	0,78	1,38	5,79
Хазар / Фонтан	6	0,88	0,52	0,07	5,07
ВНИИР7718 / ВНИИР7887	2	12,00	2,52	6,93	17,07
ВНИИР7718 / ВНИИР7887	4	5,17	2,06	1,03	9,31
ВНИИР7718 / ВНИИР7887	6	3,10	1,78	2,51	9,69

По результатам статистического анализа сделан вывод, что у гибридов риса для стимуляции каллусогенеза и регенерации оптимальной в питательных средах является концентрация 6-БАП

2,0 мг/л. У отдельных генотипов для стимуляции каллусогенеза может быть использована концентрация 6-БАП 2,0 мг/л и 4,0 мг/л вследствие различного уровня эндогенных гормонов (рис. 1). Применение 6-БАП в концентрации 6,0 мг/л снижает каллусогенез, а в концентрациях 4,0 и 6,0 мг/л регенерационную способность в культуре пыльников *in vitro* (рис. 2).

Рисунок 1 - Влияние концентрации 6-БАП на каллусогенез у гибридов риса

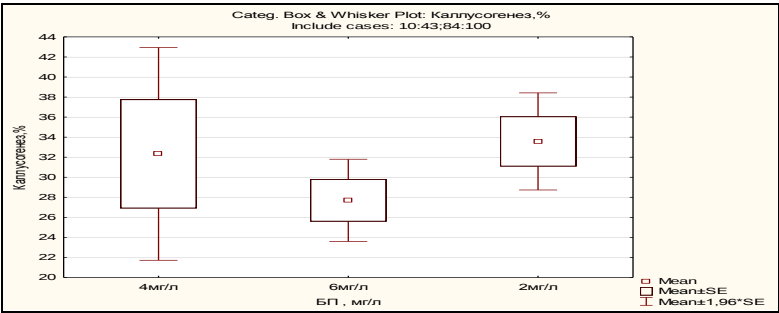
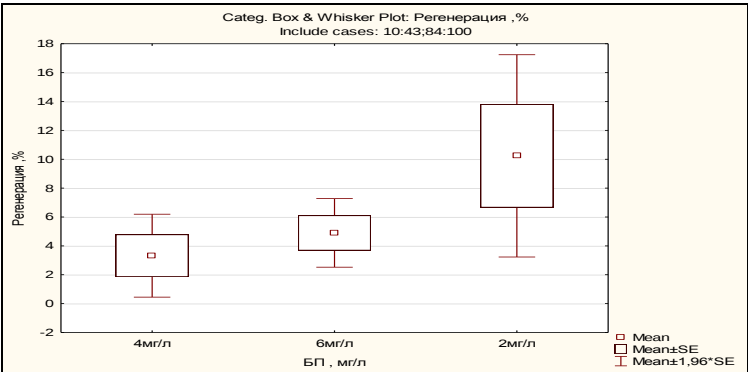


Рисунок 2 - Влияние концентрации 6-БАП на регенерацию у гибридов риса



ИДЕНТИФИКАЦИЯ ХРОМОСОМЫ ЯЧМЕНЯ *HORDEUM MARINUM* SUBSP. *GUSSONEANUM* HUDSON 4X У ЗАМЕЩЕННЫХ ЛИНИЙ И ВЛИЯНИЕ ЗАМЕЩЕНИЯ ХРОМОСОМ СЕДЬМОЙ ГОМЕОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРИОДА ВСХОДЫ- КОЛОШЕНИЕ

**Чуманова Е.В., Ефремова Т.Т., Арбузова В.С., Трубачеева Н.В.
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск 630090
E-mail: chumanova@bionet.nsc.ru**

В настоящее время широко используется интрогрессия генетического материала от культурных и диких видов злаков в геном мягкой пшеницы. Хромосомы чужеродных видов злаков могут быть интрогрессированы в геном мягкой пшеницы при получении замещенных или транслоцированных линий (Friebe et al., 1996; Molnár-Láng et al., 2014). Одним из таких видов является дикий вид ячменя *Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum* Hudson 4x ($2n = 4x = 28$). При работе с пшенично-чужеродными линиями важное значение имеет применение методов для выявления чужеродного генетического материала. В настоящее время для этой цели широко используются цитологические методы (геномная *in situ* гибридизация, дифференциальное окрашивание хромосом) и молекулярно-генетическое маркирование.

Целью данной работы являлась идентификация хромосом ячменя *Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum* Hudson 4x ($2n = 4x = 28$) у пшенично-ячменных замещенных линий по хромосомам седьмой гомеологической группы с использованием молекулярно-цитологических методов и изучение влияния 7HL(7A), 7HL(7B) и 7HL(7D) замещения хромосом на продолжительность периода всходы-колошение.

Для доказательства присутствия телоцентрической хромосомы ячменя использовали геномную *in situ* гибридизацию с меченой ДНК ячменя *H. marinum* ssp. *gussoneanum* 4x в качестве зонда. Геномная *in situ* гибридизация показала наличие пары телоцентрических хромосом ячменя в генотипе 7HL(7A), 7HL(7B) и 7HL(7D) замещенных линий (рис. 1).

Для подтверждения цитологических данных мы использовали EST (expressed sequence tags) маркер k04783, который позволяет быстро и точно идентифицировать 7Н хромосому ячменя *H. marinum* (Nasuda et al., 2005). Маркеры, созданные на основе

экспрессирующихся последовательностей (EST-маркеры), были разработаны для культурного ячменя *H. vulgare*, но благодаря тому, что они происходят из высоко консервативных последовательностей генома, они могут применяться у родственных видов. При использовании маркера k04783 у изучаемых нами трех замещенных линий амплифицировался фрагмент длиной 700 п.н., что указывает на присутствие хромосомы 7HL ячменя *H. marinum* (рис. 2).

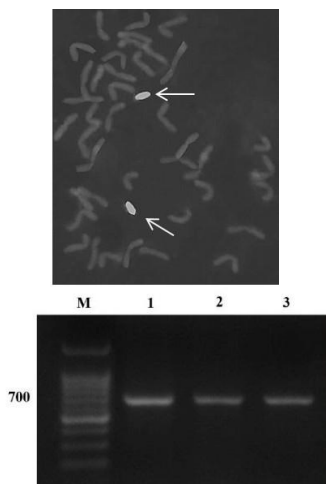


Рис. 1. Геномная *in situ* гибридизация (GISH) пшенично-ячменной дителосомной линии 7HL(7A). Стрелками указаны телоцентрические хромосомы ячменя *H. marinum*.

Рис. 2. Использование молекулярного маркера k04783 для идентификации хромосомы ячменя. 1–7HL(7A), 2–7HL(7B), 3–7HL(7D).

Проведено изучение влияния 7HL(7A), 7HL(7B) и 7HL(7D) замещения хромосом на продолжительность периода всходы-колошение при выращивании в условиях длинного дня (посев 10 февраля 2014 г.) и короткого дня (посев 6 октября 2014 г.). Среди трех линий самой скороспелой как на длинном, так и на коротком дне, оказалась линия 7HL(7A), которая выколашивалась в среднем за 39 и 47 дней соответственно. Самой позднеспелой из трех изученных линий оказалась линия 7HL(7B), которая выколашивалась в среднем за 45 и 54 дней соответственно. Растения линии 7HL(7D) выколашивались за 42 и 50 дней соответственно.

Для идентификации известных доминантных или рецессивных аллелей генов *Vrn* использовали известные аллель-специфичные праймеры: *Vrn-A1* (Yan et al., 2004; Fu et al., 2005), *Vrn-B1* (Milec et al., 2012), *Vrn-D1* (Yan et al., 2004; Fu et al., 2005), *Vrn-B3* (Yan et al., 2006).

У всех трех замещенных линий было обнаружено по два доминантных гена *Vrn*: *Vrn-A1a* и *Vrn-B1c* у линии 7HL(7B) и *Vrn-A1b* и *Vrn-B1c* у линий 7HL(7A) и 7HL(7D) (рис. 3). У всех трех линий присутствовал рецессивный аллель гена *vrn-D1*. У линий с замещением 7HL(7A) и 7HL(7D) амплифицировался фрагмент, характерный для рецессивного аллеля гена *vrn-B3*. У линии 7HL(7B) с отсутствием 7В хромосомы пшеницы, в которой локализован ген *Vrn-B3*, данный фрагмент отсутствовал.

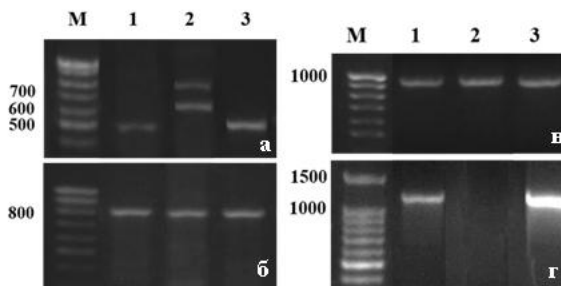


Рис. 3. Использование аллель-специфичных праймеров для идентификации генов *Vrn* у пшенично-ячменных замещенных линий: *Vrn-A1* (а), *Vrn-B1* (б), *vrn-D1* (в), *vrn-B3* (г). а: *Vrn-A1a* – 650 и 750 п.н., *Vrn-A1b* – 500 п.н.; б: *Vrn-B1c* – 850 п.н.; в: *vrn-D1* – 997 п.н.; г – *vrn-B3* – 1140 п.н. 1 – 7HL(7A), 2 – 7HL(7B), 3 – 7HL(7D).

Известно, что у мягкой пшеницы наряду с генами *VRN* на продолжительность периода всходы-колошение также оказывают влияние гены *Ppd* чувствительности к длине дня (фотопериоду): *Ppd-D1*, *Ppd-B1* и *Ppd-A1*, локализованные в коротких плечах хромосом второй гомеологической группы (Law et al., 1978; Snape et al., 2001) и *Ppd-B2*, локализованный в коротком плече хромосомы 7В (Khlestkina et al., 2009). Вероятно, то, что самой позднеспелой оказалась линия 7HL(7B), можно объяснить отсутствием хромосомы 7В пшеницы, в которой локализован доминантный ген *Ppd-B2*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00721.

БЕЗОПАСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ БАКУЛОВИРУСОВ

Охлопкова О.В.¹, Моисеева А.А.¹, Хлистун И.В.¹, Худеева К.А.²,
Петрова Т.А.², Колосов А.В.¹

¹*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, 630559*

²*Национальный исследовательский Томский политехнический
университет,
г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050*

Экологически безопасная защита растений с каждым годом становится все более актуальной ввиду ухудшающегося состояния окружающей среды. На сегодняшний день накоплено большое количество данных, показывающих эффективность биологических агентов в борьбе с вредителями сельского и лесного хозяйств. Наиболее перспективными в этой области являются бакуловирусы, так как они абсолютно безопасны для позвоночных, воздействуют исключительно на целевых вредителей, имеют свойство персистировать в геноме насекомых, оказывая пролонгированное негативное действие на популяцию вредителя.

Представители царства вирусов могут размножаться исключительно в живых клетках. Эта биологическая особенность обуславливает всю специфику их наработки. На данный момент принято нарабатывать вирусную массу на клеточных культурах насекомых либо на самих насекомых. Второй метод распространен в большей степени, так как полученные при наработке *in vivo* вирусные структуры наиболее стабильны в окружающей среде. Следовательно, он является более эффективным и надежным.

Таким образом, одним из важных звеньев этой технологии является наработка биомассы в инсектарии.

Для того чтобы успешно культивировать биомассу в лабораторных условиях, необходимо правильно подобрать искусственную питательную среду (ИПС), которая сможет удовлетворять все потребности конкретного насекомого. Если ИПС подобрана с учетом всех особенностей, насекомые будут быстрее достигать целевого возраста, что снизит объем трудозатрат. Кроме того, будут правильно формироваться клетки жирового тела, что позволит получить больший объем вирусной массы.

Целью нашего исследования является изучение темпов роста гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) при культивировании на ИПС с различным составом, а также степени чувствительности насекомых к вирусу ядерного полиэдроза (ВЯП).

Для проведения исследования грену непарного шелкопряда (НШ) собирали во II декаде октября 2015-2016 гг. в лесозащитных полосах Ордынского района Новосибирской области в очагах массового размножения насекомых. Яйца подвергали поверхностной стерилизации и промывке. После чего ставили их на активацию в термостат. Отродившихся гусениц рассаживали группами в чашки Петри с ИПС пяти видов, которые различались по ключевым компонентам: 1) кукурузная мука, 2) фасоль, 3) дрожжевой экстракт, 4) чечевица, 5) горох. При культивировании НШ фиксировали личиночные стадии. Результаты этого исследования представлены на рис. 1.

Как видно из диаграммы, скорость достижения целевого возраста у гусениц, культивируемых на ИПС с фасолью и с чечевицей, составила $11,0 \pm 1,6$ и $10,2 \pm 0,6$ суток соответственно, что значительно быстрее, чем у гусениц, культивируемых на других средах. Для ИПС с горохом показатель составил $13,0 \pm 1,6$ суток, с кукурузной мукой – $13,4 \pm 0,8$ суток. Наиболее низкую скорость достижения III возраста имели гусеницы, выращенные на среде с дрожжевым экстрактом – $15,8 \pm 1,4$ суток.

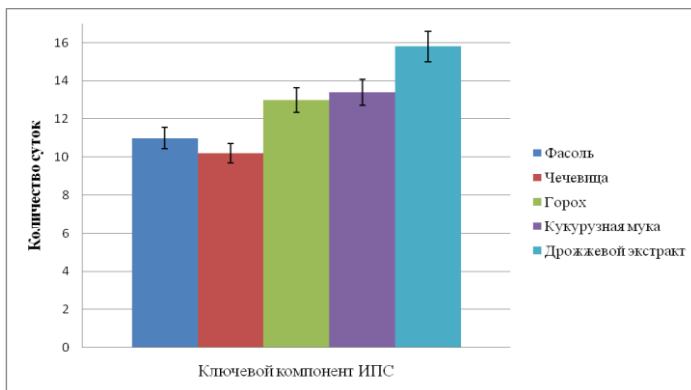


Рисунок 1. Скорость достижения III возраста у гусениц, культивируемых на ИПС с различными ключевыми компонентами

Для инфицирования насекомых применяли изолят ВЯП НШ 7 из коллекции отдела биофизики и экологических исследований ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово. На ИПС соответствующего вида наносили вирусную суспензию и культивировали на ней насекомых. Причину гибели гусениц устанавливали микроскопическим методом. По завершении эксперимента определяли процент гибели гусениц от вируса на каждой среде.

После заражения гибель гусениц (в %) на 9-е сутки на ИПС с горохом и с кукурузной мукой оказалась самой высокой – 96% и 95% соответственно, с фасолью – 80%, с дрожжевым экстрактом – 68%, с чечевицей – 44% (Табл.1). Однако при проведении микроскопического исследования выявлено, что на средах с № 3, 4 и 5 гибель гусениц от вируса составила не более 20%, что может быть связано с множеством факторов (влажность, состав среды и др.). При этом гибель гусениц на ИПС № 1 и 2 связана именно с ВЯП НШ.

Таблица 1

Динамика гибели гусениц, культивируемых на различных ИПС, обработанных ВЯП НШ

№ п/п	Ключевой компонент ИПС	Время после заражения (сутки)		
		7	8	9
1	Фасоль	20%	40%	80%
2	Чечевица	20%	32%	44%
3	Горох	84%	91%	95%
4	Кукурузная мука	31%	85%	96%
5	Дрожжевой экстракт	21%	53%	68%

По результатам проведенного нами исследования насекомые, выращенные на ИПС с фасолевым и с чечевичным компонентами, быстрее достигали целевого возраста. Так же гусеницы непарного шелкопряда, культивируемые на этих средах, оказались более чувствительны к ВЯП НШ. Еще хотелось бы отметить общую благоприятную тенденцию по использованию бобовых для приготовления кормов при культивировании биомассы и наработке вируса *in vivo*.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА РЫБ СЕМЕЙСТВА ЛОСОСЕВЫЕ

Ильина Л.А., Йылдырым Е.А., Филиппова В.А., Дубровин А.В.,
Дубровина Е.Г., Никонов И.Н., Новикова Н.И., Лаптев Г.Ю.
*Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ», г.
Санкт-Петербург, г. Пушкин, ул. Малиновская, д. 8, лит. А, пом.
7-Н, 196602*

Семейство Лососевые (*Salmoninae*) относится к ценным промысловым рыбам, наиболее известными представителями и важными объектами искусственного разведения которых являются тихоокеанский лосось, различные виды форелей, семга. Поэтому их изучение представляет широкий интерес как для успешного разведения в аквакультуре, так и для развития подходов к мониторингу естественных популяций.

В ряде работ показано, что микроорганизмы пищеварительного водных животных менее многочисленны и разнообразны в сравнении с наземными видами животных, однако играют важную роль в пищеварении и жизнедеятельности рыб, обеспечении защитных функций организма, регуляции метаболизма (Austin, 2002). Важное влияние на своеобразную экологическую систему, населяющую пищеварительный тракт рыб, оказывают различные факторы, такие как возраст, тип питания, сезон года, уровень солености и другие параметры окружающей среды (Wu et al., 2010). В связи с этим актуальной задачей является оценка микробиоценоза в системе «рыба – окружающая среда – корм».

Несмотря на широкий интерес к представленной теме, микробиоценоз кишечника рыб до сих пор изучен не в полной мере. Это объясняется, прежде всего, практически полным отсутствием методической базы для исследования факультативно- и строго анаэробных микроорганизмов, населяющих пищеварительный тракт. Возможность исследования микробиома кишечника с использованием молекулярно-генетических подходов на основе гена 16S рРНК, которые позволяют изучать разнообразие микроорганизмов, минуя стадию их культивирования, привели к пониманию необходимости пересмотра классических представлений.

Нами впервые в России были проведены исследования микробиома кишечника форели радужной на основе молекулярно-генетического метода T-RFLP (*terminal restriction fragment length*

polymorphism). Данный метод позволяет дать развернутую характеристику микробного сообщества, выявляя не только таксономические доминанты, но и минорные компоненты, в том числе некультивируемые микроорганизмы, доля которых в разных экосистемах может достигать 90% (Kitts C.L., 2001).

Методика. Исследовали бактериальное сообщество годовиков кишечника 5 особей форели радужной из ООО «Сумской лососёво-сиговый питомник» Ленинградской области. Условия содержания рыбы – в бассейнах по 500 голов при температуре воды – +2°C.

Тотальную ДНК из образцов выделяли с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas, Inc.», Литва) согласно рекомендациям производителя. ПЦР-амплификацию проводили с использованием ДНК-амплификатора Verity («Life Technologies, Inc.», США). Флуоресцентно меченные ампликоны гена 16S рРНК очищали по стандартной методике, рестрикцию 30–50 нг ампликонов 16S рРНК проводили рестриктазами HaeIII, HhaI и MspI, следуя рекомендации изготовителя («Fermentas», Литва). Продукты рестрикции анализировали с помощью CEQ 8000 («Beckman Coulter», США) согласно рекомендациям производителя. Таксономическую принадлежность бактерий определяли с использованием программы Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php>).

Математическую и статистическую обработку экспериментальных результатов проводили с использованием программного обеспечения Excel 2010.

Результаты. Установлено, что структура микробиоценоза кишечника рыб вопреки традиционным представлениям (Cahill, 1990; Austin, 2002) характеризовалась достаточно богатым таксономическим разнообразием - до $63,00 \pm 1,5$ филотипов.

При таксономическом анализе бактериального сообщества значительную долю последовательностей ДНК не удалось идентифицировать - их содержание составляло до 37,90%.

Состав идентифицированных микроорганизмов был отнесен к 5 филумам и включал в себя, главным образом, представителей филума *Proteobacteria*, включая до 21,93% представителей *Gammaproteobacteria*, до 4,30% - *Alphaproteobacteria*, до 3,20% - *Epsilonproteobacteria*.

Доля же представителей филумов *Bacteroides* и *Firmicutes* (в том числе бактерий семейств *Bacillaceae*, *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae*), доминирующих

в кишечнике млекопитающих, у рыб составило лишь до 4,80 и 15,85% соответственно. Полученные результаты несколько противоречат существующему мнению о том, что бактерии из семейств *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* до настоящего времени обнаруживали только в составе содержимого рубца жвачных животных [20]. Доля же облигатных обитателей кишечника наземных животных - представителей бактерий рода *Lactobacillus* и семейства *Bifidobacterium*, составляла у рыб лишь до 1,37 и 0,28% соответственно. Помимо этого, в более низких концентрациях выявлялись представители филумов *Actinobacteria* и *Deinococcus-Thermus*.

В кишечнике рыб были обнаружены условно-патогенные и патогенные микроорганизмы: представители родов *Pasteurella* (до 0,15%), *Campylobacter* (до 3,2%), *Staphylococcus* (до 1,54%) и семейства *Enterobacteriaceae* (до 7,63%), а также семейства *Actinobacteriaceae* (до 9,91%), которые традиционно считаются связанными с дисбиотическими нарушениями у животных.

Стоит отметить, что полученные результаты согласуются с сообщениями зарубежных авторов, описанных с использованием как классических, так и молекулярно-генетических методов (Austin, 2002; McDonald et al., 2012).

Таким образом, результаты исследований с использованием молекулярно-генетического метода T-RFLP позволяют получить детальное представление о микробиоме кишечника рыб, и представляют собой перспективное направление, которое позволит установить связь кишечной микробиоты рыб с микроорганизмами пищи и окружающей среды (воды и грунта), сезонные и онтогенетические изменения в составе кишечной микробиоты рыб.

Литература

1. Austin, B. The bacterial microflora of fish / B. Austin // The Scientific World Journal. – 2002. – № 2. – P. 558 – 572.
2. Kitts C.L. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics // Current Issues in Intestinal Microbiology. 2001. V. 2. V.17–25.
3. McDonald, R. Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a Wood-Eating fish / R. McDonald, H.J. Schreier, J.E.M. Watts // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – I. 10. – P. 1 – 9.

4. Wu, S. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) / S. Wu, G. Wang, E. Angert, W. Wang, Y. Cheng, G. Wang // *Aquaculture*. – 2010. – V. 303. – P. 1 – 7.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАНЕЛИ ПОРОДОСПЕЦИФИЧНЫХ SNP-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСТОПОРОДНОСТИ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ ПОРОДЫ ПЬЕТРЕН

Снытков Е.В.¹, Кипень В.Н.²

¹УО «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ, 220009, Минск, Республика Беларусь

²ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», 220000, Минск, Республика Беларусь

E-mail: evsnytkov@gmail.com

Введение. Пьетрен – порода свиней мясного направления продуктивности. Животные данной породы выведены путем скрещивания свиней английской крупной белой и беркширской породы. В настоящее время свиньи породы пьетрен популярны во всем мире из-за своих мясных качеств. Хряков породы пьетрен используют в промышленном свиноводстве с целью улучшения мясных качеств. Наиболее популярный трехпородный гибрид: крупная белая / ландрас / пьетрен. При скрещивании свиней пород пьетрен и дюрок мясо получается хорошего качества, при скрещивании пьетрена и ландраса свиньи обладают быстрым ростом. Отличительной особенностью пьетренов является то, что они генетически не предрасположены к накоплению жира – даже при скрещивании свиней мясосального и сального направления со свиньями породы пьетрен получают молодняк мясной породы.

На сегодняшний день порода пьетрен широко распространена в европейских странах, особенно в Бельгии, Франции, Великобритании, Нидерландах. В Республике Беларусь данная порода распространена слабо – доли процента от общей численности поголовья *Sus scrofa domesticus*.

Ранее нами была показана возможность с использованием данных полногеномных сиквенсных проектов коммерческих пород свиней для выявления породоспецифичных SNP-маркеров [1].

Цель и задачи. Смоделировать с использованием MDR-анализа (Multifactor dimensionality reduction [2]) панель генетических маркеров, способную дифференцировать животных породы пьетрен от представителей пород крупная белая, ландрас, дюрок и мейшан, а также охарактеризовать ее с позиций чувствительности, специфичности и общей точности.

Материалы и методы. Поиск породоспецифичных SNP был выполнен с помощью алгоритма SRA Nucleotide BLAST (Sequence Read Archive Nucleotide BLAST) и программы BioEdit v.7.2.5. Количество включенных в анализ SNP – 193 [3]; число полногеномных прочтений для свиней породы пьетрен – 6, для других пород – 85 (крупная белая – 19, ландрас – 23, мейшан – 15, дюрок – 28). Общее количество проанализированных сиквенсов – 32 754 738 518.

Были использованы SRA-данные по полногеномному секвенированию (NGS), размещенные в открытом доступе на облачном сервисе DNAnexus (<http://sra.dnexus.com/>), а также в SRA-NCBI – high-throughput DNA and RNA sequence read archive (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra).

Построение модели взаимодействий SNP (определение минимального и достаточного количества генетических маркеров для решения поставленной задачи) проводилось с использованием биоинформатического метода MDR.

Основные результаты. В результате проведенного исследования нами было выявлено наличие семи строго специфичных SNP-маркеров (породоспецифичный аллель отмечен только у представителей данной породы) для породы пьетрен: ALGA0115746 (хромосомная позиция – 17:47595840, частота породоспецифичного аллеля – 58,3%), ALGA0117988 (X:14724810, 50,0%), ASGA0030130 (6:149172524, 16,7%), ASGA0058793 (13:136017764, 50,0%), ASGA0077092 (17:48426806, 33,3%), ASGA (6:142179174, 66,7%), M1GA (12:49934017, 33,3%).

В процессе моделирования панели генетических маркеров, способной дифференцировать животных породы пьетрен, нами были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели в MDR, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов: количество атрибутов (attribute count range) – от 1 до n (где n – количество переменных в модели); воспроизводимость модели (cross-validation count) – 100; анализ топ-моделей (track top models) – 1000; поиск конфигурации модели (search method

configuration) – exhaustive; классификация ячеек (ambiguous cell assignment) – unclassified.

В результате проведенного моделирования была определена модель, отражающая такое сочетание породоспецифичных для пьетрена SNP, которое позволило наилучшим образом отличить животных этой породы от других пород в рамках данной работы. В частности, модель включала в себя два SNP (ALGA0115746 и ALGA0117988) и имела следующие характеристики: сбалансированная точность (adj. Balanced accuracy) – 100%, чувствительность (Sensitivity) – 100%, специфичность (Specificity) – 100%, воспроизводимость (Cross Validation Consistency) – 100/100.

Выводы. Таким образом, нами предложена и охарактеризована модель, включающая два SNP-маркера, с помощью которой имеется возможность с высокой точностью отличить чистопородных домашних свиней породы пьетрен от особей пород крупная белая, ландрас, дюрок и мейшан.

Полученные нами результаты могут лечь в основу создания панели SNP-маркеров для определения чистопородности особей породы пьетрен подвида *Sus scrofa domestica*.

1. Кипень, В.Н. Выявление породоспецифичных SNP-маркеров для крупной белой породы домашних свиней с использованием полногеномных SRA-данных проектов NGS / В.Н. Кипень, С.А. Котова // Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 50-летию Вавиловского (ранее Всесоюзного) Общества генетиков и селекционеров: «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». – РФ, Москва. – 2016. – С.177;
2. Greene, C. Multifactor dimensionality reduction for graphics processing units enables genome-wide testing of epistasis in sporadic ALS // Bioinformatics. – 2010. – p.694-695;
3. Ramos, AM Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing / Ramos AM, Megens HJ, Crooijmans RP [et al.] // Anim Genet. 2011 Dec;42(6):613-20. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02198.x. Epub 2011 Apr 25.

МОНИТОРИНГ ГМ-ПРОДУКЦИИ, ПОСТУПИВШЕЙ НА РОССИЙСКИЙ РЫНОК В 2016 Г.

**Кондратьева Н.С.¹, Коробкова М.Ю.,¹ Гузеева А.А.¹,
Капитова И.А.¹**

***¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский государственный центр качества и
стандартизации Лекарственных средств для животных и
кормов», Москва, Звенигородское шоссе д.5, 123022.***

E-mail: gmo-lab@vgnki.ru, kanc@vgnki.ru

В связи с климатическими нарушениями и ограничением ресурсов сельскохозяйственных культур в мире в настоящее время наблюдается широкомасштабное производство пищевых и кормовых продуктов, содержащих генно-инженерно-модифицированные организмы. В 2014 году общая площадь, засеянная ГМ-культурами, составляла 181,5 млн. гектаров земли, эти данные превышают показатели 1996 года в 100 раз. ГМ-культуры выращивались в 28 странах; 20 из которых являются развивающимися, и для повышения урожайности используют сконструированные биотехнологами культуры. США является ведущим производителем ГМ продуктов (73,1 млн гектаров земли, 40% от мировых посевов ГМО), за ними следуют Бразилия (42,2 млн га), Аргентина (24,3 млн га), Индия (11,6 млн. га) и Канада (11,6 млн. га).

Несмотря на существенный экономический потенциал, регистрация и коммерциализация ГМО вызывают споры в научном сообществе и в государственном секторе. Некоторые аспекты ГМО, такие как оценка рисков, маркетинг, маркировка и отслеживание, строго регулируются во всем мире (Европейском Союзе и других странах). Отправной точкой в оценке рисков ГМО является концепция «существенной эквивалентности», которая включает сравнение оценки сортов ГМО с традиционными.

В Российской Федерации действует законодательная и нормативно-методическая база, необходимая для эффективного осуществления государственного надзора и производственного контроля за пищевой продукцией и кормами для сельскохозяйственных животных и птицы произведенной из ГМО растительного происхождения. Пищевые продукты из ГМО, поступающие на рынок Российской Федерации, проходят тщательный контроль.

В РФ и Европейском Союзе действуют обязательные (необходимые) условия, установленные для использования ГМО в

пищевых и кормовых продуктах. В рамках данных условий требуется обязательная маркировка пищевых продуктов, содержащих более 0,9% зарегистрированных и более 0,5% незарегистрированных ГМО.

К настоящему времени для мониторинга содержания ГМ-компонента было разработано большое количество методик, таких как двумерный электрофорез, капиллярный электрофорез белков, ВЭЖХ и ИФА. Из всех перечисленных наиболее широко применяемой методикой является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данный метод, используемый для идентификации и количественного анализа ГМО, является высокочувствительным, специфичным, простым в использовании, быстрым, экономичным, а также подходит для широкомасштабного мониторинга ГМ-продукции на рынке.

На сегодняшний день ФГБУ ВГНКИ является ведущим учреждением Россельхознадзора, выполняющим широкий спектр исследований, основной целью которых является контроль качества сырья и продукции кормовой промышленности для выявления и идентификации генетически модифицированных линий сои, кукурузы, рапса и риса, не заявленных производителем. В рамках выполнения данной задачи проводится мониторинг пищевой и кормовой продукции для оценки возможных рисков их использования.

Определение ГМ-компонентов выполняется в несколько этапов: 1) качественное определение 7-и регуляторных последовательностей, наиболее часто используемых при проведении процедур генетической трансформации (ген *pat*, генетическая конструкция СТР2-CP4-*epsps*, промоторы 35S, pSSuAra, терминаторы NOS, FMV, E9). 2) качественная идентификация ГМ-линий растений. На данном этапе происходит обнаружение 13 ГМ-линий сои (40-3-2, MON89788, MON87701, BPS-CV-127, MON87705, MON87708, MON87769 и др.); 19 ГМ-линий кукурузы (MIR162, MIR604, MON810, MON88017, LY038, MON87460, DAS40278 и др.); 9 ГМ-линий рапса (GT 73, MS8, RF 3, и др.); ГМ-линии риса LL 62. 3) анализ количественного содержания отдельных ГМ-линий (соя, кукурузы, рапса) в процентном соотношении.

В 2016 году в отделе по контролю ГМО было исследовано 5434 образца. В данный период было проведено: более 2300 скрининговых исследований на наличие ГМ вставок, 1407 и 152 – на идентификацию линий ГМ-соя и ГМ-кукурузы, соответственно;

в том числе в 1504 случаях проводилось количественное содержание линий ГМ-сои.

На основании анализа полученных данных за 2016 год, были сделаны выводы, что основными источниками, содержащими ГМ компоненты, поступающими на отечественный рынок, являются соевый шрот и комбикорма для кормления свиней и птиц. ГМ линия MON 87701 наиболее часто встречалась в образцах соевого шрота (49,94%), в то время как образцы комбикормов содержали ГМ-линии сои 40-3-2, MON89788, MON87701 в количестве 55,44%, 49,87% и 26,25% соответственно.

Одним из центральных вопросов безопасности, обсуждаемых в отношении ГМО, является возникновение непреднамеренных изменений, являющихся следствием генетической трансформации. Данные явления выходят за рамки первичных ожидаемых эффектов генетической модификации и представляют статистически значимые различия в фенотипе по сравнению с соответствующим фенотипом контроля. Такие непредсказуемые изменения могут оказывать влияние на здоровье человека и / или окружающую среду.

Таким образом, учитывая спорную ситуацию в отношении влияния ГМО на здоровье человека и окружающую среду, необходимо осуществлять качественный контроль ГМ-продукции, имеющейся на отечественном рынке.

ВЛИЯНИЕ NaCl-ЗАСОЛЕНИЯ НА ДЫХАТЕЛЬНЫЙ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ CO₂- ГАЗООБМЕН РАСТЕНИЙ ТОМАТА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Богоутдинова Л.Р.^{1,2}, Халилуев М.Р.¹

**¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», Лаборатория генной
инженерии растений, Москва 127550**

E-mail: marat131084@rambler.ru

**²ФГБОУ ВО Российский Государственный Аграрный
Университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Кафедра
генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства,
Москва 127550**

E-mail: bogoutdinova_lr@rambler.ru

Понимание адаптивных механизмов солеустойчивости растений как сложного комплексного признака является неотъемлемой частью многих физиолого-биохимических и молекулярно-генетических исследований, результаты которых в последние десятилетия все чаще находят применение в практической селекции. Известно, что засоление оказывает существенное влияние на процессы дыхания и фотосинтеза растений. При этом может наблюдаться как увеличение, так и снижение показателей интенсивности темнового дыхания, интенсивности истинного фотосинтеза. Это зависит от большого числа факторов: вида растения, его возраста и физиологического состояния, концентрации стрессового фактора, а также продолжительности его действия, условий окружающей среды и других. Необходимым условием при изучении процессов дыхания и фотосинтеза растительных организмов при солевом стрессе является выровненность материала. Кроме того, требуется создание и поддержание контролируемых константных условий культивирования, поскольку от этого зависит достоверность полученных экспериментальных данных. Отмеченных недостатков лишена система тестирования растений в экспериментальных условиях *in vitro*. Таким образом, целью настоящего исследования было изучить влияние NaCl-засоления на дыхательный и фотосинтетический CO₂-газообмен проростков томата (*S. lycopersicum* L.) в условиях *in vitro*.

Растительным материалом для исследований служили 8-10-суточные асептические проростки двух контрастных по

устойчивости к засолению генотипов томата (*S.lycopersicum* L.): селекционная линия ЯЛФ и сорт Рекордсмен. В экспериментах использовали фрагменты побеговой части асептических проростков томата после 8 суток культивирования на питательной среде для индукции ризогенеза, не содержащей NaCl, а также с добавлением ранее установленных сублетальных (150 и 250 мМNaCl для линии ЯЛФ и сорта Рекордсмен соответственно) и промежуточных концентраций (75 мМNaCl) стрессового фактора. Каждый вариант состоял из 3 биологических повторностей по 10 проростков в каждой. Определение дыхательного и фотосинтетического CO₂-газообмена проводили с помощью системы, позволяющей осуществлять измерения растений в условиях *invitro* (патент РФ № 2572349). За 24 ч до измерений культуральные сосуды объемом 300 см³ разгерметизировали и выдерживали в условиях световой комнаты, а непосредственно за 2 ч – в условиях абсолютной темноты. Регистрацию выделяемого CO₂ в условиях темноты и на свету осуществляли при постоянной температуре (22–23°C) в течение 5 мин. Интенсивность темнового дыхания (CO₂-газообмен (мкг/ч) в условиях темноты), а также интенсивность истинного фотосинтеза (CO₂-газообмен (мкг/ч) в условиях темноты и на свету) определяли из расчета на мг сухой биомассы проростка.

В результате исследования было установлено, что по сравнению с контролем достоверное снижение интенсивности истинного фотосинтеза и интенсивности темнового дыхания (в 1,1 и в 1,3 раза соответственно) наблюдалось уже при культивировании проростков томата линии ЯЛФ в условиях 75 мМNaCl. Последующее уменьшение интенсивности истинного фотосинтеза у проростков томата селекционной линии ЯЛФ отмечено на среде, содержащей сублетальную концентрацию стрессового фактора. Однако подобного рода изменений в отношении показателя интенсивности темнового дыхания отмечено не было. В отличие от линии ЯЛФ, достоверных различий по показателям интенсивности темнового дыхания и интенсивности истинного фотосинтеза у проростков томата сорта Рекордсмен, культивируемых в контрольных условиях, а также при действии 75 и 150 мМNaCl, установлено не было. Снижение ИТД и у данного генотипа происходило только в условиях 250 мМNaCl. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существенных различиях между исследуемыми генотипами томата, контрастных по устойчивости к засолению, по показателям интенсивности истинного фотосинтеза и интенсивности темнового дыхания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01331 мол_а.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С РАЗНОЙ СКОРОСТЬЮ АДГЕЗИИ К БЕЛКАМ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Кашапова И.С., Чивилев И.В., Косовский Г.Ю.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных
биотехнологий,*

127422, Москва, ул. Костякова, д.12, стр.4,

E-mail: i-kashapova@rambler.ru

В последние годы для получения популяций клеток, имеющих способности дифференцироваться в различные типы клеток, особое внимание уделяется мезенхимным стволовым клеткам (МСК), основным источником которых является костный мозг (КМ). При разработке методов использования МСК для получения трансгенных клеточных популяций и для решения задач регенеративной ветеринарии и медицины необходимо учитывать особенности данного типа клеток, в том числе адгезивные и пролиферативные свойства.

В настоящем исследовании представлены данные сравнения скорости адгезии и пролиферации МСК КМ крысы 1 пассажа на желатиновых подложках и адгезивном пластике.

МСК КМ крысы высевались в концентрации 200000 кл/мл среды ДМЕМ (ПанЭко, Россия) с содержанием 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS (HyClone, США) на 0,1% желатин типа В (ПанЭко, Россия). Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, по истечении которых отбиралась среда и переносилась в новую чашку Петри на 20 мин, после чего из этой чашки Петри среду снова переносили в чистую и оставляли еще на 30 мин. Далее для всех трех чашек в камере Горяева было подсчитано количество прикрепившихся клеток. В качестве контроля оценивалась скорость адгезии МСК КМ крысы в тех же условиях к пластику. Таким образом, было показано, что в течение 10 мин к желатину адгезировало 4% всех клеток, тем временем, как в контроле – 4,5%; за полчаса к желатиновому матриксу

прикрепились 80% клеток и 50% к пластику соответственно; в течение часа 16% в экспериментальной группе и 45,5% - в контрольной.

Для изучения пролиферативных свойств клетки после определения адгезивности культивировали в 48-луночном планшете в присутствии 5%CO₂ в течение 48 часов, после чего в камере Горяева подсчитывали их концентрацию. В ходе эксперимента показано, что субпопуляции МСК КМ крысы, адгезировавшие в течение 10 минут, как на желатиновый матрикс, так и к пластику не пролиферировали. Время удвоения субпопуляций, прикрепившихся к желатину и пластику в течение 30 мин, равнялось 61,4 и 96 часов соответственно. Клетки, адгезировавшие в течение 60 минут, удваивали популяцию за 52,1 часа на желатиновой подложке и за 56,4 часа в контроле.

Полученные результаты доказывают, что в популяциях МСК КМ крысы 1 пассажа с низкой адгезией выявляется в последующем наиболее высокая скорость пролиферации, причем, чем медленнее клетки прикрепляются к субстрату, тем выше скорость удвоения их популяций. Кроме того, из полученных результатов следует, что в популяции МСК КМ содержатся клетки с различной способностью взаимодействовать с белками внеклеточного матрикса.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАНЕЛИ ПОРОДОСПЕЦИФИЧНЫХ SNP-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСТОПородНОСТИ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ ПОРОДЫ МЕЙШАН

Кипень В.Н.

*ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета
судебных экспертиз Республики Беларусь», 220090, Минск,
Республика Беларусь*

E-mail: slavakipen@rambler.ru

Введение. Мейшан (Meishan) – порода домашних свиней, названная по региону происхождения – округу Мэйшань в южном Китае.

Порода знаменита чрезвычайной плодовитостью: самки вступают в период половой зрелости в возрасте 2,5-3 месяца и приносят по 15-16 и более поросят в помете. Мейшаны относятся к сальным породам. Свиньи этой породы растут медленно, среднесуточный привес 330-440 г. Животные просты в содержании,

устойчивы к большинству заболеваний, могут питаться грубой пищей, побочными продуктами сельского хозяйства, водорослями и комбикормами. Потребность мейшанов в кормах на единицу прироста живого веса до 40 % ниже, чем у свиней западных пород.

Исследования селекционеров направлены на изучение причин высокой плодовитости мейшанов, которые, предположительно, обусловлены гормональными и генетическими отличиями от западных пород. Селекционная работа ведётся в отношении попыток выведения гибридных пород повышенной плодовитости, а также в отношении снижения жирности мяса мейшанов.

В Республике Беларусь данная порода распространена слабо – менее 1% от общей численности поголовья *Sus scrofa domestica*.

Ранее нами была показана возможность с использованием данных полногеномных сиквенсных проектов коммерческих пород свиней определить наличие породоспецифичных SNP-маркеров для животных некоторых пород свиней [1].

Цель и задачи. Смоделировать с использованием MDR-анализа (Multifactor dimensionality reduction [2]) панель генетических маркеров, способную дифференцировать животных породы мейшань от представителей пород крупная белая, ландрас, дюрок и пьетрен, а также охарактеризовать ее с позиций чувствительности, специфичности и общей точности.

Материалы и методы. Поиск породоспецифичных SNP был выполнен с помощью алгоритма SRA Nucleotide BLAST (Sequence Read Archive Nucleotide BLAST) и программы BioEdit v.7.2.5. Количество включенных в анализ SNP – 193 [3]; число полногеномных прочтений для свиней породы мейшан – 15, для других пород – 76 (крупная белая – 19, ландрас – 23, пьетрена – 6, дюрок – 28). Общее количество проанализированных сиквенсов – 32 754 738 518.

Были использованы SRA-данные по полногеномному секвенированию (NGS), размещенные в открытом доступе на облачном сервисе DNAnexus (<http://sra.dnexus.com/>), а также в SRA-NCBI – high-throughput DNA and RNA sequence read archive (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra).

Построение модели взаимодействий SNP (определение минимального и достаточного количества генетических маркеров для решения поставленной задачи) проводилось с использованием биоинформатического метода MDR.

Основные результаты. В результате проведенного исследования нами было выявлено наличие четырех строго специфичных SNP-маркеров (породоспецифичный аллель отмечен только у представителей данной породы) для породы мейшан: ALGA0006723 (хромосомная позиция – 1:180980648, частота породоспецифичного аллеля – 25,0%), ALGA0090556 (16:47944374, 57,1%), ALGA0099778 (X:67185873, 100%), ASGA0049066 (10:73784360, 23,3%).

В процессе моделирования нами были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов: количество атрибутов (attribute count range) – от 1 до n (где n – количество переменных в модели); воспроизводимость модели (cross-validation count) – 100; анализ топ-моделей (track top models) – 1000; поиск конфигурации модели (search method configuration) – exhaustive; классификация ячеек (ambiguous cell assignment) – unclassified.

В результате проведенного моделирования была определена модель, отражающая такое сочетание породоспецифичных для мейшана SNP, которое позволило наилучшим образом отличить животных этой породы от других пород в рамках данной работы. В частности, модель включала в себя два SNP (ALGA0099778 и ASGA0049066) и имела следующие характеристики: adj. Balanced accuracy – 1, Sensitivity – 1, Specificity – 1, Cross Validation Consistency – 100/100.

Выводы. Таким образом, нами предложена и охарактеризована модель, включающая два SNP-маркера, с помощью которой имеется возможность с высокой точностью отличить чистопородных домашних свиней породы мейшан от особей пород крупная белая, ландрас, дюрок и пьетрен.

Полученные нами результаты могут лечь в основу создания панели SNP-маркеров для определения чистопородности особей породы мейшан подвида *Sus scrofa domestica*.

1. Кипень, В.Н. Выявление породоспецифичных SNP-маркеров для крупной белой породы домашних свиней с использованием полногеномных SRA-данных проектов NGS / В.Н. Кипень, С.А. Котова // Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 50-летию Вавиловского (ранее Всесоюзного) Общества генетиков и

- селекционеров: «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». – РФ, Москва. – 2016. – С.177;
2. Greene, C. Multifactor dimensionality reduction for graphics processing units enables genome-wide testing of epistasis in sporadic ALS // Bioinformatics. – 2010. – p.694-695;
 3. Ramos, AM Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing / Ramos AM, Megens HJ, Crooijmans RP [et al.] // Anim Genet. 2011 Dec;42(6):613-20. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02198.x. Epub 2011 Apr 25.

АДАПТАЦИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА К КРУПНОМАСШТАБНОМУ КУЛЬТИВИРОВАНИЮ В БИОРЕАКТОРЕ

Коровина Д.Г., Стаффорд В.В., Савченкова И.П.
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко»,
109428, Москва
E-mail: daryakorovina@gmail.com

Мультипотентные мезенхимные стеловые клетки (ММСК) сельскохозяйственных животных представляют собой перспективный клеточный материал для ветеринарной биотехнологии и вирусологии. Для эффективного накопления вирусов на чувствительных культурах ММСК, которые обладают сильно выраженными адгезивными свойствами *in vitro*, существует необходимость в поиске методов адаптации их культивирования в биореакторе. Системы культивирования на трехмерных носителях являются наиболее применяемыми для крупномасштабного культивирования адгезивных клеток млекопитающих, развитие и рост которых определяются прикреплённостью к твёрдому субстрату. Поэтому целью данных исследований была адаптация ММСК крупного рогатого скота (КРС) к трехмерному культивированию с использованием макропористых криогелей природного происхождения.

В экспериментах были использованы ММСК, выделенные ранее из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) КРС. В исследованиях также использовали мышинные фибробласты линии

СТО. Совместно с лабораторией криохимии (био)полимеров ИНЭОС РАН (д.х.н., проф. Лозинский В.И. и коллеги) были разработаны криогели, характерной морфологической особенностью которых являлась их макропористость, при этом поры были взаимосвязаны. Макропористые криогели с высокой упругостью и хорошей адгезией формировали из растворов природных полимеров, таких как желатин и белки плазмы крови КРС. Эти носители изготовлены из компонентов внеклеточного матрикса, который идеально подходит для адгезивной культуры ММСК. Использование природных биополимеров в создании дает возможность максимально имитировать строение и свойства тканей, а также создавать микроокружение со структурой, близкой к строению природных клеточных ниш. Это позволяет достигать наиболее эффективного заселения таких искусственных ниш ММСК, способствуя их пролиферации. Для гистологических анализов криогелей и полученных трехмерных структур использовали криомикротомные срезы. Носители закрепляли на столике криомикротомы Mikrom HM 525c помощью заливочной среды Neg-50, предварительно отжав от капиллярной жидкости, и замораживали в течение 30-40 мин при температуре от -15 до -22⁰С. Затем получали срезы толщиной 10-20 мкм, которые наносили на предметные стекла Surgipath X-tra Adhesive. Полученные срезы просушивали не менее 24 ч, далее окрашивали гематоксилином и эозином.

Макропористые криогели на основе коммерческого желатина типа В из кожи быка (Пат. 2594427 РФ) представляли собой упругие бело-прозрачные круглые диски с диаметром 2,2-3,5 см и высотой 0,2-0,7 см. Криогели из белков плазмы КРС имели цилиндрическую форму со следующими параметрами: диаметр 1 см, высота 0,6-1 см. Криогели на основе желатина имели крупные (80-130 мкм) взаимосвязанные поры, способные обеспечить незатрудненное проникновение клеток в толщу. Отличительной особенностью данных матриксов было градиентное уменьшение пор от периферии вглубь материала. Криогели на основе белков плазмы крови КРС также имели макропористую структуру, диаметр пор находился в диапазоне 70-170 мкм.

Методы загрузки носителей были условно разделены на два подхода: статические и динамические. Для исследования совместимости матриксов с линией СТО и ММСК, выделенных из КМ и ЖТ КРС, клетки рассеивали в 12-луночные планшеты и выращивали до формирования монослоя. Кусочки криогелей,

подготовленные в асептических условиях, помещали на поверхность клеточного монослоя, слегка придавливая, и культивировали в стандартных условиях в течение 10 сут. Гистологический анализ на 10-е сут культивирования выявил распространение клеток линии STO в объеме матриксов на основе плазмы и желатина на расстояние приблизительно 1300 и 1200 мкм, соответственно. ММСК, выделенные из ЖТ, распространились в матриксах из плазмы крови КРС на 600 мкм, при этом в желатиновых носителях клетки не были выявлены. ММСК, выделенные из КМ, не были способны мигрировать во все типы указанных матриксов при данном методе загрузки. Возможно, статический метод загрузки не подходит для насыщения матриксов клетками ММСК с целью получения трехмерных культур *in vitro*.

В связи с этим дальнейшее насыщение макропористых криогелевых носителей проводили с использованием динамического метода. Для этого клеточную суспензию с концентрацией 3×10^6 , 6×10^6 и 9×10^6 клеток наносили на отжатый от капиллярной жидкости матрикс. В результате быстрого набухания губчатого материала суспензия клеток всасывалась капиллярными силами во внутреннее пространство пор. Эффективность введения клеток в трехмерные матриксы определяли по разности между количеством клеток в исходной суспензии и их количеством после процедуры введения в криогелевый носитель, отнесенной к исходному количеству клеток. Насыщение матрикса из плазмы составило $99,43 \pm 0,56\%$, матрикса из желатина - $98,50 \pm 1,17\%$. Носители насыщались клетками в течение 2-х ч при $t = 37^\circ\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе, после чего переносились в пробирки-биореакторы объемом 50 мл с необработанной поверхностью и газопроницаемыми крышками. Гистологический анализ образцов проводили в динамике, на 7-е и 14 сут культивирования. Было установлено, что при динамическом методе насыщения концентрация клеток не менее 6×10^6 на 1 см^3 является наиболее оптимальной для всех типов матриксов. Этот метод загрузки позволяет эффективно заселять макропористые криогели для их успешного прекультивирования в течение как 7-и сут, так и 14-и сут.

Таким образом, использование макропористых криогелей, представленных желатином и плазмой крови, позволяет адаптировать адгезивную культуру ММСК КРС к крупномасштабному культивированию в биореакторе.

СТРУКТУРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА FRIGIDA В КОНТЕКСТЕ ЭВОЛЮЦИИ РАЗНООБРАЗНЫХ ЖИЗНЕННЫХ ФОРМ BRASSICACEAE.

Фадина О. А.

***ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 127550,
Москва,***

Тимирязевская ул., 42

E-mail: fadinaokcaha@gmail.com

В регуляции перехода арабидопсиса к цветению под влиянием пониженных температур участвуют гены FLOWERING LOCUS C (FLC) и FRIGIDA (FRI), и взаимодействие сильных и слабых аллелей этих генов во многих случаях объясняет полиморфизм растений по времени зацветания. Культурные виды Brassicaceae представлены сильно различающиеся по времени зацветания жизненными формами, однако, несмотря на большое экономическое значение этих видов, строение и функции гомологов гена FRI у них недостаточно исследованы.

Мы изучили структурный полиморфизм гена FRIGIDA в контексте эволюции разнообразных жизненных форм Brassicaceae с целью выявления наиболее вариабельных участков, ассоциированных с изменением времени перехода к цветению.

Для выделения и структурного анализа последовательностей гомологов FRIGIDA *A. thaliana* поздноцветущего экотипа H51 в геномах Brassicaceae мы из всех доступных баз данных извлекли аннотированные и неаннотированные фрагменты и полноразмерные последовательности FRI семейства Brassicaceae и клонировали полноразмерные последовательности FRI из *Raphanus sativus* и шести культурных видов Brassica.

В результате анализа полученных последовательностей было выявлено, что у всех членов семейства Brassicaceae ген FRIGIDA представлен одной копией, кроме представителей культурных видов Brassica, где ген представлен двумя локусами FRI.a и FRI.b (81% сходства). У *C. sativa* ген FRIGIDA представлен тремя разными локусами, на 9, 11 и 18 хромосомах (94-96% сродства). Филогенетический анализ последовательностей FRIGIDA Brassicaceae показал отчетливое разделение линии Brassicaceae I и II, трибы внутри каждой линии и локусы FRI.a и FRI.b в пределах рода Brassica. В отличие от диких видов Brassicaceae (линия I), где ген FRI представлен одной копией, у культурных видов Brassica и *Raphanus* (линия II) ген FRI представлен двумя локусами FRI.a и FRI.b.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей FRIGIDA Brassicaceae показал, что все последовательности имеют центральный консервативный домен Frigida и вариабельные С- и N- концевые области. Структура белка FRIGIDA содержит биспиральные coiled-coil домены. У всех белков FRIGIDA Brassicaceae сохранился coiled-coil домен в С-концевой области, критичной для функциональной активности белка. У представителей культурных форм Brassicaceae линии II в N-концевой области белка образование такой структуры не обнаружено или имеет низкую вероятность. Множественные аминокислотные полиморфизмы в первой части белка (N-концевая область) в основном носят адаптивный характер и поддерживаются положительной селекцией и следовательно эта область является интересной для поиска полиморфизмов, ассоциированных с изменением времени перехода к цветению. При сравнении N-концевых областей аминокислотных последовательностей FRIGIDA из культурных форм *B. nigra* различных регионов произрастания и FRIGIDA из растений *R. sativus* контрастных по времени зацветания мы не обнаружили полиморфизмы, которые предположительно могли бы быть ассоциированы с изменением временем цветения. Авторы благодарят центр коллективного пользования оборудованием “Биотехнология” ВНИИСБ за секвенирование последовательностей фрагментов генома Brassica. Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ № 16-34-01371.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОГЕНЕЗА АШВАГАНДЫ (WITHANIA SOMNIFERA) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO <i>Алрашиди А.А.</i>	5
ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ГРУППЫ ФТОРХИНОЛОНОВ И ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS НА МИКРОБИОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ПТИЦ <i>Дубровин А.В.</i>	7
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА SSCP ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ВИРУЛЕНТНОСТИ AVR2 RHYNTOHORA INFESTANS (MONT.) DE BARY В ПОПУЛЯЦИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Чижик В.К.</i>	10
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ <i>Бочкарев В.С.</i>	11
ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЭМБРИОНОВ И ЛИЧИНОК ДАНИО РЕРИО (DANIO RERIO) <i>Полтева Е.А., Козикова Л.В.</i>	14
СТРУКТУРА, ФИЛОГЕНИЯ И ЭКСПРЕССИОННЫЕ ПАТТЕРНЫ НОВЫХ ГЕНОВ-ГОМОЛОГОВ УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА ДИКОРАСТУЩИХ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ВИДОВ ТОМАТОВ (SOLANUM SECTION LYCOPERSICON) <i>Слугина М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.</i>	16
ПЕРЕДАЧА МУТАЦИИ Rn1b В СОРТ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ КРАСНОДАРСКАЯ 99 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ <i>Миков Д.С., Давоян Э.Р., Давоян Р.О., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М.</i>	17
ИНДУКЦИЯ РТИ (PATTERN-TRIGGERED IMMUNITY) И ТРАНСКРИПЦИОННОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ В ПРОЦЕССЕ ПЕРСИСТЕНТНОЙ АЛЛЕКСИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ <i>Архинов А.В.</i>	19

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ АЛЛЕЛОФОНДА И ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ТРЕХ ПОПУЛЯЦИЯХ РОМАНОВСКИХ ОВЕЦ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ	22
<i>Денискова Т.Е., Соловьева А.Д., Зиновьева Н.А.</i>	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПАСПОРТИЗАЦИЯ ГЕНОТИПОВ ЛОШАДЕЙ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТАМ ДНК	24
<i>Гавриличева И.С., Блохина Н.В., Храброва Л.А., Царёва М.А.</i>	
СОЗДАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ КДНК ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА, ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ	27
<i>Белова Н.В., Кутыин И.В., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Трубицына Т.П., Максименко С.В., Рябых В.П.</i>	
ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИЛОКУСНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ СИСТЕМ АНАЛИЗА ДЛЯ РАЗЛИЧЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СОРГО (SORGHUM)	30
<i>Мицурова В.С., Анискина Ю.В., Шилов И.А.</i>	
ГЕНЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ МАСТЬ ЛОШАДИ, КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В КОНЕВОДСТВЕ	33
<i>Курская В.А.</i>	
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА	35
<i>Кочина Е.А., Шумилина Д.В.</i>	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ПИРОПЛАЗМИДОЗОВ ЛОШАДЕЙ	37
<i>Калашиникова Т. В.</i>	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ В ПРОМОТОРЕ PRO-SMAMP1 ИЗ STELLARIA MEDIA РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ЕГО ИНДУЦИБЕЛЬНОСТЬ В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА ПРИ АТАКЕ ФИТОПАТОГЕНОВ	40
<i>Маджарова Н.В., Зайцев Д.В., Комахин Р.А.</i>	
РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА СОРТОВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (RIBES NIGRUM L.)	42
<i>Пикунова А.В., Князев С.Д.</i>	

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ ГЕНОМА МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ МЕЖДУ ALLIUM CERA L. И ALLIUM FISTULOSUM L. УСТОЙЧИВЫХ К СТЕМФИЛИОЗУ (STEMPHYLLIUM VESICARIUM) ИСПОЛЬЗУЯ GISH АНАЛИЗ <i>Кудрявцева Н.А., Хрусталева Л.И.</i>	45
СТАБИЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА I329L ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В КЛЕТКАХ СНО <i>Каторкин С.А., Каторкина Е.И., Мима К.А., Титов И.А., Малоголовкин А.С.</i>	46
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ A238L И I329L ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ <i>Шкаликова М.В., Титов И.А., Малоголовкин А.С.</i>	48
РЯСКА МАЛАЯ (LEMNA MINOR L.), КАК ЭКСПРЕССИОННАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГКСФ) <i>Аликина О.В., Тарасенко И.В., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В.</i>	50
РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ГЕНОМА КРС ДЛЯ КОНТРОЛЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ГАПЛОТИПОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАРУШЕНИЕМ ФЕРТИЛЬНОСТИ <i>Пантюх К.С., Рукин И.В., Груздев Д.С.</i>	52
РАЗРАБОТКА ВСЕРОССИЙСКОЙ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОЙ ОЦЕНКИ ПЛЕМЕННОЙ ЦЕННОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МОЛОЧНЫХ ПОРОД <i>Рукин И.В., Груздев Д.С., Пантюх К.С., Рысина М.С., Князева Т.А., Щеглов М.Е.</i>	54
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ РИСА (ORYZA SATIVA) PI-TA И PI-B МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ <i>Шалаева Т.В., Колобова О.С., Шилов И.А</i>	55

ОЦЕНКА ОДНОРОДНОСТИ И ГИБРИДНОСТИ СЕЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ СОРГО (SORGHUM) ПОСРЕДСТВОМ МУЛЬТИЛОКУСНОГО МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА <i>Родионова Д.А., Анискина Ю.В., Шилов И.А.</i>	58
СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА 5-ГО СЕРОТИПА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T7 <i>Ожаровская Т.А., Данилюк А.В., Картусев А.Г., Зубкова О.В.</i>	61
РАЗРАБОТКА УЛУЧШЕННЫХ МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ НА ПОВЫШЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ АНТОЦИАНОВ, СКОРОСПЕЛОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИРУСНЫМ БОЛЕЗНЯМ <i>Волобова В.А. , Хабарова Л.Н. , Пастухов С.А. , Полякова М.Н.</i>	63
РАЗРАБОТКА СРЕДСТВ ТИПИРОВАНИЯ ЭПИЗООТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ РОССИИ СЕРОТИПОВ ВИРУСА БЛЮТАНГА <i>Кольцов А.Ю.</i>	64
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ PLUG МАРКЕРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ СЕЛЕКЦИИ КНИИСХ. <i>Соколов П. А.</i>	67
СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОСНОВНЫХ ХВОЙНЫХ ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ПОРОД РФ В ЦЕЛЯХ УСТАНОВЛЕНИЯ ФАКТОВ НЕЗАКОННЫХ РУБОК <i>Волков В.А.</i>	69
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TOZ19 У POPULUSSP <i>Ульянич П.С.</i>	72
РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТРОМБОПАТИИ (ТР) У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА СИММЕНТАЛЬСКОЙ ПОРОДЫ <i>Филипченко А.А., Форнара М.С., Костюнина О.В., Сермягин А.А., Зиновьева Н.А.</i>	74
СОЗДАНИЕ ГОМОЗИГОТНЫХ ЛИНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ МЕТОДОМ ГАПЛОИДИИ <i>Сащенко М.Н., Подвигина О.А.</i>	77

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА У ЛАКТИРУЮЩИХ ТРАНСГЕННЫХ КРОЛЬЧИХ	80
<i>Кутыин И.В., Белова Н.В., Езерский В.А., Максименко С.В., Трубицына Т.П., Колоскова Е.М., Рябых В.П.</i>	
ПОИСК В ПРОМОТОРЕ PRO-SMAMP2 ИЗ STELLARIA MEDIA РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ЕГО АКТИВАЦИЮ В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА ПРИ АТАКЕ ФИТОПАТОГЕНОВ	83
<i>Казакова К.А., Зайцев Д.В., Комахин Р.А.</i>	
ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА RT-GFP В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЯХ NICOTIANA TABACUM L. МЕТОДАМИ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ И СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИИ	86
<i>Назарова М.С., Агеева М.Н., Ралдугина Г.Н., Беляев Д.В., Брилкина А.А.</i>	
СКРИНИНГ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ НА НАЛИЧИЕ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К СЕТЧАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЕВ	87
<i>Астапчук И. Л., Репко Н.В., Зеленский Г.Л.</i>	
СКРИНИНГ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВИДОВ PICEA L.	91
<i>Ковальков А.В., Волков В.А., Григорьева Е.А.</i>	
БИОХИМИЧЕСКОЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГАПЛОИДНЫХ РЕГЕНЕРАНТОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO	92
<i>Карпеченко Н. А., Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П., Землянухина О.А.</i>	
МОРФОГЕНЕЗ STEVIA REBAUDIANA В КУЛЬТУРЕ IN VITRO	93
<i>Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П.</i>	
СОРТОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ ДНК ТОПОЛЕЙ И ОСИН	95
<i>Кондратьева А.М., Ржевский. С.Г., Федулова Т.П.</i>	

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛАТФОРМЫ ION TORRENT (PGM) ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА <i>Сыромятников М.Ю., Савинкова А.В., Паневина А.В., Попов В.Н.</i>	98
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА СВЁКЛЫ <i>Федорин Д.Н., Федулова Т.П.</i>	100
РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИИ ЦВС-2 МЕТОДОМ ПЦР <i>Кудин. К.В., Кудина И.В., Прокулевич В.А.</i>	103
АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С ГЕНОМ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА БОМБИНИНА <i>Фурс О.В., Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Шевчук Т.В., Дьяченко О.В., Бурьянов Я.И.</i>	106
ДНК-МАРКЕРЫ ГЕНА VF УСТОЙЧИВОСТИ ЯБЛОНИ (MALUS MILL.) К ПАРШЕ (VENTURIA INAEQUALIS (СКЕ.) WINT) <i>Должикова М.А., Пикунова А.В., Седов Е.Н.</i>	108
ИЗУЧЕНИЕ ИССОПА ЛЕКАРСТВЕННОГО (HYSSOPUS OFFICINALIS L.) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO <i>Кучина Т.Г., Лебедев И.К., Калашникова Е.А.</i>	110
ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ -А И –Г ОВЕЦ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ E. COLI <i>Острикова К.В., Потапович М.И., Прокулевич В.А.</i>	112
АНАЛИЗ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ESCSDP3 В ПРОЦЕССЕ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЯ <i>Шамустакимова А.О.</i>	113
АНАЛИЗ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ ДНК ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО МАРКИРОВАНИЯ <i>Александров О.С., Киров И.В.</i>	115

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА СИНДРОМА ЛАВАНДОВЫХ ЖЕРЕБЯТ <i>Калинкова Л.В., Шемарыкин А.Е.</i>	117
ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ МЕЗОФИЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ЛИСТА КАРТОФЕЛЯ (SOLANUM TUBEROSUM) <i>Куприна К.А., Князев А.Н.</i>	119
ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ 6–БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЮ У ГИБРИДОВ РИСА <i>Савенко Е.Г., Кострюкова Э.Н., Глазырина В.А., Гончарова Ю.К.</i>	121
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ХРОМОСОМЫ ЯЧМЕНЯ HORDEUM MARINUM SUBSP. GUSSONEANUM HUDSON 4X У ЗАМЕЩЕННЫХ ЛИНИЙ И ВЛИЯНИЕ ЗАМЕЩЕНИЯ ХРОМОСОМ СЕДЬМОЙ ГОМЕОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРИОДА ВСХОДЫ-КОЛОШЕНИЕ <i>Чуманова Е.В., Ефремова Т.Т., Арбузова В.С., Трубачеева Н.В.</i>	124
БЕЗОПАСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ БАКУЛОВИРУСОВ <i>Охлопкова О.В., Моисеева А.А., Хлестун И.В., Худеева К.А., Петрова Т.А., Колосов А.В.</i>	127
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА РЫБ СЕМЕЙСТВА ЛОСОСЕВЫЕ <i>Ильина Л.А., Йылдырым Е.А., Филиппова В.А., Дубровин А.В., Дубровина Е.Г., Никонов И.Н., Новикова Н.И., Лаптев Г.Ю.</i>	130
МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАНЕЛИ ПОРОДОСПЕЦИФИЧНЫХ SNP-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСТОПОРОДНОСТИ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ ПОРОДЫ ПЬЕТРЕН <i>Снытков Е.В., Кипень В.Н.</i>	133
МОНИТОРИНГ ГМ-ПРОДУКЦИИ, ПОСТУПИВШЕЙ НА РОССИЙСКИЙ РЫНОК В 2016 Г. <i>Кондратьева Н.С., Коробкова М.Ю., Гузеева А.А., Капитова И.А.</i>	136
ВЛИЯНИЕ НАСЛ-ЗАСОЛЕНИЯ НА ДЫХАТЕЛЬНЫЙ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ CO₂-ГАЗООБМЕН РАСТЕНИЙ ТОМАТА В УСЛОВИЯХ IN VITRO <i>Богоутдинова Л.Р., Халилуев М.Р.</i>	139

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С РАЗНОЙ СКОРОСТЬЮ АДГЕЗИИ К БЕЛКАМ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА <i>Кашиanova И.С., Чивилев И.В., Косовский Г.Ю.</i>	141
МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАНЕЛИ ПОРОДОСПЕЦИФИЧНЫХ SNP-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСТОПОРОДНОСТИ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ ПОРОДЫ МЕЙШАН <i>Кипень В.Н.</i>	142
АДАПТАЦИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА К КРУПНОМАСШТАБНОМУ КУЛЬТИВИРОВАНИЮ В БИОРЕАКТОРЕ <i>Коровина Д.Г., Стаффорд В.В., Савченкова И.П.</i>	145
СТРУКТУРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА FRIGIDA В КОНТЕКСТЕ ЭВОЛЮЦИИ РАЗНООБРАЗНЫХ ЖИЗНЕННЫХ ФОРМ BRASSICACEAE. <i>Фадина О. А.</i>	148

Научное издание

**17-я Всероссийская молодежная научная конференция
«Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и
ветеринарии»**

Сборник тезисов

17 Всероссийской молодежной научной конференции
«Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и
ветеринарии»

посвященной памяти академика РАСХН

Георгия Сергеевича

МУРОМЦЕВА

г. Москва, 6-7 апреля 2017 г.,

ФГБНУ ВНИИСБ

Отпечатано в печатном салоне «Сервис Принт»

г. Москва, ул. Прянишникова, д.31А

www.serviceprint.ru

Тираж 80 экз.