

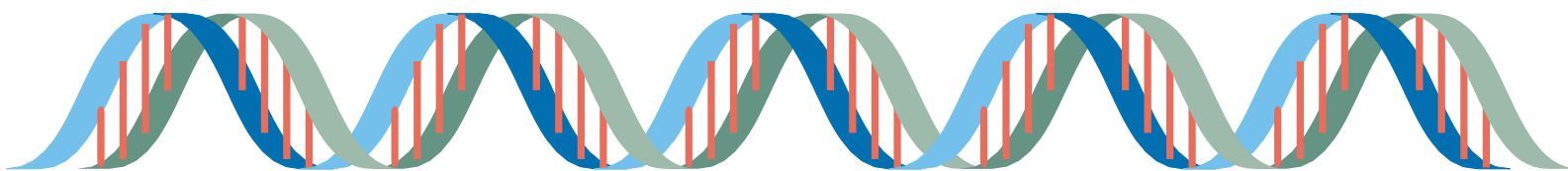


ФГБНУ ВНИИСБ
Курчатовский геномный центр - ВНИИСБ



XX Всероссийская конференция молодых ученых
«Биотехнология в растениеводстве,
животноводстве и сельскохозяйственной
микробиологии»

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ КОНФЕРЕНЦИИ
(в дистанционном формате)



27-29 октября 2020 г.
Москва

Посвящается
памяти академика РАСХН Георгия
Сергеевича Муромцева

В рамках соглашения
о создании и развитии центра
геномных исследований
мирового уровня
«Курчатовский геномный центр»

XX научная конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии»



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ
И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ФГБНУ ВНИИСБ

Конференция проводится на основании Соглашения от «31» октября 2019 г. № 075-15-2019-1667 о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации на осуществление государственной поддержки создания и развития центра геномных исследований мирового уровня «Курчатовский геномный центр» в рамках реализации федерального проекта «Развитие научной и научно-производственной кооперации» национального проекта «Наука»

ГЕНЕРАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ



Официальный спонсор



Спонсор



ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР
ООО «НАУЧНЫЙ СЕРВИС»

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

XX ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ

**«БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ,
ЖИВОТНОВОДСТВЕ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ»**

27-29 октября 2020 г.

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

Москва – 2020

УДК 663.18(063); 606; 573.6; 57.088

ББК 30.16

Авт.знак Б63

ISBN 978-5-6044756-7-6

«Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии»: 20-я Всероссийская конференция молодых учёных (Москва, 27-29 октября 2020 г., ФГБНУ ВНИИСБ), сборник тезисов докладов. – М.: ФГБНУ ВНИИСБ, 2020. – 188 с.

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

20-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.

Конференция проводится на основании Соглашения от «31» октября 2019 г. № 075-15-2019-1667 о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации на осуществление государственной поддержки создания и развития центра геномных исследований мирового уровня «Курчатовский геномный центр» в рамках реализации федерального проекта «Развитие научной и научно-производственной кооперации» национального проекта «Наука».

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

© ФГБНУ ВНИИСБ, 2020 г.

Оглавление

СЕКЦИЯ «БИОИНФОРМАТИКА И ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ»	12
ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ И ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА-ГОМОЛОГА <i>ITC2</i> У ЛУКА-ПОРЕЯ (<i>ALLIUM PORRUM</i> L.) Анисимова О.К. ¹ , Филюшин М.А. ²	13
СБОРКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕФЕРЕНСА РОДСТВЕННОГО ВИДА НА ПРИМЕРЕ ГЕНА <i>D53 DASYPYRUM VILLOSUM</i> Баженов М. С.	14
АНАЛИЗ РЕПИТОМА <i>SHEPHERDIA ARGENTEA</i> (PURSH) NUTT. Боне К.Д. ^{1,2} , Разумова О.В. ¹ , Киров И.В. ¹ , Карлов Г.И. ¹	16
АНАЛИЗ РЕТРОТРАНСКРИПТОМА И РЕТРОПРОТЕОМА <i>A. THALIANA</i> НА ОСНОВЕ ДАННЫХ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ Гварамия С. ^{1*} , Меркулов П. ¹ , Омаров М. ^{1,2} , Киров И. ¹	17
ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГОМОЛОГОВ ГЕНОВ <i>PM19L</i> , <i>CML31</i> и <i>AOS2</i> В ОБЛУЧЕННЫХ СОРТАХ ЯЧМЕНЯ Горбатова И.В., Казакова Е.А., Волкова П.Ю.	18
ПОИСК ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СРОКИ НАЧАЛА ЦВЕТЕНИЯ ГУАРА (<i>CYAMOPSIS TETRAGONOLOBA</i> (L.) TAUB.), С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СЕТЕЙ Григорьева Е.А. ^{1,2*} , Архимандритова С.Б. ³ , Беатович А. ² , Потокина Е.К. ¹	20
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА УРОВНЕ ИЗОФОРМ Меркулов П.Ю. ¹ , Гварамия С.А. ¹ , Омаров М.Р. ^{1,2} , Киров И.В. ¹	21
NANOTRF: ПРОГРАММА ДЛЯ <i>DE NOVO</i> ПОИСКА ВЫСОКОКОПИЙНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ В ДАННЫХ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК РАСТЕНИЙ Колганова Е.И. ¹ , Муравенко О.В. ² , Киров И.В. ¹	22
АНАЛИЗ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДНК В ГЕНОМАХ ПОЛИПЛОИДНЫХ ДИКОРАСТУЩИХ ЗЛАКОВ ИЗ РОДА <i>TRINOPYRUM</i> Никитина Е.А.	24
RETRANSDB – БАЗА ДАННЫХ АННОТИРОВАННЫХ ТРАНСКРИПТОВ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ РАСТЕНИЙ Омаров М.Р. ^{1,2} , Киров И.В. ¹	25
ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ <i>Ledum palustre</i> L. (<i>Rhododendron tomentosum</i>) МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ Разгонова М.П. ^{1,2} , Дербуш И.В. ¹ , Чунихина О.А. ¹ , Наврость О.Г. ¹ , Захаренко А.М. ^{1,2} , Пикула К.С. ^{1,2} , Голохваст К.С. ^{1,2,3}	26
ПОИСК ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОМА КОНОПЛИ ПОСЕВНОЙ (<i>CANNABIS</i> <i>SATIVA</i> L.) Романов Д.В.	28
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ В СОЗДАНИИ НОВОГО ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ТЫКВЕННЫХ КУЛЬТУР <i>ACIDOVORAX CITRULLI</i> Словарева О.Ю. ¹ , Старикова Е.В. ^{1,2}	29
РОЛЬ МЕТИОНИНОВОГО ЦИКЛА В ФОРМИРОВАНИИ ОТВЕТА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА Y-ВИРУС КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ Спеченкова Н.А., Фесенко И.А., Князев А.Н., Махотенко А.В., Глушкевич А.И., Мамаева А.С., Калинина Н.О., Тальянский М.Э.	31
РАСШИФРОВКА ГЕНОМА ГУАРА (<i>CYAMOPSIS TETRAGONOLOBA</i> (L.) TAUB.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВТОРОГО И ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ Ульянич П.С. ^{1,2,3} , Григорьева Е.А. ^{1,3,4} , Беатович А. ⁴ , Волков В.А. ^{1,3} , Потокина Е.К. ^{1,3}	33
ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ГДФ-Л-ГАЛАКТОЗОФОСФОРИЛАЗЫ (<i>GGPI</i>) В ЛИСТЬЯХ ЛУКА-ПОРЕЯ В ОТВЕТ НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС. Филюшин М.А., Анисимова О.К., Дьяченко Е.А.	34
СЕКЦИЯ «ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ»	36
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ НОВОГО ПРОМОТОРА <i>pro-Sm-AMPX</i> ИЗ РАСТЕНИЯ <i>STELLARIA MEDIA</i> Иванова Л.А., Комахин Р.А.	37

ВЫБОР ГЕНОВ СИНТЕЗА КРАХМАЛА ПШЕНИЦЫ КАК МИШЕНЕЙ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ Кругин П.Ю.	39
ИЗУЧЕНИЕ СЕРОТИП-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Кольцов А.Ю., Сухер М.М., Белов С.В., Крутько С.А., Кольцова Г.С.	40
АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИИ МУТАНТОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ РАСТЕНИЙ ПОСЛЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ПО ГЕНУ <i>NUD</i> У ЯЧМЕНЯ Короткова А.М. ¹ , Колосовская Е.В. ¹ , Герасимова С.В. ¹ , Кукоева Т.В. ¹ , Хлесткина Е.К. ^{1,2}	42
АНАЛИЗ ПРОНИКАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НАНОЧАСТИЦ В ПЫЛЬЦЕВЫЕ ЗЕРНА ЛУКА РЕПЧАТОГО Мардини М. ¹ , Ермолаев А. С. ¹ , Пивоваров А.М. ¹ , Яковцева М.Н. ² , Хрусталёва Л.И. ^{1,3}	43
ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ КАСПАЗЫ-3 БЕЛКОМ 5EL (A238L) ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ Нефедьева М.В., Титов И.А., Малоголовкин А.С.	44
ВЛИЯНИЕ ОДИНОЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ВИРУСНОГО БЕЛКА VPg НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ФАКТОРАМИ ИНИЦИИИ ТРАНСЛЯЦИИ eIF4E КАРТОФЕЛЯ (<i>Solanum tuberosum</i>) Ражина О.Л. ^{1,2} , Лебедева М.В. ¹	46
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА МИКСОМЫ КРОЛИКОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО БЕЛОК VP60 ВИРУСА ВГБК-2 Сухер М.М., Кольцов А.Ю., Белов С.В., Кольцова Г.С.	46
РОЛЬ МУЛЬТИГЕННОГО СЕМЕЙСТВА 110 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В АКТИВАЦИИ ЭФФЕКТОРНОЙ КАСПАЗЫ-3 Титов И.А., Нефедьева М.В., Малоголовкин А.С.	47
ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНА <i>SENH3</i> ПОДСОЛНЕЧНИКА (<i>HELIANTHUS ANNUUS</i> L.) С ПОМОЩЬЮ ТРАНСФЕКЦИИ ПРОТОПЛАСТОВ РИБОНУКЛЕИНОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ Уварова А.Г. ¹ , Гарибян Ц.С. ¹ , Киров И.В. ^{1,2}	49
БИРЕПОРТЕРНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ ОЦЕНКИ РАБОТЫ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ Фридман В.А., Кабардаева К.В., Сухорукова А.В., Фадеев В.С., Тюрин А.А.	50
СЕКЦИЯ «КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ»	52
ПОЛУЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ И ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> БАЗИЛИКА ЛИМОННОГО (<i>OCIMUM</i> × <i>AFRICANUM</i> LOUR.) СОРТА ЛИМОННЫЕ ДОЛЬКИ Алексеева Е.В., Козлова В.А., Чередниченко М.Ю.	53
О ПЕРВЫХ ЭТАПАХ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ Блинков А.О. ^{1,2}	54
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОЦВЕТИЙ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП <i>IN VITRO</i> Ганаева Д.Р., Десятерик А.А., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н.	56
БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ УСКОРЕННОГО СОЗДАНИЯ СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА РИСА <i>ORYZA SATIVA</i> L. Глазырина В.А., Савенко Е. Г., Шундрин Л.А.	58
ВЛИЯНИЕ ЗЕАТИНА НА <i>IN VIVO</i> РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК <i>PETUNIA HYBRIDA</i> L. В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ Демьянчук И.С. ¹ , Захарова Е.В. ^{1,2,3} , Ковалева Л.В. ³	59
ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ <i>HELIANTHUS TUBEROSUS IN VITRO</i> Долотенко К.Е., Ратинская Л., Калашникова Е.А.	60
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММА «ВНИИЗЖ» С ПРОИЗВОДСТВЕННЫМИ ШТАММАМИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ RABV Доронин М.И. ¹ , Стариков В.А. ¹ , Михалишин Д.В. ¹	62
ВЛИЯНИЕ АБК И ИНГИБИТОРА ЕЕ СИНТЕЗА ФЛУРИДОНА НА РОСТ НЕСОВМЕСТИМЫХ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК <i>PETUNIA HYBRIDA</i> L. <i>IN VIVO</i> В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ Зинкевич В.В. ¹ , Фатеев А.Д. ¹ , Захарова Е.В. ^{1,2} , Ковалева Л.В. ³	63
ИССЛЕДОВАНИЕ СУСПЕНЗИОННОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ <i>PODOPHYLLUM PELTATUM</i> МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ Китаева М.П. ¹ , Федотчева Т.А. ^{1,2}	65

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ ПОДСОЛНЕЧНИКА Константинов З.С. ¹ , Гарибян Ц.С. ²	66
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ <i>IN VITRO</i> МЕЛИССЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (<i>MELISSA OFFICINALIS</i> L.) СОРТА ИСИДОРА Кухта Е.С., Фридман В.А., Чередниченко М.Ю.	67
ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РАЗМНОЖЕНИЕ <i>AMOMUM AROMATICUM</i> Roxb. <i>IN VITRO</i> Кхуат Ван Куэт ¹ , Нгуен Тхи Хай ² , Калашникова Е.А. ¹ , Киракосян Р.Н. ¹	69
ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ КЛОНИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ СЛИЯНИЯ И АКТИВАЦИИ Лопухов А.В., Шедова Е.Н.	71
ЭФФЕКТЫ ЭЛИСИТОРОВ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА АНТИРАДИКАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК <i>ECHINACEA</i> <i>PURPUREA</i> L. MOENCH Нестер Г.В., Дитченко Т.И.	72
ГАПЛОИДИЯ НА ШНИТТ-ЛУКЕ (<i>ALLIUM SCHOENOPRASUM</i> L.) ЧЕРЕЗ ГИНОГЕНЕЗ Романова О.В., Середин Т.М., Романов В.С.....	74
АКТИВНОСТЬ КАСПАЗО-ПОДОБНОЙ ПРОТЕАЗЫ В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ (<i>PETUNIA HYBRIDA</i> L.) Соболев Д.С. ¹ , Фатеев А.Д. ¹ , Захарова Е.В. ²	76
УРОВЕНЬ СТЕРОИДНЫХ И ГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ В ЖИДКОСТИ ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ <i>BOS TAURUS</i> Станиславович Т.И., Кузьмина Т.И.	77
ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДОНОРСКИХ ООЦИТОВ <i>BOS TAURUS</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА Татарская Д.Н. ¹ , Кузьмина Т.И. ²	79
ВЛИЯНИЕ АМИНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ (АОА), ИНГИБИТОРА СИНТЕЗА АЦК (ЭТИЛЕНА), НА РОСТ <i>IN VIVO</i> НЕСОВМЕСТИМЫХ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК <i>PETUNIA</i> <i>HYBRIDA</i> L. Фатеев А.Д. ¹ , Зинкевич В.В. ¹ , Захарова Е.В. ^{1,2,3} , Ковалева Л.В. ³	81
ОЦЕНКА КОМПЕТЕНТНОСТИ К ЭМБРИОНАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ ООЦИТОВ <i>BOS TAURUS</i> ПОСЛЕ ИНТРА- ИЛИ ЭКСТРА-ОВАРИАЛЬНОЙ ВИТРИФИКАЦИИ Чистякова И.В., Кузьмина Т.И.	82
ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ <i>MEDICAGO</i> <i>DAGHESTANICA</i> RUPR. Ширнина И.В. ¹ , Ширнин С.Ю. ²	84
СЕКЦИЯ «МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ».....	86
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛЛЕЛОФОНДА СОВРЕМЕННЫХ И ИСТОРИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ЯРОСЛАВСКОЙ И ХОЛМОГОРСКОЙ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО МИКРОСАТЕЛЛИТАМ Абдельманова А.С. ¹ , Мишина А.И. ¹ , Волкова В.В. ¹ , Доцев А.В. ¹ , Сермягин А.А. ¹ , Чинаров Р.Ю. ¹ , Боронецкая О.И. ² , Петрикеева Л.В. ² , Брем Г. ^{1,3} , Зиновьева Н.А. ¹ 87	
РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОПОЛЯ БЕЛОГО, ТОПОЛЯ БОЛЛЕ И ОСИНЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА ОБЩИХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ Александров О.С.	88
АССОЦИАЦИЯ SNPS RS1449103 И ST2-1 С ПРИЗНАКАМИ ЯЙЦА КУРИЦЫ-НЕСУШКИ Баркова О.Ю.	90
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ЦВЕТОВОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦВЕТА МЯСА И ШПИКА ПОМЕСНОГО ПОГОЛОВЬЯ А.А. Белоус, А.А. Сермягин, О.В. Костюнина, Н.А. Зиновьева.....	91
АССОЦИАЦИЯ ГЕНА МИОСТАТИНА С ПРОДУКТИВНЫМИ ПРИЗНАКАМИ БРОЙЛЕРОВ Ветох А.Н., Герман Н.Ю., Прытков Ю.А.	92
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СУБЪЕДИНИЦ ГЛЮТЕНИНОВ У НЕКОТОРЫХ ОБРАЗЦОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ МЕТОДОМ SDS-PAGE Груздев И.В. ^{1,2} , Дудников М.В. ¹ , Соловьев А.А. ^{1,3}	93
ПОИСК QTL И ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ИНТЕНСИВНОСТЬЮ РОСТА ОВЕЦ, НА ОСНОВЕ GWAS Денискова Т.Е., Петров С.Н., Доцев А.В., Сермягин А.А., Форнара М.С., Зиновьева Н.А.....	95

АЛЛЕЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНА ЭТИЛЕН ЗАВИСИМОЙ ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ <i>MD-PGI</i> В НОВОМ ГИБРИДНОМ ГЕНОФОНДЕ ЯБЛОНИ (<i>MALUS MILL.</i>) ВНИИСПК Должикова М. А. аспирант, Пикунова А. В. канд. б. н., Толпекина А.А., Седов Е. Н., академик РАН	97
ПРОЯВЛЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ КАЧЕСТВ ЗЕРНА ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ У РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПО ЗАПАСНЫМ БЕЛКАМ Ермоленко О.И. ¹ , Груздев И.В. ² , Турбаев А.Ж. ³ , Колмыкова Л.П. ¹ , Кузнецова Н.Л. ¹ , Соловьев А.А. ^{1,2}	99
АЛЛЕЛЬНЫЙ ПЛИМОРФИЗМ ГЕНА ФИТОИНСИНТАЗЫ <i>SIPSY1</i> И БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ЛИКОПИНА И БЕТА-КАРОТИНА У СОВРЕМЕННЫХ СОРТОВ ТОМАТА ОВОЩНОГО (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i>) Ефремов Г.И. ¹ , Тукусер Я.П. ² , Слугина М.А. ¹	101
ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИМОРФИЗМА H3GA0051811 ГЕНА НЕРН ДЛЯ ОСОБЕЙ ВИДА <i>SUS SCROFA</i> – АНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ KASP Кипень В.Н. ¹ , Снытков Е.В. ² , Патрин М.М. ³	102
ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЗЦОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ ПО ГЕНУ <i>WBM</i> Коленков М.А. ¹ , Дудников М.В. ¹ , Киров И.В. ¹ , Ожерельев П.А. ² , Крутова А.В. ² , Соловьев А.А. ¹	104
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ И ГРУШИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТТЕЛИТНЫХ МАРКЕРОВ Кочешкова А.А., Баженов М.С.	105
ПОИСК И ВАЛИДАЦИЯ РЕГИОНОВ CNV В ГЕНОМЕ ЖИРНОХВОСТНЫХ ПОРОД ОВЕЦ Кошкина О.А., Бардуков Н.В., Зимина А.А.	107
АЛЛЕЛЬНЫЙ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНГИБИТОРА АМИЛАЗ <i>AI</i> У ДИКИХ ВИДОВ И КУЛЬТУРНЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ Кулакова А.В., Дьяченко Е.А.	108
АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА RS15619223 ГЕНА <i>LCORL</i> В МАЛОЧИСЛЕННЫХ ПОРОДАХ КУР Ларкина Т.А., Дементьева Н.В.	109
RAPID DETECTION OF POTATO ROOT NEMATODE, <i>DITYLENCHUS DESTRUCTOR</i> , IN LABORATORY CONDITIONS Niloufar Mahmoudi ^{1,2} , Yousef Naserzadeh ^{1,2} , Elena Pakina ¹	111
ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА <i>Tm-2²</i> ДЛЯ ОЦЕНКИ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ТОМАТА (<i>Solanum lycopersicum</i>) ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСУ МОЗАИКИ (ToMV) Ерошевская А.С. ^{3,4} , Милюкова Н.А. ¹ , Пырников А.С. ¹ , Энзекрей Е.С. ^{1,2} , Егорова А.А. ^{3,4} , Терешонкова Т.А. ^{3,4} , Ховрин А.Н. ^{3,4}	113
ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ Михайлова П.Д., Логинова Н.Н., Смирнова Е.В., Базанов Т.А.	114
RAPID METHOD FOR MOLECULAR DIAGNOSTIC OF <i>DROSOPHILA SIMULANS</i> WITH CONVENTIONAL PCR Yousef Naserzadeh ^{1,2*} , Niloufar Mahmoudi ^{1,2} , Elena Pakina ¹	116
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОМО- И ГЕТЕРОГЕННЫХ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ В КОЛЛЕКЦИОННОМ ПИТОМНИКЕ Николаев П.Н., Юсова О.А.	118
DIFFERENTIATION OF SILVER (<i>HYPORHTHALMICHTHYS MOLITRIX</i> VAL.) AND BIGHEAD (<i>HYPORHTHALMICHTHYS NOBILIS</i> RICH.) CARPS USING STR-LOCi Nosova A.Yu., Kipena V. N., Tsar A. I.	120
МЕТОД ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩЕГО АНАЛИЗА КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК (HRM) ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТИПА ЦИТОПЛАЗМЫ И <i>M_s</i> ЛОКУСА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ Нзеха М. ¹ , Кудрявцева Н.А. ^{1,2} , Никитина Е.А. ² , Ермолаев А.С. ^{1,2} , Хрусталева Л.И. ^{1,2}	121
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИСТОЧНИКОВ ЦМС ЯРОВОГО РАПСА Павлов Р.Е. ² , Дудников М.В. ¹ , Коленков М.А. ¹ , Соловьев А.А. ¹	123
АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА <i>MSTN</i> С ЭКСТЕРЬЕРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ КУР ПУШКИНСКОЙ ПОРОДЫ Пегливанян Г.К., Дементьева Н.В.	124
РАЗРАБОТКА НОВЫХ МАРКЕРОВ НА ЛОКУС <i>P16</i> , ОТВЕЧАЮЩИЙ ЗА УСТОЙЧИВОСТЬ <i>HELIANTHUS ANNUUS</i> К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ Пырников А.С., Сыксин С.В., Милюкова Н.А., Соловьев А.А.	125

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РИСА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ Савенко Е.Г., Мухина Ж.М.....	126
БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КРОВИ БЫЧКОВ КАЗАХСКОЙ БЕЛОГОЛОВОЙ ПОРОДЫ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПО ГЕНАМ <i>CAPN1</i> И <i>GH</i> Селионова М.И. ¹ , Плахтюкова В.Р. ²	127
ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИПОРОДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ПОПУЛЯЦИИ СОВЕТСКИХ ТЯЖЕЛОВОЗОВ МЕТОДОМ АНАЛИЗА STR-ЛОКУСОВ Сигаева А.С. ¹ , Дудников М.В. ² , Цыганок И.Б. ¹	130
ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА СОРТОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ SSR-МАРКЕРОВ Смирнова Е.В., Базанов Т.А., Михайлова П.Д., Логинова Н.Н.	131
АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА <i>NR6A1</i> ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ОСОБЕЙ ВИДА <i>SUS SCROFA</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ KASP Снытков Е.В. ¹ , Патрин М.М. ² , Кипень В.Н. ³	133
ХАРАКТЕРИСТИКА ОВЕЦ ТОНКОРУННЫХ ПОРОД ПО ГЕНУ <i>IGF-1</i> Соловьева А.Д., Кошкина О.А., Денискова Т.Е., Зиновьева Н.А.	134
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ МАЛИНЫ С РАЗЛИЧНОЙ ОКРАСКОЙ ЯГОД ПУТЕМ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМИ МАРКЕРАМИ НА ОСНОВЕ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ Субботина Н.М. ^{1,2} , Лебедев В.Г. ^{1,2} , Малюченко О.П. ³ , Шестибратов К. А. ²	135
РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ НОВЫХ STR-МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ДНК РАСТЕНИЙ РОДА <i>CENCHRUS</i> Сыксин С.В. ¹ , Кулакова Ю.Ю. ² , Соловьев А.А. ¹	136
ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНА <i>Vf</i> УСТОЙЧИВОСТИ ЯБЛОНИ (<i>MALUS MILL.</i>) К ПАРШЕ (<i>VENTURIA INAEQUALIS (CKE.) WINT</i>) Толпекина, А. А., Пикунова, А. В., Должикова, М. А., Седов Е. Н.	137
АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОРОД СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ Харзинова В.Р., Зиновьева Н.А.....	139
ТЕСТИРОВАНИЕ СЕЛЕКЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА НАЛИЧИЕ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ <i>SE2</i> И <i>SP2</i> Черепухина И.В., Налбандян А.А., Руденко Т.С., Михеева Н.Р., Федулова Т.П.....	141
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА (<i>GRF</i>) НА ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ У ТРИТИКАЛЕ Черноок А.Г.	143
РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЛИАДИН-КОДИРУЮЩИХ ЛОКУСОВ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ КАЧЕСТВА КЛЕЙКОВИНЫ ТРИТИКАЛЕ Энзекрей Е.С. ^{1,2} , Сыксин С.В. ¹ , Пырских А.С. ¹ , Милукова Н.А. ¹ , Соловьев А.А. ^{1,2}	145
СЕКЦИЯ «БИОТЕХНОЛОГИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ».....	146
ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В НАВОЗЕ ПРИ АКТИВНОЙ ЕГО ФЕРМЕНТАЦИИ Бирюков К.Н., Родионова Н.В.	147
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ <i>PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA</i> И <i>PHAEOACREMONIUM ALEOPHILUM</i> В ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЕ Блинова С.А. ^{1,2} , Яшкин А.С. ¹ , Шварцев А.А. ¹ , Володин В.А. ³ , Макаркина М.В. ⁴	148
ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИРКУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ У МОЛОДНЯКА КРС Гладких М. И., Рожкова И. Н.	150
ХЛОРЕЛЛА КАК МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ СРЕДЫ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ЕЁ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Дудина Ю.А., Калашникова Е.А.	151
ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА ФАСОЛИ <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV. <i>PHASEOLI</i> В	

СЕМЕННОМ И РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР И. М. Игнатъева, Е. В. Каримова, С. И. Приходько.....	153
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ КРОЛИКОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ В 2018-2020 гг. Кольцов А.Ю., Белов С.В., Сухер М.М., Живодеров С.П., Бобровская Н.К., Глухарева Е.Н., Сливко И.А., Луницин А.В., Кольцова Г.С....	155
ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА ЯИЧНЫХ КУР С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ПРОДУКТИВНОСТИ НА ФОНЕ СКАРМЛИВАНИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК Мотин М.С.	156
DETECTION AND IDENTIFICATION OF <i>RATHAYIBACTER TRITICI</i> IN RUSSIAN GRAIN CROP SURVEY Muvingi M. ¹ , Slovareva O.Y. ² , Ruberts V.S. ³ , Igonin V.N. ³	158
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА Пархоменко Ю.С., Семенова Е.В., Перепелкина И.С.	160
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ И ХРАНЕНИЯ (-20°C) БИОМАССЫ <i>Kluyveromyces marxianus</i> Петрухина Д.И.	161
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД В ДИАГНОСТИКЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СВИНОМАТОК В СВИНОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ Рожкова И. Н., Гладких М. И.	163
ПРЕИМУЩЕСТВА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ НЕКРОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ Семенова Е.В., Пархоменко Ю.С., Перепелкина И.С.	165
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ АССОЦИАТИВНОЙ АЗОТФИКСАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ Шулико Н.Н., Тукмачева Е.В.	166
СЕКЦИЯ «ЦИТОЛОГИЯ И ЦИТОГЕНЕТИКА»	168
МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОБЪЯСНЕНИЮ ВИДООБРАЗОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>BIDENS</i> Галкина М.А. ¹ , Прокопчук С.Р. ² , Виноградова Ю.К. ¹ , Разумова О.В. ^{1,3}	169
СОЗДАНИЕ TYRAMIDE-FISH ПРОБ ДЛЯ ИНТЕГРИРОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И ФИЗИЧЕСКОЙ КАРТ ХРОМОСОМЫ 2 <i>ALLIUM CEPA</i> Ермолаев А. С. ^{1,2} , Киров И. В. ¹ , Пивоваров А. М. ^{1,2} , Хрусталева Л. И. ^{1,2}	170
ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СБОРКИ И РАЗБОРКИ СИНАПТОНОМНОГО КОМПЛЕКСА ЛУКА РЕПЧАТОГО (<i>ALLIUM CEPA</i>) И ЛУКА-БАТУНА (<i>A. FISTULOSUM</i>) Кудрявцева Н.А. ^{1,2} , Макарова Л.М. ² , Симаковский С.А. ^{1,3} , Хрусталева Л.И. ^{1,2}	172
КАРИОТИП ШЕФЕРДИИ СЕРЕБРИСТОЙ (<i>SHEPHERDIA ARGENTEA</i> (PURSH) NUTT.) Прокопчук С. Р. ^{1,2} , Разумова О.В. ¹	173
ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДНК В МЕХАНИЗМАХ ЭВОЛЮЦИИ ПОЛА РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА CANNABACEAE Разумова О.В. ¹ , Александров О.С. ¹ , Бочаркина Ю.В. ^{1,2} , Романов Д.В. ¹ , Боне К.Д. ^{1,3}	175
ИЗУЧЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН КАРТОФЕЛЯ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ОБРАЗЦОВ ФИЦ КАРТОФЕЛЯ ИМ. А. Г. ЛОРХА Сиволапова А.Б., Иванова А.С., Войнова М.С., Королева А.К.	176
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЦИТОГЕНЕТИКА В ПРИКЛАДНЫХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ РАСТЕНИЙ Хрусталева Л.И. ^{1,2} , Мардини М. ¹ , Ермолаев А.С. ^{1,2} , Одинцов С.В. ^{1,2} , Нзеха М. ¹ , Макарова Л. М. ¹ , Федчук М. ¹ , Пивоваров А. ¹ , Киров И.В. ² , Кудрявцева Н.А. ^{1,2}	177
СЕКЦИЯ «РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ»	180
ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ <i>HELIANTHUS TUBEROSUS</i> IN VITRO Долотенко К.Е., Ратинская Л., Калашникова Е.А.	181
ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ГРИБА <i>FOMES FOMENTARIUS</i> Э-14 НА СКОРОСТЬ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН <i>SINAPIS ALBA</i> Киселева С.В., Сайтгареева А.Л., Халимова Л.Х.	182

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА КАПУСТЫ КОЛЬРАБИ Пчёлина Е.А. ¹ , Севостьянова Н.Н. ¹ , Даниловских М.Г. ^{1,2} , Винник Л.И. ¹	183
ВЛИЯНИЕ ХЕЛАТНЫХ МИКРОУДОБРЕНИЙ НА НАБУХАЕМОСТЬ СЕМЯН ЗЕРНОВОГО СОРГО Степанченко Д.А., Кибальник О.П., Куколева С.С.....	185
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИДРОЛИЗАТА ХИТОЗАНА НА РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ <i>SOLANUM</i> <i>LYCOPERSICUM</i> Тимофеева Т.А. ^{1,2} , Штанько Д.А. ^{1,3} , Закурин А.О. ¹	187

**СЕКЦИЯ
«БИОИНФОРМАТИКА И ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ»**

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ И ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА-ГОМОЛОГА *VTC2* У ЛУКА-ПОРЕЯ (*ALLIUM PORRUM* L.)**Анисимова О.К.¹, Филюшин М.А.²****1 – ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва 127550****2 – ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва 119071**

L-аскорбиновая кислота (витамин С) является одним из наиболее важных антиоксидантов растений, а также кофактором многих ферментов. К настоящему времени определены основные пути биосинтеза витамина С у различных растений, идентифицированы ключевые ферменты и гены их кодирующие.

Содержание витамина С в зеленых листьях у сортов лука-порея (*Allium porrum* L.) варьирует в широких пределах и может достигать 200 мг/100г. Несмотря на то, что *A. porrum* является популярным объектом для биохимических исследований, для него, как и других представителей рода *Allium*, гены метаболизма витамина С не были идентифицированы и охарактеризованы ранее. В связи с этим целью работы стала идентификация у лука-порея одного из ключевых генов биосинтеза витамина С – ГДФ-L-галактозофосфорилазы (*VTC2*), определение профиля его экспрессии и поиск возможных корреляций с содержанием витамина С.

На основе известной последовательности гена *VTC2* из *Asparagus officinalis* в базе данных NCBI (TSA) в транскриптомах различных видов *Allium* были найдены гомологичные последовательности. Были разработаны системы праймеров для амплификации, секвенирования и экспрессионного анализа этого гена у образцов лука-порея. С помощью разработанных праймеров были амплифицированы и секвенированы последовательности генов-гомологов *VTC2* у 35 сортов лука-порея, для которых ранее было определено содержание витамина С в листьях. Размер кодирующей последовательности у всех образцов лука-порея был инвариантен и составил 1275 п.н. В анализируемых последовательностях было выявлено 25 вариабельных сайтов, 11 из которых были образцеспецифичными, а остальные нуклеотидные замены встречались у двух и более анализируемых сортов. Анализ распределения детектированных нуклеотидных замен у анализируемых сортов лука-порея позволил выявить 29 аллельных вариантов гена *VTC2*.

Размер белка у исследуемых сортов лука-порея составил 424 а.о. Идентифицированные в кДНК нуклеотидные замены приводили к семи аминокислотным замещениям. За счет различных комбинаций этих замещений было выявлено 11 вариантов белка ГДФ-L-галактозофосфорилазы, кодируемого геном *VTC2*. Анализ обнаруженных замещений в программе PROVEAN предсказал их нейтральный характер. Идентифицированные аминокислотные замещения в белках *VTC2* анализируемых сортов лука-порея были сопоставлены с данными по содержанию витамина С в листьях, однако не было выявлено зависимостей между вариантами белка и содержанием витамина С.

Для определения профиля экспрессии гена *VTC2* в различных частях лука-порея был собран растительный материал (зеленая (листья) и белая (ложный стебель) части) сортов Blauwgroene winter, Коламбус, Otina, Pandora в трех временных точках – август (активный рост), октябрь (уборка) и декабрь (через два месяца хранения). В целом у анализируемых сортов не выявлено общего паттерна экспрессии *VTC2*. Сходный профиль экспрессии *VTC2* был выявлен в зеленой части сортов Коламбус и Pandora. В белой части растений сходной профиль экспрессии *VTC2* выявлен только у сортов Blauwgroene Winter и Коламбус.

Для поиска возможных корреляций с уровнями транскрипции *VTC2* в отобранном растительном материале было определено содержание витамина С. У двух из четырех анализируемых сортов (Blauwgroene Winter и Коламбус) наблюдалось увеличение

количества витамина С в белой части растений после периода хранения. У сорта Коламбус содержание витамина С достоверно увеличивалось и в листьях, тогда как у Pandora и Otina, несмотря на увеличение содержания в период уборки, через два месяца хранения оно значительно снижалось. Уровни транскрипции *VTC2* были сопоставлены с содержанием витамина С. В результате, была выявлена положительная корреляция ($r=0.34$) между содержанием витамина С в зеленой части сортов лука-порея с уровнями экспрессии *VTC2*. В белой части сортов лука-порея была выявлена достоверная отрицательная корреляция ($r=-0.58$, $p\text{-value}=0.04$) между содержанием витамина С и уровнями транскрипции *VTC2*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-016-00054.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.002

**СБОРКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА НА ОСНОВЕ ДАННЫХ
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
РЕФЕРЕНСА РОДСТВЕННОГО ВИДА НА ПРИМЕРЕ ГЕНА D53 *DASYPYRUM*
*VILLOSUM***

Баженов М. С.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Россия,
127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
E-mail: mikhabazhenov@gmail.com***

Использование высокопроизводительного секвенирования применительно к отдельным генам целесообразно для изучения внутривидового аллельного разнообразия. В случае необходимости изучения нескольких генов у большого числа образцов секвенирование ПЦР-ампликонов методами нового поколения при использовании баркодирования может оказаться более выгодным по сравнению с традиционным секвенированием по Сэнгеру. Однако, получаемые таким способом данные требуют обработки с помощью алгоритмов, позволяющих реконструировать полную последовательность гена из коротких прочтений аналогично сборке полного генома.

Традиционно используются два способа реконструкции последовательности геномов из данных высокопроизводительного секвенирования. Первый – выравнивание коротких прочтений на референсную последовательность – ранее собранный геном того же вида – с последующим выявлением однонуклеотидных полиморфизмов и небольших инсерций/делеций. Второй – сборка генома *de novo*, основанная на объединении взаимно перекрывающихся коротких прочтений. Однако, первый способ может выявлять лишь небольшие полиморфизмы, и поэтому последовательность генома родственного вида не может быть использована в качестве референса. Второй способ не требует референсной последовательности, но позволяет собрать геном лишь фрагментарно – в виде набора контигов. Аналогичные проблемы возникают и при сборке последовательностей отдельных генов (ПЦР-ампликонов) у тех видов, для которых референсная последовательность неизвестна. Для решения указанных проблем и повышения качества сборки геномов или их фрагментов у видов с неизвестной референсной последовательностью были предложены разнообразные гибридные методы, сочетающие сборку *de novo* с картированием на референс родственного вида [1,2].

Для решения задачи сборки последовательности гена *D53*, кодирующего белок, участвующий в пути передачи гормонального сигнала стриголактонов, у дикого сородича пшеницы, злака *Dasypyrum villosum* (L.) Borbás, не имеющего референсной последовательности, был применен гибридный способ, реализованный с помощью оригинального набора программ. Способ заключается в том, что короткие прочтения сначала собираются в контиги, затем контиги выравниваются на референсную

последовательность родственного вида (в качестве таковой использовалась последовательность гомолога *D53* субгенома D пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L.) и объединяются друг с другом в нужном порядке. Тем самым формируется черновая референсная последовательность гена, которая корректируется путем картирования на нее коротких прочтений и создания консенсусной последовательности, которая вновь используется в качестве референса. Описанная процедура коррекции проводится неоднократно, однако, как правило после 7-кратного повторения дальнейших изменений в последовательности не происходит.

Для реализации способа была собрана следующая цепочка программ: SPAdes 3.14.0 – для сборки контигов [3], CAP3 – для выравнивания контигов на референс родственного вида [4], Consensus – оригинальная программа для выбора выравнивания, содержащего референс из результатов, получаемых на выходе CAP3, и сборки контигов в суперконтиги [5], SNAP (Scalable Nucleotide Alignment Program) v1.0 [6], freebayes [7], samtools 1.10, bcftools 1.10.2 [8] – для картирования прочтений на суперконтиги, исправления неточностей сборки, выявления аллельных вариантов на случай гетерозиготности растения.

Для секвенирования гена-гомолога *D53* использовался образец *D. villosum*, #1 собранный в Греции предоставленный нам А. J. Lukaszewski (Калифорнийский университет, США). Метод выделения ДНК, праймеры, условия ПЦР и метод секвенирования описаны нами в ранее опубликованной работе [9]. Качество сборки последовательности оценивалось визуально по равномерности её покрытия короткими прочтениями в программе Integrative Genomics Viewer [10].

Удовлетворительный результат сборки с равномерным покрытием получился при использовании референсной последовательности в качестве «доверенных контигов» (опция --trusted-contigs) при работе SPAdes и выполнения вышеописанной итеративной процедуры коррекции референсной последовательности.

Список литературы

1. Lischer, H.E.L.; Shimizu, K.K. Reference-guided de novo assembly approach improves genome reconstruction for related species. *BMC Bioinformatics* 2017, 18, 474, doi:10.1186/s12859-017-1911-6.
2. Ranjard, L.; Wong, T.K.F.; Rodrigo, A.G. Effective machine-learning assembly for next-generation amplicon sequencing with very low coverage. *BMC Bioinformatics* 2019, 20, 654, doi:10.1186/s12859-019-3287-2.
3. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012, 19, 455–477, doi:10.1089/cmb.2012.0021.
4. Huang, X.; Madan, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 1999, 9, 868–877, doi:10.1101/gr.9.9.868.
5. MikhailBazhenov *MikhailBazhenov/Consensus*; 2020;
6. Zaharia, M.; Bolosky, W.J.; Curtis, K.; Fox, A.; Patterson, D.; Shenker, S.; Stoica, I.; Karp, R.M.; Sittler, T. Faster and More Accurate Sequence Alignment with SNAP. *arXiv:1111.5572 [cs, q-bio]* 2011.
7. Garrison, E.; Marth, G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *arXiv:1207.3907 [q-bio]* 2012.
8. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009, 25, 2078–2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
9. Bazhenov, M.; Chernook, A.; Kroupin, P.; Karlov, G.; Divashuk, M. Molecular Characterization of the Dwarf53 Gene Homolog in *Dasypyrum villosum*. *Plants* 2020, 9, 186, doi:10.3390/plants9020186.

10. Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Winckler, W.; Guttman, M.; Lander, E.S.; Getz, G.; Mesirov, J.P. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 2011, 29, 24–26, doi:10.1038/nbt.1754.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.003

АНАЛИЗ РЕПИТОМА *SHEPHERDIA ARGENTEA* (PURSH) NUTT.

Боне К.Д.^{1,2}, Разумова О.В.¹, Киров И.В.¹, Карлов Г.И.¹

**1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва, Россия, 175550 E-mail: karinabone@mail.ru**

**2 – Российский государственный аграрный университет МСХА имени
К.А. Тимирязева, Москва, Россия, 175550,**

Шефердия серебристая (*Shepherdia argentea* (Prush) Nutt.) – это двудомное растение семейства *Elaeagnaceae*, близкий родственник облепихи. Широко используемое растение в традиционной медицине.

В ягодах шефердии серебристой содержится высокое количество витамина С, каротина, катехинов. Среди экономически значимых признаков шефердии, можно отметить такие свойства, как способность обогащать почву азотом, благодаря наличию азотфиксирующих бактерий на корнях.

В нашей работе мы провели секвенирование двух растений *Shepherdia* с последующей аннотацией репитома. Тандемные повторы и мобильные элементы, включая как транспозоны ДНК, так и ретротранспозоны, были идентифицированы, классифицированы, а также предсказано их количество в геноме. Сравнительный анализ повторов мужского растения и растения с неизвестным полом выявил различия в нескольких повторах.

С полученными Illumina сиквенсами двух растений *Shepherdia* провели кластеризацию с помощью программы RepeatExplorer. Были обнаружены тандемные повторы и ретротранспозоны. Более глубокий биоинформатический анализ и аннотирование повторов ДНК мужского и неизвестного пола растений шефердий выявили 8 и 7 сателлитных повторов соответственно. Среди ретротранспозонов Ty1 / Copia мы обнаружили пятнадцать кластеров, соответствующих подсемействам Ale, двенадцать кластеров, соответствующих подсемействам Angela / Tork, три кластера, соответствующих подсемействам TAR, семь кластеров, соответствующих подсемействам Ivana, и два кластера, соответствующих подсемействам SIRE. Среди ретроспозонов Ty3 / Gypsy мы обнаружили одиннадцать подсемейств Athila, три подсемейства TeKay, одно подсемейство Galadriel, четыре подсемейства CRM и шестьдесят подсемейств Reina.

Эти данные позволили нам построить филогенетическое дерево на основе Ty1/ Copia и Ty3/ Gypsy.

На полученные кластеры повторяющихся элементов мужского и неизвестного пола растений шефердии, подобрали праймеры и провели ПЦР с ДНК растений из нашей коллекции. В результате получили существенные различия на растениях разного пола.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, соглашение № 20-016-00145 А.

Список литературы:

1. Fastqc Version 0.11.8: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
2. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
3. Novak, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., Macas, J. (2013) - RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next generation sequence reads. *Bioinformatics* 29:792-793.

4. Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." *Genome Res.* 7:649-656. PubMed.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.004

АНАЛИЗ РЕТРОТРАНСКРИПТОМА И РЕТРОПРОТЕОМА *A. THALIANA* НА ОСНОВЕ ДАННЫХ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Гварамия С.^{1*}, Меркулов П.¹, Омаров М.^{1,2}, Киров И.¹

**1 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия;**

2 – НИУ «Высшая школа экономики», Москва, Россия

*** e-mail: sofia.gvaramia@gmail.com**

Самый многочисленный класс мобильных генетических элементов в растениях – LTR-ретротранспозоны, которые перемещаются в геноме посредством РНК-интермедиата. Активность большинства транспозонов подавлена эпигенетически [1]. Последние исследования показывают, что некоторые ретротранспозоны способны избегать ингибирования и проявляют мобильность [2], однако механизмы, позволяющие им уклоняться от систем посттранскрипционного сайленсинга, слабо изучены. К тому же, изучение биологии мобильных элементов осложняется их слабой экспрессией и отсутствием оптимальных биоинформатических подходов.

В данном исследовании, мы провели прямое секвенирование РНК *ddm1* мутанта арабидопсиса на платформе Oxford Nanopore (Oxford Nanopore Technologies). Для анализа белков методом масс-спектрометрии, белки выделяли с помощью фенольной экстракции [8], полученные спектры идентифицировали с помощью программного обеспечения “Peaks” (Bioinformatics Solutions Inc.). В результате мы получили около 800 000 прочтений с одной проточной ячейки R9.4.1 на MinION и идентифицировали изоформы сотен ретротранспозонов, в частности, 4 изоформы ретротранспозона *EVD* [9]. Также были *de novo* выявлены 6 транспозонов, которые оказались активны как в мутантном, так и в диком типе *A. thaliana*. На основании полученных данных, нами были предсказаны открытые рамки считывания и проведена идентификация белков с помощью масс-спектрометрического анализа дикого типа и мутанта *ddm1*. Вследствие чего, для *ddm1* были найдены уникальные белки, принадлежащие ДНК транспозонам семейств CACTA и VANDAL, а также одомашненная транспозаза DAYSLEEPER суперсемейства hAT.

В дальнейшем, полученные уникальные данные будут использованы для глубокого изучения ретротранскриптома и ретропротеома растений, а также для функциональных исследований роли транскрипционной активности транспозонов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-34-70032.

Список литературы:

1. Slotkin, R. K. & Martienssen, R. A. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Rev. Genet.* 8, 272–285 (2007).
2. Thieme, M., Lanciano, S., Balzergue, S., Daccord, N., Mirouze, M., and Bucher, E. (2017) Inhibition of RNA polymerase II allows controlled mobilisation of retrotransposons for plant breeding. *Genome Biol.* 18, 134
3. Oxford Nanopore Technologies. Pinfish. 2018. <https://github.com/nanoporetech/pinfish>.
4. Kovaka, S., Zimin, A.V., Pertea, G.M. et al. Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome Biol* 20, 278 (2019).
5. Tang, A.D., Soulette, C.M., van Baren, M.J. et al. Full-length transcript characterization of SF3B1 mutation in chronic lymphocytic leukemia reveals downregulation of retained introns. *Nat Commun* 11, 1438 (2020).

6. Ellinghaus, D., Kurtz, S. & Willhoeft, U. LTRharvest, an efficient and flexible software for de novo detection of LTR retrotransposons. *BMC Bioinformatics* 9, 18 (2008)
7. Steinbiss, S., Willhoeft, U., Gremme, G., & Kurtz, S. (2009). Fine-grained annotation and classification of de novo predicted LTR retrotransposons. *Nucleic Acids Research*, 37, 7002 - 7013.
8. Faurobert M., Pelpoir E., Chaïb J. (2007) Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. In: Thiellement H., Zivy M., Damerval C., Méchin V. (eds) *Plant Proteomics. Methods in Molecular Biology*, vol 355. Humana Press.
9. Mirouze, M., Reinders, J., Bucher, E. *et al.* Selective epigenetic control of retrotransposition in *Arabidopsis*. *Nature* **461**, 427–430 (2009).

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.005

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГОМОЛОГОВ ГЕНОВ *PM19L*, *CML31* и *AOS2* В ОБЛУЧЕННЫХ СОРТАХ ЯЧМЕНЯ

Горбатова И.В., Казакова Е.А., Волкова П.Ю.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», Обнинск 249032
E-mail: gorbatova.irina.96@mail.ru***

Изучение молекулярных механизмов формирования эффекта радиационной стимуляции при облучении семян сельскохозяйственных культур низкими дозами ионизирующего излучения является перспективным подходом для поиска кандидатных генов продуктивности и стрессоустойчивости. Базируясь на данных, полученных при анализе транскриптома зародышей семян ячменя, облученных стимулирующими дозами γ -излучения [1], была проанализирована экспрессия 17-ти генов стрессового ответа в корнях и побегах 7-ми сортов ячменя, отличающихся по ответной морфологической реакции на облучение [2]. Стимулирующий эффект облучения был зафиксирован для сортов Фокс 1, Ратник, Ерема и Мастер, ингибирующий – для сорта Леон, для сортов Грис и Федос эффекта по исследуемым параметрам не было обнаружено. Из 17-ти исследованных кандидатных генов наиболее перспективными для дальнейшего изучения механизмов радиационного гормезиса были признаны гомологи генов *PM19L*, *CML31* и *AOS2*.

Материалы и методы. Семена облучали в дозе 20 Гр (мощность дозы 60 Гр/ч) на гамма-установке «ГУР-120» (^{60}Co) (ФГБНУ ВНИИРАЭ, Обнинск). В качестве контроля для каждого сорта использовали необлученные семена.

Облученные и контрольные семена стерилизовали в 10%-ном растворе H_2O_2 в течение 5 минут, тщательно промывали дистиллированной водой и проращивали в рулонах из фильтровальной бумаги и полиэтиленовой пленки. Использовали 3 рулона для облученных и 3 рулона для контрольных семян каждого сорта; каждый рулон содержал около 100 семян. Проращивание проводили в инкубаторе (MIR-254, Sanyo, Япония), поддерживающем температуру 20 °С в темноте. После 7-ми дней прорастания из каждого рулона отбирали по 10 самых крупных проростков. Кончики корней (4 см) и верхушки побегов (3 см) этих проростков одновременно срезали и сразу же помещали в криопробирки и замораживали в жидком азоте. Таким образом, для анализа экспрессии генов использовали 84 образца (42 образца на ткань).

До 100 мг замороженной ткани гомогенизировали в жидком азоте и использовали для выделения общей РНК с помощью набора для очистки РНК GeneJet Plant (Thermo Scientific). 1 мкг тотальной РНК подвергали обработке ДНКазой I (Thermo Scientific) и последующему синтезу кДНК с использованием набора MMLV RT (Евроген, Россия), согласно протоколам производителя. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-Технология, Россия): стадия начальной денатурации 2 мин при 95°C, затем 40

циклов по 15 с при 95°C и 60 с при 60°C. В качестве референсного гена использовали актин. Все анализы были выполнены в трех биологических и двух технических повторностях. Расчеты кратности изменения (fold change, FC) были сделаны с использованием метода $\Delta\Delta C_p$ в ПО Microsoft Office Excel, 2019. Корреляционный анализ между экспрессией генов и морфологическими признаками был выполнен с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена в программе Statistica 8.0.

Результаты. Экспрессия гомологов *PM19L* и *CML31* была почти повсеместной в γ -облученных сортах и характеризовалась значительными изменениями в ответ на облучение и корреляцией с морфологическими признаками. По этим причинам гены *PM19L* и *CML31* были признаны наиболее многообещающими для участия в формировании радиационного гормезиса у разных сортов ячменя.

PM19L кодирует мембранный белок PM19L, который участвует в передаче сигналов абсцизовой кислоты. Экспрессия этого гена была значимо повышена в γ -стимулированных сортах Фокс 1 и Ерема (в побегах) и Ратник (в корнях); однако у Мастера экспрессия этого гена была значительно ниже, чем у необлученных растений. У сортов «без эффекта» Грис (в корнях и побегах) и Федос (в корнях), а также у сорта с γ -ингибированием Леон (в побегах) экспрессия гомолога *PM19L* также была увеличена; однако FC в целом были ниже, чем для γ -стимулированных сортов.

CML31 кодирует в геноме риса (*Oryza sativa* subsp. *Japonica*) вероятный кальций-связывающий белок CML31. Экспрессия его гомолога в растениях ячменя после гамма-облучения семян проявлялась только в облученных растениях сортов Ерема (в побегах) и Мастер (в корнях), или характеризовалась повышением экспрессии в корнях сортов Ратник и Ерема. Также экспрессия этого гена была подавлена в γ -ингибируемом сорте Леон.

Продукт гомолога *AOS2* участвует в биосинтезе жасмоновой кислоты. Экспрессия *AOS2* была повышена в корнях двух γ -стимулированных сортов Фокс 1 и Ратник и подавлена в побегах сорта Ерема. В корнях γ -стимулированных сортов Фокс 1 и Ратник, экспрессия *AOS2* гомолога усиливается. Существенной индукции пути биосинтеза жасмоновой кислоты в побегах не было обнаружено, что может быть связано с возможным накоплением жасмоновой кислоты и последующем ингибировании роста. При этом экспрессия гомолога *AOS2* в побегах отрицательно коррелировала с длиной побега. Следовательно, передача сигналов по жасмонатному пути в корнях облученных растений может быть возможной целью для дальнейших исследований детерминант радиационного гормезиса.

Заключение. В ходе данной работы было обнаружено, что даже оригинальные высококачественные семена имеют разный тип ответа на одну и ту же дозу облучения, что свидетельствует о важной роли генотипа в возникновении радиационной стимуляции.

Мы определили гомологи *PM19L* и *CML31* в качестве многообещающих мишеней для будущих исследований, касающихся механизмов стимулирующего эффекта после облучения в низких дозах. Гомолог *AOS2*, связанный с передачей сигналов жасмонатом, также может быть возможным кандидатным геном для будущих исследований.

Полученные данные о дифференциальной экспрессии генов помогут расширить знания о молекулярных путях, участвующих в эффекте радиационной стимуляции, а представленные гены могут послужить основой для дальнейших исследований, направленных на получение более стрессоустойчивых сортов.

Список литературы:

1. Volkova P.Y., Duarte G.T., Soubigou-Taconnat L., Kazakova E.A., et al. Early response of barley embryos to low- and high-dose gamma irradiation of seeds triggers changes in the transcriptional profile and an increase in hydrogen peroxide content in seedlings // *J Agro Crop Sci* 2020, 206, 277–295, doi:10.1111/jac.12381.
2. Казакова Е.А., Макаренко Е.С., Подлущий М.С., Донцова А.А., Битаршвили С.В., Лыченкова М.А., Горбатова И.В., Филиппов Е.Г., Донцов Д.П., Чиж Т.В., Снегирев А.С., Волкова П.Ю. Радиочувствительность сортов озимого и ярового ячменя по выраженности

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.006

**ПОИСК ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СРОКИ НАЧАЛА
ЦВЕТЕНИЯ ГУАРА (*СУАМОПСИС ТЕТРАГОНОЛОБА* (L.) ТАУБ.),
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СЕТЕЙ**

Григорьева Е.А.^{1,2*}, Архимандритова С.Б.³, Беатович А.², Потокина Е.К.¹

**1 – Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени
С.М. Кирова, Санкт-Петербург 194021**

**2 – Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург
197101**

E-mail: L.Grigoreva@gmail.com

**3 – Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И.
Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург 190000**

Гуар (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) новая сельскохозяйственная культура, которая была недавно интродуцирована на территорию РФ. Выращивание гуара в умеренных широтах затруднено из-за длинного фотопериода, препятствующего цветению этого короткодневного растения. Среди обширного внутривидового разнообразия *C.tetragonoloba* можно выявить генотипы, слабочувствительные к фотопериоду. Поиск генов, отвечающих за фотопериодическую чувствительность (ФПЧ) гуара, и, соответственно, сроки начала цветения, позволил бы ускорить процесс маркер-вспомогательной селекции этой новой бобовой культуры, которая является источником ценного растительного сырья – полисахарида галактоманнана.

Для идентификации генов «раннего цветения» у гуара мы использовали видоизмененный подход «прямой генетики», следуя от фенотипа к гену. В качестве фенотипа мы использовали метаболомный профиль, который достоверно различает ранне – и поздно-зацветающие генотипы гуара при их выращивании в условиях длинного дня.

Ранее нами было установлено, что растения гуара, способные без задержек зацвести на длинном фотопериоде, отличаются от прочих «поздних» генотипов повышенной концентрацией 65 метаболитов в тканях третьего листа – стадии предшествующей цветению. 7 из них были рекомендованы для использования в качестве биомаркеров для отбора «раннецветущих» генотипов гуара.

Цель нашего исследования состояла в попытке выявить гены, влияющие на сроки цветения гуара, путем сопоставления данных метаболомного и транскриптомного профилирования одних и тех же тканей двух групп растений гуара, различающихся по срокам перехода к генеративной фазе на длинном дне.

По результатам транскриптомного анализа нами было выявлено 84772 последовательностей, дифференциально экспрессирующихся (ДЭП) между двумя сравниваемыми группами. Задача заключалась в том, чтобы выяснить, вовлечены ли эти ДЭП в пути биосинтеза ключевых метаболитов, концентрация которых показывает достоверное отличие у «ранних» и «поздних» генотипов гуара. Для решения задачи мы использовали метод интеграции метаболомных и транскриптомных данных в единую генетическую сеть (gene network). В результате нами было выявлено 619 достоверных взаимодействий метаболитов и ДЭ на основании информации, доступной в базе данных KEGG.

На основании идентификации и анализа этих взаимодействий были выявлены потенциальные гены-кандидаты, вовлеченные в пути биосинтеза ключевых метаболитов – биомаркеров раннего цветения у гуара.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ офис в рамках научного проекта № 17-29-08027.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.007

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА УРОВНЕ ИЗОФОРМ

Меркулов П.Ю.¹, Гварамия С.А.¹, Омаров М.Р.^{1,2}, Киров И.В.¹

*1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва 127550 E-mail: biotech@iab.ac.ru,*

*2 – Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»,
Москва, 109028 E-mail: hse@hse.ru*

LTR-ретротранспозоны (РТ) – наиболее распространённые представители мобильных элементов в растениях. Их геномная последовательность состоит из двух длинных концевых повторов (LTRs) фланкирующих белок-кодирующую область. Полноразмерные РТ кодируют несколько белков, включая белок оболочки GAG, обратную транскриптазу, интегразу, РНКазу Н и аспарагиновую протеазу. В процессе транспозиции ретротранспозоны проходят стадии транскрипции, трансляции, формирования вирусоподобных частиц, обратной транскрипции и последующего встраивания новой копии в геном. Подобные интеграции как правило приводят к различным вредным мутациям, поэтому экспрессия ретротранспозонов подавлена в нормальных условиях.

К настоящему моменту хорошо охарактеризована транскрипция и транспозиция ретротранспозонов в стрессовых условиях [1-4]. В то же время экспрессия ретротранспозонов в соматических клетках в отсутствии стресса и её причины изучены слабо. Для выявления ретротранспозонов с детектируемой экспрессией в подсолнечнике (*Helianthus annuus* L.) нами был выполнен полногеномный анализ с последующим картированием коротких RNAseq-прочтений из 13 библиотек, соответствующих различным тканям и внешним условиям. В результате было предсказано 44 ретротранспозона, проявлявших высокую активность. Транскрипция 9 случайно выбранных из них была подтверждена методом ПЦР с обратной транскрипцией.

Среди 44 экспрессирующихся ретротранспозонов был обнаружен элемент с конститутивной экспрессией, который мы назвали *Turan*. Транскрипционная активность данного ретротранспозона была предсказана во всех анализируемых тканях и условиях, а также подтверждена методом ПЦР с обратной транскрипции. Для идентификации отдельных изоформ нами было выполнено прямое секвенирование РНК на платформе Oxford Nanopore (Oxford Nanopore Technologies). Были детектированы транскрипционные изоформы, образовавшиеся в результате сплайсинга и преждевременной терминации транскрипции. Наиболее представленной изоформой для полноразмерных РТ являлся короткий транскрипт, несущий короткую рамку считывания, кодирующую исключительно белок оболочки GAG (shGAG). Было детектировано множество экспрессирующихся ретротранспозонов, для большинства из которых, в т. ч. для *Turan* продукты транскрипции были представлены различными изоформами, среди которых также присутствовали shGAG.

Для поиска связи транскрипционной активности и потенциальной способности к мобилизации была проведена оценка относительной разницы числа копий для каждого из 44 ранее детектированных нами ретротранспозонов между 13 сортами подсолнечника. Показано, что 60% экспрессирующихся RTE имеют разное число копий у сортов, что говорит об их недавней мобильной активности в геноме. Один ретротранспозон, названный

нами *Gagarin*, показал наличие своей кДНК в виде кольцевых молекул, для остальных, в т. ч. для *Tyran*, подобные молекулы детектированы не были.

Таким образом, геном подсолнечника содержит десятки экспрессирующихся ретротранспозонов с недавней мобильной активностью. Для большинства из них характерно образование нескольких изоформ, в т. ч. shGAG. На примере ретротранспозона *Tyran* можно сделать предположение о том, что не всегда высокая транскрипционная активность ретротранспозона ведёт к его мобилизации.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации (грант МК-2360.2019.4).

Список литературы:

1. Slotkin R.K., Martienssen R., Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):272-85. DOI 10.1038/nrg2072
2. Martinez G., Choudury S.G., Slotkin R.K., tRNA-derived small RNAs target transposable element transcripts. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(9):5142-52. DOI 10.1093/nar/gkx103
3. Fultz D., Slotkin R.K., Exogenous Transposable Elements Circumvent Identity-Based Silencing, Permitting the Dissection of Expression-Dependent Silencing. *Plant Cell.* 2017;29(2):360-76. DOI 10.1105/tpc.16.00718
4. Panda K., Ji L., Neumann D.A., Daron J., Schmitz R.J., Slotkin R.K. Full-length autonomous transposable elements are preferentially targeted by expression-dependent forms of RNA-directed DNA methylation. *Genome Biol.* 2016;17(1):170. DOI 10.1186/s13059-016-1032-y
5. Lanciano S., Carpentier M.C., Llauro C., et al. Sequencing the extrachromosomal circular mobilome reveals retrotransposon activity in plants. *PLoS Genet.* 2017;13(2):e1006630. DOI 10.1371/journal.pgen.1006630

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.008

NANOTRF: ПРОГРАММА ДЛЯ *DE NOVO* ПОИСКА ВЫСОКОКОПИЙНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ В ДАННЫХ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК РАСТЕНИЙ

Колганова Е.И.¹, Муравенко О.В.², Киров И.В.¹

***1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно - исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва, 127550. E-mail: biotech@iab.ac.ru***

***2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
(ИМБ РАН), Москва, 119991. E-mail: isinfo@eimb.ru***

Высококопийные тандемно организованные повторы (ТП) могут занимать значительную часть (до 30%) генома растений. В большинстве случаев они расположены в субтеломерных и центромерных регионах, а также в интерстициальных участках хромосом. ТП участвуют в различных биологических процессах, включая структурную организацию хроматина, деление клеток и регуляцию экспрессии генов. Изучение ТП и их функций осложняется их особенной геномной организацией, представляющей длинные массивы длиной до нескольких миллионов пар нуклеотидов. Это затрудняет сборку полноразмерных кластеров ТП в геноме, что приводит к сильному уменьшению размера кластера при сборке генома и искажению реальной копийности.

Секвенирование 3-го поколения на платформе Oxford Nanopore (нанопоровое секвенирование, или ONT) - технология, позволяющая получать достаточно протяжённые риды. Однако, вместе с длинными прочтениями для методики нанопорового секвенирования характерно большое число ошибок секвенирования, которое делает невозможным использование таких данных для прямого поиска ТП обычными

инструментами (например, Tandem Repeat Finder (Benson, 1999)). В тоже время с каждым днем растет число видов растений, для которых выкладываются в свободный доступ геномные данные ONT. Целью нашей работы было разработать удобный инструмент для поиска высококопийных ТП в сырых данных ONT с низким покрытием генома.

Результатом данной работы стал NanoTRF – пайплайн, который позволяет найти высококопийные ТП, рассчитать их копиюность в геноме и собрать их консенсусные последовательности для последующего анализа (например, с помощью FISH). В качестве входных данных для запуска nanoTRF требуются только данные полногеномного секвенирования ONT в формате FASTQ или FASTA. NanoTRF написан на языке python и состоит из нескольких модулей для первичного предсказания ТП в каждом риде (TideHunter) (Gao et al., 2019), их кластеризации на основе Лувенского метода (Louvain Method), фильтрации для отсеивания низкокопийных tandemных повторов и, наконец, построения консенсуса. В результате, пользователь получает таблицу с последовательностями ТП, их копиюностью в геноме и другими характеристиками.

Для валидации nanoTRF, мы провели ONT секвенирование генома *Deschampsia antarctica* – вид, который содержит большой набор ТП. Используя nanoTRF, нами были идентифицированы более 40 ТП и получены их сиквенсы. Мы сравнили данные по этим повторам с контрольными (ТП, предсказанные с помощью NGS) и результаты показывают высокую корреляцию (коэффициент корреляции - 0.98, p-value < 1e-5) по рассчитанному числу копий в геноме индивидуальных повторов, а также практически полную идентичность по сиквенсу. Нам удалось выявить 13 новых ТП, чья геномная организация ещё не изучена. На обнаруженные новые tandemные повторы мы подобрали праймеры и провели ПЦР для валидации. Все предсказанные nanoTRF tandemные повторы были успешно амплифицированы. Для большей части ПЦР продуктов наблюдалась так называемая лесенка – типичная картина tandemно-организованных повторов.

Таким образом, nanoTRF – это чувствительный инструмент, с высокой точностью определяющий высококопийные ТП в «сырых» данных ONP. NanoTRF позволит в дальнейшем существенно увеличить число новых ТП и расширить наши знания об их организации и эволюции. NanoTRF доступен по ссылке: <https://github.com/Kirovez/nanoTRF>.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ грант № 17-00-00336).

Список литературы:

1. Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences / G. Benson // Nucleic Acids Research. – 1999. – Vol. 27 – Issue 2. – pp. 573-580
2. Gao, Y. TideHunter: efficient and sensitive tandem repeat detection from noisy long-reads using seed-and-chain / Y. Gao, B. Liu, Y. Wang, Y. Xing // Bioinformatics. – 2019. – Vol. 35. – Issue 14. – pp. i200-i207
3. González, M.L. Characterization of some satellite DNA families in *Deschampsia antarctica* (*Poaceae*) / M.L. González, J.O. Chiapella, J.D. Urdampilleta // Polar Biology. – 2018. – Vol. 41. – Issue 3. – pp. 457-468
4. Novák, P. TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads / P. Novák, L.A. Robledillo, A. Koblížková, I. Vrbová, P. Neumann, J. Macas // Nucleic Acids Research. – 2017. – Vol. 45. – Issue 12. – P. e111

**АНАЛИЗ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДНК В ГЕНОМАХ ПОЛИПЛОИДНЫХ
ДИКОРАСТУЩИХ ЗЛАКОВ ИЗ РОДА *THINOPYRUM*****Никитина Е.А.*****Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Москва, 127550. E-mail: shhket@gmail.com***

В геномах растений повторяющиеся последовательности могут занимать до 95%. Повторы могут быть как тандемно организованными, так и диспергированными. Они выполняют различные функции, связанные с поддержанием стабильной структуры молекулы ДНК и играют видную роль в эволюции генома. Повторяющиеся последовательности часто выступают в роли потенциально видо- или геномспецифичных маркеров в исследованиях как фундаментального, так и прикладного характера.

Нами были проанализированы качественный и количественный состав фракции повторяющейся ДНК в геномах представителей рода *Thinopyrum*: *Th.ponticum* и *Th.elongatum*. Это полиплоидные многолетние дикорастущие злаки, которые используются в селекции пшеницы для передачи хозяйственно-ценных признаков.

Секвенирование проводилось с помощью Illumina NextSeq с парными ридями. Далее мы провели анализ с помощью RepeatExplorer2 для поиска повторяющихся последовательностей и отбора потенциальных сателлитных повторов в геноме.

В результате мы получили данные о сателлитных повторах в геномах образцов *Th.ponticum* и *Th.elongatum* и других повторах и провели сравнение их копийности по типам повторяющихся элементов генома. В среднем, большую часть повторяющейся ДНК составляют мобильные элементы, 46,85%, из них 44,6% относятся к мобильным элементам класса 1, а 1,8% к мобильным элементам класса 2. Среди мобильных элементов класса 1 превалирует доля *Ty3-gypsy*: в среднем 29,3%. Помимо мобильных элементов получены проценты о содержании рДНК, которой найдено в среднем 0,49%. Сателлитная ДНК составляет 1%.

Наиболее представленным семейством LTR-ретротранспозонов из надсемейства *Ty1-copia* стало семейство *Angela* (в среднем 7,5%). Семейство SIRE представлено неодинаково между образцами: при среднем значении 2,1%, образец *Th.ponticum* показал долю в размере 0,66%. Семейства *Bianca*, *Ikeros* и *Tork* найдены в меньших количествах и не во всех образцах. Среди надсемейства *Ty3-gypsy* наибольшую долю занимает семейство *Athila* (16,9%). Остальные семейства представлены в меньшем количестве.

Между образцами не обнаружено существенной разницы: с помощью PCA был построена матрица корреляций, показывающая, что разница в копийности разных типов повторяющейся ДНК не является надёжным методом для дифференциации геномов *Th.ponticum* и *Th.elongatum*. Однако, существуют отдельные различия: семейство *Bianca* (*Ty1-copia*) встретилось только в образце *Th.elongatum*, а *Reina* (*Ty3-gypsy*) напротив, встретилось только у *Th.ponticum*. Выравнивание консенсусных последовательностей сателлитных тандемных повторов показало, что почти все повторы *Th.ponticum* встречаются так же и у *Th.elongatum*.

Список литературы:

1. Cheng Z. J., Murata M. A centromeric tandem repeat family originating from a part of *Ty3/gypsy-retroelement* in wheat and its relatives // *Genetics*. – 2003. – Т. 164. – №. 2. – С. 665-672.
2. Kroupin P. et al. Pipeline for the rapid development of cytogenetic markers using genomic data of related species // *Genes*. – 2019. – Т. 10. – №. 2. – С. 113.

3. Kroupin P. Y. et al. Development of new cytogenetic markers for *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Z.-W. Liu & R.-C. Wang //Comparative cytogenetics. – 2019. – Т. 13. – №. 3. – С. 231
4. Nikitina E. et al. Development of Specific *Thinopyrum* Cytogenetic Markers for Wheat-Wheatgrass Hybrids Using Sequencing and qPCR Data //International journal of molecular sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 12. – С. 4495.
5. Novák P., Neumann P., Macas J. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data //BMC bioinformatics. – 2010. – Т. 11. – №. 1. – С. 378.
6. Yaakov B. et al. Copy number variation of transposable elements in *Triticum–Aegilops* genus suggests evolutionary and revolutionary dynamics following allopolyploidization //Plant cell reports. – 2013. – Т. 32. – №. 10. – С. 1615-1624.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.010

RETRANSDB – БАЗА ДАННЫХ АННОТИРОВАННЫХ ТРАНСКРИПТОВ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ РАСТЕНИЙ

Омаров М.Р.^{1,2}, Киров И.В.¹

*1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научноисследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва 127550 E-mail: biotech@iab.ac.ru,*

*2 – Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»,
Москва, 109028 E-mail: hse@hse.ru*

Ретротранспозоны (РТ) – класс мобильных генетических элементов, способных встраивать копии в новые участки генома. РТ занимают значительную часть растительных геномов и их активность строго контролируется клеткой различными эпигенетическими механизмами [1]. В ряде исследований последних лет показано, что некоторым ретротранспозонам удастся преодолевать системы защиты генома в соматических клетках при отсутствии стрессовых условий [2]. Таким образом появилась необходимость введения термина «ретротранскриптом», обозначающего совокупность транскрибирующихся ретротранспозонов в популяции клеток [3]. Однако, практически ничего неизвестно о том, что отличает транскрипционно активные РТ от огромного числа нетранскрибирующихся.

В представленной работе нами был разработан алгоритм для поиска транскрибирующихся ретротранспозонов при помощи данных секвенирования Oxford Nanopore. Данный алгоритм был применен для геномов 7 различных видов растений: *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Cucumis melo*, *Brassica napus*, *Rosa chinensis*, *Oryza sativa*, *Helianthus annuus*. В ходе работы у каждого вида были обнаружены десятки транскрибирующихся РТ в соматических тканях. Дальнейший анализ выявил некоторые общие паттерны сплайсинга: например, наличие большого числа изоформ *shGAG*, кодирующих только белок вирусоподобной оболочки *GAG*, а также присутствие в нем РНК-связывающего мотива. На основе полученных данных была создана база данных RETRANSdb.

Таким образом, наши результаты показывают, что десятки ретротранспозонов транскрибируются в соматических клетках растений и масштабы экспрессии отличаются среди разных видов. Дальнейшая работа в данном направлении поможет продвинуться в понимании тонкой регуляции ретротранскриптома растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-2360.2019.4.

Список литературы:

1. Slotkin K.R., Matthew Vaughn, Miloš Tanurdžić, Filipe Borges, Jörg D. Becker, José A. Feijó, and Robert A. Martienssen., Epigenetic Reprogramming and Small RNA Silencing of Transposable Elements in Pollen. *Cell*; 2009. 136(3): 461-472. DOI 10.1016/j.cell.2008.12.038.
2. Sarah N Anderson, Michelle C Stitzer, Peng Zhou¹, Jeffrey Ross-Ibarra, Cory D Hirsch, Nathan M. Springer., Dynamic Patterns of Transcript Abundance of Transposable Element Families in Maize. *G3*; 2019. 9(11): 3673-3682. DOI 10.1534/g3.119.400431
3. Kovaka, S., Zimin, A.V., Pertea, G.M., Roham Razaghi, Steven L. Salzberg and Mihaela Pertea. Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome Bio*; 2019 20(278): DOI 10.1186/s13059-019-1910-1

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.011

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *Ledum palustre* L. (*Rhododendron tomentosum*) МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Разгонова М.П.^{1,2}, Дербуш И.В.¹, Чунихина О.А.¹, Наврость О.Г.¹, Захаренко А.М.^{1,2},
Пикула К.С.^{1,2}, Голохваст К.С.^{1,2,3}

1 – ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), 190031 Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, E-mail m.razgonova@vir.nw.ru

2 – ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Школа Биомедицины, 690922 Владивосток, остров Русский, Аякс, 10, E-mail Razgonova.mp@dvfu.ru

3 – ФГБНУ «Тихоокеанский институт географии Дальневосточного отделения Академии Наук РФ», 690041 Владивосток, ул. Радио, 7, E-mail k.golokhvast@vir.nw.ru

Род рододендрон *Rhododendron* является самым крупным родом семейства *Ericaceae* (вересковых) и насчитывает около 800 видов. На территории России произрастает 19 видов, основная часть которых (14 видов) встречается только во флоре Сибири и Дальнего Востока [Пояркова А.И., 1952]. Экспериментальные данные, а также сведения народной медицины и традиционной медицины народов, издавна населяющих российскую территорию Дальнего Востока, свидетельствуют о широком использовании рододендронов флоры Сибири и Дальнего Востока в качестве фунгицидных, противовоспалительных, сердечно-сосудистых, тонизирующих, диуретических и антимикробных средств. Обширный ареал обитания данных видов и популярность в народной медицине создают объективные предпосылки для их детального изучения с целью внедрения в медицинскую практику [Коротаева М.С., 2006].

Детальное исследование метаболитов растений является исключительно важной задачей, так как позволяет выявить химические вещества (или комплексы веществ), которые обуславливают те или иные полезные свойства растений. Вместе с тем, с химической точки зрения многие из этих растений изучены лишь поверхностно, хотя очевидна необходимость получения исчерпывающих сведений о составе вторичных метаболитов, и в особенности, это касается тех растений, которые издавна используются в народной медицине [Букреева и др., 2013; Dampc et al., 2013].

Наиболее широко на территории Сибири и Дальнего Востока распространен багульник болотный *Ledum palustre* L. (*Rhododendron tomentosum*). Широкое использование эфирных масел *L. palustre* в медицине обусловлено наличием в них биологически активных компонентов, которые обладают антимикробными, антигрибковыми, гипотензивными, цитотоксическими и противовоспалительными, рострегулирующими, инсектицидными и другими важными свойствами. [Ганина и др., 2015].

В *L. palustre* обнаружен целый комплекс биологически активных соединений: дубильные вещества, кумарины, флавоноиды, фенолы, фенолокислоты, катехины,

микроэлементы, аскорбиновая кислота, тритерпеноиды и фитостерины [Butkiene et al., 2008]. Наибольший интерес, однако, вызывает изучение биологической активности эфирного масла багульника болотного. В первую очередь следует обратить внимание на возбуждение им центральной нервной и сердечно-сосудистой систем и противопаразитарные свойства [Ульяновский и др., 2014].

Настоящая работа посвящена детальному метаболомному анализу листьев *L. palustre*, собранных в Приморском крае на отрогах Сихотэ-Алиня и подвергшихся мацерации метиловым спиртом.

Метод ВЭЖХ-МС/МС применен для обнаружения целевых аналитов в метанольном экстракте *Ledum palustre* L. Масс-спектрометрические данные были получены с помощью масс-спектрометра amaZon SL (производство фирмы «BRUKER DALTONIKS», Германия), оснащенного источником ионизации электрораспылением ESI в режимах отрицательных и положительных ионов. Оптимизированные параметры получены следующим образом: температура источника ионизации: 70 ° C, поток газа: 4 л / мин, газ-небилайзер (распылитель): 7,3 psi, капиллярное напряжение: 4500 V, напряжение на изгибе торцевой пластины: 1500 V, фрагментатор: 280 V, энергия столкновения: 60 eV. Масс-спектрометр использовался в диапазоне сканирования m/z 100 – 1.700 для МС и МС/МС. Скорость захвата составляла 1 спектр/с для МС и 2 спектра/с для МС/МС. Сбор данных контролировался программным обеспечением Windows для BRUKER DALTONIKS. Все эксперименты повторены трижды. Реализован режим трехступенчатого разделения ионов (МС/МС режим).

В результате масс-спектрометрического исследования выделено 49 целевых аналитов, из них 27 биологически активных соединений идентифицированы впервые в *Ledum palustre* L. путем сравнения полученных экспериментальных данных с известными научными результатами. Это соединения: миристиновая кислота; 7-гексадециновая кислота; цис-циклопропан-гексадекановая кислота; маргариновая кислота; апигенин; нарингенин; линолевая кислота; стеариновая кислота; цис-циклопропан-октадекановая кислота; кемпферол; метиловый эфир кемпферола; дигидрокверцетин; рамнетин; мирицетин; госсипетин; ампелоптин; генэйкозановая кислота; метиловый эфир мирицетина; неохлорогеновая кислота; лигноцериновая кислота; андромедотоксин; монтановая кислота; цинарозид; катехин-7-О-глюкозид; госсипетин-3-глюкозид; рутин.

Список литературы:

1. Букреева, Т.В.; Шаварда, А.Л.; Матусевич, О.В.; Морозов, М.А. Урсановые, олеанановые и лупановые тритерпеноиды листьев *Ledum palustre* (Ericaceae) на Северо-западе России. / Раст. ресурсы. – 2013. – Т.49. – №2. – С. 395–403.
2. Ганина, М.М.; Попова, О.И. Содержание фенольных соединений в побегах багульника стелющегося (*Ledum decumbens* Lodd. ex Steud), произрастающего на территории ямало-ненецкого автономного округа. / Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т.49. – №4. – С. 33–35.
3. Коротаева, М.С. Фармакогностическое изучение четырех видов рода *Ledum* L. Диссертационное исследование по специальности 15.00.02. – Ярославль. – 2006.
4. Пояркова, А.И. Род Рододендрон. // Флора СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1952. – Т.18. – С. 31-60.
5. Ульяновский, Н.В.; Косяков, Д.С.; Покрышкин, С.А.; Боголицын, К.Г.; Ульяновская, О.С. Изучение компонентного состава летучих веществ багульника болотного методом термодесорбционной газовой хромато-масс-спектрометрии. // Химия растительного сырья. – 2014. – №4. – С. 153-161.
6. Butkiene R., Sakociute V., Latvenaite D., Mockute D. Composition of young and aged shoot essential oils of the wild *Ledum palustre* L. //Chemija. – 2008. – Vol.19(2). –pp. 19-24.
7. Dampc, A.; Luczkiewicz, M. *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*). A Review of traditional use based on current research. Fitoterapia. – 2013. – Vol. 85. – pp. 130–143.

8. Razgonova, M.; Zakharenko, A.; Ercisli6 S.; Grudev, V.; Golokhvast, K. Comparative Analysis of Far East Sikhotinsky Rhododendron (*Rh. sichotense*) and East Siberian Rhododendron (*Rh. adamsii*) Using Supercritical CO₂-Extraction and HPLC-ESI-MS/MS Spectrometry. // *Molecules*. – 2020. – Vol.25. – pp. 3774.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.012

ПОИСК ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОМА КОНОПЛИ ПОСЕВНОЙ (*CANNABIS SATIVA* L.)

Романов Д.В.

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», Лаборатория прикладной геномики и
частной селекции сельскохозяйственных растений, Курчатowski геномный центр –
ВНИИСБ, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42.
E-mail: akabos1987@gmail.com**

Конопля посевная является важным сельскохозяйственным растением. Лечебными свойствами в разной степени обладают все надземные части растения. Используют при лечении ожогов, сердечно-сосудистых и бронхолегочных заболеваний, анемии, хрупкости костей и диатезе, заболеваний системы пищеварения. Кроме широкого использования в медицине, конопля успешно используется в качестве технической культуры, а также в косметологии и в кулинарии [1].

Конопля посевная является двудомным растением с XX\XY-системой детерминации пола, также существуют однодомные сорта, с женским кариотипом (XX) [2]. При этом двудомность конопли накладывает определенные ограничения на процесс ее возделывания. Мужские и женские растения созревают в разное время, из-за чего на определенном этапе необходимо проводить ручные прополки, что значительно сказывается на стоимости конечного продукта [3]. Определение механизмов детерминации пола в дальнейшем позволит влиять на процентное соотношение мужских и женских особей в популяции. Создание цитогенетических маркеров для идентификации половых хромосом конопли посевной, является важным шагом для их дальнейшего изучения.

Для решения поставленной задачи нами была выделена высокоочищенная ДНК конопли посевной. После этого были идентифицированы высококопийные последовательности генома конопли посевной с помощью NGS-секвенирования с низким покрытием и последующего биоинформатического анализа полученных сиквенсов с помощью сервера RepeatExplorer и сопутствующих биоинформатических программ (FastQC, trimmomatic и др.).

В результате нами были найдены 8 сателлитных повторов конопли посевной, один из которых показал гомологию к известному субтеломерному повтору [2]. Эти повторы в дальнейшем будут использованы для FISH-локализации на хромосомах конопли посевной.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-76-00036).

Список литературы:

1. Russo, E. B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1614-1648.
2. Divashuk, M. G., Alexandrov, O. S., Razumova, O. V., Kirov, I. V., & Karlov, G. I. (2014). Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XY chromosome sex determination system. *PloS one*, 9(1), e85118.
3. Faux, A. M., Berhin, A., Dauguet, N., & Bertin, P. (2014). Sex chromosomes and quantitative sex expression in monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Euphytica*, 196(2), 183-197.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ В СОЗДАНИИ НОВОГО ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ТЫКВЕННЫХ КУЛЬТУР *ACIDOVORAX CITRULLI*

Словарева О.Ю.¹, Старикова Е.В.^{1,2}

1 – ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», Быково 140150; E-mail: office@vniikr.ru

2 – ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства», Москва 119435

Acidovorax citrulli (Schaad et al.) – это растительный патоген, способный наносить существенный ущерб производству продукции культур семейства Cucurbitaceae в местах своего распространения [1]. Возбудитель бактериоза является карантинным организмом для многих стран [2]. Ранняя диагностика бактерии – ключ к контролю её распространения [3]. Использование методов на основе ПЦР позволяет проводить обнаружение бактерий наиболее быстро. В то же время ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) – метод, требующий минимальных трудозатрат [4]. Существует всего несколько тестов на основе ПЦР-РВ для диагностики *A. citrulli*, только два из них рекомендованы диагностическим протоколом Европейской и средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) РМ7/127(1) [5], и применение лишь один из них коммерчески выгодно. При этом оценка специфичности данного теста показала неудовлетворительный результат [6]. В связи с высокой актуальностью проведено исследование, целью которого являлась разработка нового теста на основе ПЦР-РВ для идентификации *A. citrulli*.

Для поиска мишени использовали аннотированные белки, соответствующие кодирующим последовательностям геномных сборок 9 штаммов *Acidovorax citrulli* и 9 – *Acidovorax avenae*, размещенным в NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/>). Каждый набор белковых последовательностей кластеризовали с помощью программы cd-hit при пороге идентичности 90% и допустимой разнице в длине последовательностей 80%. Для идентификации белковых кластеров применяли скрипт на языке Python. Полученные белковые кластеры, присутствующие у *A. citrulli* и отсутствующие у *A. avenae*, сравнивали с известными белковыми последовательностями (nr) с помощью программы blastp с целью оценки их специфичности для *A. citrulli*. Специфичными считались белки, имеющие низкое сходство (<70% идентичности) с белками других бактериальных видов, как родственных, так и не родственных *A. citrulli*. Как неподходящие в качестве мишени, из анализа исключили фаговые белки, а также белки, имеющие внутривидовую вариабельность у *A. citrulli*.

Оценку аналитической специфичности нового метода проводили с 5 штаммами *A. citrulli* – IVIA 51, 2609, 3000 (Испания), и DLS 1035, 1456 (Германия). Также использовали нецелевые бактерии из коллекций CFBP, LSV (Франция), NCPPB (Великобритания), DSMZ (Германия), EVIRA (Финляндия), LMG (США), ICMP (Новая Зеландия), ACW (Швейцария) и ФГБУ «ВНИИКР». Всего использовали 188 штаммов различных видов, подвидов и патоваров бактерий, принадлежащих родам *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Dickeya*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pectobacterium*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rathayibacter*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Xylella* и *Xylophilus*. Каждый штамм тестировали в трехкратной повторности. Использовали следующий состав реакционной смеси: 12 µl воды, 5 µl 5X qPCRmix-HS (ООО «Евроген», Россия), по 10 pmol праймеров, 5 pmol зонда и 50–100 нг ДНК-матрицы. Для проведения ПЦР использовали амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «ДНК-Технология», Россия). Программа

амплификации: 95 °C – 5 мин., затем 40 циклов: 94 °C – 10 сек., 62 °C – 30 сек., 72 °C – 20 сек.

В результате идентифицировано 153 белковых кластера, присутствующих во всех 9 штаммах *A. citrulli* и отсутствующих во всех 9 штаммах *A. avenae*. В результате сравнения с известными белковыми последовательностями (nr), многие из полученных кластеров решили не использовать в качестве ПЦР-мишени, поскольку они имели высокое сходство с белками других бактериальных видов и родов (таких как *Variovorax*, *Ottowia*, *Stenotrophomonas*, *Bordetella* и др.). В то же время, белок S-box домена PAS длиной 524 аминокислотных остатка был высокоспецифичен для *A. citrulli* при отсутствии вариативности внутри вида. Данный белок участвует в принятии бактерией сигналов, таких как фотоны, молекулы газа и др. Сигнальные домены PAS встречаются у многих организмов, но отличаются высокой вариативностью (идентичность около 20%) [7]. Используя программу PrimerBlast и кодирующую последовательность, соответствующую локусу C8E07_RS00895 белка S-box PAS домена (WP_011796953.1) *A. citrulli* штамма AAC00-1 # 5596 (NZ_QUNC01000001.1), разработали следующие праймеры и зонд:

PASF: 5'-CCAAAGCCAGCACGAGGAGA-3'

PASR: 5'-GAACAGCGAGACGGAGTGGT-3'

PASP: 5'-FAM-ACGCGCATCAACGGCGTCATCG-BHQ1-3'

Тестирование бактериальных штаммов новым методом показало положительные результаты со всеми 5 штаммами *A. citrulli* и отрицательные – со всеми 188 штаммами бактерий других видов. Таким образом, новый метод позволяет проводить выявление и идентификацию *A. citrulli*, избегая перекрестных реакций с нецелевыми бактериями. Использование нового метода ПЦР-ПВ для идентификации *A. citrulli*, основанного на последовательности, кодирующей белок S-box домена PAS, может использоваться для тестирования здоровья продукции тыквенных культур в условиях рутинной диагностики.

Список литературы:

1. Yang R., Garcia D.S., Pérez Montaña F., Mateus da Silva, G., Zhao M., Jiménez Guerrero I., Rosenberg T., Chen G., Plaschkes I., Morin S., Walcott R., Burdman S. Complete Assembly of the Genome of an *Acidovorax citrulli* Strain Reveals a Naturally Occurring Plasmid in This Species. 2019. 10:1400.
2. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), *Acidovorax citrulli* Categorization. 2020. <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC/categorization>.
3. Islam M.R., Hossain M.R., Kim H.T., Jesse D.M.I., Abuyusuf M., Jong H.J., Park J.I., Nou I.S. Development of Molecular Markers for Detection of *Acidovorax citrulli* Strains Causing Bacterial Fruit Blotch Disease in Melon. 2019. 2;20(11):2715.
4. Xinyue B., Xiaodong L., Haibo Y., Mengnan A., Rui L., Zihao X., Yuanhua W. Development of a multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of Cucumber green mottle mosaic virus and *Acidovorax citrulli* in watermelon. 2019. 7:7539.
5. European and Mediterranean Plant Protection Organization. PM7/127(1) *Acidovorax citrulli*. EPPO Bulletin. 2016. 46:3.
6. Slovareva O.Y., Kornev K.P., Matyashova G.N., Stakheev A.A., Prikhodko S.I. Recommended procedure for detection and identification *Acidovorax citrulli* in seeds. 2019. 2063:030020.
7. Nebert D.W. Aryl hydrocarbon receptor (AHR): "pioneer member" of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of "sensors" of foreign and endogenous signals. 2017. 67.

РОЛЬ МЕТИОНИНОВОГО ЦИКЛА В ФОРМИРОВАНИИ ОТВЕТА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА Y-ВИРУС КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

**Спеченкова Н.А., Фесенко И.А., Князев А.Н., Махотенко А.В.,
Глушкевич А.И., Мамаева А.С., Калинина Н.О., Тальянский М.Э.**

***Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН), Москва 117997
E-mail: solanum@ibch.ru***

Картофель (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) является важнейшей сельскохозяйственной культурой, которая подвергается воздействию различных факторов окружающей среды и патогенов (в том числе вирусов) на протяжении всего жизненного цикла. Воздействие некоторых абиотических и биотических стрессовых факторов оказывает негативное влияние на урожайность картофеля, а также качество клубней. Идентификация ключевых генов и механизмов защитного ответа растений, участвующих в формировании комплексной устойчивости, позволит усовершенствовать селекционный процесс и создание новых сортов различных сельскохозяйственных культур.

Y-вирус картофеля (YVK) является экономически важным патогеном растений семейства Паслёновые. Известно, что взаимодействие вируса с растением модулируется различными абиотическими факторами (например, повышенной температурой). Под воздействием теплового стресса на зараженных растениях картофеля наблюдается формирование суровых симптомов, что подтверждается данными о повышении уровня накопления РНК YVK (Makarova et al., 2018). Однако некоторые защитные противовирусные механизмы растений остаются неизвестными. Для того чтобы понять, каким образом повышенная температура влияет на взаимодействие вируса с растением, были проанализированы изменения на протеомном уровне растений картофеля сорта Чикаго, инфицированных YVK при нормальной (22°C) и повышенной (28°C) температуре. Особый интерес вызвала группа белков метионинового цикла (МЦ), представленность которых снижалась в условиях повышенной температуры и не изменялась при нормальной. Полученные данные согласуются с тем, что в условиях повышенной температуры последовательно изменяются уровни метаболитов МЦ (Mäkinen and De, 2019). Предполагается, что увеличение восприимчивости растений картофеля сорта Чикаго к YVK при повышенной температуре вызвано нарушениями в МЦ. Обработка растений экзогенным метионином приводила к восстановлению уровня накопления метаболитов МЦ и повышению резистентности к YVK в условиях повышенной температуры (Fesenko et al, 2020).

Для изучения роли основных ферментов и метаболитов МЦ в формировании ответа растений к стрессам на транскриптомном уровне нами был использован метод нанопорового секвенирования на секвенаторе нового типа - MinION. Данный метод позволяет напрямую секвенировать РНК, устанавливать новые изоформы генов, открывать новые транскрибирующие участки генома, а также оценивать наличие таких модификаций нуклеотидов, как метилирование. Анализ транскриптома растений картофеля был проведен с использованием технологий Oxford Nanopore Technologies. Были выделены препараты поли-А содержащей РНК из листьев контрольных и опытных растений картофеля сорта Чикаго (YVK и повышенная температура) в трёх биологических повторностях и подготовлены геномные библиотеки. Впервые в России было выполнено прямое нанопоровое секвенирование мРНК растений картофеля на приборе MinION с

использованием ячеек R9.4.1 FLO-MIN106. В результате было получено более 2 млн. прочтений для каждого биоповтора.

Среди 12958 установленных и аннотированных транскриптов можно отметить гены, транскрипция которых увеличивалась: это уже отмеченные ранее ферменты метионинового цикла (например метионинсинтаза, 5-формилтетрагидрофолатциклолигаза и др.) и сопутствующие ему белки (транспортёр S-аденозилметионина и др.). Помимо этого, в несколько раз возрастает уровень транскрипции генов компонентов сигнальных путей, опосредованных фитогормонами, некоторые хлоропластные гены и гены-участники защитных путей ответа на тепловой стресс (семейства белков HSP) и патогены (белки врожденного иммунитета растений). Кроме того, наблюдалось снижение транскрипции некоторых генов ферментов метионинового цикла, таких как сериновая, гомоцистеиновая и другие метилтрансферазы. Эти данные согласуются с ранее полученными данными об изменении протеома (Fesenko et al, 2020). Особый интерес представляет снижение транскрипции целого кластера WRKY генов семейства транскрипционных факторов, что не характерно в условиях повышенной температуры, но, видимо, обусловлено вирусной инфекцией (Zhang et al., 2017). Примечательно, что отсутствие транскрипции наблюдалось в генах, которые представлены РНК-связывающими белками и генами полиА-полимеразы.

Полученные данные анализа транскриптома согласуются с данными протеомного профилирования и позволяют предположить участие белков метионинового цикла в защитном ответе растений на абиотические и биотические стрессы. Разработанные методы анализа молекулярных механизмов устойчивости растений картофеля могут быть применимы и для других сельскохозяйственных культур.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства РФ № 14.W03.31.0003/4.

Список литературы:

1. Makarova, S., Makhotenko, A., Spechenkova, N., Love, A. J., Kalinina, N. O., and Taliansky, M. Interactive responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants to heat stress and infection with potato virus Y. 2018. *Frontiers in microbiology*, 9, 2582. DOI 10.3389/fmicb.2018.02582.
2. Mäkinen K, De S. The significance of methionine cycle enzymes in plant virus infections. 2019. *Current opinion in plant biology* 50, 67-75. DOI 10.1016/j.pbi.2019.03.002.
3. Fesenko I., Spechenkova N., Mamaeva A., Makhotenko A., Taliansky M., et al. Role of the methionine cycle in the temperature-sensitive responses of potato plants to potato virus Y. 2020. *Molecular Plant Pathology* (in prep).
4. Zhang, C., Wang, D., Yang, C., Kong, N., Shi, Z., et al. Genome-wide identification of the potato WRKY transcription factor family. 2017. *PloS one*, 12(7), e0181573. DOI 10.1371/journal.pone.0181573.

**РАСШИФРОВКА ГЕНОМА ГУАРА (*CYAMOPSIS TETRAGONOLOBA* (L.) TAUB.)
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВТОРОГО И
ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ**

Ульянич П.С.^{1,2,3}, Григорьева Е.А.^{1,3,4}, Беатович А.⁴, Волков В.А.^{1,3}, Потокина Е.К.^{1,3}

1 – Научно-технологический университет «Сириус», Сочи 354340

*2 – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии, Санкт-Петербург 196608
E-mail: p.ulianich@gmail.com*

*3 – Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени
С.М. Кирова, Санкт-Петербург 194021*

4 – Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург 197101

Гуар (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) – однолетняя бобовая культура, преимущественно возделываемая в Индии и Пакистане. Интерес к гуару, как новой сельскохозяйственной культуре РФ, объясняется высоким содержанием в его семенах полисахарида галактоманнана, используемого во многих отраслях промышленности, включая нефтедобычу. Гуар – растение короткого фотопериода, его успешная интродукция на территории РФ зависит от развития методов маркер-вспомогательной селекции этой культуры. На сегодняшний день информация о полном геноме этого вида отсутствует, что сильно затрудняет разработку и использование молекулярных маркеров для селекции гуара.

Нами была предпринята попытка создания первой версии полногеномной сборки гуара с использованием технологий секвенирования ДНК короткими чтениями на платформе Illumina NovaSeq600 и длинными чтениями на платформе Oxford Nanopore Technologies (ONT). В результате проведенных экспериментов нам удалось достичь ~250-кратного покрытия генома гуара короткими чтениями с Illumina, и почти 97-кратного покрытия длинными чтениями с MinION. Суммарное покрытие составило ~347X. Полученные результаты секвенирования обеспечили базу для тестирования различных алгоритмов полногеномной сборки гуара.

Путем комбинирования технологий секвенирования второго и третьего поколения нам удалось разрешить несколько проблем: избежать ограничений, вызванных малой длиной чтений с платформы Illumina, и нивелировать ошибки в длинных чтениях с платформы ONT. В ходе работы были протестированы несколько подходов к полногеномной сборке: с использованием ассемблеров (Assemblers) для коротких ридов (ABYSS, Soapdenovo2, SGA, Velvet), ассемблеров для длинных ридов (Flye, Canu), ассемблеров, комбинирующих длинные и короткие чтения (hybridSPAdes, Masurca). По результатам оценки основных биоинформатических характеристик полученной полногеномной сборки гуара наиболее результативным оказался ассемблер Masurca. С его использованием показатель N50 для сборки составил 2518853 п.о., процент полученных скаффолдов длиной более 200 000 п.о. составил 93.00%, длиной более 300 000 п.о. – 90.66%. Результаты позволяют перейти к следующему этапу расшифровки генома гуара – выяснению порядка расположения скаффолдов на хромосомах с использованием оптического картирования.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-51007 с использованием оборудования и инфраструктуры Научно-технологического университета «Сириус».

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ГДФ-L-ГАЛАКТОЗОФОСФОРИЛАЗЫ (*GGPI*) В ЛИСТЬЯХ ЛУКА-ПОРЕЯ В ОТВЕТ НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС.**Филюшин М.А., Анисимова О.К., Дьяченко Е.А.*****Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук», Москва 119071
e-mail: michel7753@mail.ru***

Индивидуальное развитие растений сопряжено с постоянным воздействием биотических и абиотических стрессов, которые оказывают значительное влияние на метаболические процессы в клетках растений. Температурные стрессы являются одними из наиболее важных факторов окружающей среды, влияющих на продуктивность и географическое распределение растений. При воздействии различных стрессовых факторов в клетках растений образуются активные формы кислорода (АФК), способные окислять компоненты мембран, приводить к деградации нуклеиновых кислот, белков и пигментов, что, в конечном итоге, вызывает гибель клеток. Для предотвращения накопления АФК и минимизирования негативных последствий их перепроизводства, растительные клетки выработали сложную антиоксидантную систему. К ферментативной антиоксидантной системе относятся такие ферменты как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза, аскорбатпероксидаза, монодегидроаскорбатредуктаза и дегидроаскорбатредуктаза. К неферментативной антиоксидантной системе относятся каротиноиды, антоцианы, некоторые полифенолы, глутатион, а также витамины – α -токоферол (витамин Е) и L-аскорбиновая кислота (витамин С) (Gill et al., 2010; Bilska et al., 2019).

L-аскорбиновая кислота – один из самых распространенных водорастворимых антиоксидантов растительных клеток. К настоящему времени у растений выявлено несколько путей биосинтеза витамина С, при этом L-галактозный путь (путь Смирнова-Уиллера) считается доминирующим (Wheeler et al., 1998, 2015). Ключевым ферментом L-галактозного пути является ГДФ-L-галактозофосфорилаза (GGP; EC 2.7.7.69), катализирующая превращения ГДФ-L-галактозы в L-галактоза-1-фосфат, который является первым соединением на пути биосинтеза АК (Smirnoff, 2018). Для некоторых видов растений была выявлена связь между увеличением экспрессии гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы и толерантностью к абиотическим стрессам (Wang et al., 2014; Ali et al., 2019).

Целью данной работы стало определение профиля экспрессии гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы (*GGPI*) в листьях лука-порей в ответ на холодовой стресс. Для проведения эксперимента 60-дневные растения лука-порей (сорт Коламбус) были помещены в климатическую камеру в регулируемые условия (день/ночь – 16 ч, +22°C, освещенность 190 ммоль м⁻² с⁻¹/8 ч, +16°C). Через 14 дней после помещения растений в климатическую камеру был собран листовой материал (контрольная группа, в двух повторностях) в четырех временных точках (0 – за 15 минут до включения света, затем через 2, 4, 6 и 24 часа). На следующий день растения были подвергнуты холодовому стрессу (+4°C), листовой материал (в двух повторностях) отбирали через те же временные интервалы, что и образцы контрольной группы. Уровни транскрипции гена *GGPI* определяли методом РВ-ПЦР. Для проведения РВ-ПЦР были разработаны специфичные праймеры, в качестве референсных генов использовали *GAPDH* и *UBQ*.

В листьях лука-порей при нормальных условиях выращивания (контроль) максимальный уровень транскрипции гена *GGPI* наблюдался через 2 ч после включения света, затем он снижался и через 6 ч достигал минимального значения, а через 24 ч уровень экспрессии *GGPI* был сопоставим с начальным значением (0 ч). В листьях, подвергнутых

холодовому стрессу, уровни экспрессии *GGPI* в первых трех временных точках (0, 2 и 4 ч) были сопоставимы с контролем. Однако через 6 ч выявлено увеличение уровня транскрипции *GGPI* в сравнении с контролем. Через 24 ч холодового стресса уровень экспрессии *GGPI*, аналогично контролю, был сопоставим с начальным значением.

Уровни транскрипции гена *GGPI* были сопоставлены с содержанием АК в листьях лука-порей. При нормальных условиях выращивания (контроль) максимальное содержание АК выявлено в листьях при отсутствии освещения (0 и 24 ч). При наличии освещения наблюдается обратная зависимость между уровнями экспрессии *GGPI* и содержанием АК. В листьях, подвергнутых холодовому стрессу, различия с контролем в профиле экспрессии *GGPI* наблюдались только через 6 ч обработки. При этом динамика содержания АК отличалась от контроля. Также, интересной особенностью стало то, что в листьях лука-порей при нормальных условиях выращивания и при холодовом стрессе уровни экспрессии *GGPI* и содержание АК через 24 ч были сопоставимы с начальными значениями.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-3350.2019.11).

Список литературы:

1. Ali B., Pantha S., Acharya R., Ueda Y., Wu L.-B., Ashrafuzzaman M., Ishizaki T., Wissuwa M., Bulley S., Frei M. Enhanced ascorbate level improves multi-stress tolerance in a widely grown indica rice variety without compromising its agronomic characteristics. *J. Plant Physiol.* 2019. V. 240. Article 152998. doi:10.1016/j.jplph.2019.152998
2. Bilska K., Wojciechowska N., Alipour S., Kalembe E.M. Ascorbic acid-the little-known antioxidant in woody plants // *Antioxidants (Basel)*. 2019. V. 8. Article 645. doi:10.3390/antiox8120645
3. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol Biochem.* 2010. V. 48. P. 909–930.
4. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. V. 22. P. 116–129. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033
5. Wang L., Meng X., Yang D., Ma N., Wang G., Meng Q. Overexpression of tomato GDP-L-galactose phosphorylase gene in tobacco improves tolerance to chilling stress. *Plant Cell Rep.* 2014. V. 33. P. 1441–1451.
6. Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 1998. V. 393. P. 365–369.

**СЕКЦИЯ
«ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ И ГЕННАЯ
ИНЖЕНЕРИЯ»**

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ НОВОГО ПРОМОТОРА
pro-Sm-AMPX ИЗ РАСТЕНИЯ *STELLARIA MEDIA*****Иванова Л.А., Комахин Р.А.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва
127550 E-mail: recombination@iab.ac.ru***

В настоящее время из широкого круга растений клонировано множество промоторов генов, но лишь единицы из них оказались востребованы в рутинной биотехнологии растений. Протяженные растительные промоторы не обладали биотехнологическими преимуществами по сравнению с известным сильным и конститутивным вирусным промотором CaMV35S [1]. Так промоторы генов «домашнего хозяйства» *UBQ1* и *UBQ6* из *A. thaliana* размером 2-2.5 тыс. п.н. демонстрируют только 30-51 % эффективности экспрессии репортерного гена *uidA* по сравнению с CaMV35S [2]. Удаление дистальной промоторной области, наиболее удалённой от старта инициации транскрипции TSS, в значительной мере позволило повысить эффективность экспрессии рекомбинантных генов. Проксимальные промоторы pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 из *Stellaria media*, размером до -455 п.н., в два раза превосходили CaMV35S при экспрессии репортера *uidA* в агроинфильтрированных растениях *Nicotiana benthamiana* и в линиях трансгенного табака. Кроме этого, они по эффективности контроля селективного гена *nptII* при отборе трансгенных побегов табака и проростков арабидопсиса на средах с антибиотиком канамицином в рекомендованных концентрациях не уступали дуплицированному промотору 2xCaMV35S [3]. Несмотря на последние достижения, генетическая инженерия для мультигенной трансформации растений нуждается в новых промоторах, обладающих высокой точностью экспрессии рекомбинантных генов.

С использованием метода для обнаружения локусов интеграции Т-ДНК [4] нами была амплифицирована промоторная область гена альфа-гарпинина *SmAMP-X* из растения *Stellaria media*. Установили, что промотор представлен двумя версиями, обозначенными pro-Sm-AMPX-1 и pro-Sm-AMPX-2, нуклеотидные последовательности которых идентичны на 83%. Существующий полиморфизм затрагивает не только промоторные области, но 5'-НТО соответствующих генов. В клонированной нами последовательности 5'-НТО гена *SmAMP-X1*, обнаружили замену «g» на «a» в положении +21 относительно TSS в сравнение с опубликованной ранее последовательностью [5].

С помощью программы «New place A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements» обнаружили в нуклеотидных последовательностях обеих версий pro-Sm-AMPX-1 и pro-Sm-AMPX-2 размером до -440 п.н. относительно TSS от 27 до 35 потенциальных цис-действующих элементов. Они включали TATA-box в ожидаемом контексте (-33 п.н.) относительно TSS, ранее описанного при клонировании гена *SmAMP-X* [5]. В проксимальных областях (примерно -100 п.н. относительно TSS) обнаружили консервативный цис-действующий элемент CAAT-box. В целом, обе версии содержали цис-действующие элементы, связанные с различными функциональными свойствами: светочувствительные элементы (box 4, TCT-motif, G box), WUN-motif – элемент, активирующийся при поранении, GATA box – элемент светорегулируемой и тканеспецифической экспрессии, CGTCA-motif – элемент участвующий в ответе на действие MeJA, P-box - гиббереллин-чувствительный элемент, MYB - вовлечен в АБК- и стресс-регулируемую активацию генов, WRKY71OS – транскрипционный репрессор сигнального пути гиббереллина, CBFHV – дегидратационно-чувствительный элемент, MYC, L1 box и др. Полиморфизм между версиями в области TATA box отсутствовал, однако расположенные рядом с ним однонуклеотидные полиморфизмы в «коровой» и

проксимальной областях предопределяли формирование различной промоторной архитектуры цис-элементов.

Структурно-функциональная характеристика 5'-делеционных вариантов pro-Sm-AMPX-1 (-1268, -416, -283 и -206 п.н.) и pro-Sm-AMPX-2 (-440 п.н.) методом агроинфильтрации растений *Nicotiana benthamiana* показала, что они достаточны для экспрессии репортерного гена *gus* и по эффективности сопоставимы с вирусным промотором 35S CaMV. Две разные версии -416 п.н. и -440 п.н., сходные по размеру и идентичные на 83%, статистически незначимо различались по эффективности. Поскольку удаление проксимальной области pro-Sm-AMPX-1 до -283 и -206 п.н. снижало силу промотора соответственно, на 30 и 80 %, сделали предположение, что они содержат действующие позитивно цис-элементы. С использованием синтетических промоторов подтвердили, что участки от -283 до -206 п.н. и от -416 до -283 п.н. повышают эффективность минимального промотора CaMV35S в два раза, а участок от -416 до -206 п.н. – в четыре раза.

Методом агробактериальной трансформации листовых эксплантов растений табака (*Nicotiana tabacum*) оценили эффективность создания трансгенных побегов с использованием 5'-делеционных вариантов pro-Sm-AMPX-1 (-416 п.н.) и pro-Sm-AMPX-2 (-440 п.н.), контролирующих экспрессию селективного гена *nptII*. Селекцию трансформированных клеток проводили на среде с высокой концентрацией канамицина 350 мг/л с целью отбраковать слабые варианты. Установили, что версия -416 п.н. оказалась конститутивной для регенерации трансгенных побегов у 50% эксплантов, а версия 440 п.н. – у 70% эксплантов. Очевидно, что эффективность новых промоторов ниже, чем у дублированного вирусного промотора 2x35S CaMV, который позволяет образовать каллусы и регенеранты у всех эксплантов. Ранее при регенерации табака только промотор pro-SmAMP2 был сопоставим по уровню конститутивности экспрессии *nptII* с 2x35S CaMV [3]. Таким образом, новый промотор pro-Sm-AMP-X можно считать пригодным для биотехнологии растений, а его версии целесообразно использовать для выяснения организации промоторной архитектуры растительных промоторов.

Работа поддержана РФФИ в рамках научного проекта № 19-016-00067.

Список литературы:

1. Odell J.T. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter / J.T. Odell, F. Nagy, N.H. Chua // *Nature*, 1985 – 313 - p. 810–812 PMID: 3974711
2. Callis J. Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*—structure, localization and expression of their promoters in transgenic tobacco / J. Callis, J. A. Raasch, R.D. Vierstra // *J. Biol. Chem.*, 1990 – 265 - 12486–12493.
3. Маджарова Н.В. Промоторы pro-SmAMP1 и pro-SmAMP2 из дикорастущего растения *Stellaria media* для биотехнологии двудольных растений / Н.В. Маджарова, К.А. Казакова, С.Р. Стрельникова, О.А. Снычева, Е.М. Ветчинкина, Л.Н. Ефремова, Д.А. Высоцкий, А.В. Бабаков, Р.А. Комахин // *Физиология растений*, 2018 - Т. 65 № 5 - с. 388-400.
4. Pogorelko G.V. A highly efficient miPCR method for isolating FSTs from transgenic *Arabidopsis thaliana* plants / G.V. Pogorelko, O.V. Fursova. // *Journal of Genetics*, 2008 – Vol. 87, No. 2, – P. 133-140.
5. Slavokhotova A.A. Novel antifungal α -hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution. / A.A. Slavokhotova, E.A. Rogozhin, A.K. Musolyamov, Y.A. Andreev, P.B. Oparin, A.A. Berkut, A.A. Vassilevski, T.A. Egorov, E.V. Grishin, T.I. Odintsova // *Plant Mol Biol.*, 2014 - 84(1-2) - p. 189-202. doi: 10.1007/s11103-013-0127-z

**ВЫБОР ГЕНОВ СИНТЕЗА КРАХМАЛА ПШЕНИЦЫ КАК МИШЕНЕЙ ДЛЯ
ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ****Крупин П.Ю.**

*Лаборатория прикладной геномики и частной селекции
сельскохозяйственных растений
Всероссийского научно-исследовательского института
сельскохозяйственной биотехнологии,
Курчатовский геномный центр – ВНИИСБ.
127550 Москва, Тимирязевская улица, 42
E-mail: pavel-krupin@yandex.ru*

Важным моментом в селекции растений является расширение генетического разнообразия культурных растений. Естественные мутации по хозяйственно-ценным генам встречаются довольно редко, что снижает эффективность их использования как основного инструмента расширения их аллельного разнообразия. Использование мутагенов приводит к ненаправленному, случайному изменению нуклеотидных последовательностей и может затрагивать жизненно важные гены организма. Возделывание трансгенных организмов в ряде стран, в том числе и в России, строго регламентировано законом. Появление нетрансгенных подходов направленной модификации генов, таких как геномное редактирование на основе технологии CRISPR/Cas9, открывает широкие перспективы для создания новых форм сельскохозяйственных растений с заданными свойствами. Для оптимизации процедуры геномного редактирования необходимо выбрать хорошо изученные гены с легко идентифицируемым фенотипическим проявлением у нокаут-мутантов. К таким генам относятся гены синтеза крахмала.

Крахмал – сложный биополимер молекулы глюкозы, в состав которого входят линейные молекулы амилозы и разветвлённые молекулы амилопектин. Молекулы амилозы синтезируются в амилопластах зерна гранул-связанной синтазой крахмала (Granule Bound Starch Synthase I, GBSSI). Пшеница с нуль-аллелями генов *Wx*, кодирующих GBSSI, характеризуются повышенным содержанием амилозы, а гомозиготы по всем трём генам (*Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1*) отличаются полным отсутствием амилопектина. Сравнение разных генов-ортологов GBSSI показало, что мотив KTGGLGDV (подчёркнуты наиболее консервативные аминокислоты), гистидин 231 и изолейцин 485 формируют АДФ-глюкозный карман, связывающий АДФ-глюкозу – молекулу, используемую для удлинения цепочки амилозного полимера (Nakamura et al., 1998; Nichols et al., 2000; Leterrier et al., 2008). Нами с помощью NCBI Conserved Domain Search путём сравнения *Wx*-генов разных видов пшеницы показано, что в формировании данного кармана также участвуют аминокислоты в составе следующих мотивов: QKGPDV, PLANQMM, LIQLQG. К консервативным также относится гистидин в мотиве HTGLL (Leterrier et al., 2008). Редактирование генов по данным функциональным доменам позволит получить безамилозные растения пшеницы. Безамилозная пшеница важна для производства спирта, нечерствеющего хлеба, лапши удон и других целей.

Удлинение цепей амилопектина по связям 1,4 осуществляется синтазами крахмала (Starch Synthase, SS), среди которых наибольшее фенотипическое проявление демонстрирует *SSIIa*: нуль-аллели по этому гену приводят к увеличению содержания амилозы в зерне пшеницы в среднем на 30%. Фермент *SSIIa* имеет консервативный домен, общий с GBSSI KTGGLGDV, что открывает перспективы для одновременного нокаут-редактирования этих двух генов. Сочетание нуль-аллелей по всем трём гомеологам *Wx* и *SSIIa* приводит к формированию так называемой «сладкой пшеницы» (Nakamura et al., 2015). Также *SSIIa* имеет свои консервативные аминокислоты (подчёркнуты) в

функциональных доменах: в каталитическом сайте VMLGTG (Liu 2015) и мальтоолигосахарид-связывающем сайте в мотивах DTVPPFDP, FNHSGLGWTF (Cuesta-Seijo et al., 2013), HTALL и HQGRG (Leterrier et al., 2008).

Разветвление цепей амилопектина происходит благодаря группе ферментов ветвления (Starch Branching Enzyme, SBE), среди которых наиболее хорошо изучено фенотипическое проявление по нуль-аллелям *SBEIIa*. В зерне таких растений пшеницы содержание амилозы может возрастать от 10% до 80% и более. Поиск по литературным источникам позволил выявить консервативные аминокислоты (подчёркнуты) SFGY, HSNSS, GFRFDGVT, GEDVS, AESHDQAL, GYHVT и функциональный мотив PQTLPTGKVLP (Li et al., 2015; Sun et al., 1998; Sestili et al., 2015). Создание высокоамилозной пшеницы важно для производства продуктов питания с резистентным крахмалом, которые предупреждают риск возникновения диабета второго типа.

Деветвящие ферменты нужны как для расщепления неправильно собранных цепей, так и для создания затравок для синтеза амилопектина. К группе деветвящих ферментов относятся изоамилозы, среди которых наиболее полно охарактеризован фермент Isoamylase 1 (ISA1). Нуль-аллели по генам *ISA1* приводит к формированию фитогликогена (Nakamura et al., 2015). Поиск с помощью NCBI Conserved Domain Search путём сравнения последовательностей *ISA1* разных видов пшениц показал следующие консервативные аминокислоты, которые формируют альфа-амилозный каталитический домен среди гликоген-деветвящих ферментов (подчёркнуты): ASIMTR, WDAGG, TLADL.

С помощью вирус-индуцированного сайленсинга было показано, что подавление экспрессии гена транскрипционного фактора *TaRSR1* приводит к увеличению содержания крахмала в зерне (Liu et al., 2016). Нами выявлено с помощью NCBI Conserved Domain Search наличие домена AP2 со следующими консервативными аминокислотами (подчёркнуты): RGVTFYRRTGRWESHIWDCGKQVYLGG. Включение данного гена в программу генетического редактирования генов синтеза крахмала представляется актуальным, так как в целом пшеница с нуль-аллелями генов *GBSSI*, *SSIIa*, *SBEIIa* и *ISA1* отличается пониженным содержанием крахмала и необходима его компенсация другими генетическими системами.

Дальнейшие этапы исследований включают в себя поиск участков генов, соответствующих выявленным консервативным участкам ферментов, разработка гидовой РНК и конструирование векторных конструкций для переноса их в геном пшеницы.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.019

ИЗУЧЕНИЕ СЕРОТИП-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Кольцов А.Ю., Сухер М.М., Белов С.В., Крутько С.А., Кольцова Г.С.

***ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии
(ФГБНУ ФИЦВиМ)», Вольгинский 60112; E-mail: lila5757@yandex.ru***

Африканская чума свиней (АЧС) является одной из наиболее серьезных угроз развития свиноводства во всем мире. АЧС приводит к значительным экономическим потерям, которые связаны с затратами на карантин и убой зараженных животных. Ежегодные вспышки АЧС в России (с 2007 г. - по настоящее время) и Восточной Европе (с 2014 г. – по настоящее время), а также быстрое распространение болезни в Азиатских странах (с 2018 г. – по настоящее время) подчеркивают актуальность изучения возбудителя АЧС и разработки методов борьбы с ним. Возбудителем болезни является большой, оболочечный и сложноорганизованный ДНК-содержащий вирус из рода *Asfivirus* семейства *Asfarviridae* (Dixon, et al., 2000).

Эффективной и безопасной вакцины против АЧС до настоящего времени не разработано, однако, неоднократно продемонстрирована возможность защиты животных от гомологичного повторного заражения путем иммунизации их аттенуированными вариантами вируса. Доступные данные экспериментов по вакцинации/заражению свиней указывают на то, что защитный иммунитет против АЧС является серотипоспецифичным.

Понимание разнообразия серологических групп вируса АЧС в природе, а также идентификация серотип-специфических антигенов, участвующих в формировании защитного иммунитета, необходимы для дизайна и разработки вакцины. Безопасные и эффективные DIVA вакцины станут важным инструментом контроля болезни.

Целью работы являлось создание и изучение рекомбинантных штаммов вируса АЧС, полученных путем замены и удаления генов EP402R и EP153R, кодирующих серотип-специфические вирусные белки CD2v и лектин С-типа.

В ходе выполнения работ были сконструированы химерные вирусы АЧС одного серотипа (SG3, SG2, SG4), содержащие гены серотип-специфических антигенов гетерологичного серотипа (SG2, SG4, SG2, соответственно), а также рекомбинантный штамм вируса с делецией гена EP402R. Для получения химерных вирусов кандидатные гены (EP402R и EP153R), кодирующие белки CD2v и C-type lectin, были клонированы в состав плазмидных векторов для создания рекомбинационных кассет. В качестве исходных вирусов были использованы штаммы МК200, КК262, ФК-32/135 депонированные в ГК ФГБНУ ФИЦВиМ. Рекомбинационные кассеты были сконструированы для каждого штамма отдельно и содержали «плечи» рекомбинации (фрагменты генома исходного штамма), гены EP402R/EP153R (гетерологичного штамма) и репортерный ген (EGFP) под контролем p72 промотера вируса АЧС.

Для увеличения эффективности редактирования геномов штаммов вируса АЧС принято решение использовать технологию CRISPR/Cas9. Данная технология позволяет внести двухцепочечные разрывы в целевых участках. В ходе проведения работ был модернизирован вектор PX458, содержащий ген Cas9, с целью удаление сайта ядерной локализации (NLS) и изменения репортерного гена для возможности редактирования вируса АЧС, который реплицируется в цитоплазме. Была подобрана гРНК для внесения разрывов в месте рекомбинации.

Далее, при одновременной трансфекции рекомбинационной кассетой (отдельно или совместно с конструкцией, кодирующей Cas9 и гРНК) и инфицировании "диким типом" вируса за счет гомологической рекомбинации были получены рекомбинантные клоны. В результате каждый химерный вирус содержал гены, кодирующие CD2v и лектин, гетерологичного вируса.

С целью характеристики рекомбинантных вирусов был проведен сравнительный анализ кинетики репликации исходных и рекомбинантных вариантов в культурах клеток различного происхождения (COS-1, A4C2 и культура клеток макрофагов свиней). Накопление вируса было оценено на основании количественной оценки копий вирусной ДНК и путем титрования вируса в культуре клеток макрофагов свиней. Было установлено, что изменение данных генов не приводит к существенным изменениям культуральных свойств вируса, однако именно данные гены обуславливают характер гемадсорбции.

В ходе выполнения работ было установлено, что белки CD2v и лектин вируса АЧС обуславливают серологическую специфичность в реакции задержки гемадсорбции. С использованием химерных вирусов и делеционного варианта в экспериментах по иммунизации с последующим заражением свиней вирулентными штаммами было продемонстрировано, что серотип-специфические белки CD2v и лектин С-типа необходимы для формирования гомологичного протективного иммунитета у свиней.

Таким образом, белки CD2v и лектин С-типа представляют собой важные серотип-специфические антигены, на которые следует обратить внимание при разработке вакцины.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-76-10030.

АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИИ МУТАНТОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ РАСТЕНИЙ ПОСЛЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ПО ГЕНУ *NUD* У ЯЧМЕНЯ

Короткова А.М.¹, Колосовская Е.В.¹, Герасимова С.В.¹, Кукоева Т.В.¹,
Хлесткина Е.К.^{1,2}

1 – ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия,

2 – ВИР, Санкт Петербург, Россия,

korotkova@bionet.nsc.ru

Методы геномного редактирования растений бурно развиваются в последние годы [1], однако работ по редактированию ячменя не много, что обусловлено сложностью редактирования геномов однодольных растений [2].

С помощью двух разных направляющих-РНК (*Nud45* и *Nud50*) методом геномного редактирования *CRISPR/Cas*, нами были получены растения T_0 с различными мутациями в четырех генах: *Nud* (целевой), *Win1* и двух безымянных генах расположенных на хромосомах 6Н и 7Н ячменя (нецелевые мутации). Среди многообразия мутантов были отобраны те, что несут только мутации в гене *Nud* и немутантны по остальным трем генам. Ген *Nud* является транскрипционным фактором, ответственным за образование липидного слоя на поверхности зерна ячменя, который, при созревании, приводит к прилипанию чешуек к зерну и формированию, таким образом, свойства пленчатости зерна. Геномное редактирование проводилось на сорте Golden promise. Всего было получено 50 растений T_0 *Nud45* и 49 растений *Nud50*, среди которых встречались и гетерозиготы и дикий тип и растения с биаллельной мутацией.

Во второе поколение T_1 были отобраны интересующие нас мутации для выведения их в гомозиготное состояние. По 9 растений из группы *Nud45* и *Nud50*. В том числе была выделена линия дикого типа в качестве контрольной группы. Растения были проверены на наличие трансгена и среди нетрансгенных выделены три линии *Nud50* с мутациями в гене *Nud* (-3), (+1) и (-1) (две мутации со сдвигом рамки считывания, и одна мутация без сдвига рамки). Все три линии растений несут в себе свойство голозерности – чешуйки не прилипают к зерну и легко чистятся. Голозерность является важным селекционным признаком, который сложно получить с помощью обычных селекционных методов.

Растения были высажены в теплице. Из каждого растения выделена ДНК. При помощи секвенирования было подтверждено единообразие последовательностей гена *Nud* в каждой линии. Отсутствие трансгенности было подтверждено при помощи ПЦР-теста. Проведен сноповый анализ и сравнение с контролем по категориям: высота растения, кустистость (общая и продуктивная), длина остей, длины колосьев, масса и количество зерна с растения и главного колоса, масса 1000 зерен.

В результате работы получены три устойчивые нетрансгенные линии растений с разными мутациями гена *Nud*. Ведется отбор мутантов из группы *Nud45*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00086).

Список литературы:

1. Korotkova A.M. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system / A.M.Korotkova, S.V.Gerasimova, E.K. Khlestkina. // Vavilov journal of genetics and breeding –2019. – 23(1). – С. 29-37.
2. Gerasimova S.V. Genome editing system CRISPR/CAS9 and peculiarities of its application in monocots / S.V. Gerasimova, E.K. Khlestkina, A.V. Kochetov, V.K. Shumny // Russ. J. Plant Physiol – 2017. – Vol. 64, № 2. – С. 141–155.

**АНАЛИЗ ПРОНИКАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НАНОЧАСТИЦ В ПЫЛЬЦЕВЫЕ
ЗЕРНА ЛУКА РЕПЧАТОГО**

**Мардини М.¹, Ермолаев А. С.¹, Пивоваров А.М.¹, Яковцева М.Н.²,
Хрусталёва Л.И.^{1,3}**

***1 – Российский государственный аграрный университет - МСХА имени
К.А. Тимирязева, центр молекулярной биотехнологии, Москва 127434
mr.majdmardini@gmail.com***

2 – Московский физико-технический институт, Москва 141701

***3 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва 127422***

Нанотехнологии позиционируются как ключевой фактор в создании инструмента доставки системы геномного редактирования в растительную клетку для широкого применения в селекции новых сортов с заданными свойствами [1]. Хотя наночастицы в последние годы широко изучались как способы доставки биомолекул в животные клетки [2,3] знания об их взаимодействии с растительной мембраной и многослойной клеточной стенкой пока остаются ограниченными [4]. Основная задача этой работы направлена на проверку проникающей способности магнитных наночастиц в зерновую пыльцу лука репчатого. Также в работе была адаптирована питательная среда для выращивания пыльцевых трубок. Мы использовали наночастицы размером ± 60 нм с покрытием карбоксиметилированным декстраном (CMD) и были конъюгированы изотиоцианатом флуоресцеина (FITC). В дальнейших исследованиях эти частицы будут использованы для доставки системы геномного редактирования в пыльцевые зерна. Поскольку выживаемость пыльцы после обработки наночастицами будет важна для дальнейших селекционных этапов, необходимо было разработать протокол, отвечающий следующим требованиям: 1) сохранность жизнеспособности пыльцы 2) в течение обработки наночастицами пыльца должна находиться в стадии покоя, т. е. не позволить пыльце начинать прорастать пока она не была перенесена на рыльце. Это особенно актуально для пыльцы лука, так как она быстро прорастает в питательной среде во время обработки. Нами было установлено, что раствор, в котором ресуспендируются наночастицы при обработке, является ключевым фактором, влияющим на достижение вышеуказанных пунктов. В начале работы, мы ориентировались на методику Zhao *et al.* [5], которую была применена на хлопке. Авторы сообщили, что их метод обработки пыльцевых зерен наночастицами является универсальным и может быть применен не только на хлопке. Однако, при обработке наночастицами пыльцевых зерен лука по протоколу Zhao *et al.* [5] мы столкнулись с рядом проблем. Согласно протоколу Zhao *et al.* [5], обработка наночастицами пыльцевых зерен проводилась в жидкой питательной среде, содержащей микро- и макроэлементы и сахарозу, в течение 30 минут в магнитном поле. Однако, пыльца лука уже через 8-10 минут прорастала в этих условиях. Мы исключили микро- и макроэлементы из питательной среды, что позволило ингибировать быстрое прорастание пыльцы во время обработки наночастицами. Анализ проникающей способности наночастиц, конъюгированных с флуорохромом был проведен с использованием эпифлуоресцентного микроскопа AxioImager M2. Наночастицы были обнаружены в пыльцевых трубках через 30 минут после обработки.

Данная работа является пилотным экспериментом, на основании которого будет разрабатываться 'DNA-free' системы геномного редактирования. Такая технология имеет большой потенциал в селекции и особенно однодольных культур, где существует проблема доставки генетических конструкций в клетку и последующей регенерации.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00065.

Список литературы:

1. Kwak, S. Y., Lew, T. T. S., Sweeney, C. J., Koman, V. B., Wong, M. H., Bohmert-Tatarev, K., ... & Strano, M. S. (2019). Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers. *Nature nanotechnology*, 14(5), 447
2. Whitehead, K. A., Dorkin, J. R., Vegas, A. J., Chang, P. H., Veiseth, O., Matthews, J., ... & Chen, D. (2014). Degradable lipid nanoparticles with predictable in vivo siRNA delivery activity. *Nature communications*, 5, 4277
3. Deng, X., Cao, M., Zhang, J., Hu, K., Yin, Z., Zhou, Z., ... & Zeng, Y. (2014). Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast cancer. *Biomaterials*, 35(14), 4333-4344
4. Cunningham, F. J., Goh, N. S., Demirer, G. S., Matos, J. L., & Landry, M. P. (2018). Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering. *Trends in biotechnology*, 36(9), 882-897
5. Zhao, X., Meng, Z., Wang, Y., Chen, W., Sun, C., Cui, B., ... & Luo, D. (2017). Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nature plants*, 3(12), 956

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.022

ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ КАСПАЗЫ-3 БЕЛКОМ 5EL (A238L) ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

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

***ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии”,
Вольгинский 601125
E-mail: masha67111@mail.ru***

Африканская чума свиней (АЧС) - геморрагическая болезнь домашних свиней и диких кабанов, вызываемая двухцепочечным ДНК-вирусом семейства *Asfarviridae* с проявлением широкого спектра клинических симптомов [1]. В настоящее время АЧС продолжает бесконтрольно распространяться по Европе и Азии, став угрозой для свиноводства во всем мире, причем в 2020 году вспышки АЧС зарегистрированы в Китае, Бельгии, Болгарии, Венгрии, Латвии, Молдове, Мьянме, Польше, Румынии, Словакии, Южной Корее и Российской Федерации [2].

Основными клетками-мишенями для репликации вируса АЧС являются моноциты и макрофаги, которые играют ключевую роль в индукции врожденных иммунных реакций и иницировании воспалительного ответа. Для активации ряда воспалительных реакций необходим транскрипционный фактор NF-kB, активацию которого ингибирует белок 5EL (ген *A238L*) вируса АЧС [3,4]. Получение делеционных вариантов вируса АЧС и расширение знаний о функциях генов, участвующих в подавлении сигнальных путей, поспособствует изучению механизмов иммунного уклонения при АЧС и разработке эффективных вакцин.

Целью данной работы является изучение роли ингибитора транскрипции NF-kB на модели вируса АЧС с делецией гена *A238L*.

В результате последовательного клонирования была получена плаزمид с маркерным геном EGFP и участками рекомбинации для удаления гена *A238L*. При трансфекции перевиваемой культуры клеток COS-1 и инфекции вирулентным штаммом Волгоград/14с отселектирован рекомбинантный вирус АЧС Волгоград/14с Δ*A238L*. В первичной культуре лейкоцитов свиней инфекционная активность вируса составила $6,00 \pm 0,22$ lg ГАЕ₅₀/см³.

Сравнительный анализ репликации рекомбинантного штамма и родительского вируса при множественности заражения 0,1 и 1,0 ТЦД₅₀/кл в культуре клеток COS-1 с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени показал отсутствие влияния делеции гена *A238L* на его репродукцию *in vitro*.

Для количественного анализа активации апоптоза применяли набор HT Titer TACSTM Assay Kit («Trevigen, Inc»), в результате проведения которого показано отличие в активации каспазы-3 на 6 часов после инфицирования. Более поздние сроки заражения 48-96 часов не продемонстрировали различий по сравнению с интактной культурой клеток COS-1.

Полногеномное секвенирование полученного рекомбинантного вируса проводили на нанопоровом секвенаторе MinION («Oxford Nanopore Technologies», Великобритания). Сравнение полногеномной последовательности штамма Волгоград/14с Δ*A238L* вируса АЧС с референс-штаммом FR682468 показало идентичность 99%, наличие флуоресцентного белка EGFP вместо гена *A238L*.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что основная роль белка 5EL заключается в ингибировании активации защитных путей хозяина, зависящих от CaN и NF-κB, что происходит в ответ на вирусную инфекцию. Таргетирование этих путей с помощью *A238L* подчеркивает их важность в регулировании защитных систем в инфицированных макрофагах.

Пути CaN и NF-κB также являются важными мишенями для иммуномодуляторов, а понимание того, каким образом регулируются оба пути, предоставит новые возможности для оценки роли 5EL во время инфицирования вирусом АЧС и разработки диагностических и защитных препаратов.

В опытах *in vitro* нами установлено, что отсутствие гена *A238L* вируса АЧС у штамма II генотипа 8 сероиммунотипа не влияет на его репродукцию и не предоставляет возможности ингибирования апоптоза на ранних стадиях после заражения, что может способствовать аттенуации вируса.

Сконструированный делеционный вариант вируса АЧС Волгоград/14с Δ*A238L* позволит изучить исследуемый ген *A238L* в полной мере, насколько он влияет на взаимоотношение вируса с клеткой хозяина, механизмы иммунного ответа, патогенез и проявление вирулентности вируса АЧС для домашних свиней.

Рекомбинантный штамм Волгоград/14с Δ*A238L* также может быть использован для дальнейшего проведения молекулярно - генетических исследований, что поспособствует лучшему пониманию механизмов модуляции иммунного ответа, что, вероятно, будет важным аспектом для будущих исследований с целью создания живых аттенуированных вакцин нового поколения.

Исследование выполнено в рамках государственного задания при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Список литературы:

1. Chenais E., Depner K., Guberti V., Dietze K., Viltrop A., Ståh K. Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014–2018. 2019. 5:6. DOI 10.1186/s40813-018-0109-2
2. Итоговая информация МЭБ о вспышках инфекционных заболеваний в ранее неблагополучных по инфекционным болезням странах в 2020 году (04.04.20 - 10.04.20) [электронный ресурс] /Россельхознадзор// Эпизоотическая ситуация АЧС.– Режим доступа: <https://www.fsvps.ru/fsvps/iac/messages/3345.html> [Дата обращения: 13 апреля 2020].
3. Dixon L.K., Islam M., Nash R., Reis A.L. African swine fever virus evasion of host defences. 2019. 266:25-33. DOI 10.1016/j.virusres.2019.04.002
4. Granja A.G., Perkins N.D., Revilla Y. A238L inhibits NF-ATc2, NF-kappa B, and c-Jun activation through a novel mechanism involving protein kinase C-theta-mediated up-regulation of the amino-terminal transactivation domain of p300. 2008. 180(4):2429-42. DOI 10.4049/jimmunol.180.4.2429

**ВЛИЯНИЕ ОДИНОЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ
ВИРУСНОГО БЕЛКА VPg НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ФАКТОРАМИ
ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eIF4E КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum*)**

Ражина О.Л.^{1,2}, Лебедева М.В.¹

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

*2 – Российский государственный аграрный университет –МСХА имени
К.А.Тимирязева (РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева), Москва 127550*

Вирус картофеля Y – один из самых распространенных и вредоносных патогенов, поражающий многие сельскохозяйственные культуры, принадлежащие к семейству *Solanaceae*.

Один из механизмов устойчивости растений к вирусу Y характеризуется особенностью взаимодействия фактора инициации трансляции eIF4E с вирусным белком VPg. Данный механизм может быть основой для создания устойчивых сортов растений.

Однако было показано, что некоторые мутации в VPg могут нарушать устойчивость растений посредством взаимодействия с другими факторами инициации трансляции мультигенного семейства eIF4E. На сегодняшний день отсутствуют сведения по поводу способности факторов семейства eIF4E картофеля взаимодействовать с VPg вируса PVY.

Мультигенное семейство картофеля состоит из трёх факторов инициации трансляции eIF4E. В данной работе мы исследовали взаимодействие этих факторов инициации трансляции с природными вариантами VPg наиболее распространенного и вредоносного штамма PVY-NTN в двугибридной дрожжевой системе. Было показано, что VPg способен связываться не только с первым, но и вторым фактором, тогда как eIF(iso)4E не участвует во взаимодействии. Все мутации в центральной части VPg влияют на его взаимодействие с факторами eIF4E. Чаще всего сродство снижается, но встречаются полиморфизмы, отличающиеся повешенным сродством к обоим факторам.

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА МИКСОМЫ КРОЛИКОВ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО БЕЛОК VP60 ВИРУСА ВГБК-2**

Сухер М.М., Кольцов А.Ю., Белов С.В., Кольцова Г.С.

***ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии
(ФГБНУ ФИЦВиМ)», Вольгинский 60112; E-mail: lila5757@yandex.ru***

Миксоматоз кроликов и вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ВГБК) – основные вирусные заболевания кроликов (*Oryctolagus cuniculus*). В России вспышки данных болезней отмечают ежегодно, а кролиководство несет значительные убытки, связанные с потерями при вспышках и затратами на проведение профилактических мероприятий. Возбудителем миксоматоза кроликов является вирус миксомы, ДНК-содержащий вирус рода *Leporipoxvirus* семейства *Poxviridae*.

РНК-содержащий небольшой вирус семейства *Caliciviridae* является возбудителем ВГБК. До недавнего времени все штаммы ВГБК принадлежали к одному серотипу, однако, в 2010 г. был идентифицирован новый вирус, получивший название ВГБК-2 (RHDV2, RHDVb). Новый вариант отличался от предыдущих («классический» и антигенный вариант RHDVa) своими биологическими свойствами, а также формировал отдельный серотип.

Новый вирус быстро распространился в Европе, попал в Австралию. В 2018 г. впервые были зарегистрированы вспышки ВГБК-2 и на территории России. Такому быстрому распространению нового типа способствовали его персистенция в популяции диких кроликов, а также недостаточная эффективность существующих вакцин.

В нашей стране разработаны эффективные средства специфической профилактики данных болезней. Однако широкое распространение вирусных инфекций кроликов указывает на необходимость совершенствования вакцинных препаратов.

Целью данного исследования является получение рекомбинантного вируса миксомы кроликов, экспрессирующего белок VP60 вируса ВГБК-2 и репортерный белок EGFP.

С целью разработки рекомбинантной комплексной вакцины против миксомы кроликов и ВГБК-2 была выбрана стратегия создания рекомбинантных (химерных) вирусов. Кандидатные гены (Vp60, EGFP) и области рекомбинации ("плечи") были последовательно клонированы в состав плазмидных векторов для создания рекомбинационных кассет. Введение в состав рекомбинационной кассеты репортерного гена (EGFP) позволяло проводить скрининг рекомбинантных клонов с целью их селекции от исходного вируса. В качестве промоторов для экспрессии данных белков были использованы синтетические промоторы вируса осповакцины (VV7.5), так как промоторы вируса миксомы не охарактеризованы. В качестве исходного вируса был использован аттенуированный штамм вируса миксомы кроликов штамм В82. Нуклеотидная последовательность полного генома которого была определена с целью подбора наиболее оптимального сайта для рекомбинации.

При одновременной трансфекции рекомбинационной кассетой и инфицировании вирусом миксомы за счет гомологической рекомбинации были получены рекомбинантные клоны. Для дальнейшего скрининга клонов был использован метод предельных разведений (15 последовательных пассажей) и метод «бляшкообразования» в культуре клеток RK-13 с детекцией рекомбинантных вариантов вируса по репортерной флюоресценции. Для подтверждения чистоты клональной популяции рекомбинантного вируса (отсутствие исходного вируса) использовали разработанные специфические праймеры. Отсутствие замен в сайте рекомбинации подтверждали нуклеотидным секвенированием. Экспрессия рекомбинантного белка VP60 вируса ВГБК-2 была оценена с использованием реакции гемагглютинации (РГА).

Таким образом, в ходе исследований был получен рекомбинантный штамм вируса миксомы кроликов, экспрессирующий белок VP60 вируса ВГБК-2 и репортерный белок EGFP. В дальнейшем планируется изучить биологические свойства рекомбинантного вируса, в том числе его протективный потенциал. Данный вирусный штамм планируется использовать в качестве живой комплексной вакцины для профилактики наиболее опасных вирусных болезней кроликов – ВГБК и миксоматоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации в рамках научного проекта № МК-3764.2019.11.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.025

РОЛЬ МУЛЬТИГЕННОГО СЕМЕЙСТВА 110 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В АКТИВАЦИИ ЭФФЕКТОРНОЙ КАСПАЗЫ-3

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

ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии”,

Вольгинский 601125

E-mail: titoffia@yandex.ru

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) является сложноорганизованным ДНК-содержащим вирусом, единственным представителем семейства *Asfarviridae*. Геном

вируса АЧС, размером 180-190 тысяч нуклеотидов кодирует более 150 различных белков (в зависимости от штамма) [1]. Наличие широкого арсенала вирусных белков обеспечивает вирусу АЧС практически автономное размножение в инфицированных клетках (моноцитах/макрофагах).

Вирус АЧС заражает всех представителей вида *Sus scrofa* (домашние свиньи и кабаны), а также большинство видов африканских свиней (*Phacochoerus africanus*, *Potamochoerus larvatus*, *Hylochoerus meinertzhageni*) [2]. Для домашних свиней и кабанов вирус вызывает летальную инфекцию со смертностью достигающей 100%, что приносит огромный экономический ущерб. В 2019 году АЧС приобрела статус пандемии, распространившись за пределы африканского континента на территории России, Европы и Юго-Восточной Азии. Следует отметить, что эффективной и безопасной вакцины против АЧС не зарегистрировано.

Значительный прогресс в разработке вакцин против АЧС был достигнут с использованием аттенуированных штаммов вируса, полученных путем многократного пассирования на клеточных линиях. Анализ их геномов продемонстрировал значительные различия в областях генома, кодирующих мультигенные семейства (MGF100, MGF110, MGF300, MGF360, MGF505). Роль мультигенных семейств MGF360 и MGF505, как факторов вирулентности вируса была многократно подтверждена, но, тем не менее, роль других членов мультигенных семейств MGF полностью не раскрыта [3].

Целью данной работы является изучение активации/регуляции апоптоза *in vitro* в клетках, инфицированных рекомбинантным вирусом АЧС с делецией мультигенного семейства MGF110.

В предыдущих этапах исследований методом гомологичной рекомбинации был получен рекомбинантный вирус АЧС с делецией генов мультигенного семейства MGF110 (1L-14L). Определена его инфекционная активность, отсутствие исходного родительского типа вируса и проведен сравнительный анализ репликации в перевиваемой культуре клеток. При сравнении с родительским штаммом вируса АЧС Волгоград/14с делеция размеров в 7563 нуклеотида не повлияла на ростовые характеристики рекомбинантного вируса ΔMGF110.

Для проведения количественного анализа активации апоптоза *in vitro* клетки культуры COS-1 высевали в 96-луночные планшеты и инфицировали 1-дневную культуру рекомбинантным вирусом АЧС ΔMGF110 и исходным штаммом Волгоград. Затем клетки были зафиксированы на плашке 3,7% формальдегидом с последующей фиксацией этанолом через 6, 24, 30, 48, 72 и 96 часов после их инфицирования. Количественная оценка активности эффекторной каспазы-3 проводилась коммерческим набором HT TiterTACS™ Assay Kit («Trevigen, Inc») в соответствии с рекомендациями изготовителя. Учет реакции осуществляли на фотометре Tecan Sunrise («TECAN Austria GmbH», Австрия) при длине волны 450 нм. В качестве положительного контрольного образца использовали фермент (TACS-Nuclease), а отрицательным контролем служила интактная культура клеток COS-1.

Проведенный количественный анализ активации апоптоза показал, что активность эффекторной каспазы-3 в клетках культуры COS-1, инфицированных рекомбинантным вирусом АЧС ΔMGF110 была в 1,4 раза выше ($p < 0.05$) по сравнению с исходным штаммом Волгоград через 6 часов после инфицирования клеток, что свидетельствует о роли генов в составе MGF110 вируса АЧС в регуляции (ингибировании) апоптоза. Поздние сроки после инфицирования (30, 48, 72 и 96 часов) по сравнению с интактной культурой клеток COS-1 не показали различий в активации каспазы-3, что можно объяснить наличием процессов естественного апоптоза.

Каспазы играют важную роль в инициации и осуществлении апоптоза, а вирусы, в свою очередь, используют различные стратегии, чтобы его избежать. Однако, как это часто бывает в биологических системах, связь между репликацией вируса и апоптозом на самом деле гораздо сложнее. Примером каскада активации является активация инициаторной

каспазы 8, которая приводит к активации эффекторной каспазы 3. Каспаза 3 расщепляет большинство клеточных субстратов во время апоптоза, а также отвечает за расщепление вирусных белков. В настоящее время признано, что некоторые вирусы непосредственно используют компоненты апоптотического пути для облегчения своей репликации.

Таким образом, результаты проведенных исследований способствуют дальнейшему пониманию функций мультигенных семейств MGF и механизмов иммунного уклонения вируса АЧС.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-016-00216.

Список литературы:

1. Salas M.L., Andrés G. African swine fever virus morphogenesis. 2013. 173(1):29-41. DOI 10.1016/j.virusres.2012.09.016

2. Chenais E., Ståhl K., Guberti V., Depner K. Identification of Wild Boar-Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever Epizootic. 2018. 24(4):810-812. DOI 10.3201/eid2404.172127

3. Dixon L.K., Islam M., Nash R., Reis A.L. African swine fever virus evasion of host defences. 2019. 266:25-33. DOI 10.1016/j.virusres.2019.04.002

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.026

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНА *CENH3* ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) С ПОМОЩЬЮ ТРАНСФЕКЦИИ ПРОТОПЛАСТОВ РИБОНУКЛЕИНОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ

Уварова А.Г.¹, Гарибян Ц.С.¹, Киров И.В.^{1,2}

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

2 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно - исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» Курчатowskiй геномный центр - ВНИИСБ

E-mail: kirovez@gmail.com

Центромер-специфичный гистон H3 (CENH3) необходим для нормального функционирования такого участка хромосомы, как центромера. По структуре ген, кодирующий этот белок, содержит N-концевой хвост (который выступает из нуклеосомы и является мишенью для посттрансляционной модификации) и C-концевой домен, который взаимодействует с ДНК и другими гистонами с образованием нуклеосомы. Этот ген привлек особое внимание селекционеров, так как растения с изменённой последовательностью белка CENH3 могут являться гаплопродюсерами. Таким образом, редактирование данного гена представляет особый интерес для потенциального получения линий гаплопродюсеров и создания чистых линий, необходимых для ведения селекции F₁ гибридов. Однако, до сих пор не было получено ни одного культурного растения с мутантным геном *cenh3* в гомозиготном состоянии. И одной из причин этого является выбор витальных сайтов для мутагенеза.

Целью этой работы является выявление неконсервативных сайтов белка CENH3 подсолнечника с помощью анализа этого белка в сотнях видах растений, оценка экспрессии гена CENH3, подбор и тестирование гРНК для его CRISPR/Cas9 редактирования.

Для оценки экспрессии центромер-специфичного белка на полученную последовательность CENH3 были подобраны праймеры для амплификации целевого гена, а также выделена тотальная РНК из нескольких сортов подсолнечника и показана экспрессия целевого гена. Был разработан и использован новый подход 1KPCons для глубокой оценки

сайтов консервативности белка на основе быстрой идентификации и сравнения гомологичных белков у сотен различных видов растений. Использование данного подхода на примере белка CENH3 позволило нам идентифицировать и сравнить последовательности данного белка у 393 видов растений. Были подобраны три гРНК для геномного редактирования и показана высокая (до 90%) эффективность разрезания целевого фрагмента рибонуклеиновыми комплексами (РНК) Cas9 с этими гРНК *in vitro*. Для доставки РНК в клетки, были оптимизированы протоколы получения протопластов подсолнечника и показана эффективность трансфекции 15-20% для трёх сортов. В дальнейшем, полученные РНК будут доставлены в протопласты для получения растений подсолнечника с отредактированным геном *cenh3*.

Работа выполнена в рамках соглашения № 075-15-2019-1667.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.027

БИРЕПОРТЕРНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ ОЦЕНКИ РАБОТЫ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ

Фридман В.А., Кабардаева К.В., Сухорукова А.В., Фадеев В.С., Тюрин А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва 127276

E-mail: VikaFridman@gmail.com

Транзиентная экспрессия является эффективным способом проверки работы генов в тканях растений. Один из наиболее часто используемых методов для транзиентной экспрессии – агроинфильтрация. Для применения этого метода необходимы векторы, отвечающие ряду требований (отсутствие селективного маркера, наличие генов-супрессоров замолкания, быстро созревающие репортерные белки). В настоящее время создано множество различных векторных систем для проведения агроинфильтрации растений.

Проблемой транзиентной экспрессии является ее зависимость от внешних условий. Экспрессия генов в тканях одного растения может отличаться от таковой в другом растении не только из-за различий в плазмидах, которыми они были трансформированы, но и в результате воздействия факторов окружающей среды: освещенности, количества влаги и питательных веществ, а также возраста растения и др.

Для решения этой проблемы мы предлагаем бирепортерную систему на основе двух флуоресцентных белков: eGFP и tagRFP, которые имеют взаимно (а также с хлорофиллом) не пересекающиеся диапазоны возбуждения/испускания. Такой подход позволяет измерять уровень экспрессии двух репортерных генов (опосредованно: по степени флуоресценции), один из которых находится под контролем какого-либо регуляторного элемента (например, трансляционного энхансера), а второй используется в качестве внутреннего контроля. Таким образом, можно утверждать о равном количестве экспрессионных кассет двух флуоресцентных белков в каждой трансформированной клетке ввиду их физической сцепленности. После проведения транзиентной экспрессии количество белка, ген которого контролируется исследуемым регуляторным элементом, – в нашем случае это tagRFP – можно точно нормировать на количество eGFP, который является контрольным в системе.

Первым этапом эксперимента стало конструирование базового вектора на основе плазмиды pVIG-T, разработанной ранее сотрудниками лаборатории (Вячеславова и др., 2012). Для этого методом СРЕС (Quan, Tian, 2011) в исходную плазмиду были интегрированы ген оптимизированного зелёного флуоресцентного белка (*egfp*) (Cormack et al., 1996) и ген красного флуоресцентного белка из *Entacmaea quadricolor* (*tagRFP*) (Merzlyak et al., 2007).

Для проверки работы предлагаемой системы было решено использовать уже описанные и охарактеризованные энхансеры: растительные AT-30, AT-65, AT-100 и AT-208 (Kim et al., 2014), контрастные по уровню экспрессии, и вирусный Omega (Gallie, Walbot, 1992). Тем же методом СРЕС эти энхансеры были клонированы в базовый вектор.

Полученными плазмидами методом агроинфильтрации были трансформированы растения *N. benthamiana* в возрасте 6 недель. После проведения транзientной экспрессии в течение 5 дней из агроинфильтрированных листьев выделяли суммарный растворимый белок и измеряли его флуоресценцию. Полученные в виде единиц флуоресценции данные пересчитывали в массовую долю. Чтобы охарактеризовать зависимость уровней экспрессии целевых белков, применяли метод линейной регрессии. Влияние анализируемого энхансера определялось отношением наклонов линий регрессии для исследуемого варианта и вектора без энхансеров (контроль).

Список литературы:

1. Вячеславов А.О., Мустафаев О.Н., Тюрин А.А., Шимшилашвили Х.Р., Бердичевец И.Н., Шаяхметова Д.М., Голденков М.А., Фадеев В.С., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Серия модульных векторов для стабильной и транзientной экспрессии гетерологичных генов в растениях. 2012. 48:9.
2. Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). 1996. 173. DOI 10.1016/0378-1119(95)00685-0
3. Gallie D.R., Walbot V. Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. 1992. 20:17. DOI 10.1093/nar/20.17.4631
4. Kim Y., Lee G., Jeon E., Ju Sohn E., Lee Y., Kang H., Wook Lee D., Kim D.H., Hwang I. The immediate upstream region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced effect on the translational efficiency in *Arabidopsis thaliana*. 2014. 42:1. DOI 10.1093/nar/gkt864
5. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W.J., Chudakov D.M. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. 2007. 4:7. DOI 10.1038/NMETH1062
6. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning for high throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. 2011. 6:2. DOI 10.1038/nprot.2010.181

**СЕКЦИЯ
«КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ»**

**ПОЛУЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ И ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* БАЗИЛИКА ЛИМОННОГО (*OCIMUM* × *AFRICANUM*
LOUR.) СОРТА ЛИМОННЫЕ ДОЛЬКИ**

Алексеева Е.В., Козлова В.А., Чередниченко М.Ю.

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва 127550; e-mail: michael.tsch@gmail.com

Ocimum × *africanum* Lour. (базилик лимонный) семейства Lamiaceae Martinov – гибрид между *O. basilicum* L. (базилик душистый) и *O. americanum* L. (базилик американский), травянистое растение, обладающее ярко выраженным лимонным запахом. Наземная часть представителей рода содержит до 1...1,5 % эфирного масла, которое обладает антигельминтным, жаропонижающим, потогонным, отхаркивающим действием [1, 7, 8]. Эти свойства объясняются присутствием большого количества различных групп вторичных метаболитов.

Целебными показаниями к применению эфирного масла базилика можно считать дезинфицирующее и дезодорирующее действие. Экстракт обладает сильным спазмолитическим свойством при кишечных и желудочных коликах. Базиликовое масло обладает противовоспалительным действием, возбуждает аппетит. В прошлом растение применяли как противоспазматическое средство при метеоризме, эпилепсии, ревматизме, желудочных коликах, диспепсии, мигрени [1]. Также базилик является также природным антиоксидантом, так как отрицательно действует на свободные радикалы [4]. Также Johnson et al. показали, что вторичные метаболиты, выделяемые каллусом базилика душистого, оказывают антибактериальное воздействие (на примере таких микроорганизмов, как *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* [4]).

Представители рода *Ocimum* L. часто становятся объектами биотехнологии, однако большинство исследований посвящены базилику душистому (*O. basilicum* L.) и базилику тонкоцветному (*O. tenuiflorum* L., син. базилик священный *O. sanctum* L.) [2, 3]. Другие виды изучены гораздо меньше: *O. americanum* L. (син. *O. canum* Sims), *O. kilimandscharicum* Gürke, *O. gratissimum* L. и др. [5, 6]

На данный момент существует очень мало информации о размножении *O.* × *africanum* Lour. (син. *O.* × *citriodorum* Vis.) культуре *in vitro*. Поэтому целью данного исследования был поиск оптимальных условий для получения асептических растений и индукции каллусогенеза в условиях *in vitro*.

Для введения в асептическую культуру *in vitro* использовали семена базилика лимонного сорта Лимонные дольки (производства ООО «Агрони»). В качестве стерилизующих агентов использовали 5 %-ный раствор гипохлорита натрия и 10 %-ный раствор пероксида водорода. Экспозиция в обоих стерилизующих агентах составила 5, 10 и 15 минут. После стерилизации семена 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) без добавления фитогормонов и регуляторов роста. Повторность опыта 5-кратная, по 10 семян на повторность по каждому варианту обработки. В качестве контроля использовали нестерильное проращивание семян на фильтровальной бумаге в чашках Петри.

Спустя 1...2 недели проростки пересаживали на свежую питательную среду МС в пластиковые контейнеры. Когда растения образовывали 5...6-ую пару настоящих листьев, из них вырезали листовые (5×5 мм), стеблевые (длиной 5...7 мм) и узловые (узел + 2-3 мм выше и ниже узла) экспланты и помещали на питательную среду МС с добавлением 0,5 или 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д).

Эффективность прорастания семян на уровне контроля была получена только при варианте стерилизации в течение 5 минут в 10 %-ном растворе пероксида водорода. Самая низкая эффективность (менее 50 %) была отмечена при 15-минутной экспозиции в 5 %-ном растворе гипохлорита натрия. В остальных вариантах проросло от 56 до 72 % семян.

Каллусогенез проходил на обоих вариантах питательной среды МС с добавлением 2,4-Д и на всех типах эксплантов с частотой 100 %. При добавлении 1 мг/л 2,4-Д образовывалась более рыхлая каллусная ткань, чем на среде с добавлением 0,5 мг/л 2,4-Д.

На питательной среде с концентрацией 2,4-Д 0,5 мг/л наблюдали активный органоогенез. Побегообразование происходило в основном из узловых эксплантов. Корнеобразование наблюдали на различных типах экспланта.

Список литературы:

1. Дудченко Л.Г., Козьяков А.С., Кривенко В.В. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения. Киев: Наукова думка, 1989. С. 20-22.
2. Словарева О.Ю., Чередниченко М.Ю. Индукция каллусогенеза и органоогенеза в культуре *in vitro* растений *Ocimum basilicum* L. // Вавиловские чтения – 2017: Сборник статей международной научно-практической конференции, посвященной 130-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов, Саратовский ГАУ, ООО «Амирит», 2017. С. 87-89.
3. Bhuvaneshwari K., Gokulanathan A., Jayanthi M., Govindasamy V., Milella L., Lee S., Yang D.C., Girija S. Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. *in vitro* culture be a potential source of secondary metabolites // Food Chemistry. 2016. 194: 55-60.
4. Johnson M., Babu A., Irudayaraj V. Antibacterial studies on *in vitro* derived calli of *Ocimum basilicum* L. // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2011. 3(1): 715-720.
5. Kashyap C.P., Ranjeet K., Vikrant A., Vipin K. Therapeutic Potency of *Ocimum Kilimandscharicum* Guerke - A Review // Global Journal of Pharmacology. 2011. 5(3): 191-200.
6. Pattnaik S., Chand P.K. *In vitro* propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. syn. *O. canum* Sims. (hoary basil) and *Ocimum sanctum* L. (holy basil) // Plant Cell Reports. 1996. 15(11): 846-850.
7. Phippen W.B., Simon J.E. Anthocyanins in basil // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998. 46: 1734-1738.
8. Sahoo Y., Pattnaik S.K., Chand P.K. *In vitro* Clonal Propagation of an Aromatic Medicinal Herb *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil) by Axillary Shoot Proliferation // In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. 1997. 33(4): 293-296.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.029

О ПЕРВЫХ ЭТАПАХ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ

Блинков А.О.^{1,2}

1 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева», Москва 127550

2 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельского хозяйства биотехнологии», Москва 127550. E-mail: aoblinkov@gmail.com

На сегодняшний день разработаны протоколы получения удвоенных гаплоидов для многих сельскохозяйственных культур, однако все они применимы преимущественно для конкретных генотипов. В связи с этим, постоянно идёт совершенствование данных методик. И задачами селекционных центров становятся внедрение и адаптация уже разработанных технологий в собственные селекционные программы [8]. Именно поэтому

целью данной работы является выбор наиболее оптимальных условий получения удвоенных гаплоидов для селекционного процесса озимой тритикале кафедры генетики, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева.

Растительным материалом для всех экспериментов служил сорт озимой тритикале Тимирязевская 150.

Гаплоидные растения получали следующими методами:

1. Методом селективной элиминации хромосом согласно Wędzony et al., 1998;
2. Методом культивирования изолированных пыльников согласно Wędzony, 2003;
3. Методом культивирования изолированных микроспор согласно Pauk et al., 2000 с небольшими модификациями. Колоски растирали пестиком в ступке в 0,3 М растворе маннитола. Жизнеспособные микроспоры отделяли от дебриса двумя способами: в градиенте 1,5 М раствора мальтозы и 0,3 М раствора маннитола, а также в градиенте концентраций Percoll (65%/20%) [1].

4. Методом культивирования изолированных микроспор по собственной методике. Пыльники (около 120 пыльников) одного колоса разрезали скальпелем пополам и помещали в колбы Эрленмейера, содержащие 20 мл неагаризованной питательной среды 190-2. Таким образом, плотность микроспор в среднем составляла 60×10^3 микроспор/мл. Колбы инкубировали до появления эмбриоподобных структур в темноте при 30°C на вращающемся шейкере-инкубаторе (Certomat B. Braun, Germany). Новообразования пересаживали на среду для регенерации 190-2Cu.

Плоидность определяли путем подсчета числа хромосом в клетках корневой меристемы при получении давленных препаратов [2]. Обработку колхицином проводили согласно Wędzony, 2003.

Метод селективной элиминации хромосом оказался крайне неэффективным: 1 гаплоидное растение с 1000 опылённых цветков. При использовании метода культивирования изолированных пыльников количество эмбриогенных структур составило около 33% от первоначального количества пыльников, а выход зелёных растений – 8,0% от полученного количества эмбриоподобных структур, что составляет примерно 3 зелёных растения с колоса. Метод культивирования изолированных микроспор согласно протоколу Pauk et al., 2000 не дал ни одного новообразования. Возможно, это связано с некоторой модификацией методики (заменой измельчения колосьев в блендере на измельчение пестиком в ступке). Метод изолированных микроспор по собственной методике показал высокую эффективность: в среднем 105 эмбриогенных структур на 100 пыльников с регенерацией 25% от полученных эмбриогенных структур. Однако все полученные растения оказались альбиносами. Формирование 100% альбиносов в первых опытах по культивированию изолированных пыльников и микроспор мы связываем с рядом допущенных ошибок: растительный материал отбирался в октябре в поле, а уменьшение длины дня напрямую влияет на повышенный выход растений- альбиносов [4], также известно, что при длительной стрессовой обработке могут выделяться сильнодействующие соединения подобные антибиотикам, способные инактивировать рибосомы [5]. Уменьшение стрессовой обработки с 14 до 7 суток, позволили увеличить выход нормальных зелёных растений до 7,95% для культуры пыльников. Для культуры изолированных микроспор подобного рода эксперимент планируются в перспективе.

Классические протоколы удваивания хромосом путём погружения корней растений на стадии кущения в течение 5 часов в раствор колхицина дают низкие результаты из-за низкой выживаемости [6]. Напротив, применение методики согласно [7] подтвердило высокую выживаемость растений (100% выживших дигаплоидных растений).

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что наилучшие результаты по формированию эмбриоподобных структур и регенерации достигнуто за счет применения разработанной и модифицированной нами методики культивирования изолированных микроспор. Использование данного метода на данный момент ограничивается формированием альбинозных растений. Уменьшение стрессовой

обработки до 7 дней, а также сбор колосьев в весеннее время, возможно, сможет повысить выход зелёных растений для данного метода, как это было показано с культурой изолированных пыльников.

Список литературы:

1. Dupl'áková N., Dobrev P.I., Reňák D., Honys D. Rapid separation of Arabidopsis male gametophyte developmental stages using a Percoll gradient. 2016. 10:1817-1832. DOI 10.1038/nprot.2016.107
2. Maluszynska J. Cytogenetic tests for ploidy level analyses- chromosome counting. 2003. 391-395. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4
3. Pauk J., Poulimatka M., Toth K. L., Monostori, T. In vitro androgenesis of triticales in isolated microspore culture. 2000. 61: 221-229. DOI: 10.1023/A:1006416116366
4. Sunderland, N. & Huang B. Barley anther culture- The switch of programme and albinism. 1985. 103: 27-40. Doi: 10.1111/j.1601-5223.1985.tb00747.x
5. Torp A. M., Andersen S.B. (2009). Albinism in microspore culture. 2009. 155-160. DOI: 10.1007/978-1-4020-8854-4
6. Wędzony M., Marcińska I., Ponitka A., Ślusarkiewicz- Jarzina A., Woźna J. Production of doubled haploids in triticales (x Triticosecale Wittm.) by means of crosses with maize (Zea mays L.) using picloram and dicamba. 1998. 117: 211-215. DOI: 10.1111/j.1439-0523.1998.tb01928.x
7. Wędzony M. Triticales anther culture. 2003. 123 - 128. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4
8. Weyen J. Barley and Wheat Doubled Haploids in Breeding 2009. 179-187. DOI: 10.1007/978-1-4020-8854-4

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.030

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОЦВЕТИЙ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП *IN VITRO*

Ганаева Д.Р., Десятерик А.А., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н.

***ФГБОУ ВО “Российский государственный аграрный университет – М СХА имени
К.А. Тимирязева”, Москва, 127550, ул. Тимирязевская, д.49,
E-mail: ganaeva.dasha@gmail.com***

В последние годы у исследователей, а также у садоводов любителей особый интерес вызывают декоративные и цветочные культуры. Однако завезенный из-за границы посадочный материал часто бывает плохого качества в связи с наличием в растениях инфекционного фона в виде патогенов, микроорганизмов или энтомофагов. Поэтому, в ходе перехода экономики России к импортозамещению, необходимо прекратить поставку импортного растительного материала и перейти на массовое размножение растений отечественной селекции.

Большой популярностью среди цветочных культур пользуются растения хризантемы, многие виды и сорта которых являются ценными декоративными растениями, широко применяемые в озеленении городов, парков, а также в композиции букетов. Кроме того, растения и экстракты, полученные из хризантемы, обладают бактерицидными свойствами и применяются в фармакологии, стоматологии, пищевой промышленности благодаря содержанию в них различных биологически активных веществ. В настоящее время насчитывается более 10 тыс. сортов хризантемы, которые отличаются по разным морфологическим, биологическим и др. признакам.

Кроме растений хризантемы все большую популярность приобретают такие цветочные растения, как клематис, георгины, рудбекия и многие другие, отличающиеся длительностью цветения и яркой окраской цветков. Исследования показывают, что для получения хорошо цветущих растений необходимо иметь высококачественный посевной или посадочный материал, для получения которого необходимы определенные условия

выращивания. Применение традиционных способов размножения не всегда приводит к генетической стабильности растений. Поэтому необходимо проводить исследования по сохранению растений различных таксономических групп и поиска альтернативных способов их размножения [1,2].

Применение методов биотехнологии, в частности, метод клонального микроразмножения, позволит не только сохранить и размножить ценные экземпляры, но и создать коллекцию *in vitro*, цель которой – сохранение биоразнообразия растений.

Объектом исследования служили язычковые цветки и бутоны хризантем, клематисов, георгинов, рудбекии, изолированные со взрослых, цветущих растений.

Изолированные экспланты стерилизовали 0,1% раствором сулемы в течение 4-5 минут, после чего их промывали в трех порциях стерильной дистиллированной воды, затем культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга (МС), а так же разные регуляторы роста: 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л препарат Дропп, 1 мг/л препарат “Стимул”, а также комплекс аминокислот и ИУК в концентрации 0,5 мг/л. Исследования проводили на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева в соответствии с разработанными ранее рекомендациями [3].

Результаты экспериментальных данных были обработаны на основе методов математической статистики по Б.А. Доспехову [4] с использованием программного пакета Microsoft Excel (2007).

Экспериментально установлено, что начало морфогенеза можно наблюдать уже на 12 сутки с начала культивирования, которое происходит в базальной части язычковых цветков. Однако этот процесс зависит от двух взаимосвязанных факторов: генотипа первичного экспланта и гормонального состава питательной среды. По способности к морфогенезу исследуемых растения расположились в следующей последовательности: хризантема, рудбекия, клематис, георгин. Наилучшие результаты были получены на среде, содержащей БАП в сочетании с ИУК и аминокислотным комплексом. Максимальный коэффициент размножения для хризантемы составил 15 на один эксплант, для рудбекии – 8, для клематиса - 5 и георгина - 4.

Таким образом, проведенные исследования позволили заключить, что для клонирования растений разных таксономических групп можно использовать не только сегменты стебля с одной или двумя пазушными почками, как предлагают многие авторы, но и части репродуктивных органов, например, язычковые цветки или бутоны. Предлагаемая технология позволяет размножить растение без ущерба для него и использовать для клонирования всего лишь один раскрывшийся бутон.

Список литературы:

1. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. Учебник и практикум / Москва, 2020. Сер. 76 Высшее образование. (2-е изд.). 378 с.
2. Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Современные аспекты биотехнологии. Москва. 2016. 145 с.
3. Калашникова Е.А., Чередниченко М.Ю., Киракосян Р.Н., Зайцева С.М. Лабораторный практикум по культуре клеток и тканей растений. Москва, 2017. 163 с.
4. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – Изд. 6-е. – М.: Альянс, 2011. – 351 с.

БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ УСКОРЕННОГО СОЗДАНИЯ СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА РИСА *ORYZA SATIVA* L.**Глазырина В.А., Савенко Е. Г., Шундрин Л.А.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр риса», Краснодар, п. Белозерный, 3, 350921
E-mail: avena558@mail.ru***

Основное назначение биотехнологического приема культуры пыльников/ микроспор *in vitro* – получение удвоенных гаплоидов (DH) и сокращение времени, необходимого для создания сортов. Среди зерновых культур эффективность метода наиболее высока у риса. Первые сорта риса через культуру пыльников были получены в Китае ещё в 1975 году.

Целью данного исследования являлась разработка схемы ускоренного и массового создания удвоенных гаплоидов риса для селекционных целей. В экспериментах использовали гибриды риса F₁ поколения. Работы велись по общепринятым методикам *in vitro*. Для экстракции ДНК использовали СТАВ-метод, для генотипирования - мультиплексный ПЦР-анализ, для выполнения ДНК-анализа - автоматический генетический анализатор ABIprism 3130, позволяющий идентифицировать разницу в размерах амплифицируемых фрагментов с точностью до одной пары нуклеотидов.

Результатом проведенного исследования стала схема ускоренного создания гомозиготных селекционных ресурсов риса за счет использования технологии гаметных клеток, молекулярного маркирования и методов классической селекции, оптимизированной для применения на селекционном материале коллекции ФГБНУ «ФНЦ риса», которая включает следующие этапы: 1. Оптимизация условий выращивания донорных растений; 2. Определение оптимальных сроков (фаза онтогенеза растений; время суток и т.д.) сбора эксплантов (метелки) с донорных растений; 3. Отработка наиболее эффективных вариантов стерилизации и температурной предобработки эксплантов; 4. Детализация состава искусственных питательных сред применительно к целевым генотипам риса для эффективной регенерации растений в условиях *in vitro*; 5. Массовое получение гаплоидов и DH риса на основе различных генетических источников; 6. Полевые испытания морфологической выравненности полученных андрогенных линий с последующим их размножением для получения семенного потомства с одновременным ДНК-анализом их генетической однородности (получение микросателлитных профилей); 7. Передача полученных ресурсов для включения в селекционные схемы в качестве прототипов сортов нового поколения, обладающих комплексом хозяйственно ценных признаков с последующей государственной регистрацией (районирование) и выходом семян на внутренний рынок.

Эффективность схемы подтверждена практическими результатами: созданы тысячи удвоенных гаплоидов риса, которые изучены селекционными подразделениями научного центра в полевых условиях для проверки их морфологической выравненности и оценки по хозяйственно важным признакам [1, 2]. На основе выделенных гомозиготных линий районировано 5 сортов. Параллельно с полевой оценкой проводилось генотипирование DH линий и полученных на их основе сортов ДНК-анализом (микросателлитным) для проверки генетической однородности. Так, для сортов риса Сонет и Соната, полученных на основе удвоенных гаплоидов, выявлены профили 14 микросателлитных локусов ДНК. Результаты мультиплексного фрагментного анализа этих сортов по микросателлитным маркерам RM1, RM11 и RM122 показали, что изученные генотипы гомозиготны в исследованных локусах ДНК, что говорит об их генетической однородности. По результатам SSR-генотипирования на сорта Сонет и Соната получены ДНК-паспорта.

Список литературы:

1. Малышева Н.Н., Савенко Е.Г., Глазырина В.А., Шундрин Л.А. Комплексная оценка дигамноидных линий риса. Материалы Международного АгроБизнес Форума «Развитие сельскохозяйственного производства в условиях Таможенного союза» Кызылорда. 2010. С.67-71

2. Малышева Н.Н., Савенко Е.Г., Глазырина В.А., Шундрин Л.А. Получение, оценка и отбор дигамноидных линий риса с хозяйственно-ценными признаками. Краснодар. 2012. Рисоводство. №2 (21). С. 14-18

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.032

ВЛИЯНИЕ ЗЕАТИНА НА *IN VIVO* РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК *PETUNIA HYBRIDA* L. В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Демьянчук И.С.¹, Захарова Е.В.^{1,2,3}, Ковалева Л.В.³

1 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет МСХА им.

К.А.Тимирязева, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49, E-mail: info@rgau-msha.ru

2 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42, E-mail: iab@iab.ac.ru

3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, Ботаническая, 35, E-mail: ifr@ippras.ru

Г. Фиттинг, в 1909-1910 гг. изучавший особенности опыления и оплодотворения у орхидей, обнаружил, что в пол-линиях (комочки пыльцы орхидей) присутствует вещество, вызывающее разрастание завязи и формирование партенокарпических плодов. Фиттинг первым предложил ввести в физиологию растений термин гормон. С начала XX в. были открыты этилен, ауксин, цитокинины, гиббереллины, абсцизины и др.

Цитокинины (ЦТК) – классические фитогормоны – были обнаружены в лаборатории Ф. Скуга (США) почти 60 лет назад. Установлены основы биосинтеза, сигналинга, многообразия ЦТК, их важная роль в процессах роста, развития и адаптации растений. Только сейчас начали открываться основные закономерности их молекулярного действия.

ЦТК представляют собой производные аденина или аденозина. ЦТК с гидроксильной алифатической цепью получили название зеатинов. Биосинтез ЦТК происходит в высших растениях, мхах, водорослях.

Физиологическое действие ЦТК на клеточном уровне: 1) стимуляция клеточного деления; 2) активация притока метаболитов (аттрагирующий эффект); 3) дифференциация пластид; 4) увеличение размера клеток; 5) биосинтез пигментов; 6) задержка старения (в низких концентрациях); 7) индукция апоптоза (в высоких концентрациях); 8) формирование побегов в культуре каллусов.

ЦТК обладают многообразным физиологическим действием на растения, характер которого зависит от их концентрации. Рост растений находится под контролем ЦТК совместно с ауксинами, при этом ЦТК стимулируют апикальную меристему и рост побега, но подавляют меристему и рост корня. Помимо деления, ЦТК способствуют также растяжению клеток, особенно в листьях и семядолях. Вместе с ауксинами и гиббереллинами ЦТК формируют донорно-акцепторные отношения в растении. ЦТК способствуют фотосинтезу, активируя формирование хлоропластов, часто даже в темноте. У многих растений ЦТК задерживают старение листьев. ЦТК необходимы для запуска процесса образования симбиотических клубеньков. У ряда растений ЦТК стимулируют прорастание семян. В высоких концентрациях ЦТК, наоборот, проявляют рост-

ингибирующее и даже апоптическое действие; они могут подавлять рост корней, культур клеток и даже вызывать опадение листьев.

Цель данной работы состояла в изучении влияния зеатина на рост *in vivo* пыльцевых трубок (ПТ) в прогамной фазе оплодотворения *Petunia hybrida* L. Основная функция мужского гаметофита (пыльцевого зерна и пыльцевой трубки) состоит в доставке двух мужских гамет к зародышевому мешку, где осуществляется двойное оплодотворение. Последовательность событий, происходящих при опылении и приводящих к успешному оплодотворению, включает: адгезию, гидратацию и прорастание и рост ПТ в тканях рыльца и в проводниковых тканях столбика.

Как было показано ранее (Ковалева Л.В. и др., 2015) прорастание пыльцы и рост ПТ петунии (*Petunia hybrida* L.) *in vitro* (на среде культивирования) сопровождается сложными перестройками гормональной системы в тканях пестика.

Для экспериментов были использованы клонально размноженные растения петунии (*P. hybrida* L.) из лабораторной коллекции. Объекты исследований - растущие *in vivo* ПТ.

Накануне запланированных опытов собирали пыльцу с растений, в то время как неопыленные цветы были кастрированы. На следующий день пестики кастрированных цветов обрабатывали раствором зеатина в концентрации 10 нМ: на рыльце пипеткой наносили 5 мкл раствора зеатина и закрывали изолятором. Опыление проводили через 2 или 6 ч после обработки. Сбор и фиксацию материала (опыленные пестики) проводили через 2, 4, 6 и 24 ч.

Визуализацию роста ПТ *in vivo* в тканях пестика проводили с использованием флуоресцентного красителя анилинового голубого. В качестве фиксатора использовали спирт и ледяную уксусную кислоту в соотношении 3:1.

В контрольных вариантах, через 24 ч после СС опыления длина ПТ составляла 15089 ± 506 мкм, то есть 58% длины пестика.

Предварительная обработка рылец зеатином за 2 ч и за 6 ч до опыления приводила к резкому ингибированию роста ПТ, при этом длина ПТ достигала лишь $160,23 \pm 15,21$ мкм (только 0,62% длины пестика).

Полученные результаты согласуются с предыдущими данными том, что зеатин ингибировал прорастание и рост ПТ *in vitro*, кроме того, повышение уровня ЦТК наблюдали при прохождении реакции СН у петунии во время прогамной фазы оплодотворения.

Список литературы:

1. Л. В. Ковалева, А. С. Воронков, Е. В. Захарова. Роль ауксина и цитокинина в регуляции актинового цитоскелета прорастающего *in vitro* мужского гаметофита петунии. 2015. 62:2. DOI: 10.7868/S0015330315020104

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.033

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ *HELIANTHUS TUBEROSUS IN VITRO*

Долотенко К.Е., Ратинская Л., Калашникова Е.А.

**ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени
К.А. Тимирязева», Москва 127550**

Helianthus tuberosus (топинамбур или земляная груша) – многолетнее растение из семейства Астровые (Asteraceae). Это ценное растенит, необходимое людям страдающим сахарным диабетом, так как его клубни являются источником инулина – углевода, который легко превращается во фруктозу. Родина топинамбура – Северная Америка. Местное население научилось выращивать его и использовать в пищу задолго до появления там европейцев. В 1613 г. французы завезли топинамбур в Европу. Свое название он получил от племени индейцев – топинамбо. Интересные и перспективные формы топинамбура завез

к нам из США великий русский ученый Николай Иванович Вавилов, который по достоинству оценил все его удивительные свойства.

Развитие биотехнологии, в частности, методов клеточной и генной инженерии растений, позволяет создавать новые формы растений, обладающих комплексом устойчивости к различным факторам абиотической и биотической природы. Однако, для проведения исследований такого рода, необходимо устанавливать оптимальные условия культивирования, обеспечивающих реализацию высокого морфогенетического потенциала культивируемых эксплантов (Калашникова, 2020).

Объектом исследования служили сегменты стеблей с двумя пазушными почками, изолированные с растений топинамбура сортов Интерес, Скороспелка и Новость ВИРа. Экспланты, перед введением в культуру *in vitro*, тщательно промывали под проточной водой в течение 15 минут, после чего в условиях ламинар-бокса проводили стерилизацию. В качестве стерилизующего агента использовали гипохлорит натрия (7%), в котором выдерживали изолированные сегменты стеблей в течение 8 минут, после чего их промывали трижды стерильной дистиллированной водой. Стерильные экспланты культивировали на модифицированной питательной среде Мурасига и Скуга (МС), содержащей различные регуляторы роста цитокининовой и ауксиновой природы. Из класса цитокининов изучали влияние БАП (6-бензиламинопурин) или кинетина в концентрации 0,5-2 мг/л, а из класса ауксинов – ИУК (индолилуксусная кислота), 2,4-Д (дихлорфеноксиксусная кислота), НУК (нафтилуксусная кислота) в концентрации 0,5-1 мг/л. Все исследуемые регуляторы роста добавляли в состав питательной среды МС отдельно или в сочетании друг с другом. Контролем служила безгормональная среда. Работу проводили в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева (Калашникова и др., 2014, 2017).

В результате проведенных исследований установлено, что изучаемые регуляторы роста оказывают неоднозначное влияние на морфогенетический потенциал культивируемых эксплантов. Так, например, добавление в состав питательной среды цитокининов (БАП или кинетин) не приводило к активному росту пазушных почек и формированию боковых побегов. Формирование адвентивных почек в этих вариантах не было отмечено. Кроме того, было выявлено, что в данных условиях культивирования в базальной части микрочеренков интенсивно формировалась каллусная ткань, которая так же была отмечена и в контрольном варианте. При добавлении в состав питательной среды ауксинов, наблюдали образование каллусной ткани и корней в базальной части микрочеренков, интенсивность которых зависела от применяемого ауксина. Так, культивирование микрочеренков на питательной среде, содержащей ИУК (0,5-1 мг/л), приводило к формированию корней минуя образование каллусной ткани. Кроме того, в этих вариантах наблюдали активный рост пазушных почек и формирование правильных по морфологии побегов, которые в дальнейшем использовали для микрочеренкования. Что касается вариантов с НУК или 2,4-Д, то в этих условиях в базальной части микрочеренков отмечался интенсивный процесс каллусогенеза. Однако следует отметить, что в варианте с НУК, наряду с каллусообразованием наблюдали процесс и ризогенеза, что не было зафиксировано в контрольном варианте и в варианте с применением 2,4-Д.

Известно, что на морфогенетические процессы оказывают влияние не только факторы гормональной природы, но и минеральный состав питательной среды. Так, например, одним из важных компонентов всех питательных сред является кальций и его соли. Как правило, в состав питательных сред кальций присутствует как CaCl_2 , что может оказывать токсичное влияние на культивируемые клетки из-за избытка хлора в среде. Поэтому рекомендуется включать в состав питательной среды $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Проведенные исследования показали, что такая замена приводит к интенсивному росту пазушных почек и формированию не витрифицированных побегов.

Список литературы:

1. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. Учебник и практикум / Москва, 2020. Сер. 76 Высшее образование. (2-е изд.). 378 с.
2. Калашникова Е.А., Чередниченко М.Ю., Карсункина Н.П., Халилуев М.Р. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. (3-е издание, исправленное и дополненное). Москва, 2014. 180 с.
3. Калашникова Е.А., Чередниченко М.Ю., Киракосян Р.Н., Зайцева С.М. Лабораторный практикум по культуре клеток и тканей растений. Москва, 2017. 163 с.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.034

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММА «ВНИИЗЖ» С ПРОИЗВОДСТВЕННЫМИ ШТАММАМИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ RABV

Доронин М.И.¹, Стариков В.А.¹, Михалишин Д.В.¹

**ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»),
Владимир, 600901
E-mail: doronin@arriah.ru**

Бешенство занимает первоочередное место в ряду вирусных болезней человека и животных, является одним из самых опасных зоонозов, вызывая поражение центральной нервной системы, энцефаломиелиты, параличи с неизбежным летальным исходом. Вирус бешенства принадлежит к порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*, виду *Rabies lyssavirus*.

Для исследования биологических свойств штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства использовали вирусный материал, изготовленный в виде 10%-ой суспензия из поражённых вирусом бешенства тканей мозга овцы. Культивирование штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства проводили в первичных культурах клеток: почка свиньи (Abelseth M. K., 1964), почка хомяка (Kissling R. E., 1958); в гетероплоидных клеточных линиях: монослойная культура клеток из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17) (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир); суспензионная клеточная сублиния из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/SUSP/ARRIAH) (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир); клетки нейробластомы мыши (NA-2); клетки из почки зеленой мартышки (Vero) (Montagnon B. J. et al., 1985).

Инфекционную активность штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства определяли титрованием с 10-кратным шагом в перевиваемой монослойной культуре клеток ВНК-21/2-17b с использованием антирабического иммуноглобулина G, меченого флуоресцеинизотиоцианатом. При репродукции штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства в первичной культуре клеток почки свиньи с 1 по 10 пассажей наблюдалось увеличение титра инфекционной активности с $5,60 \pm 0,25$ до $6,50 \pm 0,20$ lg ККИД₅₀/см³, в первичной клеточной линии почки хомяка – с $5,60 \pm 0,20$ до $6,50 \pm 0,25$ lg ККИД₅₀/см³, в монослойной культуре клеток из почки сирийского хомячка (ВНК-21/2-17) – с $5,85 \pm 0,15$ до $7,25 \pm 0,20$ lg ККИД₅₀/см³, в суспензионной сублинии клеток из почки сирийского хомячка (ВНК-21/SUSP/ARRIAH) – с $6,00 \pm 0,10$ до $7,75 \pm 0,15$ lg ККИД₅₀/см³, в клетках нейробластомы мыши (NA-2) – с $5,70 \pm 0,15$ до $6,75 \pm 0,15$ lg ККИД₅₀/см³, в клетках почки зеленой мартышки (Vero) – с $5,60 \pm 0,15$ до $6,50 \pm 0,20$ lg ККИД₅₀/см³.

Результаты исследований свидетельствовали о высокой адаптационной активности штамма «ВНИИЗЖ» вируса ящура к указанным клеточным культурам. Вирус, репродуцированный в суспензионной культуре клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH, был использован для получения антигена с целью изготовления экспериментальной серии вакцины.

При изучении свойств штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства выявлены существенные преимущества в сравнении с другими используемыми производственными штаммами «RV-97», «Щелково-51», «CVS-27» (контрольный). В качестве тест-системы для заражения использовали суспензию клеток сублинии ВНК-21/2-17 с концентрацией клеток $3,4-3,5$ млн/см³. Доза заражения составляла 0,005 ККИД₅₀/клетка.

Данные по репродукции вируса бешенства свидетельствовали о преимуществах штамма «ВНИИЗЖ», поскольку для него по итогам 10 последовательных пассажей в чувствительной клеточной сублинии ВНК-21/2-17 были характерны более высокие средние значения титра инфекционной активности ($7,75 \pm 0,15$ lg ККИД₅₀/см³) по сравнению со штаммами «RV-97», «Щелково-51», «CVS-27» для которых значения титра инфекционности соответствовали показаниям $7,00 \pm 0,10$; $7,25 \pm 0,11$; $7,31 \pm 0,16$ lg ККИД₅₀/см³. По итогам сравнительного анализа было выявлено, что накопление гликопротеина вируса бешенства штамма «ВНИИЗЖ» по данным твердофазного иммуноферментного анализа составляло $2,11 \pm 0,11$ мкг/см³, что на 67,4; 44,5; 41,6 % выше по сравнению с репродукцией штаммов «RV-97», «Щелково-51», «CVS-27», соответственно. Количество экспрессированного нуклеопротеина вируса бешенства для штамма «ВНИИЗЖ» составляло $1,90 \pm 0,12$ мкг/см³, что на 140,5; 40,7; 53,2 % выше по сравнению с культивированием штаммов «RV-97», «Щелково-51», «CVS-27», соответственно.

Таким образом, вакцинный штамм «ВНИИЗЖ» вируса бешенства по сравнению с представленными производственными штаммами «RV-97», «Щелково-51», «CVS-27» при репродукции в чувствительной клеточной сублинии ВНК-21/2-17 характеризуется более высокими показателями титра инфекционной активности и накопления иммуногенных компонентов для производства высокоиммуногенных антирабических инактивированных вакцин.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.035

ВЛИЯНИЕ АБК И ИНГИБИТОРА ЕЕ СИНТЕЗА ФЛУРИДОНА НА РОСТ НЕСОВМЕСТИМЫХ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК *PETUNIA HYBRIDA* L. *IN VIVO* В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПОЛОДТОВРЕНИЯ

Зинкевич В.В.¹, Фатеев А.Д.¹, Захарова Е.В.^{1,2}, Ковалева Л.В.³

1 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет МСХА им.

К.А. Тимирязева, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49, E-mail: info@rgau-msha.ru

2 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42, E-mail: iab@iab.ac.ru

3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, Ботаническая, 35, E-mail: ifr@ippras.ru

Рост и развитие мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения регулируется его специфическими взаимодействиями с диплоидными спорофитными тканями рыльца и столбика, которые в значительной степени определяют возможность последующего слияния гамет в процессе двойного оплодотворения.

Развитие мужского гаметофита сопровождается достаточно существенными изменениями его водного статуса. Во время созревания в пыльнике пыльца подвергается дегидратации. Реактивация пыльцы осуществляется на поверхности рыльца в ходе ее гидратации. Рост пыльцевой трубки (ПТ) начинается сразу после ее набухания и включает в себя образование новой плазматической мембраны (ПМ), клеточной стенки и вакуоли.

Получены данные о потенциальной роли АБК в гидратации пыльцевого зерна (ПЗ) и прорастании ПТ петунии (Ковалева и др., 2017). АБК участвует в регуляции прорастания и роста мужского гаметофита петунии, контролируя водный баланс в системах пыльник-мужской гаметофит и пыльца-пестик. Выявлены две возможные мишени действия АБК: K^+ -каналы и H^+ -АТФаза, функционирующие в их ПМ. Полагают, что АБК стимулирует прорастание ПЗ и рост ПТ, активируя открывание K^+ -каналов в ПМ ПТ.

Об участии АБК в регуляции прорастания и роста мужского гаметофита петунии свидетельствуют данные о ее высоком содержании в зрелой пыльце, которое падало до нуля через 1 ч после ее прорастания *in vitro*, в то время как прорастание пыльцы на рыльце и рост ПТ в тканях столбика происходило при высокой концентрации АБК. Рост совместимых ПТ сопровождался высоким уровнем АБК, однако ингибирование роста самонесовместимых ПТ происходило при еще более высоком уровне АБК.

Цель данной работы состояла в изучении влияния АБК и ингибитора ее синтеза флуридона на рост самонесовместимых ПТ *Petunia hybrida* L. *in vivo* в прогамной фазе оплодотворения. Для экспериментов были использованы клонально размноженные растения петунии (*P. hybrida* L.) двух клонов - самонесовместимые и самосовместимые, из лабораторной коллекции. Объект исследований - растущие *in vivo* пыльцевые трубки.

Накануне запланированных опытов собирали пыльцу с растений самонесовместимой линии, в то время как неопыленные цветы были кастрированы. На следующий день пестики кастрированных цветов были обработаны раствором АБК и флуридона в концентрации 10нМ. С этой целью на рыльце пестика пипеткой наносили 5 мкл раствора фитогормона или ингибитора, после чего цветок закрывали изолятором. Самоопыление проводили через 2 или 6 ч после обработки. Сбор и фиксацию материала (опыленные пестики) проводили через 2, 4, 6 и 24 ч.

Визуализацию роста ПТ *in vivo* в тканях пестика проводили с использованием флуоресцентного красителя анилинового голубого. Этот метод основан на специфической способности флуорохрома анилинового голубого связываться с каллозой, являющейся частью оболочки ПТ. В качестве фиксатора использовали спирт и ледяную уксусную кислоту в соотношении 3:1.

В контрольных вариантах опытов, через 24 ч после совместимого опыления - длина ПТ составляла 15876 ± 188 мкм (58% длины пестика), в то время как после самонесовместимого опыления длина ПТ составляла 7891 ± 406 мкм (27% длины пестика).

Стимуляторный эффект на рост несовместимых ПТ был выявлен в варианте с предварительной обработкой рылец флуридоном за 2 ч до опыления: самонесовместимые ПТ почти достигали длины, характерной для совместимого опыления (13293 ± 588 мкм, т.е. 48% длины пестика), а при обработке рылец флуридоном за 6 ч до опыления длина ПТ, напротив, уменьшилась почти в два раза и составила лишь 4007 ± 129 мкм (14 % длины пестика).

Обе предварительные обработки рылец АБК оказались не эффективными: длина ПТ после предварительной обработки АБК за 6 ч составила 8221 ± 185 мкм (25,4% длины пестика), в то время как обработка АБК за 2 ч до опыления даже ингибировала рост ПТ, что отразилось на уменьшении их длины до 5127 ± 153 мкм (15,5% длины пестика).

Таким образом, полученные в данной работе результаты о то, что АБК играет существенную роль в процессе роста мужского гаметофита *in vivo*, а также полученные ранее данные о том, что АБК играет решающую роль в развитии фертильного и стерильного мужского гаметофита, участвуя совместно с 3-уксусной кислотой (ИУК) в ПКС тапетума (Kovaleva et al., 2017), дают основание говорить о сложном взаимодействии сигнальных путей АБК с другими фитогормонами (ИУК, этиленом, гиббереллинами, цитокининами) в прорастающем мужском гаметофите в прогамной фазе оплодотворения (Ковалева и др., 2017).

Список литературы:

1. Kovaleva L. V., Voronkov A. S., Zakharova E. V., Andreev I. M. ABA and IAA control microsporogenesis in *Petunia hybrida* L. 2017. 255:3. DOI 10.1007/s00709-017-1185-x
2. Ковалева Л. В., Захарова Е. В., Воронков А. С., Тимофеева Г. В., Андреев И. М. Роль абсцизовой кислоты и этилена в контроле движущих сил транспорта воды в прорастающем мужском гаметофите петунии. 2017. 5. DOI 10.7868/S0015330317040078

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.036

ИССЛЕДОВАНИЕ СУСПЕНЗИОННОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *PODOPHYLLUM PELTATUM* МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Китаева М.П.¹, Федотчева Т.А.^{1,2}

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 117216, Россия, Москва, ул. Грина, д.7

E-mail: kimape@mail.ru

2 – НИЛ молекулярной фармакологии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 119435, Россия, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 9а

Клеточная культура растения *Podophyllum peltatum* (семейство *Berberidaceae*) является одним из перспективных источников получения противоопухолевого соединения подофиллотоксина и его производных [1, 2, 3].

Из плода, почки и корня растения *P. peltatum*, находящегося в биоколлекции ФГБНУ ВИЛАР, получены каллусная и суспензионная клеточные культуры [4].

Изучены ростовые свойства суспензионной клеточной культуры [4, 5].

Методом тонкослойной хроматографии в ней обнаружено основное биологически активное вещество растения – фенилтетрагидронафталиновый лигнан подофиллотоксин [6].

Цель исследования – изучение морфофизиологических характеристик суспензионной клеточной культуры *Podophyllum peltatum*.

Объект исследования – 14- и 28-суточная суспензионная клеточная культура плода, почки и корня *Podophyllum peltatum* из биоколлекции ФГБНУ ВИЛАР.

Метод исследования – оптическая микроскопия.

Для определения размеров клеток применялась камера Горяева.

Жизнеспособность клеток определялась по методу окрашивания 0,1 % метиленовым синим в соответствии с протоколом [6, 7].

В результате исследования получены данные о размере, форме и жизнеспособности клеток 14- и 28-суточной клеточной культуры *Podophyllum peltatum*, полученной из корня, почки и плода растения.

Обнаружено, что клетки клеточной культуры почки и корня крупные и вытянутые, а клетки клеточной культуры плода небольшие и округлые.

Суспензия клеточных культур корня и почки неравномерно распределена по всему объему питательной среды, состоит из клеток разного размера и формы, преимущественно располагающихся у дна колбы. Суспензия клеточной культуры плода равномерно распределена по всему объему питательной среды, состоит из клеток примерно одинакового размера и формы.

Клеточные культуры отличаются по цвету. 14-суточные клеточные культуры корня и почки ярко-желтого цвета. 14-суточная клеточная культура плода коричневатого-желтого цвета. 28-суточная клеточная культура корня двух цветов - ярко-желтого или темно-коричневого. 28-суточная клеточная культура почки темно-коричневого цвета. 28-суточная клеточная культура плода болотного цвета.

Жизнеспособность клеток 14-суточных клеточных культур составляет 90-100 %, 28-суточных клеточных культур – 70-80 %.

Данные микроскопического анализа подтверждают полученные ранее данные о большей нестабильности суспензионных клеточных культур корня и почки и большей стабильности суспензионной клеточной культуры плода.

Список литературы:

1. Китаева М.П., Федотчева Т.А., Савина Т.А. Современные подходы к получению подофиллотоксина // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: Тезисы Международной научно-практической конференции. М.: РУДН, 2018. – С. 93-94.
2. Китаева М.П., Савина Т.А., Федотчева Т.А. Современные биотехнологические подходы к получению подофиллотоксина // Сборник трудов Шестой научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодые ученые и фармация XXI века». – М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2018. – С. 11-17.
3. Китаева М.П., Федотчева Т.А. Современные методы анализа лекарственного растительного сырья, содержащего подофиллотоксин // VII научная конференция с международным участием "Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения": сборник научных трудов. М.: ВИЛАР, 2019. - С. 202-207.
4. Савина Т.А., Цыбулько Н.С. Изучение возможности использования клеточной культуры подофилла щитовидного в качестве источника биологически активных соединений // The Biology of Plant *In Vitro* and Biotechnology: abstracts VIII International Conference. – Саратов: Изд. Саратов. губерн. торгово-промышленной палаты. - 2003: 88-89.
5. Китаева М.П., Федотчева Т.А., Савина Т.А. Суспензионная клеточная культура как источник получения подофиллотоксина // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции. В 2 томах. Орехово-Зуево: ГГТУ, 2019. - С 89-91.
6. Китаева М.П., Федотчева Т.А., Савина Т.А. Изучение клеточной культуры *Podophyllum peltatum* методом тонкослойной хроматографии // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: сборник тезисов II Международной научно-практической конференции. М.: РУДН, 2019. – С. 146-147.
7. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 487 с.
8. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.037

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Константинов З.С.¹, Гарибян Ц.С.²

1 – Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение «Российский государственный аграрный университет МСХА имени К. А. Тимирязева», Факультет агрономии и биотехнологии, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.49

**2 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, лаборатория маркерной и геномной селекции растений, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42
E-mail: tsovinar1980@mail.ru**

Подсолнечник - одна из ценных сельскохозяйственных культур. Он является сырьём для производства как пищевого масла, так и технического. В связи с наличием в ней легкоусвояемых белков, подсолнечник используют в качестве кормовой культуры. Интенсивное возделывание подсолнечника создаёт необходимость выведения сортов с

новыми хозяйственно ценными признаками. Однако получение новых генотипов затруднено из-за узости разнообразия генофонда подсолнечника. Селекционные методы выведения новых ценных сортов занимают большое количество времени, поэтому, для интенсификации и ускорения данного процесса, целесообразно применять методы биотехнологии. Растения-регенеранты получают путём индукции побегообразования из каллусной ткани, который образуется под действием специальных регуляторных веществ - фитогормонов. Для индукции каллусогенеза необходимо наличие в составе питательной среды фитогормонов групп ауксинов и цитокининов. Эффективность каллусогенеза подсолнечника в культуре *in vitro* зависит от генотипа, типа используемого экспланта и состава питательных сред.

Для изучения влияния гормонального состава питательной среды на каллусогенез подсолнечника сортов Казачий и Енисей, применялись 2-х недельные проростки, выращиваемые в условиях *in vitro*. В качестве эксплантов использовали части гипокотилия, эпикотилия и листьев, которые культивировались на разных вариантах питательных сред, отличающихся различными видами и концентрациями фитогормонов.

В результате выполнения данной работы показано, что для инициации каллусогенеза подсолнечника сорта Казачий наиболее эффективной питательной средой из всех применяемых в работе является среда Мурасиге-Скуга (МС), содержащая 1,5мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 1,5мг/л α -нафтилуксусную кислоту (НУК), а для сорта Енисей- МС, содержащая 1 мг/л 6-БАП и 1 мг/л НУК. Максимальный прирост биомассы каллуса у обоих сортов образовали экспланты из гипокотилия.

Таким образом, определены оптимальный гормональный состав питательной среды и выявлены наиболее эффективные типы эксплантов для каллусогенеза подсолнечника сортов Казачий и Енисей.

В дальнейшем планируется исследование регенерационной способности подсолнечника из морфогенного каллуса.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.038

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *IN VITRO* МЕЛИССЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*MELISSA OFFICINALIS* L.) СОРТА ИСИДОРА

Кухта Е.С., Фридман В.А., Чередниченко М.Ю.

***Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Москва 127550; e-mail: michael.tsch@gmail.com***

Род *Melissa* L., относящийся к семейству Lamiaceae Martinov (Яснотковые) включает по разным оценкам от 10 до 15 видов многолетних травянистых растений. В России наиболее ценным является вид Мелисса лекарственная (*Melissa officinalis* L.). Она применяется в народной и научной медицине около 2000 лет, является фармакопейным растением во многих странах, в том числе в Российской Федерации [1]. Мелисса находит широкое применение в медицине, в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности во многих странах мира. Сырье мелиссы обладает седативным, спазмолитическим, иммуномодулирующим, антидепрессивным, антигистаминным, антиоксидантным, противовоспалительным и антимикробным действием. Биологическая ценность сырья мелиссы лекарственной обусловлена комплексом биологически активных веществ: летучих соединений, фенольных веществ и витаминов, входящих в состав эфирного масла.

К настоящему времени для различных сортов мелиссы лекарственной, представляющей интерес как декоративное, лекарственное, пряно-ароматическое растение, проведен ряд исследований, направленных на совершенствование технологий культивирования *in vitro* с целью повышения содержания в тканях растения ценных

вторичных метаболитов, увеличения выхода биомассы растения, используемой в промышленности [2-4].

В нашей работе использовали семена *Melissa officinalis* L. сорта Исидора, включенного в Госреестр по Российской Федерации в 2003 г. (производитель – ООО «Группа компаний «Гавриш»).

Для получения асептических растений семена стерилизовали 0,1 %-ным раствором хлорида ртути (II) (экспозиция 3, 5, 7 минут) или 5 %-ным раствором гипохлорита натрия (экспозиция 10, 15, 20 минут). После стерилизации семена дважды промывали в дистиллированной воде. Затем семена помещали на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) без добавления гормонов и регуляторов роста. Повторность опыта 3-кратная, по 15 семян на повторность. Дальнейшее культивирование проводили в условиях световой комнаты (21 °С, 3000 лк, 16-часовой световой день).

Клональное микроразмножение полученных проростков проводили на питательной среде МС без добавления и с добавлением регуляторов роста: безгормональная; МС + 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП); МС + 0,5 мг/л индолил-3-уксусной кислоты (ИУК); МС + 1 мг/л кинетина.

Для индукции формирования каллусной ткани из асептических растений с 4...5 парами настоящих листьев получали листовые, стеблевые, узловые и черешковые экспланты и помещали на питательную среду МС с добавлением регуляторов роста: (1) 1,0 мг/л ИУК + 0,5 мг/л БАП; (2) 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л БАП. Культивирование проводили в пластмассовых контейнерах при стандартных условиях.

Эффективность прорастания семян *M. officinalis* сорта Исидора была высокой при всех режимах стерилизации (выше 80 %), кроме варианта 20-минутной экспозиции в 5 %-ном растворе гипохлорита натрия (73,3 %). Достоверно выше контроля эффективность прорастания была только при стерилизации 0,1 %-ным раствором хлорида ртути (II) в течение 3 минут. Именно этот режим можно рекомендовать для поверхностной стерилизации семян при введении в культуру *in vitro*.

В экспериментах по клональному микроразмножению *M. officinalis* сорта Исидора на большинстве вариантов гормонального состава питательных сред отмечалось активное корне- и побегообразование. На среде МС без добавления регуляторов роста наблюдалось эффективное укоренение. На некоторых черенках в базальной части наблюдали спонтанное образование каллусной ткани. Побеги развивались хорошо. На питательной среде МС с добавлением 1 мг/л кинетина эффективность укоренения составила более 50 %. Развитие побегов уступало по интенсивности предыдущему варианту. На питательной среде МС с добавлением 1 мг/л БАП укоренения практически не наблюдали. Побеги формировали сильно ветвящийся укороченный стебель с мелкими листьями. На питательной среде МС с добавлением 0,5 мг/л ИУК частота укоренения не уступала таковой на контрольном варианте (безгормональная среда). Побеги мощные, с длинным стеблем, практически не ветвящиеся, с большими листьями.

На всех вариантах питательных сред в базальной части черенков наблюдали спонтанное образование каллусной ткани с частотой, убывающей в следующем порядке: 0,5 мг/л ИУК > 1 мг/л БАП > 1 мг/л кинетин > безгормональная среда.

В экспериментах по индукции каллусогенеза на всех типах экспланта и на обоих вариантах гормонального состава питательной среды была получена каллусная ткань. При использовании сегментов листьев каллусогенез на среде с добавлением ИУК в качестве ауксинового компонента наблюдался значительно реже, чем при использовании других типов эксплантов, но с частотой выше 50 %, и формировался более рыхлый каллус, чем на другом варианте питательной среды и других типах экспланта. На питательной среде с добавлением 2,4-Д каллус наблюдался с частотой 100 % на всех типах экспланта, кроме листовых.

Соматический органогенез наблюдали только при использовании в качестве эксплантов сегментов узлов. При этом частота органогенеза на питательной среде МС + 1

мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП (68,0 %) была значительно выше, чем на среде с добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП (18,0 %). При использовании в качестве эксплантов листовых пластинок, черешков листьев и междоузлий органогенез не наблюдали. На среде с добавлением НУК и БАП наблюдали также единичные случаи ризогенеза.

Список литературы:

1. Рачина С.А., Рачин А.П. Валериана, меласса и мята в терапии тревожных расстройств и нарушений сна: обзор клинических исследований // Лечащий врач, 2016. 6: 61-64.
2. Якимова О.В., Егорова Н.А. Введение в культуру *in vitro* и микроразмножение *Melissa officinalis* L. // Сборник статей Международной научной конференции, Минск, 18-20 августа 2014. С. 272-275.
3. Якимова О.В., Егорова Н.А. Исследование влияния некоторых факторов на каллусообразование у мелиссы (*Melissa officinalis* L.) в культуре *in vitro* // Вестник Удмуртского университета, 2014. 4: 39-43.
4. Shakeri S.M., Kazemitabar S.K., Sinaki J.M. *In vitro* culture of *Melissa officinalis* without the use of hormones // International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 2013. P. 1382-1387.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.039

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РАЗМНОЖЕНИЕ *AMOMUM AROMATICUM* Roxb. *IN VITRO*

Кхуат Ван Куэт¹, Нгуен Тхи Хай², Калашникова Е.А.¹, Киракосян Р.Н.¹

1 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, 127550

2 – Вьетнамский национальный аграрный университет, Биотехнологический факультет, г. Ханой, Вьетнам

Amomum aromaticum Roxb. (черный кардамон) – растение, входящее в семейство Zingiberaceae Lindl., род *Amomum*. На территории Вьетнама произрастает 21 вид этого рода. *A. aromaticum* Roxb. в настоящее время произрастает не только во Вьетнаме, но и в Индии, Китае, Бангладеш, Непале, Мьянме, Лаосе и Камбодже.

Во Вьетнаме *A. aromaticum* Roxb. широко известен как "кардамон", "Са нхан КОК" или "До Хо". Это многолетнее однодольное травянистое растение, которое является важным лекарственным растением и составляет во Вьетнаме ценную недревесную продукцию, которая отличается высоким экспортным потенциалом. В традиционной медицине семена *A. aromaticum* используют в качестве лекарств при борьбе с диареей, малярией, кариеса зубов, различными кишечными заболеваниями и др. (Jafri et al., 2001; Do Tat Loi, 2005; Verma et al., 2010). Согласно Parihar et al. (2012), экстракты, полученные из семян, листьев и стеблей *A. aromaticum* обладают антибактериальной активностью по отношению к *Klebsiella pneumoniae*, вызывающей респираторную суперинфекцию, также экстракты усиливают иммунный ответ, увеличивая количество фагоцитоза и лимфоцитов у мышей. По данным Le et al. (2017), эфирное масло *A. aromaticum* обладает противоопухолевой активностью. Кроме того, различные части растения, особенно семена, широко используются в качестве приправы для многих блюд. Поэтому и масштабное размножение и сохранение *A. aromaticum* имеет важное значение.

Основные способы размножения черного кардамона являются - семенной и вегетативный (корневыми отпрысками). Однако эти методы имеют свои недостатки, например, генетическая неоднородность материала при семенном способе размножения, или появление грибковых или вирусных заболеваний - при вегетативном способе. Все это свидетельствует о поиске альтернативных способов размножения, важной сельскохозяйственной культуры для Вьетнама.

Клональное микроразмножение – это быстрый и экономически выгодный способ размножения растений в условиях *in vitro*, при котором достигается получение необходимого количества генетически однородного посадочного материала за короткий промежуток времени. Такие технологии позволяют создавать *in vitro* банк ценных, лекарственных, исчезающих, а также занесенных в Красную книгу растений (Калашникова, 2020).

Объектом исследования служили спящие почки, изолированные с корней 6-8 летних растений *A. aromaticum*. Экспланты, перед введением в культуру *in vitro*, промывали мыльным раствором под проточной водой в течение 15-20 минут, после чего в условиях ламинар-бокса проводили стерилизацию. В качестве стерилизующего агента использовали гипохлорит кальция (8-10%) или хлорид ртути (0,1%), в котором выдерживали изолированные корневые почки в течение 5-12 минут, после чего их промывали трижды стерильной дистиллированной водой. Стерильные экспланты культивировали на модифицированной питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей БАП или кинетин в концентрации 0,5-2 мг/л. Все работы проводили в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Калашникова и др., 2014).

В результате проведенных исследований было установлено, что присутствие в составе питательной среды цитокининов оказывает существенное влияние на такие важные показатели, как коэффициент размножения и формирование главного и дополнительных побегов. Так, на среде с кинетином коэффициент размножения составил от 2 до 3, в то время как на среде с БАП этот показатель был на уровне от 2 до 4. Причем в этих условиях выращивания сформировавшиеся адвентивные почки характеризовались активным ростом и к концу пассажа их высота в среднем составляла 3,2 - 6,4 см, что в 2 раза выше по сравнению с вариантом, в котором присутствовал кинетин. Анализируя полученные данные следует заключить, что наилучшие результаты были получены на питательных средах, в которых гормоны (БАП или кинетин) находились в концентрации 1 мг/л.

Сформировавшиеся микропобеги в дальнейшем отделяли от материнского экспланта и переносили на питательные среды для укоренения. В качестве ауксинов применяли НУК или ИМК в концентрации 0,25-1 мг/л. Экспериментально установлено, что во всех условиях выращивания наблюдали 100%-ное укоренение микропобегов. Причем на среде с ИМК формировались корни в 1,5-2 раза длиннее по сравнению с вариантом с НУК.

Таким образом, на основании проведенных исследований подобраны наиболее благоприятные условия культивирования *A. aromaticum* на всех этапах клонального микроразмножения.

Список литературы:

1. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. Учебник и практикум / Москва, 2020. Сер. 76 Высшее образование. (2-е изд.). 378 с.
2. Калашникова Е.А., Чердниченко М.Ю., Карсункина Н.П., Халилуев М.Р. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. (3-е издание, исправленное и дополненное). Москва, 2014. 180 с.
3. Do Tat Loi (2005). Vietnamese medicinal plants and herbs. Medical Publishing House, Ha Noi. pp. 404.
4. Jafri M.A., Farah K.J., & Singh S. (2001). Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb.). Journal of Ethnopharmacology. 75 (2-3): 89-94.
5. Le T.B., Beaufay C., Nghiem D.T., Mingeot-Leclercq M.P. & Quetin-Leclercq J. (2017). *In vitro* Anti-Leishmanial Activity of Essential Oils Extracted from Vietnamese Plants. Molecules. 22(7): 1071.
6. Parihar L., Sharma L., Kapoor P. & Parihar P. (2012). Detection of antioxidant, immunomodulatory and antimicrobial activity of *Amomum aromaticum* against *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Pharmacy Research. 5(2): 901-905.

7. Verma S.K., Rajeevan V., Bordia A. & Jain V. (2010). Greater cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) - A cardio-adaptogen against physical stress. Journal of Herbal Medicine and Toxicology. 4(2): 55-58.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.040

ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ КЛОНИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ СЛИЯНИЯ И АКТИВАЦИИ

Лопухов А.В., Шедова Е.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, дом 60, 142132 E-mail: lopixoff.al@yandex.ru

При клонировании взамен собственного хромосомного материала женская половая клетка (ооцит) приобретает ядро соматической клетки от животного, генетическую копию которого планируется получить. В этом случае исходный эпигенетический паттерн в дифференцированных соматических клетках стирается, а эмбриональные эпигенетические характеристики и паттерны экспрессии генов восстанавливаются до тотипотентного эмбрионального состояния. Во время последующего развития полученные клонированные эмбрионы с тотипотентным статусом вновь способны дифференцироваться в различные типы соматических клеток. Этот процесс, который включает в себя различные молекулярные и эпигенетические модификации и от которого в конечном итоге зависит эффективность клонирования, называется ядерным перепрограммированием. Считается, что соответствующие трансформации ядра соматической клетки (кариопласта) опосредуются влиянием цитоплазмы ооцита (цитопласта) и начинаются с момента объединения (слияния). При этом характер влияния цитоплазмы зависит от многих условий и, следовательно, может направленно изменяться.

В рамках представляемой работы оценивали эффективность соматического клонирования с точки зрения продолжительности воздействия цитоплазмы ооцита (цитопласт) на донорское ядро (кариопласт) до активации, а также повторного электрослияния цитопласта и кариопласта. Изучали воздействие указанных факторов на формирование клонированных эмбрионов крупного рогатого скота и их развитие до стадии бластоцисты. Ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) созревали в среде ТС-199, дополненной 10 % фетальной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл ФСГ и 10 мкг/мл ЛГ. Через 20-24 ч созревания ОКК обрабатывали 0.1 % раствором гиалуронидазы, механически удаляли кумулюсные клетки и отбирали ооциты с первым полярным тельцем. Фетальные фибробласты культивировали до сформированного монослоя, контактно ингибировали в течение 2 суток и готовили к процедуре переноса в энуклеированный ооцит в виде суспензии. Для объединения ооцитов и перенесенных в их перивителлиновое пространство клеток применяли два последовательных импульса постоянного тока при напряжении 35 В продолжительностью 20 мкс (однократно или в случае отсутствия признаков объединения клеток двукратно). Полученные цитогибриды активировали иономицином через 1.0 или 2.0 ч после слияния и культивировали до стадии бластоцисты. Доля раздробившихся ооцитов не различалась между группами и варьировала от 60.7 до 70.4 %. Также не различалась доля развития бластоцист, когда использовалось однократное или двукратное слияние (соответственно 29.4 ± 4.4 и 22.8 ± 3.5 %). При интервале между слиянием и активацией 1.0 ч выход бластоцист составлял 17.4 ± 2.6 %. Удлинение продолжительности указанного периода до 2.0 ч повышало этот показатель до 31.1 ± 3.8 % ($p < 0.05$). Таким образом, показано, что эффективность клонирования зависит от интервала между слиянием и

активацией, (оптимальные параметры применительно к описанному нами протоколу — соответственно 2 и 23-25 ч). Также очевидно, что повторное электрослияние энуклеированного ооцита и соматической клетки не оказывает отрицательного воздействия на качество образовавшихся цитогрибидов, а, следовательно, может быть использовано в рамках процедуры получения клонированных эмбрионов у крупного рогатого скота.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.041

**ЭФФЕКТЫ ЭЛИСИТОРОВ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА
АНТИРАДИКАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ СУСПЕНЗИОННЫХ
КУЛЬТУР КЛЕТОК *ECHINACEA PURPUREA* L. MOENCH**

Нестер Г.В., Дитченко Т.И.

Белорусский государственный университет, Минск 220030

E-mail: bio.nesterGV1@bsu.by

Биотехнологическим источником фенолпропаноидов с иммуностимулирующей, антиоксидантной, противовирусной и противовоспалительной активностью могут служить культуры клеток, тканей и органов эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench) [1]. Повышение продукционного потенциала культивируемых *in vitro* растительных клеток может быть достигнуто путем их обработки элиситорами [2-3]. Одним из наиболее известных грибных элиситоров является дрожжевой экстракт (ДЭ), который представляет собой водорастворимую фракцию свободных пептидов и аминокислот, образующихся в результате автолиза клеток *Saccharomyces cerevisiae* под действием ферментов или при нагревании. Исследования влияния элиситоров на синтез вторичных метаболитов культурами растительных клеток и тканей свидетельствуют, что их эффективность зависит от типа культуры, режима обработки, а также условий культивирования [3-4]. В связи с этим разработка оптимальных способов применения элиситоров является актуальной задачей при создании клеточных линий-продуцентов экономически важных биологически активных соединений. Целью настоящей работы явилась оценка способности ДЭ повышать антирадикальную активность (АРА) экстрактов из клеток суспензионных культур эхинацеи пурпурной

Объектами исследования служили суспензионные культуры *Echinacea purpurea* L. Moench, инициированные из каллусных тканей разного происхождения (листового, корневого) и различающиеся по степени агрегированности. В работе использовалась питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга, включающая 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 1 мг/л кинетина и 1 мг/л β-индолил-3-уксусной кислоты. Величина pH питательных сред до автоклавирования составляла 5,8. Суспензионные культуры инкубировали в темноте при 25°C. Постоянное перемешивание питательной среды обеспечивалось с помощью орбитального шейкера со скоростью вращения 120 об/мин. Продолжительность ростового цикла составляла 15 суток. Поскольку наиболее выраженная элиситор-индуцированная стимуляция вторичного метаболизма в культурах растительных клеток в большинстве случаев отмечается в поздней логарифмической фазе либо в начале стационарной фазы ростового цикла, то обработку суспензионных культур *Echinacea purpurea* препаратом ДЭ производили на 13 сутки цикла выращивания (переход в стационарную фазу). Проавтоклавируемый водный маточный раствор ДЭ добавляли в питательные среды до конечных концентраций 50, 100, 250 и 500 мг/л. Культивирование клеток в присутствии препарата элиситоров осуществлялось в течение 2 суток. Для определения АРА экстрактов использовали метод, основанный на взаимодействии антиоксидантов, характеризующихся антирадикальными свойствами, со стабильным хромоген-радикалом 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) [5]. С целью сравнительной оценки АРА разных образцов использовали величину IC₅₀ – концентрацию,

при которой наблюдалось 50%-ное ингибирование радикалов ДФПГ. Количественную оценку содержания суммы фенольных соединений в пересчете на феруловую кислоту производили на основе реакции комплексообразования с реактивом Фолина-Дениса, флавоноидов в пересчете на кверцетин – по реакции с $AlCl_3$. Содержание гидроксикоричных кислот (ГКК) определяли в пересчете на цикориевую кислоту методом прямой спектрофотометрии.

Установлено, что водно-спиртовые экстракты из суспензионной культуры *Echinacea purpurea* корневого происхождения изначально характеризовались более высокой АРА по сравнению с экстрактами из культуры листового происхождения. В частности, величина IC_{50} составляла в среднем $(0,152 \pm 0,011) \%$ для культуры корневого происхождения и $(0,091 \pm 0,011) \%$ – для культуры листового происхождения. Двухсуточная экспозиция клеток исследуемых суспензионных культур в присутствии 50–500 мг/л ДЭ приводила к существенному возрастанию содержания в получаемых экстрактах соединений с антирадикальными свойствами. В случае суспензионной культуры листового происхождения самое низкое значение IC_{50} было выявлено в результате воздействия 100 мг/л ДЭ – $(0,058 \pm 0,004) \%$. Таким образом, в указанной концентрации исследуемый элиситор индуцировал практически трехкратный рост АРА. Для суспензионной культуры корневого происхождения самое низкое значение IC_{50} $(0,070 \pm 0,007) \%$ отмечалось в результате обработки культуры 250 мг/л ДЭ, т.е. стимулирующий эффект был выражен в гораздо меньшей степени и составлял в среднем 1,3 раза.

Изменения АРА экстрактов из суспензионной культуры *Echinacea purpurea* листового происхождения, инкубируемых в присутствии разных концентраций ДЭ, коррелировали с уровнями накопления отдельных групп фенольных соединений – гидроксикоричных кислот и флавоноидов. Эффективность применения исследуемого биотического элиситора была гораздо выше для суспензионной культуры листового происхождения, которая исходно характеризовалась более низким содержанием ГКК по сравнению с культурой корневого происхождения. Для данного объекта воздействие 100–500 мг/л ДЭ индуцировало существенное усиление биосинтеза ГКК, в результате чего их доля в комплексе вторичных метаболитов фенольной природы возрастала до 82–87% (в контроле в среднем 50–51%). В случае суспензионной культуры корневого происхождения, отличающейся в контроле более высоким содержанием исследуемых вторичных метаболитов, стрессовая реакция, индуцируемая компонентами ДЭ, проявлялась в меньшей степени. При этом положительная корреляция между АРА и уровнями накопления вторичных метаболитов фенольной природы отсутствовала.

Таким образом, можно предположить, что особенности проявления стимулирующего эффекта ДЭ на показатели АРА и уровни накопления фенилпропаноидов и флавоноидов обусловлены различиями в исходном биосинтетическом потенциале исследуемых суспензионных культур *Echinacea purpurea* листового и корневого происхождения.

Список литературы:

1. Parsons J.L., Cameron S.I., Harris C.S., Smith M.L. Echinacea biotechnology: advances, commercialization and future considerations. *Pharmaceutical Biology*. 2018. 56(1):485–494. DOI: 10.1080/13880209.2018.1501583.
2. Ramirez-Estrada K., Vidal-Limon H., Hidalgo D., Moyano E., Golenioswki M., Cusidó R.M., Palazon J. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*. 2016. 21:182–206. DOI: 10.3390/molecules21020182.
3. Isah T., Umar S., Majib A., Sharma M.P., Rajasekharan P.E., Zafar N., Fruk A. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2018. 132:235–369. DOI:10.1007/s11240-017-1332-2.

4. Angelova Z., Georgiev S., Roos W. Elicitation of Plants. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2006. 20(2):72–83. DOI: 10.1080/13102818.2006.10817345.
5. Филиппенко Т.А., Белая Н.И., Николаевский А.Н. Фенольные соединения растительных экстрактов и их активность в реакции с дифенилпикрилгидразилом. Химико-фармацевтический журнал. 2004. 38(8):34–36.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.042

ГАПЛОИДИЯ НА ШНИТТ-ЛУКЕ (*ALLIUM SCHOENOPRASUM* L.) ЧЕРЕЗ ГИНОГЕНЕЗ

Романова О.В., Середин Т.М., Романов В.С.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный
научный центр овощеводства", Московская область, Одинцовский район, посёлок
ВНИИССОК 143080
E-mail: vniissok@mail.ru***

Шнитт-лук – многолетнее однодольное растение, являющаяся одной из важнейших овощных культур. Луковые культуры занимает второе место после томата в списке овощей, выращиваемых в мире (FAOSTAT, 2018).

Одной из селекционных задач по луку является создание генетически однородных родительских линий. Основным ограничением является длительность этого процесса. Для получения чистых гомозиготных родительских линий необходимо четыре и более поколений самоопыления, что приводит к инбредной депрессии. В качестве альтернативы более медленному традиционному процессу применяют методы *in vitro*.

Гаплоидные растения можно получить с помощью культуры пыльников, культуры неоплодотворенных семязпочек или культуры цветочных бутонов. По литературным данным, только гиногенез эффективен для получения гаплоидов и удвоенных гаплоидов растений лука. Впервые регенеранты из культуры неопылённых семязпочек были получены Guha и Johri в 1966 году. Выход гиногенных семязпочек, которые дали проростки, колеблется от 0,03% до 21,9% (Campion, Azzimonti, 1988; Campion, Alloni, 1990; Keller, Korzun, 1996; Ahmed Mahmood Ibrahim et al., 2016).

Удвоенные гаплоиды (DHs), полученные спонтанным или индуцированным удвоением хромосом, с восстановленной фертильностью могут быть использованы для создания инбредных родительских линий.

Целью настоящего исследования являлась оценка гиногенетической способности генотипов лука шнитта с использованием культуры цветочных бутонов. Данное исследование проводилось в лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ ФНЦО.

Донорные растения лука шнитта (*Allium schoenoprasum* L.) выращивались в условиях теплицы. Зонтики были взяты с растений-доноров на 3-5 сутки до начала цветения. Целые соцветия сначала поверхностно стерилизовали 70 % спирте в течение 30 секунд, затем в 50 % растворе "Белизны" с 2-мя каплями Твина-20 в течение 15 минут и трижды промывали в стерильной дистиллированной воде. После стерилизации бутоны размером 3-5 мм отделяли от цветоножки, затем целые цветочные бутоны культивировали на среде БДС (Dunstan, Short, 1977) с 30 г/л сахарозы, дополненную 2 мг/л НУК, 4 мг/л БАП, 0,5 мг/л гидролизата казеина, с добавлением 5 г/л агар-геля (pH=5,8). По десять бутонов были посажены в каждую банку. Бутоны культивировали в ростовой комнате на стеллажах с люминесцентными лампами (16/8 часов) с освещенностью 2,5 тыс. люкс при 25°C до прорастания эмбриоидов. Подсчитывали процент гиногенных эмбриоидов и выживших растений.

Каждые 14 суток бутоны переносили на свежую питательную среду. Бутон с проросшим эмбриоидом пересаживали в отдельные стеклянные банки и культивировали до образования корней. Полученные растения переносили в горшки с торфом и накрывали пластиковыми стаканами с отверстиями для газообмена.

Самый простой и эффективный тип эксплантов для получения гаплоидов лука – цветочные бутоны (Bohanec, 2002). Размер бутонов был определен экспериментально, и составил 3-5 мм. Это соответствует IV стадии развития – зародышевые мешки бутонов являются незрелыми и завершение формирования женского гаметофита происходит *in vitro* (Musial et al., 2005). Зрелые зародышевые мешки содержат несколько гаплоидных клеток, способных в дальнейшем сформировать гаплоидные эмбриониды – это яйцеклетка, синергиды и антиподы. В большинстве случаев по пути спорофитного развития идёт именно яйцеклетка (гаплоидный партеногенез). Она может развиваться в гаплоидное растение, избегая фазу промежуточного каллусообразования (Jakse, Bohanec, 2003; Murovec, Bohanec, 2012).

Для развития эмбрионидов и снижения уровня возможной витрификации предпочтительнее использовать питательную среду БДС с 30 г/л сахарозы (Bohanec, 2002). Цветочные бутоны, высаженные на питательную среду БДС, начинали раскрываться через 4-5 сутки культивирования, затем набухали в два-три раза от их первоначального размера. Поскольку не наблюдалось растрескивания пыльников из-за высокой влажности, то предполагалось, что самоопыление не происходит.

Первые эмбриониды появились через 50 суток, а на 70 суток – регенеранты с развитой корневой системой. Выход гиногенных эмбрионидов составил 1,44%, укоренившихся растений – 0,5%. В дальнейшем выращенные растения будут оцениваться по уровню пloidности методом проточной цитометрии, а затем использоваться для получения удвоенных гаплоидов шнитт-лука для создания гомозиготных родительских линий.

В результате проведённой работы была оценена способность к гиногенезу генотипов растений шнитт-лука из коллекции ФГБНУ ФНЦО, что позволяет использовать этот метод в селекционных программах. Основным ограничением гиногенеза на луке является низкий процент образования эмбрионидов и выживаемости растений, а также высокий уровень бактериального и грибкового загрязнения, наблюдаемый во время введения в культуру.

Список литературы:

1. Ahmed Mahmood Ibrahim, Fatimah Binti Kayat, Dwi Susanto, Pedram Kashiani and Mohammed Arifullah. 2016. Haploid induction in spring onion (*Allium fistulosum* L.) via gynogenesis. Biotechnology. 15: 10-16. DOI: 10.3923/biotech.2016.10.16
2. Bohanec B. Doubled-haploid onions 2002. H.D. Rabinowitch, L. Currah (eds.). *Allium* crop science: Recent advances. CABI, Wallingford, UK. 7: 145-157. DOI 10.1079/9780851995106.0145
3. Champion B., Alloni C. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. 1990. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 20:1-6.
4. Champion B., Azzimonti M.T. Evolution of ploidy level in haploid plants of onion (*Allium cepa*) obtained through *in vitro* gynogenesis. 1988. 4th EUCARPIA *Allium* Symposium, Wellesbourne, UK, September 6-9, 1988. 85-89.
5. Dunstan D.I., Short K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. 1977. Physiol. Plant., 41: 70-72.
6. Guha S., Johri B.M. *In vitro* development of ovary and ovule of *Allium cepa* L. 1966. Phytomorphology. 16:353-364.
7. Jakse M., Bohanec B. Haploid induction in onion via gynogenesis. 2003. Doubled haploid production in crop plants: a manual. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.) Kluwer, Dordrecht. 281-285. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4_41
8. Keller E R J, Korzun L. Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species 1996. *In vitro* Haploid Production in Higher Plants. Jain S M, Sopory S K, Veilleux R E (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. 3:51-75.

9. Musial K., Bohanec B., Przywara L. The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sacs in vitro and gynogenesis induction in relation to flower size. 2005. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 41: 446-452.

10. Murovec J., Bohanec B. Haploids and Doubled haploids in plant breeding 2012. Plant Breeding. Abdurakhmonov I.Y. (Ed.). 87-106. DOI: 10.5772/29982

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.043

АКТИВНОСТЬ КАСПАЗО-ПОДОБНОЙ ПРОТЕАЗЫ В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ (*PETUNIA HYBRIDA* L.)

Соболев Д.С.¹, Фатеев А.Д.¹, Захарова Е.В.²

1 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет МСХА им.

К.А. Тимирязева, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49, E-mail: info@rgau-msha.ru

2 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская 42, E-mail: iab@iab.ac.ru

Изучение механизмов взаимодействия мужского гаметофита со спорофитными тканями пестика является одним из аспектов современной биологии. Межклеточные взаимодействия в системе пыльца-пестик определяют в значительной степени возможность взаимоассимиляции гамет при совместимом опылении или ее невозможность при наличии генетически детерминированных барьеров оплодотворения, что имеет как теоретическое значение (межклеточные взаимодействия как общебиологическая проблема), так и практическое (объем и качество урожая).

Взаимодействие начинается с попадания пыльцы на рыльце, продолжается во время роста пыльцевых трубок по проводниковому тракту (межклеточное пространство проводниковых тканей или открытый канал столбика) и завершается слиянием гамет в завязи. В этот сложный процесс вовлечено множество взаимодействий, включая клеточное узнавание, вне- и внутриклеточную сигнализацию и другие, пока неидентифицированные, факторы. Следовательно, взаимодействия в системе пыльца-пестик в прогамной фазе оплодотворения происходят между гаплоидным мужским гаметофитом, с одной стороны, и спорофитом, который образует диплоидные женские ткани пестика (рыльца, столбика, завязи), с другой стороны. У петунии S-ген контролирует рост пыльцевых трубок в тканях рыльца и столбика. Несовместимые пыльцевые трубки прорастают на поверхности рыльца, входят в ткани столбика и спустя 8-10 часов после опыления их рост тормозится, тогда как совместимые пыльцевые трубки продолжают расти и, в конце концов, достигают семязпочки через 24 часа.

Недавно было установлено, что у петунии (*Petunia hybrida* L.) фактором S-РНКазной самонесовместимости (СН) является программируемая клеточная гибель (ПКГ) (Kovaleva et al., 2020).

Целью данной работы являлось выявление активности каспазо-подобных протеаз в прогамной фазе оплодотворения и их участие в СН-индуцированной ПКГ у петунии.

Для определения каспазо-подобной активности в системе пыльца-пестик мы использовали флуорогенный субстрат каспазы Ac-DEVD-AMC. Активация каспазо-подобной активности в системе пыльца-пестик петунии варьировала в зависимости от типа опыления. В случае перекрестно-совместимого опыления мы наблюдали равномерно низкий уровень каспазной активности в тканях пестика, сопровождающийся направленным ростом совместимых пыльцевых трубок в течение 24 ч.

Напротив, характер активности DEVDазы при самонесовместимом опылении был абсолютно другим. Прорастание самонесовместимых пыльцевых трубок и их рост в тканях

рыльца и столбика в течение 2 ч сопровождалось резким повышением активности DEVДазы. В этот период ее активность в системе пыльца–пестик возросла почти в восемь раз по сравнению с совместимым опылением.

Таким образом, наши результаты показали, что рост самонесовместимых пыльцевых трубок *in vivo*, в тканях пестика, в первые 4 ч сопровождался высокой каспазо-3-подобной активностью. Весь комплекс проведенных исследований доказал, что каспазо-3-подобная протеаза участвует в СН-индуцированной ПКГ у петунии (*P. hybrida* L.).

Список литературы:

1. Kovaleva L.V., Zakharova E.V., Timofeeva G.V. et al. (2020) Aminoxyacetic acid (AOA), inhibitor of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthesis, suppresses selfincompatibility-induced programmed cell death in self-incompatible *Petunia hybrida* L. pollen tubes. – Protoplasma. – 257:213–227.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.044

УРОВЕНЬ СТЕРОИДНЫХ И ГИПОФИЗАРНЫХ ГОРМОНОВ В ЖИДКОСТИ ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ *BOS TAURUS*

Станиславович Т.И., Кузьмина Т.И.

***Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения
сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства -
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ВНИИГРЖ), Санкт-Петербург-Пушкин 196601,
Московское шоссе, д. 55а.
E-mail: illfor@mail.ru***

Клеточные репродуктивные технологии в животноводстве (созревание ооцитов *in vitro*, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), получение эмбрионов для целей эмбриотрансплантации, клонирование и т.д.) разработаны благодаря фундаментальным исследованиям сопряженных процессов оогенеза и фолликулогенеза. Для успешного применения этих методов необходимо наличие высококачественных донорских ооцитов, выделенных из овариальных фолликулов. Оценка ооцитов из антральных фолликулов по морфологическим признакам (число слоев кумулюсных клеток, ширина зоны пеллюцида, зернистость ооплазмы) зависит от профессиональных качеств эмбриотехнолога и не является оптимальным критерием. Актуальным вопросом на сегодняшний день остается разработка неинвазивных методик определения качества исходной популяции яйцеклеток, полученных от животных-доноров, к последующему созреванию и оплодотворению *in vitro*. Жидкость овариальных фолликулов обеспечивает микроокружение для роста и развития гамет [2]. Значимую роль в созревании яйцеклеток коров *in vivo* играет гормональный состав фолликулярной жидкости, которая различается по функциональному статусу в зависимости от стадии роста, содержащихся в ней ооцитов (растущие [BCV⁻] и завершившие фазу роста [BCV⁺]). BCB-диагностика основана на отличиях в ответной реакции растущих или завершивших фазу роста ооцитов, выделенных из фолликулов яичников, и обработанных витальным красителем бриллиантовым кристаллическим голубым (BCV – brilliant cresyl blue). Ооциты, завершившие фазу роста, наиболее компетентны к созреванию и оплодотворению *in vitro*, чем растущие, так как следующим этапом их формирования является мейотическое созревание. Исследование гормонального статуса овариальных фолликулов с учетом функционального статуса развивающегося в нем ооцита может способствовать лучшему пониманию механизмов дифференцировки фолликулов [1]. Цель исследования - оценить гормональный статус [концентрация стероидных (эстрадиол, тестостерон) и гипофизарных гормонов (фолликулостимулирующий, пролактин)] в овариальных фолликулах коров, содержащих

растущие [BCV⁻] или завершившие фазу роста [BCV⁺] ооциты. Методика. Для экспериментов использовали постмортальные яичники коров на стадии фолликулярного роста, полученные на мясокомбинате. Яичники доставляли в лабораторию в термосе в стерильном физиологическом растворе при температуре 32-35⁰С. Жидкость из каждого фолликула (Ø 6-8 мм) получали путем аспирации и помещали в 96-луночные плата до проведения ВСВ-диагностики. Выделенный из аспирата ооцит-кумуляный комплекс отмывали в растворе Дюльбекко с 0,4 % бычьего сывороточного альбумина, инкубировали 90 минут в 26 мкМ растворе ВСВ в Дюльбекко. ВСВ-диагностика проводилась при температуре 38,5⁰С, в атмосфере 5 % CO₂, 90 % влажности. После этого ооцит-кумуляные комплексы трижды отмывали в растворе Дюльбекко. Ранжирование образцов аспирата фолликулярной жидкости проводили в соответствии с функциональным статусом находившегося в нем ооцита, разделяя на ооциты с синей окраской ооплазмы – завершившие фазу роста [BCV⁺] и неокрашенные – растущие [BCV⁻]. Аспираты фолликулов, содержащих растущие [345 ВСВ⁻] или завершившие [582 ВСВ⁺] фазу роста ооциты центрифугировали при 2000 g в течении 10 минут, сохраняя супернатант при - 80⁰С до определения гормонального статуса фолликулярной жидкости. Иммуноферментный анализ полученных образцов осуществлялся с использованием фотометра Stat Fax 2100 и набора реагентов производства фирмы «Хема», Россия. Обработка результатов проводилась с помощью пакета статистической программы Sigma Stat («Jandel Scientific Software», США). Существование статистически значимых различий между исследуемыми группами проанализировано при помощи t-критерия Стьюдента. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: P<0,05; P<0,01; P<0,001. Все использованные, за исключением выше обозначенных, реагенты производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США), пластик - «BD Falcon™» (Нидерланды). Результаты исследований. В результате исследования не установлено достоверных различий в уровне эстрадиола в жидкости овариальных фолликулов коров, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты (6,56 ± 0,13 нг/мл против 7,43 ± 0,18 нг/мл). Содержание тестостерона в фолликулярной жидкости яичников коров, содержащих завершившие фазу роста ооциты значительно превышало таковое в жидкости фолликулов с растущими ооцитами (12,43 ± 0,73 нг/мл против 8,01 ± 1,41 нг/мл, P<0,01). Концентрация пролактина в фолликулярной жидкости с завершившими фазу роста ооцитами была достоверно ниже, чем в жидкости, содержащей растущие ооциты (4,3±0,17 нг/мл против 6,2 ± 0,25 нг/мл, P<0,05). Такая же тенденция установлена при определении концентрации фолликулостимулирующего гормона. А именно, уровень фолликулостимулирующего гормона в жидкости фолликулов, содержащих растущие ооциты, превышал аналогичный показатель в жидкости фолликулов с ооцитами, достигшими стадии роста (9,4 ± 0,81 нг/мл против 5,3 ± 0,64 нг/мл, P<0,01). Выводы. Полученные данные позволяют предложить использование уровня содержания гипофизарных (пролактин и фолликулостимулирующий гормон) и стероидных (эстрадиол и тестостерон) гормонов в фолликулярной жидкости как превентивную диагностику качества ооцитов *Bos Taurus*.

Работа выполнена в соответствии с темой Министерства образования Российской Федерации, номер государственной регистрации – АААА-А18-118021590132-9.

Список литературы:

1. Costa L., Mendes M., Ferriani R. et al. Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004. 37(11):1747-55. DOI 10.1590/S0100-879X2004001100021
2. Macaulay A.D., Gilbert I., Scantland S. et al. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation. *Biol. Reprod.* 2016. 94(1):16. DOI: 10.1095/biolreprod.114.127571

ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДОНОРСКИХ ООЦИТОВ *BOS TAURUS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМАТатарская Д.Н.¹, Кузьмина Т.И.²*1 – Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина, Санкт-Петербург, г. Пушкин, 196605**2 – Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста (ВНИИГРЖ), Санкт-Петербург-Пушкин, 196601
E-mail: prof.kouzmina@mail.ru*

Несмотря на несомненные успехи инновационных эмбриотехнологий (получение клонированных, трансгенных животных для создания особей согласно задачам селекционеров) в животноводстве, ветеринарии, биомедицине отдельные их этапы требуют дальнейшего совершенствования. Прежде всего, оценка качества исходной популяции донорских ооцитов и состав сред для экстракорпорального созревания. Низкая эффективность морфологической оценки ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), обеспечивающая выход эмбрионов на завершающей стадии доимплантационного развития лишь до 40%, вызвала необходимость разработки информативных метаболических тестов, одним из которых является ВСВ-тест, позволяющий оценивать функциональный статус ооцитов (растущие – ВСВ⁻ или завершившие фазу роста – ВСВ⁺ ооциты). Потенции к развитию эмбрионов из ВСВ⁻ ооцитов значительно ниже, чем ВСВ⁺. Учитывая тот факт, что способность к завершению мейотического созревания ооцит приобретает лишь после завершения стадии роста, сформулирована гипотеза, согласно которой пролонгирование времени культивирования гамет создаст возможность ВСВ⁻ ооцитам завершить фазу роста и приступить к созреванию. В последнее десятилетие активизировались исследования, связанные с возможностью введения в среды культивирования клеток наночастиц различных химических элементов. Одним из таких веществ является кремний. Кремний – структурный антиоксидант, блокирующий процессы перекисного и ферментативного окисления липидов. Высокодисперсный кремнезем (ВДК) – аморфная форма диоксида кремния с размером частиц от 4 до 40 нм. Ранее было показано, что наночастицы, обладающие квантовыми точками размером от 3 до 9 нм, способны тормозить образования продуктов окисления белков и ингибировать образование агрегатных белковых структур, ультрамалые частицы кремнезёма обладают антиоксидантным и антиагрегационным эффектами за счёт чего происходит сохранение функций клеточных компартментов, в том числе функций ядерного аппарата [1]. Наночастицы (н) ВДК не оказывают генотоксического действия и способны инициировать антистрессовый ответ клеток через активацию белков репарации ДНК [2]. С учетом выявленных нами ранее положительных эффектов нВДК на нативные и девитрифицированные клетки овариальных фолликулов коров [3], и результатов выше перечисленных работ других авторов, целью настоящего исследования явилась оценка показателей оплодотворяемости ооцитов коров, завершивших фазу роста *in vivo* или *in vitro*, при созревании в средах с нВДК.

ОКК выделяли из антральных фолликулов (Ø=3-8 мм) яичников коров и половозрелых телок черно-пестрой породы *postmortem*. После извлечения ОКК подвергали ВСВ-тесту. Для чего помещали в 26 µМ ВСВ (бриллиантовый кристаллический голубой), растворенный в фосфатно-солевом буфере с 0,4 % бычьим сывороточным альбумином (А-7888, Sigma) на 90 минут при температуре 38,5°C в атмосфере 5% CO₂, 90% влажности. Ранжирование ооцитов после инкубации с ВСВ проводили в соответствии с окраской

ооплазмы – ооплазма завершивших фазу роста ооцитов оставалась окрашенной, а растущих – теряла окраску. ОКК культивировали в среде ТС-199 с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 50 нг/мл пролактина совместно с 1×10^6 клеток гранулезы на мл среды. Дизайн экспериментов модифицировали путем пролонгации времени культивирования ооцитов до 30 часов и введением в опытные среды для созревания ооцитов и культивирования эмбрионов 0,001% нВДК (Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко, Украина). В выборе концентраций руководствовались рекомендациями разработчиков [4]. Все использованные в исследовании реагенты производства фирмы Sigma-Aldrich. Режимы и протоколы культивирования ооцитов/эмбрионов и оплодотворения представлены в методических рекомендациях, разработанных в лаборатории биологии развития ВНИИГРЖ [5]. Для сравнения результатов использовали критерии χ^2 (статистическая программа Sigma Stat). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$.

Доля ооцитов, не завершивших фазу роста *in vivo*, и достигших стадии метафазы-II в среде с нВДК через 24 часа культивирования составила 48%, а в среде лишенной наночастиц – 39 %. Введение в среду культивирования ОКК нВДК обеспечивало значительный рост созревших ооцитов в экспериментальной группе при пролонгировании культивирования до 30 часов (65% против 51%, $P < 0,05$). Анализ показателей оплодотворяемости выявил значительные различия в уровне эмбрионов на стадии бластоцисты, развившихся из ооцитов, не завершивших фазу роста, обработанных и необработанных нВДК при пролонгировании культивирования до 30 часов (23% против 12%, $P < 0,05$). Полученные данные позволяют рекомендовать оптимизацию системы созревания донорских ооцитов, не завершивших фазу роста *in vivo*, путем введения в среду созревания 0,001% нВДК и пролонгацией времени культивирования до 30 часов, что обеспечит повышение эффективности технологии получения эмбрионов от элитных животных за счет приобретения такими ооцитами (ранее считавшимися, как некомпетентными к завершению ядерно-цитоплазматического созревания *in vitro*) способности к дальнейшему созреванию и оплодотворению.

Работа выполнена в рамках проекта #18-016-00147А, финансируемого РФФИ.

Список литературы:

1. Shin W.S., Di J., Cao Q., Li B., Seidler P.M., Murray K.A. Amyloid β -protein oligomers promote the uptake of tau fibril seeds potentiating intracellular tau aggregation. *Alzheimers Research and Therapy*. 2019; 11(1): 86. DOI: 10.1186/s13195-019-0541-9.
2. Yang Y., Du X., Wang Q., Liu J. Mechanism of cell death induced by silica nanoparticles in hepatocyte cells is by apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine*. 2019; 44(3): 903-912 DOI: 10.3892/ijmm.2019.4265.
3. Кузьмина Т.И., Станиславович Т.И., Молчанов А.В. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на показатели криорезистентности девитрифицированных ооцит-кумулясных комплексов *Bos Taurus*. *Аграрный научный журнал*. 2019. № 3:29-34. DOI:<http://agrojr.ru/index.php/asj/article/view/734/598> 0.42
4. Галаган Н.П., Клименко Н.Ю., Орел И.Л., Новикова Е.А. Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот. *Biopolymers and Cell*. 2010. 26(3): 205-213. DOI 10.7124/bc.000158
5. Кузьмина Т. И., Багиров В. А., Егиазарян А. В., Альм Х., Торнер Х. Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* (методические рекомендации) Санкт-Петербург-Пушкин. – 2009. - 44 С.

ВЛИЯНИЕ АМИНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ (АОА), ИНГИБИТОРА СИНТЕЗА АЦК (ЭТИЛЕНА), НА РОСТ *IN VIVO* НЕСОВМЕСТИМЫХ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК *PETUNIA HYBRIDA* L.

Фатеев А.Д.¹, Зинкевич В.В.¹, Захарова Е.В.^{1,2,3}, Ковалева Л.В.³

1 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет МСХА им.

К.А.Тимирязева, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49, E-mail: info@rgau-msha.ru

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

г. Москва, ул. Тимирязевская 42, E-mail: iab@iab.ac.ru

3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, г. Москва, Ботаническая, 35, E-mail:

ifr@ippras.ru

Самонесовместимость (СН) – генетически управляемый универсальный механизм, посредством которого пестик и отвергает свою (несовместимую) и принимает чужую (совместимую) пыльцу. СН встречается у представителей более 70 семейств растений. Для петунии (сем. Пасленовых) характерна СН *Solanaceae*-типа, механизм которой регулируется высоко полиморфным *S*-локусом с множественными гаплотипами. Если пыльца *S*-гаплотипа совпадает с *S*-гаплотипом пестика, пыльца признается “своей”, и рост пыльцевой трубки (ПТ) в столбике прекращается. В механизм СН *Solanaceae*-типа включены два тесно связанных гена на *S*-локусе: (1) ген *S-PHKазы*, контролирующий *S*-специфичность пестика, и (2) ген *S*-локус *F-box* (*SLF* или *SFB*), контролирующий *S*-специфичность пыльцы. Установлено, что в семействах *Solanaceae*, *Rosaceae* и *Plantaginaceae* СН *S-PHKазного* типа, т.е. собственная пыльца отторгается экспрессируемой пестиком *S-PHKазой*, которая проявляет цитотоксичность внутри ПТ. Однако полностью механизм этого, наиболее сложного, типа СН до конца не установлен.

К настоящему времени убедительно доказано, что фитогормоны активно включаются в процессы репродукции у высших растений, в том числе в прогамную фазу оплодотворения, связанную с прорастанием и ростом ПТ (Kovaleva, Zakharova, 2003).

Впервые влияние этилена на рост растений обнаружил Д. Нелюбов в 1901 году, а Р. Гейн в 1934 г. доказал, что сами растения способны его синтезировать. Цикл биосинтеза этилена начинается с превращения аминокислоты метионина в *S*-аденозил-метионин (SAMe), который превращается в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК), активность которой лимитирует скорость цикла, поэтому ее регуляция является ключевой в регуляции биосинтеза этилена.

Результаты исследований, проведенных за последние двадцать лет, дали основание полагать, что индуцированное опылением образование и выделение этилена тканями пестика является фактором, необходимым для прорастания и роста ПТ и успешного оплодотворения.

Цель исследования заключается в изучении участия фитогормона этилена в регуляции роста и ингибирования самонесовместимых ПТ петунии *in vivo*.

Для экспериментов были использованы клонально размноженные растения петунии (*P. hybrida* L.) двух клонов (самонесовместимого и самосовместимого) из лабораторной коллекции. Объекты исследований – растущие *in vivo* ПТ.

Накануне запланированных опытов собирали пыльцу с растений самонесовместимой линии и кастрировали неопыленные цветы. На следующий день обрабатывали пестики кастрированных цветов раствором АОА (ингибитор предшественника этилена АЦК). С этой целью на рыльце пестика пипеткой наносили 5 мкл

раствора ингибитора и закрывали изолятором. Опыление проводили через 2 или 6 ч после обработки. Сбор и фиксацию материала (опыленные пестики) проводили через 2, 4, 6 и 24 ч.

Визуализацию роста ПТ *in vivo* в тканях пестика проводили с использованием флуоресцентного красителя анилинового голубого. В качестве фиксатора использовали спирт и ледяную уксусную кислоту в соотношении 3:1.

В контрольных вариантах опытов (без обработки АОА) в течение 24 ч после самонесовместимого опыления длина ПТ составляла 7891 ± 406 мкм (27% длины пестика), в то время как после совместимого опыления их длина составляла 15876 ± 188 мкм (58% длины пестика).

Результаты показали, что предварительная обработка рылец за 2 ч до опыления АОА стимулировала рост несовместимых ПТ, при этом их длина достигала 12168 ± 178 мкм (44,4% длины пестика), в то время как после обработки за 6 ч до опыления эта величина достигала 24609 ± 183 мкм (89,3 % длины пестика). В последнем случае ПТ почти достигали завязи.

Таким образом, результаты данной работы свидетельствуют в пользу представлений о том, что этилен контролирует рост и ингибирование самонесовместимых ПТ петунии, участвуя в процессе функционирования механизма СН в спорофитных тканях пестика.

Список литературы:

1. Kovaleva L., Zakharova E. Hormonal status of the pollen-pistil system at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* L. Sex Plant Reprod. 2003.– 16. – P. 191–196. <https://doi.org/10.1007/s00497-003-0189-1>.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.047

ОЦЕНКА КОМПЕТЕНТНОСТИ К ЭМБРИОНАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ ООЦИТОВ *BOS TAURUS* ПОСЛЕ ИНТРА- ИЛИ ЭКСТРА-ОВАРИАЛЬНОЙ ВИТРИФИКАЦИИ

Чистякова И.В., Кузьмина Т.И.

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста (ВНИИГРЖ), Санкт-Петербург-Пушкин, 196601
E-mail: itjarena7@gmail.com*

Криоконсервация репродуктивных клеток животных является одним из основных методов сохранения генетического материала высокоценных пород и исчезающих видов. Однако, успехи в данной области остаются достаточно скромными, что, прежде всего, связано с несовершенством технологий замораживания, в частности протоколов витрификации. Как известно, при экстра-овариальной витрификации женских гамет, где в основном используются открытые системы замораживания (криодевайсы), насыщение клеток криопротекторами достигается за короткие сроки при сравнительно коротком времени экспозиции в витрифицирующих растворах, что является бесспорным преимуществом относительно закрытой интра-овариальной (внутрифолликулярной) системы, в случае которой время экспозиции значительно возрастает. Тем не менее, при использовании открытого способа замораживания существует риск инвазирования биологического образца, что впоследствии может повлиять на компетентность ооцита к эмбриональному развитию [0]. Таким образом, создание универсальной эффективной модели витрификации, обеспечивающей полноценное функционирование созревающей гаметы является одной из основных задач, стоящих перед репродуктологами и криобиологами.

Цель исследования – оценить компетентность к эмбриональному развитию ооцитов *Bos taurus*, подвергшихся экстра- или интра-овариальной витрификации.

Материалом для исследований служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК), выделенные из антральных фолликулов яичников коров, половозрелых телок чернопестрой породы *postmortem*. ОКК для витрификации аспирировали из фолликулов диаметром от 3 до 8 мм. Для витрификации использовались ооциты с гомогенной цитоплазмой, окружённые 5- и более слоями кумулюсных клеток. Ооциты, предназначенные для экстраовариальной витрификации, обрабатывались тремя растворами криопротекторов (КПА), приготовленными на основе среды Т-199 с добавлением 10% ФБС (HyClone, Logan, UT): КПА-1-0.7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоля (ЭГ); КПА-2-1.4 М ДМСО + 1.8 М ЭГ; КПА-3- 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалозы. ОКК поэтапно экспонировали в течение 30 сек в КПА-1, затем 30 сек в КПА-2 и 20 сек в КПА-3. При интраовариальной витрификации препарированные яичники животных делили на 6-8 секций (15 мм × 20 мм), помещали в стерильные марлевые мешочки и опускали поэтапно в растворы КПА, приготовленные на основе фосфатного буферного раствора Дюльбекко (ФБР) с добавлением 20% ФБС: КПА-1 - 7,5% ЭГ + 7,5% ДМСО (25 мин), затем в КПА-2 – 15% ЭГ, 15% ДМСО и 0,5 М сахарозы (15 минут). В растворы КПА и среды для размораживания дополнительно вносили по 0,001% наночастицы высокодисперсного кремнезёма (нВДК, ИХП им. А.А. Чуйко НАН Украины). При выборе концентрации основывались на данных, представленных разработчиками [2]. Пайеты с ооцитами и стерильные марлевые мешочки с фрагментами яичников погружали в сосуды Дьюара с жидким азотом (– 196°C). Витрифицированные ооциты и мешочки с фрагментами находились в жидком азоте не менее 24 часов. ОКК извлекали из пайет после оттаивания и помещали в 0,25 М раствор трегалозы на основе среды Т-199 с добавлением 10% ФБС при 37°C, отмывали последовательно в 0,19 М и затем 0,125 М трегалозе. Аспирированные ооциты из фрагментов, после оттаивания последовательно обрабатывали 0,5 М и 0,25 М растворами трегалозы, приготовленными на основе ФБР с 20%-ым содержанием ФБС. Финальную отмывку всех ОКК проводили в среде Т-199 с добавлением 10% ФБС. Нативные и девитрифицированные ОКК культивировали при температуре 38,5°C, в атмосфере с 5%-ым содержанием CO₂ в течение 24 часов в среде следующего состава: среда Т-199 + 10% ФБС + 10⁶ клеток/мл гранулезы + 50 нг/мл бычьего пролактина + 0.001% нВДК. Режимы оплодотворения ооцитов и культивирования эмбрионов коров, методика цитологического анализа хроматина ооцитов и эмбрионов представлены в работах, опубликованных нами ранее [4, 5]. Все реагенты, использованные при выполнении экспериментов, за исключением обозначенных в тексте, производства компании Sigma-Aldrich (США). Для сравнения результатов использовали t-критерий Стьюдента и χ^2 Пирсона (статистическая программа SigmaStat). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P<0,05$; $P<0,01$; $P<0,001$.

При культивировании экспериментальных и контрольной групп ооцитов было показано, что доля раздробившихся клеток, не подвергшихся заморозке, составила 70%, при экстра-овариальной витрификации – 52%, при интра-овариальной только 32% ($P<0.001$). Достоверных различий в выходе эмбрионов на ранних стадиях развития между опытными группами выявлено не было. Однако, выход доимплантационных эмбрионов на стадиях поздней морулы-бластоцисты из девитрифицированных ооцитов обеих групп всё же остаётся достоверно ниже, чем из нативных клеток (11 % и 6 % против 36 %, $P<0.01$).

Показана возможность получения доимплантационных эмбрионов из ооцитов, витрифицированных экстра- или интра-овариально. Преимущество вне-фолликулярной витрификации состоит прежде всего в том, что при обработке криопротекторами ооциты насыщаются ими гораздо быстрее, и следовательно, криповреждения в клетках выражены в меньшей степени по сравнению с ооцитами, подвергшимися интра-фолликулярной витрификации. В целом экстра-овариальная витрификация более эффективна, чем интра-овариальная. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобразования (Госзадание №АААА-А18-118021590132-9).

Список литературы:

1. Makarevich A., Foldesiova M., Olexikova L., Kubovicova E., Chrenek P. Possibilities of cattle ovarian tissue conservation: a mini-review // Slovak J. Anim. Sci. 2017. 50 (3): 128-133. ISSN 1337-9984
2. Галаган Н.П., Клименко Н.Ю., Орел И.Л., Новикова Е.А. Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот. Biopolymers and Cell. 2010. 26(3): 205-213. DOI 10.7124/bc.000158
3. Chistyakova I.V., Kuzmina T.I., Stanislavovich T.I., Kovtun S.V. Effects of *highly dispersed silica nanoparticles* on the cryoresistance of the bovine cumulus-oocyte complexes. Abstract Book of the 55th Annual meeting of the society for cryobiology. 2018 July 10-13; Madrid: Cryobiology: 90. DOI 10.1016/j.cryobiol.2018.10.215
4. Heleil B., Kuzmina T., Novikova N., Torner H., Alm H. Effect of prolactin on developmental competence of bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. Journal of Reproduction and Infertility. 2010. № 1. С. 01-07.
5. Кузьмина Т.И., Шейко И.П., Ганджа А.И., Брюсов К.П. Развитие доимплантационных эмбрионов *Bos Taurus* и *Sus Scrofa Domesticus*, полученных из девитрифицированных ооцитов. Генетика и разведение животных. 2014. № 4. с. 15-19.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.048

ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ *MEDICAGO DAGHESTANICA* RUPR.

Ширнина И.В.¹, Ширнин С.Ю.²

**1 – ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Ботаническая ул. 4,
Москва, 127276**

**2 – Курчатовский геномный центр — ВНИИСБ, ул. Тимирязевская 42, Москва, Россия,
127550**

Культивирование *in vitro* может дать значительные преимущества для быстрого размножения находящихся под угрозой исчезновения видов растений, которые имеют ограниченную репродуктивную способность и существуют в местообитаниях, находящихся на грани уничтожения [1].

Medicago daghestanica Rupr. – зимостойкое многолетнее травянистое растение. Эндемик Кавказа. Занесен в Красную книгу Дагестана, статус редкости – 3. Произрастает на известковых осыпях и скалах в среднем горном поясе. Может использоваться в условиях гор в качестве пастбища. Представляет большой интерес с точки зрения эволюции рода *Medicago* [2].

Цель настоящего исследования – разработать методику клонального микроразмножения и длительного сохранения *M. daghestanica* в культуре *in vitro*. В качестве исходного материала *M. daghestanica* использовали семена, полученные из состава коллекционных фондов ботанических садов и дендрариев.

При стерилизации семян использовали раствор фунгицида системного действия «Фундазол» в концентрации 2%, 70%-ый этанол. В качестве основного стерилизатора – 7 %-ый раствор гипохлорита кальция.

В ходе исследований определены оптимальные режимы стратификации, позволяющие получать жизнеспособные проростки *M. daghestanica* – это теплая стратификация (1-1,5 месяца при температуре 20-25⁰С). Для *M. daghestanica* оптимальной является питательная среда, содержащая ½ MS и 2ip в концентрации 0,5 мг/л. Длительность пассажа составляет 40 суток.

Хранение в условиях минимального роста – один из наиболее эффективных способов поддержания коллекций *in vitro* [3]. При этом основной задачей является

сохранение жизнеспособности эксплантов в сочетании с максимальным увеличением длительности субкультивирования.

В настоящее время разрабатывается методика длительного хранения микропобегов *M. daghestanica*.

В процессе исследований показано, что при длительном культивировании на питательных средах, содержащих от 30 до 120 г/л сахарозы, прослеживается тенденция снижения коэффициента размножения при повышении концентрации сахарозы.

Данная взаимозависимость подтверждается исследованиями других авторов на представителях родов *Actinidia*, *Clematis*, *Cymbidium*, *Rosa*, *Fragaria* [3,4].

Таким образом, разработаны общие рекомендации на этапах введения в культуру *in vitro* исходного материала, собственно микроразмножения, укоренения и депонирования.

Список литературы:

- 1) Molkanova O.I., Egorova D.A., Mitrofanova I.V. Preservation characteristics of valuable plant species in *in vitro* genebanks at russian botanical gardens // In Vitro. Cellular & Developmental Biology. 2018. № 54. P. 546–547.
- 2) Красная книга Республики Дагестан. — Махачкала, 2009.-552с.
- 3) Ветчинкина Е.М., Ширнина И. В., Ширнин С. Ю., Молканова О. И. Сохранение редких видов растений в генетических *in vitro* //Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. 2012.- № 7.- С. 109-118.
- 4) Митрофанова И.В., Видяшвар О.П., Мязина Л.Ф. Регенерация побегов из листовых эксплантов *Actinidia chinensis* Planch. / Проблемы дендрологии, садоводства и цветоводства. Ялта, 1995. – С. 107.

СЕКЦИЯ
«МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ»

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛЛЕЛОФОНДА СОВРЕМЕННЫХ И
ИСТОРИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ЯРОСЛАВСКОЙ И ХОЛМОГОРСКОЙ ПОРОД
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО МИКРОСАТЕЛЛИТАМ**

**Абдельманова А.С.¹, Мишина А.И.¹, Волкова В.В.¹, Доцев А.В.¹, Сермягин А.А.¹,
Чинаров Р.Ю.¹, Боронцовская О.И.², Петрикеева Л.В.², Брем Г.^{1,3}, Зиновьева Н.А.¹**

*1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», 142132
Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: abdelmanova@vij.ru;*

*2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени
К.А.Тимирязева», 127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
e-mail: liskun@rgau-msha.ru;*

*3 – Institut für Tierzucht und Genetik, University of Veterinary Medicine (VMU),
Veterinärplatz, A-1210, Vienna, Austria, e-mail: gottfried.brem@agrobiogen.de*

За многовековую историю в нашей стране были созданы породы крупного рогатого скота, отличающиеся крепким здоровьем и отличными способностями к адаптации. Особый интерес среди них представляют холмогорская и ярославская.

Холмогорская порода, сформировавшаяся в Архангельской губернии в 17-18 вв., прекрасно приспособлена к суровым условиям севера, менее подвержена простудным заболеваниям.

Ярославская порода отличается прекрасными продуктивными качествами. Выведение этой породы в Ярославской губернии в 18-19 вв. способствовало развитию маслодельной и сыродельной промышленности в Центральных регионах Российской империи.

Однако животные этих пород уступают по обильномолочности специализированным коммерческим породам, например, голштинской. Поэтому для улучшения отечественных пород скота в середине XX века активно использовались производители голштинской породы, что могло привести к изменению генетического профиля российских пород [1].

Целью нашей работы являлся анализ генетического разнообразия существующих популяций холмогорской и ярославской пород в сравнительном аспекте с животными этих же пород, обитавшими в начале XX века. В качестве группы сравнения использовались животные голштинской породы.

Материалом для исследований служили образцы ткани и крови современных особей холмогорской (KHLM_M, n = 177), ярославской (YRSL_M, n = 62) и голштинской (HLST_M, n = 158) пород, а также зубы, извлеченные из черепов исторических животных холмогорской (KHLM_H, n = 18) и ярославской (YRSL_H, n = 19) пород, хранящихся в краниологической коллекции Музея животноводства им. Е.Ф. Лискуна РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева.

Геномную ДНК выделяли с использованием колонок Nexttec (Nexttec Biotechnology GmbH, Германия), набора QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen, США) и набора COrDIS «Экстракт» декальцин (ООО «ГОРДИЗ», Россия) в соответствии с инструкциями фирм-производителей.

Генотипирование проводили с использованием 9 высокополиморфных микросателлитных маркеров (TGLA227, BM2113, ETH10, SPS115, TGLA122, INRA23, TGLA126, ETH225, BM1824) по протоколам, принятым в ФНИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста. Статистическую обработку и визуализацию результатов

проводили в программной среде R 3.5.0 [2] с использованием дополнительных пакетов, а также в программах Structure.2.3.4 [3] и SplitsTree 4.14.5 [4].

Анализ главных компонент показал, что современные популяции достаточно консолидированны. Группы KHLМ_М и YRSL_М отделились как от HLST_М, так и друг от друга. Образцы из групп KHLМ_Н и YRSL_Н расположились вблизи кластеров современных одноименных пород. В группах KHLМ_Н и YRSL_Н найдено большее аллельное разнообразие, нежели в современных ($6,09 \pm 0,63$ и $7,03 \pm 0,64$ у KHLМ_Н и YRSL_Н соответственно против $5,67 \pm 0,47$ и $6,14 \pm 0,52$ у KHLМ_М и YRSL_М). Минимальное аллельное разнообразие выявлено в HLST_М ($5,46 \pm 0,47$).

Анализ структуры популяций при $K=2$ показал отличие российских пород от голштинской. При $K=3$ выявлено, что исторические популяции несут генетические компоненты, свойственные как KHLМ_М, так и, в большей степени, YRSL_М. На дендрограмме, построенной с использованием значений F_{st} , все три современные популяции образуют отдельные ветви и достаточно удалены от исторических. Таким образом, в настоящее время еще сохранились стада чистопородных холмогорских и ярославских животных, что дает возможность вести селекционную работу по улучшению продуктивных качеств, сохраняя уникальные аллельные комбинации отечественных пород.

Генотипирование исторических образцов выполнено при поддержке РНФ, проект 19-76-20012. Генотипирование современных образцов проведено в рамках выполнения государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по теме № 0445-2019-0024.

Список литературы:

1. Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Паронян И.А. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных странах. СПб.: Изд-во ВНИИГРЖ. 1994. – 472 с.
2. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. – Vienna, Austria, 2012. [http:// www.Rproject.org](http://www.Rproject.org)
3. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. N. 155. P. 945-959.
4. Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // Mol. Biol. Evol. 2006. N. 23. P. 254-267. DOI: 10.1093/molbev/msj030;

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.050

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОПОЛЯ БЕЛОГО, ТОПОЛЯ БОЛЛЕ И ОСИНЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА ОБЩИХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

Александров О.С.

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

E-mail: olegsandrov@gmail.com

Тополь секции *Populus* (син. *Leuce* Duby) или белые тополя – широко распространённые древесные растения, которые используются как источник древесины и сырья в разных отраслях народного хозяйства, а также являются ценными культурами для озеленения. Во многих странах ведётся селекционная работа по выведению новых быстрорастущих, морозостойких и декоративных сортов тополей данной секции. С научной точки зрения белые тополя интересны как объекты для генетических популяционных исследований.

Тополь белый (*Populus alba* L.) и осина (*P. tremula* L.) способны скрещиваться друг с другом, образуя жизнеспособные гибриды, известные как тополь сереющий (*P. × canescens* (Aiton) Sm.). В молодом возрасте эти гибриды трудноотличимы по морфологическим признакам от материнского вида, что вызывает проблемы при их идентификации. Тополь Болле (*P. bolleana* Lauche) – родственный вид тополя белого, обладающий пирамидальной кроной и также способный к скрещиваниям с ним и с осинкой. В нашей стране такие скрещивания велись для того, чтобы передать признак пирамидальной кроны от теплолюбивого тополя Болле морозостойким сородичам. Два гибридных тополя – тополь советский пирамидальный (*P. × sowietica pyramidalis* Jabl.) и тополь Яблокова (*P. jablokovii* Jabl.) – были получены в 30-х годах XX века академиком А.С. Яблоковым и широко применялись для озеленения улиц Москвы и Подмосковья. Эти гибриды весьма сходны по морфологическим признакам, поэтому их идентификация (а отсюда и корректное размножение в питомниках) часто бывает затруднительной. Перспективным решением данной проблемы является разработка эффективных молекулярных маркеров, позволяющих производить идентификацию данных видов и гибридов.

В настоящее время геномы тополя белого, тополя Болле и осины секвенированы [1-4], что открывает широкие возможности для поиска видоспецифичных маркеров на основе опубликованных геномных данных. В настоящей работе был проведен поиск микросателлитных повторов в геноме тополя Болле с помощью программы Tandem Repeat Finder (TRF). Ряд локусов с найденными микросателлитами тестировался с помощью BLAST в геномах тополя белого и осины. При выявлении протяженных делеций и вставок на консервативные бордерные участки локусов подбирались праймеры с помощью программы Primer3.

Таким образом, для дальнейшей работы были отобраны 12 пар маркеров, с помощью которых производились сравнительные ПЦР исследования образцов тополя белого, тополя Болле, осины и их гибридов. Наиболее перспективными при электрофоретической детекции результатов амплификации оказались маркеры PbSc174, PbSc193 и PbSc309, которые показали различия между аллелями изучаемых видов порядка 17-25 п.о.

Полученные маркеры могут быть полезными инструментами при сравнительном геномном изучении тополей секции *Leuce Duby*, а также могут быть использованы в селекционных программах и популяционно-генетических исследованиях.

Работа выполняется при финансовой поддержке гранта РФФИ договор № 19-04-00744\20 от 31.03.2020 г.

Список литературы:

1. Mader, M.; Le Paslier, M.C.; Bounon, R.; Bérard, A.; Rampant, P.F.; Fladung, M.; Leplé, J.C.; Kersten, B. Whole-genome draft assembly of *Populus tremula* × *P. alba* clone INRA 717-1B4. *Silvae Genet.* **2016**, *65*, 74–79.
2. Lin, Y.C.; Wang, J.; Delhomme, N.; Schiffthaler, B.; Sundström, G.; Zuccolo, A.; Hoenner, M.P. Functional and evolutionary genomic inferences in *Populus* through genome and population sequencing of American and European aspen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E10970–E10978.
3. Ma, T.; Wang, J.; Zhou, G.; Yue, Z.; Hu, Q.; Chen, Y.; Wang, K. Genomic insights into salt adaptation in a desert poplar. *Nat. Commun.* **2019**, *4*, 2797.
4. Liu, Y.J.; Wang, X.R.; Zeng, Q.Y. *De novo* assembly of white poplar genome and genetic diversity of white poplar population in Irtysh River basin in China. *Sci. China Life Sci.* **2019**, *62*(5), 609–618.

**АССОЦИАЦИЯ SNPS RS1449103 И ST2-1 С ПРИЗНАКАМИ ЯЙЦА
КУРИЦЫ-НЕСУШКИ****Баркова О.Ю.**

***Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных,
филиал ФГБНУ Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им.
академика Л.К. Эрнста
E-mail: spbvniigen@mail.ru***

Интенсификация отечественной селекции птицы, направленная на повышение яичной продуктивности, имеет особую актуальность и значимость. Современные технологии молекулярной генетики позволяют обнаружить гены, влияющие на интересующие исследователя признаки. В последнее десятилетие поиск QTL (локусов количественных признаков) при помощи микросателлитов почти заменился методом полногеномного ассоциативного анализа (GWAS). Другой метод поиска QTL основывается на разном уровне экспрессии изучаемых генов, ассоциированных с признаком. Анализ экспрессии в реальном времени тканей яйцевода позволил выявить нуклеотидную последовательность CR523443. Данная нуклеотидная последовательность имела разные уровни экспрессии у кур с тонкой и толстой скорлупой. При секвенировании CR523443 выявлено шесть нуклеотидных замен. ST2-1, ST3-1, ST3-2, ST3-3 и ST6-1. Наибольшая связь с признаком толщина скорлупы наблюдалась у нуклеотидной замены ST2-1 [1]. При помощи полногеномного ассоциативного анализа (GWAS) польскими учеными [2] был выявлен однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs14491030 на хромосоме 4, оказывающий влияние на массу яйца домашней курицы. Ассоциация с генетической изменчивостью массы яйца составила до 38 % ($P < 0,03$). Генотипирование 2900 кур осуществлялось с помощью Illumina 42k Infinium chip SNP чипа. Проведенный нами анализ *in silico* показал, что SNP rs14491030 находится в 14 экзоне гена NCAPG (не -SMC субъединице CAP-G комплекса конденсина I) в позиции 78775527 п.н. Конденсины являются субъединичными белковыми комплексами, основной функцией которых, является компактизация хроматина и разделение хроматид в ходе их митотической сегрегации. [3,4].

Для проведения экспериментов использованы 97 мясо-яичных несушек Род-Айленд (красного оперения) и 133 несушки популяции Аврора, содержащихся на базе ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких и находящихся под угрозой исчезновения пород кур». В работе использовали следующие признаки: масса яйца (в граммах), толщина скорлупы (в мкм.) и упругая деформация (в мкм.). ДНК выделяли из образцов куриной крови при помощи фенольного метода. Куры были генотипированы при помощи амплификатора IQ-5. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа, находящегося в пакетах программы SigmaPlot 9.

При проведении дисперсионного анализа данных для генотипов AG, AA и GG маркера rs14491030 у кур было выявлено достоверное различие для признаков вес яйца $P < 0,001$ и упругой деформации $P = 0,026$. Эффект замещения аллеля А на G составил 7 грамм ($P < 0,05$) для признака вес яйца. и 2.5 мкм ($P < 0,05$) для упругой деформации скорлупы яйца. Для признака упругая деформация яйца эффект замещения аллеля составил менее одной сигмы ($\sigma = 4.7$), следовательно, наблюдается минорный плеiotропный эффект. Эффект гена NCAPG на вес яйца составил порядка одной сигмы ($\sigma = 6.0$).

Статистический анализ несушек породы Род-Айленд показал достоверное различие генотипов признака масса яйца, упругая деформация и толщина скорлупы маркера SNP2_1. Эффект замещения аллелей СТ-СС для признака толщина скорлупы составил 38,3 мкм ($P < 0,001$), замены СС-ТТ 33,4 мкм ($P < 0,001$). Для признака упругая деформация скорлупы эффект замещения аллелей СТ-ТТ составил 5,3 мм ($P < 0,001$), СС -ТТ 4,0 мм ($P < 0,001$).

Эффект замены аллелей для признака масса яйца наблюдался при замене СС-ТТ ($P < 0,001$) и составлял 1 грамм.

При сравнении трех генотипов нуклеотидной замены SNP2_1 получена достоверная ассоциация для упругой деформации ($P < 0,001$) и толщины скорлупы ($P < 0,001$) у кур породы Аврора. Влияния на массу яйца обнаружено не было. Эффект замещения аллелей СТ-ТТ для признака толщина яичной скорлупы ($P < 0,001$) составил 6,4 мкм, СТ-СС ($P < 0,001$) 6,3 мкм. Эффект замещения аллелей СТ-СС для признака упругой деформации составил ($P < 0,002$) 2,7 мм, СТ-ТТ ($P < 0,0001$) 4,8 мм, СТ-СС ($P = 0,006$) 2,0 мм.

Выявленные мажорные QTL могут быть использованы для создания системы молекулярно-генетических маркеров, что позволит создать задел для селекции отечественных высокопродуктивных кроссов птицы.

Список литературы:

1. Barkova O. Yu., Smaragdov M. G. 2013 Analysis of the association of a single nucleotide substitution in the intergenic region of chromosome 4 with signs that determine the quality of a domestic chicken egg. Russian journal of Genetics. 49(7):243. DOI 10.7868/s0016675813070023.
2. Wardecka B, Olszewski R, Jaszczak K. 2003. Preliminary mapping of QTLs affecting egg quality on chromosomes 1–5 in chickens. Czech Journal. Animal. Science. 2003. 48:97.
3. Wolc A, Arango A.J, Settar P. Genome – wide association analysis and genetic architecture of egg weight and egg uniformity in layer chickens. Animal Genetics. 2012. 43:87.
4. D.F. Hudson, S. Ohta, T., Freisinger Molecular and genetic analysis of condensin function in vertebrate cells. Mol Biol. Cell. 2008. 19:3070.
5. Hirano T. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action .Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006. 7:311.

Исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А18-118021590138-1 с использованием популяций кур из биоресурсной коллекции ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, Пушкин).

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.052

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ЦВЕТОВОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦВЕТА МЯСА И ШПИКА ПОМЕСНОГО ПОГОЛОВЬЯ

А.А. Белоус, А.А. Сермягин, О.В. Костюнина, Н.А. Зиновьева

***ФГБНУ Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени
академика Л.К. Эрнста, г.о. Подольск, п. Дубровицы д.60, belousa663@gmail.com***

Проведено полногеномное ассоциативное исследование по цветовым характеристикам мяса и шпика, которые выявили ряд достоверных SNP ($p < 0,00001$). Для L_1 идентифицировано 12 SNP, расположенных на SSC1, 4, 6, 7, 11, 12 и 13 - MARC0004459, ASGA0020028, ASGA0020060, WU_10.2_6_68478534, WU_10.2_7_11825139, WU_10.2_7_30126417, WU_10.2_11_24430461, ALGA0061467, 11_24632221, WU_10.2_12_15501641, WU_10.2_13_15752151 и WU_10.2_13_186390177. Для a_1 выявлено 5 SNP, расположенных на SSC7 (4 SNP) и SSC11 - ALGA0040373, DIAS0000554, ALGA0040529, WU_10.2_7_98872303, H3GA0032581. Для b_1 обнаружено 26 SNP на SCC1 (5 SNP), SCC4 (14 SNP), SCC8, 11, 13, 17 и 18 (3 SNP) - ALGA0004521, MARC0069419, MARC0019057, H3GA0003447, WU_10.2_1_265629502, ASGA0104019, DIAS0004696, ASGA0019102, INRA0013423, WU_10.2_4_30712720, H3GA0012422, ASGA0019122, MARC0016020, ALGA0024354, ALGA0024372, MARC0029339, M1GA0005925, INRA0014618, DIAS0001140, WU_10.2_8_14796575, ASGA0052195, ALGA0073427,

H3GA0047672, ALGA0097014, WU_10.2_18_12035129 и MARC0082296. Аннотация полученных SNP по цвету мяса установила 20 генов, отвечающих за физиологические и молекулярные функции, такие как развитие нервной системы, сперматогенез, клеточную защиту, контроль роста и выживание клеток, транспорт и организацию цитоскелета, эмбриональное развитие, транспорт глюкозы и других сахаров, солей желчных и органических кислот, формирование черепно-лицевой структуры, реакцию на стресс, обмен кальция и свертываемость крови.

По показателю цвета шпика выявлено 28 SNP из них для L₂ - 12 SNP на SSC3 (5 SNP), SSC9 (2 SNP) и SSC16 (5 SNP) - MARC0056315, ASGA0015552, H3GA0010662, WU_10.2_3_122672317, WU_10.2_3_122688220, WU_10.2_9_58629404, WU_10.2_9_58803213, WU_10.2_16_47786015, WU_10.2_16_47803924, ALGA0090674, H3GA0046594 и WU_10.2_16_72189069. Для a₁ идентифицировано 4 SNP на SCC7 - ALGA0038697, WU_10.2_7_12695778, ALGA0038703, H3GA0020002 ($p < 0,00001$). И для b₁ обнаружено 12 SNP на SSC2 (6 SNP), SSC3 (2 SNP), SSC8, 16 (2 SNP) и SSC17 - WU_10.2_2_1111, WU_10.2_2_13489, ASGA0084177, WU_10.2_2_302556, ALGA0111915, WU_10.2_2_162105044, ALGA0019913, ALGA0019916, ALGA0047322, MARC0029288, H3GA0043808, DRGA0016669. Аннотация SNP выявила 27 генов, отвечающих за многие физиологические функции, такие как развитие мозга, нервной системы, иммунитет, сенсорное восприятие запаха, хост-вирусное взаимодействие, транспорт белка, ангиогенез, регуляцию тканей, за регуляцию процесса биосинтеза липидов, клеточную адгезию, связывание нуклеиновых кислот и регуляцию тканей.

Полученные результаты будут применяться в последующих разработках тест-систем и их внедрению в работу Селекционно-гибридных центров.

Исследования проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, регистрационный номер темы Государственного задания №АААА-А19-119052190018-3.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.053

АССОЦИАЦИЯ ГЕНА МИОСТАТИНА С ПРОДУКТИВНЫМИ ПРИЗНАКАМИ БРОЙЛЕРОВ

Ветох А.Н., Герман Н.Ю., Прытков Ю.А.

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Дубровицы
142132. E-mail: anastezuva@mail.ru***

Птицеводство является одной из главных отраслей сельского хозяйства. Основной тенденцией промышленного птицеводства является получение высокопродуктивных особей. Мясная продуктивность сельскохозяйственной птицы обусловлена хорошим метаболизмом и высокой биологической способностью к конверсии корма. Также интерес представляют и молекулярные маркеры, используемые для улучшения продуктивных качеств при селекции. Одним из таких маркерных генов считается ген миостатина (MSTN), отвечающий за биологические и продуктивные качества кур. MSTN напрямую влияет на формирование скелетных мышц у животных.

Целью данного исследования было изучение влияния полиморфизма в гене MSTN (T4842G) на продуктивные качества цыплят-бройлеров кросса РОСС 708 ($n = 58$) и на морфометрические показатели тушек. Нами была изучена динамика живой массы бройлеров по дням, а также измерены и проанализированы пред убойные линейные показатели (длины тела, ножек, киля, обхват, ширина и глубина груди, ширина таза) и послеубойные весовые показатели (масса составных частей тушки птицы и массы внутренних органов). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с

помощью пакета анализа данных (t-test, однофакторный дисперсионный анализ – ANOVA) в Microsoft Excel 2016.

Полиморфизм T → G в гене миостатина определяли методом PCR-RFLP с использованием фермента рестрикции BSEI. Локус MSTN / BSEI был полиморфным у всех бройлеров и содержал в себе два аллеля: T-аллель был обнаружен с частотой 0,87 и G-аллель - 0,13. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) продуцировал три генотипа: GG, TT и GT, частота встречаемости которых составила 6,25%, 81,25% и 12,5% соответственно. Т-тест и ANOVA показали статистически значимое влияние фактора MSTN / BSEI на генотип цыплят и изменчивость их признаков ($p < 0,05$). SNP в кодирующей области был связан с живой массой, массой груди, массой ног, массой мышц груди и массой сердца и с линейными промерами в зависимости от генотипа. Наибольший живой вес был у генотипа GG и составил $2440,00 \pm 114,31$, показатели массы в других генотипах составили: у TT - $2176,92 \pm 31,20$ и у TG – $2007,50 \pm 112,76$. Показатели длина тела ($18,00 \pm 0,82$ см), обхват груди ($32,00 \pm 0,00$ см) и длина ножек без плюсневой кости ($20,00 \pm 0,41$ см) были самыми большими в генотипе GG, тогда как наибольшая глубина груди ($6,36 \pm 0,11$) была у бройлеров с генотипом TT, а ширина грудной клетки ($7,00 \pm 0,82$ см) и таза ($7,17 \pm 0,13$) была наибольшей у птиц с генотипом TG.

В нашем исследовании генотип GG у бройлеров РОСС 708 характеризовался самой высокой скоростью роста и увеличением мышечной массы, что также было отражено в некоторых измерениях и показателях тела цыплят ($p < 0,05$). Это может свидетельствовать о том, что мутация в гене миостатина оказывает влияние на морфометрические показатели и характеристики продуктивности кур в зависимости от генотипа.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации, государственное задание №0445-2019-0024.

Список литературы:

1. Khaerunnisa I., Pramujo M., Arief I.I., Budiman C., Gunawan A., Sumantri J., Sumantri C. Polymorphism of the T4842G Myostatin Gene is Associated with Carcass Characteristics in Indonesian Chickens // International Journal of Poultry Science. 2016. №15. 316-324. DOI: 10.3923/ijps.2016.316.324
2. Loures Cruz F., Saraiva L., Silva G., Nogueira T., Silva A., Faria P. Growth and carcass characteristics of different crosses of broiler chickens reared under an alternative system. // Semina: Ciências Agrárias. 2018. 39(1). 317. DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n1p317.
3. Интернет-ресурс <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/373964>

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.054

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СУБЪЕДИНИЦ ГЛЮТЕНИНОВ У НЕКОТОРЫХ ОБРАЗЦОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ МЕТОДОМ SDS-PAGE

Груздев И.В.^{1,2}, Дудников М.В.¹, Соловьев А.А.^{1,3}

***1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва 127550 E-mail: gruzdev82mtz@mail.ru***

2 – ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550

***3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Главный
ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН»***

Тритикале (*×Triticosecale* Wittm.) – новый ботанический род семейства Мятликовые (Poaceae), сочетающий геномные комплексы пшеницы и ржи. Тритикале находит широкое применение в сельском хозяйстве и перерабатывающей промышленности, как кормовая и зернофуражная культура, а также как сырье для производства спирта. Производство хлеба

из муки тритикале на сегодняшний момент ограничено. Между тем, технологические свойства муки тритикале во многом сходны с технологическими свойствами пшеничной муки и определяются в значительной мере количественными и качественными характеристиками запасных белков зерна (Чернышова и др., 2015; Грабовец, Крохмаль, 2018).

Особое значение среди запасных белков имеют высокомолекулярные глюteniны, синтез которых детерминирован генами, расположенными у гексаплоидной тритикале в локусах *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-R1*. Исследователями показано прямое влияние этих белков на хлебопекарные качества (Payne et al., 1982; Payne et al., 1987). Обширная работа по изучению высокомолекулярных субъединиц глютеинов тритикале проделана французскими и польскими исследователями (Amiour et al.; 2002a, Amiour et al., 2002b; Salmanowicz, Dylewicz, 2007; Salmanowicz, 2010). В России также ведутся работы по изучению полиморфизма высокомолекулярных глютеинов мягкой пшеницы, а также диких пшениц (Климушина и др., 2013; Обухова, Будашкина, 2014), однако тритикале не подвергается интенсивному изучению.

Идентификацию высокомолекулярных субъединиц глютеинов проводили у 36 сортов и линий яровой гексаплоидной тритикале, для которых ранее был определен ряд показателей, косвенно влияющих на хлебопекарные качества, а также произведена пробная выпечка. Среди этих образцов были 4 сорта, включенные в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (Укро, Гребешок, Памяти Мережко, Ярило), 6 сортов зарубежной селекции, из них 2 сорта из Белоруссии (Лана и Ульяна), 2 сорта из Польши (Dublet и Legalo), 1 сорт из Украины (Хлебодар Украинский) и 1 сорт из Швейцарии (Sandro). Большую часть изученных образцов составили 19 линий, полученных в РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Экстракцию и фракционирование высокомолекулярных субъединиц глютеинов проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в соответствии с протоколом, описанным Singh et al. (1991). Композицию высокомолекулярных субъединиц глютеинов тритикале определяли в соответствии их молекулярной массе и относительной подвижности в полиакриламидном геле под действием электрического поля, по сравнению с известными субъединицами глютеинов сорта яровой мягкой пшеницы Chinese Spring: AxN/Bx7+By8/Dx2+Dy12. Номенклатура высокомолекулярных субъединиц глютеинов тритикале приведена в соответствии с Amiour et al. (2002).

По результатам SDS-PAGE среди изученных сортов и линий яровой гексаплоидной тритикале наиболее многочисленную группу составили образцы, у которых не экспрессируется субъединица, характерная для локуса *Glu-A1* (т.н. нуль-аллель). Наиболее часто среди изученных образцов по локусу *Glu-B1* встречаются сочетания субъединиц Bx7+By8, Bx7+By9, Bx7+By18. Самым массовым аллельным состоянием локуса *Glu-R1* было сочетание субъединиц 2r+6,5r, чуть реже встречаются сочетания 1r+4r и 6r+13r.

В ходе исследования установлено, что яровая гексаплоидная тритикале обладает широким разнообразием по составу высокомолекулярных субъединиц глютеинов. Наибольшее аллельное разнообразие выявлено по гену локуса *Glu-1B*, детерминирующему субъединицы у-типа, а также по локусу ржаного генома *Glu-1R*.

В целом следует отметить, что тритикале может и должна в перспективе стать ценным сырьем для хлебопекарной промышленности, однако для этого нужно решить ряд селекционных и технологических задач, в частности, устранить объективное негативное влияние ржаного генома. Не следует также забывать, что тритикале является плацдармом для насыщения генофонда пшеницы новыми сочетаниями высокомолекулярных субъединиц глютеинов, а также других хозяйственно полезных признаков.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации, государственное задание №АААА-А19-119031490067-3.

Список литературы:

1. Грабовец, А.И. Тритикале. Монография. / А.И. Грабовец, А.В. Крохмаль – г. Ростов-на Дону, ООО «Издательство «Юг». – 2018. – 240 с.
2. Климушина, М.В. Анализ аллельного состава генов, связанных с хлебопекарными качествами, у аллоцитоплазматических гибридов пшеницы / М.В. Климушина, М.Г. Дивашук, Т.А.К. Мухаммед, О.Г. Семенов, Г.И. Карлов // Генетика. – 2013. – Т. 49. – С. 617–625.
3. Обухова, Л.В. Корреляционный анализ зависимости силы муки от запасных белков пшеницы / Л.В. Обухова, Е.Б. Будашкина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – №4/1. – с. 807-811.
4. Чернышова, Э.А. Сравнительная характеристика технологических качеств зерна сортов озимой тритикале / Э.А. Чернышова, А.Г. Мякинков, А.А. Соловьев // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 3. – С. 16-24.
5. Amiour, N. Allelic variation of HMW and LMW glutenin subunits, HMW secalin subunits and 75K gammascalins of hexaploid triticale / N. Amiour, M. Dardevet, D. Khelifi, A. Bouguennec, G. Branlard // Euphytica. – 2002. – 123. P. 179–186.
6. Amiour, N. Diversity of seven glutenin and secalin loci within triticale cultivars grown in Europe/ N. Amiour, A. Bouguennec, C. Marcoz, P. Sourdille, M. Bourgoignie, D. Khelifi, G. Branlard // Euphytica. – 2002. – 123. – P. 295–305.
7. Payne, P.I. The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm. / P.I. Payne, L.M. Holt, G.J. Lawrence, C.N. Law // Qual. Plant. Food Hum. Nutr. – 1982. – 31. – P. 229-241.
8. Payne, P.I. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties / P.I. Payne, M.A. Nightingale, A.F. Krattiger, L.M. Holt // J. Sci. Food Agric. – 1987. – 40. – P. 51-65.
9. Salmanowicz, B.P. Identification and characterization of high molecular weight glutenin genes in Polish triticale cultivars by PCR-generated DNA markers / B.P. Salmanowicz, M. Dylewicz // J. Appl. Genet. – 2007. – 48. – P. 347–357.
10. Salmanowicz, B.P. Identification and characterization of high molecular weight secalins from triticale seeds by capillary electrophoresis / B.P. Salmanowicz // Electrophoresis. – 2010. – 31. – P. 2226–2235.
11. Singh, N.K. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin / N. K. Singh, K.W. Shepherd, G.B. Cornish // J. Cereal Sci. – 1991. – 14. – P. 203-208.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.055

ПОИСК QTL И ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ИНТЕНСИВНОСТЬЮ РОСТА ОВЕЦ, НА ОСНОВЕ GWAS

**Денискова Т.Е., Петров С.Н., Доцев А.В., Сермягин А.А., Форнара М.С.,
Зиновьева Н.А.**

***ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика
Л.К. Эрнста», лаборатория молекулярных основ селекции, Дубровицы 142132***

E-mail: horarka@yandex.ru

Интенсивность роста и развития животных во многом определяет эффективность производства продуктов питания, в том числе баранины. Поиск геномных ассоциаций SNP-маркеров с признаками роста и развития у овец значительно отстает от аналогичных исследовательских работ в свиноводстве, скотоводстве и птицеводстве. Следует отметить, что определенные успехи были сделаны в этом направлении. В результате проведенных полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) были выявлены некоторые потенциальные гены-кандидаты, ассоциированные с интенсивностью привесов ягнят после отъема от матерей (Zhang L. et al, 2013), со строением каркаса туши и размерами тела (Al-

Mamun H.A. et al., 2015), с весом костей (Matika O. et al, 2016) и вовлечённые в регуляцию формирования скелетных мышц и липидный метаболизм (Lu Z. et al, 2020). Тем не менее, необходимо продолжить поиск генетических вариантов, лежащих в основе наследования признаков роста и развития у овец.

Цель нашей работы – идентификация QTLs и генов-кандидатов, ассоциированных с интенсивностью роста у овец, путем проведения GWAS в группе возвратных кроссов, происходящих из ресурсной популяции овец: Романовская х (Катадин х Романовская). Фенотипические признаки, в том числе девять промеров туловища и живая масса, были собраны в возрастной динамике (6, 42, 90, 180 и 270 дней). Для каждого показателя были рассчитаны средняя арифметическая (M), стандартная ошибка средней арифметической ($\pm m$), среднее квадратическое отклонение (σ) и коэффициент вариации (C_v , %). Экспериментальные овцы ($n=38$) были генотипированы с применением ДНК-чипа *Ovine Infinium® HD SNP BeadChip* (Illumina, США), включающего 600000 SNPs, из которых после контроля качества осталось 459868 для проведения GWAS. Выявление ассоциаций SNP-маркеров с показателями роста и развития возвратных кроссов проводили в PLINK 1.90. Для подтверждения достоверного влияния SNP был выполнен тест для проверки нулевых гипотез по Бонферрони при пороговом значении $p < 1,09 \times 10^{-7, \frac{0,05}{459868}}$. Визуализацию данных проводили в пакете R qqman.

В результате проведенного GWAS были найдены достоверно значимые ассоциации ряда SNPs (при p от $1,70 \times 10^{-07}$ до $5,45 \times 10^{-09}$), включая *oar3_OAR6_18252318*, *oar3_OAR3_160072113*, *oar3_OAR7_37679053*, *oar3_OAR7_43279978*, с косой длиной туловища в возрасте 180 дней ($59,52 \pm 0,70$ см). Достоверно значимый SNP (*oar3_OAR15_58479722*, при $p = 9,35 \times 10^{-07}$) ассоциирован с шириной груди за лопатками в 180 дней ($11,58 \pm 0,29$ см). Один SNP на хромосоме 1 достоверно ассоциирован с шириной в маклоках ($13,31 \pm 0,05$ см) и шириной груди за лопатками в 180 дней, а также суггестивно ассоциирован с живой массой в том же возрасте ($22,61 \pm 0,87$ кг) при $p = 4,35 \times 10^{-06}$.

Среди наиболее интересных функциональных кандидатов были идентифицированы гены, чья роль в биологических процессах была подтверждена у овец. Так, например, продукты генов *CNOT2*, *CNOT6*, *PPARD* и *ELOVL6* участвуют в регуляции энергетического и липидного метаболизма в скелетных мышцах; продукт гена *PITX2* влияет на развитие гипофиза и рост организма; продукт гена *CAPN3* связан с качеством туши; продукт гена *MYOD1* отвечает за миогенную дифференцировку, продукт гена *FGGY* оказывает регуляторный эффект в накоплении как мышечной, так и жировой ткани и может быть ответствен за привесы живой массы. Кроме того, был обнаружен целый ряд суггестивных ассоциаций изучаемых признаков роста и развития с SNPs, локализованными в непосредственной близости от генов *KLHDC1*, *KLHDC2*, *DGAT2*, *DGKH* и *EN1*, продукты которых вовлечены в миграцию мышечных клеток, развитие скелета, процессы роста у крупного рогатого скота и у других видов млекопитающих, но еще не открыты у овец.

Таким образом, нами был впервые проведен GWAS у возвратных кроссов, полученных из двух семейств полусибсов ресурсной популяции, на основе высокоплотных геномных данных и фенотипических показателей, зафиксированных в возрастной динамике. В настоящее время ожидается рождение второй серии возвратных кроссов для расширения изучаемой выборки. Выявленные гены-кандидаты будут аннотированы и валидированы для внедрения в селекционный процесс.

Матери возвратных кроссов романовской породы генотипированы в рамках выполнения задания Министерства науки и высшего образования РФ, тема 0445-2019-0026.

Закладка ресурсной популяции, генотипирование исходных родительских форм, кроссов первого и второго поколений (возвратных кроссов), создание базы фенотипической изменчивости изучаемых признаков, а также проведение GWAS выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-08015.

Список литературы:

1. Zhang L., Liu J., Zhao F., Ren H., Xu L., Lu J., Zhang S., Zhang X., Wei C., Lu G., Zheng Y., Du L. Genome-wide association studies for growth and meat production traits in sheep. PLoS One. 2013.10(6): e0128688. DOI: 10.1371/journal.pone.0128688
2. Al-Mamun H.A., Kwan P., Clark S.A., Ferdosi M.H., Tellam R., Gondro C. Genome-wide association study of body weight in Australian Merino sheep reveals an orthologous region on OAR6 to human and bovine genomic regions affecting height and weight. Genet. Sel. Evol 2015. 47(1):66. DOI:10.1186/s12711-015-0142-4.
3. Matika O., Riggio V., Anselme-Moizan M., Law A.S., Pong-Wong R., Archibald A.L., Bishop S.C. Genome-wide association reveals QTL for growth, bone and in vivo carcass traits as assessed by computed tomography in Scottish Blackface lambs. Genet. Sel. Evol. 2016. 48:11. DOI 10.1186/s12711-016-0191-3.
4. Lu Z., Yue Y., Yuan C., Liu J., Chen Z., Niu C., Sun X., Zhu S., Zhao H., Guo T., Yang B. Genome-Wide Association Study of Body Weight Traits in Chinese Fine-Wool Sheep. Animals (Basel). 2020.10(1). pii: E170. DOI: 10.3390/ani10010170.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.056

АЛЛЕЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНА ЭТИЛЕН ЗАВИСИМОЙ ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ *MD-PG1* В НОВОМ ГИБРИДНОМ ГЕНОФОНДЕ ЯБЛОНИ (*MALUS MILL.*) ВНИИСПК

**Должикова М. А. аспирант, Пикунова А. В. канд. б. н., Толпекина А.А.,
Седов Е. Н., академик РАН**

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский
научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, Орловская
область, п/о Жилина, 302530 Россия
E-mail: dolzhikova.mari94@mail.ru**

Яблоня – ведущая плодовая культура в мире, в частности, в России. Плоды яблони являются одними из наиболее важных в экономическом отношении. За последние десятилетия производство яблок значительно увеличилось. Основными производителями являются: Китай, США, Турция, Польша, Индия, Италия, Иран, Чили, Франция и Россия (по данным FAOSTAT). В связи с высокой конкурентоспособностью, рынок необходимо обеспечивать стабильным поступлением высококачественных плодов. Сорта плодовых культур должны сочетать в себе высокие вкусовые достоинства, привлекательный внешний вид, устойчивость к болезням и вредителям, наиболее продолжительные сроки хранения и реализации. В настоящее время известно несколько генов, влияющих на твердость плодов и их размягчение в период хранения, в т.ч. – *Md-AC01*, *Md-ACS1*, *Md-EXP7* и *Md-PG1*. В данной работе проведены исследования аллельного разнообразия гена *Md-PG1*.

В процессе хранения плодов яблони под воздействием этилена на активность ферментных систем происходит ферментативное разрушение клеточных стенок и ламеллярного слоя в плодах. Один из таких ферментов – полигалактуроназа вовлечен в процесс деградации пектина, который приводит к размягчению богатых пектином слоев ткани плодов [4]. Главный локус количественного признака (major QTL) *Md-PG1*, расположенный в группе сцепления (LG) 10 яблони детерминирует активность этилен-зависимой эндополигалактуроназы и влияет на процесс размягчения мякоти плодов при хранении [2].

Для гена *Md-PG1* в настоящее время идентифицированы функциональные ДНК-маркеры. Присутствие комбинаций аллелей с разной длиной SSR повтора локуса *Md-PG1ssr10kd* влияет на показатели плотности мякоти плода при хранении. Сочетание аллелей 310:319 и 313:319 соответствует среднему уровню активности, этилен-зависимой полигалактуроназы. Сочетание 319:319 соответствует высокому уровню активности,

этилен-зависимой полигалактуроназы [5], что приводит к значительному снижению плотности мякоти, данное сочетание аллелей не желательно.

Выделение ДНК проводилось из высушенных молодых листьев СТАВ методом (Diversity Arrays Technology P/L (DArT) (www.DiversityArrays.com)). Протестировано 318 образцов гибридных семян из десяти гибридных семей. ПЦР проводили по методике, описанной у Longhi [1], с использованием праймеров к микросателлитному локусу *Md-PG1ssr10kd*. Амплификация фрагментов проводилась в следующем профиле программы: предварительная денатурация 5 мин при 95 °С; следующие 30 циклов (отжиг праймеров): 30 с при 58 °С; элонгация ДНК 30 с при 72 °С и завершающая элонгация 10 мин при 72 °С.

Для электрофоретического анализа амплифицированных фрагментов использовался 8 % полиакриламидный (ПААГ) гель.

В ходе исследований было проанализировано 262 образца из 10 гибридных семей. В гибридной семье 6341 (Свежесть × 29-40-127 (Орлик × Реса)) всего 3 гибрида с сочетанием 319:319. В гибридной семье 6342 (Свежесть × 31-5-15 (Северный синап × Реса)) 1 гибрид с сочетанием 319:319. В гибридной семье 6346 (Антоновка обыкновенная × Болотовское) выделился 1 гибрид. В семье 6348 (Поэзия × Краса Свердловска) 11 гибридов с нежелательным сочетанием аллелей. В семье 6349 (Приокское × Краса Свердловска) 10 гибридов с нежелательным сочетанием аллелей. В семье 6353 (Поэзия × Афродита) 2 гибрида с сочетанием 319:319. В семье 6354 (Приокское × Свежесть) 5 гибридов. В гибридной семье 6355 (Восторг × Орловская Гирлянда) всего 2 гибрида с нежелательным сочетанием аллелей. В семье 6356 (Восторг × Болотовское) всего 1 гибрид с нежелательным сочетанием аллелей. И в семье 6356а (Созвездие × Памяти Хитрово) отсутствуют гибриды с нежелательным сочетанием аллелей.

В ходе исследования аллельного полиморфизма гена *Md-PG1* по локусу *Md-pg10kd* были идентифицированы как гомозиготные генотипы, так и гетерозиготные. Были идентифицированы гомозиготные образцы с аллельной комбинацией 319:319 и гетерозиготные образцы (аллели 310:319, 313:319).

Во всех анализируемых образцах гомозиготными по сочетанию аллеля 319:319 оказались 13, 7 %, отсутствовал нежелательный аллель у 11,5 % гибридов, у большинства гибридов аллель 319 был обнаружен в гетерозиготном состоянии (74,8 %).

На основании результатов выполненной работы были идентифицированы гибриды, несущие селекционно-ценные аллели гена *Md-PG1*. Они могут быть использованы в дальнейшем селекционном процессе.

В селекции на высокое качество плодов применение ДНК-маркеров для идентификации аллелей целевых генов имеет важное значение. Это обусловлено возможностью выявления селекционно-ценных гибридов, несущих аллельный набор, детерминирующий высокие показатели качества плодов, на ранних этапах вегетации – до вступления гибридных форм в плодоношение. Таким образом, появляется возможность провести отбор и выбраковку семян с «нежелательными» аллелями уже на первом году жизни семян, что позволяет существенно сократить объем селекционного материала и повысить экономическую эффективность селекции.

Список литературы:

1. Longhi, S.A. candidate gene based approach validates *Md-PG1* as the main responsible for a QTL impacting fruit texture in apple (*Malus domestica* Borkh.) / S. Longhi, M.T. Hamblin, L. Trainotti [et al.] // BMC Plant Biol. – 2013. – №13. – P. 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-37>
2. Costa, F. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylenedependent polygalacturonase gene in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / F. Costa, C.P. Peace, S. Stella [et al.] // J Expt Bot. – 2010. – №61. – P. 3029–3039. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq130>
3. Супрун И. И. и др. Анализ аллельного полиморфизма генов *Md-exp7* и *Md-pg1*, детерминирующих признаки качества плодов, у современных и автохтонных сортов яблони Крыма // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2015. – №. 33. – С. 1-11.

4. Ульяновская Е. В. и др. Выделение новых доноров и источников для селекционного совершенствования яблони // Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2017. – Т. 4. – №. 1-2. – С. 139-141.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.057

ПРОЯВЛЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ КАЧЕСТВ ЗЕРНА ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ У РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПО ЗАПАСНЫМ БЕЛКАМ

**Ермоленко О.И.¹, Груздев И.В.², Турбаев А.Ж.³, Колмыкова Л.П.¹, Кузнецова Н.Л.¹,
Соловьев А.А.^{1,2}**

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН». E-mail: o.ermolenko2015@gmail.com

2 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550 E-mail: gruzdev82mtz@mail.ru

3 – НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана»

Тритикале, являясь относительно новой культурой, прочно укрепляет свои позиции в структуре сельского хозяйства. Большой интерес проявляют к зерну тритикале из-за высокой пищевой ценности. В настоящее время тритикале используется преимущественно в производстве комбикормов, но применяют ее и вместо мягкой пшеницы для производства лепешек, крекеров и печенья. Зерно тритикале и продукты его переработки находят применение в спиртовой, крахмалопаточной, пивоваренной промышленности, перспективно так же использование для получения биогаза (Грабовец, Крохмаль, 2019). Тритикале обладает определенным хлебопекарным потенциалом, однако технологические свойства муки из этой культуры сильно разнятся от сорта (Чернышова и др., 2015). Там, где нельзя получать высокие урожаи хлебопекарной пшеницы из-за агроклиматических особенностей, тритикале может стать хорошей альтернативой пшенице.

Высокомолекулярные глюteniны (HMW-GS) – группа запасных белков, которые накапливаются в эндосперме пшеницы и кодируются локусами *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-R1*, локализованными в длинных плечах хромосом первой гомеологической группы (Payne et al., 1983). Эти локусы очень полиморфны по своей природе, и их аллельные варианты отвечают за различные комбинации HMW-GS в различных сортах пшеницы и тритикале (Rasheed et al., 2012). Различные аллели, кодирующие HMW-GS, по-разному влияют на хлебопекарные качества пшеницы (Payne et al., 1987). Наиболее ценными считаются субъединицы с высоким молекулярным весом, такие как *Glu-A1* (1) / (2*), *Glu-B1* (7+8) / (7+9) / (17+18) и *Glu-D1* (5+10). Полиморфизм локуса *Glu-R1* у гексаплоидной тритикале довольно хорошо изучен (Amiour et al., 2002), однако влияние аллелей этого локуса на хлебопекарные и технологические свойства муки тритикале изучено слабо. Решение данного вопроса позволило бы оптимизировать поиск генотипов тритикале с хорошими хлебопекарными качествами, что значительно облегчило бы селекционный процесс.

На показатели качества зерна, помимо генотипа, в значительной степени оказывают влияние погодные условия в период вегетации. В условиях 2019 г. все образцы отличались большим содержанием клейковины, при этом натура и масса 1000 зерен в среднем были ниже, чем в 2017 г. По стекловидности в 2019 г. все образцы соответствовали зерну тритикале первого класса, в то время как в 2017 г. все линии имели стекловидность ниже 40%. По комплексу показателей (натура, количество клейковины, качество клейковины) в 2019 г. тритикале второго класса соответствовали сорта Гребешок, Ярило, Лана, Dublet, Sandro и селекционные линии С259, С238. Сорта Памяти Мережко и Dublet, сформировавшие в 2017 г. клейковину первой группы качества, при ее небольшом

количестве, имели объем хлеба выше среднего. В 2019 г. объем хлеба был ниже, по группе качества клейковина соответствовала удовлетворительной слабой. Наиболее высокие показатели по объемному выходу хлеба и общей хлебопекарной оценке показали сорта Гребешок (360 см³, 2,9 балла), Ярило (360 см³, 3,3 балла) в 2017 г.

Разнообразие изученных образцов яровой тритикале по локусу *Glu-A1* представлено аллельными вариантами *Glu-A1a* и *Glu-A1b*, кодирующими, соответственно, субъединицы х-типа 1 и 2*, а также аллелем *Glu-A1c*, при наличии которого в белковом профиле отсутствует HMW-GS, который также не экспрессируется и у тритикале. Среди изученных образцов сорта Гребешок (80%), Sandro, C-259 (80%) имели аллельный вариант *Glu-A1a*. Сорта Памяти Мережко, Ярило, Dublet, Legalo и линия C238 имели аллельный вариант *Glu-A1b*. Аллельный вариант *Glu-A1c* идентифицирован у линии 131/7 и сортов Укро (70%), Ульяна (75%), Лана и Activo.

Локус *Glu-B1* является более полиморфным в сравнении с локусом *Glu-A1*. У изученных образцов яровой тритикале были идентифицированы пять аллелей локуса *Glu-B1*: *Glu-B1b*, ответственный за синтез сочетания субъединиц 7+8; *Glu-B1c*, ответственный за синтез субъединиц 7+9; *Glu-B1IV* – 23+18; *Glu-B1r* – 7+18; *Glu-B1s* – 6,8+20у. Аллель *Glu-B1c* идентифицирован у линии 131/7. Аллель *Glu-B1IV* идентифицирован у сорта Ярило. Аллель *Glu-B1s* был обнаружен у сортообразцов Гребешок, Памяти Мережко, Sandro, C 238, C259 (80%). Аллель *Glu-B1r* идентифицирован у сортов Лана, Dublet (67%). Аллель *Glu-B1b* выявлен у сортов Ульяна, Legalo, Укро (80%).

У изучаемых образцов идентифицировано три аллеля локуса *Glu-R1*: аллель *Glu-R1a*, контролирующий синтез субъединиц 1^r+4^r; *Glu-R1b*, отвечающий за субъединицы 2^r+6,5^r; *Glu-R1c* – 6^r+13^r. Аллель *Glu-R1a* идентифицирован у сортов Лана, Укро (80%), Ульяна (75%). Аллель *Glu-R1b* обнаружен у сорта Legalo и линии 131/7 (60%). По данным Amieur et al. (2002) аллель *Glu-R1c* встречается у 65,7% европейских сортов тритикале. Наиболее часто встречался этот аллель и в нашем исследовании. Он идентифицирован у сортов Гребешок, Памяти Мережко, Ярило, Dublet, Sandro, линий C238 и C259 (80%).

Корреляционный анализ между аллельным состоянием генов глютеинов и показателями качества зерна и хлебопекарной оценки по результатам контрастных погодно-климатических условий 2017 и 2019 гг. позволил выявить некоторые тенденции. Установлена средняя отрицательная зависимость между аллельным составом локуса *Glu-R1* и показателями стекловидности зерна, качества клейковины, натуры зерна, массы 1000 зерен в оба года урожая – 2017 и 2019 гг. Подобные зависимости отмечены и между аллельным состоянием локуса *Glu-A1* и показателями натуры зерна и группой качества клейковины по показателю ИДК. При этом следует отметить, что отмечена положительная связь средней силы между аллельным состоянием локуса *Glu-A1* и общей хлебопекарной оценке. Корреляционные зависимости между аллельным состоянием изученных локусов, показателями качества зерна и хлебопекарными показателями в значительной мере зависят от агроклиматических условий года. В то же время полученные высокие значения коэффициентов корреляции позволяют проводить целенаправленный отбор генотипов на конкретные аллельные состояния генов глютеинов.

Список литературы:

Грабовец, А.И. Тритикале. Монография. / А.И. Грабовец, А.В. Крохмаль – г. Ростов-на Дону, ООО «Издательство «Юг». – 2018. – 240 с.

Чернышова, Э.А. Сравнительная характеристика технологических качеств зерна сортов озимой тритикале / Чернышова Э.А., Мякинков А.Г., Соловьев А.А. // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 3. – С. 16-24.

Amieur, N. Allelic variation of HMW and LMW glutenin subunits, HMW secalin subunits and 75K gammasecalins of hexaploid triticale / N. Amieur, M. Dardevet, D. Khelifi, A. Bouguennec, G. Branlard // Euphytica. – 2002. – 123. P. 179–186.

Payne, P.I. The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm. / P.I. Payne, L.M. Holt, G.J. Lawrence, C.N. Law // Qual. Plant. Food Hum. Nutr. – 1982. – 31. – P. 229-241.

Payne, P.I. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties / P.I. Payne, M.A. Nightingale, A.F. Krattiger, L.M. Holt // J. Sci. Food Agric. – 1987. – 40. – P. 51-65.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.058

**АЛЛЕЛЬНЫЙ ПЛИМОРФИЗМ ГЕНА ФИТОИНСИНТАЗЫ *SIPSY1* И
БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ЛИКОПИНА И БЕТА-КАРОТИНА
У СОВРЕМЕННЫХ СОРТОВ ТОМАТА ОВОЩНОГО (*SOLANUM LYCOPERSICUM*)**

Ефремов Г.И.¹, Тукусер Я.П.², Слугина М.А.¹

**¹Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва
117312**

**²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научный
центр овощеводства», Московская область, 143086
E-mail: gleb_efremov@mail.ru**

Томат овощной (*Solanum lycopersicum*) является второй по значимости овощной культурой. Диетическая ценность плодов томата во многом определяется содержанием каротиноидов (ликопина и бета-каротина). Томаты и продукты переработки (томатная паста, сок, пюре, кетчуп и др.) считаются основными источниками ликопина в диете человека. В настоящее время основным трендом в селекции овощных культур, в том числе томата, является создание сортов с повышенным содержанием полезных вторичных метаболитов. Для ускоренного получения новых сортов томата с улучшенными питательными качествами необходимо проведение молекулярно-генетической характеристики генов метаболизма каротиноидов с сопутствующим биохимическим анализом содержания ликопина и бета-каротина у сортов томата овощного, используемых в селекционных программах.

Ключевым ферментом биосинтеза каротиноидов является фитоинсинтаза PSY1, которая катализирует реакцию конденсации геранилгеранил пирофосфата с образованием фитоина – предшественника всех каротиноидов.

В настоящей работе впервые у 12 сортов томата овощного клонированы и секвенированы кодирующие последовательности гена *SIPSY1*, определен их полиморфизм и проведен поиск корреляции между аллельными вариантами и содержанием ликопина, бета-каротина и общих каротиноидов в созревшем плоде. Показано, что цвет окраски плода зависит от качественного и количественного содержания каротиноидов. Проведенный биохимический анализ методом спекрофотометрии показал, что максимальный уровень содержания ликопина характерен для сортов, образующих коричнево-фиолетовые плоды, а именно у сортов Black Jack, Black Cherry, Zemba содержание ликопина в зрелых плодах которых составило – 290, 230 и 190 мкг/гр сырой массы соответственно. У красноплодных сортов содержание ликопина было ниже: Heinz – 143, Малиновый Силач – 126, Корнеевский – 117, Гармошка – 110 мкг/гр сырой массы соответственно. У сортов, плоды которых имеют белую и желтую окраску (Копилка желтая, Черри желто-оранжевые и Несозревающий гибрид) найдены лишь следовое количество ликопина. Максимальное количество бета-каротина выявлено у сортов (Копилка желтая – 67.98 мкг/гр сырой массы и Черри желто-оранжевые – 59.7 мкг/гр сырой массы, минимальное у сортов - (Несозревающий гибрид – 3.92 мкг/гр сырой массы и Гармошка – 9.45 мкг/гр сырой массы).

Идентифицированные кодирующие последовательности (кДНК) гена *SIPSY1* исследуемых сортов имели одинаковую длину – 1239 пн., что соответствует белку в 412 а.о. Общий уровень полиморфизма кодирующих последовательностей составил 3.87%. В составе нуклеотидных последовательностей выявлено 48 SNPs, индели отсутствовали. Наибольшее число нуклеотидных замен выявлено в экзоне I (22 SNPs), в то время как экзон II был инвариантен. В экзонах III и VI выявлено по 6 полиморфных сайтов; в экзонах IV и V – по 10 и 4 SNPs соответственно. Всего определено 16 аллельных вариантов. Для некоторых сортов (Корнеевский, Zemba, Black Jack, Несозревающий гибрид) показано наличие двух аллельных вариантов *SIPSY1*, соответствующих двум аллелям на диплоидном геноме. Для сортов Heinz и Малиновый силач найден общий аллельный вариант, каждый из оставшихся сортов имел свойственный только ему аллельный вариант. Проведенный сравнительный анализ показал, что окраска плодов коррелировала с присутствием определенных аллельных вариантов *SIPSY1*. Так для красноплодных сортов были характерны аллельные варианты А, С, D, Е; для желтоплодных сортов – L, G; для сортов с коричнево-фиолетовой окраской плодов – F, H, I, J, K, N, O. Полученные нуклеотидные последовательности были транслированы и изучена вариабельность соответствующих белковых последовательностей. Из 48 экзонных SNPs в 31 приводили к замещению а.о., 12 из которых оказались радикальными согласно предсказанию программы PROVEAN. Общий уровень полиморфизма аминокислотных последовательностей составил 7.5%, что является достаточно высоким показателем для выборки образцов, состоящих из сортов *S. lycopersicum*. Однако определенных а.о сцепленных с окраской плода выявлено не было.

Таким образом, в настоящей работе выявлена корреляция между уровнем содержания ликопина и цветом плодов, а также связь отдельных аллельных вариантов с цветом плода.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 19-16-00016) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.059

**ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИМОРФИЗМА
НЗGA0051811 ГЕНА *HERN* ДЛЯ ОСОБЕЙ ВИДА *SUS SCROFA* –
АНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ KASP**

Кипень В.Н.¹, Снытков Е.В.², Патрин М.М.³

*1– Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
220072, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: v.kipen@igc.by*

*2 – Международный государственный экологический институт
им А.Д. Сахарова БГУ, 220070, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: evsnytkov@gmail.com*

*3 – ООО «МАКСИМ МЕДИКАЛ»,
143420, пос. Архангельское, Московская обл., Российская Федерация,
e-mail: max@maxmedikal.com*

Введение. Задача по дифференциации дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и домашней свиньи (*Sus scrofa domesticus*) может быть решена с использованием анализа трех полиморфных вариантов – с.367G>A (ген *MC1R*) и g.299084751C>T (ген *NR6A1*) и НЗGA0051814 (ген *HERN*), – сбалансированная точность предсказания составляет не менее – 99,14% [1]. Однако в гене *HERN* на основании подробного биоинформатического анализа SRA для более 600 особей вида *Sus scrofa* нами был выявлен дополнительный полиморфный вариант с предположительно высоким дифференцирующим потенциалом. Молекулярно-генетический анализ данного полиморфизма не возможен классическим

методом ПЦР-ПДРФ. Данное затруднение решено путем использования технологии генотипирования KASP (Kompetitive allele specific PCR, LGC Biosearch Technologies), с применением которой предполагается разработка тест-системы с использованием приборов Real-Time PCR для решения задачи дифференциации особей в пределах вида *Sus scrofa*.

Цель и задачи. Оценить частоту распространенности полиморфизма H3GA0051811 (*HEPH*) на X-хромосоме (Chr.X: g.53901464C>T, Sscrofa11.1 (RefSeq GCF_000003025.6) от 2017/02/07) среди особей дикого кабана и домашней свиньи, как обладающего потенциально высоким дифференцирующим потенциалом для их различения. На основании полученных результатов охарактеризовать предсказательный потенциал данного полиморфизма для дифференциации особей *Sus scrofa scrofa* (дикий кабан) и *Sus scrofa domesticus* (домашняя свинья).

Материалы и методы. Определение генотипа по полиморфизму H3GA0051811 (*HEPH*) осуществляли с использованием технологии, основанной на конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP, kompetitive allele specific PCR). Генотипирование проводили с использованием KASP Assay mix (KASP by Design, KBD) и KASP Master mix (LGC Biosearch Technologies, Великобритания; ООО «Максим Медикал», РФ) в двукратной повторности. Концентрация ДНК для всех образцов была стандартизирована до 30-50 нг/мкл. ПЦР проводили в объеме 10 мкл в термоциклире CFX96 (Bio-Rad, США) согласно имеющимся рекомендациям по KASP.

Дифференцирующий потенциал для полиморфизма проводили с использованием программы MDR v.3.0.2 (<http://www.multifactorialdimensionalityreduction.org/>). Вклад конкретного генотипа определялся величиной энтропии H (выраженной в %). При H = 100% генотип способен однозначно дифференцировать, к какой группе (дикий кабан или домашняя свинья) относится неизвестный образец. В программе MDR в результате множественных перестановок (пермутаций) первичных данных определяется наиболее оптимальная модель дифференциации. Корректность модели оценивали по значению сбалансированной точности (Balanced Accuracy), которая зависит от чувствительности и специфичности модели. Также дифференцирующий потенциал полиморфизма определен с использованием ROC-анализа в SPSS v.20.0. При наличии нижней границы асимптотического 95% доверительного интервала более 0,8 для параметра AUC (площадь под кривой) полиморфизм позиционировался как генетический маркер с высоким дифференцирующим потенциалом.

Основные результаты. Для полиморфизма H3GA0051811 (ген *HEPH*) для 43 (100%) животных подвида *Sus scrofa scrofa* (дикий кабан) был выявлен генотип СС, генотипы СТ и ТТ не выявлены. В то же время для 92 (96,84%) животных подвида *Sus scrofa domesticus* (домашняя свинья) был выявлен генотип ТТ, для 3 (3,0%) животных – генотип СТ, генотип СС не выявлен.

Результаты ROC-анализа свидетельствуют о статистически значимой ($p < 0,001$) ассоциации полиморфизма H3GA0051811 (*HEPH*) со способностью к дифференцированию дикого кабана от домашней свиньи – AUC=1,0 (95% ДИ=[0,999-1,0]).

В процессе моделирования в MDR v.3.0.2 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.

Полученная модель имела следующие характеристики: сбалансированная точность (adj. Balanced accuracy) – 99,5%, чувствительность (Sensitivity) – 100%, специфичность (Specificity) – 100%, Cross Validation Consistency – 100/100.

Выводы. Таким образом, нами на выборке из 43 диких кабанов и 95 домашних свиней пяти пород (ландрас, крупная белая, пьетрен, дюрок, йоркшир) впервые на практическом

материале доказан высокий дифференцирующий потенциал ОНП Н3GA0051811 (НЕРН) для различения особей дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и его домашней разновидности (*Sus scrofa domesticus*) – сбалансированная точность предсказания составила не менее 99,5% (при 100% специфичности). Значимость данного полиморфизма для решения задачи дифференциации в пределах вида *Sus scrofa* сопоставима с потенциалом полиморфизма Н3GA0051814 (НЕРН).

На основании всех полученных результатов будет предложена тест-система для дифференциации дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и домашней свиньи (*Sus scrofa domesticus*) с использованием технологии KASP.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «МАКСИМ МЕДИКАЛ» (пос. Архангельское, Московская обл., Российская Федерация, e-mail: max@maxmedikal.com)

Список литературы:

1. Анализ полиморфизма гена гестина (НЕРН) на X-хромосоме для установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида *Sus scrofa* / Кипень В.Н., Иванова Е.В., Снытков Е.В., Верчук А.Н. // Генетика. 2020. Т. 56. № 9. С. 1054-1064.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.060

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЗЦОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ ПО ГЕНУ *wbm*

**Коленков М.А.¹, Дудников М.В.¹, Киров И.В.¹, Ожерельев П.А.², Крутова А.В.²,
Соловьев А.А.¹**

**1 – ФГБНУ ВНИИСБ, Россия, Москва, 127550 Тимирязевская ул., 42; e-mail:
Colenckov@yandex.ru**

**2 – ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва, 127550
Тимирязевская ул., 49**

В селекции тритикале, одной из наиболее важных характеристик являются хлебопекарные качества. Качество выпечки хлеба – важная задача, для расширения возможностей разнообразия пшеничных продуктов, как источника калорий и витаминов в рационе человека. Оценка качества выпечки представляет собой тяжёлую задачу, так как для этого требуется значительное количество семян для анализа, а сам процесс является трудо- и времязатратным. Одним из вариантов преодоления этих трудностей является поиск генетических детерминант, на основе которых стал бы возможным отбор с помощью молекулярных маркеров как это было показано на других признаках. Генетическая изменчивость хлебопекарных качеств пшеницы зависит от вязкости и упругости теста, во многом основанных на высокомолекулярных и низкомолекулярных субъединицах глютеина, гены которых локализованы в длинных плечах хромосом 1-й группы. Хромосома 1RS кодирует ген *Sec-1*, вызывающий нежелательную липкость теста. Этот ген постепенно исключается из селекционных программ пшеницы, но в случае с тритикале он присутствует всегда. Недавно обнаруженный высоко экспрессирующийся ген *wbm* был идентифицирован в транскриптом развивающихся семян пшеницы (Furtado et al., 2015). Анализ РНК-seq показал, что ген *wbm* богат серой S, постоянно экспрессировался в высокой степени во всех сортах пшеницы, дающих хлеб хорошего качества. Guzman et al. (2016) идентифицировали 8 из 56 сортов CIMMYT, несущих ген *wbm*, и пришли к выводу, что аллель оказывает значительное влияние на общие качества клейковины, прочность клейковины, растяжимость клейковины и качество выпечки хлеба. Однако эффекты были меньше, чем у локусов *Glu-B1* и *Glu-D1*. Однако, частота встречаемости гена *wbm* среди образцов гексаплоидной тритикале почти не исследована.

Цель работы заключалась в изучении встречаемости гена *wbm* среди линий яровой тритикале для проведения дальнейших оценок их хлебопекарных качеств и использования в селекционных программах.

Для анализа использовали набор образцов яровой тритикале из коллекции ВИР, USDA, сортов отечественной и зарубежной селекции, а также селекционных линий лаборатории. В ходе анализа были установлено, что 3 линии являются носителем гена *wbm*. Для исследования влияния этого гена на хлебопекарные качества были проведены скрещивания носителей гена с линиями без данного гена, характеризующимися контрастными хлебопекарными качествами, по диаллельной схеме скрещиваний.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации, государственное задание №АААА-А19-119031490067-3.

Список литературы:

1. Дивашук, М.Г. Использование микросателлитных маркеров для идентификации пшенично-ржаной транслокации у гексаплоидной тритикале / М.Г. Дивашук, Г.И. Карлов, А.А. Соловьев // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2007. – № 1. – С. 61-65.
2. Коршунова, А.Д. Анализ распределения генов короткостебельности пшеницы и ржи среди сортообразцов яровой гексаплоидной тритикале (*Triticosecale* Wittm.) / Коршунова А.Д., Дивашук М.Г., Соловьев А.А., Карлов Г.И. // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 3. – С. 334.
3. Furtado, A. A novel highly differentially expressed gene in wheat endosperm associated with bread quality. / A. Furtado, P.C. Bundock, P.M. Banks, G. Fox, X. Yin, R.J. Henry // Scientific Reports. – 2015. – 5:10446. DOI: 10.1038/srep10446
4. Kirov, I. Analysis of Wheat Bread-Making Gene (*wbm*) Evolution and Occurrence in Triticale Collection Reveal Origin via Interspecific Introgression into Chromosome 7AL / I. Kirov, A. Pirsikov, N. Milyukova, M. Dudnikov, M. Kolenkov, I. Gruzdev, S. Siksin, L. Khrustaleva, G. Karlov, A. Soloviev // Agronomy – 2019. – 9. – 854. – <https://doi.org/10.3390/agronomy9120854>.
5. Guzman C. Sources of the highly expressed wheat bread making (*wbm*) gene in CIMMYT spring wheat germplasm and its effect on processing and bread-making quality / C. Guzman, Y. Xiao, J. Crossa et al. // Euphytica – 2016. 209:689–692. DOI 10.1007/s10681-016-1659-5.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.061

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ И ГРУШИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТТЕЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Кочешкова А.А., Баженов М.С.

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

E-mail: alina.kocheshkova@gmail.com

Яблоня и груша являются одними из самых распространенных плодовых культур в России. Для интенсификации селекции плодовых необходимо применение молекулярных методов, позволяющих, в том числе, производить идентификацию исходного материала. Идентификация сортов позволяет оценивать генетическое разнообразие, создавать генетические паспорта сортов, защищать авторские права селекционных учреждений, следить за чистотой сортов и соответствием их известному стандарту. Микросателлитные ДНК-маркеры, основанные на анализе простых повторяющихся последовательностей, (SSR – simple sequence repeats) позволяют эффективно и надежно идентифицировать генотипы яблони и груши (Patocchi, 2009; Fua, 2010; Савельев, 2011).

Для проведения работы были проанализированы зарубежные и отечественные научные публикации по микросателлитному маркированию яблони и груши.

Амплификация маркеров проводилась с помощью ПЦР. Визуализация результатов проводилась с помощью электрофореза продуктов ПЦР в агарозном геле, а также путем фрагментного анализа (капиллярного электрофореза) на генетическом анализаторе 3130XL Applied Biosystems.

Биологическим объектом исследования послужили 46 сортов яблони отечественной и зарубежной селекции, возделываемых на территории РФ — Память воину, Налив белый, Афродита, Мелба, Коричное полосатое, Пепин шафранный, Московское позднее, Имрус, Антоновка обыкновенная, Алесь, Солнышко, Лобо, Орлик, Ветеран, Синап орловский, Мартовское, Жигулевское, Татьянин день, Юбиляр, Памяти Тихомирова, Гордеевское, Гайя, Гала, Голден Делишес, Грани Смит, Делишес, Леди Крым (Пинк Леди), Лето Красное, Новелла, Ренет Симиренко, Ред Чиф, Ренуацив, Слава Победителям (Переможецам), Смеральда, Флорина, Фуджи, Фуджион, Цивг 198, Красавица Москвы, Народное, Мечта, Первинка, Апорт кроваво-красный, Медуница, Китайка Долго, Гемини; и 27 сортов груши — Кафедральная, Отрадненская, Ника, Детская, Видная, Гера, Памяти Яковлева, Лада, Чудесница, Память Жегалова, Августовская роса, Чижовская, Москвичка, Верная, Яковлевская, Мраморная, Брянская красавица, Велеса, Белорусская поздняя, Десертная росошанская, Нарядная Ефимова, Потаповская, Карамельная, Академическая, Лесная красавица, Память Анзина, Русская Малгоржатка). Растительный материал был предоставлен Мичуринским садом ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева и Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский селекционно-технический институт садоводства и питомниководства».

В результате анализа научных источников было найдено 177 микросателлитных маркеров, рекомендованных для изучения генетического разнообразия яблони и груши.

Среди рекомендованных маркеров на основе литературных данных были отобраны наиболее полиморфные — 12 маркеров разработанных для яблони и 10 маркеров разработанных для груши. Была проведена апробация данных маркеров на отдельных сортах яблони и груши.

На основании анализа 22 микросателлитных локусов на 45 сортах яблони определен диагностический набор из 13 маркеров, отличающихся стабильностью в воспроизведении и высоким уровнем информативности, позволяющих идентифицировать генотипы, взятые для анализа. Минимальным количеством маркеров для определения сортовой принадлежности являются 8 маркеров: CH01f07a, CH03d07, CH01h01, CH02c06, CH02d08, CH05c06, GD12, CH04c07. Установлено, что данного количества маркеров достаточно для идентификации любого сорта в коллекции.

Почти все сорта обладали уникальным набором аллелей по изучаемым локусам. Однако микросателлитный анализ не позволяет выявить генотипические различия между клоновыми мутантами, что совпадает с литературными данными.

По результатам апробации 22 микросателлитных локусов на 27 сортах груши было отобрано 8 стабильно работающих маркеров, отличающихся высоким уровнем информативности. При этом достаточно 6 молекулярных маркеров (CH01f07a, CH01h10, CH02c09, CH05c06, GD12, CH04c07) для генотипирования анализируемых сортов груши. Каждый сорт груши имеет свой уникальный профиль, на основании которого может быть составлен генетический паспорт.

Кластерный анализ продемонстрировал уникальный аллельный состав по отобранным локусам у изучаемых генотипов яблони и груши.

Так же было успешно проведено тестирование мультиплексного фрагментного анализа нескольких маркеров (CH03d07, CH01h01, CH01h10 и GD12), меченных различными флуорофорами, путем смешения ПЦР-продуктов из нескольких пробирок. Применение мультиплексного фрагментного анализа позволит снизить стоимость идентификации сортов с помощью микросателлитных маркеров.

Результаты работы смогут найти применение в области патентования новых сортов, определения сортовой чистоты посадочного материала, определения принадлежности отдельных деревьев яблони и груши к определенному сорту.

Список литературы:

1. Савельев, Н.И. Применение метода молекулярных маркеров для изучения генетического разнообразия плодовых культур / Н.И. Савельев, А.Н. Юшков, И.Н. Шамшин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2011. – №. 2, Ч. 1. – С. 8-12.
2. Fua, G. Genetic assessment of apple germplasm in Bosnia and Herzegovina using microsatellite and morphologic markers / G. Fua, S. Simon, N. Pojskic, M. Kurtovic, I. Peji // Scientia Horticulturae. – 2010. – №126. – P. 164-171.
3. Patocchi, A. Development and test of 21-multiplex PCRs composed of SSRs spanning most of the apple genome / A. Patocchi, F. Fernandez-Fernandez, K. Evans, D. Gobbin // Tree Genetics & Genomes. – 2009. – N 5. – P. 211-223.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.062

ПОИСК И ВАЛИДАЦИЯ РЕГИОНОВ CNV В ГЕНОМЕ ЖИРНОХВОСТНЫХ ПОРОД ОВЕЦ

Кошкина О.А., Бардуков Н.В., Зимина А.А.

ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», лаборатория молекулярных основ селекции, Дубровицы 142132

E-mail: olechka1808@list.ru

Доступность высокопроизводительных платформ для генотипирования и секвенирования нового поколения привели к значительному успеху в поиске и детекции геномных регионов, число копий которого отличается от референсного генома (copy number variation, CNV). Часто в регионах с CNV перекрываются гены, ассоциированные с экономически-значимыми признаками у сельскохозяйственных животных. Тем не менее, в геноме овец на настоящий момент открыто незначительное количество CNV по сравнению с крупным рогатым скотом. В связи с этим, целью нашей работы стал поиск CNV в геноме локальных российских овец с жирными хвостами и модификации системы валидации CNV с использованием метода ПЦР в реальном времени. Исследования проводились на овцах с жирными хвостами, в том числе: каракульская, осетинская, лезгинская, карачаевская. От каждой породы по 20 голов было генотипировано с использованием ДНК-чипов высокой плотностью Illumina Ovine Infinium® HD SNP BeadChip. Валидация регионов CNV проводилась по модифицированному протоколу ПЦР в реальном времени с использованием референсного красителя ROX (500mM) для нормализации интенсивности флуоресценции зондов и интеркалирующего красителя SYBR Green I. Последующая амплификация проводилась с использованием референса (образца с исходной концентрацией, последовательно разбавленный 3 раза (×20, ×10, ×5) и отрицательный контроль с водой). ПЦР в реальном времени проводилась на приборе QuantStudio®5 (Thermo Fisher Scientific, США). Среди перекрывающихся в CNV генов были найдены кандидаты, ассоциированные с липидным метаболизмом и с депонированием жира в хвостовой области у овец. Полученные результаты носят промежуточный характер и будут продолжены на большей выборке овец разных пород. Тем не менее, была показана некоторая перспективность использования метода детекции и валидации CNV для идентификации потенциальных генов-кандидатов.

Тест-система валидации была отработана в рамках выполнения задания Министерства науки и высшего образования РФ, тема 0445-2019-0026. Генотипы жирнохвостых пород были получены при финансовой поддержке РНФ № 19-16-00070.

**АЛЛЕЛЬНЫЙ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНГИБИТОРА
АМИЛАЗ *AI* У ДИКИХ ВИДОВ И КУЛЬТУРНЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ**

Кулакова А.В., Дьяченко Е.А.

**Институт Биоинженерии, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук, Москва
119071**

e-mail: dyachenko-el@yandex.ru

Экономическая ценность сорта картофеля обусловлена урожайностью и сохранностью вкусовых качеств клубней в процессе хранения. При хранении клубней картофеля в низких температурах происходит деградация крахмала и накопление редуцирующих сахаров (холодовое осахаривание, CIS), что способствует ухудшению вкусовых качеств, а при высоко температурной термической обработке - накоплению канцерогена акриламида.

Гидролитическое разрушение крахмала клубней осуществляют α - и β -амилазы. Активность амилаз регулируется посттрансляционно ингибитором амилаз (AI) путем блокировки активного сайта или изменения конформации ферментов. Повышение содержания редуцирующих сахаров при низких температурах является сигналом к росту активности AI и подавлению активности амилаз. Виды и сорта картофеля существенно различаются по холодо- и CIS-устойчивости, что прежде всего зависит от аллельных вариантов генов углеводного обмена, в том числе ингибиторов амилаз. Ранее была показана положительная корреляция уровня экспрессии гена *AI* в клубнях картофеля с устойчивостью к холодовому осахариванию. Однако, несмотря на важное значение ингибитора амилаз, информация о вариабельности *AI* как у видов, так и у сортов картофеля практически отсутствует.

Целью данной работы являлся анализ полиморфизма последовательности гена ингибитора амилаз (*AI*) у дикорастущих видов картофеля (род *Solanum* секция *Petota*), используемых в селекции новых сортов, в том числе холодостойких и CIS-устойчивых, а также современных отечественных сортов.

В результате работы впервые были идентифицированы (амплифицированы, клонированы, секвенированы) и охарактеризованы полногеномные последовательности генов *AI* у 12 дикорастущих видов и 45 сортов картофеля. Для каждого вида и сорта были секвенированы по пять клонов, это позволило охарактеризовать гомо- и гетерозиготное состояние гена. Все идентифицированные гены *AI*, как у видов, так и у сортов *S. tuberosum* имели характерную для ингибитора амилаз четырёхэкзонную структуру. Выровненная длина анализируемых последовательностей составила 1998 п.н. Всего у последовательности *AI* видов и сортов картофеля выявлено 779 SNPs (39%). В экзонах было детектировано 217 SNPs, 97 из которых приводили к замещению аминокислот, а 27-оказались радикальными. Уровень аминокислотного полиморфизма AI был крайне высок и составил 44,7%.

Общая длина гена у анализируемых видов картофеля секции *Petota* варьировала от 1777 п.н. у образца вида *S. vernei* до 1869 п.н. у *S. gourlay*. Всего у *AI* последовательности видов картофеля обнаружено 381 SNPs (19,3%), 83 из которых (12,7%) было в экзонах. В сравнении с взятым из базы геном NCBI *S. tuberosum* у образца вида *S. stoloniferum* помимо замен обнаружена 21-нуклеотидная инсерция (ССАAGTGCTTCACCAACATCA) в экзоне III. Также в экзоне III у одного аллельного варианта образца вида *S. berthaultii* выявлена трехнуклеотидная делеция. В том же участке экзона у образцов четырех видов (*S. acaule*, *S. andigenum*, *S. demissum*, *S. jamesii*) выявлены аллельные варианты с делецией 12 н.п. (ССТАСТССТТСТ), а у *S. stoloniferum* – с делецией 9 н.п.

Интересно, что у анализируемых сортов картофеля выявленный уровень варибельности гена *AI* был даже выше, чем у видов: было обнаружено 572 SNPs (28,6%), из которых более четверти (149 SNPs, 22,9%) – в экзонах. Высокий уровень полиморфизма у анализируемых сортов может быть объяснен широким вовлечением образцов дикорастущих видов в селекцию современных сортов картофеля. Также следует отметить, что практически каждый сорт характеризовался несколькими аллельными вариантами гена *AI*. Несмотря на высокую варибельность нуклеотидных последовательностей, транслированная аминокислотная последовательность была менее вариабельна и составила 35,5% (77 замен а.о.). Однако, проведенный анализ не выявил аминокислотных замен *AI*, сцепленных с холодо- и *CIS*-устойчивостью сортов картофеля.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, ФНТП развития сельского хозяйства РФ на 2017 – 2025 годы (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации») и гранта РФФИ № 18-016-00108.

Список литературы:

1. Chen X., Song B., Liu J., Yang J., He T., Lin Y., Zhang H., Xie C. Modulation of gene expression in cold-induced sweetening resistant potato species *Solanum berthaultii* exposed to low temperature. *Molecular Genetic Genomics*. 2012. 287: 411–421.
2. Neilson J., Lagüe M., Thomson S., Aurousseau F., Murphy A. M., Bizimungu B., Deveaux V., Bègue Y., Jacobs J. M. E., Tai H. H. Gene expression profiles predictive of cold-induced sweetening in potato. *Functional & Integrative Genomics*. 2017. 17(4): 459–476.
3. McKenzie M.J., Chen R.K., Harris J.C., Ashworth M.J., Brummell D.A. Post-translational regulation of acid invertase activity by vacuolar invertase inhibitor affects resistance to cold-induced sweetening of potato tubers. *Plant Cell and Environment*. 2013. 36: 176–185.
4. Van Harsselaar J.K., Lorenz J., Senning M., Sonnewald U., Sonnewald S. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genomics*. 2017. 18(1): 37.
5. Zhang H., Liu J., Hou J., Yao Y., Lin Y., Ou Y., Song B., Xie C. The potato amylase inhibitor gene *SbAI* regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity. *Plant Biotechnology Journal*. 2014. 12(7): 984–993.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.064

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА RS15619223 ГЕНА *LCORL* В МАЛОЧИСЛЕННЫХ ПОРОДАХ КУР

Ларкина Т.А., Дементьева Н.В.

**Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных,
филиал ФГБНУ Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им.
академика Л.К. Эрнста
E-mail: spbvniigen@mail.ru**

За последнее десятилетие интерес к малочисленным популяциям в птицеводстве только растет. Искусственный отбор птицы по хозяйственно-полезным или декоративным признакам привели к формированию большого числа различных пород и популяций, что способствовало существенному увеличению их генетического разнообразия. С расшифровкой генома курицы (*Gallus gallus*), и появлением технологии SNP-чипов стало возможным более детально, на молекулярном уровне, взглянуть на фундаментальную основу генетического разнообразия и результатов селекции в птицеводстве. У *Gallus gallus* мало изученным является анализ обнаруженных маркеров гена *LCORL*. Этот ген кодирует корепрессороподобный лигандзависимый ядерный рецептор и является транскрипционным фактором, который функционирует в сперматогенезе. Полиморфизмы в этом гене связаны

с формированием костей, размерами скелета, высоты в холке [1-3]. *LCORL* влияет не только на рост скелета у взрослой особи, но и на развитие мышц в эмбриогенезе [4]. Полиморфные варианты в гене *LCORL* в малочисленных породах мало изучены и являются важным источником информации для использования в будущих селекционных программах.

Исследования проводили на базе института ВНИИГРЖ. Объектом эксперимента служили 10 популяций кур разного направления продуктивности биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (г. Пушкин, Санкт-Петербург). Материалом для нашего исследования служила ДНК, выделенная из крови особей. ДНК из лейкоцитов цельной крови выделяли общепринятым фенольным методом. SNP-сканирование проводили с помощью чипа Illumina Chicken 60K SNP iSelect BeadChip («Illumina», США). Отбор SNPs проводили с помощью программы PLINK 1.9 и функции -extract. Биометрическая обработка данных выполнена с помощью программ, PLINK 1.9, Microsoft Excel.

В результате SNP-сканирования выявили однонуклеотидный полиморфизм rs15619223 (76404421A>C) в гене *LCORL* у 10 различных популяций биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ. В линиях корниш 3,4,5; породах пушкинская, царскосельская, юрловская ($\chi^2=0,055$), узбекская бойцовая ($\chi^2=0,014$); кроссах корниш х брама светлая х суссекс, царскосельская х суссекс х амрок преобладает гомозиготный генотип AA, вероятно такая закономерность связана с мясным и мясо-яичным направлением продуктивности, а также с массивным скелетом у этих кур. У итальянской куропатчатой ($\chi^2=0,139$) и гамбургской породы ($\chi^2=0,131$) преобладающим является мономорфный генотип CC. Куры этих пород имеют мелкие экстерьерные формы и относятся к декоративному типу. Таким образом, анализ генетической изменчивости гена *LCORL* по rs15619223 (76404421A>C) важен для разработки дальнейших селекционных приемов как по поддержанию генетического разнообразия, так и для повышения продуктивных показателей птицы.

Список литературы:

1. He S., Zhang L., Li W., Liu M. BIEC2-808543 SNP in the LCORL Gene is Associated with Body Conformation in the Yili Horse. Anim Biotechnol. 2015. 26(4):289. DOI:10.1080/10495398.2014.995303.
2. Lindholm-Perry A., Sexten A., Kuehn L., Smith T., King D., Shackelford S., Wheeler T., Ferrell C., Jenkins T., Snelling W., Freetly H. Association, effects and validation of polymorphisms within the NCAPG LCORL locus located on BTA6 with feed intake, gain, meat and carcass traits in beef cattle. BMC Genet. 2011. 12. DOI: 10.1186/1471-2156-12-103.
3. Chang T., Xia J., Xu L., Wang X., Zhu B., Zhang L., Gao X., Chen Y., Li J., Gao H. A genome-wide association study suggests several novel candidate genes for carcass traits in Chinese Simmental beef cattle. Anim Genet. 2018. 49(4):312 DOI:10.1111/age.12667.
4. Han Y., Chen Y., Liu Y., Liu X. Sequence variants of the LCORL gene and its association with growth and carcass traits in Qinchuan cattle in China. J Genet. 2017. 96(1):9. DOI: 10.1007/s12041-016-0732-0.

Исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А18-118021590138-1 с использованием популяций кур из биоресурсной коллекции ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, Пушкин).

RAPID DETECTION OF POTATO ROOT NEMATODE, *DITYLENCHUS DESTRUCTOR*, IN LABORATORY CONDITIONS

Niloufar Mahmoudi^{1,2}, Yousef Naserzadeh^{1,2}, Elena Pakina¹

1 – Department of AgroBiotechnology, Institute of Agriculture, RUDN University, 117198 Moscow, Russia

2 – All-Russian Plant Quarantine Centre (VNIKR), Moscow, Russia.

***Corresponding author's email: nmahmoodi@ymail.com
Russia, 117198 Moscow, Miklukho-Maklaya St, No 8.**

Ditylenchus destructor is one of the most important pest limitations affecting potato production worldwide. This species is known to cause a decrease in growth and potato yields. To control this nematode disease and reduce the losses in potato production, rapid and accurate diagnosis of this parasite is required. A species-specific method for the easy, rapid detection of *D. destructor* was developed in this research for detecting nematode in laboratory conditions in infested potato tubers. Different primers were designed based on the sequence distinction of internal transcribed spacer (ITS) ribosomal RNA gene between *D. destructor* and other *Ditylenchus* spp. The detection technique could detect the presence of *D. destructor* and no cross-reactivity of other species such as *D. dipsaci* and *D. gigas*. We also performed a morphology diagnostic and polymerase chain reaction (RFLP) to decide which of these techniques was less time-consuming, more efficient, and more convenient to use. The species-specific PCR provided faster results, amplifying target nematode species, with more sensitive results than RFLP. Although morphology diagnostic was quite time-consuming. The species-specific technique greatly simplified the operating procedure to quickly detect of *D. destructor*.

Key word: Potato, *Ditylenchus destructor*, PCR, Molecular, Nematode

Ditylenchus destructor является одним из наиболее важных вредных факторов, влияющих на производство картофеля во всем мире. Этот вид, как известно, вызывает снижение роста и урожайности картофеля. Для борьбы с этой нематодой и снижения потерь в производстве картофеля необходима быстрая и точная диагностика этого паразита. В этих исследованиях был разработан видоспецифичный метод для легкого и быстрого обнаружения *D. destructor* для обнаружения нематод в лабораторных условиях в зараженных клубнях картофеля. Различные праймеры были разработаны на основе различия последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) рибосомального гена РНК между *D. destructor* и другими *Ditylenchus* spp. Метод обнаружения мог обнаружить присутствие *D. destructor* и отсутствие перекрестной реактивности других видов, таких как *D. dipsaci* и *D. gigas*. Мы также провели морфологическую диагностику и полимеразную цепную реакцию (РФЛП), чтобы решить, какой из этих методов был менее трудоемким, более эффективным и более удобным в использовании. Видоспецифичная ПЦР давала более быстрые результаты, усиливая целевые виды нематод, с более чувствительными результатами, чем РФЛП. Хотя морфологическая диагностика занимала довольно много времени. Видоспецифическая методика значительно упростила процедуру оперативного обнаружения *D. destructor*.

References:

1. Blok, V.C., (2005). Achievements in and future prospects for molecular diagnostics of plant-parasitic nematodes. Canadian Journal of Plant Pathology 27:176-185.
2. Goodey, I. B., (1952): Investigations into the host ranges of *Ditylenchus destructor* and *D. dipsaci*. Annals of applied biology 39: 221-228. doi.org/10.1111/j.1744-7348.1952.tb00901.x.
3. Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT Nucleic Acid Symposium Series. 41:95–98. Doi: 10.12691/ajidm-4-3-3.

4. Hashemi, K., Karegar, A.J.Z., (2019). Description of *Ditylenchus paraparvus* n. sp. from Iran with an updated list of *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Anguinidae). 4651, 85-113.
5. Hooper, D.I., (1973). *Ditylenchus destructor*. C.I.H. descriptions of plant-parasitic nematodes Set 2, no.21.
6. Luc, M., Sikora, R.A and Brigde, J., (2005). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture 2nd.Second edition. pp.73.
7. Madani, M., Tenuta, M., Chizhov, V.N., Subbotin, S.A., (2015). Diagnostics of stem and bulb nematodes, *Ditylenchus weischeri* and *D. dipsaci* (Nematoda: Anguinidae), using PCR with species-specific primers. Canadian Journal of Plant Pathology 37:212–220.
8. Mahmoudi, N., (2019). EFFECT OF BETA-AMINO BUTYRIC ACID ON ACTIVITY OF PEROXIDASE AND POLYPHENOL OXIDASE ENZYMES IN CUCUMBER INFECTED WITH NEMATODE *MELOIDOGYNE JAVANICA*. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries 14(1):7-17. DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-7-17
9. Medina, I.L., Gomes, C.B., Correa, V.R., Mattos, V.S., Castagnone-Sereno, P., Carneiro RMDG., (2016). Genetic diversity of *Meloidogyne* spp. parasitizing potato in Brazil and aggressiveness of *M. javanica* populations on susceptible cultivars. Nematology 1:1-12. DOI: 10.1163- 15,685,411/00003032.
10. Naserzadeh, Y., Kartoolinejad, D., Mahmoudi, N., Zargar, M., Pakina, E., Heydari, M., Astarkhanova, T., and Kavhiza, N. J. J. R. o. C., (2018). Nine strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: Effects on growth indices, seed and yield production of *Carthamus tinctorius* L. Research on Crops 19(4): 622-632.doi: 10.31830/2348-7542.2018.0001.39
11. Naserzadeh, Y., Nafchi, A.M., Mahmoudi, N., Nejad, D.K. and Gadzhikurbanov, A.S., (2019). Effect of combined use of fertilizer and plant growth stimulating bacteria *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* and *Pseudomonas* on the quality and components of corn forage in Iran. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries 14(3):209-224. dx.doi.org/10.22363/2312-797X-2019-14-3-209-224
12. Subbotin, S.A., Krall, E.L., Riley, I.T., Chizhov, V.N., Staelens, A., De Loose, M. and Moens, M., (2004). Evolution of the gall-forming plant parasitic nematodes (Tylenchida: Anguinidae) and their relationships with hosts as inferred from Internal Transcribed Spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 30(1): 226-235. DOI: 10.1016/s1055-7903(03)00188-x
13. Wendt, K.R., Vrain, T.C., and Webster, J.M.J.J.o.N., (1993). Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. Journal of Nematology 25(4): 555. DOI: 10.1111/epp.12433
14. Naserzadeh, Y., Mahmoudi, N. and Pakina, E., (2019). Antipathogenic effects of emulsion and nanoemulsion of cinnamon essential oil against *Rhizopus* rot and grey mold on strawberry fruits. Foods and Raw materials 7(1): 210-216. doi.org/10.21603/2308-4057-2019-1-210-216

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *Tm-2²* ДЛЯ ОЦЕНКИ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ТОМАТА (*Solanum lycopersicum*) ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСУ МОЗАИКИ (ToMV)

**Ерошевская А.С.^{3,4}, Милюкова Н.А.¹, Пырников А.С.¹, Энзекрей Е.С.^{1,2},
Егорова А.А.^{3,4}, Терешонкова Т.А.^{3,4}, Ховрин А.Н.^{3,4}**

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550, E-mail: biotech@iab.ac.ru

2 – ФГБУН «Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина» РАН, Москва 127276, E-mail: info@gbsad.ru

3 – Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», E-mail: yniioh@yandex.ru

4 – ООО Агрохолдинг «Поиск»

В мире существуют минимум два фактора, сдерживающих дальнейший рост объемов продукции сельского хозяйства. Один из них – низкая потенциальная продуктивность возделываемой культуры, здесь объем потерь может достигать до 40%, а другой фактор – болезни растений, из-за которых объем предуборочных потерь может достигать до 75%. При повышении спроса населения страны на объем производства сельскохозяйственных культур в последнее время в разных регионах России все большее отмечается распространение вирусных заболеваний сельскохозяйственных культур, среди которых особую опасность представляет вирус мозаики томата (ВМТо, ToMV, Tomato mosaic virus). ToMV – РНК-содержащий вирус – один из самых распространенных вирусов растений семейства пасленовых. Поражение им нарушает метаболизм растений томата, за счёт чего теряется товарный вид продукции, понижается количество полезных веществ и уменьшается лёжкость, что может привести к большим финансовым потерям в крупных овощных холдингах. Вирус ToMV легко выдерживает высокие температуры, длительное время сохраняется в почве и распространяется семенами паслёновых, в частности томатами (до 6%). Поражённые вирусом растения и являются первичными источниками – далее вирус ToMV распространяется механически, например, в процессе различных агротехнических мероприятий. Это делает вирус ToMV одним из самых вредоносных вирусов для овощных культур семейства *Solanaceae*, а чаще всего от него страдают томаты. При заражении данным вирусом потери урожая могут достигать 10-50 и более %. Вирус мозаики томата может вызывать различные симптомы в зависимости от штамма, поражающего растение, и экологических условий. Симптомы на листьях могут варьировать от хлоротичной крапчатости до некроза и штриховатости стебля, что приводит к отставанию растений в росте и развитии. На плодах симптомы заболевания могут проявляться от неравномерного созревания плодов до побурения внутренней стенки плода. При определенных погодных условиях у гетерозиготных растений с устойчивостью к вирусу могут проявляться некротические полосы и пятна. Вирус ToMV легко переносится на сельскохозяйственной технике, имеет широкий круг хозяев, включающий многие сельскохозяйственные культуры и сорные растения, растительные остатки также могут стать причиной заражения. Переносчиками вируса также могут быть насекомые.

Традиционный подход к определению заболевания растений включает в себя визуальное наблюдение за состоянием растения. Проявление его внешних признаков наблюдается тогда, когда болезнь принимает хронический характер, борьба с ней становится затруднительной, а признаки заболевания не являются специфичными. Возникает потребность в диагностике посевного материала, чтобы исключить появление и распространение болезни.

Агротехнические мероприятия позволяют уменьшить распространение вирусной инфекции, но наиболее эффективным способом, позволяющим снизить вредоносность заболевания, является использование устойчивых к ToMV сортов томата. Устойчивость томатов к ToMV определяется тремя генами – *Tm-1* (ген толерантности, полученный от *Lycopersicon hirsutum* и локализованный в 5 хромосоме), а также аллельными генами *Tm-2* и *Tm-2²*, определяющими реакцию сверхчувствительности (из 9 хромосомы *L. peruvianum*). В селекционной практике обычно используются сорта и формы с геном *Tm-2²*. Доминантные гомозиготы по данному гену устойчивы к вирусу томатной мозаики.

Широкое внедрение в производство сортов и гибридов, в которых есть ген устойчивости к вирусу томатной мозаики, дает возможность сдерживать распространенность и вредоносность данного патогена на томатах. Для идентификации аллелей гена *Tm-2²* успешно применяются методы молекулярно-генетического анализа.

Цель данного исследования заключалась в анализе образцов томата на устойчивость к вирусу мозаики. В качестве объектов изучения были взяты 24 селекционных образца культурного томата *Solanum lycopersicum*. С целью выявления аллелей гена устойчивости к вирусу мозаики у данных вариантов после предварительного выделения ДНК была проведена ПЦР с использованием CAPS-маркера *Tm2RS-f3/ Tm2RS-r3*. Пара праймеров позволяет амплифицировать фрагмент ДНК размером 703 п.н. У образцов, несущих аллели устойчивости, продукт амплификации разрезается эндонуклеазой *HpaI* на фрагменты 458 и 245 п.н., у восприимчивых образцов рестрикция не проходит. Визуализация результатов ПЦР и рестрикции проводилась методом электрофореза в агарозном геле.

Проведенный молекулярно-генетический анализ среди изученных 24 селекционных образцов выявил 7 гомозиготных устойчивых (*Tm-2²Tm-2²*), и 9 гетерозиготных устойчивых образцов (*Tm-2²/tm-2²*), остальные образцы идентифицированы как неустойчивые к вирусу мозаики томата.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.067

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ

Михайлова П.Д., Логинова Н.Н., Смирнова Е.В., Базанов Т.А.

ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», г. Тверь,
Комсомольский просп., 17/56, 170041
Email: p.mikhaylova@fncl.ru

Лен масличный является одной из важнейших мировых сельскохозяйственных культур и возделывается во многих странах, в т.ч. в Российской Федерации.

В семенах льна содержится около 50 % масла, которое является быстровысыхающим и используется в виде сырья во многих отраслях промышленности: лакокрасочной, кожевенно-обувной, мыловаренной и др.

По причине высокого содержания α -линоленовой кислоты в масле семян льна во многих странах в последнее время его начинают применять в пищу в связи с его лечебными свойствами. Оно способствует снижению уровня холестерина, нормализации артериального давления, улучшению обмена белков и жиров, уменьшению вероятности образования тромбов и опухолей [1].

В качестве ценного белкового корма для многих сельскохозяйственных животных применяют жмых или (при экстрагировании) шрот, получаемые после извлечения из семян льна масла.

Исходя из экономической важности масличного льна проблема селекционного улучшения является актуальной.

В настоящее время в государственном реестре селекционных достижений РФ содержится 41 сорт льна масличного. Идентификация сорта по морфологическим признакам затруднена из-за ограниченного количества отличительных морфологических признаков, проявляемых на различных стадиях онтогенеза. В связи с этим в последнее время для определения сортовой принадлежности льна масличного часто прибегают к использованию генетического маркирования. Наиболее эффективными для льна являются микросателлитные или SSR (Simple Sequence Repeats) маркеры, основанные на вариабельности микросателлитных последовательностей [2,3]. Они позволяют составлять «генетические паспорта» для каждого сорта растений, устанавливать филогенетические связи, вычислять генетические дистанции между сортами для подбора родительских пар при селекции [4].

Целью настоящей работы была оценка современных сортов масличного льна с использованием молекулярных маркеров.

В качестве материала для исследований было выбрано 14 сортов льна масличного, включенных в Государственный реестр селекционных достижений РФ, различного географического происхождения: «Рациол» (Шумперк, Чехия), «Чибис» (Белгород), «Илим» (Витебск, Беларусь), «Исток» (Пенза), «Кинельский 2000» (Самара), «ЛМ 98» (Торжок), «Уральский» (Торжок, Екатеринбург) и сорта «Август», «ВНИИМК 620», «Исилькульский», «Небесный», «Ручеек», «Северный», «Сокол» (Краснодар).

Семена каждого сорта сеяли в пластиковую емкость и выращивали в течение двух недель. Из листьев четырех растений каждого сорта выделяли ДНК с использованием СТАВ-метода.

Генетический анализ проводился с использованием набора из 12 SSR-маркеров, синтезированных компанией ООО «НПФ Синтол» (Россия).

Каждый прямой праймер был помечен одним из трех флуоресцентных красителей (FAM, R6G или TAMRA).

Реакционная смесь ПЦР объемом 25 мкл содержала: 20 нг исследуемой ДНК, по 0,25 мкМ прямого и обратного праймера 200 мкМ dNTP, 2,5 мкМ $MgCl_2$ и 1 единицу Taq-полимеразы.

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе T100 MyCycler™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) при условиях: начальная денатурация 5 мин при 94 °C; далее следовали 25 циклов: денатурация при 94 °C – 30 с, отжиг в течение – 45 с (температуру подбирали в зависимости от праймеров), элонгация при 72 °C – 40 с; терминальная элонгация – 5 мин 72 °C.

ПЦР-продукты были исследованы методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 с использованием маркера молекулярного веса СД-450 СИНТОЛ (Россия). Обсчет результатов проводили в программе ДНК-ФА СИНТОЛ (Россия).

На основании проведенных исследований полиморфизма двенадцати SSR-локусов льна масличного были составлены «генетические паспорта» изученных сортов, а также был проведен кластерный анализ и построена дендрограмма генетического родства среди изученных сортов на основании анализа генетических дистанций Нея с использованием метода связывания ближайших соседей.

Дендрограмма показала, что исследованные сорта распределяются на три группы. В первую вошли сорта «Небесный», «Ручеек», «Северный» и «Сокол», созданные селекционерами различных филиалов ВНИИМК в 90-х годах. Во вторую вошли сорта «Уральский», «Кинельский 2000», «Исилькульский» и «Чибис», а в третью - сорта «Август», «ВНИИМК 620», «Исток», «ЛМ 98», «Рациол» и «Илим». Сорта двух последних групп – различного селекционного происхождения, но их объединение в группы указывает на использование в селекционном процессе как минимум двух различных широко используемых предшественников. Вторая и третья группа представляют собой особый

интерес в плане наследования признаков родительских форм, что должно стать материалом для дальнейших исследований и может оказать серьезную помощь в работе селекционеров.

Использованная система SSR-маркеров показала себя с хорошей стороны и в ходе дальнейших работ позволит провести «генетическую паспортизацию» всех реестровых сортов и определить дальнейшие направления селекционных работ.

Список литературы:

1. Челюстникова Т.А., Гучетль С.З., Антонова Т.С. Микросателлитные локусы для идентификации сортов льна масличного селекции ВНИИМК: подбор информативных праймеров и оптимальных условий ПЦР ДНК // Масличные культуры. 2019. – Вып. 2 (178). – С. 41-46. DOI: 10.25230/2412-608X-2019-2-178-41-46
2. Žiarovska J., Ražna K., Senkova S., Štefúnova V. Variability of *Linum usitatissimum* L. based on molecular markers // ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 2012. – Vol. 7 No. 1. – P. 50-58.
3. Ущиповский И.В., Лемеш В.А., Богданова М.В., Гузенко Е.В. Особенности селекции и перспективы применения молекулярно-генетических методов в генетико-селекционных исследованиях льна (*Linum usitatissimum* L.) // Сельскохозяйственная биология. 2016. – Т.51. – №5. – С. 602-616. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.5.602rus
4. Bickel C., Gadani S., Lukacs M., Cullis C. SSR markers developed for genetic mapping in flax (*Linum usitatissimum* L.) // Research and Reports in Biology. 2011. – Vol.2. – P. 23-29. DOI: 10.2147/RRB.S16091

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.068

RAPID METHOD FOR MOLECULAR DIAGNOSTIC OF *DROSOPHILA SIMULANS* WITH CONVENTIONAL PCR

Yousef Naserzadeh^{1,*}, Niloufar Mahmoudi^{1,2}, Elena Pakina¹

1 – Department of Agrobiotechnology, Institute of Agriculture, RUDN University, 117198 Moscow, Russia

2 – All-Russian Plant Quarantine Centre (VNIKR), Moscow, Russia.

*Corresponding author's email: unaserzadeh@gmail.com

Russia, 117198 Moscow, Miklukho-Maklaya St, No 8.

The invasive pest *Drosophila simulans* is a dangerous insect for territory of Russian Federation. *Drosophila simulans* is a species of fruit fly closely related to *D. melanogaster* it was discovered by the fly geneticist Alfred Sturtevant in 1919. The molecular diagnostic method for the *D. Suzukii* from another non-quarantine species *Drosophila* sp has been created. The method that was proposed for differentiation is using 709-bp region of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene. We amplified samples of DNA with primers Dsuz 6 and Dsuz 1 by *D. simulans* collections in the laboratory samples from (Turkey, Iran and Russia) and contrasted with sequences of other GenBank *Drosophila* taxa. Based on DNA sequence polymorphisms, a polymerase chain reaction' (cPCR) results showed that these primers identify exactly the region of the gene, as well as the specific *Drosophila simulans* primer.

Keywords: Identification, *Drosophila*, *Drosophila simulans*, PCR, plant quarantine.

Экспресс-метод молекулярной диагностики *Drosophila simulans* с помощью традиционной ПЦР

Инвазионный вредитель *Drosophila simulans* – опасное насекомое для территории Российской Федерации. *Drosophila simulans* – это вид плодовой мухи, тесно связанный с *D. melanogaster*, который был открыт генетиком Альфредом Стертевантом в 1919 году. Создан метод молекулярной диагностики *D. Suzukii* от другого некарантинного вида *Drosophila* sp. Метод, который был предложен для дифференцировки, заключается в использовании 709-

в области митохондриальной ДНК гена цитохромоксидазы I. Мы амплифицировали образцы ДНК с помощью праймеров Dsuz 6 и Dsuz 1 по D. симулансы собраны в лабораторных образцах из Турции, Ирана и России и контрастируют с последовательностями других генбанковских таксонов дрозофилы. Результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанные на полиморфизме последовательностей ДНК, показали, что эти праймеры точно идентифицируют область гена, а также специфический праймер *Drosophila simulans*.

Ключевые слова: идентификация, дрозофила, *Drosophila simulans*, ПЦР, карантин растений.

REFERENCES:

1. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*. 2000 May;25(1):25-9.
2. Ranz JM, Maurin D, Chan YS, Von Grotthuss M, Hillier LW, Roote J, Ashburner M, Bergman CM. Principles of genome evolution in the *Drosophila melanogaster* species group. *PLoS biology*. 2007 Jun;5(6). doi.org/10.1371/journal.pbio.0050152.
3. Mazzetto F, Pansa MG, Ingegno BL, Tavella L, Alma A. Monitoring of the exotic fly *Drosophila suzukii* in stone, pome and soft fruit orchards in NW Italy. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2015 Jun 1;18(2):321-9. DOI: 10.1016/j.aspen.2015.04.001.
4. Schlenke TA, Begun DJ. Strong selective sweep associated with a transposon insertion in *Drosophila simulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004 Feb 10;101(6):1626-31. doi.org/10.1371/journal.pgen.1000998
5. Dhami MK, Dsouza M, Waite DW, Anderson D, Li D. Real-time PCR assay for the identification of the brown marmorated stink bug (*Halyomorpha halys*). *Frontiers in molecular biosciences*. 2016 Feb 26;3:5. doi.org/10.3389/fmolb.2016.00005
6. Higham JP, Malik BR, Buhl E, Dawson JM, Ogier AS, Lunnon K, Hodge JJ. Alzheimer's disease associated genes ankyrin and tau cause shortened lifespan and memory loss in *Drosophila*. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019;13. doi.org/10.3389/fncel.2019.00260
7. Kenis M, Tonina L, Eschen R, van der Sluis B, Sancassani M, Mori N, Haye T, Helsen H. Non-crop plants used as hosts by *Drosophila suzukii* in Europe. *Journal of Pest Science*. 2016 Jul 1;89(3):735-48. doi: 10.1007/s10340-016-0755-6.
8. Farnsworth D, Hamby KA, Bolda M, Goodhue RE, Williams JC, Zalom FG. Economic analysis of revenue losses and control costs associated with the spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura), in the California raspberry industry. *Pest management science*. 2017 Jun;73(6):1083-90. DOI: 10.1002/ps.5512.
9. Oh WT, Jun JW, Giri SS, Yun S, Kim HJ, Kim SG, Kim SW, Kang JW, Han SJ, Kwon J, Park SC. Morganella psychrotolerans as a possible opportunistic pathogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fisheries. *Aquaculture*. 2020 Jan 25;735021.doi.org/10.3390/microorganisms7090302
10. Katoh T, Izumitani HF, Yamashita S, Watada M. Multiple origins of Hawaiian drosophilids: phylogeography of *Scaptomyza hardy* (Diptera: Drosophilidae). *Entomological Science*. 2017 Jan;20(1):33-44. doi.org/10.1111/ens.12222
11. Naserzadeh Y, Nafchi AM, Mahmoudi N, Nejad DK, Gadzhikurbanov AS. Effect of combined use of fertilizer and plant growth stimulating bacteria *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* and *Pseudomonas* on the quality and components of corn forage in Iran. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2019 Dec 15;14(3):209-24. dx.doi.org/10.22363/2312-797X-2019-14-3-209-224
12. Naserzadeh Y, Mahmoudi N, Pakina E., J Foods Elena, and Raw materials.. Antipathogenic effects of emulsion and nanoemulsion of cinnamon essential oil against *Rhizopus* rot and grey mold on strawberry fruits. 2019. 7(1). doi.org/10.21603/2308-4057-2019-1-210-216

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОМО- И ГЕТЕРОГЕННЫХ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ В
КОЛЛЕКЦИОННОМ ПИТОМНИКЕ****Николаев П.Н., Юсова О.А.****ФГБНУ «Омский АНЦ», 644012, г. Омск, пр. Королева, д.26,**e-mail: ksanajusva@rambler.ru, nikolaevpetr@mail.ru

Проблема идентификации сотов. Гибридов и генотипов культурных растений – одна из самых старых в земледелии. С момента возникновения научной селекции и поступления на рынок товарных семян селекционных сортов проблема их идентификации особую значимость [1]. Полигенность и сложность организации морфогенетических процессов, лежащих в основе их формирования, требует фундаментальных подходов к их изучению [2].

В условиях сурового климата Западной Сибири ячмень является наиболее перспективной культурой как по урожайности, так и по устойчивости к засухе и болезням [3, 4]. Наиболее пригодными для идентификации сортов являются запасные белки. Почти у всех видов растений запасные белки проявляют значительный полиморфизм в отношении заряда, размеров или обоих параметров. Более того, они кодируются генами в различных локусах, присутствуют в сравнительно больших количествах и легко экстрагируются. Следовательно, электрофоретическое исследование состава запасных белков семян является эффективным и удобным способом характеристики генотипа растения и может оказаться пригодным для идентификации сортов.

У ячменя этим требованиям наиболее полно отвечают спирторастворимые запасные белки эндосперма – проламины (гордеины). Гордеины составляют около 50% суммарного белка зерновки, чрезвычайно полиморфны и обладают сортоспецифичностью. Электрофоретические спектры этих белков не зависят ни от условий выращивания растений, ни от условий и длительности хранения семян. Эти белки появляются в эндосперме на 11-й день после оплодотворения и сохраняются как минимум в течение 3-х суток после прорастания зерновки.

Объектом исследований являлись 7 сортов ячменя коллекции ВИР, различных центров селекции: стандартный сорт Омский 91 (ФГБНУ «Омский АНЦ»); Золотник (ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр ИЦиГ Сибирского отделения РАН»); Задонский 8 (ФГБНУ ФРАНЦ); Наран (ФГБНУ Бурятский НИИСХ); Зевс, Княжич (ОАО НПФ «Белселект»); Волгарь, (ФГБНУ «Поволжский НИИ селекции и семеноводства им. П.Н. Константинова).

Изучение наследования гордеинов позволило установить, что в целом электрофоретические компоненты гордеина контролируются семью сцепленно наследуемыми локусами – Hrd A, Hrd B, Hrd C, Hrd D, Hrd E, Hrd F и Hrd G, расположенными на коротком плече хромосомы 5 (1H) ячменя. Среди указанных семи локусов наиболее полиморфными являются три – Hrd A, Hrd B и Hrd F. Остальные четыре локуса (Hrd C, Hrd D, Hrd E, Hrd G) контролируют присутствие или отсутствие отдельных компонентов.

Сорта Задонский 8, Княжич, Зевс и Казак являются линейными по гордеин-кодирующим локусам или мономорфными по гордеинам сортами. Такие сорта имеют только один тип электрофореграмм. Остальные: Омский 91, Наран, Волгарь и Золотник являются гетерогенными по гордеин-кодирующим локусам. Они характеризуются двумя и более электрофоретическими спектрами гордеинов, отличающимися по вариантам блоков компонентов, контролируемым, соответственно, одним или более локусами.

Гетерогенность сорта обусловлена отбором его родоначального растения, которое могло оказаться гетерозиготным по одному, двум или более гордеин-кодирующим локусам.

От того, по скольким локусам родоначальное растение было гетерозиготным, зависит число биотипов. В настоящий момент ученые не пришли к единому мнению о значении гетерогенных сортов. Имеет оно положительную или отрицательную роль, поскольку, с одной стороны, гетерогенность сортов позволяет растениям лучше приспособиться к окружающим условиям среды, с другой – увеличивается риск вырождения сорта.

Так стандартный сорт Омский 91 имеет более сложную структуру популяции по гордеин-кодирующим локусам. Этот сорт состоит из шести биотипов, различающихся по блокам компонентов, контролируемым аллелями локусов – *Hrd A* (HRD A2 и HRD A12), *Hrd B* (Hrd B1 и Hrd B8) и *Hrd F* (Hrd F2 и Hrd F3). Общая формула гордеинов сорта Омский 91: Hrd A2+21 B1+8 F2+3. Но в нашем опыте, в отобранной пробе семян обнаружены три биотипа этого сорта: Hrd A12B1F3, Hrd A12B8F2 и Hrd A2B1F2.

Сорт ярового ячменя Наран состоит из двух биотипов, отличающиеся по блокам компонентов, контролируемым аллелями только локуса *Hrd A*: 1 – Hrd A23 B19 F1, 2 – Hrd A2 B19 F1. Это может объясняться тем, что родоначальное растение сорта Наран было гетерозиготным по локусу *Hrd A* и гомозиготным по локусу *Hrd B*. В результате расщепления гетерозигот в последующих поколениях и возникли два биотипа, различающиеся только по аллелям локуса *Hrd A*.

Сорт Поволжского НИИ селекции и семеноводства Волгарь состоит из двух различающихся по блокам компонентов, контролируемым аллелями локусов – *Hrd A* (Hrd A24 и Hrd A28).

Среднеранний сорт ярового ячменя Золотник в отличие от выше указанных гетерозиготных сортов представлен двумя биотипами, отличающимися по блокам компонентов, контролируемым аллелями локуса *Hrd B* и *Hrd F*.

При анализе гордеинов гетерогенных сортов необходимо отметить и еще одну особенность. Она заключается в том, что, исследуя ограниченную выборку семян, не всегда можно обнаружить все теоретически ожидаемые биотипы. Это касается биотипов, возникающих в результате рекомбинации между тесно сцепленными локусами – *Hrd A* и *Hrd G* (величина рекомбинации между ними составляет 1,5%), локусами *Hrd B* и *Hrd C, D, E, F* (величина рекомбинации составляет от 0,2 до 1,5%). Таким образом, понимание закономерностей наследования гордеинов позволяет различать гетерогенность сорта, обусловленную особенностями его выведения и неоднородность, возникшую в результате засорения.

В ходе исследований была обнаружена идентичность электрофореграмм отдельных биотипов и сортов. Сорта как Задонский 8, Зевс и Княжич вовсе не отличались между собой по электрофоретическим спектрам гордеинов (Hrd A2 B17 F3), рис. 5. В большинстве случаев это результат родственных связей и общей родословной сортов. В производственных посевах сходство аллелей возделываемых сортов создает опасную ситуацию на фоне восприимчивости к заболеваниям. При посеве таких сортов необходимо соблюдать пространственную изоляцию.

Список литературы:

1. Созинов А.А. Проблема качества зерна при интенсивном земледелии. Вестник сельскохозяйственной науки. 1985. № 1; 55-65.
2. Конарев В.Г. Белки пшеницы как генетические маркеры. 1980. 60-120.
3. Николаев П.Н., Юсова О.А., Поползухин П.В. Оценка адаптивного потенциала сортов ярового ячменя селекции ФГБНУ «Омский АНЦ». Земледелие. 2019. № 1; 30-35. DOI: 10.24411/0044-3913-2019-10110.
4. Поползухин П.В., Николаев П.Н., Аниськов Н.И., Юсова О.А., Сафонова И.В., Быков С.А. Агробιοлогическая характеристика кормового сорта ярового ячменя Саша. Достижения науки и техники АПК. 2019. 33 (1); 27–29. DOI: 10.24411/0235-2451-2019-10106.

DIFFERENTIATION OF SILVER (*HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX* VAL.) AND BIGHEAD (*HYPOPHTHALMICHTHYS NOBILIS* RICH.) CARPS USING STR-LOCI

Nosova A.Yu., Kipena V. N., Tsar A. I.

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, Akademicheskaya st., 27, 220072, Minsk, Republic of Belarus
E-mail: A.Nosova@igc.by

Introduction. In commercial aquaculture, with a high frequency, a cross occurs between silver (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and bighead (*Hypophthalmichthys nobilis* Rich.) carps. To increase the efficiency of the formation of repair groups of these species and, subsequently, the selection from them of elite low inbred brood stocks, genetic and phenotypic variability, as well as the physiological state, must be taken into account. When forming uterine herds of herbivorous fish, it is necessary to use at least two-line breeding – reproduction of two unrelated groups of fish with the selection of females and males of different origin. This will allow avoiding closely related crosses and rely on obtaining highly productive, fast-growing fish setting material.

Interspecific hybridization and subsequent introgression between silver and bighead carps can potentially have negative consequences for broodstock and repair herds, as well as the effectiveness of their use in aquaculture. At the same time, the effect of heterosis on the offspring of the silver and bighead carp has not been adequately studied for use in commercial aquaculture [1].

Purpose. The aim of this study is to evaluate the differentiating potential of 11 STR loci to identify hybrid individuals of silver and bighead carps.

Materials and methods. The material used for research was tissue samples from 129 producers of herbivorous fish (silver carp – 63 samples, bighead carp – 66 samples) selected in the Beloozerskoye branch («Opytnyj rybhoz «Selec», Belarus).

As biological samples for molecular genetic studies, biopsy material (fins, muscle tissue, blood, etc.) was used. Total DNA was extracted using commercial DNA Purification Kit (ThermoFisherScientific®, USA), as well as phenol-chloroform and salt extraction techniques [2] with modifications.

Allele diversity was analyzed at 11 STR loci – Hmo11, Hmo13, Hmo15, Hmo25, Hmo26, Hmo31, Hmo33, Hmo 34, Hmo36, Hmo37, Hmo40 [3].

Statistical analysis of the data was performed using the programs GenAIEx v.6.5, STRUCTURE v.2.3.4. In STRUCTURE v.2.3.4 program, the Q criterion was calculated, which characterizes the belonging of each individual to the corresponding cluster (subgroup within the group). Using POPHELPER v1.0.10 web application, a graphical interpretation of the results obtained in STRUCTURE v.2.3.4 was performed.

The main results. Of the 11 STR loci analyzed in the framework of this study, the highest calculated F_{ST} values are shown for the STR loci Hmo15 (0,2214), Hmo33 (0,4957), Hmo40 (0,3500), Hmo25 (0,3356), and Hmo31(0,2458). Information on the allelic diversity and prevalence frequency of specific alleles for the STR loci listed above is presented in [3].

Based on the data obtained, a repeated analysis of the subpopulation structure of the studied samples of silver carp was performed using STRUCTURE v.2.3.4 program based on the results of genotyping of 5 STR loci. As a result the accuracy of silver carp differentiation using the five STR loci was $99.5 \pm 0.3\%$, and of bighead carp differentiation – $99.4 \pm 0.8\%$.

Conclusions. In the Laboratory of Genetic and Cell Engineering (Institute of genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus) together with Republican Daughter Unitary Enterprise «Fish Industry Institute» (Minsk, Belarus) developed and used the technology of genetic identification of herbivorous fish (silver carp, bighead carp and their hybrids). This technology will increase productivity by controlling the formation of interspecific hybrids.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

References:

1. Wang J., Yang G., Zhou G. Quantitative trait loci for morphometric body measurements of the hybrids of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*H. nobilis*) // *Acta biologica Hungarica*. 2013. Vol. 64. No. 2. P. 169-183. DOI: 10.1556/ABiol.64.2013.2.4 doi: 10.1556/ABiol.64.2013.2.4.
2. Sambrook, J., Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
3. Носова А. Ю., Кипень В. Н., Царь А. И. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов у белого (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) и пестрого (*Hypophthalmichthys nobilis* Rich.) толстолобиков, выращиваемых в аквакультуре в Республике Беларусь // Доклады НАН Беларуси. 2019. Т. 63. № 1. С. 79-86 doi: 10.29235/1561-8323-2019-63-1-79-86

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.071

МЕТОД ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩЕГО АНАЛИЗА КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК (HRM) ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТИПА ЦИТОПЛАЗМЫ И *Ms* ЛОКУСА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ

Нзеха М.¹, Кудрявцева Н.А.^{1,2}, Никитина Е.А.², Ермолаев А.С.^{1,2}, Хрусталева Л.И.^{1,2}

1 – ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550;

E-mail: mais123nzeha@gmail.com

2 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550; E-mail: biotech@iab.ac.ru

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) растений контролируется митохондриальным геномом и проявляется в стерильности пыльцы, которая может быть подавлена ядерным геном, восстанавливающим мужскую фертильность (*Ms*). Ручная кастрация на луке очень трудоемкое и, можно сказать, практически невыполнимое, так как в одном соцветии – зонтике находится сотни цветков. Сейчас гибридные семена лука, как и других овощных культур, производят с использованием ЦМС. Два источника ЦМС были генетически охарактеризованы на луке. Цитоплазма S широко используется производителями семян из-за стабильной мужской стерильности, отсутствия снижения женской фертильности и относительно частого появления рецессивного аллеля в ядерном локусе восстановления мужской фертильности (*ms*), позволяющем семенное размножение линий с мужской стерильностью (Jones and Clarke 1943). Второй источник цитоплазмы с мужской стерильностью (Т) был идентифицирован Berninger (1965), генетически охарактеризован Schweisguth (1973) и используется для получения гибридных семян лука в Европе. Семенное размножение растений с мужской стерильностью (*Smsms*) возможно путем скрещивания с линией закрепителем (*Nmsms*), определение которой является важным этапом селекционных программ получения гибридных семян.

Сборка полной митохондриальной последовательности цитоплазмы CMS-S предполагает, что химерный ген *orf725* является лучшим кандидатом, ответственным за индукцию CMS (Kim *et al.* 2016). Кроме того, митохондриальный геном нормальной (N) цитоплазмы и цитоплазмы CMS-T почти идентичны друг другу за исключением *orf725* гена, предполагая, что мужская цитоплазматическая стерильность как CMS-S, так и CMS-T может быть вызвана *orf725* и восстановлена фертильность локусом *Ms* (Kim *et al.* 2019a). Для определения генотипа *Ms* локуса несколькими научными группами были созданы различные молекулярные маркеры RFLP, SCARs и SNP (Gokse *et al.* 2002, Engelke *et al.* 2003, Kim 2014). Хотя не все эти маркеры действительно были тесно сцеплены с *Ms* локусом. Как было установлено позже, *Ms* локус расположен в регионе с супрессией рекомбинации (Khrustaleva *et al.* 2016).

Идентификация отдельных растений или инбредных линий, которые поддерживают CMS, требует определения типа цитоплазмы, а также генотипа в ядерном локусе *Ms*. Использование классического тестового скрещивания требует много времени, а учитывая двухгодичную генерацию лука репчатого, этот процесс может занять четыре или больше лет. Поэтому поиск простых, надежных и воспроизводимых молекулярных маркеров определения типа цитоплазмы и генотипа в ядерном локусе *Ms* является актуальной задачей в селекции и производстве гибридных семян лука репчатого.

В нашей работе мы использовали метод высокоразрешающего анализа кривых плавления ДНК (HRM, High Resolution Melting). Преимуществом этого метода является простота, специфичность и высокая чувствительность в анализе точечных мутаций. Принцип основан на разнице температуры плавления альтернативных аллелей. HRM анализ типа цитоплазмы был проведен с использованием праймеров, разработанных на последовательность генов *orf725* и *cox1* (Kim & Kim 2019b). HRM анализ *Ms*-локуса был проведен с праймерами, разработанными на *pms1* ген, вовлеченный в систему репарации неправильного спаривания, предполагаемый ген-кандидат восстановления мужской стерильности (Kim *et al.* 2015). Исследования были проведены на образцах лука репчатого, *Allium cepa* L., сорта Халцедон, Банко, Валенсия и ЛФК (контроль с известной Т-цитоплазмой); образцы *A. galanthum*, полученные из селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева РГАУ-МСХА (ГФМ) и предоставленные профессором Havey, Wisconsin-Madison University (Havey).

Нами были оптимизированы условия проведения высокоразрешающего анализа кривых плавления ДНК (HRM) на амплификаторе Roche LightCycler® 96. Измерение кинетики диссоциации молекул ДНК было выполнено с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen. HRM анализ у *A. galanthum* (ГФМ) выявил наличие в гомозиготе рецессивного аллеля (*msms*) и N-тип цитоплазмы, а у *A. galanthum* (Havey) - в гомозиготе доминантный аллель (*MsMs*) и N-тип цитоплазмы. HRM анализ типа цитоплазмы показал следующее: *A. cepa* «Банко» – N-цитоплазма; *A. cepa* «ЛФК» – Т-цитоплазма; *A. cepa* «Валенсия» – Т-цитоплазма, «Халцедон» - Т-цитоплазма.

Полученные нами результаты позволяют рекомендовать метод HRM для определения типа цитоплазмы и аллельного состояния *Ms*-локуса, тесно связанного с геном восстановителем фертильности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ проекта № 20-46-07005.

Список литературы

1. Berninger, E. (1965). Contribution a l'etude de la sterilité male de l'oignon (*Allium cepa*). *Ann. Amélior Plant*, 15, 183-199.
2. Engelke, T., Terefe, D., & Tatlioglu, T. (2003). A PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 107(1), 162-167.
3. Gökçe, A. F., & Havey, M. J. (2002). Linkage equilibrium among tightly linked RFLPs and the *Ms* locus in open-pollinated onion populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(6), 944-946.
4. Khrustaleva, L., Jiang, J., & Havey, M. J. (2016). High-resolution tyramide-FISH mapping of markers tightly linked to the male-fertility restoration (*Ms*) locus of onion. *Theoretical and applied genetics*, 129(3), 535-545.
5. Kim, S. (2014). A codominant molecular marker in linkage disequilibrium with a restorer-of-fertility gene (*Ms*) and its application in reevaluation of inheritance of fertility restoration in onions. *Molecular breeding*, 34(3), 769-778.
6. Kim, S., Kim, C. W., Park, M., & Choi, D. (2015). Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(11), 2289-2299.

7. Kim, B., Yang, T. J., & Kim, S. (2019). Identification of a gene responsible for cytoplasmic male-sterility in onions (*Allium cepa* L.) using comparative analysis of mitochondrial genome sequences of two recently diverged cytoplasms. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(2), 313-322.
8. Kim, B., & Kim, S. (2019). Identification of a variant of CMS-T cytoplasm and development of high resolution melting markers for distinguishing cytoplasm types and genotyping a restorer-of-fertility locus in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 215(10), 164.
9. Schweisguth, B. (1973). Etude d'un nouveau type de sterilité male chez l'oignon, *Allium cepa* L. In *Annales de l'Amélioration des Plantes*.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.072

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИСТОЧНИКОВ ЦМС ЯРОВОГО РАПСА

Павлов Р.Е.², Дудников М.В.¹, Коленков М.А.¹, Соловьев А.А.¹

1 – ФГБНУ ВНИИСБ, Россия, Москва, 127550 Тимирязевская ул., 42;

**2 – ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, Москва, 127550
Тимирязевская ул., 49**

Рапс – ценная масличная и кормовая культура, которая по пищевым и кормовым достоинствам превосходит многие другие сельскохозяйственные культуры. В семенах рапса содержится до 40-45% полувысыхающего масла и 21-33% белка. Рапсовое масло содержит ненасыщенные жирные кислоты (олеиновую, линоленовую, линолевую), обладает высокой калорийностью, по вкусовым и питательным свойствам приравнивается к оливковому. Широкое применение оно находит в химической отрасли и многих других областях народного хозяйства.

Повышение урожайности рапса связано с использованием эффекта гетерозиса, что является важным резервом увеличения производства маслосемян в мире и весьма перспективным направлением в селекции ярового рапса.

Для получения гибридов ярового рапса в промышленных масштабах наиболее удобным и технологичным является использование цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) и генов восстановления фертильности. Различные линии ЦМС были используются при производстве гибридного рапса F₁, включая аллоплазматический тип цитоплазмы Ogu₁ редиса, то есть Ogu-ЦМС, эндогенные цитоплазмы, такие как Nap, Pol. Кроме того, у *B. napus* были описаны и другие типы аутоплазматических и аллоплазматических цитоплазм, включая Tour-ЦМС, ЦМС *Moricandia arvensis*, Nsa-ЦМС и Nau-ЦМС.

В результате исследований были протестированы сортообразцы, использующиеся в селекционном процессе. Идентифицированы митотипы растений ярового рапса. Определены сортообразцы несущие ген-восстановитель фертильности для ЦМС типа Ogu. Для того, чтобы быстро отличать цитоплазму типа Ogu от типов Cam и Pol, был адаптирован мультиплексный анализ с двумя парами праймеров, MSS6 и MSS14. Скрининг коллекции показал, что из 11 растений пяти образцов с цитоплазмой Pol один образец несет ген *Rfo*; четыре образца с цитоплазмой Ogu, из них два образца несут ген *Rfo*; один образец имеет цитоплазму Nap; и один образец – цитоплазму Cam.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *MSTN* С ЭКСТЕРЬЕРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ КУР ПУШКИНСКОЙ ПОРОДЫ**Пегливанян Г.К., Дементьева Н.В.**

***Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных,
филиал ФГБНУ Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им.
академика Л.К. Эрнста
E-mail: spbvniigen@mail.ru***

В птицеводстве показатели, отражающие скорость роста молодняка и экстерьерные характеристики кур – важные ориентиры для селекции. Традиционный селекционный отбор, основанный на фенотипической оценке, отличается невысокой эффективностью при низком коэффициенте наследуемости признака, в малочисленных группах животных и птиц, разводимых в биоресурсных коллекциях, его сложно применить. Использование молекулярно-генетических маркеров, связанных с экономически значимыми признаками, позволяет проводить ранний отбор птицы. Что позволяет повысить рентабельность птицеводства [1]. В настоящее время интерес к малочисленным популяциям в животноводстве растет, так как эти популяции являются источником неисчерпаемых генетических ресурсов [2]. Исследования молекулярных маркеров в популяции породы пушкинская дают обширные знания о генетике признаков. Таким образом, анализ аллельного разнообразия и связь с продуктивными признаками породы пушкинская является актуальной и значимой задачей.

Целью нашего исследования было определение влияния проводимой MAS-селекции по SNP MST2244 в гене миостатина на экстерьерные характеристики кур пушкинской породы из биоресурсной коллекции Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных (ВНИИГРЖ).

Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из крови кур экспериментальной популяции пушкинской породы. Популяция была сформирована на базе биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (Пушкин. Санкт-Петербург). При рождении цыплята индивидуально помечались. В ходе выращивания проводили их регулярное взвешивание в возрасте 7, 14, 33, 39 и 90 дней. Одновременно вели выбраковку больных или травмированных цыплят.

Изучены две однонуклеотидные замены в экзоне 1 гена миостатина: G/A в положении MST2109 и G/C в положении MST2244. По частоте встречаемости обнаружено существенное преобладание в локусе MST2244 дезоксирибонуклеозидтрифосфата G над C и в локусе MST2109 – A над G [3]. Птицу с желательными аллелями A и G отбирали в племенное ядро. В возрасте 330 дней птицу взвесили и оценили экстерьерные показатели. Выявленная связь между аллелями и фенотипическими признаками позволит научно-обоснованно планировать селекционную работу, направленную на повышение генетического потенциала породы пушкинская.

Список литературы:

1. Дементьева Н.В., Вахрамеев А.Б., Ларкина Т.А., Митрофанова О.В. Эффективность использования SNP-маркеров в гене *MSTN* в селекции кур пушкинской породы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(8):993-998. DOI 10.18699/VJ19.575
2. Cruz V., Schenkel F., Savegnago R., Grupioni N., Stafuzza N., Sargolzaei M., Ibelli A., Peixoto J., Ledur M., Munari D. Association of apolipoprotein B and adiponectin receptor 1 genes with carcass, bone integrity and performance traits in a paternal broiler line. PLoS One. 2015;10(8):e0136824. DOI 10.1371/journal.pone.0136824.
3. Дементьева Н.В., Митрофанова О.В., Тыщенко В.И., Терлецкий В.П., Яковлев А.Ф. Скорость роста и продуктивность бройлерного кросса кур с разными полиморфными

типами гена миостатина. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):39-43. DOI 10.18699/VJ16.154

Исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А18-118021590138-1 с использованием популяций кур из биоресурсной коллекции ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, Пушкин).

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.074

РАЗРАБОТКА НОВЫХ МАРКЕРОВ НА ЛОКУС *Pl6*, ОТВЕЧАЮЩИЙ ЗА УСТОЙЧИВОСТЬ *HELIANTHUS ANNUUS* К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ

Пырников А.С., Сыксин С.В., Милюкова Н.А., Соловьев А.А.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550
E-mail: Stason_16@inbox.ru

Ложная мучнистая роса – заболевание, которое вызывает облигатный грибной паразит *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni. Источниками инфекции являются зооспоры, мицелий в зараженных семенах и ооспоры, которые могут сохраняться в почве в жизнеспособном состоянии до 7 лет, зараженные растительные остатки и всходы падалицы подсолнечника. На протяжении вегетационного периода грибок распространяется при помощи зооспорангиев. Заболевание поражает растения подсолнечника в основном на ранних стадиях развития, растения имеют слаборазвитую корневую систему, карликовый вид, нарушается гелиотропизм. Исследования генетических основ резистентности растений подсолнечника к паразиту позволили определить специфические гены, обуславливающие устойчивость растения к различным расам *P. halstedii*. Устойчивость подсолнечника к этому патогену обеспечивают специфичные доминантные гены, находящиеся в локусах как *Pl*. В настоящее время выделено более 35 патотипов возбудителя, что обуславливает необходимость установления вариантов генов локуса *Pl*, для возможности проведения маркерной селекции подсолнечника, нацеленную на приобретение устойчивости к данному паразиту. Наиболее перспективным локусом, связанным с устойчивостью к большинству распространенных в РФ рас, включая самые новые и высокопатогенные, показал себя локус *Pl6*. На данный момент известно 14 маркеров данного локуса, названных NBS1-14, отличающихся по размеру (InDel). Было установлено, какие варианты отвечают за устойчивость и чувствительность к инфицированию, однако при использовании имеющихся в литературе последовательностей праймеров, сохраняется сложность интерпретации результатов ввиду большого количества неспецифичных ампликонов.

Работу проводили в лаборатории маркерной и геномной селекции растений ФГБНУ ВНИИСБ и на базе центра коллективного пользования «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ. Биоинформатический анализ и обработку данных осуществляли через программное обеспечение UGENE (Россия) и AliView (Швеция). Синтез праймеров, расходные материалы для ПЦР и капиллярного электрофореза произведены компанией «Синтол».

Нами разработана новая система праймеров, для определения наличия, отсутствия и установлении размера каждого варианта локуса с соотносением его с устойчивостью/восприимчивостью к фитопатогену, а благодаря методам фрагментного анализа появляется возможность проведения полной диагностики маркеров NBS в одной реакции. Принцип построен на трех прямых флуоресцентномеченных праймерах разными флуорофорами, и десяти обратных. В комбинации праймеров, ПЦР-ампликоны имеют разброс по размерам в пределах 150-1100 нуклеотидов, что позволяет проводить диагностику методом капиллярного электрофореза, напротив 1600-3500 с использованием классических праймеров. На данном этапе проводится подбор оптимальных условий

комбинационной ПЦР с установлением всех вариантов изучаемых локусов на предмет появления неспецифичных продуктов, а также возможно отсутствующих в базе данных нуклеотидных последовательностей, локусов.

Список литературы:

- 1) Рамазанова, С.А. Использование SNP-маркеров для идентификации локусов *Pl5* и *Pl8*, контролирующих устойчивость подсолнечника к *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni / С.А. Рамазанова и др. // Масличные культуры. – вып. 3. – 2019. – с.21
- 2) Jocić, S. Towards sustainable downy mildew resistance in sunflower / S. Jocić, D. Miladinović, I. Imerovski, A. Dimitrijević, S. Cvejić, N. Nagl, A. Kondić-Špika // Helia. – 2012. – 35:61–72
- 3) Melaku, A. G. Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: Genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance gene *Pl1* / Melaku Ayele Gedil, Mary B. Slabaugh, Simon Berry, Richard Johnson, Richard Michelmore, Jerry Miller, Tom Gulya, and Steven J. Knapp // NRC Research Press Web site., – March 2001. – Vol.44, – p.205
- 4) Radwan, O. Induction of a sunflower CC-NBS-LRR resistance gene analogue during incompatible interaction with *Plasmopara halstedii* / O. Radwan, S. Mouzeyar, P. Nicolas and M. F. Bouzidi // Journal of Experimental Botany. – February 2005. – Vol. 56, – No. 412, pp. 567–575,
- 5) Bouzidi, M.F. Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers / M.F. Bouzidi, S. Badaoui, F. Cambon, F. Vear, De Labrouhe D. Tourvielle, P. Nicolas, S. Mouzeyar // Theor Appl Genet. – 2002. – V. 104. – pp. 592–600.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.075

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РИСА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ

Савенко Е.Г., Мухина Ж.М.

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
научный центр риса», Краснодар, п. Белозерный, 3, 350921**

E-mail: avena5@rambler.ru

В развитых рисоводческих странах (Австралия, Западная Европа, США, Япония, Китай) прогресс в рисоводстве осуществляется как за счет биогенных, так и техногенных факторов интенсификации. Самый главный из них - использование современных селекционных методов при создании новых сортов. В зарубежных селекционных программах риса биотехнологические подходы и приемы, в первую очередь, молекулярное маркирование хозяйственно важных генов, и, в частности, устойчивости к пирикуляриозу, применяется очень широко, например, IRRI (Филиппины); CIRAD (Франция) и др.

Большинство генов устойчивости к пирикуляриозу, идентифицированных у риса, определяют непоражаемость растений ограниченным числом рас патогена. Хорошо известно, что такие гены при пирамидировании в одном генотипе могут обеспечить стабильную устойчивость к болезни. Существуют также гены, детерминирующие устойчивость широкого спектра и являющиеся важным генетическим ресурсом для селекции. К таким генам относят *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33* (Deng Y. et al., 2006). Многочисленные исследования показывают, что наибольший эффект перечисленные гены проявляют при совместном действии (Girish Kumar K. et al., 2000; Correa-Victoria F.J. et al., 2003).

В ходе исследований, проведенных коллективом сотрудников «ФНЦ риса», сформирована коллекция доноров эффективных генов расоспецифической устойчивости к пирикуляриозу, а также генов широкого спектра устойчивости к патогену на основе обмена образцов риса между российскими и китайскими учеными. Беккроссом эти гены введены в

элитную генетическую плазму риса. В результате на основе образцов российской и китайской селекции созданы ценные образцы риса. Маркерный контроль целевых генов позволил выявить линии, обладающие заданными характеристиками и несущие гены устойчивости к патогену. Эти образцы проведены через культуру пыльников *in vitro*, в результате чего ускоренно получены генетически стабильные (гомозиготные) формы и создана коллекция удвоенных гаплоидов (DH).

Начато формирование пополняемой базы данных, содержащей микросателлитные (или SNP) профили удвоенных гаплоидов, а также созданных на их основе селекционно ценных образцов риса.

Таким образом, сочетая методы классической селекции с современными биотехнологиями, позволяющими проводить анализ данных генотипов растений на основе молекулярного маркирования, быстро стабилизировать полученные ценные генотипы за счет экспериментальной гаплоидии, удастся существенно повысить эффективность и скорость селекционной работы (с 8-10 лет традиционной селекции до 4-5 лет) по выводу на внутренние рынки страны сортов нового поколения, обладающих комплексом хозяйственно ценных признаков и адаптированных для биологического (безпестицидного) земледелия, что играет большое значение в условиях высокой конкурентной среды агробизнеса и чрезвычайно важно для здоровья и долголетия наций.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-516-53001 ГФЕН_а «Создание и применение предселекционных ресурсов риса с пирамидированными генами широкого спектра устойчивости к возбудителю пирикулярриоза».

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.076

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КРОВИ БЫЧКОВ КАЗАХСКОЙ БЕЛОГОЛОВОЙ ПОРОДЫ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПО ГЕНАМ *CAPN1* И *GH*

Селионова М.И.¹, Плахтюкова В.Р.²

1 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва 127550, E-mail: m_selin@mail.ru

2 – ВНИИОК – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр», Ставрополь 355017, E-mail: viktoriyaplahtyukova@mail.ru

Одной из основных задач селекционно-племенной работы является получение и тиражирование животных с заданными хозяйственно-полезными признаками. Генетическое маркирование мясного скота, в сочетании с основными зоотехническими методами, во многом способствует решению этой задачи и позволит ускорить процесс создания стад с генетически высоким потенциалом продуктивности.

Гены кальпаина (*CAPN1*) и гормона роста (*GH*) рассматриваются как одни из перспективных локусов, в селекции мясного скота для увеличения и улучшения количественно-качественных характеристик мясной продуктивности. Кальпаин (*CAPN1*), контролирует функцию ослабления связей между пучками мышечных волокон, вследствие декомпозиции кальций-зависимой цистеин-протеазы и создает условия для равномерного распределения внутримышечного жира между волокнами, что и обеспечивает «мраморность» мяса и, следовательно, его нежность и сочность [8].

Соматотропный гормон или ген гормона роста (*GH*) является одним из ключевых гипофизарных регуляторов соматического роста животных, а также играет важную роль в углеводно-жировом обменном процессе [1, 7].

Морфо-биохимические и гематологические исследования позволяют выявить содержание в крови элементы, которые играют важное диагностическое и прогностическое значение в предопределении общего физиологического состояния организма животного. Кроме того, биохимические показатели важны для контроля напряженности обмена

веществ, и в случае значительных отклонений, позволяют вовремя принимать корректирующие действия для обеспечения здоровья животных и высокого уровня их продуктивности [2].

Казахская белоголовая порода является одной из первых выведенных большим коллективом ученых-исследователей и практиков скороспелой мясной породой отечественной селекции, которая получила достаточно широкое распространение в Южном и Северо-Кавказском регионах (на 01.01.2020 года насчитывалось 40,7 тыс. гол.). Однако комплексных исследований ее генетических характеристик и биохимического статуса животных разных генотипов по генам гормона роста и кальпаина не проводилось, что и определило актуальность настоящей работы.

Одной из задач собственных исследований было изучение жирнокислотного состава плазмы крови бычков разных генотипов по генам кальпаина и гормона роста. Актуальность их проведения была обусловлена тем, что липиды в метаболическом отношении очень активны: они составляют 70,0% нервной ткани, основу мембран и клеточных органелл, гормонов, ферментов [3]. Им принадлежит важная роль в обменных процессах животного организма не только как источника энергии, но и присущи более существенные функции – структурные, регуляторные. В метаболических процессах липиды принимают участие главным образом в виде свободных жирных кислот, в том числе насыщенных (предельных), ненасыщенных (непредельных), структура которых зависит от числа углеродных атомов.

Следует отметить, что жирные кислоты не только играют важную роль в жизнедеятельности организма, формировании продуктивности, но и некоторые из них выполняют роль сигнальных молекул, включенных в процесс экспрессии отдельных генов. Это свидетельствует о том, что образование жира в жировой ткани жвачных животных находится под генетическим контролем [9].

Для исследования было отобрано 36 проб крови (по 6 животных для каждой группы) бычков разных генотипов *CC*, *CG* и *GG* гена *CAPN1*, *VV*, *LV* и *LL* гена *GH* казахской белоголовой породы. Содержание жирных кислот (ЖК) в плазме крови определяли методом газожидкостной хроматографии в виде метиловых эфиров на газовом хроматографе «Кристалл 200» с капиллярной колонкой HP-FFAP 50 m 0,32 mm 0,5 μ m (США). Идентификацию ЖК осуществляли с использованием стандартов фирмы Sigma и Fluka. Количественное определение ЖК проводилось с использованием программного обеспечения «Хроматэк Аналитик» [4]. Биохимические исследования крови (общий белок, его фракции, глюкоза, кальций, фосфор, магний) проводили на автоматических биохимических анализаторах и согласно методикам, указанным в «Методах ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник» [6] и Методических указаниях по применению унифицированных биохимических методов исследования крови, мочи в ветеринарных лабораториях [5].

Выявлено, что у носителей генотипов *CC* и *VV* генов *CAPN1* и *GH* количество эритроцитов в крови составляло 6,42 и $7,2 \times 10^{12}/л$, и они имели превосходство над бычками *GG*- и *LL*-генотипов на 0,8% и 6,7% ($P > 0,05$) соответственно. Более высокое содержание эритроцитов в крови бычков сопровождалось бóльшим уровнем гемоглобина. Уровень лейкоцитов и глюкозы в крови достоверно превалировал у бычков *CC-CAPN1* и *VV-GH* генотипов над *GG-CAPN1* и *LL-GH* генотипами на 1,8 и $1,0 \times 10^9/л$ и 3,6 и 3,5 мг/% соответственно ($P < 0,05$). Достоверное превосходство на 7,9–8,6% ($P < 0,05$) отмечено по уровню общего белка и соотношению белковых фракций. При сопоставлении содержания кальция, фосфора и магния значимых различий между животными разных генотипов не выявлено.

Показатели резистентности организма позволили выявить некоторое превосходство бычков *CAPN1-CC* и *GH-VV* генотипов по бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки над бычками *GG* и *LL*-генотипов – на 1,36 и 1,2 абс.%% и 3,9 и 1,2 абс.%%.

Полученные данные позволяют предположить, что в клетках органов и тканей бычков *CAPN1-CC* и *GH-VV* генотипов отмечался несколько более интенсивный уровень

окислительно-восстановительных функций, что положительно влияет на обменные процессы в организме, которые в свою очередь могут влиять на формирование более высокой их продуктивности.

Сравнительный анализ жирнокислотного состава крови бычков разных генотипов свидетельствует как о его схожести, так и различии. Качественный состав был идентичен, однако что касается количества, то больший процент от общей суммы жирных кислот у исследуемого поголовья составили такие насыщенные кислоты, как пальмитиновая, стеариновая, и ненасыщенные – олеиновая и линолевая кислоты.

У бычков гомозиготных *СС*- и *VV*-генотипов генов *CAPN1* и *GH* сумма ненасыщенных жирных кислот в плазме крови была выше, чем у гомозиготных *GG*- и *LL*-вариантов соответственно на 6,3% и 7,1%. Превалирование уровня ненасыщенных жирных кислот над насыщенными определило и меньшие значения индекса направленности липидного обмена (ИНЛ) у *СС*- и *VV*-генотипов – 0,92 и 1,00 против 1,04 и 1,13 у *GG*- и *LL*-генотипов. Сравнительный анализ содержания общих липидов, холестерина и глюкозы в крови выявил, что у *СС*-, *VV*-гомозигот и *CG*-, *LV*-гетерозигот общее количество липидов, глюкозы в крови было ниже в среднем на 11,2 %, при более высоком уровне холестерина в среднем на 12,8 %, чем у *GG*- и *LL*-гомозигот.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что интенсивность липидного обмена у молодняка казахской белоголовой породы зависела от генотипа по генам *CAPN1* и *GH*. Можно предположить, что животные – носители желательных *С*- и *V*-аллелей в гомо- и гетерозиготном состоянии с большей интенсивностью использовали энергетические компоненты крови при реализации биосинтетических процессов.

Список литературы:

1. Бейшова И.С. Фенотипические эффекты генов соматотропинового каскада, ассоциированных с мясной продуктивностью у коров казахской белоголовой породы / И.С. Бейшова // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – № 1. – С. 48–53.
2. Громыко Е.В. Оценка состояния организма коров методами биохимии / Е.В. Громыко // Экологический вестник Северного Кавказа. – 2005. – Т. 1. – № 2. – С. 80-94.
3. Козлов М.В. Влияние характеристик липидов на функционирование физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / М.В. Козлов. – Москва, 2007. – 24 с.
4. Людина А.Ю. Определение кислот трикарбонового цикла в плазме крови человека методом газожидкостной хроматографии / А.Ю. Людина, Т.И. Кочан, Е.Р. Бойко // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 11. – С. 13–15.
5. Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследований крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях / МСХ СССР, Гл. управление ветеринарии, ВАСХНИЛ, Отделение ветеринарии / Подготовлены В.Т. Самохиным и др. – М.: ВАСХНИЛ, 1981. – 85 с.
6. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник. / Под ред. И.П. Кондрахина. – М.: КолосС, 2004. – 520 с.
7. Седых Т.А. Влияние полиморфизма гена гормона роста (*GH*) на развитие мышечной и жировой тканей у молодняка мясного скота / Т.А. Седых, Л.А. Калашникова, Р.С. Гизатуллин // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 252-253.
8. Сонич Н.А. Показатели мясной продуктивности абердин-ангус × черно-пестрых быков в зависимости от генотипов по генам тиреоглобулина (*TG5*), кальпаина (*CAPN1*) и миостатина (*MSTN*) / Н.А. Сонич, О.А. Епишко, Л.А. Танана, В.В. Пешко, О.В. Вертинская // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сб. науч. трудов. – Гродно, 2019. – С. 226–235.
9. Roh S.-G. Control of adipogenesis in ruminants / S.-G. Roh, D. Hishikawa, Y.-H. Hong // Animal Science Journal. – 2006. – Vol. 77. – № 5. – P. 472–477. DOI 10.1111/j.17400929.2006.00374.x

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИПОРОДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ПОПУЛЯЦИИ СОВЕТСКИХ ТЯЖЕЛОВОЗОВ МЕТОДОМ АНАЛИЗА STR-ЛОКУСОВ

Сигаева А.С.¹, Дудников М.В.², Цыганок И.Б.¹

***1 – ФГБОУ ВО "Российский государственный аграрный университет - МСХА имени
К.А. Тимирязева"; 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
E-mail: alexandra9954@gmail.com***

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

Высокая скорость интенсификации животноводства привела к необходимости развития генетических методов селекционной оценки животных (genomic breeding values – GBV) [1]. Сегодня довольно сложно корректно диагностировать наследственные заболевания лошадей, вести селекцию лошадей по генеалогическим группам или полезным сельскохозяйственным признакам, без использования методов генетического анализа. В этих целях применяются подходы, основанные на выявлении ассоциаций изменчивости признаков животных с полиморфизмом разных геномных элементов, от STR-локусов до миллионов мононуклеотидных замен (SNP) [1] и исследованием GWAS (genome-wide association studies).

М. А. Зайцева писала, что повышение эффективности контроля происхождения племенных лошадей – одна из важнейших задач племенного коневодства [2]. На сегодняшний день, наиболее часто для генетической экспертизы и проведения контроля достоверности происхождения используются микросателлитные маркеры, которые позволяют располагать более точными данными, в отличие от проводимого ранее анализа на генетический полиморфизм белков крови [3]. Метод анализа коротких tandemных повторов рекомендован Международным обществом по изучению генетики животных (ISAG) [3]. В 2004 году сообществом была предложена панель из 12 основных и 5 дополнительных STR-маркеров, рекомендуемых для определения внутрипородного полиморфизма [2].

Советские тяжеловозы, порода лошадей, выведенная путем сложного воспроизводительного и поглотительного скрещивания, на Починковском (Нижегородская область) и Мордовском конных заводах. Официально утверждена как самостоятельная порода в 1952 году. Порода выводилась путем скрещивания брабансонов с местными упряжными лошадьми, позже для создания новой породы использовали першеронов, битюгов, суффольков и арденов. В настоящее время разводится на Починковском и Перевозском конных заводах. Был проведен анализ внутрипородного полиморфизма по 17 микросателлитным локусам ДНК 53 животных, полученной из волосяных луковиц. Образцы были предоставлены кафедрой коневодства РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Перевозским конным заводом. Фрагментный анализ проводился на приборе НАНОФОР-05, в результате, получены предварительные данные о гетерогенности исследуемой популяции.

Список литературы:

1. Глазко В.И. Полилокусное генотипирование крупного рогатого скота по участкам гомологии к ретротранспозонам / В.И. Глазко, Г. Ю. Косовский, С.Н. Ковальчук, Т.Т. Глазко // Сельскохозяйственная биология, 2015. - том 50. - № 6. - с. 766-775.
2. Зайцева М.А. Использование микросателлитных маркеров ДНК в контроле происхождения лошадей // Мат. Меж. науч. практ. конф. молодых ученых и специалистов "Вклад молодых ученых в развитие аграрной науки 21 в." - Рязань, 2004. - С.105-107.

3. Цыганок И.Б. Рябова Е.В., Сушко Ю.В. Генетический полиморфизм трансферрина и церулоплазмينا у лошадей першеронской и русской верховой породы / И.Б. Цыганок, Е.В. Рябова, Ю.В. Сушко. - Сб. научных докладов. - ВНИИК. - Дивово, 1999. - С. 55-57.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.078

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА СОРТОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ SSR-МАРКЕРОВ

Смирнова Е.В., Базанов Т.А., Михайлова П.Д., Логинова Н.Н.

***ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», г. Тверь,
Комсомольский просп., 17/56, 170041
Email: ev.smirnova@fncl.ru***

Лен-долгунец – важнейшая российская техническая культура комплексного использования. Лен является безотходной культурой, все составные части которой могут быть использованы в различных отраслях промышленности: текстильной, химической, фармацевтической, медицинской, пищевой и др. [1].

Сорта льна-долгунца трудноразличимы морфологически, поэтому одной из важных задач селекции является изучение генетического разнообразия и внутривидовой дифференциации сортов. На основании знаний о генетической структуре различных сортов льна, характере распределения генетической изменчивости сортов, принадлежащим разным географическим регионам происхождения, может быть оценен их генетический потенциал и возможность дальнейшей селекции, а также возможна разработка генетических паспортов различных сортов льна.

Для идентификации и паспортизации льна-долгунца можно использовать различные генетические методы, но более перспективным является метод использования молекулярных маркеров, в частности, SSR-маркеров (Simple Sequence Repeats). SSR-маркеры ограничивают простые повторяющиеся последовательности в геноме растения. Преимуществами использования SSR-маркеров являются высокая полиморфность, точность, хорошая воспроизводимость, повсеместное распределение в геноме [2]. Для культуры льна создано несколько сотен таких маркеров, различающихся между собой по уровню полиморфизма.

Материалом для исследования послужили 16 сортов льна-долгунца, включенных в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации: Сурский, Тверской, Зарянка (оригинатор – Институт льна, филиал, г. Торжок, Тверская обл.); Добрыня, Пересвет (оригинатор – Псковский ИСХ, филиал, г. Псков); Тост 4, Тост 5, Памяти Крепкова (оригинатор – Сибирский НИИСХиТ, филиал, г. Томск), Василек, Веста, Грант, Ласка, Левит 1, Пралеска (оригинатор - РУП Институт льна, Беларусь, д. Устье); Мерилин (г. Слэйскил, Нидерланды), Агата (г. Лелистад, Нидерланды).

Семена льна-долгунца представленных сортов проращивали в течение 2 недель, затем из листьев проростков выделяли ДНК с применением СТАВ-метода. После выделения ДНК осуществляли проведение ПЦР с использованием набора флуоресцентно меченых праймеров (12 пар), разработанных и синтезированных ООО «НПФ Синтол» (г. Москва) [3]. Для проведения ПЦР использовался амплификатор T100 (BIO-RAD).

Фрагментный анализ полученных продуктов амплификации осуществляли с использованием генетического анализатора НАНОФОР-05. Обработку полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения «ДНК ФА».

В результате проведенного анализа были получены генетические характеристики каждого исследуемого сорта льна-долгунца в виде набора фрагментов ДНК определенной длины. Полиморфные локусы, выявленные с помощью 12 пар праймеров, были использованы для создания SSR-базы данных изученных сортов льна. Полученные данные

были применены для создания «генетических паспортов» в виде буквенно-цифровой записи. SSR-база данных позволила провести анализ генетического сходства изученных форм льна и построить дендрограмму генетического подобия методом невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA).

Анализ дендрограммы показывает, что исследованные сорта можно разделить на несколько групп. В первую группу вошли сорта голландской (Мерилин и Агата) и белорусской селекции (Веста и Грант). Это может свидетельствовать, что белорусские селекционеры в качестве предшественников своих сортов использовали голландский селекционный материал. Во вторую группу выделились сорта Сурский, Зарянка и Тверской. Они относятся к группе сортов тверской селекции, созданных с использованием вологодских кражевых форм и других общих родительских генотипов. Еще четыре белорусских сорта (Ласка, Василек, Пралеска и Левит 1) сформировали следующую, третью группу. Сорта Василек и Пралеска вошли в одну группу ожидаемо, так как были созданы методом многократного индивидуального отбора из одной гибридной популяции. Данных о родословной сортов Ласка и Левит 1 не обнаружено, но, вероятно, они созданы на основе общего генетического материала с сортами Василек и Пралеска или близких родительских форм. В последнюю, четвертую группу, вошли сорта псковской и томской селекции (Пересвет, Добрыня, Памяти Крепкова, Тост 4 и Тост 5), имевшие в своих родословных псковские кряжи.

Результаты кластерного анализа, проведенного на основании изучения полиморфизма 12 SSR локусов 16 сортов льна-долгунца позволяют дифференцировать сорта некоторых селекционных центров, в которых они были созданы, или определить соотношение близкородственных форм. Такой подход может помочь в работе по созданию новых сортов для определения подходящих родительских пар. Используемая система SSR-маркеров позволяет отличать генотипы льна-долгунца друг от друга на молекулярном уровне и может быть использована для проведения генетической паспортизации сортов Государственного реестра и адаптации методов маркер-ассоциированной селекции для культуры льна.

Список литературы:

1. Павлова, Л.Н. Новые сорта льна-долгунца – важный фактор повышения эффективности производства льнопродукции // Инновационные разработки для производства и переработки лубяных культур: материалы Междунар. научно-практ. конф. ФГБНУ ВНИИМЛ. 2017. – С. 78-81.
2. Канукова, К.Р. ДНК-маркеры в растениеводстве // *Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН*. 2019. - № 6 (92). – С. 220-232. DOI: 10.35330/1991-6639-2019-6-92-220-232.
3. Лемеш, В.А. Полиморфизм микросателлитных локусов льна (*Linum usitatissimum* L.) как основа генетической паспортизации сортов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2013. – Том 57. - № 2. – С. 74-78.

**АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *NR6A1* ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ОСОБЕЙ
ВИДА *SUS SCROFA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ KASP**

Снытков Е.В.¹, Патрин М.М.², Кипень В.Н.³

1 – Международный государственный экологический институт

им А.Д. Сахарова БГУ, 220070, Минск, Республика Беларусь,

e-mail: evsnytkov@gmail.com

2 – ООО «МАКСИМ МЕДИКАЛ»,

143420, пос. Архангельское, Московская обл., Российская Федерация,

e-mail: max@maxmedikal.com

3– Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

220072, Минск, Республика Беларусь,

e-mail: v.kipen@igc.by

Введение. Задача по дифференциации дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и домашней свиньи (*Sus scrofa domesticus*) может быть решена с использованием молекулярно-генетического анализа трех полиморфных вариантов в генах *MC1R*, *NR6A1* и *HEPH* [1]. Молекулярно-генетический анализ данных трех полиморфных вариантов в этих генах проведен классическим методом ПЦР-ПДРФ, для получения результата требуется 6-7 часов (пробоподготовка и ПЦР, проверочный электрофорез в агарозе, рестрикция, повторный электрофорез). К тому же, многостадийность процесса, как известно, сопряжена с аккумуляцией ошибок. Этих недостатков лишена технологии генотипирования KASP (Kompetitive allele specific PCR, LGC Biosearch Technologies) – необходимое время получения итогового результата генотипирования в этом случае составляет до 2,5 часов в одну стадию, при проведении дополнительной процедуры плавления ампликона общее время анализа составит не более 3,5 часа.

Цель и задачи. Оценить применимость технологии KASP для генотипирования полиморфизма g.299084751C>T (*NR6A1*, Chr.1:g.265347265T>C, Sscrofa11.1 (RefSeq GCF_000003025.6) от 2017/02/07) на биологических образцах (ДНК выделена из ушных выщипов) особей дикого кабана (WB) и домашней свиньи (DS).

Материалы и методы. Определение генотипа по полиморфизму g.299084751C>T (*NR6A1*) осуществляли с использованием технологии, основанной на конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP, kompetitive allele specific PCR). Генотипирование проводили с использованием KASP Assay mix (KASP by Design, KBD) и KASP Master mix (LGC Biosearch Technologies, Великобритания; ООО «Максим Медикал», РФ) в двукратной повторности. ПЦР проводили в объеме 10 мкл в термоциклире CFX96 (Bio-Rad, США) согласно имеющимся рекомендациям по KASP.

Результаты теста на специфичность рассчитывались как FR (false rate) в % = (число несовпадений генотипов для технологий ПЦР-ПДРФ и KASP) / (число проведенных реакций ПЦР) * 100. Чувствительность технологии KASP применимо к исследуемым полиморфным вариантам выражена в виде предела концентрации ДНК (limit of detection, LOD) для корректного обнаружения генотипа. Для определения нижнего предела детектируемого количества генетического материала в реакции ПЦР была использована серия разведений ДНК для 9 образцов с известным генотипом. Диапазон тестируемого количества ДНК в реакции ПЦР составил 1,0-50,0 нг/реакцию – концентрации 1,0 нг/мкл, 2,0 нг/мкл, 5,0 нг/мкл, 10 нг/мкл, 20 нг/мкл, 50 нг/мкл. В тесте на робастность (устойчивость) использовали различный объем ПЦР-смеси (7,5 мкл, 10,0 мкл и 12,5 мкл) и 2 протокола ПЦР, рекомендованных LGC Biosearch Technologies, с температурой отжига праймеров 57,0°C – «65-57°C touchdown protocol» и «2-Step 57°C protocol» (<https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/KASP-thermal-cycling-conditions-all-protocols.pdf>).

Основные результаты. Для полиморфизма g.299084751C>T (*NR6A1*) генотип CC был выявлен в 23,96% случаев (WB – 23), генотип CT – в 5,21% (DS – 1, WB – 4), TT – 70,83% (DS – 68).

Специфичность составила 100% – результаты генотипирования с использованием технологии ПЦР-ПДРФ и KASP совпали полностью.

Минимальное достаточное количество ДНК для корректного определения генотипа составило не менее 1,0 нг/реакцию при 42 циклах амплификации, при 36 циклах амплификации (т.е. использован только основной протокол, без использования доамплификации по 3 цикла) LOD = 5,0 нг/реакцию.

В тесте на робастность (устойчивость) при использовании объема ПЦР-смеси 7,5 мкл, 10,0 мкл или 12,5 мкл для двух протоколов ПЦР «65-57°C touchdown protocol» и «2-Step 57°C protocol» случаи некорректного определения генотипа или отсутствие продуктов ПЦР не выявлены. Таким образом, для технологии KASP при генотипировании по полиморфизму g.299084751C>T (*NR6A1*) показана высокая робастность.

Выводы. Для технологии генотипирования KASP (Kompetitive allele specific PCR, LGC Biosearch Technologies) при генотипировании полиморфизма g.299084751C>T (*NR6A1*) определены высокие показатели специфичности, чувствительности и робастности. На основании полученных результатов может быть разработана тест-система для дифференциации дикого кабана (*Sus scrofa scrofa*) и домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*) с использованием технологии KASP.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «МАКСИМ МЕДИКАЛ» (пос. Архангельское, Московская обл., Российская Федерация, e-mail: max@maxmedikal.com)

Список литературы:

Анализ полиморфизма гена гестина (HERN) на X-хромосоме для установления принадлежности биологических образцов к диким или домашним представителям вида *Sus scrofa* / Кипень В.Н., Иванова Е.В., Снытков Е.В., Верчук А.Н. // Генетика. 2020. Т. 56. № 9. С. 1054-1064.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.080

ХАРАКТЕРИСТИКА ОВЕЦ ТОНКОРУННЫХ ПОРОД ПО ГЕНУ *IGF-1*

Соловьева А.Д., Кошкина О.А., Денискова Т.Е., Зиновьева Н.А.

ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства - ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», группа генетики и геномики мелкого рогатого скота, Дубровицы 142132
E-mail: anastasiya93@mail.ru

Технология, основанная на применении ДНК- маркеров, рассматривается как основной подход, позволяющий значительно ускорить процесс накопления генов, несущих желательные признаки по продуктивности, в особенности, когда речь идет о признаках, которые трудно или дорого измерить, и тех, которые проявляются в позднейших стадиях жизни животных, а значит – повысить продуктивность и экономическую рентабельность мясного овцеводства. Селекция с помощью геномных маркеров теперь является одним из основных мировых направлений овцеводства. Следовательно, поиск новых генов, структурные особенности которых влияют на продуктивные качества животных стала актуальной задачей на современном этапе исследования. Наибольшее число известных генов, которые влияют на нормы производства баранины различных регуляторных пептидов, такие как миостатин, кальпаstatин и другие. Еще один важный регуляторный белок, который контролирует рост и развитие в мышечных структурах млекопитающих, является инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1).

Таким образом, для понимания распределения генотипов в популяциях локальных пород, необходимо проведение мониторинга на расширенной породной выборке. В связи с тем, что тонкорунные овцы характеризуются большой плодовитостью, отличной приспособленностью к умеренному влажному климату и часто используются как продуценты мяса в российских регионах, целью нашей работы стал анализ частоты встречаемости аллелей в гене инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) у представителей наиболее популярных пород данного направления. В качестве материала для исследования было использовано 78 образцов ткани овец тонкорунных пород, в том числе: волгоградская, грозненская, дагестанская горная и горноалтайская полутонкорунная. Выделение ДНК проводили с помощью набора «ДНК-Экстран-2» (ЗАО «Синтол», Россия). Полиморфизм фрагмента гена IGF-1 изучали с помощью метода ПЦР-ПДРФ с последующим разделением рестрицированных фрагментов в 3%-ном агарозном геле, окрашенным бромидом димидиума, для идентификации генотипа. Частота встречаемости генотипов СС, СТ и ТТ в гене IGF-1 составила 55,13%, 25,64% и 19,23%, соответственно. Аллель С встречался с частотой 0,878, также аллель Т 0,544. Таким образом, результаты предварительного мониторинга продемонстрировала перспективность использования гена IGF-1 в качестве ДНК-маркера у овец.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, тема 0445-2019-0026.

Список литературы:

1. Дейкин А.В., Селионова М.И., Криворучко А.Ю., Коваленко Д.В., Трухачев В.И. Генетические маркеры в мясном овцеводстве. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):576-583. DOI 10.18699/VJ16.139

2. V. Trukhachev, V. Skripkin, A. Kvochko, A. Kulichenko, D. Kovalev, S. Pisarenko, A. Volynkina, M. Selionova, M. Aybazov, S. Shumaenko, A. Omarov, T. Mamontova, O. Yatsyk, A. Krivoruchko. Polymorphisms of the IGF1 gene in Russian sheep breeds and their influence on some meat production parameters. Slov Vet Res 2016; 53 (2): 77-83. UDC 636.3.082.22:591.151:572.782

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.081

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ МАЛИНЫ С РАЗЛИЧНОЙ ОКРАСКОЙ ЯГОД ПУТЕМ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМИ МАРКЕРАМИ НА ОСНОВЕ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ

Субботина Н.М.^{1,2}, Лебедев В.Г.^{1,2}, Малюченко О.П.³, Шестибратов К. А.²

**1 – ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»
(ПушГЕНИ), Пушкино 142290**

**2 – Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А.
Овчинникова РАН, Пушкино 142290
E-mail: natysubbotina@mail.ru**

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

Малина является популярной ягодной культурой во всем мире. Ее ценят не только за вкусовые качества, но и за высокое содержание антоцианов – веществ с антиоксидантной активностью, количество которых коррелирует с окраской ягод. В последние годы значительно вырос интерес к выведению новых сортов малины с повышенной питательной ценностью. Нами был разработан набор из 9 микросателлитных маркеров на основе структурных (из *Rubus* и *Fragaria*) и регуляторных (из *Rubus*) генов биосинтеза флавоноидов. С помощью данного набора маркеров проведено генотипирование 19 сортов

малины обыкновенной *R. idaeus* и двух сортов малины западной *R. occidentalis* для оценки их генетического разнообразия. Все анализируемые сорта отличались друг от друга генетическим и географическим происхождением, а также окраской ягод (от желтой до черной). Показано, что из 9 разработанных маркеров, 7 являлись полиморфными. Всего было обнаружено 26 аллелей в семи локусах. Наиболее полиморфным маркером являлся RiMY01, расположенный в интронной области транскрипционного фактора MYB10 малины обыкновенной (PIC=0.82). Локус RiG001, на основе ароматической поликетид синтазы, отсутствующий у сортов ежевики, также не амплифицировался в малине западной. Расположение сортов малины на дендрограмме не было связано с их географическим и генетическим происхождением, но в значительной степени коррелировало с окраской ягод. Сорта малины западной имели более высокую гомозиготность и группировались отдельно от сортов малины обыкновенной, но в то же время они отличались друг от друга. Кроме того, некоторые сорта малины с желто-оранжевой окраской ягод формировали отдельный кластер. Это позволяет предположить, что единый генетический механизм образования желто-оранжевой окраски ягод отсутствует. Разработанный набор SSR-маркеров может быть полезным молекулярным инструментом в программах селекции малины по улучшению питательных характеристик, связанных с содержанием антоцианов.

Работы выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект № 14.574.21.0149, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57417X0149).

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.082

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ НОВЫХ STR-МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ДНК РАСТЕНИЙ РОДА *CENCHRUS*

Сыксин С.В.¹, Кулакова Ю.Ю.², Соловьев А.А.¹

**1 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550**

2 – ВНИИКР

E-mail: Stason_16@inbox.ru

Род Ценхрус (Колючещетинник) включает в себя более 25 видов однолетних и многолетних злаков. Некоторые из них представляют собой сорные растения, широко распространяющиеся за пределы своего естественного ареала, в число которых входит ценхрус длинноколючковый (*Cenchrus longispinus*). *C. longispinus* – сорное растение, включенное в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза. На ранней стадии развития растения, до стадии выхода в трубку, растения рода *Cenchrus* схожи с другими злаками, вследствие чего появляется проблема в идентификации карантинного вида в инвазивных очагах. Наряду с этим, импортная подкарантинная продукция растительного происхождения может включать в себя и другие виды растений рода *Cenchrus*, не входящих в реестр карантинных объектов РФ, поэтому выявление вида *C. longispinus* и возможность достоверно отличить его от других морфологически близких видов является крайне актуальной задачей для диагностики в карантинных лабораториях. В 2019 году J. Нуун и др. из университета Гачон провели полногеномное секвенирование хлоропластного генома *C. longispinus*, благодаря чему появилась возможность разработать новые хлоропластные маркеры на основе переменных STR-локусов.

Работу проводили на базе центра коллективного пользования «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ. Образцы были предоставлены Всероссийским Центром Карантина Растений. Выделение ДНК образцов проводили с использованием разработанной методики (патент RU2672378C1). Биоинформатический анализ и обработку данных осуществляли через программное обеспечение UGENE (Россия) и AliView (Швеция). Синтез и расходные материалы для ПЦР и капиллярного электрофореза произведены компанией «Синтол».

При множественном выравнивании доступных полных геномов растений рода *Cenchrus*, а именно *C. longispinus*, *C. americanus*, *C. ciliaris*, *C. echinatus* и *C. purpureus*, было выбрано 7 переменных локусов, отличающих карантинный вид *C. longispinus* по размеру ампликона. Чаще всего в хлоропластном геноме встречались (A)n-повторы, с вариативностью по количеству 6-10 нуклеотидов, часто дополненные делеционными вариантами генома в размере до 150 нуклеотидов. Праймеры были смоделированы на фланкирующие участки как самого повтора, так и делеционного локуса, что позволяет достаточно достоверно дифференцировать исследуемые виды. Смоделировано 7 пар праймеров для капиллярного электрофореза, с флуоресцентными метками FAM, R6G, TAMRA, ROX для мультиплексирования STR-системы дифференциации видов. На данный момент продолжается работа по установлению всех вариаций изучаемых локусов у 8 видов растений рода *Cenchrus*.

Список литературы:

- 1) Сыксин, С.В. Поиск молекулярных ISSR-маркеров для идентификации центхруса длинноколючкового. / С.В. Сыксин, В.Г. Кулаков, Ю.Ю. Кулакова, Е.С. Мазурин, А.А. Соловьев // Защита и карантин растений. – 2019. – № 9. – С. 40-42.
- 2) Тохтарь В.К. Центхрус длинноколючковый – еще один американский «гость» Центрального Черноземья // Защита и карантин растений. – 2010. – №12. – С. 26-27.
- 3) Mariac C. Cost-effective enrichment hybridization capture of chloroplast genomes at deep multiplexing levels for population genetics and phylogeography studies / C Mariac et al. // Molecular Ecology Resources. – Institut de Recherche pour le Développement, France., – April 2014
- 4) Abdi, S. Development of EST-SSR markers in *Cenchrus ciliaris* and their applicability in studying the genetic diversity and cross-species transferability /S. Abdi, A. Dwivedi, Shashi, S. Kumar, V. Bhat // Journal of Genetics №98. – November 2019. – p. 101, doi: 10.1007/s12041-019-1142-x
- 5) Dhaliwal, A. Cytomorphological study in genus *Cenchrus* L.: an important medicinal plant from north india (family: Poaceae) / Dhaliwal A., Dhaliwal R.S., Kaur N., Gupta R.C. // Cytologia. – 2018. – Т. 83. – № 1. – С. 45-52.
- 6) Kulakov, V.G. Present-day nomenclature of a *Cenchrus* species of quarantine concern for the Russian Federation / Kulakov V.G., Kulakova Yu.U. // Карантин растений. Наука и практика. – 2014. – № 1 (7). – С. 15-19.
- 7) Soltani, N. Long-spine sandbur [*Cenchrus longispinus* (Hack. in Kneuck.) Fernald] control in corn. / N. Soltani, M. Kumagai, L. Brown, P.H. Sikkema // Can. J. Plant Sci. 90(24): 2010. P. 1-245.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.083

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНА *VF* УСТОЙЧИВОСТИ ЯБЛОНИ (*MALUS MILL.*) К ПАРШЕ (*VENTURIA INAEQUALIS (CKE.) WINT*)

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

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, Орловская область, п/о Жулина, 302530 Россия

E-mail: tolpekina@vniispk.ru

Яблоня является ведущей плодовой культурой. Она подвержена различным заболеваниям. Одним из распространенных и вредоносных заболеваний данной культуры является парша (*Venturia inaequalis (Cke.) Wint*). Возбудителем парши яблони является сумчатый гриб, который относится к отделу *Ascomycota*, порядку *Pleosporales*, семейству *Venturiaceae*. Гриб поражает листья, черешки, цветки, плоды, плодоножки и побеги

(прирост текущего года) яблони. Из-за парши снижается уровень урожая яблок в средней полосе России не менее чем на 40 %, а в отдельные годы достигает 70-80 %. Более 100 лет занимаются изучением заболевания *Venturia inaequalis*. В результате многолетних исследований, получен большой объем знаний, которые включают многие аспекты фундаментальной биологии и генетики гриба, эпидемиологии и контроля болезни (Насонов, 2015).

Ввиду высокой вредоносности парши яблони, актуальной становится задача создания сортов, иммунных к данному заболеванию. Эту задачу невозможно решить без глубоких знаний генетических основ устойчивости к парше. Особое значение приобретает технология ДНК-маркирования, позволяющая проводить скрининг генофонда яблони на наличие генов устойчивости на любом этапе селекционного процесса вне зависимости от фазы онтогенеза растений (Ушакова, 2015).

Выявлены ДНК-маркеры гена устойчивости яблони к парше полученные от *Malus floribunda* L. Идентифицированы и маркированы другие полигенные источники устойчивости к возбудителям парши, а именно гены *Va*, *Vb*, *Vbj*, *Vm*, *Vr* и др (Киселев, 2010).

Во Всероссийском научно-исследовательском институте селекции плодовых культур долгие годы одним из приоритетных направлений работы остается селекция яблони (*Malus Mill.*) на устойчивость к парше.

Исследования на наличие ДНК-маркеров гена *Vf* проводятся в лаборатории биохимической генетики в ВНИИ селекции плодовых культур с 2013 года. Объектами исследования в 2019г. послужили 238 гибридных сеянцев из 9 гибридных семей и 5 отборных сеянцев из двух гибридных семей.

Выделение ДНК из листьев яблони проводили по методике Plant DNA Extraction Protocol for DArT (Diversity Array Technology, Australia). Методика амплификации с *VfC* праймерами описана у Afunian и др. (2004). Условия ПЦР следующие: денатурация 5 мин при 95°C, затем 30 циклов – 30 с при 95°C, 56°C – 30 с, 72°C – 30 с; финальная элонгация 72°C – 10 мин. Детекцию продуктов осуществляли путем разделения в 1,7% агарозном геле.

В результате проведенного в 2019 году тестирования нового гибридного фонда яблони было выявлено наличие и отсутствие гена *Vf*.

В гибридной семье № 6341, полученной скрещиванием по схеме Свежесть × 29-40-127 (Орлик × Реса) протестировано 38 гибридов, из которых 17 имеют ген *Vf*, и 21 не имеют ген устойчивости к парше.

В гибридной семье под номером 6342, полученной по следующей схеме скрещивания: Свежесть × 31-5-15 (Северный синап × Реса) протестировано 26 гибридных форм, из них 15 имеют ген *Vf*, а соответственно 11 от общего числа тестируемых образов данной семьи - нет.

Четыре образца было протестировано в гибридной семье 6346 (схема скрещивания: Антоновка обыкновенная × Болотовское). Из них у одного гибрида есть ген *Vf*, у 3 – соответственно нет.

В семье 6349 (Приокское × Краса Свердловска) было отобрано и изучено 33 образца, из которых у 16 наблюдалось наличие гена *Vf*, а у 17 – нет.

В семье 6353, полученной от скрещивания Поэзия × Афродита, протестировано 18 образцов, из которых у 13 образцов присутствует ген *Vf*, а у 5 – нет.

В семье 6354 (Приокское × Свежесть) протестировано 40 образцов, из которых у 30 образцов присутствует ген *Vf*, а у 10 – нет.

Шесть образцов было протестировано в гибридной семье 6355 (схема скрещивания: Восторг × Орловская гирлянда). Из них у 4 есть ген *Vf*, у 2 – соответственно нет.

В гибридной семье № 6356, полученной скрещиванием по схеме Восторг × Болотовское протестировано 47 образцов гибридных форм, из которых 19 образцов имеют ген *Vf*, и 28 не имеют ген устойчивости к парше.

В семье 6356а (Созвездие × Памяти Хитрово) было отобрано и изучено 26 образцов, из которых у 18 наблюдалось наличие гена *Vf*, а у 8 – нет.

Проведенное ДНК-генотипирование нового гибридного фонда яблони ВНИИСПК на присутствие гена *Vf* устойчивости к парше позволило выявить генотипы (гибридные и отборные сеянцы) у которых амплифицируется ДНК маркер гена *Vf*. Из всех проанализированных сеянцев у 133 сеянцев обнаружен *VfC* маркер гена *Vf*, а у остальных 105 соответственно – нет.

Список литературы:

1. Киселев Д. А., Удовиченко Е. Н. Использование молекулярных маркеров в селекции яблони и груши. Физиология и биохимия культурных растений. 2010. Т. 42. № 6. С. 475-482.
2. Насонов А. И., Супрун И. И. Парша яблони: особенности возбудителя и патогенеза. Микология и фитопатология. 2015. Т. 49. №. 5. С. 275-285.
3. Ушакова Я. В. Использование технологии ДНК-маркирования в селекционно-генетических исследованиях яблони. НАУЧНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА. 2011. С. 235-237.
4. Afunian, M. R., Goodwin P. H., Hunter D. M. Linkage of *Vfa4* in *Malus* × *domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. Plant Pathology. 2004. V.53. N.4. P. 461-467. DOI 10.1111/j.1365-3059.2004.01047.x
5. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 1990, 12: 13-15.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.084

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОРОД СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Харзинова В.Р., Зиновьева Н.А.

**ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства - ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», лаборатория функциональной и эволюционной геномики животных,
Дубровицы 142132
E-mail: veronika0784@mail.ru**

Столетиями методами народной селекции создавались генетически разнообразные породы свиней, которые были отселекционированы с учетом различных национальных культур, внешних условий среды, задач и потребностей человеческого общества. На сегодняшний день, промышленное производство свинины основано на использовании ограниченного количества коммерческих пород свиней импортного происхождения, наряду с которыми, существует локальные породы, являющиеся носителями уникальных форм изменчивости и составляющие национальные генетические ресурсы сельскохозяйственных видов животных (Muñoz et al., 2019). Оценка значения породы с точки зрения ее консервации требует синтеза информации из целого ряда источников, в том числе из молекулярно-генетических исследований, дающих объективные критерии изучения разнообразия в породе и между породами. Наиболее часто используемыми маркерами для данных целей служат микросателлитные маркеры (короткие tandemные повторы, short tandem repeats, STR) (Egito et al., 2007). В этой связи, целью настоящей работы являлось применение микросателлитов для анализа генетического разнообразия, генетической структуры, а также сравнительной генетической характеристики свиней коммерческого и локального разведения. Исследуемая выборка включала 991 образец свиней локальных и коммерческих пород импортного происхождения отечественной репродукции: кемеровская (КЕМ), беркширская (BERK), ливенская (LIV), мангалица (MNG), цивильская (CVL), крупная белая (LW), ландрас (LDR) и дюрок (DUR). В качестве биологического материала использовали пробы ткани. Выделение ДНК осуществляли с помощью колонок Nexttec («Nexttec™ Biotechnologie GmbH», Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Мультиплексный анализ, включающий 10 STR-локусов (S0155, S0355, S0386, SW24, SO005, SW72, SW951, S0101, SW240, SW857) выполняли с

использованием ранее описанной методики (Харзинова и др., 2018). Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе ABI3130xl («Applied Biosystems», США) с последующим определением длин аллелей микросателлитов в программном обеспечении Gene Mapper v. 4.0. («Applied Biosystems», США). Статистические вычисления выполнены в программах GenAlEx v. 6.5.1 (Peakall R., Smouse P.E., 2012), SplitsTree 4.14.5 (Huson et al., 2006), STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard, et al., 2006) и R пакетах "diveRsity", "pophelper" (Keenan et al., 2013), adegenet (Jombart, 2008), ggplot2 (Wickham, 2009). Среднее число аллелей варьировало от $7,556 \pm 1,396$ у крупной белой до $4,556 \pm 0,475$ у цивильской пород. Максимальные значения числа эффективных аллелей (NE) также были детектированы в крупной белой породе: $NE=3,750 \pm 0,575$, а минимальные у свиней породы дюрок: $NE=2,606 \pm 0,544$. У свиней LW, значения ожидаемой (HE) гетерозиготности были выше 0,6, включая LW (0.693), KEM (0.659), BERK (0.630) и LIV (0.665). Кластерный анализ показал консолидированность свиней пород беркширская и мангалица. Породы LIV и CVL имели часть особей смешанного происхождения. Коммерческие породы свиней сформировали несколько кластеров внутри своих пород. Анализ главных компонент не позволил визуализировать четкую дифференциацию большинства из исследуемых пород. Однако, алгоритм «сети соседей» (NeighborNet), построенный на основе числовых матриц данных попарных генетических дистанций F_{ST} и D , выявил обособленный массив свиней CVL, LW, KEM и LIV пород. Проведенные нами исследования, основанные на анализе полиморфизма микросателлитов, являются первоначальным этапом характеристики генетического разнообразия и выявления внутривидовых и межвидовых особенностей локальных и коммерческих пород свиней. Тем не менее, полученные нами результаты могут быть учтены при разработке селекционных, организационных и экономических мероприятий, направленных на сохранение локальных пород, а также рациональное использование генетических ресурсов специализированных пород.

Исследования выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках темы ГЗ № АААА-А18-118021590138-1.

Список литературы:

1. Muñoz M., Bozzi R., García-Casco J., Núñez Y., Ribani A., Franci O., García F., Škrlep M. et al. Genomic diversity, linkage disequilibrium and selection signatures in European local pig breeds assessed with a high density SNP chip. Scientific Reports. 2019. v. 9. DOI: doi.org/10.1038/s41598-019-49830-6.
2. Egito A.A., Paiva S.R., Albuquerque M. S., Mariante A.S., Almeida L.D., Castro S.R., Grattapaglia D. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. BMC Genet. 2007. 8:83-97. DOI: 10.1186/1471-2156-8-83.
3. Харзинова В.Р., Карпушкина Т.В., Денискова Т.Е., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Популяционно-генетическая характеристика свиней породы крупная белая, ландрас и дюрок с использованием микросателлитов. Зоотехния. 2018. №4. С. 2–7.
4. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update. Bioinformatics. 2012. 28: 2537-2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
5. Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Molecular Biology and Evolution. 2006. 23: 254–267. DOI:10.1093/molbev/msj030
6. Pritchard J.K. Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 2000. 155: 945–959
7. Keenan K., McGinnity P., Cross T. F., Crozier W.W., Prodöhl P.A. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. Methods in Ecology and Evolution. 2013. 4: 782–788. DOI.org/10.1111/2041-210X.12067.
8. Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics. 2008. 24: 1403-1405. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn129.

9. Wickham H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag, NY. 2009.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.085

ТЕСТИРОВАНИЕ СЕЛЕКЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ НА НАЛИЧИЕ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ *SE2 И SP2*

**Черепухина И.В., Налбандян А.А., Руденко Т.С., Михеева Н.Р.,
Федулова Т.П.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», 396030, Россия, Воронежская область, Рамонский район, п. ВНИСС,
E-mail: arpna@rambler.ru***

Рентабельность выращивания сахарной свёклы во многом зависит от устойчивости её к биотическим и абиотическим факторам. Одним из разрушительных патогенных микроорганизмов, вызывающих значительные потери урожая у сахарной свёклы, является *Fusarium oxysporum*. Фузариозная гниль появляется в начале лета. Пораженные листья, начиная с периферических, увядают, а их черешки у основания чернеют. Корни отстают в росте, и на них образуются обильные боковые корешки. Жаркая погода, высокая насыщенность севооборота сахарной свёклой приводит к значительному накоплению инфекции в почве и серьезным потерям урожая. Подбор молекулярно-генетических маркеров для выявления устойчивых генотипов очень важен и достаточно сложен, так как устойчивость к данному заболеванию характеризуется полигенным наследованием и находится под контролем многих генов, расположенных в QTL-локусах. Для определения генетической локализации локусов количественных признаков сегодня применяют методику позиционного клонирования конкретных хромосом, которые были предварительно определены с помощью полиморфных (SSR) маркеров [1, 2, 3]. Тестирование селекционного материала на устойчивость к фузариозу проводится опосредованно, путем выявления в их геноме наличия локусов специфических сигнальных киназ, входящих в состав рецепторов и участвующих в распознавании фитопатогена. Известно, что растения для противостояния различным патогенным организмам, продуцирующим хитин, экспрессируют хитиназу, являющуюся катализатором деградации хитина, что приводит к обезвреживанию патогена [4].

В качестве материала для исследований на наличие генов устойчивости к болезням были использованы растения сортотипов сахарной свёклы отечественной и зарубежной селекции.

Для проведения экспериментов осуществлялась экстракция суммарной ДНК из растительной ткани, с применением 8М ацетата аммония и 20% SDS [5]. Качество выделенной ДНК определялось электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Полученная ДНК, растворенная в 10 мМ трис-HCl-буфере, содержащем 0,1 мМ ЭДТА использовалась для ПЦР-анализа. Полимеразно-цепная реакция проводилась на амплификаторе «Genius» (Великобритания).

Тестирование селекционного материала сахарной свёклы на наличие генов кислой хитиназы осуществлялось с праймерами EBS0085, BB02714 и FusA [4]:

EBS0085 F: 5/-ATTAAGTGGAAGTAGAAATC-3/

EBS0085 R: 5/-ATTTGTCATCCCAGAATAC-3/

BB02714 F: 5/-AATAAAGAGTGGGTAAGTTTCT-3/

BB02714 R: 5/-TTGGAGGATATAACAGAACTC-3/

FusA F: 5/-AGCTACCTTTGGTAACGGGC-3/

FusA R: 5/-GCAGTGCTTAAGCTGGCATC-3/

Для подтверждения связи генов SE 2 и SP 2, контролирующих кислотную хитинизацию с устойчивостью сахарной свёклы к корневой гнили, проведено генотипирование 10 образцов сахарной свёклы с использованием молекулярных маркеров *FusA 1*, *BB2714* и *EBS0085*, локализованных на хромосоме 3. В результате классической ПЦР по праймеру *BB2714* выявлен один продукт длиной 900 п.н. у образцов №1 (ОП 18084), 4 (ОП 18075), 10 (*B. corroliflora* Zoss.), соответствующий локализации гена SP 2.

При использовании праймера *FusA 1* на наличие гена кислой хитиназы SE 2 был выявлен соответствующий ДНК-фрагмент длиной 650 п.н. почти во всех исследуемых генотипах. В растениях образца №26 (МС 1, ВИР) показано отсутствие данного ампликона. В растениях генотипов №№22, 23, 30 и 31 установлено наличие двух фрагментов длиной 300 и 650 п.н., что может свидетельствовать о гетерозиготности указанных материалов по данному локусу.

Амплификация ДНК растений с праймером *EBS0085*, также направленная на выявление наличия гена кислой хитиназы SE 2 показала характерный для данного маркера ампликон, длиной в 550 п.н. у всех образцов. Гомозиготные генотипы (aa) на электрофореграмме имели один четкий и наиболее интенсивный ампликон, тогда как устойчивые гетерозиготы (ab) были представлены ПЦР-фрагментами с менее выраженной интенсивностью, с дополнительной полосой в 700 п.н.

Таким образом, в процессе проведенных исследований выделены селекционные образцы сахарной свёклы, предположительно несущие в своем геноме гены устойчивости к фузариозной гнили. Они рекомендованы для дальнейшей селекционной работы по признаку устойчивости к данному заболеванию.

Для более детального тестирования изучаемых материалов и определения их, как абсолютно устойчивых, необходимо углубление молекулярно-генетических исследований с использованием большого количества SNP-маркеров и ПЦР в реальном времени.

Список литературы

1. Covey P. Multilocus Analysis Using Putative Fungal Effectors to Describe a Population of *Fusarium oxysporum* from Sugar Beet / P. Covey, B. Kuwitzky, M. Hanson, K. Webb // *Phytopathology*.- 2014.- V. 104(8).- P. 886-986.
2. Francis S. Exploitation of novel sources of disease resistance in *Beta* germplasm using molecular markers / S. Francis, M. Asher // *J Sugar Beet*.- 2000.- V. 37.- P. 89-95.
3. De Lucchi C. Molecular markers for improving control of soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* in sugar beet / C. De Lucchi, P. Stevanato, L. Hanson, J. McGrath, L. Panella, M. De Biaggi, C. Broccanello, M. Bertaggia, L. Sella, G. Concheri // *Euphytica*.- 2017.- V. 213:71.
4. Yezhebayeva R. Two sugar beet chitinase genes, BvSP2 and BvSE2, analysed with SNP Amplifluor-like markers, are highly expressed after *Fusarium* root rot inoculation and field susceptibility trial / R. Yezhebayeva, A. Abekova, K. Konysbekov, Sh. Bastabayeva, A. Kabdrakhmanova, A. Absattrova, Y. Shavrukov // *Peer J*.- 2018.- V. 6.- P. 2-19.
5. Hussein A.S. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis / A.S. Hussein, A.A. Nalbandyan, T.P. Fedulova, N.N. Bogacheva // *Russian Agricultural Sciences*.- May 2014, Volume 40, Issue 3, p. 177-178.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА (*GRF*) НА ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ У ТРИТИКАЛЕ**Черноок А.Г.**

Лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Курчатовский геномный центр-ВНИИСБ, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550

С каждым годом население нашей планеты увеличивается, и это подчёркивает необходимость развития интенсивного земледелия, главной особенностью которого является применение высоких доз азотных удобрений, что несёт большую химическую нагрузку для почвы и экологии в целом. Есть и другой выход- улучшение эффективности поглощения азота у растений. Карликовые сорта пшеницы, получившие широкое распространение ещё со времён Зелёной революции, являются главными объектами исследования в этом направлении, так как обладают повышенной способностью к поглощению и использованию азота из почвы (Li et al., 2018).

Тритикале была получена в конце 19 века путём скрещивания пшеницы и ржи. Полученный амфидиплоид обладает хорошими характеристиками (высокая морозоустойчивость, стрессоустойчивость, экологическая пластичность), однако есть и ряд недостатков (невыполненность зерна, полегание посевов, прорастание зерна на корню). В связи с этим активно ведутся работы по улучшению хозяйственно-ценных признаков тритикале. Полегание стебля при возделывании успешно решается внедрением в геном тритикале генов короткостебельности как пшеничного, так и ржаного происхождения (Коршунова и др., 2015). Ржаной ген короткостебельности *Ddw1* может снижать высоту растений ржи до 50% (Наскаuf, 2013) и является наиболее перспективным в решении данной проблемы. Помимо снижения высоты ген *Ddw1* обеспечивает существенное увеличение урожайности у ржи благодаря сильному плеiotропному эффекту на многие хозяйственно-ценные признаки (Banaszak, Z, 2010). Однако у тритикале ген *Ddw1* отрицательно влияет на элементы продуктивности (Kroupin, 2019).

Улучшенное поглощение растениями пшеницы азота приводит к увеличению массы 1000 зёрен, и обусловлено присутствием генов-регуляторов факторов роста (*GRF*) (Avni et al., 2018). Транскрипционные факторы семейства *GRF* (Growth Regulating Factors) впервые были охарактеризованы у риса. Накопление у риса фактора (*GRF4*), связано с увеличением эффективности использования азота, в то же время растения сохраняют полукарликовость и высокоурожайные характеристики (Li S. et al., 2018).

Целью нашего исследования является изучение влияния генов-регуляторов факторов роста (*GRF*) на хозяйственно ценные признаки на примере популяции растений яровой тритикале, полученной от скрещивания сортов Хонгор и Дублет, различающихся по аллелям генов *Ddw1* (*Ddw1* и *ddw1*) и *GRF* (262 и 274). На пшенице мы секвенировали гены *GRF4-2A* и *GRF4-2B* и на основе полученных последовательностей создали SSR маркеры для этих генов. Маркеры успешно сработали на тритикале, но только по *GRF4-2A* был обнаружен полиморфизм у родительских форм и дальнейший анализ популяции растений вели только по *GRF4-2A*.

Растения выращивались в условиях полевого опыта на базе Полевой Опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева в 2019 году. Проведено генотипирование растений по генам *Ddw1* и *GRF*. Проведён структурный анализ каждого индивидуального растения из потомства. Выполнена оценка влияния гена *GRF* на хозяйственно-ценные признаки яровой тритикале на основе структурного анализа и статистической обработки.

Оценку влияния гена *GRF* проводили независимо и в совокупности с геном короткостебельности *Ddw1*.

Хорошие характеристики зерна связаны с улучшенной способностью растений поглощать азот из почвы и это обусловлено действием генов-регуляторов факторов роста (*GRF*). Процесс усвоения азота представляет собой сложную систему физиологических путей, включающих множество биохимических реакций. *GRF* – это транскрипционный фактор множества генов азотного обмена у растений. Белок, синтезируемый в результате экспрессии *GRF*, обеспечивает ассимиляцию азота и углерода, а также гомеостатичную координацию азотного обмена в растениях.

В результате нашего исследования были выявлены следующие эффекты гена *GRF*. По признакам масса зерна с главного колоса, число колосков в колосе и масса 1000 зёрен было отмечено, что *GRF* (274) приводит к увеличению этих показателей. У высоких растений с геном *GRF* (274) масса 1000 зёрен больше, чем у высоких растений с *GRF* (262) на 5,5% (3 г), у низких отмечен похожий эффект аллеля *GRF* (274). Разница по массе 1000 зёрен у низких и высоких растений с *GRF* (274) составляет 14% (8,1 г), а у низких и высоких с *GRF* (262): 12% (6,4 г). Масса зерна с главного колоса у высоких растений с *GRF* (274) больше, чем у низких с *GRF* (274) на 19% (0,58 г), при таком же сравнении, но с аллелем *GRF* (262) разница составила 8% (0,22 г).

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности нашего исследования, однако требуется дальнейшая работа в этом направлении.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-316-90046.

Список литературы:

1. Коршунова, А.Д. Анализ распределения генов короткостебельности пшеницы и ржи среди сортообразцов яровой гексаплоидной тритикале (*Triticosecale* Wittm.) / Коршунова А.Д., Дивашук М.Г., Соловьев А.А., Карлов Г.И. // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 3. – С. 334.
2. Avni R. et al. Genome based meta-QTL analysis of grain weight in tetraploid wheat identifies rare alleles of *GRF4* associated with larger grains // *Genes*. – 2018. – Т. 9. – №. 12. – С. 636
3. Banaszak, Z. Breeding of triticale in DANKO / Z. Banaszak // Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. – Gumpenstein: Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein. – 2010. – Vol. 61. – P. 65–68
4. Hackauf, B., Goldfisch M., Musmann D., Melz G., Wehling P. Evaluation of the dominant dwarfing gene *Ddw1* with respect to its use in hybrid rye breeding. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 2013: 41 – 42
5. Kroupin, P.; Chernook, A.; Karlov, G.; Soloviev, A.; Divashuk, M. Effect of Dwarfing Gene *Ddw1* on Height and Agronomic Traits in Spring Triticale in Greenhouse and Field Experiments in a Non-Black Earth Region of Russia. *Plants* 2019, 8, 131.
6. Li S. et al. Modulating plant growth–metabolism coordination for sustainable agriculture // *Nature*. – 2018. – Т. 560. – №. 7720. – С. 595-600.

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ
ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЛИАДИН-КОДИРУЮЩИХ ЛОКУСОВ И ИХ
ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ КАЧЕСТВА КЛЕЙКОВИНЫ ТРИТИКАЛЕ**

Энзекрей Е.С.^{1,2}, Сыксин С.В.¹, Пырников А.С.¹, Милюкова Н.А.¹, Соловьев А.А.^{1,2}

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,

Москва 127550

2 – ФГБУН «Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина» РАН, Москва 127276

Для тритикале, как и для пшеницы, до настоящего времени остается актуальной проблема определения компонентного состава клейковинных белков и связь этого показателя с технологическими качествами данной культуры. Большое внимание в последнее время уделяется вопросу разработки информативных молекулярно-генетических маркеров, направленных на идентификацию аллелей генов белков клейковины.

Основными клейковинными белками тритикале, пшеницы и других зерновых культур, наряду с глютелинами, являются глиадины. Глиадины являются растворимыми в спирте запасными белками зерна тритикале, на долю которых приходится около 40% по массе всех белков тритикалевой муки. Кроме того, это один из наиболее полиморфных белков в природе, поэтому глиадин часто служит объектом изучения в селекционно-генетических исследованиях, имеющих большое значение для науки и сельскохозяйственной практики.

Показано, что глиадины имеют некоторые важные особенности, которые позволяют использовать гены, которые их кодируют, в качестве генетических маркеров. Структура генов, кодирующих различные фракции глиадинов, хорошо известна. В этих генах нет интронов, и они имеют сравнительно простую систему регуляции. А- и γ -глиадины – одни из основных белков клейковины, с которыми связаны её важнейшие реологические свойства. По молекулярной структуре гены глиадинов очень схожи, имеют большое число псевдогенов в геноме. Максимальный уровень экспрессии наблюдается в промежутке 14-28 дней после цветения – в зависимости от генотипа и условий возделывания культуры. Наиболее значимыми факторами качества глиадинов является размер полиглутаминовых участков, названных RQI и RQII.

В данном исследовании были разработаны 2 новые группы праймеров для косвенной оценки качества α - и γ -глиадинов, а именно определение размера полиглутаминовых участков RQI и RQII. Праймеры Full разработаны на амплификацию всех возможных вариантов генов глиадинов группы, учитывая псевдогены. Для исключения псевдогенов выделяли РНК из семян тритикале, обрабатывали ДНКазой с последующей обратной транскрипцией и ПЦР с праймерами Full. После проделанных действий амплифицировали глутамин-богатые участки генов и оценивали их размеры. По литературным данным известно, что чем больше полиглутаминовый участок, тем выше показатели качества клейковины. Так же нами были смоделированы новые праймеры на полиглутаминовые участки RQI и RQII (омега-глиадины), покрывающие все известные гены (исключая псевдогены) омега-глиадинов. Смоделированные праймеры будут использоваться в специфической revRT-qPCR (количественная ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени). Тем самым, при использовании данного типа ПЦР, погрешностью на перекрестную ПЦР-реакцию на альфа-глиадины можно пренебречь.

В настоящее время проводится анализ различных по происхождению генотипов тритикале с использованием разработанных праймеров.

**СЕКЦИЯ
«БИОТЕХНОЛОГИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ»**

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В НАВОЗЕ ПРИ АКТИВНОЙ ЕГО ФЕРМЕНТАЦИИ

Бирюков К.Н., Родионова Н.В.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина», Москва 109472
E-mail: kaf_zoogigieny_fzta@mgavm.ru*

При многоукладном сельскохозяйственном производстве неблагоприятное воздействие на окружающую природную среду и ветеринарное благополучие оказывают отходы животноводческих предприятий, и, в частности, навоз [1, 3, 4].

В настоящее время требованиями действующих нормативных документов запрещено применение в земледелии бесподстилочного свежего навоза, поступающего с животноводческих ферм. Органические отходы (навоз) должны использоваться только в виде компостов и после соответствующей переработки [2].

В связи с этим в последние годы за рубежом и у нас в стране активно ведутся поиски по разработке биотехнологических способов переработки органических отходов животноводства [2, 5, 6].

Из биотехнологических способов переработки отходов наибольшее распространение получила технология активной аэробной ферментации или ускоренное компостирование, где в процессе их переработки в биореакторе получается высокоэффективное органическое удобрение, сбалансированное по питательным элементам.

Для широкого внедрения в практику этого способа переработки навоза важным является изучение технологии его ускоренного компостирования не только как биологического процесса разложения органической массы, но и как возможного эффективного биотехнологического способа их обеззараживания от патогенной микрофлоры для получения экологически безопасных органических удобрений и охраны окружающей среды.

Поэтому нами была изучена динамика изменения численности микроорганизмов в навозе при активной его аэробной ферментации в биореакторе.

Установлено, что на начальном этапе активного компостирования в навозе количество термофильных микроорганизмов было незначительным и составляло всего лишь $1,3 \pm 0,1 \cdot 10^2$ КОЕ/г. В дальнейшем (после 4-х суток биоферментации навоза) наблюдается рост численности активных термофильных культур и их количество увеличивается до $1,5 \pm 0,1 \cdot 10^8$ КОЕ/г. В то время как общее микробное число снижается до $15,0 \pm 0,1 \cdot 10^6$, а количество БГКП и стафилококков уменьшается до $2,0 \pm 0,2 \cdot 10^2$ и $2,5 \pm 0,1 \cdot 10^2$ соответственно. Увеличение численности термофильных микроорганизмов на 5-6 порядков по сравнению с их количеством в исходном навозе свидетельствуют об активизации термобиологических процессов переработки навоза. В последующем (на 5-ые, 7-ые и 9-ые сутки) отмечено снижение общего микробного числа, количество кокковой микрофлоры при высокой численности термофильных микроорганизмов. Так, после пяти суток биоферментации навоза его общее микробное число не превышало $5,0 \pm 0,2 \cdot 10^6$ КОЕ/г, количество стафилококков $300,0 \pm 1,5$ тыс. КОЕ/г. Бактерии группы кишечных палочек, в том числе и патогенные сероварианты O₁₄₁; O₁₄₂ в этот период не были выделены, а количество термофильных микроорганизмов увеличивалось по сравнению с первоначальным значением (в исходном навозе) на 6-ть порядков и составляло $4,8 \pm 0,3 \cdot 10^8$ КОЕ/г. После 7-ми суток аэробной биоферментации навоза в компостном субстрате отсутствовала кокковая микрофлора, а уровень общей микробной контаминации снизился

до $5,0-9,0 \pm 1,5 \cdot 10^4$ КОЕ/г при высоком количественном содержании термофильных микроорганизмов, которые находились в пределах от $1,5,0 \pm 0,2 \cdot 10^7$ до $7,9 \pm 0,1 \cdot 10^8$ КОЕ/г.

Анализ результатов микробиологических исследований показал, что численность микроорганизмов в навозе при его активной аэробной ферментации зависит от температуры компостной смеси, продолжительности ферментации и от количества термофильных микроорганизмов. С увеличением численности активных термофильных микроорганизмов до 10^8 КОЕ/г происходит снижение, а в последующем гибель бактерий группы кишечных палочек и кокковой микрофлоры.

Список литературы:

1. Баранников В.Д. Охрана окружающей среды в зоне промышленных животноводства. - М. - Россельхозиздат. - 1985. - С. 118.
2. Лысенко В.П., Тюрин В.Г. Переработка отходов птицеводческих хозяйств. // М.: ВНИИгеосистем, 2016, - С.428;
3. Смирнов А.М., Тюрин В.Г. Ветеринарно-санитарные и зоогигиенические мероприятия в свиноводстве. // Ж. Ветеринария, №9, 2012 год, С. 3-7;
4. Смирнов А.М., Тюрин В.Г. Экологические проблемы при производстве продукции на животноводческих предприятиях и пути их решения. // С/х биология. Серия биология животных. 1994 №2, с. 26-33;
5. Golueke Clarence G, When in compost "Safe"? // Biocycle J.1982. - Vol.23.№2 – P.28-38.;
6. Charles L. Senn. Role of composting in waste // Utilization Compost. SciJ. - 1974. - Vol. 15, №2. - P.24-28.;

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.089

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ *PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA* И *PHAEOCREMONIUM ALEOPHILUM* В ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЕ

Блинова С.А.^{1,2}, Яшкин А.С.¹, Шварцев А.А.¹, Володин В.А.³, Макаркина М.В.⁴

1 – ООО «Синтол», Москва, 127434 Россия;

sofya.blinova@yandex.ru

2 – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127434 Россия;

3 – Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарах» РАН, Ялта, 298600 республика Крым;

4 – Северо-кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, г. Краснодар, 350901 Россия.

В древесине и на коре виноградной лозы обитает множество сапротрофных грибов, часть из которых является патогенными для растений и при совместном заражении приводят к заболеванию – эска винограда. Главными возбудителями эски и болезни Петри (у молодых виноградных лоз) являются *Phaeomoniella chlamydospora* и *Phaeocremonium aleophilum*. Эска наряду с эутипиозом является одним из основных заболеваний древесины винограда (Pierron et al., 2016). Визуальное проявление эски – симптом тигровой полосатости листьев, часто проявляется в начале лета, однако не обязательно симптомы болезни проявляются каждый год. Проявление симптомов объясняется двумя причинами, обе из которых зависят от факторов окружающей среды:

1. Перенос к листьям, выделяемых грибами, токсинов;
2. Водный стресс, вызванный нарушением сосудов ксилемы.

Наконец, растения со стволами, сильно разрушенными грибами, могут погибнуть от апоплексии, то есть внезапного увядания целого или части растения винограда (Pouzoulet et al., 2014).

Понимание локализации патогенов в растении, а также своевременная диагностика посадочного материала важны для развития виноградарства. Болезни древесины винограда являются угрозой для виноградников всего мира. Анализ зараженности виноградников Франции показал, что 72% растений проявляют симптомы заболевания эска, а 12% виноградников оказались непродуктивными из-за комплекса болезней древесины (Grosman et al., 2012).

Материалы и методы:

Материалом для работы послужили образцы древесины винограда с растений с визуальными признаками заражения и без них. Сбор образцов проводили с апреля по август 2019 года на территории виноградных насаждений Краснодарского края и Южного берега Крыма.

Для выделения ДНК были отобраны многолетние и однолетние фрагменты лозы винограда. Для выделения ДНК использовали набор реагентов «ЦитоСорб» EW-001 (Синтол, Россия) (заявка на патент RU №2019111081/10 (021521). Растительный материал был предварительно подготовлен путем измельчения древесины виноградной лозы вручную, с последующей гомогенизацией материала с использованием керамических бусин в экстрагирующем буфере на ротационном гомогенизаторе Precellys Evolution (Bertin technologies, Франция) по следующей программе 10000rpm/15sec pause 30sec 4 повтора. Для определения локализации *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* в растительном материале было проведено выделение НК из трех частей одной лозы: корка, проводящая система, сердцевина. Для оптимизации пробоподготовки было проанализировано 99 случайно выбранных образцов.

Скрининг образцов винограда на наличие *P. chlamydospora* и *P. aleophilum* проводили методом ПЦР с последующей визуализацией продуктов амплификации на генетическом анализаторе Нанофор 05 (ИАП, РАН, Россия).

Статистическая обработка данных проводилась в приложении RStudio ver. 8.12.175.481 (R-tools Technology, Канада).

Результаты:

Для определения локализации патогенов в лозе, нами была проведена специальная предварительная подготовка проб, которая заключалась в выделении материала из трех частей растения, а именно – корки, проводящей системы, сердцевины. Всего было проанализировано 99 образцов, из которых 29,3% не были заражены ни одним из двух исследуемых патогенов. Зараженными *P. chlamydospora* были 67,7% виноградных лоз от всех проверенных. При анализе результатов по локализации патогена было выявлено, что исследуемый грибок преимущественно концентрируется в проводящей системе и процент его встречаемости в ней составил 74,6% от общего количества зараженных образцов. Зараженность *P. aleophilum* составила 32,3% от 99 проанализированных образцов, наибольшая встречаемость патогена была также в проводящей системе и составила 84,4%. Одновременно двумя исследуемыми патогенами было заражено 27,3% образцов, преимущественная локализация которых была в проводящей системе – 77,7%. *P. aleophilum* в проводящей системе значительно больше чем в корке и сердцевине, эти заключения применимы и к *P. chlamydospora*. Были найдены достоверные различия в локализации *P. aleophilum* и *P. chlamydospora* (Хи-квадрат=19,135; df=4; p-значение <0,01; Критерий Фишера p-значение <0,01).

В ходе исследования установлены места локализации целевых грибных патогенов. Со статистической значимостью *P. aleophilum* и *P. chlamydospora* преимущественно концентрируются в проводящей системе растения. Результаты нашего исследования позволяют рекомендовать использование в качестве образца для выделения ДНК исследуемых грибов проводящую систему винограда.

Список литературы:

1. Grosman, J., Doublet, B. Maladies du bois de la vigne: synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003–2008 au réseau d'épidémiosurveillance actuel. 2012. *Phytoma Défense Végétaux* 651, 31–35.
2. Pierron, R.J.G., Pouzoulet, J., Couderc, C., Judic, E., Compant, S., Jacques, A. Variations in early response of grapevine wood depending on wound and inoculation combinations with *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. 2016. *Front. Plant Sci.*, 11 DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00268>.
3. Pouzoulet, J., Pivovarov, A. L., Santiago, L. S., and Rolshausen, P. E. Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. 2014. *Front. Plant Sci.* 5:253. DOI: 10.3389/fpls.2014.00253

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.090

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИРКУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ У МОЛОДНЯКА КРС

Гладких М. И., Рожкова И. Н.

ФГБНУ Всероссийский НИВИ патологии, фармакологии и терапии
394087, Воронеж, ул. Ломоносова 144, Б
Email: mariya221095@yandex.ru

Инфекции дыхательных путей крупного рогатого скота, в частности телят, являются серьезной проблемой современного животноводства, так как данные заболевание приводят к массовому падежу молодняка или его вынужденному убою. Подобные явления снижают экономический потенциал крупных животноводческих комплексов, и отрицательно влияют на их продуктивность [3,4,5].

Известно, что основной причиной инвазии особей является вирусная инфекция, которая, подавляя иммунную систему организма хозяина, создает благоприятные условия для развития патогенных микроорганизмов, тем самым приводя к осложнению течения заболевания. Помимо этого, установлено, что соблюдение оптимальных условий содержания животных (микроклимат помещений, сбалансированный рацион питания, отсутствие стрессоров и т.д.) также оказывает влияние на резистентность особей к вирусам и патогенам [1,2].

Сегодня для детекции и контроля циркуляций респираторных заболеваний в крупных хозяйствах активно используются молекулярно-генетические методы, основанные на применении реакции амплификации в реальном времени.

Целью нашей работы стало выявление и оценка динамики циркуляции возбудителей острых респираторных вирусных инфекций в хозяйствах Центрально-Черноземского региона РФ за 2019 год методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовался патологический материал и носовые смывы от 45 хозяйств Центрально-Черноземского региона РФ. Диагностику респираторных заболеваний проводили с помощью коммерческих наборов ООО «Вет Фактор» и «AmpliSens» (Россия), на амплификаторе «Rotor-Gene 3000» (Corbett Research, Австралия).

Результаты исследований. В ходе лабораторно-клинической диагностики за 2019 год нами были проанализированы 230 проб патологического материала и носовых смывов (126 и 104 соответственно) на наличие следующих инфекционных агентов: ВД-БС, ИРТ, ПГ-3, аденовирус, *Mycoplasma spp.*, *Pasteurella multocida*. Анализ показал полное отсутствие возбудителя ПГ-3 в хозяйствах, тогда как из 209 образцов - 19% были заражены

ВД-БС. Из 187 исследованных проб - 10,7% контаминированы возбудителем ринотрахеита крупного рогатого скота, аденовирусом заражены - 8,2% образца из 73, от 152 материала инфицированы *Mycoplasma spp.* - 5,9%, а *Pasteurella multocida* встречается в - 15% из 80 исследованных проб. в крупных коммерческих.

Таким образом, нами была проведена оценка циркуляции основных возбудителей респираторных инфекций крупного рогатого скота за 2019 год. Данные указывают на необходимость коррекции условий содержания животных в крупных коммерческих сельскохозяйственных комплексах, своевременную вакцинацию, а также профилактическую диагностику распространения таких инфекций как: ВД-БС, ИРТ, аденовирус, *Mycoplasma spp.*, *Pasteurella multocida*.

Список литературы:

1. Манжурина О.А., Скогорева А.М., Ромашков Б.В. Современные аспекты инфекционной патологии у продуктивных животных в условиях Воронежской области. 2015. 101-108. ID: 25816682
2. Шахов А.Г., Сашнина Л.Ю., Федосов Д.В., Алехин Ю.Н., Сидельникова И.Р. Микробиоценоз верхних дыхательных путей у телят с разным иммунным статусом в период адаптации к новым условиям, при возникновении и развитии респираторных болезней. 2012. 3,41. 81-87. ID: 18047488
3. Pardon B., Callens J., Maris J., Allais L., Van Praet W., Deprez P., Ribbens S. Pathogen-specific risk factors in acute outbreaks of respiratory disease in calves. 2020.103, 3. 2556-2566. DOI: 10.3168/jds.2019-17486
4. Dubrovsky S.A., Van Eenennaam A.L., Karle D.M., Rossitto P.V., Lehenbauer T.W., Aly S.S. Epidemiology of bovine respiratory disease (BRD) in preweaned calves on California dairies: The BRD 10K study. 2019.102, 8. 7306-7319. DOI: 10.3168/jds.2018-14774
5. Maier G.U., Rowe J.D., Lehenbauer T.W., Karle B.M., Williams D.R., Champagne J.D., Aly S.S. Development of a clinical scoring system for bovine respiratory disease in weaned dairy calves. 2019.102, 8. 7329-7344. DOI: 10.3168/jds.2018-15474

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.091

ХЛОРЕЛЛА КАК МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ СРЕДЫ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ЕЁ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Дудина Ю.А., Калашникова Е.А.

**Российский государственный аграрный университет – МСХА им. Тимирязева,
Факультет агрономии и биотехнологии, Москва 127550
E-mail: info@timacad.ru**

Микроводоросли являют собой большое биологическое разнообразие, и одной из самых важных из них является зеленая эукариотическая микроводоросль хлорелла – *Chlorella vulgaris*. Она представляет собой сферическую микроскопическую клетку диаметром 2–10 мкм (Yamamoto *et al.*, 2005).

Хлорелла получила широкую известность благодаря своему составу: около 50% белка, состоящего из 18 незаменимых аминокислот; витамины B1, B2, B3, B5, B6, A, E; полный комплекс незаменимых ненасыщенных жирных кислот; 13 важных для здоровья макро- и микроэлементов в органической форме. В некоторых источниках комплекс пигментов, антиоксидантов, провитаминов, витаминов и других компонентов именуют фактором роста хлореллы и рассматривают как единое целое.

Богатый состав создает предпосылки для широкого применения хлореллы в различных областях деятельности человека.

Одно из практических приложений хлореллы лежит в сфере сельского хозяйства. При корректной организации экономически целесообразного производства, биомасса этих микроводорослей может эффективно работать не только как кормовая добавка для сельскохозяйственных животных, но и как частичная замена более дорогостоящих компонентов корма (Kotrbaček *et al.*, 2015).

Немаловажной отраслью применения хлореллы является пищевое производство. Традиционно хлореллу употребляют в виде порошков или таблеток, а используемые для производства такой продукции штаммы хлореллы имеют толстую клеточную стенку. Способ разрушения клеточной стенки и его целесообразность находятся в поле зрения ученых, ведутся дискуссии по поводу улучшения таким образом её усвояемости. Российская компания «Be.live.organic» нашла выход в применении штамма хлореллы с тонкой клеточной стенкой (планктонного штамма). Конечный продукт имеется в продаже в виде суспензии живой хлореллы.

Невозможно не упомянуть о такой области, как медицина. Комплекс биологически активных соединений биомассы хлореллы оказывает противовоспалительное, антиоксидантное, противомикробное и ранозаживляющее действие (C.J. de Andrade, L.M. de Andrade, 2017).

Хлорелла представляется перспективным инструментом очистки окружающей среды от загрязнений, включая загрязнения антропогенного характера. Кейс, связанный с российской компанией «Альготек», являет собой пример грамотного сотрудничества между наукой и бизнесом. Основой их методики биологической реабилитации водоёмов служит применение специально выведенного для работы с водоемами и запатентованного планктонного штамма *Chlorella Vulgaris* BIN. На сегодняшний день продолжаются начатые на базе РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева в 2019 году исследования для разработки протоколов эффективной биоремедиации водоемов.

Основным нюансом в производстве биотоплива из микроводорослей является содержание липидов, которое часто бывает низким и не того качественного состава. В одном из исследований многофакторная оптимизация повысила липидный пул до 55% сухой массы клеток против 9% контроля (Mallick *et al.*, 2012).

Идея создания биорегенеративных систем жизнеобеспечения на основе биореакторов, которые перерабатывают отходы и дают пищу и воду, для создания планетарных баз обсуждалась с начала космической эры, а сейчас лежит в области интереса таких крупных организаций, как, например, NASA.

Традиционно хлореллу выращивают в прудах и биореакторах (или иных установках), которые отличаются степенью контроля и возможностью создания специальных условий. Хлорелла имеет быстрый темп роста и реагирует на каждый набор условий, в связи с чем возможен контроль выхода конкретных компонентов.

С инженерами сообщества «Твой сектор космоса» в рамках проекта «435nm» мы работали над созданием фотобиореактора для эффективного роста хлореллы. Опыты проводили на экспериментальных стендах для отработки гипотез и с прототипами фотобиореактора. За время существования проекта члены команды «435nm» подготовили и создали четыре прототипа фотобиореактора, которые получили названия 200, 401, 402 и 402.3.

Хлореллу во всех экспериментах культивировали с использованием питательной среды Тамия, модиф. Опыты проводили при комнатной температуре, а динамику роста отслеживали при помощи датчиков оптической плотности.

Опыт эксплуатации первых прототипов реакторов показал, что существует ряд замечаний, который позволил нам спроектировать дальнейшие образцы и избежать предыдущих ошибок. Проанализировав их, смоделировали и собрали самый оптимальный на данный момент прототип «402.3», который в настоящее время находится на стадии доработок.

Кроме того, изучили влияние фотометрических характеристик источника света на оптическую плотность и, соответственно, эффективность выращивания хлореллы. Использовали светодиодное теплое освещение полного спектра и три фитотрона с различными характеристиками излучения (контроль – отсутствие освещения). Для установления оптической плотности применяли спектрофотометр. Использовали питательную среду, аналогичную упомянутой выше. Изучили реакцию двух штаммов хлореллы: с тонкой клеточной стенкой, *Chlorella vulgaris* ВКПМ А1-24, зарекомендовавший себя в области пищевого применения, и с толстой клеточной стенкой, *Chlorella Vulgaris* Beijer, доказавший эффективность при применении в том числе в сельском хозяйстве, любезно предоставленные ООО «Альготек» и кафедрой гидробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова соответственно.

Результаты измерений оптической плотности позволили нам отметить, что наибольший прирост биомассы наблюдается при использовании теплого белого светодиодного освещения (Т=2700К), а минимальный при использовании Варианта 1 (ДК=БК) или Варианта 3 (ДК>БК). При этом результаты измерений оптической плотности обоих штаммов показали схожие результаты, что обнаруживает отсутствие различий в восприятии данными штаммами хлореллы излучения с различными спектральными характеристиками.

Список литературы:

1. Yamamoto M., Kurihara I., Kawano S. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). 2005. DOI: 10.1007/s00425-005-1486-8
2. Kotrbáček V., Doubek J., Doucha J. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. 2015. DOI: 10.1007/s10811-014-0516-y
3. Andrade C.J. de, Andrade L.M. de An overview on the application of genus *Chlorella* in biotechnological processes. 2017. DOI: 10.15226/2475-4714/2/1/00117
4. Mallick N., Mandal S., Singh A.K. *et al.* Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. 2012. DOI: 10.1002/jctb.2694

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.092

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА ФАСОЛИ *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PHASEOLI* В СЕМЕННОМ И РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР

И. М. Игнатьева, Е. В. Каримова, С. И. Приходько

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений», 140150, Россия, Московская обл., г. Быково, ул. Пограничная 32, *babiraignirmi@ya.ru*

Бактериозы растений причиняют значительный ущерб сельскохозяйственному производству Российской Федерации и сопредельных с ней стран, так как каждую культуру поражает практически несколько возбудителей заболеваний из различных родов фитопатогенных бактерий, при этом на их территориях появляются новые бактериальные патогены или наблюдается переход последних на ранее не поражаемые ими сельскохозяйственные культуры. В данный период актуальными проблемами стали большие объемы экспорта и высокие требования стран-импортеров к качеству и отсутствию бактериальных патогенов в семенном материале [1].

Цель работы – оптимизация праймерной системы в соответствии с Boldwin et al. 2017 при обнаружении возбудителя бактериального ожога фасоли *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (далее *X. a.* pv. *phaseoli*) в семенном и растительном материале зернобобовых

культур [2].

Данная работа способствует разработке методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителей болезней зернобобовых культур, при проведении лабораторных исследований образцов растительного и семенного материала растений семейства Бобовые (Fabaceae), растительных экстрактов, бактериальных культур и препаратов ДНК.

В качестве положительных контрольных образцов в работе применяли референтный штамм *X. a. pv. phaseoli* CFBP2534 из Французской коллекции бактерий фитопатогенов (Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes (CFBP), Париж, Франция).

Экстракцию ДНК проводили с помощью коммерческих наборов в соответствии с инструкцией производителя. В исследованиях применяли набор «Проба-ГС» ООО «АгроДиагностика», основанный на сорбционном методе выделения ДНК, а также набор для выделения ДНК «М-Сорб-Туб-Автомат» (ЗАО «Синтол»), основанный на использовании магнитных частиц, процесс экстракции роботизирован. Лаборатория оснащена станцией выделения нуклеиновых кислот «Freedom EVO» (Тесан, Швейцария).

Исследование, основанное на анализе ПЦР, способствует установке новой, быстрой и достоверной диагностики. Также это может быть использовано при оценке уровня заражения растения-хозяина. Существенное влияние на достоверность результатов диагностики оказывает выбор праймеров и оптимизация состава ПЦР-смеси. Оптимизацию тест-систем ПЦР проводили по двум направлениям: оптимизация реакционной смеси (состав, объем реакционной смеси и её компонентов, концентрация праймеров) и оптимизация программы амплификации (температура отжига, количество циклов). Различные наборы выделения ДНК характеризуются своим уровнем чувствительности. Диагностические праймерные системы различаются по степени взаимодействия праймеров с реакционной смесью. Для корректной работы диагностического набора необходимо проводить валидацию праймерной системы, определяя его аналитическую чувствительность, аналитическую специфичность и селективность [3, 4].

Нами были оптимизированы состав реакционной смеси и условия амплификации методов ПЦР-РВ соответствии с Boldwin et al.

Метод на основе классической ПЦР с праймерами в соответствии с Boldwin et al. позволяет детектировать ДНК *X. a. pv. phaseoli* с помощью прямого Au F (5'- ACG GCC GGC GTC TTG TCT CT-3'), обратного праймеров Au R (5' - GCC GAG GTC CGC GAG ATT CT-3') и зонда Au P (5' - FAM-CGT CTC TGG CTT GAC TGC GGT CGC -BHQ1- 3') [2].

Для определения аналитической чувствительности ПЦР-методов приготовили экстракты сои с различным уровнем зараженности. Для этого в новые пробирки переносили 900 мкл растительного экстракта и добавляли 100 мкл бактериальной суспензии начиная с базовой, с концентрацией 10^8 КОЕ/мл и далее последовательно, заканчивая концентрацией 10^0 КОЕ/мл. Всего было приготовлено восемь 10-кратных разведений. В качестве отрицательного контроля использовали экстракт сои, свободный от возбудителя бактериоза. Далее из каждого образца было отобрано 200 мкл для выделения ДНК.

Результаты испытаний коммерческих наборов экстракции ДНК и методов ПЦР показали эффективность при выявлении и идентификации фитопатогена в экстрактах зернобобовых культур. При сравнении исследуемых методов экстракции ДНК бактерии установлено, что оба набора для выделения ДНК «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика») и «М-Сорб-Туб-Автомат» (ЗАО «Синтол») применимы для выделения ДНК при дальнейшей идентификации *X. a. pv. phaseoli* с помощью ПЦР-РВ. Также нами предложены состав оптимизированной в условиях лаборатории ФГБУ «ВНИИКР» реакционной смеси и условия амплификации для проведения ПЦР-РВ в соответствии с Boldwin et al. Показатель аналитической чувствительности составил 10^3 КОЕ/мл, показатель аналитической специфичности составил 100 %, селективность не выявлена.

Данная праймерная система может быть использована в лабораторной экспертизе для идентификации бактериального ожога фасоли *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* из

экстракта растительного и семенного материала зернобобовых культур.

Список литературы:

1. Игнатьева И.М., Каримова Е.В. Изучение бактериозов возбудителей болезней зернобобовых культур и разработка методов их диагностики. Сборник материалов конференции «Современные подходы и методы в защите растений», 2018, стр. 193-197.
2. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and pv. var. *fuscans* in Bean Seed, Oktober 2019, Developed by ISHI Veg All right reserved- 2019 ISF.
3. Wilson HA; Lilly VG; Leach JG, 1965. Bacterial polysaccharides, IV: longevity of *Xanthomonas phaseoli* and *Serratia marcescens* in bacterial exudates. *Phytopathology*, 55:1135-1138.
4. Willian Mário de Carvalho Nunes, Maria Júlia Corazza, Silvana Aparecida Crestes Dias de Souza, Siu Mui Tsai, Eiko Eurya Kuramae. 2008. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* isolates. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.3, p.228-231.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.093

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА
ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ КРОЛИКОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ В
2018-2020 гг.**

Кольцов А.Ю., Белов С.В., Сухер М.М., Живодеров С.П., Бобровская Н.К., Глухарева Е.Н., Сливко И.А., Луницин А.В., Кольцова Г.С.

***ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр вирусологии и
микробиологии", п. Вольгинский 601125; E-mail: kolcov.andrew@gmail.com***

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ВГБК) – остропротекающее высококонтагиозное вирусное заболевание европейских кроликов (*Oryctolagus cuniculus*). Возбудителем ВГБК является вирус семейства *Caliciviridae* рода *Lagovirus*. Этот род объединяет несколько патогенных и непатогенных вирусов кроликов и зайцев.

С 1980-х годов вирус ВГБК поражал только диких и домашних кроликов, в то время как вирус синдрома коричневой печени европейских зайцев (ЕВНС) инфицировал только зайцев (*Lepus spp.*). Однако в 2010 г. во Франции был выявлен новый патогенный лаговироз, RHDV2 или RHDVb, который был патогенен как для зайцев, так и для кроликов. Кроме преодоления видового барьера, новый подтип отличался от «классических» штаммов и подтипа RHDVa способностью инфицировать молодых кроликов (менее двух недель). Дальнейший анализ показал генетические различия в последовательности капсидного белка (VP60). ВГБК-2 составляет новую филогенетическую группу с отличием более чем на 15% от всех известных лаговирозов. Инкубационный период RHDVa составляет 1-2 дня, а RHDV2 3-5 дней. Кролики, инфицированные RHDV2, с большей вероятностью будут демонстрировать подострые или хронические симптомы, чем кролики, инфицированные RHDVa. С 2016 года вирулентность некоторых штаммов RHDV2 увеличилась до уровня вирусов RHDVa.

На территорию нашей страны ВГБК была занесена в 1986 г. Благодаря разработке отечественными исследователями вакцинных препаратов и проведению массовых профилактических мероприятий, к 2000 г. заболевание удалось практически полностью ликвидировать. Однако после 2003 г. наблюдалось увеличение количества вспышек ВГБК. Согласно исследованиям, проведенным в Федеральном исследовательском центре вирусологии и микробиологии, все изученные изоляты вируса ВГБК, выделенные в России с 2003 по 2017 гг., относились к подтипу RHDVa.

В 2018 г. вспышка болезни, вызванная новым вирусом ВГБК-2, была впервые зарегистрирована на территории России. Изолят RHDV2 был выделен при исследовании образцов патологического материала от павших кроликов из Тверской области.

Целью данной работы являлось изучение молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса ВГБК, выделенных в России в 2018-2020 гг.

Выявление генома вируса ВГБК подтипа RHDV2 проводили по методике, рекомендованной МЭБ и описанной Duarte M. (Duarte M., et al. 2015). Выявление генома вируса ВГБК «классического» подтипа и подтипа RHDVa проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Бурмакина Г.С., 2012). Для выделения вирусной РНК из образцов печени использовали реагент Trizol LS (Thermo Fisher Scientific).

В результате проведенных исследований было установлено, что изоляты вируса, выделенные в Тверской и Московской области в 2018 г., а также в Нижегородской области и Красноярском крае в 2019 г. относятся к подтипу ВГБК-2. Изолят, выделенный во Владимирской области, был идентифицирован как подтип RHDVa.

На основании последовательностей полных геномов трех различных подтипов вируса ВГБК были подобраны пары праймеров для амплификации перекрывающихся фрагментов. Данные праймеры были использованы для определения нуклеотидной последовательности полноразмерной кДНК копии вирусной РНК длиной 7,4 тыс. п.о.

Наиболее информативным геном вируса ВГБК является ген VP60, кодирующий мажорный капсидный белок. Нуклеотидные последовательности данного гена четырех отечественных изолятов подтипа ВГБК-2 были использованы для определения филогенетических отношений. Изоляты, выделенные в Тверской и Московской области в 2018 г., формировали отдельный кластер. Гомология нуклеотидных последовательностей данных изолятов составила 99,6%, при этом все замены были синонимичными. Второй кластер был сформирован изолятами, выделенными в 2019 г. Степень гомологии нуклеотидных последовательностей отечественных изолятов между разными кластерами не превышала 94,8%.

Таким образом, в ходе проведенных исследований были определены и проанализированы нуклеотидные последовательности геномов изолятов вируса ВГБК, выделенных со вспышек болезни на территории России в 2018-2020 гг. Было установлено, что на территории нашей страны циркулируют изоляты, относящиеся как к новому подтипу RHDV2, так и изоляты подтипа RHDVa, циркулирующие в России с 2003 года.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации в рамках научного проекта № МК-3764.2019.11

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.094

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА ЯИЧНЫХ КУР С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ПРОДУКТИВНОСТИ НА ФОНЕ СКАРМЛИВАНИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК

Мотин М.С.

***ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина. Факультет
зоотехнологии и агробизнеса. Кафедра зоогигиены и птицеводства имени А. К.
Даниловой, Москва 109472. Email: krox1710@gmail.com***

Проблема здоровья поголовья на птичниках в условиях промышленного птицеводства продолжает быть актуальной (1). В настоящее время активное применение антибиотиков привело к тому, что все чаще и чаще появляются штаммы микроорганизмов устойчивые к уже имеющимся препаратам. Бесконечная «война» фармацевтов и микроорганизмов пагубно влияет на здоровье птицы, продуктивность и товарные качества птицеводческой продукции на прилавках магазинов (2–4). Эта проблема диктует необходимость более глубокого и полного изучения микробиома желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) птицы, его взаимосвязи со здоровьем и продуктивностью кур и поиск альтернативных антибиотикам средств для применения их в промышленном птицеводстве.

В качестве такой замены антибиотикам используются пробиотики – препараты и добавки, содержащие живые микроорганизмы, которые качественно меняют (заселяют) кишечную микрофлору, пребиотики – вещества, не перевариваемые в верхних отделах ЖКТ, но стимулирующие рост и жизнедеятельность микроорганизмов толстого отдела кишечника, и другие препараты (4–5). В связи с этим целью настоящего исследования было провести оценку влияния пробиотических и пребиотических препаратов на состав кишечной микрофлоры и продуктивность птицы.

Для оценки эффективности применения пробиотиков и пребиотиков был поставлен опыт на курах-несушках кросса Lohmann White LCL в виварии при кафедре зоогигиены и птицеводства имени А. К. Даниловой Московской ветеринарной академии имени К.И. Скрябина. Были сформированы две опытные и контрольная группы по 40 голов в каждой, после чего разделили кур на подгруппы высоко- и низкопродуктивных особей по признаку интенсивности яйцекладки (%). Контрольная группа получала стандартный рацион (ПК-1 для кур-несушек) согласно руководству по содержанию кросса, а опытная группа 1 – стандартный рацион и пребиотик «Ветелакт» в дозировке 0,2 мл на голову в день. Опытная группа 2 получала пробиотик «Профорт» в дозировке 1 г на 1 кг комбикорма.

Для изучения состава микрофлоры были использованы современные молекулярно-генетические методы: NGS-sequencing и qPCR-RT. NGS-sequencing – это один из новейших методов определения состава микрофлоры по геномному профилю. Секвенатор нового поколения считывает и расшифровывает геномы микроорганизмов, которые представлены 16S rRNA участками.

Секвенирование проводилось на системе Ion GeneStudio™ S5 System с применением Ion 520™ Chip. Подготовка библиотеки осуществлялась по протоколам с использованием наборов Ion Xpress™ Plus Library Kit, Ion Plus Fragment Library Kit, Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 и Ion 16S™ Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific). Приготовление ДНК матрицы проводили на OneTouch™ 2 Instrument, оценку количества поликлонов – на Qubit 3.0, а обогащение сфер – на Enrichment System.

При проведении qPCR-RT использовали флуоресцентный краситель SYBR Green (Диаэм, Евроген, Россия). Реакцию проводили на амплификаторах Light Cycler® 96 System и Light Cycler® 460 System (Roche, Швейцария). В режиме реального времени система высчитывала общее микробное число по заданной формуле и через эквивалент *E. coli* методом прямого сравнения. Математическую обработку результатов выполняли в программе MS Excel.

По окончании исследования было установлено, что у высокопродуктивной и низкопродуктивной птицы имеются различия как в составе микробиоты, так и в ее количестве. Скармливание пребиотической добавки «Ветелакт» положительно повлияло на состав микробиома высокопродуктивной птицы, что показывает увеличение доли микроорганизмов филума *Firmicutes* и порядков *Bifidobacteriales* и *Lactobacillales*. Эффект от скармливания пребиотика «Ветелакт» низкопродуктивной птице не значителен как по зоотехническим показателям, так и по составу микробиоты. Скармливание пробиотической добавки «Профорт» положительно повлияло как на продуктивность, так и на качество микрофлоры, оказав стабилизирующий эффект. У низкопродуктивной птицы, получавшей «Профорт», наблюдается увеличение общего микробного числа по сравнению с другими группами, что говорит о том, что этот препарат благоприятно способствовал заселению кишечной микробиоты птицы бактериями.

Список литературы:

1. Табакова Л. П. Частная зоотехния и технология производства продукции животноводства. М.: Колос, 2007. 318 с.
2. Намазова-Баранова Л.С., Баранов А.А. Антибиотикорезистентность в современном мире // Педиатрическая фармакология. 2017. Т. 14. № 5. С. 341–354.

3. Материалы Международной научно-практической конференции «Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных». М.: Сельскохозяйственные технологии, 2019. 284 с.

4. Радчук Н.А., Дунаев Г.В., Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология / Под ред. Н. А. Радчука. М.: Агропромиздат, 1991. 383 с.

5. Ильина Л.А., Ылдырым Е.А., Никонов И.Н., Филиппова В.А., Лаптев Г.Ю., Новикова Н.И., Грозина А.А., Ленкова Т.Н., Манукян В.А., Фисинин В.И., Егоров И.А. Таксономическое разнообразие микробиома слепых отростков кишечника у цыплят-бройлеров и его изменение под влиянием комбикормов с подсолнечным шротом и сниженной обменной энергией // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. № 6. С. 817–824.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.095

DETECTION AND IDENTIFICATION OF *RATHAYIBACTER TRITICI* IN RUSSIAN GRAIN CROP SURVEY

Muvingi M.¹, Slovareva O.Y.², Ruberts V.S.³, Igonin V.N.³

1 – People's Friendship University Russia, RUDN University Department of Agro-Biotechnology, Institute of Agriculture, Moscow 117198, E-mail: mufaromuvingi@gmail.com

2 – Federal State Organization "All-Russian Plant Quarantine Center", Bykovo 140150

3 – Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Moscow 127550

Rathayibacter tritici is a gram-positive soil-bacterium that belongs to the Kingdom Bacteria, Phylum Actinobacteria, Order Actinomycetales, Sub-order Micrococccineae, Family Microbacteriaceae and Genus *Rathayibacter* [1, 2]. In some cereals the bacteria cause spike blight in wheat [2]. Early stage symptoms include early stage symptoms yellow or white stripes along leaf veins, yellow mucous bacteriosis, and curled or wrinkled leaves they come out of the leaf axils filled with bacterial mass [3]. Later stage symptoms include ugly ears filled with bright yellow bacterial exudate and plant kennels are not formed if at all formed they just shrivel [1]. *R. tritici* is mainly transported by the nematode *Anguina tritici*. The larvae of the nematode stays in the soil viable for five to seven years and in cereal seeds more than two years. Nematode mostly affects young or short plants [4]. The purpose of the study was to conduct a phytosanitary survey of grain crops to detect and identify the bacteria.

The plant material for the study was sampled from experimental field of Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A Timiryazev in May 2020th. Samples were collected from 55 different varieties of wheat, rye and triticales. Ten to fifteen plants of one sample of each crop variety were collected both with symptoms like chlorotic spots and streaks, wilt and twisting and those that were healthy and placed in a plastic bags with paper filters to absorb water. The samples were stored at 2–8 °C before the experiment. The probe preparation was performed during a week after sampling. Specimens weighing 1 to 2.5 g were taken from each sample and placed into a 100 ml container. A laboratory electronic balance (AJH-4200CE, Vibra, Japan) was used to weigh the samples. Phosphate-buffered saline (PBS) was added to the laboratory specimen (20:1, by weight). The sample was then shaken vigorously at 200 rpm for 45–60 mins on a Unimax 2010 rotary shaker (Heidolph, Germany). The extracts were then passed through filter paper with pore size of 3–5 µm. The filtrates were then placed in a 50 ml tubes and after – in a centrifuge (Allegra X-30R, Beckman Coulter, Denmark) and run for 10 min at 4 °C, 10 000 g. The resulting supernatant was then removed and 1 ml of PBS buffer were added to the precipitate and vortexed for 30 secs. These solutions were used to isolate the bacteria.

The samples were plated using the Drigalsky method [5] onto Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) media whose components were 5 g yeast extract, 5 g peptone, 10 g glucose and 15 g agar

per 1 liter distilled water. Two Petri-dishes were used per sample and after they were sealed with parafilm and incubated (MIR-254, Panasonic Healthcare Co., Ltd., Japan) at 25 °C for 5 days. At the same time was plated a positive control – the strain of *R. tritici*, which have been deposited into the CFBP collection (France) at number 1385 in 1952 (origin is the Egypt). After 5 days grown colonies were compared with colonies of *R. tritici*. All colonies, which looked like *R. tritici*, were incubated at 96°C for 10 mins in 200 µl of PBS for DNA extraction. After this classical PCR was run on these samples in a mix that contained 1.0 µl of each primer (Rt 3F/3R) at a concentration of 10 pmol, 16.0 µl of deionized water, 5.0 µl of 5X MasDDTaqMIX-2025 master mix (ZAO Dialat, RF) and 2 µl of DNA. Total volume was 25 µl per sample. The primers Rt 3F/3R were developed by Baek et al., 2018. The sequences of primers are following: Rt 3F 5'-GTG GGC TGA TAG GTG GTG ATGT-'3, Rt 3R 5'-GCG CCC TTT CTC TAC TGG GTAT-'3. The amplification protocol was: initial denaturation 95°C for 10 min, then 25 cycles: 95°C for 20 s, 64°C for 15 s, 72°C for 15 s, and then final elongation 72°C for 2 min. All PCR reactions were run in a Bio-Rad T100 Thermal Cycler amplifier (Bio-Rad, USA). The identification of reaction products was accomplished on a 1.5% agarose gel using a Power Pac HV electrophoresis power supply and a Bio-Rad Imaging System (Bio-Rad, USA).

As a result, Colonies of *R. tritici* after 5 days were yellow color, round, regular shape, up to 3 mm in diameter [1]. Some of the bacterial colonies looked like the positive control. Good bacterial growth were noted on YPGA media with yellow colonies that ranged between 2–3 mm in diameter and appeared to be convex. In total 42 bacterial colonies looked like *R. tritici* were collected. YPGA proved to be a suitable media for the cultivation of *R. tritici*. The electrophoresis run on the amplicons gave negative results for the presence of *R. tritici* in 42 collected bacterial samples when tested with Rt 3F/3R primers. At the same time, with DNA of positive control were obtained amplicons whose specific length was 520 bp [6]. Some amplicons appeared to be bigger than the positive control. Their lengths were between 650 to 1 400 bp. Thus the absence of bacteria in the surveyed territory of the experimental field of the Timiryazev Academy was established. The obtained data can be used for drawing up maps indicating the geographical distribution of the dangerous cereals pathogen. At the same time, the identification methods used can be applied to diagnose *R. tritici*.

In the Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy field no *R. tritici* was detected in the 55 samples of the different cereal crops. This was the first phytosanitary examination on this field for the identification and detection of *R. tritici*.

References:

1. Zgurskaya H. I., Evtushenko, L.I., Akimov V.N., Kalakoutsii L.V. *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb. nov., and six strains from annual grasses. 1993. 43.
2. Park J., Lee P.A., Lee H.H., Choi K., Lee S.W., Seo Y.S. Comparative Genome Analysis of *Rathayibacter tritici* NCPPB 1953 with *Rathayibacter toxicus* Strains Can Facilitate Studies on Mechanisms of Nematode Association and Host Infection. 2017. 33:4.
3. Slovareva O.Y. Detection and identification of pathogens of bacterial diseases of wheat and barley in the Russian Federation. 7:1.
4. Shashkov, A.S., Tul'skaya, E.M., Streshinskaya, G.M. et al. Rhamnomannans and Teichuronic Acid from the Cell Wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603T. 2020. 85.
5. Lavrenchuk L.S., Ermoshin A.A. Microbiology: Workshop (In Russian). ed. E.V. Berezina. 2019. 107.
6. Baek K.Y., Lee H.H., Son G.J., Lee P.A., Roy N., Seo Y.S., Lee S.W. Specific and Sensitive Primers Developed by Comparative Genomics to Detect Bacterial Pathogens in Grains. 2018. 34:2.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В
ДИАГНОСТИКЕ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА****Пархоменко Ю.С., Семенова Е.В., Перепелкина И.С.****ФБГНУ «ВНИВИПФит», г. Воронеж, ул. Ломоносова, 1146 394087****E-mail: yuliyasp21@mail.ru**

Сальмонеллезы (*Salmonellosis*) – группа бактериальных болезней, преимущественно молодняка сельскохозяйственных и промысловых животных, характеризующихся при острым течении лихорадкой, явлениями септицемии, токсикоза и поражением кишечника. Возбудителем являются бактерии рода *Salmonella*. По заключению экспертов Всемирной организации здравоохранения, сальмонеллез как зоонозная инфекция не имеет себе равных по сложности эпизоотологии, эпидемиологии и борьбы с ним [1]. Болезнь крайне опасна как в случае острого течения, так и хронического.

Сальмонеллез – дозозависимая инфекция, следовательно, ее вспышка в хозяйствах обычно обусловлена не повышением вирулентности возбудителя (она постоянна), а накоплением его в критической концентрации [1]. Его источником, как правило, являются больные и переболевшие животные – сальмонеллоносители. Факторы передачи – инфицированные корма, вода, подстилка, предметы ухода за животными, оборудование, одежда и обувь [2]. Поэтому на животноводческих комплексах, в которых строго соблюдаются санитарные требования, острых вспышек болезни не происходит, а появляются только сальмонеллоносители [1].

Выделение и идентификация возбудителя сальмонеллеза лабораторными методами происходит, в основном, бактериологическим и молекулярно-генетическим способами диагностики. Микробиологический метод эффективен при наличии необходимого количества возбудителя в биологическом материале, что, как правило, возможно лишь в острую фазу заболевания. С помощью же ПЦР-анализа можно диагностировать инфекцию как в остром периоде, так в хронической стадии, а также выявлять случаи носительства, поскольку данный способ исследования позволяет обнаружить даже единичные молекулы ДНК микроорганизма, не выявляемые другими методами.

Материалы и методы исследования. Материал исследовали молекулярно-генетическим и бактериологическим методом. Всего было проанализировано 48 проб биологического материала (содержимое кишечника, кровь, внутренние паренхиматозные органы, трубчатая кость) от молодняка крупного рогатого скота в возрасте до 6 месяцев и 26 проб от взрослых животных. Указанные материалы для исследования поступали в лабораторию из хозяйств Центрально-Черноземного региона РФ.

Выделение ДНК возбудителя *Salmonella* spp. производили с помощью набора AmpliSens ПЦР-смесь-1 R *Salmonella* spp. (Россия) на амплификаторе. Детекцию результатов осуществляли посредством электрофореза в агарозном геле. Для обнаружения возбудителя бактериологическим способом диагностики использовали микроскопию мазков, посев на среды для селективного обогащения (магниевая среда, селенитовый бульон, среда Раппопорта) с последующим пересевом на селективные плотные среды (Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар) с дальнейшим определением биохимических свойств и серотипа в реакции агглютинации согласно МУ 4.2.2723-10 «Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды».

Результаты исследования. При исследовании 64 проб биологического материала от крупного рогатого скота методом ПЦР-диагностики в 100 % случаев был получен положительный результат на наличие возбудителя сальмонеллеза, в то время как положительный результат с выделением сальмонелл бактериологическим методом

установлен в 76,6 % (49) случаев. При этом в анализируемых пробах от молодняка этот показатель составил 87,5 % (42 пробы), а от взрослых – 46,1 % (12 проб), что свидетельствует о сальмонеллоносительстве или хронической форме болезни, выраженной в большей степени среди животных в возрасте старше полугода. Отмечено, что процент выделения бактерий рода *Salmonella* в исследуемых образцах молекулярно-генетическим методом примерно в 1,5 раза выше по сравнению с бактериологическим. Это подтверждает более высокую чувствительность ПЦР-диагностики. Кроме того время исследования микробиологическим методом составляет около 5-7 суток, а при ПЦР-анализе – максимум 1 сутки, что значительно сокращает сроки диагностики.

Заключение. Молекулярно-генетический метод исследования необходимо широко внедрять для мониторинговых регулярных исследований, ведь выявление бессимптомного бактерионосительства крайне важно для эффективного предотвращения распространения сальмонеллезной инфекции. В частности, с целью профилактики сальмонеллеза молодняка крупного рогатого скота на стадии подготовки родительских пар именно ПЦР-диагностика может позволить выявить больший процент сальмонеллоносителей, так как среди взрослых животных около 50% особей по результатам проведенного анализа являются таковыми. Это преимущество по сравнению с бактериологическим методом необходимо использовать в повседневной практике.

Список литературы:

1. Сальмонеллезы животных и птиц. Манжурина О.А., Скогорева А.М., Ромашов Б.В., Степанов А.В. Воронеж. 2018. 135 с.
2. Сагабиева Н.Н. Эпизоотологический мониторинг сальмонеллеза крупного рогатого скота в Курской области: автореф. дис. ... канд. вет. наук. 2004. 137 с.
3. МУ 4.2.2723-10 «Лабораторная диагностика сальмонеллез, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды» – 2010.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.097

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ И ХРАНЕНИЯ (-20°C) БИОМАССЫ *Kluyveromyces marxianus*

Петрухина Д.И.

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и
агроэкологии», 249032 Обнинск
E-mail: daria.petrukhina@outlook.com**

Молочная сыворотка является основным побочным продуктом, который образуется в процессе переработки молочного сырья. Так называемая «кислая сыворотка» возникает в процессе производства творога с применением молочнокислых бактерий. Как отмечается, утилизация молочной сыворотки со сточными водами и проведение их последующей стандартной обработки слишком дорого из-за высокой химической и биологической потребности в кислороде (ХПК и БПК) молочной сыворотки. Однако высокое содержание углеводов, особенно лактозы, позволяет использовать молочную сыворотку в качестве ценного сырья для производства биоэтанола. Весь процесс получения этанола можно провести в две стадии. Так, на первой осуществить аэробное культивирование дрожжей *Kluyveromyces marxianus* для производства биомассы на кислой молочной сыворотке, а на второй — анаэробную ферментацию лактозы молочной сыворотки дрожжами в этанол. Для обеспечения бесперебойного функционирования анаэробной ферментации, необходимо постоянное наличие свежей биомассы дрожжей. Для снижения материальных и временных затрат и объема работ по обеспечению биомассой дрожжей второй стадии производства этанола, целесообразно получение замороженной биомассы *Kl. marxianus*, которая бы после размораживания имела высокий процент жизнеспособных клеток.

Исследовали *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ). Рост культуры на плотной питательной среде осуществляли в чашках Петри с селективным агаром YGC с хлорамфениколом. Компоненты кислой молочной сыворотки: pH= 4,40-4,46, лактоза 150-151 г/л, L-лактат 24,5-26,5 г/л, этанол <0,1 г/л, аммонийный азот 0,25-0,32 г/л, ортофосфатный фосфор 1,99-2,10 г/л. Компоненты, добавляемые к сыворотке: $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,84 г/л, H_3BO_3 0,70 г/л, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,79 г/л, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,45 г/л, KI 1,53 г/л, NH_4Cl 15,0 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 г/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20,1 мг/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,7 мг/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5,1 мг/л, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4,9 мг/л. Использовали одноклассовый аэробный биореактор с рубашкой, датчиками pO_2 , pH и температуры, контроллером для регулирования потока подаваемого в реактор воздуха. Применяли обратный холодильник из стекла (40 см) для удержания испаренной воды. Использовали резервуары с 2М КОН и 1М H_2SO_4 и контролируемым насосом для регулирования pH, а также весы для контроля потребления щелочи и кислоты. Параметры процесса: Начальный объем питательной среды составлял 600 мл. Аэрация достигала 50 нл/ч с использованием воздуха, очищенного от воды и углекислого газа. Скорость перемешивания составляла 1200 мин⁻¹. Значение pH поддерживали в диапазоне 4-6 (щелочь или кислоту прибавляли только при выходе из этого диапазона). Для приготовления буферного раствора, соли взвешивали и растворяли в 1 л деионизированной воды: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ =0,16 г/л, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ =0,198 г/л, NaCl =8,19 г/л. Подготовка необходимой биомассы для хранения при -20 °С: Культуру *Kl. marxianus*, растущую на плотной питательной среде в чашках Петри, переносили в стерильных условиях в пробирки типа Эппендорф и суспензировали в 2 мл воды либо буферного раствора. Центрифугировали в течение 3 мин при 6000 мин⁻¹, удаляли супернатант, промывали 1 мл воды либо буферного раствора. Отбирали 100 мкл однородного образца этой суспензии, прибавляли 10 мкл красителя метиленового синего и тщательного перемешивали. Проводили подсчет живых и мертвых клеток под микроскопом с применением гемоцитометра. Остаток пробы центрифугировали течение 3 мин при 6000 мин⁻¹, удаляли супернатант и замораживали при температуре -20 °С. После размораживания вновь проводили определение количества живых и мертвых клеток. Аналогичным образом исследовали клеточную суспензию, выращенную из биореактора, для установления каких-либо различий между поверхностными и погруженными культурами дрожжей. Далее проводили масштабирование процесса. Использовали 1 литр клеточной суспензии *Kl. marxianus* с концентрацией 40 г/л, полученную путем выращивания в биореакторе. Подготавливали 25 проб, для этого стерильно переносили 40 мл суспензии дрожжей в стерильные флаконы (50 мл) с завинчивающейся крышкой. Центрифугировали в течение 3 мин при 6000 мин⁻¹, удаляли супернатант, промывали 40 мл стерильного буферного раствора. Вновь центрифугировали течение 3 мин при 6000 мин⁻¹ и удаляли супернатант. Хранили при -20 °С.

Результаты показали, что замораживание до -20 °С не оказывало существенного влияния на соотношение процента живых и мертвых клеток дрожжей из культуры на плотной питательной среде, суспензированных в воде: до замораживания процент живых клеток 57±3, процент мертвых клеток 43±3, а после 57±1 и 43±1 соответственно. Вероятно, лизис клеток происходил уже в водной суспензии до замораживания, и это соотношение сохранялось после оттаивания. При использовании в качестве суспензионной среды буферного раствора результаты не были более благоприятным: до замораживания процент живых клеток 75±2, процент мертвых клеток 25±2, а после 57±2 и 43±2 соответственно. Однако, лизис клеток в буферном растворе до замерзания, был снижен в сравнении с данными, полученными с применением воды в качестве суспензионной жидкости. Это объясняется тем, что клетки дрожжей из культуры, растущей на плотной питательной среде, были перемещены в суспензию с высоким осмотическим давлением. Наиболее благоприятный коэффициент концентрации для дрожжевых клеток соблюдался в буферном растворе.

Процедура замораживания и оттаивания влияла значительно меньше на клетки из суспензии, выращенной в биореакторе, после их последующей обработки буферным раствором: до замораживания процент живых клеток >99 , процент мертвых клеток <1 , и после >99 и <1 соответственно. Это можно объяснить тем, что путем центрифугирования клеточной суспензии из биореактора происходило осаждение не только дрожжевых клеток, но и компонентов питательной среды, таких как соли, сахар, что способствовало увеличенной концентрации даже после промывки клеточной суспензии буферным раствором, который в свою очередь ограничивает лизис клеток из-за более низкого осмотического давления, в отличие от образцов клеток, выращенных на плотной среде. Однако, эти данные были получены для концентрированной биомассы, в масштабе 1 мл. Увеличение масштаба замораживания биомассы до 40 мл, приводило к увеличению объемов замороженного осадка клеток дрожжей: до замораживания процент живых клеток 90 ± 1 , процент мертвых клеток 10 ± 1 , а после 68 ± 1 и 32 ± 1 соответственно. Поскольку в большем объеме дрожжевой биомассы быстрое замораживание с образованием таких небольших кристаллов льда, как в пробирке типа Эппендорф в 1 мл, никогда не сможет быть реализовано, происходит более медленно замораживание с образованием более крупных кристаллов льда, что в свою очередь приводит к разрушению большего количества дрожжевых клеток.

Таким образом, полученный высокий процент живых клеток *Kl. marxianus* после обработки и хранения с температурой -20°C указывает на целесообразность предлагаемой процедуры для сохранения достаточной биомассы для осуществления второго этапа производства биоэтанола - анаэробной ферментации лактозы молочной сыворотки.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.098

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД В ДИАГНОСТИКЕ РЕПРОДУКТИВНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СВИНОМАТОК В СВИНОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Рожкова И. Н., Гладких М. И.

***ФГБНУ Всероссийский НИВИ патологии, фармакологии и терапии
394087, Воронеж, ул. Ломоносова 114, Б
Email: iri.rogulina@yandex.ru***

На промышленных свиноводческих комплексах при современных способах производства наблюдается значительное ограничение возможности проявления выработанных эволюцией физиологических функций свиноматок, которое приводит к снижению продуктивных и воспроизводительных качеств, нарушению обмена веществ, расстройству деятельности ряда органов и систем из-за изменения традиционных условий кормления и содержания животных, отсутствия активного движения и инсоляции.

Наибольшую опасность в снижении репродуктивной функции свиноматок представляют биологические факторы, в частности инфекционные болезни, вызывающие развитие инфекционного процесса у животных, особенно на фоне снижения у них естественной резистентности [3]. К наиболее распространенным из них относятся: вирусные (репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС), цирковиральная инфекция свиней (ЦВИС), парвовирусная инфекция свиней (ПВИС)), а также бактериальные заболевания (микоплазмоз, хламидиоз и тд.).

Пока не все современные свиноводческие комплексы имеют высокий уровень защиты животных от проникновения инфекционных заболеваний, что говорит о необходимости регулярного мониторинга инфекций современными и наиболее точными методами исследований, в целях предотвращения заболеваний свиней. В настоящее время одним из эффективных методов в предварительной диагностике инфекций является

молекулярно-генетический метод - полимеразная цепная реакция (ПЦР)[1]. Этот метод обладает такими важными критериями, как быстрота использования, достаточная простота применения, высокая чувствительность, а в некоторых случаях дает возможность провести типирование возбудителя [2].

Целью исследований являлось мониторинговое изучение инфицированности влагалищных смывов свиноматок возбудителями инфекционных болезней, способными вызвать патологию репродуктивных органов у животных.

Материалы исследований. В 2016-2019 гг. были проведены молекулярно-генетические исследования 418 проб влагалищных смывов свиноматок из 5 крупных свиноводческих комплексов Белгородской области, в которых отмечались нарушения репродуктивной функции у свиноматок (эндометриты, прохолосты, аборты, мёртворождаемость, мумификация, мацерация плодов, рождение нежизнеспособных поросят).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени осуществлялась на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия) с гибридно-флюоресцентной детекцией и на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, г. Москва) с детекцией продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Результаты исследований. В результате молекулярно-генетического мониторинга в пробах влагалищной слизи были выявлены 5 видов патогенов (PPCC, ЦВС-2, ПВИС, патогенные микоплазмы и хламидии).

Проведенными исследованиями 418 проб влагалищных смывов методом ПЦР установлена их контаминированность патогенными микоплазмами и хламидиями в 39,5% и 7,6% соответственно; вирусом ПВИС в 15,6%, вирус PPCC в 7,4%, вирус ЦВС-2 в 3,2% случаев.

Уровень контаминированности смывов в разные годы отличается, так в 2018-2019 гг. не обнаружен вирус ЦВС-2, хламидии выделены в 2017-2018 гг. При этом уровень инфицированности патогенными микоплазмами уменьшился с 42,6% в 2016 году до 9,6% в 2019 году. Так же отмечено снижение инфицированности влагалищных смывов вирусом PPCC с 9,5% в 2016 до 0,0% в 2019 гг.

Заключение. По результатам молекулярно – генетических исследований установлено, что в исследуемых свиноводческих комплексах Белгородской области циркулируют 5 видов возбудителей, способных вызвать нарушения воспроизводительной функции у свиноматок. Среди указанных патогенов преобладают микоплазмы, которые в большинстве случаев встречаются в виде ассоциаций с разными комбинациями возбудителей.

В связи с циркуляцией возбудителей репродуктивных болезней в свиноводческих хозяйствах необходима организация плановых комплексных лабораторных исследований, включающих молекулярно-генетический метод для определения стратегии проведения лечебно - профилактических и санитарных мероприятий.

Список литературы:

1. Ефанова Л.И., Свиридов М.М., Манжурина О.А., Пасько Н. В., Рогулина И.Н. Обнаружение с помощью ПЦР возбудителей репродуктивных нарушений в сперме хряков, абортированных плодах и влагалищных смывах свиноматок с эндометритом. 2013. ID: 18948917
2. Манжурина О.А., Рожкова И.Н., Пархоменко Ю.С., Перепелкина И.С., Семенова Е.В. Молекулярно-генетический мониторинг специфических возбудителей репродуктивных нарушений у свиней. 2019. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2019.3.47
3. Шабунин С.В., Нежданов А.Г. Болезни органов размножения у животных как локальное проявление полиорганной патологии. 2009. ID: 26034437

ПРЕИМУЩЕСТВА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ НЕКРОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ**Семенова Е.В., Пархоменко Ю.С., Перепелкина И.С.****ФБГНУ «ВНИВИПФит», г. Воронеж, ул. Ломоносова, 1146 394087****E-mail: yuliyasp21@mail.ru**

По мнению многих ученых проблема роста заболеваемости крупного рогатого скота некробактериозом к сожалению не теряет актуальности. На фоне интенсивного промышленного животноводства, многочисленных факторов риска травматизма и ряда других причин заметно возросли заболевания конечностей молочных коров и племенных быков [3]. Ведь условия содержания, невыполнение ветеринарно-санитарных требований, и, как следствие, потеря кожным покровом естественной непроницаемости в качестве неспецифического фактора защиты приводят к внедрению в ткани патогенной микрофлоры [1]. К таким патогенам чаще всего относятся возбудители некробактериоза (*Fusobacterium necrophorum*), являющиеся при определенных негативных условиях причиной развития инфекционной болезни, характеризующейся гнойно-некротическими поражениями преимущественно нижних конечностей, но в отдельных случаях и ротовой полости, вымени, половых органов, печени, легких, мышцах и других тканей и органов [3]. *Fusobacterium necrophorum* – анаэробная бактерия, выделение которой бактериологическими методами из патологического материала осложняется наличием в нем сопутствующей микрофлоры [2], а также проводимой, особенно в крупных хозяйствах, антибиотикотерапией в качестве профилактики. *Fusobacterium necrophorum* является частью нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта жвачных животных, способствует расщеплению и усваиванию грубых кормов [1], является условно-патогенным микроорганизмом. Поиск эффективных методов лечения и профилактики некробактериоза является важным вопросом современной ветеринарии и невозможен без своевременного мониторинга эпизоотологической ситуации, которую позволяет отслеживать в скотоводческих хозяйствах по многим вирусным и бактериальным патологиям, в том числе и по некробактериозу, молекулярно-генетический метод.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились методом полимеразной цепной реакции параллельно с бактериологическим. Было проанализировано 86 проб соскобов с копыт от крупного рогатого скота с клиническими признаками патологии дистальной части конечностей (хромота, язвы, гнойно-некротические поражения) из хозяйств Центрально-Черноземного региона РФ. Исследуемый материал отбирали из пораженных участков на границе здоровой и пораженной ткани. Указанные материалы для исследования поступали в лабораторию в 2018 - 2019 годах.

Выделение ДНК *Fusobacterium necrophorum* проводили при помощи тест-системы для выявления *Fusobacterium necrophorum* в гнездовой полимеразной цепной реакции согласно наставлению к ней. Для обнаружения возбудителя бактериологическим способом диагностики использовали микроскопию мазков, посев на питательные среды (Китта-Тароцци, кровяной агар и др.) в анаэробных условиях, заражение лабораторных животных.

Результаты исследования. Проведенными исследованиями 86 проб соскобов с копыт от крупного рогатого скота с клиническими признаками патологии дистальной части конечностей за период 2018 - 2019 годов методом ПЦР установлена инфицированность возбудителем некробактериоза 74,4 % (64) проб, а бактериологическим – 55,8 % (48). В 25,6 % (22) случаев микроорганизм *Fusobacterium necrophorum* не был выделен ни тем, ни другим методом, что свидетельствует об иной этиологии развития поражения конечностей у животных. Преимущественная результативность ПЦР-диагностики составила 30 %. Помимо этого время выделения и идентификации возбудителя некробактериоза

микробиологическим методом составляет около 10 суток, а молекулярно-генетическим – около 6 часов, что позволяет значительно сократить сроки исследования.

Заключение. Чувствительность, специфичность, короткие сроки исследования метода ПЦР-диагностики позволяют идентифицировать возбудитель некробактериоза в биологическом материале более эффективно по сравнению с бактериологическим, что указывает на необходимость его более широкого применения при проведении своевременных мониторинговых и диагностических исследований.

Список литературы:

1. Джупина С.И. Особенности профилактики некробактериоза крупного рогатого скота. Ветеринария сегодня. 2015. № 2 (13). С.21-27.
2. Макаев Х.Н., Фаизов Т.Х., Потехина Р.М. и др. Выделение и идентификация возбудителя некробактериоза крупного рогатого скота при помощи бактериологических исследований и ПЦР-диагностики. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им.Н.Э. Баумана. 2012. Том 211. С.91-94.
3. Скородумов Д.И., Субботин В.В., Сидоров М.А. и др. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. М.: ИзографЪ. 2005. 656 с.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.100

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ АССОЦИАТИВНОЙ
АЗОТФИКСАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ**

Шулико Н.Н., Тукмачева Е.В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Омский аграрный научный центр», Омск, 644012
E-mail: 55asc@bk.ru*

Динамичное развитие сельскохозяйственного производства в стране в настоящее время не представляется возможным без использования биологических методов обеспечения питания растений и их защиты от вредителей. Наиболее реальной альтернативой широкомасштабному применению минеральных удобрений и пестицидов в сельском хозяйстве может служить использование микробно-растительных взаимодействий на основе биопрепаратов ассоциативной азотфиксации [1].

Резкое сокращение применения в сельском хозяйстве минеральных и органических удобрений, химических средств защиты растений вызвало необходимость поиска и применения в ресурсосберегающих технологиях дополнительных источников азотного питания растений, какими являются биопрепараты комплексного действия на основе ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов.

Исследования проводились в южной лесостепи Омского Прииртышья в 2014-2017 гг. в полевых опытах с яровой мягкой пшеницей. Почва – лугово-черноземная среднесиловая тяжелосуглинистая с содержанием гумуса 6,8%. Площадь делянки 25 м², повторность – четырёхкратная. Обеспеченность почвы азотом нитратов в слое 0-20 см низкая (3-5 мг/кг), содержание подвижных фосфора и калия - высокое. Перед посевом внесены азотные удобрения в дозе N₃₀.

Годы исследований были в основном благоприятными для возделывания зерновых. Засушливым был вегетационный период 2014 г. Количество осадков составляло 135 мм или 68% от нормы (ГТК=0,68 ед.). В 2015-2016 гг. гидротермический коэффициент (ГТК) за май-август равнялся 1,08-1,09 ед. В 2017 г. гидротермический коэффициент был низким 0,7 ед., однако благоприятным было распределение осадков в течение вегетационного периода, что положительно повлияло на урожайность зерновых.

Для обработки семян были использованы биопрепараты ассоциативных азотфиксаторов комплексного действия БиоВайс (ООО «Планта-Плюс», г. Томск),

Ризоагрин (ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург, Пушкин). Агротехника возделывания пшеницы общепринятая в условиях Сибири. Обработка семян пшеницы проводилась непосредственно перед посевом вручную.

Урожайность зерновых культур является комплексным показателем условий, складывающихся в период роста и развития растений. Применение бактериальных удобрений достоверно повышало урожайность зерна пшеницы в среднем за годы исследований на 0,15-0,16 т/га зерна или 7-9% к контролю

Анализ экономической эффективности применения бактериальных удобрений показал рост рентабельности до 10% к контролю, который составил 60,1%. При инокуляции семян пшеницы отмечен рост прибыли с одного гектара как в варианте БиоВайс, так и Ризоагрин. Чистый доход составил 639 руб. к контролю – 3666 руб. Использование бактериальных удобрений под яровую пшеницу в условиях черноземной лесостепи Омского Прииртышья обеспечило рост экономической эффективности ее производства на 16-17%.

Список литературы:

1. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. СПб: Изд-во С.-Петерб. Ун-та. 2009. 210 с.

**СЕКЦИЯ
«ЦИТОЛОГИЯ И ЦИТОГЕНЕТИКА»**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОБЪЯСНЕНИЮ
ВИДООБРАЗОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *VIDENS*****Галкина М.А.¹, Прокопчук С.Р.², Виноградова Ю.К.¹, Разумова О.В.^{1,3}****1 – Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН Москва, Ботаническая ул., 4,
127276, e-mail: mawa.galkina@gmail.com****2 – Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.
Тимирязева, агрономический факультет, Москва, 127550, Тимирязевская ул., 49****3 – ФГБНУ ВНИИСБ, Лаборатория прикладной геномики и частной селекции
сельскохозяйственных растений, Москва, 127550, Тимирязевская ул., 42**

Происхождение видов путем гибридизации достаточно распространено в живой природе. Однако каждый подобный случай требует независимого изучения и подтверждения, кроме того, вопросы происхождения инвазионных видов особенно важно прояснить, чтобы предотвращать дальнейшие инвазии и сохранить биоразнообразие конкретных регионов. Ранее было высказано предположение о гибридогенном происхождении вида североамериканской череды *Bidens connata* Muehl. ex Willd. Предположительно его предками стали два других произрастающих в Северной Америке вида – евразийско-североамериканская череда *B. cernua* L. и североамериканская *B. frondosa* L. (Crowe and Parker, 1981). При этом ранее описанный вид *B. decipiens* Warnst., распространённый в Восточной Европе, тоже обладает признаками, промежуточными между выше указанными видами, что также позволяет предположить его гибридогенное происхождение (Galkina and Vinogradova, 2019). Ряд авторов ранее описывал европейскую *B. decipiens* инвазионным американским видом *B. connata*, несмотря на некоторые морфологические различия (Andreau and Vilà, 2010; Mayorov and Vinogradova, 2013). Таким образом, предстоит решить две проблемы - во-первых, являются ли идентичными таксоны *B. decipiens* и *B. connata*, во-вторых, их происхождение.

Цитология и молекулярная цитогенетика дает широкий спектр методов для установления идентичности видов, а также выявления их происхождения. В данном исследовании мы анализировали митотические хромосомы видов череды (*B. connata*, *B. frondosa*, *B. cernua*), из полпуляций, собранных на территории США, а также на территории Беларуси, и *B. decipiens* европейского происхождения.

Были установлены хромосомные числа всех изучаемых видов, впервые методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) показана локализация 45S и 5Sp ДНК, проведена геномная *in situ* гибридизация (GISH) на хромосомы *Bidens decipiens* с использованием в качестве зондов ДНК предполагаемых родителей.

Подсчет хромосомных чисел, число сайтов 45S и 5Sp ДНК подтверждает гибридную природу *B. decipiens*, также результаты геномной *in situ* гибридизации показали гибридизацию ДНК *B. cernua* на хромосомы *B. decipiens*, что также может свидетельствовать об участии этого вида в видообразовании рода. Однако меченная ДНК *B. frondosa* не гибридизовалась на хромосомы *B. decipiens*, что, при этом, не исключает полностью роль *B. frondosa* в образовании изучаемых видов. В настоящее время работа продолжается.

Работа выполнена в рамках госзадания ГБС РАН «Гибридизация у растений в природе и культуре: фундаментальные и прикладные аспекты» (№19-119012390082-6).

Список литературы:

1. Crowe, D.R. and Parker, W.H., Hybridization and agamospermy of *Bidens* in north-western Ontario, Taxon, 1981, vol. 30, no. 4, pp. 749–760.

2. Galkina, M.A. and Vinogradova Yu.K. On the Issue of Hybridogenic Origin of *Bidens × decipiens* Warnst. Russian Journal of Biological Invasions, 2019, 10(4), 315-324, DOI10.1134/S2075111719040039.

3. Andreau, J. and Vila, M., Risk analysis of potential invasive plants of Spain, J. Nat. Conserv., 2010, vol. 18, no. 1, pp. 34–44.

4. Mayorov, S.R. and Vinogradova, Yu.K., Formation of secondary distribution range and intraspecific variability of *Bidens connata*, Proc. 12th Reunion on Ecology and Management of Alien Plant Invasions, September 22–26, 2013, Pirenopolis, 2013, p. 119.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.102

СОЗДАНИЕ TYRAMIDE-FISH ПРОБ ДЛЯ ИНТЕГРИРОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И ФИЗИЧЕСКОЙ КАРТ ХРОМОСОМЫ 2 *ALLIUM CERA*

Ермолаев А. С.^{1,2}, Киров И. В.¹, Пивоваров А. М.^{1,2}, Хрусталева Л. И.^{1,2}

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550, E-mail: biotech@iab.ac.ru

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, 127550, E-mail: ermol-2012@yandex.ru

Высоконасыщенные генетические карты являются ценным ресурсом и обязательным шагом на пути к *de novo* сборке генома. Для осуществления этого необходимо интегрирование генетической и физической карт, что позволяет выравнивать группы сцепления и физическую хромосому. Лук, обладает огромным геномом (16Gbp) с большой пропорцией повторяющихся последовательностей (около 92-95%) и для него основной проблемой является локализация ВАС-контигов и скэффолдов на физических хромосомах. Для лука существуют генетические карты (King *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2005; McCallum *et al.*, 2012), построенные на различных типах молекулярных маркеров (AFLP, SSR, SNP). Однако, генетические карты представляют из себя лишь линейный порядок маркеров и частоты рекомбинаций между ними. Так что может быть значительная разница в расстоянии между маркерами на генетической и физической карте. Кроме того, проблемой являются регионы с супрессией рекомбинации, например, центромера. Маркеры, которые расположены близко друг к другу на генетической карте, могут быть расположены довольно далеко на хромосоме, даже на разных плечах (Khrustaleva *et al.*, 2016). Физические карты обеспечивают нас информацией о позиции маркеров относительно цитологического ландшафта (центромера, теломера и т. д.), а также могут дать информацию о наличии хромосомных перестроек (Khrustaleva *et al.*, 2019).

Нами была произведена работа по отбору маркеров и созданию Tyramide-FISH проб на хромосому 2 *A. cera*. Для отбора маркеров была использована генетическая карта транскриптома *A. cera* и черновой вариант его генома, полученные от профессора Shiguo (университет Ямагучи, Япония). Черновой вариант генома использовался для определения предполагаемых позиций экзон-экзонных сшивок в транскриптах и последовательностей интронов в геномных последовательностях. Для всех транскриптов были отобраны топовые по E-value и Query cover выравнивания из базы TSA *Allium cera* и эти транскрипты были выравнены на геномные контиги для определения позиций интронов в геноме и экзон-экзонных сшивок в транскрипте. Маркер отбирался для последующего физического картирования если последовательность транскрипта, дающего топовое выравнивание на последовательность маркера, соответствовала следующим критериям: (1) сходство только к одному геномному скэффолду в черновом геноме, (2) наличие как минимум одного интрона, то есть наличие как минимум одной экзон-экзонной сшивки в транскрипте, (3) длина

последовательности (включая интроны) не менее 1Kb и (4) расчетная длина <9Kb. Всего из группы сцепления хромосомы 2, содержащей 126 маркеров (133.3 cM), было отобрано 5 маркеров, отвечающих этим критериям. Праймеры подбирались на транскрипты с помощью программы Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) так, чтобы в ПЦР-продукт попал как минимум один интрон. Все предполагаемые ПЦР-продукты были проверены на наличие мобильных элементов с помощью программы CENSOR (Kohany *et al.*, 2006). Отобранные маркеры были проверены на наличие белковых доменов по базе CDD v3.18 (Shennan *et al.*, 2012) с помощью инструмента CD-search (Marchler-Bauer & Bryant, 2004) с порогом E-value 0.01. С праймерами на отобранные маркеры была проведена ПЦР и ПЦР-продукт был очищен и клонирован в плазмиду pAL2-T (Evrogen), для последующего использования её в качестве пробы при проведении Tyramide-FISH.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ проекта № 20-46-07005.

Список литературы:

1. Khrustaleva L., Jiang J., Havey M. J. High-resolution tyramide-FISH mapping of markers tightly linked to the male-fertility restoration (*Ms*) locus of onion. 2016, 535:545.
2. Khrustaleva L., Kudryavtseva N., Romanov D., Ermolaev A., Kirov I. Comparative Tyramide-FISH mapping of the genes controlling flavor and bulb color in *Allium* species revealed an altered gene order. 2019, 1:11.
3. King J. J., Bradeen J. M., Bark O., McCallum J. A., Havey M. J. A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. 1998, 52:62.
4. Kohany O., Gentles A. J., Hankus L., Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. 2006, 1:7.
5. Lu S., Wang J., Chitsaz F., Derbyshire M. K., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Marchler G. H., Song J. S., Thanki N., Yamashita R. A., Yang M., Zhang D., Zheng C., Lanczycki C. J., Marchel-Bauer A. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. 2020, D265:D268.
6. Marchler-Bauer A., Bryant S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. 2004, W327:W331.
7. Martin W. J., McCallum J., Shigyo M., Jakse J., Kuhl J. C., Yamane N., Pither-Joyce M., Gokce A. F., Town C. D., Havey, M. J. Genetic mapping of expressed sequences in onion and *in silico* comparisons with rice show scant colinearity. 2005, 197:204.
8. McCallum J., Baldwin S., Shigyo M., Deng Y., van Heusden S., Pither-Joyce M., Kenel, F. AlliumMap-A comparative genomics resource for cultivated *Allium* vegetables. 2012, 168.
9. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. Primer3: New capabilities and interfaces. 2012, e115.

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СБОРКИ И РАЗБОРКИ
СИНАПТОНЕМНОГО КОМПЛЕКСА ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM CEPA*) И
ЛУКА-БАТУНА (*A. FISTULOSUM*)**

Кудрявцева Н.А.^{1,2}, Макарова Л.М², Симановский С.А.^{1,3}, Хрусталева Л.И.^{1,2}

**1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550; E-mail: biotech@iab.ac.ru**

**2 – ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева Москва 127550;
E-mail: natalia.kudryavtseva92@gmail.com**

**3 – ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской
академии наук, Москва 119071;
E-mail: sergeysimanovsky@gmail.com**

Изучение механизмов рекомбинации, набирает все больший интерес, так как этот важный биологический процесс обеспечивает перераспределение генетического материала, посредством физического обмена участками хромосом. Во время профазы 1 мейоза гомологичные хромосомы удерживаются вместе с помощью синаптонемного комплекса (СК), который в свою очередь является необходимым условием для образования кроссинговера.

Большинство живых организмов имеют случайное распределение хиазм вдоль хромосом. И только немногие являются исключением! Таким исключением является *A. fistulosum*, у которого хиазмы строго локализованы в проксимальных областях хромосом. Цитологическим проявлением кроссинговера являются хиазмы.

Ранее Albin and Jones (1987, 1990) была установлена корреляция распределения поздних рекомбинационных узлов (RNs) и хиазм, а также подтвердилась их проксимальная локализация у *A. fistulosum*. Такой анализ был проведен с применением электронной микроскопии (Albin and Jones, 1990).

С развитием новых технологий геномного, протеомного и иммуноферментного анализа белков, вовлеченных в сборку СК и рекомбинацию, открылись возможности детального изучения этого сложного биологического процесса. Так, например, с использованием конфокальной микроскопии и визуализации белков с помощью антител, меченных флуорохромами, была получена трехмерная архитектура синаптонемного комплекса на ячмене (Phillips *et al.* 2010). На ржи с использованием иммунофлуоресцентного анализа удалось изучить динамику сборки компонентов синаптонемного комплекса (Hesse *et al.* 2019).

В результате иммунохимии двух близкородственных видов *A. cepa* и *A. fistulosum* с диаметрально противоположным распределением хиазм, будут получены уникальные данные о формировании синаптонемного комплекса и распределения рекомбинаций вдоль физических хромосом.

Иммунохимический анализ мейотических белков, вовлеченных в формирование синаптонемного комплекса и рекомбинаций, на луковых еще никем в мире не проводился. Поэтому нашей первостепенной задачей являлась адаптация метода визуализации мейотических белков *in situ* на хромосомах *A. fistulosum* и *A. cepa* в профазе 1 мейоза. Нами были подготовлены и апробированы несколько вариантов протоколов создания препаратов, на основе работ: Susan Hesse *et al.* (2019), Mikhailova *et al.* (2006), Chelysheva *et al.* (2010), а также объединенный протокол Phillips *et al.* (2010) и Susan Hesse *et al.* (2019). Для анализа качества препаратов и последующей иммунохимической детекции использовались кроличьи антитела против белка ASY1 (осевой и латеральный элемент СК) арабидопсиса (*A.thaliana*). Самый яркий сигнал ASY1 был отмечен на препаратах, выполненных по адаптированному нами протоколу на основе протоколов Phillips *et al.* (2010) и Susan Hesse

et al. (2019). Преимуществом нашего протокола по сравнению с протоколом Susan Hesse *et al.* (2019) было отсутствие эндогенного свечения. На препаратах, выполненных по протоколу Mikhailova *et al.* (2006), наблюдалось большое количество цитоплазмы, что объясняется минимальным временем обработки энзимами. Такое количество цитоплазмы маскирует сигнал ASY1, что в свою очередь затрудняет последующий анализ. Отрицательный результат иммуноокрашивания был получен на препаратах, приготовленных по протоколу Chelysheva *et al.* (2010), где были визуализированы короткие сигналы ASY1 на пахитенных хромосомах. Такие результаты могут быть объяснены влиянием обработки 25% и 45% уксусной кислоты, после которой посадка антител к ASY1 стала невозможной.

В результате проведенных нами расширенных экспериментов по адаптации метода иммунохимического анализа белков, вовлеченных в сборку и разборку СК луковых нами был разработан оптимальный метод приготовления цитологических препаратов и последующей иммунологической детекции, что позволит

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ проекта № 20-46-07005.

Список литературы:

1. Albin, S. M., & Jones, G. H. (1987). Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *A. fistulosum* - I. The initiation and sequence of pairing. *Chromosoma*, 95, 324–338. doi:10.1007/BF00293179.
2. Albin, S. M., & Jones, G. H. (1990). Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *Allium fistulosum*. III The F₁ hybrid. *Genome*, 33(6), 854–866. doi: 10.1139/g90-129.
3. Hesse, S., Zelkowski, M., Mikhailova, E. I., Keijzer, C. J., Houben, A., Schubert, V. (2019). Ultrastructure and Dynamics of Synaptonemal Complex Components During Meiotic Pairing and Synapsis of Standard (A) and Accessory (B) Rye Chromosomes. *Frontiers in Plant Science*, 10(June), 1–20. doi:10.3389/fpls.2019.00773.
4. Phillips, D., Nibau, C., Wnetrzak, J., & Jenkins, G. (2010). Development of a Molecular Cytogenetic Recombination Assay for Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Cytogenetic and genome research*, 129 (1-3), 154–161. doi: 10.1159/000314335.
5. Mikhailova E. I., Phillips D., Sosnikhina S. P., Lovtsyus A. V., Jones R. N., Jenkins G. (2006) Molecular assembly of meiotic proteins Asy1 and Zyp1 and pairing promiscuity in rye (*Secale cereale* L.) and its synaptic mutant *sy10*. *Genetics*, 174 (3), 1247–1258. doi: 10.1534/genetics.106.064105.
6. Chelysheva L., Grandont L., Vrielynck N., le Guin S., Mercier R., Grelon M. (2010) An easy protocol for studying chromatin and recombination protein dynamics during *Arabidopsis thaliana* meiosis: Immunodetection of cohesins, histones and MLH1. *Cytogenetic and genome research*, 129(1-3), 143–153. doi: 10.1159/000314096.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.104

КАРИОТИП ШЕФЕРДИИ СЕРЕБРИСТОЙ (*SHEPHERDIA ARGENTEA* (PURSH) NUTT.)

Прокопчук С. Р.^{1,2}, Разумова О.В.¹

1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,

Москва, Россия, 175550 E-mail: psr1653@gmail.com

2 – Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А.

Тимирязева, Москва, Россия, 175550,

Большинство видов растений, существующих на Земле, являются гермафродитами. Однако существуют виды, представленные в популяциях двумя формами: растения только с мужскими цветками и только с женскими. Некоторые двудомные растения имеют в своем

кариотипе половые хромосомы. Известно, что половые хромосомы растений эволюционировали независимо, и, следовательно, требуют глубокого изучения.

Шефердия серебристая (*Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt.) перспективная сельскохозяйственная культура. Шефердия является древесной культурой, которая цветет и плодоносит на 5-8 год вегетации, поэтому исследование детерминации пола у данного вида, и ее кариотипа является актуальной проблемой для использования в сельскохозяйственных целях. Культура мало изучена, на данный момент не существует кариотипов шефердии, созданных с использованием современных методов. Также шефердия может являться потенциальным донором полезных признаков для своего близкого родственника – облепихи (*Hippophae* sp.).

Кариотип является важной характеристикой вида. В данной работе представлен кариотип шефердии серебристой. В исследовании использовались современные методы молекулярной цитогенетики. Препараты митотических хромосом готовились с помощью метода steam drop. Корни собирались с молодых, активно растущих деревьев. Одно растение было мужского пола, 9 - неизвестного. Предфиксационная обработка проводилась в течение 4 часов при комнатной температуре 0,2% 8-гидроксихинолином, фиксация проводилась в уксусном спирте. Хромосомы просматривали в программе ZEN на микроскопе AxioScope A1, при увеличении 100х. Хромосомы упорядочивались, и для каждой из них подбирались пары. Далее хромосомы измерялись с помощью программы DRAWID. После измерения хромосом программа строила идиограммы, с ее помощью также просчитывались доверительные интервалы для проверки статистической достоверности измерений длины хромосом.

Таким образом, было установлено, что кариотип шефердии серебристой состоит из 13 пар хромосом ($2n=26$). Две из тринадцати пар хромосом являются акроцентрическими, так как показатели их центромерных индексов находятся в диапазоне 23-26%, остальные хромосомы кариотипа субметацентрические, так как их центромерные индексы варьируются в пределах 26-40%.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ соглашение № 075-15-2019-278

Список литературы:

Kirov, I., Khrustaleva, L., Van Laere, K., Soloviev, A., Meeus, S., Romanov, D., & Fesenko, I. (2017). DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing. *Comparative cytogenetics*, 11(4), 747.

Kirov, I., Divashuk, M., Van Laere, K., Soloviev, A., & Khrustaleva, L. (2014). An easy "SteamDrop" method for high quality plant chromosome preparation. *Molecular cytogenetics*, 7(1), 21.

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДНК В МЕХАНИЗМАХ ЭВОЛЮЦИИ ПОЛА РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА CANNABACEAE

Разумова О.В.¹, Александров О.С.¹, Бочаркина Ю.В.^{1,2}, Романов Д.В.¹, Боне К.Д.^{1,3}

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

127550 E-mail: razumovao@gmail.com

2 – Сколковский институт науки и технологий, Москва, Московская обл., 143026

3 – Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.

Тимирязева, Москва, 127550

Половые хромосомы растений – явление чрезвычайно редкое. На данный момент гетероморфные половые хромосомы, выявлены в кариотипе только 19 видов из 4 из филогенетически далеких семейств покрытосеменных (Renner, 2014). Это свидетельствует о независимом образовании половых хромосом в процессе эволюционного развития. Еще у порядка 20 видов из 13 семейств (Ming et al., 2011) выявлены гомоморфные (внешне не различимые) половые хромосомы. Следствием такого независимого образования гетероморфных половых хромосом и крайней малочисленности видов, ими обладающих, является трудность в оценке процессов, приводящих к формированию различий в кариотипе мужских и женских растений. Во многих семействах растений только часть видов являются двудомными, из них у еще меньшего числа обозначены гетероморфные половые хромосомы. Причина образования половых хромосом как таковых не ясна, также не ясно различие в размерах Y и X-хромосом. Господствующая ранее теория о корреляции размера Y-хромосомы с ее эволюционной древностью по-видимому не оправдалась, по крайней мере в целом ряде случаев получены убедительные доказательства эволюционной древности практически гомоморфных половых хромосом (Prentout et al., 2020, Akagi, 2014, 2016). Эволюция половых хромосом растений неразрывно связана с накоплением/отсутствием накопления повторяющихся элементов ДНК. Ранее на значительном количестве видов было показано, что в одних случаях половые хромосомы ассимилируют повторяющуюся ДНК в других, напротив, элиминируют (Hobza et al., 2006, 2015; Zhou et al., 2020; Kubat et al., 2008; Mariotti et al., 2009; Kejnovsky et al., 2009). От чего именно зависит, в какую сторону пойдет процесс накопления/удаления повторяющихся элементов ДНК в хромосомах и каким образом он повлияет на детерминацию и дифференциацию пола по-прежнему не ясно.

Семейство Cannabaceae *sensu stricto* включает три вида из двух родов. Это род Cannabis, с единственным полиморфным видом Cannabis sativa L. и род Humulus, с двумя наиболее распространенными видами т- хмель обыкновенный Humulus lupulus L. и хмель японский Humulus japonicus Siebold & Zucc. Все три вида являются двудомными, при этом в своем кариотипе имеют половые хромосомы, находящиеся, по-видимому, на разных этапах эволюции. Так, у хмеля обыкновенного в кариотипе 20 хромосом, при этом Y-хромосома наименьшая по абсолютному размеру ($2n=18+XX\backslash XY$ у женских и мужских растений соответственно), у хмеля японского женские растения имеют 16 хромосом ($2n=14+XX$), а мужские - 17 ($2n=14+XY1Y2$), половые хромосомы самые большие в кариотипе. У конопли система хромосом схожа с хмелем обыкновенным, и у мужских и у женских растений по 18 аутосом и одна пара половых хромосом - $XY\backslash XX$, но, в отличие от хмеля обыкновенного, Y-хромосома конопли отличается большими размерами, по сравнению с аутосомами и X-хромосомой. Ранее нами были обнаружены tandemные повторы, позволяющие цитологически идентифицировать половые хромосомы у всех трех видов, показана возможная роль субтеломерного повтора в эволюции половых хромосом в

изучаемом семействе. В данном исследовании мы провели секвенирование репитомов мужских и женских растений трех видов семейства с целью выявления кластеров высококопийных повторов, сравнения их между собой, локализации на хромосомах и выявления роли повторяющихся элементов ДНК в эволюции хромосом семейства Cannabaceae.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, договор № 20-316-70018/19.

Список литературы:

1. Renner, S. S. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. 2014. *American Journal of botany*, 101(10), 1588-1596.
2. Ming, R., Bendahmane, A., & Renner, S. S. Sex chromosomes in land plants. 2011. *Annual review of plant biology*, 62, 485-514.
3. Prentout, D., Razumova, O., Rhoné, B., Badouin, H., Henri, H., Feng, C., ... & Marais, G. A. An efficient RNA-seq-based segregation analysis identifies the sex chromosomes of *Cannabis sativa*. 2020. *Genome Research*, 30(2), 164-172.
4. Akagi, T., Henry, I. M., Tao, R., & Comai, L. (2014). A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science*, 346(6209), 646-650.
5. Akagi, T., Henry, I. M., Kawai, T., Comai, L., & Tao, R. Epigenetic regulation of the sex determination gene MeGI in polyploid persimmon. 2016. *The Plant Cell*, 28(12), 2905-2915.
6. Hobza, R., Lengerova, M., Svoboda, J., Kubekova, H., Kejnovsky, E., & Vyskot, B. An accumulation of tandem DNA repeats on the Y chromosome in *Silene latifolia* during early stages of sex chromosome evolution. 2006 *Chromosoma*, 115(5), 376.
7. Hobza, R., Kubat, Z., Cegan, R., Jesionek, W., Vyskot, B., & Kejnovsky, E. Impact of repetitive DNA on sex chromosome evolution in plants. 2015. *Chromosome Research*, 23(3), 561-570.
8. Zhou, R., Macaya-Sanz, D., Carlson, C. H., Schmutz, J., Jenkins, J. W., Kudrna, D., ... & Tuskan, G. A. A willow sex chromosome reveals convergent evolution of complex palindromic repeats. 2020 *Genome biology*, 21(1), 1-19.
9. Kubat, Z., Hobza, R., Vyskot, B., & Kejnovsky, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. 2008. *Genome*, 51(5), 350-356.
10. Mariotti, B., Manzano, S., Kejnovský, E., Vyskot, B., & Jamilena, M. Accumulation of Y-specific satellite DNAs during the evolution of *Rumex acetosa* sex chromosomes. 2009. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(3), 249.
11. Kejnovsky, E., Hobza, R., Cermak, T., Kubat, Z., & Vyskot, B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. 2009. *Heredity*, 102(6), 533-541.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.106

ИЗУЧЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН КАРТОФЕЛЯ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ОБРАЗЦОВ ФИЦ КАРТОФЕЛЯ ИМ. А. Г. ЛОРХА

Сиволапова А.Б., Иванова А.С., Войнова М.С., Королева А.К.

**ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха»,
Московская область, 140051, mail@vniikh.com**

Картофель – важнейший объект селекционно-генетических исследований. Однако такие факторы, как автотетраплоидность, высокий уровень гетерозиготности, тетрасомное наследование и стерильность многих форм сильно осложняют селекционную работу.

У картофеля выделяют несколько типов мужской стерильности: генно-цитоплазматическая мужская стерильность, сопровождаемая нарушениями развития репродуктивных органов; функциональная мужская стерильность с нормальными, хорошо окрашиваемыми, но не функционирующими пыльцевыми зернами, и цитоплазматическая

мужская стерильность (Гавриленко и др., 2019). Для исследования мужской стерильности были отобраны 280 образцов картофеля из коллекции образцов ФИЦ Картофеля им. А.Г. Лорха, включающие в себя как известные культивируемые сорта, так и гибриды. Фертильность и жизнеспособность пыльцевых зерен оценивалась двумя методами: ацетокарминовое окрашивание и проращивание пыльцы в культуральной среде с последующим окрашиванием йодным раствором и анализом с помощью микроскопа.

Только 54 из 280 исследованных образцов, включая такие сорта, как Метеор, Пламя, Лорх, Манифест и другие, образовывали исключительно деформированные неокрашиваемые ацетокарминовым методом пыльцевые зерна, и не формировали пыльцевые трубки через сутки проращивания на культуральной среде. Также 61 образец показал наличие тетрадной мужской стерильности (когда в конце микроспорогенеза тетрады не распадаются и микроспоры остаются объединенными). Хорошо сформированные и окрашиваемые пыльцевые зерна были обнаружены у 98 образцов исследуемой коллекции, однако только 12 из них показали более 70% прорастания на культуральной среде (среди них такие сорта как Ресурс, Купец).

Список литературы:

Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Апаликова О.В., Новикова Л.Ю., Антонова О.Ю. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по типам цитоплазм. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019; 23(6):753-764.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.107

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЦИТОГЕНЕТИКА В ПРИКЛАДНЫХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ РАСТЕНИЙ

**Хрусталева Л.И.^{1,2}, Мардини М.¹, Ермолаев А.С.^{1,2}, Одинцов С.В.^{1,2}, Нзеха М.¹,
Макарова Л. М.¹, Федчук М.¹, Пивоваров А.¹, Киров И.В.², Кудрявцева Н.А.^{1,2}**

1 – ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550;

E-mail: khrustaleva@rgau-msha.ru

***2 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550;***

E-mail: biotech@iab.ac.ru

Появление технологии флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) открыло огромные возможности для исследований в области фундаментальной цитогенетики и ее практическом применении в селекции растений. FISH технологии основаны на гибридизации меченой флуорохромом ДНК пробы с комплементарной к ней последовательностью ДНК хромосомы, что позволяет физически картировать на хромосомах различные последовательности ДНК, включая гены и важные структурные элементы хромосомы такие как теломеры и центромеры, визуализировать родительские геномы в межвидовом гибриде и таким образом следить за интрогрессией генетического материала от одного родителя к другому. Геномная *in situ* гибридизация (GISH) - вариант FISH, когда в качестве меченой пробы ДНК используют геномную ДНК, нашла широкое применение в межвидовой селекции. Метод не требует знаний о сиквенсе геномной ДНК и может быть применен на любой культуре. О том насколько популярен этот метод, можно судить по сотням публикаций использования GISH в межвидовой селекции и филогенетических исследованиях. Ярким примером успешного применения GISH в сопровождении селекционного процесса являются работы по созданию лука репчатого, устойчивого к пероноспорозу (Sholten et al., 2007, Khrustaleva et al., 2019).

Интегрирование генетических и рекомбинационных карт с физической структурой хромосом является важным объектом фундаментальной и прикладной науки с момента,

когда было установлено, что гены находятся на хромосоме и, причем, в определенном фиксированном порядке (Sutton 1903, Bridges 1916). Генетические карты снабжают информацией о принадлежности признаков/генов к одной группе сцепления и их порядке расположения внутри группы сцепления. Однако эти карты не отражают реальную дистанцию между маркерами. Известно, что рекомбинации неравномерно распределены вдоль физической хромосомы. События кроссинговера супрессированы в гетерохроматине и в районе центромеры (Akhunov et al., 2003, Anderson, 2003). Близко расположенные маркеры на рекомбинационной карте в местах супрессии рекомбинаций могут быть физически значительно удалены друг от друга (Khrustaleva et al., 2005). Почему нам важно знать реальную дистанцию между маркерами? Что это дает для селекционера? Во-первых, это обеспечит эффективный поиск маркеров, тесно связанных с признаком/геном, во-вторых, связать группы сцепления с физическими хромосомами (Kirov et al., 2014), наконец, это позволит изолировать и клонировать важные гены, чей продукт неизвестен, но фенотипический признак имеет важное экономическое значение. В свою очередь клонированный ген можно будет использовать для создания надежных SNP молекулярных маркеров с последующим созданием генотипов с заданными свойствами путем геномного редактирования.

Несмотря на то, что современные подходы к секвенированию (PacBio, Oxford Nanopore) позволяют получать длинные прочтения (reads), сборка на хромосомном уровне по-прежнему остается основным узким местом. Метод высокочувствительной FISH путем tyramide-амплификации сигнала (tyr-FISH) позволяет визуализировать и физически картировать ДНК размером менее 1 kb (Khrustaleva and Kik, 2001). Молекулярная цитогенетика устраняет разрыв между сборками генома *in silico* и организацией *in vivo*. Используя картирование *in situ*, можно получить надежную сборку генома на уровне хромосом, особенно в регионах с подавлением рекомбинации (центромеры) и высоким содержанием повторов (гетерохроматин).

Открытие структуры молекулы ДНК вместе с последующими значимыми открытиями в области молекулярной генетики, а также разработка передовых технологий позволили интегрировать молекулярную цитогенетику в современную биологию. Благодаря уникальному видению хромосомы, цитогенетика сейчас находится в центре геномики, биологии развития, таксономии и других биологических дисциплин.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ проекта № 20-46-07005.

Список литературы:

1. Akhunov E.D., A.W. Goodyear, S. Geng et al. (2003) The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome res.* 13: 753-763.
2. Anderson L.K., G.G. Doyle, B. Brigham et al. (2003) High resolution crossover maps for each bivalent of *Zea mays* using recombination nodules. *Genetics* 165: 849-865.
3. Bridges C.B. (1916) Nondisjunction as proof of the chromosome theory of heredity. *Genetics* 1: 1-52.
4. Sutton W.S. (1903) The chromosomes in heredity. *Biol.Bull.* 4: 231-248.
5. Ludmila Khrustaleva, Majd Mardini, Natalia Kudryavtseva, Rada Alizhanova, Dmitry Romanov, Pavel Sokolov, Grigory Monakhos (2019) The power of Genomic in situ Hybridization (GISH) in interspecific breeding of bulb onion (*Allium cepa* L.) resistant to downy mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.). *Plants* 8(2), 36
6. Khrustaleva L.I. de Melo P.E., van Heusden A.W. & C.Kik (2005) The integration of recombination and physical maps in a large-genome monocots using haploid genome analysis in a trihybrid *Allium* population. *Genetics* 169: 1673-1685.
7. Khrustaleva L.I. & Kik C. (2001) Localization of single copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa* L.) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *Plant J* 25: 699-707.

8. Ilya Kirov, Katrijn Van Laere, Jan De Riek, Ellen De Keyser, Nadine Van Roy, Ludmila Khrustaleva (2014) Anchoring Linkage Groups of the Rosa Genetic Map to Physical Chromosome and EST-SNP Markers. Plos One, April 2014, Volume 9, Issue 4e95793
9. Scholten, O.E., A.W. van Heusden, L.I. Khrustaleva, K. Burger-Meijer, R.A. Mank, R.G.C. Antonise, J.L. Harrewijn, W. Van haecke, E.H. Oost, R.J. Peters and C. Kik (2007) The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion. Euphytica 156: 345-353.

**СЕКЦИЯ
«РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ»**

**ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
*HELIANTHUS TUBEROSUS IN VITRO*****Долотенко К.Е., Ратинская Л., Калашникова Е.А.****ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К. А. Тимирязева», Москва 127550**

Helianthus tuberosus (топинамбур или земляная груша) – многолетнее растение из семейства Астровые (Asteraceae). Это ценное растение, необходимое людям страдающим сахарным диабетом, так как его клубни являются источником инулина - углевода, который легко превращается во фруктозу. Родина топинамбура — Северная Америка. Местное население научилось выращивать его и использовать в пищу задолго до появления там европейцев. В 1613 г. французы завезли топинамбур в Европу. Свое название он получил от племени индейцев — топинамбо. Интересные и перспективные формы топинамбура завез к нам из США великий русский ученый Николай Иванович Вавилов, который по достоинству оценил все его удивительные свойства.

Развитие биотехнологии, в частности, методов клеточной и генной инженерии растений, позволяет создавать новые формы растений, обладающих комплексом устойчивости к различным факторам абиотической и биотической природы. Однако, для проведения исследований такого рода, необходимо устанавливать оптимальные условия культивирования, обеспечивающих реализацию высокого морфогенетического потенциала культивируемых эксплантов (Калашникова, 2020).

Объектом исследования служили сегменты стеблей с двумя пазушными почками, изолированные с растений топинамбура сортов Интерес, Скороспелка и Новость ВИРа. Экспланты, перед введением в культуру *in vitro*, тщательно промывали под проточной водой в течение 15 минут, после чего в условиях ламинар-бокса проводили стерилизацию. В качестве стерилизующего агента использовали гипохлорит натрия (7%), в котором выдерживали изолированные сегменты стеблей в течение 8 минут, после чего их промывали трижды стерильной дистиллированной водой. Стерильные экспланты культивировали на модифицированной питательной среде Мурасига и Скуга (МС), содержащей различные регуляторы роста цитокининовой и ауксиновой природы. Из класса цитокининов изучали влияние БАП (6-бензиламинопурина) или кинетина в концентрации 0,5-2 мг/л, а из класса ауксинов – ИУК (индолилуксусная кислота), 2,4-Д (дихлорфеноксиуксусная кислота), НУК (нафтилуксусная кислота) в концентрации 0,5-1 мг/л. Все исследуемые регуляторы роста добавляли в состав питательной среды МС отдельно или в сочетании друг с другом. Контролем служила безгормональная среда. Работу проводили в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (Калашникова и др., 2014, 2017).

В результате проведенных исследований установлено, что изучаемые регуляторы роста оказывают неоднозначное влияние на морфогенетический потенциал культивируемых эксплантов. Так, например, добавление в состав питательной среды цитокининов (БАП или кинетин) не приводило к активному росту пазушных почек и формированию боковых побегов. Формирование адвентивных почек в этих вариантах не было отмечено. Кроме того, было выявлено, что в данных условиях культивирования в базальной части микрочеренков интенсивно формировалась каллусная ткань, которая так же была отмечена и в контрольном варианте. При добавлении в состав питательной среды ауксинов, наблюдали образование каллусной ткани и корней в базальной части микрочеренков, интенсивность которых зависела от применяемого ауксина. Так, культивирование микрочеренков на питательной среде, содержащей ИУК (0,5-1 мг/л),

приводило к формированию корней минуя образование каллусной ткани. Кроме того, в этих вариантах наблюдали активный рост пазушных почек и формирование правильных по морфологии побегов, которые в дальнейшем использовали для микрочеренкования. Что касается вариантов с НУК или 2,4-Д, то в этих условиях в базальной части микрочеренков отмечался интенсивный процесс каллусогенеза. Однако следует отметить, что в варианте с НУК, наряду с каллусообразованием наблюдали процесс и ризогенеза, что не было зафиксировано в контрольном варианте и в варианте с применением 2,4-Д.

Известно, что на морфогенетические процессы оказывают влияние не только факторы гормональной природы, но и минеральный состав питательной среды. Так, например, одним из важных компонентов всех питательных сред является кальций и его соли. Как правило, в состав питательных сред кальций присутствует как CaCl_2 , что может оказывать токсичное влияние на культивируемые клетки из-за избытка хлора в среде. Поэтому рекомендуется включать в состав питательной среды $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Проведенные исследования показали, что такая замена приводит к интенсивному росту пазушных почек и формированию не витрифицированных побегов.

Список литературы:

1. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. Учебник и практикум / Москва, 2020. Сер. 76 Высшее образование. (2-е изд.). 378 с.
2. Калашникова Е.А., Чердниченко М.Ю., Карсункина Н.П., Халилуев М.Р. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. (3-е издание, исправленное и дополненное). Москва, 2014. 180 с.
3. Калашникова Е.А., Чердниченко М.Ю., Киракосян Р.Н., Зайцева С.М. Лабораторный практикум по культуре клеток и тканей растений. Москва, 2017. 163 с.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.109

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ГРИБА *FOMES FOMENTARIUS* Э-14 НА СКОРОСТЬ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН *SINAPIS ALBA*

Киселева С.В., Саитгареева А.Л., Халимова Л.Х.

**ФБГОУ ВО Уфимский государственный нефтяной технический университет, г. Уфа
450064**

E-mail: kiselevabtmp@gmail.com

Известным эффективным способом повышения урожайности сельскохозяйственных культур является использование регуляторов роста растений в процессе подготовки или предобработки семян. Для этой цели зачастую используют продукцию микробных грибных продуцентов, среди которых могут быть фитогормоны (гиббереллины, ауксины, цитокинины и др.), а также разнообразные витамины или токсины, стимулирующие ростовые процессы [1].

Изучаемый нами базидиальный гриб *Fomes fomentarius* Э-14 является продуцентом фенолоксидазных ферментов, в первую очередь лакказ, которые участвуют в деструкции лигнинов и фенолсодержащих соединений, в условиях роста с их максимальной продукцией в период 7-20 сут [2].

Целью работы являлось изучение влияния препаратов культуральной жидкости гриба *F. fomentarius* Э-14, полученных в условиях поверхностно-жидкофазного роста на среде Королевой-Скоробогатко, на всхожесть и скорость прорастания семян *Sinapis alba* (горчицы белой).

В качестве потенциальных стимуляторов использовали препараты 7-ми и 20-ти суточных культуральных жидкостей (КЖ), разбавленных в соотношении (0,1 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 5,0 - 6,0 - 7,0 - 8,0 - 10) мл в 1000 мл воды дистиллированной, а также КЖ без разбавления. Контролем являлась водная обработка семян *S. alba*.

В работе исследовали два режима обработки семян - по времени замачивания – на 30 мин и на 24 ч. В результате характер воздействия препаратов на семена оценивали по длине ростка и зародышевого корешка и фиксировали всхожесть семян (%) на 3 сут роста.

Анализ данных всхожести и размеров корешков и побегов семян *Sinapis alba*, обработанных препаратами 7-ми суточных КЖ при разбавлении $(5-7) \times 10^{-3}$ показал, что они обладали ростстимулирующим действием на корневую систему, увеличивая ее длину в 1,5-2 раза, и на высоту побегов относительно контроля - на 20-30% семян при 24-ти часовой инкубации.

В то время для препаратов 20-суточных КЖ при разбавлении $(1-2) \times 10^{-3}$ было достаточно 30-ти минутной инкубации для достижения аналогичного результата по увеличению длины корней или даже более эффективного воздействия – увеличивалась мочковатость корней *S. alba*, образовывались еще 2-4 дополнительных корешка. Высота побегов также превышала контроль на 22-27%.

Таким образом, обнаружено ростстимулирующее действие препаратов культуральной жидкости гриба *F. fomentarius* Э-14 на всхожесть и ростовые показатели семян горчицы белой *Sinapis alba*, что позволяет не только увеличить ее ростовые показатели, но и ускорить приживаемость растений в неблагоприятных условиях роста.

Список литературы:

1. Wu, J., Kawagishi, H. Plant growth regulators from mushrooms. // J. of Antibiotics. 2020. - v. 73. - pp. 657–665. DOI 10.1038/s41429-020-0352-z.
2. Шакирова А.А., Коваленко С.В., Халимова Л.Х. Исследование влияния изопропиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот на рост и фенолоксидазную активность гриба *Fomes fomentarius* Э-14 // Баш. хим. ж. 2019. Т. 26, № 1. с. 85-90.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.110

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА КАПУСТЫ КОЛЬРАБИ

Пчёлина Е.А.¹, Севостьянова Н.Н.¹, Даниловских М.Г.^{1,2}, Винник Л.И.¹

**1 – ФГБОУВО «Новгородский государственный университет имени Ярослава
Мудрого», Великий Новгород 173003**

E-mail: snn79@yandex.ru

2 – Политехнический колледж НовГУ, Великий Новгород 173003

Разработка экологически чистых технологических приёмов, позволяющих более полно использовать собственный (генетический) потенциал культурных растений с целью повышения продуктивности и устойчивости растений является актуальным в ведении современного агрохозяйства. Одним из эффективных методов является метод физического воздействия, выгодно отличающийся от химических высокой степенью экологической безопасности и технологичности на фоне низких энергозатрат. На практике доказана эффективность применения электромагнитного излучения видимой области света как эпигенетического метода регулирования биосистем, позволяющего управлять экспрессией генов без изменения наследственной программы живого организма [1]. Свет для фотосинтезирующих растений не только источник энергии, но и важный регулятор всех биологических процессов [2,3,4].

Экспериментальная часть. С начала 2000-х годов на базе Новгородского государственного университета имени Ярослава Мудрого учёным М.Г. Даниловских разрабатывался и испытывался опто-механический прибор управления лучом лазера, отличающийся от аналогов небольшими размерами и низким потреблением энергии. Многочисленные лабораторные опыты позволили подобрать оптимальную дозу и экспозицию облучения и перейти к полевым испытаниям.

Опытным объектом полевых испытаний устройства управления лучом лазера в 2019 году стала высаженная рассада капусты кольраби сорта «Укза F1». Капуста «Укза F1» является гибридом, относится к скороспелым сортам капусты кольраби с округлым стеблеплодом фиолетового цвета. Высадка проводилась в начале июня на территории посевных площадей КФХ Д.П. Павлюк, д. Ермолино Новгородской области, Северо-Запад России. Среднесуточная дневная температура на момент высадки находилась в пределах +17...+19°C, ночью +11°C.

Обработка лазером проводилась двукратно в тёмное время суток полупроводниковым лазером красного диапазона со следующими параметрами: плотность мощности 44 мВт/см², вариации дозы облучения от 160 мДж/см² до 1.32 Дж/см², длина волны 658 нм, длительность импульсов 62.5 мкс, частота импульсов 1000 Гц, мощность излучения 150 мВт, экспозиция излучения 30 сек. Первая обработка проводилась 5 июня, вторая через 12 дней – 17 июня.

После проведения обработок проводили замеры площади листовой поверхности кольраби по стандартной методике: $S=0,75 \times a \times b$ (где a – длина листа, см; b – ширина в самой широкой части листа, см). После уборки урожая, которая состоялась 07.07.2019 г., проводили контрольные измерения стеблеплодов и их биохимический анализ.

Результаты и обсуждения. Замеры поверхности листовой пластины проводили трёхкратно в течение всего периода вегетации – 15, 22 и 29 июня. Проведенные 15 июня замеры показали, что в среднем площадь листовой поверхности кольраби контрольной группы составила 2078.78 см², а опытной группы 2296.22 см², что на 218 см² больше площади листьев контрольных образцов. Проведённые замеры по определению площади листовой поверхности кольраби от 22 июня показали незначительный разрыв по показателю - 2477.64 см² против 2561.23 см² в контрольной и в опытной группе соответственно. Среднесуточная температура воздуха днём за этот период менялась от +17°C до +28°C. На фоне незначительных отклонений площади листовой поверхности капусты опытной группы от контрольной было отмечено утолщение стебля и формирование стеблеплода фиолетового цвета у облучённых растений, в то время как растения контрольной группы отличались лишь крупными листьями тёмно зелёного цвета. При проведении замеров площади листовой поверхности 29 июня было отмечено увеличение роста показателя – 3197.18 см² в контроле против 3625.6 см² у растений опытной группы, что на 428 см² превышает контрольный показатель.

На момент уборки урожая среднесуточная влажность воздуха достигала 82-96 %, что значительно затрудняло проведение уборочных мероприятий. Собранный урожай капусты кольраби был зачищен от листьев и взвешен. Вес стеблеплодов кольраби контрольной группы колебался от 283 до 520 г/шт., при этом средняя масса составила 400 г. В опытной группе минимальный вес составил 490 г, максимальный 993 г, средний вес одного стеблеплода был равен 650 г.

Кроме весовых измерений был проведён анализ на содержание белков, жиров и углеводов в капусте. Содержание белка в капусте опытной группы было на 0.3 г/100 г выше, чем в капусте контрольной группы. Белок кольраби ввиду своей сбалансированности по аминокислотному составу и с другими элементами наилучшим образом усваивается организмом, поэтому увеличение белка положительно сказывается на качестве готового продукта. Количество жиров незначительно отличается в капусте опытной группы – на 0.01 г/100 г выше, чем в контроле, что не является существенным. Увеличение количества углеводов в стеблеплодах кольраби опытной группы (на 0.3 г/100 г) свидетельствует о повышении количества клетчатки в стеблеплоде, что делает консистенцию более плотной. При этом повышается лёжкость и сохранность готовой продукции в свежем виде. Дополнительно был проведён анализ на содержание токсичных элементов в стеблеплодах - содержание Pb, As, Kd, Hg, нитратов и пестицидов находилось ниже предельно допустимых значений, что свидетельствует об экологической безопасности продукции.

Выводы. Обработка *in vivo* капусты кольраби сорта «Укза F₁» полупроводниковым лазером способствует активации фитохромов вследствие действия красного когерентного света и ускорению ростовых процессов. Оптимальной экспозицией облучения для данного вида растений является двукратная 30-секундная обработка в тёмное время суток. Отмечено высокое товарное качество урожая, увеличение массы стеблеплода и содержания белков и углеводов, что значительно повышает рентабельность выращивания кольраби в условиях Северо-Запада. Проведённые исследования показали, что лазерная стимуляция вегетирующих растений является тем самым технологическим приёмом, который позволит снизить техногенную нагрузку на почву и повысить качество готовой продукции.

Список литературы:

[1] Budagovsky A.V., Solovykh N.V., Budagovskaya O.N., Budagovsky I.A. Response of vegetable organisms to quasi-monochromatic light of different duration, intensity and wavelength Quantum Electronics.2015;45(4):345-350. [doi:10.1070/QE2015v045n04ABEH015502](https://doi.org/10.1070/QE2015v045n04ABEH015502).

[2] Budagovsky A.V., Solovykh N.V., Yankovskaya M B, Maslova M V, Budagovskaya O.N., Budagovsky I.A. Effect of spatial coherence of light on the photoregulation processes in cells. Physical Review E.2016;94(1):012411. [doi:10.1103/physreve.94.012411](https://doi.org/10.1103/physreve.94.012411).

[4] Moskvina S.V. Low-level laser therapy in Russia: history, science and practice. Journal of Lasers in Medical Sciences.2017;8(2):56-65.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.111

ВЛИЯНИЕ ХЕЛАТНЫХ МИКРОУДОБРЕНИЙ НА НАБУХАЕМОСТЬ СЕМЯН ЗЕРНОВОГО СОРГО

Степанченко Д.А., Кибальник О.П., Куколева С.С.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российской научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы»
(ФГБНУ РосНИИСК «Россорго»), Саратов 410050
E-mail: 0709-Den@mail.ru*

В настоящее время в сельскохозяйственной практике широко применяется большое количество препаратов, использование которых направлено на повышение устойчивости растений к изменяющимся условиям окружающей среды. При этом высоким спросом пользуются хелатные микроудобрения, способные оказывать положительное влияние на физиологические процессы, хозяйственно-ценные признаки, урожайность и качество полученной продукции таких сельскохозяйственных культур как яровая и озимая пшеница, гречиха, кукуруза, горох, сорго, овощные культуры. Сорго – высокоурожайная и засухоустойчивая культура, биологической особенностью которой является медленный рост в начальные этапы развития. Для прорастания семян которой, как и для большинства культурных растений, лимитирующим фактором считается наличие влаги в почве. Ключевым значением в прорастании семян культурных растений является набухание. В литературе отмечены особенности набухания семян в зависимости от условий предпосевной обработки на разных культурах [1-3], тогда как сведения о сорго немногочисленные. В этой связи, изучение сортовых особенностей зернового сорго по степени набухания семян в зависимости от предпосевной обработки препаратами (хелатных форм микроудобрений) является актуальным.

Лабораторный опыт по влиянию хелатных удобрений на набухание семян проводили в 2020 г. Объектами исследований являлись сорта зернового сорго – Гарант, РСК Партизан, РСК Оникс, РСК Локус, РСК Каскад, Бакалавр, Ассистент, Магистр селекции института. Сорта относятся к раннеспелой и среднеранней группам и различаются по хозяйственно-ценным признакам. Все сорта допущены к использованию на территории РФ,

за исключением РСК Оникс и РСК Партизан, проходящих государственное сортоиспытание.

В опыте использовали препараты производства НПО «Сила Жизни». Reasil micro Amino Zn – биологический стимулятор роста растений. Аминокислоты (L-глицин, L-лизин, L-треонин и др.) являются мощным стимулятором роста растений; выполняют роль комплексообразователей для незаменимых микроэлементов, транспортируя их в растение в доступной форме. Стимулируют обменные процессы в растении, увеличивают проницаемость клеточной мембраны. Reasil Forte Carb-Ca/Mg/B-Amino – жидкое удобрение. Сбалансированный состав с высоким процентным содержанием борозаноламина, кальция и магния в комплексе с гидроксикарбоновыми и аминокислотами, обеспечивает высокий уровень биодоступности питательных элементов, их незамедлительное поступление и мобильность в растении. Благодаря гидроксикарбоновым кислотам и аминокислотам обеспечивает поступление питательных веществ на более высоком уровне.

Перед проведением опыта семена обрабатывали следующими растворами: 1 – дистиллированной водой (контроль); 2 – Reasil micro Amino Zn (доза 1,0 л/т); 3 – Reasil Forte Carb-Ca/Mg/B Amino (доза 1,0 л/т). Навеску из 50 семян каждого сорта взвешивали для определения сухого начального веса с помощью электронных весов Сарто-Госм с точностью до 0,000 граммов. Взвешенные семена высыпали в чашки Петри, заливали их дистиллированной водой (5 мл) и помещали в термостат разогретый до 24⁰С. Дальнейшие взвешивания проводили через один час, два, четыре, шесть, двадцать четыре и сорок восемь часов. Набухание семян определяли по формуле [2]:

$A = (M_1 - M_2) \times 100 / M_2$, где M_1 и M_2 – массы набухшего и исходного образцов.

Полученные результаты обрабатывали дисперсионным анализом с помощью программы Agros 2.09.

Семена, находящиеся в состоянии покоя, в период прорастания проходят три этапа: активация метаболизма; подготовка к началу роста растяжением и дальнейший рост органов проростка [1]. С начала процесс набухания семян осуществляется силами гидратации, а затем – осмотическими, за счет накопления продуктов гидролиза белков, липидов и углеводов [4]. В результате проведенных исследований выявлены сортовые различия по степени набухания семян, которая варьировала в интервале 57,4-68,8% в среднем по опыту. Наибольшей интенсивностью набухания за 48-ми часовой период характеризуются сорта Магистр (64,6%) и Гарант (68,8%). Самое интенсивное набухание (43,2-47,9%) прослеживалось в первые 1-2 часа. Через 4-6 часов отмечалась лаг-фаза, в течение которой скорость поглощения воды существенно не изменялась. Набухание в этот период составило 53,3-54,9%. Следующая фаза характеризовалась повторным увеличением темпов водопоглощения. На этом этапе набухание достигло у некоторых сортов в отдельных вариантах 94,9%.

Обработка зернового сорго микроудобрениями оказала разное влияние на процесс набухания. В среднем по опыту значимое усиление процесса поглощения семенами воды установлено в варианте с применением Reasil Forte Ca/Mg/B: 63,2% в сравнении с контрольным вариантом 59,7%. На набухаемость семян сортов Ассистент и Магистр влияние удобрений было равнозначным: при обработке Reasil Forte Carb-Ca/Mg/B Amino интенсивность набухания составила 55,0-66,7%; Reasil micro Amino Zn – 57,4-65,3%, соответственно. Более сильное влияние Reasil Forte Carb-Ca/Mg/B Amino отмечено на набухание семян у сорта РСК Каскад: разница с контрольным вариантом составила 12,3%. На сортах РСК Оникс, Гарант наблюдалась тенденция усиления процесса набухаемости при обработке семян препаратами. Сорта РСК Локус и Бакалавр оказались невосприимчивы к действию данных препаратов.

Таким образом, при предпосевной обработке семян данными препаратами отмечена активация физиолого-биохимических процессов на начальных этапах прорастания, и как следствие интенсификация ростовых процессов. В среднем по опыту усиление процесса

поглощения семенами воды установлено в варианте с применением Reasil Forte Carb-Ca/Mg/B Amino, что выше контрольного варианта на 3,5%. Полученные результаты свидетельствуют об улучшении прорастания семян зернового сорго, обработанных данным препаратом.

Список литературы:

1. Карпова Г.А. Темпы водопоступления и общая метаболическая активность семян проса при использовании регуляторов роста. Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. 2011.–№25. – С. 618-623.
2. Ржевская В.С., Омельченко А.В. Влияние микробиологического препарата Эмбико на прорастание семян и рост проростков озимой пшеницы Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2015.–№ 21.– С. 58-64.
3. Зубарева К.Ю. Особенности набухания семян в зависимости от условий предпосевной обработки. Мат-лы IV Межд. науч. конф. «Донецкие чтения 2019: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности» 2019. – С. 344-346.
4. Зимон А.Д. Занимательная коллоидная химия.– М.:Агар, 2002– 168 с.
5. Аскоченская Н. А. Водный режим семян. Мат-лы Всесоюз. симпозиума «Регуляция водного обмена растений». – К.: Наукова думка, 1984.– С.42-44.
6. Никулин А.В., Тарасова И.Н. Определение зависимости прорастания семян от степени набухания. Успехи современного естествознания. 2011. – № 5. – С. 128.

DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.112

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИДРОЛИЗАТА ХИТОЗАНА НА РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Тимофеева Т.А.^{1,2}, Штанько Д.А.^{1,3}, Закурин А.О.¹

1 – Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

2 – ФГБОУ ВО "Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева"; 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

**3 – ФГБОУ ВО «Московский политехнический университет», 107023, г. Москва, ул. Большая Семеновская, 38
E-mail: timofeyka2033@mail.ru**

Природный биополимер хитозан, получаемый путем дезацетилирования хитина, обладает рядом уникальных свойств, позволяющих применять его в различных областях науки. Фунгицидная и антимикробная активность способствует расширению спектра применения хитозана [1,3], в том числе в качестве средства защиты растений в сельском хозяйстве. Также известно, что хитозан способен вызывать физиологические изменения в растениях – стимуляцию роста и дифференцировки тканей, усиление иммунного ответа, что позволяет использовать хитозан в качестве элиситора [2]. Однако хитозан плохо растворим в воде. Для решения этой проблемы предлагается использовать низкомолекулярный гидролизат хитозана, растворимость которого значительно выше.

В данной работе было изучено влияние гидролизата хитозана в концентрациях от 0,002 мг/мл до 5 мг/мл (средняя молекулярная масса 33 kDa) на прорастание семян томата *Solanum lycopersicum* сортов Черри розовый и Викинг. Семена сорта Викинг подвергли стерилизации перед проведением эксперимента.

Получение достоверных сведений о действии гидролизата хитозана на прорастание семян томата требует корректной разработки условий проведения экспериментов, так как для получения гидролизата хитозана используются азотная кислота и аммиак, являющиеся

источником азота – одного из основных биогенных химических элементов. Гидролизат хитозана из расчета концентрации 10мг/мл растворяли в 200мМ растворе азотной кислоты, а затем доводили рН раствора до 5,5 с помощью 14мМ NH₄ОН. В связи с этим, в целях разделения влияния гидролизата хитозана и азота, параллельно различным концентрациям гидролизата хитозана, использовали пропорциональные концентрации растворов азотной кислоты и аммиака. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

В эксперименте использовали следующие концентрации гидролизата хитозана, мг/мл: 5; 2; 0,2; 0,02; 0,002.

Влияние различных концентраций растворов проверяли при временном и постоянном воздействии. Семена проращивались в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге по общепринятой методике [4]. Условия проращивания: 20-24°C, 16-часовой фотопериод а) воздействие раствора в течение 22 часов с последующим перекалыванием на среду без действующего вещества и б) воздействие в течение 8 дней.

На 8-ой день после замачивания фиксировали процент прорастания, измеряли длину корня и гипокотили проросших семян. Статистическая обработка полученных экспериментальных данных производилась с использованием пакета анализа данных программы Microsoft Excel.

Постоянное нахождение семян в растворе гидролизата хитозана не показывало положительных результатов, напротив, концентрация 5 мг/мл полностью ингибировала развитие семян обоих сортов томата, а концентрация 2 мг/мл существенно снижала процент прорастания и тормозила развитие проростков. Концентрации 0,002 мг/мл, 0,02 мг/мл, 0,2 мг/мл позволили увеличить длину гипокотилей сорта Викинг почти в 2 раза, по сравнению с контролем (временное воздействие не оказывало такого влияния на семена сорта Викинг).

При постоянном воздействии высоких концентраций гидролизата хитозана на семена сорта Черри наблюдалось активное развитие грибных патогенов.

Временное воздействие раствора гидролизата хитозана в концентрациях 0,2 и 5 мг/мл для семян сорта Черри, 2 и 5 мг/мл для сорта Викинг позволило увеличить длину проростков почти в 2 раза. Следует отметить сильное увеличение длины корней у обоих сортов.

Наблюдалось как положительное, так и отрицательное влияние раствора, содержащего пропорциональные концентрации азотной кислоты и аммиака, на прорастания семян обоих сортов, однако полученные результаты незначительно отличались от контроля.

Серия проведенных экспериментов показала, что гидролизат хитозана оказывает существенное влияние на прорастание семян и развитие проростков. Результат воздействия зависит как от концентрации раствора и длительности обработки, так и от сорта растения. Полученные данные открывают возможности для дальнейшего изучения влияния гидролизата хитозана на развитие растений, ценных для сельского хозяйства с перспективой его применения в качестве стимулятора.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 20-016-00205А).

Список литературы:

1. El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F. Chitosan in plant protection. 2010. Mar 30;8(4):968-87. doi: 10.3390/md8040968.
2. Baque, Md. A., Shiragi, Md. H. K., Lee, E. J. & Paek, K.-Y. Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). Aust. J. Crop Sci. 6(9), 1349–1355 (2012).
3. Куликов С.Н., Хайрулин Р.З. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизм действия и роль структуры. Хитозан. М.: «Центр Биотехнологий» РАН. 2013 С. 363–407.
4. Николаева М.Г., Лянгузова И.В., Поздова Л.М. Биология семян. СПб.: НИИ химии СПбГУ, 1999. 233 с.