ФГБНУ ВНИИСБ
Курчатовский геномный центр - ВНИИСБ

XXI Всероссийская конференция молодых ученых

# «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии»

## СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ КОНФЕРЕНЦИИ

(в смешанном формате)

19-21 октября 2021 г.
Москва

Посвящается
памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева

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

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

Российская Академия Наук

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

СИНТОЛ научно-производственная компания

helicon

Феномика

## Официальные спонсоры

ПУЩИНСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ

БиоЛаб Микс

## Спонсоры

ВТБ

ЩЕЛКОВО АГРОХИМ

**ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР**
**ООО «НАУЧНЫЙ СЕРВИС»**

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

# XXI ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ

# «БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, ЖИВОТНОВОДСТВЕ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»

**19-21 октября 2021 г.**

**КОНФЕРЕНЦИЯ ПОСВЯЩАЕТСЯ ПАМЯТИ АКАДЕМИКА РАСХН ГЕОРГИЯ СЕРГЕЕВИЧА МУРОМЦЕВА**

**Москва – 2021**

**УДК 663.18(063); 606; 573.6; 57.088**
**ББК 30.16**
**Авт.знак Б63**

**ISBN 978-5-6047415-9-7**

**«Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии»: 21-я Всероссийская конференция молодых учёных (Москва, 19-21 октября 2021 г., ФГБНУ ВНИИСБ), сборник тезисов докладов. – М.: ФГБНУ ВНИИСБ, 2021. – 155 с.**

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

21-я Всероссийская молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» 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.

ISBN 978-5-6047415-9-7
9 785604 741597

**© ФГБНУ ВНИИСБ, 2021 г.**

**Оглавление**

**СЕКЦИЯ «БИОИНФОРМАТИКА И ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ» .....11**
МЕТА-АНАЛИЗ ДАННЫХ ТРАНСКРИПТОМОВ ВЫЯВИЛ ГЕНЫ-КАНДИДАТЫ УСТОЙЧИВОСТИ К НИЗКИМ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ У *ARABIDOPSIS THALIANA L.* Сизенцова Я.Г. [1,2], Омельянчук Н.А.[1], Миронова В.В.[1,2]**.....12**
СЕКВЕНИРОВАНИЕ И СБОРКА ТРАНСКРИПТОМОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ КОЛЛЕКЦИИ IPPAS ИФР РАН Бобровникова Л.А.[1,2], Миронов К.С.[2], Синетова М.А.[2] **.....13**
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ К ИССЛЕДОВАНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К СТРЕССУ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ Галиева А.Г.[1], Кононов В.А.[2], Самарина Л.С.[3], Орлов Ю.Л.[1,2,3] **.....15**
ПРОВЕДЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ФРАГМЕНТА ГЕНА GE ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА Коротин А.В., Сазонова Ю.В. **.....17**
ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ КОНТУРОВ И КЛАСТЕРОВ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ГЕНОМАХ РАСТЕНИЙ ПО ДАННЫМ CHIP-SEQ Дергилев А.И.[1], Добровольская О.Б.[2], Орлова Н.Г.[3,4], Орлов Ю.Л.[1,2] **.....18**
ПРИМЕНЕНИЕ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОИСКА СТРУКТУРНЫХ ВАРИАНТОВ В ГЕНОМЕ КАРТОФЕЛЯ Лиходеевский Г. А., Шанина Е. П., Стафеева М. А., Ахметханов В. Ф. **.....20**
АНАЛИЗ МОБИЛОМА РАСТЕНИЙ ПУТЁМ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК, ОБОГАЩЁННОЙ ВНЕХРОМОСОМНЫМИ КОЛЬЦЕВЫМИ МОЛЕКУЛАМИ Меркулов П.Ю., Киров И.В **.....21**
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ GINOFIP – АЛГОРИТМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОПЕРОНОВ ИНТЕРЕСА Кучур П.Д.[1], Афонникова С.Д. [1], Комиссаров А.С.[1]**.....23**
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФОСФОРИТНОЙ МУКИ РАСТЕНИЯМИ ПШЕНИЦЫ ТВЕРДОЙ И РЖИ С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ Баженов М.С. **.....24**
СООТНОШЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ГЕНА E183L ВИРУСА АЧС С КЛАССИФИКАЦИЕЙ ИЗОЛЯТОВ ПО СЕРОГРУППАМ Минкова С.И, Кольцов А.Ю., Холод Н.С., Кольцова Г.С. **.....25**
ПРОЕКТИРОВАНИЕ НАТУРНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ В ПРОГРАМНО-АППАРАТНОМ КОМПЛЕКСЕ СИНЕРГОТРОН Булатов А.П.[1], Латушкин В.В.[1], Давыдова Н.В.[2], Верник П.А.[1]**.....27**
КАРТИРОВАНИЕ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОМА КОНОПЛИ ПОСЕВНОЙ (*CANNABIS SATIVA* L.) Романов Д.В. **.....29**
**СЕКЦИЯ «МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ» .....31**
МОЛЕКУЛЯРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ У ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ Корзун В.Н.**.....32**
ПОЛИМОРФИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У ДОМАШНИХ И ДИКИХ СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ Соловьева А.Д., Бардуков Н.В., Харзинова В.Р. **.....33**
ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ У ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ *AEGILOPS SPELTOIDES* Болдаков Д.М., Давоян Э.Р., Зубанова Ю.С., Давоян Р.О., Бибишев В.А. **....34**
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ CSN3, LGB И MGST1 У КОРОВ МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ Романенкова О.С.[1], Зимина А.А.[1], Сермягин А.А.[1], Кольцов Д.Н.[2]**.....35**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛЮТЕНИНОВ У СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ КАНАДСКОЙ СЕЛЕКЦИИ Русманов Н.С.[1] Груздев И.В.[1,2], Ворончихина И.Н.[3], Рубец В.С.[1],Соловьев А.А.[2,3] ..... **37**
ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CXCR1 И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ КОРОВ Зимина А.А.[1], Романенкова О.С.[1], Сермягин А.А.[1] ..... **39**
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОРТОВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (RIBES NIGRUM L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРА ИЗ РЕСУРСОВ ВНИИСПК Павленко А.А., Должикова М.А., Бахотская А.Ю. ..... **40**
ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДНК-МАРКЕРА ESR1 НА ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА СВИНЕЙ ПОРОД КРУПНАЯ БЕЛАЯ И ЛАНДРАС Карпушкина Т.В., Свеженцева Н.А., Форнара М.С., Бардуков Н.В., Бакоев Н.Ф., Костюнина О.В. ..... **43**
ПОИСК МУТАЦИЙ ГЕНА *GRF2-2R* В ОБЛАСТИ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ miRNA396 У РЖИ ПОСЕВНОЙ МЕТОДОМ ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩЕГО ПЛАВЛЕНИЯ ДНК Черноок А. Г. [1,2], Баженов М. С. [1,2], Никитина Е. А [1,2], Панченко В.В.[3] ..... **44**
ПОИСК ЛОКУСОВ ПОД ДАВЛЕНИЕМ У КРС ТАГИЛЬСКОЙ ПОРОДЫ Мишина А.И., Абдельманова А.С., Доцев А.В. ..... **46**
АНАЛИЗ СЕЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ ТОМАТА (*Solanum lycopersucum*) И ИДЕНТИФИКАЦИЯ У НИХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *Ph-3* УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ Пырсиков А.С.[1], Чайчук К.Д.[2], Милюкова Н.А.[1] ..... **47**
ХАРАКТЕРИСТИКА ГОРСКОГО СКОТА ДАГЕСТАНА ПО STR-МАРКЕРАМ Волкова[1] В.В., Денискова[1] Т.Е., Абдельманова[1] А.С., Романенкова[1] О.С., Хожоков[2] А.А., Сермягин[1] А.А., Зиновьева[1] Н.А. ..... **48**
ГОРДЕИН-КОДИРУЮЩИЕ ЛОКУСЫ ПЛЕНЧАТЫХ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ СЕЛЕКЦИИ ОМСКОГО АГРАРНОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА Юсова О.А., Николаев П.Н. ..... **49**
АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ГЕНА *LCORL* SNP A503G У КУР ПОРОДЫ ПУШКИНСКАЯ И ИХ ВЛИЯНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСТЕРЬЕРА И ЖИВОЙ МАССЫ Пегливанян Г.К. ..... **51**
АНАЛИЗ КОЛЛЕКЦИИ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА ЛОКУС *Pl6*, ОТВЕЧАЮЩИЙ ЗА УСТОЙЧИВОСТЬ *HELIANTHUS ANNUUS* К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ Сидоров Л.А.[1], Милюкова Н.А.[2], Пырсиков А.С.[2] ..... **53**
ХАРАКТЕРИСТИКА ОВЕЦ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-ЧИПОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ Денискова Т.Е., Доцев А.В., Шахин А.В., Родионов А.Н., Зиновьева Н.А. ..... **54**
РАЗРАБОТКА МАРКЕРОВ К ГЕНАМ, СВЯЗАННЫМ С СОДЕРЖАНИЕМ КРАХМАЛА В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM* L Куваева Д.Д., Сергеева Е.М., Щербань А.Б, Афонников Д.А., Салина Е.А., Кочетов А.В. ..... **55**
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РОССИЙСКИХ ЛОКАЛЬНЫХ ПОРОД ОВЕЦ, ОСНОВАННЫЙ НА ПОЛИМОРФИЗМЕ ГЕНА ЦИТОХРОМА Б МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК Кошкина О.А., Денискова Т.Е., Соловьева А.Д., Зиновьева Н.А. ..... **56**
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ 1BL/1RS ТРАНСЛОКАЦИИ У ПШЕНИЦЫ Коробкова В.А.[1], Черноок А.Г.[1], Дивашук М.Г.[1], Архипов А.В.[1], Яновский А.С.[2], Воропаева А.Д.[2] ..... **58**
ИНДЕКС ЭНЕРГЕТИЧЕСКИ КОРРЕКТИРОВАННОГО МОЛОКА КАК БИОМАРКЕР ПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КОРОВ .... Лашнева И.А., Сермягин А.А. ..... **59**
СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS*) НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА Шалаева Т.В., Шилов И.А. ..... **61**
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ *Ty-2* И *Ty-3* ДЛЯ ОЦЕНКИ КОЛЛЕКЦИИ ОБРАЗЦОВ ТОМАТА (*Solanum lycopersicum*) НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИРУСУ ЖЁЛТОЙ

КУРЧАВОСТИ ЛИСТЬЕВ ТОМАТА (TYLCV) Почитаньева Н.В.[1], Пырсиков А.С.[2], Милюкова Н.А.[2] ..... **62**
АНАЛИЗ ГЕНОВ ГЛЮТЕНИНОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ Полховская Е.С., Дудников М.В., Киров И.В., Соловьев А.А. ..... **64**
АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ ТОМАТА (*SOLANUMLYCOPERSICUM*) НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КЛАДОСПОРИОЗУ Белова Н.И.[1], Пырсиков А.С.[2], Милюкова Н.А.[2] ..... **65**
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИБРИДНОСТИ ПОТОМСТВА РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ ПО ЛОКУСАМ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛЮТЕНИНОВ Груздев И.В.[1], Полховская Е.С.[1], Коленков М.А.[1] Соловьев А.А.[1,2] ..... **67**
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО Келехсашвили Л.М., Датиева И.А. ..... **69**
ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА I-2 ДЛЯ ОЦЕНКИ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ТОМАТА (Solanum lycopersicum) ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ Василик М.П.[1], Милюкова Н.А.[2], Пырсиков А.С.[2] ..... **70**
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ Болотина А.А.*, Полховская Е.С., Киров И.В. ..... **72**
ДИНАМИКА РОСТА И РАЗВИТИЯ РЕСУРСНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОВЕЦ Петров С.Н., Денискова Т.Е., Зиновьева Н.А. ..... **73**
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ ГРУШИ ФНЦ САДОВОДСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТТЕЛИТНЫХ МАРКЕРОВ Свистунова Н.Ю., Бурменко Ю.В. ..... **74**
ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕМЕННИКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ Дуденкова Н. А. ..... **75**
**СЕКЦИЯ «ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ»** ..... **77**
ЧТО НОВОГО МОЖНО УЗНАТЬ ПРИ РЕДАКТИРОВАНИИ ИНТРОНОВ ГЕНОВ lncРНК С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9 Степанов Г. А.[1], Матвеева А. М.[1,2], Журавлев Е. С.[1], Власов В.В. [1,2] ..... **78**
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМЫЕ ГЕНЫ-МАТРЕШКИ КАК МИШЕНИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К РАЗЛИЧНЫМ ВИДАМ СТРЕССА: АЛГОРИТМ ПОИСКА В МОДЕЛЬНЫХ И КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЯХ Шешукова Е.В.[1], Ершова Н.М.[1], Поздышев Д.В.[1,2], Комарова Т.В.[1,2] ..... **79**
РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ТОМАТА Баранов Д.Ю.[1], Долгов С.В.[1,2], Тимербаев В.Р.[1,2] ..... **81**
РЕПЛИКАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНА EP402R IN VIVO Кольцов А.Ю., Крутько С.А., Белов С.В., Холод Н.С., Коротин А.В., Сухер М.М., Кольцова Г.С. ..... **82**
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ VPG ВИРУСА Y С ФАКТОРАМИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ EIF4E КАРТОФЕЛЯ Ражина О.Л., Злобин Н.Е., Лебедева М.В. ..... **83**
ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕРНЫХ ВИРУСОВ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ БЕЛКИ P54 И P30 Кольцова Г.С., Сухер М.М., Рудакова С., Крутько С.А., Белов С.В., Холод Н.С., Кольцов А.Ю. ..... **85**
СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕСИИ ГЕНА ДЕФЕНЗИНА Sm-AMP-D2 ИЗ Stellaria media L. В РАСТЕНИЯХ ТОМАТА Михель И.М. ..... **86**
СОЗДАНИЕ УДОБНОГО ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУС-РАСТИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ Колесникова В.В.[1] , Лебедева М. В.[2] ..... **88**
ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ПЕТУНИИ С ПРИЖИЗНЕННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕОРГАНИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА Демиденко Д.В.[1,2], Халилуев М.Р. [1,2] ..... **89**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОМОТОРА pro-SmAMP-X В МОДЕЛЬНЫХ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ Иванова Л.А., Комахин Р.А. ..... **91**
ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПЕТУНИИ С ГЕНОМ *codA* ИЗ *Arthrobacter globiformis* Каракай М.В.[1,2], Халилуев М.Р. [1,2] ..... **93**
ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГОСЯ РЕТРОТРАНСПОЗОНА ARABIDOPSIS THALIANA Константинов З.С.1,2, Лебедева М.В.2, Корчинская В.Ю.3, Таранов В.В.2, Киров И.В.2 ..... **95**
**СЕКЦИЯ «КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОСКОПИЯ»** ..... **96**
РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТОВ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ СВЕКЛЫ СТОЛОВОЙ Заячковская Т.В., Минейкина А.И., Кан Л.Ю., Заячковский В.А., Домблидес Е. А. ..... **97**
РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КУЛЬТУРЫ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ИЗ МАТЕРИАЛА, ПОЛУЧЕННОГО ЧЕРЕЗ 10 ЧАСОВ ПОСЛЕ СМЕРТИ ГИБРИДА ОВЦЫ И СНЕЖНОГО БАРАНА Ворожбит Т.А., Сингина Г.Н. ..... **99**
ЭМБРИО- И КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕМЯЗАЧАТКОВ *CUCURBITA PEPO L. Осминина Е.В., Соловьева Ю.А., Монахос С.Г.* ..... **100**
ЭНДОГЕННЫЙ ФОРМАЛЬДЕГИД КАК ФАКТОР, ВОЗВРАЩАЮЩИЙ КЛЕТКАМ ОПУХОЛИ СПОСОБНОСТЬ К АПОПТОЗУ *Липскеров Ф.А.[1,2], Шешукова Е.В.[2], Ершова Н.М.[2], Комарова Т.В.[1,2]* ..... **102**
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ КАБАЧКА (*CUCURBITA PEPO* L.) В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК *IN VITRO* Ермолаев А.С., Домблидес Е.А. ..... **103**
ВЛИЯНИЕ ЦИТОХАЛАЗИНА Б НА РАЗВИТИЕ КЛОНИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ СВИНЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ПРОЦЕДУРЫ ЭНУКЛЕАЦИИ И ПЕРЕНОСА ЯДЕР СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК Лопухов А.В., Сингина Г.Н. ..... **105**
МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КОК-САГЫЗА (*TARAXACUM KOK-SAGYZ RODIN)* – ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА Мартиросян Л.Ю.[1,2], Эсембаева М. А.[3], Мягкова Е. Р.[4], Филатова С. И.[4], Цыганкова Е. А.[3], Джумакулыева М.[3] ..... **107**
ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭМБРИОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР КУЛЬТУР КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ Вишнякова А.В., Синицина А.А., Монахос С.Г. ..... **109**
ПОЛУЧЕНИЕ DH-РАСТЕНИЙ РЕДИСА ЕВРОПЕЙСКОГО В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР *IN VITRO* Козарь Е.В., Домблидес Е.А., Солдатенко А.В. ..... **111**
ПЕРВЫЕ ШАГИ В ПОСТРОЕНИИ КАРИОТИПА *SHEPHERDIA ARGENTEA (PURSH) NUTT* Боне К.Д.[1], Разумова О.В.[1], Карлов Г. И.[1] ..... **113**
ПОЛИПЛОИДНЫЕ ФОРМЫ ЛУКА (*Allium cepa* L. × *Allium fistulosum* L.) И ЧЕСНОКА (*Allium sativum* L.) Романова О.В., Середин Т.М., Романов В.С., Мастяев И.С. ..... **114**
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФРАКЦИЙ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДНК РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА CANNABACEAE И ЕЕ РОЛЬ В ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ Разумова О.В[1], Бочаркина Ю.В.[2], Боне К.Д.[1], Романов Д.В.[1], Почтовый А.А.[1], Александров О.С.[1] ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *THINOPYRUM SARTORII* Кузнецова В. М.[1], Дивашук М. Г.[1], Крупин П. Ю.[1] Никитина Е. А.[1] ..... **117**
ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА Абрамова А.С.[1], Гарибян Ц.С.[2] **118**
ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОКЛОНОВ *IPOMOEA BATATAS* (L.) *IN VITRO* Абубакаров Х.Г., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н ..... **119**
ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ МЕТАБОЛИЗМА И НАКОПЛЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО *SCUTELLARIA BAICALENSIS GEORGI* Бронских Е.Д., Орехова И.А., Шебитченко Т.С. ..... **120**

ИЗУЧЕНИЕ ЦИКОРИЯ (*CICHORIUM INTYBUS* L.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*, КАК ИСТОЧНИКА ИНУЛИНА Дегтярева И.С., Панкова М.Г., Полупанова А.А., Хомутова А.А., Киракосян Р.Н. **122**
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ АДАПТАЦИИ МИКРОКЛОНОВ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO* Гущин А.В., Киракосян Р.Н., Калашникова Е.А. **123**
INTRODUCTION TO IN VITRO CULTURE OF AMOMUM TSAO-KO CREVOST & LEMARIE SEEDS Khuat Van Quyet[1,2], Kalashnikova E. A.[1,*], Kirakosyan R. N.[1] , Nguyen Thanh Hai[3] **124**
РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ ПОДСОЛНЕЧНОГО ШРОТА Клишин А.А., Мальцева О.Ю. **125**
ГАПЛОИДИЯ В УСКОРЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ. Донцова В.Ю **126**
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ BRASSICA × RAPHANUS Спивак В.В. **127**
**СЕКЦИЯ «СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ. РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ» 129**
ЛЕТУЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, ВЫДЕЛЯЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ, ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ. Плюта В.А.[1], Сидорова Д.Е.[1], Мелькина О.Е.[2], Кокшарова О.А[1,3], Хмель И.А.[1] **130**
ОПРЕДЕЛЕНИЕ HLA-II У ПАЦИЕНТОВ С ВЫСОКИМИ ТИТРАМИ IgG ПОСЛЕ COVID-19 Нефедьева М.В., Титов И.А., Малоголовкин А.С. **132**
ИНТЕНСИФИКАЦИЯ БИОСИНТЕЗА СКВАЛЕНА ДРОЖЖАМИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Клименко А.А., Мещерякова О.Л., Корнеева О.С. **133**
ПОИСК БАКТЕРИОФАГОВ, ЭФФЕКТИВНЫХ ПРИ БОРЬБЕ С ФИТОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ СЕМЕЙСТВА *PSEUDOMONAS* И *RAOULTELLA*, ПОРАЖАЮЩИХ КОК-САГЫЗ (*TARAXACUM KOK-SAGYZ RODIN)* – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА Мартиросян Л. Ю.[1,2], Лукьянова А. Л.[3], Америк А. Ю.[1] **135**
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В СИЛОСЕ ИЗ АМАРАНТА Василаки Е.А.[1], Мельникова А.Ю.[2], Свиридова Т.В. [1], Мещерякова О.Л.[1] Шуваева Г.П.[1], Корнеева О.С. [1] **136**
ANTIBIOTIC RESISTANCE PATTERNS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI, SALMONELLA ISOLATED FROM MEAT PRODUCTS Ashraf Ayyal Mutar Alrashedi[1], Kamal Mathlum Al-khafaji[2], Abdulamir A.Alzahid[3] **138**
DISTRIBUTION OF HEPATITIS E VIRUS GENOTYPES FROM HUMAN AND ANIMAL RESERVOIRS *Ahmed M. El-Adly [1;2]* **139**
РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ ПОДСОЛНЕЧНОГО ШРОТА Клишин А.А., Мальцева О.Ю. **141**
МЕТОД ОПОСРЕДОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ТИТРА ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА РВ-97 С ПРИМЕНЕНИЕМ ОТ-ПЦР-РВ В СЫРЬЕ ДЛЯ ВАКЦИНЫ Доронин М.И.[1], Мудрак Н.С.[1], Михалишин Д.В.[1] **142**
SSR-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* НА ТЕРРИТОРИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2018-2020 ГГ Чижик В.К., Соколова Е.А. **143**
ПОСТУПЛЕНИЕ САХАРОЗЫ В КЛЕТКИ ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЕ ПРОГРАММЫ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КАМБИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ У БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ Серкова А.А., Тарелкина Т.В., Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., Софронова И.Н., Иванова Д.С., Семенова Л.И. **144**
ПРИМЕНЕНИЕ СОЛЕЙ ТЕРПЕНОВЫХ КИСЛОТ ЖИВИЦЫ СОСНЫ СИБИРСКОЙ КЕДРОВОЙ В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА СЕЛЬСКОЗЯЙСТВЕННЫХ

РАСТЕНИЙ Никитин Е.Н., Шаронова Н.Л., Теренжев Д.А., Белов Т.Г., Шуматбаев Г.Г., Рахмаева А.М., Крупин Е.О. **146**
ДЕЙСТВИЕ МЕТИЛЖАСМОНАТА НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА, ПОДВЕРГНУТЫХ НИЗКОТЕМПЕРАТРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ Игнатенко А.А., Репкина Н.С., Таланова В.В., Титов А.Ф. **148**
ВЛИЯНИЕ УФ-Б НА ПРОРАСТАНИЕ ПЫЛЬЦЫ И РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК Petunia hybrida L Зинкевич В.В., Захарова Е.В. **150**
ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ПЕСТИКОВ ИНГИБИТОРОМ КАСПАЗО-ПОДОБНОЙ ПРОТЕАЗЫ (AC-DEVD-CHO) НА РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ (*Petunia hybrida* L.) Соболев Д.С., Демьянчук И.С., Захарова Е.В. **150**
ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ТОМАТА ДИКОГО ВИДА *SOLANUM PENNELLII COR*. Тукусер Я.П., Байков А.А., Романова О.В., Домблидес Е.А., Гинс М.С. **151**
ОБРАБОТКА ИНГИБИТОРОМ КАСПАЗО-ПОДОБНЫХ ПРОТЕАЗ (AC-DEVD-CHO) СНИМАЕТ ДЕГРАДАЦИЮ ДНК, ВЫЗВАННУЮ САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬЮ S-РНКАЗНОГО ТИПА У *Petunia hybrida L.* в ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ Демьянчук И.С., Соболев Д.С., Захарова Е.В. **153**
INFLUENCE OF DIFFERENT LAND CONFIGURATION AND PHOSPHORUS FERTILIZER APPLICATION ON GROWTH PARAMETERS AND YIELDS PERFORMANCE OF BLACK–EYED BEAN (*VIGNA UNGUICULATA* L.) IN SEMI-ARID REGION OF AFGHANISTAN Feroz babazoi[1] and Bashir Ahmad Babazoi[2] **154**

## СЕКЦИЯ
## «БИОИНФОРМАТИКА И ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ»

# МЕТА-АНАЛИЗ ДАННЫХ ТРАНСКРИПТОМОВ ВЫЯВИЛ ГЕНЫ-КАНДИДАТЫ УСТОЙЧИВОСТИ К НИЗКИМ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ У *ARABIDOPSIS THALIANA L.*

**Сизенцова Я.Г.[1,2], Омельянчук Н.А.[1], Миронова В.В.[1,2]**

***1 - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), Новосибирск 63090 E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru***

***2 – Университет Радбауда по биологическим и экологическим наукам (RIBES), Неймеген, Нидерланды 6525 AJ E-mail: m.frieling@science.ru.nl***

Растения из средних и умеренных широт характеризуются способностью переживать воздействие низких положительных температур (от +4°C до 0°C), в то время как растения из тропических регионов погибают уже при +16 °C. На молекулярном уровне процесс развития адаптации к холоду сопровождается изменением экспрессии огромного пула генов, в том числе генов, кодирующих транскрипционные факторы. Так, например, было показано, что в ответ на холод повышается экспрессия CBF/DREB, долгое время считающиеся наиболее важными регуляторами развития холодоустойчиворсти. Однако CBF/DREB транскрипционные факторы регулируют лишь небольшой процент генов (~11 %), экспрессия которых изменяется в ответ на холод, и отвественны в первую очередь за развитие морозо-, а не холодоустойчивости. (Park et al., 2016). Таким образом, регуляторы, отвественные за развитие холодоустойчивости, до сих пор не выявлены.

Цель нашего исследования состояла в поиске возможных регуляторов развития холодоустойчивости у *Arabidopsis thaliana*. На первом этапе мы собрали 31 набор транскриптомных данных, полученных из различных тканей арабидопсиса при моделировании условий холодового стресса (от +10 °C до 0°C), в базе данных GEO NCBI. Затем для каждого набора данных мы выделили лист дифференциально экспрессирующихся в ответ на холодовой стресс генов использованием пакетов *edgeR* и *limma* R. На втором этапе мы провели кластеризацию значений экспрессии обработанных транскриптомов и выделили три кластера данных, отличающихся друг от друга длительностью воздействия низкими положительными температурами: 1) ранний (от 1 до 6 часов), 2) поздний (от 12 до 24 часов) и 3) очень поздний ответ (более 24 часов). Наконец, на третьем этапе, мы провели распознавание пиков связывания транскрипционных факторов в промоторах генов длиной 1500 пн для раннего, позднего и очень позднего ответа, используя подход, писанный у Shi et al., 2021. В результате мы выявили транскрипционные факторы, районы связывания которых значимо обогащены в промоторах дифференциально экспрессирующихся генов для каждой фазы холодового стресса. Так, например, мы обнаружили, что факторы транскрипции из суперсемейства WRKY ассоциированы с ранним ответом, в то время как представители суперсемейства AP2/ERF, MYB и bZIP - с поздним и очень поздним холодовым ответом. Детальный анализ списка выявленных транскрипционных факторов показал, что роль большинства из них, за исключением CBF/DREB, в развитии холодо- или морозоуйсточивости мало изучена. Таким образом, наш анализ предсказал новых возможных регуляторов холодового стресса и показал временную специфичность регуляции ответа на низкие положительные температуры.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ №20-44-543005.

**Список литературы:**

1. Zhao, Chunzhao, et al. "Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in Arabidopsis." Plant physiology 171.4 (2016): 2744-2759.
2. Park, Sunchung, et al. "Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network." The Plant Journal 82.2 (2015): 193-207.
3. Shi, Dongbo, et al. "Tissue-specific transcriptome profiling of the Arabidopsis inflorescence stem reveals local cellular signatures." The Plant Cell (2020).

## СЕКВЕНИРОВАНИЕ И СБОРКА ТРАНСКРИПТОМОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ КОЛЛЕКЦИИ IPPAS ИФР РАН

**Бобровникова Л.А.[1,2], Миронов К.С.[2], Синетова М.А.[2]**

***[1]Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Биотехнологический факультет***
***[2]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН***
***127276, Москва, Ботаническая, 35***
***E-mail: lidia.bo@yahoo.com***

Микроводоросли накапливают в качестве основных запасных веществ крахмал и триацилглицерины (ТАГ). При этом соотношения этих запасных продуктов могут сильно варьироваться и в значительной степени оказываются видо- и даже штамм-специфичны. Кроме того, различные стрессовые воздействия могут способствовать запасанию крахмала или же ТАГ, открывая возможности для биотехнологического «управления» процессами запасания в клетках культивируемых микроводорослей [1]. К сожалению, универсального молекулярного объяснения данному феномену до сих пор нет. Данное исследование нацелено на получение полноразмерных транскриптомов биотехнологически значимых штаммов микроводорослей и является основополагающим для дальнейших исследований механизмов запасания питательных веществ в клетках данных микроорганизмов.

Три штамма микроводорослей, депонированных в Коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН: *Neochlorella semenenkoi* IPPAS C-1210, *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 и *Coelastrella* sp. IPPAS H-626 — характеризуются высокой скоростью накопления биомассы, наделены высоким адаптивным потенциалом, способны запасать значительное количество крахмала и ТАГ. Штаммы IPPAS C-1210 и IPPAS H-626 способны расти гетеротрофно на питательных средах с добавлением 0,1% глюкозы в качестве источника углерода. Для каждого из этих штаммов нами была проведена оптимизация протокола выделения тотальной РНК: мы сравнивали качество препаратов тотальной РНК, выделенной из клеточного гомогената, полученного разрушением клеток 0,1-мм стеклянными бусами, с помощью фенольного метода, Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) и RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Наиболее эффективным оказался набор от QIAGEN. Выделение тотальных РНК проводили для культур микроводорослей, растущих в автотрофных и гетеротрофных условиях. Удаление рРНК из препаратов тотальной РНК (Ribozero Plant, Illumina), получение библиотек кДНК (TruSeq Stranded Total RNA, Illumina), а также секвенирование в формате 150-п.н. парных чтений (NovaSeq 6000, Illumina) — проводили в ЗАО Евроген. В результате было получено 6 пар (три штамма, каждый — в двух условиях роста: автотрофных и гетеротрофных) fastq-файлов, каждый из которых содержал 90-100 млн прочтений.

TrimGalore v. 0.6.5 [2] использовали для удаления адаптерных последовательностей прочтений. Сборку транскриптомов проводили с помощью ассэмблеров с настройками по умолчанию: SPAdes (v. 3.15.2) [3], Trinity [4], transABySS (v. 2.0.1, для четырех длин k-меров: -k 32, 64, 96, 128) [5] и TransLig (v. 1.3) [6]. Объединение сборок для авто- и

гетеротрофных условий роста проводили с помощью EvidentialGene [7]. Оценку качества и полноты финальных сборок, собранных различными методами, а также транскриптомов, полученных отдельными ассэмблерами, проводили с помощью BUSCO (v. 5.2.2) [8], rnaQUAST (v. 2.2.0) [9], анализируя число полноразмерных транскриптов (diamond-blastx против Swiss-Prot), а также анализом метрик для выравниваний прочтений на сборки транскриптомов (bwa-0.7.17) [11].

Данные позволяют утверждать, что полученные транскриптомы содержат 94% (C-1210), 99% (C-1509) и 98% (H-626) полноразмерных генов по базе данных BUSCO chlorophyta-odb10. Средняя длина транскрипта согласно rnaQUAST была равна 2234 (C-1210), 1986 (C-1509) и 2574 (H-626) п.н. Сборки содержали значительные количества хорошо охарактеризованных белков из базы данных Swiss-Prot. Так, количество 100%-покрытых по длине (и > 50%-покрытых) транскриптов, обнаруженных выравниванием с помощью алгоритма blastx белков Swiss-Prot, соответствовало 2234 (6314) для C-1210, 1986 (4673) для C-1509 и 2574 (7045) для H-626. Полученные транскриптомы позволяли выровнять на их последовательности до 95-97% всех прочтений, использованных для сборок.

Несмотря на то, что схема эксперимента не предполагает проведения полноценного анализа дифференциально экспрессирующихся генов, мы можем «очертить круг» кандидатов в таковые. Анализ с помощью GFOLD (v. 1.1.4) [12] и blast2go выявил наборы дифференциально экспрессирующихся генов, состав которых свидетельствовал об изменениях в процессах трансляции, связывания белков, метаболизма сахаров, фотосинтеза и дыхания, организации клеточных органелл: хлоропластов, митохондрий и эндомембран; а также белков стрессового ответа.

Работа проведена при поддержке РНФ, грант № 20-14-00280.

**Список литературы:**

1. Pick U., Avidan O., Triacylglycerol is produced from starch and polar lipids in the green alga Dunaliella tertiolecta, Journal of Experimental Botany, 2017, 68: 4939–4950. https://doi.org/10.1093/jxb/erx280

2. https://doi.org/10.5281/zenodo.5127899

3. Bushmanova E., Antipov D., Lapidus A., Prjibelski A.D. rnaSPAdes: a *de novo* transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data, GigaScience, 2019, 8: giz100. https://doi.org/10.1093/gigascience/giz100

4. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. Nat Biotechnol., 2011, 29:644-52. https://doi.org/10.1038/nbt.1883

5. Robertson, G., Schein, J., Chiu, R. et al. De novo assembly and analysis of RNA-seq data. Nat Methods, 2010, 7: 909–912. https://doi.org/10.1038/nmeth.1517

6. Liu, J., Yu, T., Mu, Z. *et al.* TransLiG: a de novo transcriptome assembler that uses line graph iteration. Genome Biol., 2019, 20: 81. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1690-7

7. Gilbert D. Gene-omes built from mRNA seq not genome DNA. 7th annual arthropod genomics symposium. Notre Dame. 2013. https://doi.org/10.7490/f1000research.1112594.1

8. Manni M., Berkeley M.R., Seppey M., Simão F.A., Zdobnov E.M. BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38: 4647–4654. https://doi.org/10.1093/molbev/msab199

9. Bushmanova E., Antipov D., Lapidus A., Suvorov V., Prjibelski, A.D. rnaQUAST: a quality assessment tool for de novo transcriptome assemblies. Bioinformatics, 2016, 32:2210-2. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw218

10. Buchfink B., Reuter K., Drost H.G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND, Nat Methods, 2021, 18: 366–368. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x

11. Li H. and Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. Bioinformatics, 2009, 25:1754-60. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324

12. Feng J, Meyer CA, Wang Q, Liu JS, Liu XS, Zhang Y. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. Bioinformatics, 2012

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ К ИССЛЕДОВАНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К СТРЕССУ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

**Галиева А.Г.[1], Кононов В.А.[2], Самарина Л.С.[3], Орлов Ю.Л.[1,2,3]**

***1 – Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск 630090; E-mail: ayya_galieva@mail.ru***
***2 – Аграрно-Технологический Институт, Российский Университет Дружбы Народов (РУДН), Москва, 117198; E-mail: kononov@mail.ru***
***3 – Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук», г.Сочи 354002; E-mail: q11111w2006@ya.ru***

Фундаментальная проблема исследования устойчивости растений к внешнему стрессу, вызванному в том числе патогенами, на молекулярном уровне требует применения новых междисциплинарных методов, основанных на биоинформационных подходах, анализе данных секвенирования, что в свою очередь предполагает разработку специализированных компьютерных инструментов. В данной работе мы рассматриваем несколько направлений разработки компьютерных программ моделирования генных сетей растений по данным высокопроизводительного геномного секвенирования, в том числе секвенирования патогенов растений (метагеном), создание электронных ресурсов биоинформатики растений, исследование структуры генома и эволюции модельных растений в плане ответа на стрессовые воздействия окружающей среды для решения агробиотехнологических задач.

Геномные и транскриптомные данные растений, касающиеся объема, сложности структуры, распределенности по несвязанным международным базам данных представляют собой Большие Данные, а биоинформационные методы их обработки, поиска селекционных маркеров относятся к машинному обучению (Chen et al., 2017).

Применение новых подходов направлены на анализ сетевых взаимодействий (генных сетей), связывающих как гены и метаболиты растения, так и гены микробиома растений. Практические применения этих подходов в мировой практике уже включают исследования культур чая, цитрусовых, и зерновых культур, активно ведутся биоинформационные исследования генома картофеля. В частности, существенные заделы созданы в исследовании генов чайного растения *Camellia sinensis*, ответа растений на холодовой стресс, моделях развития и эволюции арабидопсиса, исследовании антисенс транскриптов в геномах растений.

Подходы машинного обучения основаны на методах биоинформатики, включающих обработку больших геномных и транскриптомных данных о последовательностях ДНК и их патогенов в комбинации с предсказанием фенотипа (устойчивости к патогену). Для анализа структуры генома растений, поиска геномных маркеров применяются программы анализа данных высокопроизводительного секвенирования (определения сайтов связывания транскрипционных факторов по технологиям ChIP-seq и ChIA-PET) (Orlov et al., 2020).

Методически для фильтрации и препроцессинга данных секвенирования используются ранее разработанные алгоритмы оценки сложности и энтропии последовательностей ДНК, в том числе для выделения специфических районов патогенных вирусов растений (Naumenko et al., 2018).

Для моделирования генных сетей – комплексов взаимодействующих макромолекул в клетке растения – применяется сетевой подход, инструменты STRING-DB, KEGG Pathways. Для оценки физиологического состояния клетки растения используются методы системного моделирования (потока вещества в клетке). Применения новых подходов к анализу эволюции и физиологии модельного растения арабидопсиса представлены в работах (Zakhartsev et al., 2016; Wang et al., 2021).

В качестве источника данных в разработке новых методов можно отметить ресурсы GEO NCBI, KEGG, Пекинского геномного института (BIG), и оригинальные данные, полученные в коллаборации с сотрудниками РУДН.

Результаты компьютерного анализа становятся основой научных публикаций по моделям стресс-устойчивости растений. Научный задел исследований основан на имеющихся в РУДН компьютерных инструментах геномного анализа. Разработаны программы анализа данных геномного секвенирования по технологии ChIP-seq (исследование связывания транскрипционных факторов) (Subkhankulova et al., 2021). Имеющиеся данные по составу микробиома растения (корни, листья, микробиом почвы) и функционального состояния позволяют применить технологии Машинного Обучения, Искусственного Интеллекта для оценки физиологического состояния модельного растения.

**Список литературы:**

1. Chen M., Harrison A., Shanahan H., Orlov Y. Biological Big Bytes: Integrative Analysis of Large Biological Datasets. J Integr Bioinform. 2017. 14(3):20170052. DOI https://doi.org/10.1515/jib-2017-0052

2. Naumenko F.M., Abnizova I.I., Beka N., Genaev M.A., Orlov Y.L. Novel read density distribution score shows possible aligner artefacts, when mapping a single chromosome. BMC Genomics. 2018. 19(Suppl 3):92. DOI https://doi.org/10.1186/s12864-018-4475-6

3. Orlov Y.L., Bragin A.O., Babenko R.O., Dresvyannikova A.E., Kovalev S.S., Shaderkin I.A., Orlova N.G., Naumenko F.M. Integrated Computer Analysis of Genomic Sequencing Data Based on ICGenomics Tool. In: Advances in Intelligent Systems, Computer Science and Digital Economics. Z. Hu et al. (Eds.): CSDEIS 2019, AISC 1127, International Journal of Intelligent Systems and Applications (IJISA) 2020. pp. 154–164. DOI https://doi.org/10.1007/978-3-030-39216-1_15

4. Subkhankulova T., Naumenko F., Tolmachov O.E., Orlov Y.L. Novel ChIP-seq simulating program with superior versatility: isChIP. Briefings in Bioinformatics. 2021. 22(1): bbaa352. DOI https://doi.org/10.1093/bib/bbaa352

5. Wang J., Orlov Y.L., Li X., Zhou Y., Liu Y., Yuan C., Chen M. In situ dissecting the evolution of gene duplication with different histone modification patterns based on high-throughput data analysis in Arabidopsis thaliana. PeerJ 2021. 9:e10426 DOI https://doi.org/10.7717/peerj.10426

6. Zakhartsev M., Medvedeva I., Orlov Y., Akberdin I., Krebs O., Schulze W.X. Metabolic model of central carbon and energy metabolisms of growing Arabidopsis thaliana in relation to sucrose translocation. BMC Plant Biology. 2016. 16:262. DOI https://doi.org/10.1186/s12870-016-0868-3

# ПРОВЕДЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ФРАГМЕНТА ГЕНА GE ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА

**Коротин А.В., Сазонова Ю.В.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», ул. Академика Бакулова, стр. 1, пос. Вольгинский, Владимирская обл., 601125 E-mail:soff.minkoff@gmail.com***

Болезнь Ауески - это заболевание, которое оказывает значительное влияние на свиноводческую отрасль. Это заболевание вызвано Suid Herpesvirus 1 (SuHV-1), который является двухцепочечным ДНК-вирусом, который принадлежит к семейству *Herpesviridae* и подсемейству *Alphaherpesvirinae* и демонстрирует медленные темпы генетической эволюции. Филогенетические деревья вариабельного гликопротеина (gE) (US8), компонента оболочки вириона, мембранного белка типа I, широко используются в исследованиях для классификации вируса болезни Ауески.

Была поставлена цель определения филогенетических отношений нуклеотидных последовательностей анализируемых изолятов вируса болезни Ауески.

Выделение ДНК проводили с использованием набора. «DNeasy blood and tissue kit» (Qiagen, Germany), согласно инструкции производителя. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием олигонуклеотидных праймеров и зонда, комплементарных последовательности гена gB вируса болезни Ауески.

ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием олигонуклеотидных праймеров и зонда, комплементарных последовательности гена gB вируса болезни Ауески.

ПЦР для амплификации целевых фрагментов гена gE проводили с использованием специфических праймеров, комплементарных данной области гена.

Детекцию и подтверждение молекулярной массы ПЦР продуктов проводили в 1,5%-ом ТАЕ агарозном геле, с содержанием бромида этидия 0,01%.

Очистка вырезанных из геля ПЦР-продуктов производилась с помощью коммерческого набора «Cleanup – standard» (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

Нуклеотидное секвенирование проводили при помощи генетического анализатора ABI 3130 (Applied Biosystems, США) и набора терминаторов цепи BigDye v.3.1 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводилось с использованием программного обеспечения BioEdit.

Для секвенирования и дальнейшего анализа были выбраны фрагменты генома вируса болезни Ауески соответствующие С-концевой области гена gE. Нами был проведен биоинформатический анализ С-концевого фрагмента гена gE с целью определения филогенетических отношений и гомологии нуклеотидных последовательностей анализируемых изолятов вируса болезни Ауески ранее не охарактеризованных штаммов «АС 21/07», «ГНКИ», «Германия», «Флавия», «Buj», полученных из ГК ФГБНУ ФИЦВиМ. При исследовании образцов биологического материала методом ПЦР в режиме реального времени в образцах «АС 21/07», «ГНКИ», «Германия», «Флавия» был обнаружен геном вируса болезни Ауески. Для филогенетического анализа, исследуемые последовательности ДНК анализировали с известными последовательностями гена gE, представленными в базе данных GenBank. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводилось с

использованием программного обеспечения BioEdit. С помощью програмного обеспечения MEGA-X была построена филогенетическая дендрограмма, на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена gE с использованием метода минимальной эволюции (бутстреп-значения были рассчитаны для 500 повторов) отражающая филогенетические взаимоотношения между штаммами/изолятами вируса болезни Ауески с целью уточнения принадлежности анализируемых образцов к определенной геногруппе (генотипу, генетическому кластеру). На основании сравнительного анализа данных последовательностей с представленными в базе данных GenBank последовательностями штаммов вируса болезни Ауески, выделенными в странах Европы и Азии было продемонстрировано, что анализируемые образцы относятся к генетическому кластеру 1, объединяющему Европейские штаммы/изоляты. В генетическм кластере 2 включающим в себя штаммы/изоляты, выделенные в странах Азии не оказался ни один из образцов.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что исследуемые изоляты относятся к генетической группе, объединяющей европейский штаммы и изоляты.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 20-76-10030).

**Список литературы:**

1. Minson, A. C., A. J. Davison, R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, D. J. McGeoch, P. E.

Pellett, B. Roizman, and D. M. J. Studdert. 2000 Herpesviridae, p. 203–255. In M. H. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (ed.), Virus taxonomy. Academic Press, New York, N.Y

2. H. Nauwynck, S. Glorieux, H. Favoreel, and M. Pensaert, “Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract,” Veterinary Research, vol. 38, no. 2, pp. 229–241, 2007

3. T. C. Mettenleiter, “Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-state of the art, June 1999,” Veterinary Research, vol. 31, no. 1, pp. 99– 115, 2000

4. B. G. Klupp, C. J. Hengartner, T. C. Mettenleiter, and L. W. Enquist, “Complete annotated sequence of the pseudorabies virus genome,” Journal of Virology, vol. 78, no. 1, pp. 424–440, 2004

## ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ КОНТУРОВ И КЛАСТЕРОВ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ГЕНОМАХ РАСТЕНИЙ ПО ДАННЫМ CHIP-SEQ

**Дергилев А.И.[1], Добровольская О.Б.[2], Орлова Н.Г.[3,4], Орлов Ю.Л.[1,2]**

***1 – Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск 630090; arturd1993@yandex.ru***

***2 – Аграрно-Технологический Институт, Российский Университет Дружбы Народов (РУДН), Москва, 117198; oxana-d@yandex.ru***

***3 – Московский государственный технический университет гражданской авиации» (МГТУ ГА), Москва, 125993***

***4 – Финансовый Университет при Правительстве Российской Федерации, Москва, 125993; ngorlova@fa.ru***

С развитием технологий высокопроизводительного геномного секвенирования, в том числе иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием ChIP-seq, появляется возможность исследовать сайты связывания транскрипционных факторов в

масштабе генома для многих модельных организмов, включая растения, имеющие биотехнологическое значение. Объёмы данных об экспериментально определенных сайтах связывания продолжают расти, и это приводит к появлению всё новых и новых качественных задач биоинформатики, среди которых: определение параметров регуляции экспрессии генов транскрипционными факторами, определение генов-мишеней и реконструкции регуляторных генных сетей в модельных организмах и т.д. Актуальной задачей становится разработка новых инструментов анализа сайтов связывания транскрипционных факторов, их взаимного расположения в последовательностях ДНК, кластеризации в геноме, включающих в себя такие возможности, как визуализация, получение статистических оценок вероятности возникновения таких кластеров.

Ранее было обнаружено и показано, что некоторые кластеры сайтов связывания транскрипционных факторов, определённые по данным ChIP-seq в геномах млекопитающих, в частности в эмбриональных стволовых клетках, имеют тенденцию встречаться не случайно. Такие кластеры сайтов соответствуют регуляторным районам генов и могут быть использованы для предсказания промоторов и энхансеров, функциональной аннотации генов-мишеней транскрипционных факторов. На данный момент геномы растений – недостаточно изученный с помощью технологий ChIP-seq объект исследования, хотя эти геномы обладают сложными механизмами транскрипционной регуляции экспрессии генов и ответа на внешние стрессовые воздействия, опосредованного транскрипционными факторами. Данная работа представляет новый программный инструмент и его применение для анализа сайтов связывания транскрипционных факторов в нескольких эволюционно удаленных модельных организмах растений (Dergilev et al., 2021).

Одно из важнейших направлений в биоинформатике – изучение регуляции транскрипции на основе наиболее полных геномных данных. Активно продолжается рост объемов данных об экспрессии генов и сайтах связывания, полученных с помощью технологий секвенирования ChIP-seq, BS-seq, DNaseI-seq, ATAC-seq, NOMe-seq, RNA-seq и др. Благодаря такому росту объёмов данных об экспериментально определенных сайтах связывания появляется возможность ставить качественно новые задачи определения параметров регуляции экспрессии генов, определения генов-мишеней транскрипционных факторов и реконструкции регуляторных генных сетей (Chen et al., 2017). На данный момент имеющиеся технологии определения сайтов, среди которых метод ChIP-seq, позволяют экспериментально определить все сайты связывания заданного транскрипционного фактора в геноме. Появляются новые задачи определения совместного расположения сайтов различных транскрипционных белковых факторов. Существуют кооперативные эффекты регуляции при одновременном связывании с ДНК различных транскрипционных факторов в белковых комплексах. Следовательно, требуется развитие программ и методов анализа данных секвенирования для обработки данных, оценки кооперативных эффектов связывания транскрипционных факторов.

Совместное расположение сайтов связывания двух и более факторов в промоторном районе гена свидетельствует о совместной регуляции экспрессии, которая может быть взаимной: два фактора связываются в промоторных районах генов друг друга и взаимно регулируют экспрессию друг друга. Кроме того, по набору расположений сайтов связывания возможно провести реконструкцию и анализ ассоциативных генных сетей, которые в свою очередь могут иметь достаточно сложную структуру. Известны примеры взаимной регуляции транскрипционных нескольких факторов. В общем случае задача совместной регуляции недостаточно изучена. Такие исследования для геномов растений представлены в отдельных базах работах (Zakhartsev et al., 2016).

Нами были использованы пики ChIP-seq для исследования ниши стволовых клеток трёх растений - *Arabidopsis thaliana, Physcomitrella patens, Chlamydomonas reinhardtii*. Данные в виде BED файлов были загружены из баз данных:

NCBI (https:www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE24568),

PlantTFDB (http:planttfdb.cbi.pku.edu.cn/index.php?sp=Ath),
PlantRegMap (http:plantregmap.cbi.pku.edu.cn/binding_site_prediction.php).

Были использованы координаты пиков геномных профилей связывания 28 транскрипционных факторов для *Arabidopsis thaliana* (цветковое растение), 18 факторов для *Physcomitrella patens* (мхи) и 8 факторов для *Chlamydomonas reinhardtii* (зелёные водоросли). Представлены результаты использования компьютерных скриптов для анализа данных ChIP-seq, расчета кластеров и их визуализации в форме тепловых карт.

Разработан набор скриптов на языке Python для компьютерного анализа кластеров сайтов связывания транскрипционных факторов. Графическая оболочка данного инструмента реализована в кроссплатформенном программном обеспечении Qt5. Для полноценного использования программы требуется дополнительное программное обеспечение: установленный интерпретатор языка Python версии не ниже 3.5, среда программирования R версии не ниже 3.4.1, Git Bash (для Windows).

Продемонстрировано существование неслучайных кластеров сайтов связывания во всех исследованных геномах растений, детально рассмотрены кластеры в геноме *Arabidopsis thaliana*. Выдвигается гипотеза об общем характере распределения кластеров сайтов связывания в геноме по числу различных транскрипционных факторов, определяющихся структурой регуляторной генной сети. Предложен метод поиска регуляторных районов на основе статистики распределения сайтов связывания в геномах растений.

Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

**Список литературы:**

1. Chen M., Harrison A., Shanahan H., Orlov Y. Biological Big Bytes: Integrative Analysis of Large Biological Datasets. J Integr Bioinform. 2017. 14(3):20170052.

2. Dergilev A.I., Orlova N.G., Dobrovolskaya O.B., Orlov Y.L. Statistical estimates of multiple transcription factor binding in the model plant genomes based on ChIP-seq data. J Integr Bioinform. 2017. (In press)

3. Zakhartsev M., Medvedeva I., Orlov Y., Akberdin I., Krebs O., Schulze W.X. Metabolic model of central carbon and energy metabolisms of growing Arabidopsis thaliana in relation to sucrose translocation. BMC Plant Biology. 2016. 16:262.

## ПРИМЕНЕНИЕ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОИСКА СТРУКТУРНЫХ ВАРИАНТОВ В ГЕНОМЕ КАРТОФЕЛЯ

**Лиходеевский Г. А., Шанина Е. П., Стафеева М. А., Ахметханов В. Ф.**

***Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620061***
***E-mail: georglihodey@gmail.com***

Картофель (*Solanum tuberosum L.*) третья по распространённости растительная культура в мире. Многие направления работы по геномной оценке картофеля, проводятся с помощью маркер-ориентированной селекции (marker-assisted selection; MAS). На сегодняшний день существуют маркеры ассоциированные с широким спектром устойчивости к патогенам картофеля. Большая часть из них SCAR или STS и по наличию/отсутствию целевого продукта позволяют легко провести генотипирование. Однако, нуклеотидный состав как некоторых маркеров, так и некоторых регионов генома картофеля остаются неизвестными. По этой причине создание новых маркеров и дальнейшая генетическая селекция затруднены. Полногеномное секвенирование и поиск

структурных вариантов могут способствовать дальнейшему развитию молекулярно-генетических исследований культуры картофеля.

Относительно небольшой размер генома картофеля в 840 миллионов нуклеотидных пар позволяет проводить полное секвенирование генома с помощью технологии Oxford Nanopore для последующего определения структурных вариантов в геноме картофеля. Секвенирование сортов Аляска, Арго, и Шах позволило выявить более 24000 структурных вариантов от 4 до 100 нуклеотидных пар. Аляска запатентованный сорт с подтвержденной устойчивостью к возбудителю рака картофеля и золотистой картофельной цистообразующей нематоде; Арго и Шах новые перспективные сортообразцы, так же обладающие подтверждённой устойчивостью к вышеназванным патогенам. Анализ структурных вариантов показал, что наиболее распространены в геноме картофеля делеции. Большинство структурных вариантов лежат в некодирующих областях, включая интроны. Тем не менее, порядка 10 тысяч генов, секвенированных сортов, затронуты делециями или дупликациями. Некоторые гены, ответственные за устойчивость к абиотическим стрессам и патогенам были дублированы, в то время как гены клеточного цикла и несколько метаболических белков были удалены.

## АНАЛИЗ МОБИЛОМА РАСТЕНИЙ ПУТЁМ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК, ОБОГАЩЁННОЙ ВНЕХРОМОСОМНЫМИ КОЛЬЦЕВЫМИ МОЛЕКУЛАМИ

**Меркулов П.Ю., Киров И.В.**

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

Мобильные генетические элементы (МГЭ) занимают значительную часть геномов растений и животных и вносят большой вклад в их эволюцию и адаптацию. Способность МГЭ к транспозиции – перемещению и/или амплификации в геноме позволяет им формировать так называемый мобилом. По типу транспозиции МГЭ делятся на два больших класса: ДНК-транспозоны, перемещающиеся по геному по принципу «вырезать-вставить», и ретротранспозоны, использующие РНК посредник для транспозиции (принцип «копировать-вставить»). Среди МГЭ растительных геномов наиболее широко представлены элементы с длинными концевыми повторами - LTR-ретротранспозоны.

Ввиду наличия многостадийного жизненного цикла у ретротранспозонов, уровень транскрипции данных элементов не отражает их способность к транспозиции и, соответственно, вклада в мобилом клетки (Lanciano *et al.*, 2017). Тем не менее известно, что перед интеграцией в геном (последней стадией жизненного цикла) часть линейной кДНК ретротранспозонов может быть переведена системами репарации клетки в форму внехромосомной кольцевой ДНК (вкДНК) (Lanciano *et al.*, 2017). Детекция данных молекул является альтернативой полногеномному секвенированию для выявления активных элементов, обладающих возможностью к интеграции в геном. В нашем исследовании нами была проведена идентификация вкДНК для активных ретротранспозонов *Helianthus annuus* и тритикале *(× Triticosecale Wittmack)*.

Для аннотации LTR-ретротранспозонов в геномах обеих культур нами был проведён полногеномный анализ, одним из главных критериев для которого являлось наличие как минимум одного ретротранспозонного домена в отбираемых последовательностях. Дальнейшее выявление транскрипционно-активных LTR-ретротранспозонов проводили с помощью картирования RNA-seq данных из базы данных открытого доступа NCBI. Далее нами было проведено прямое секвенирование РНК с помощью технологии Oxford Nanopore. РНК для секвенирования выделяли из 7-дневных проростков подсолнечника и

зерновок тритикале на 10 день после цветения. Полученные прочтения были картированы на геномные последовательности обеих культур, что позволило выявить транскрипционные изоформы экспрессирующихся элементов. Нам удалось детектировать два полноразмерных LTR-ретротранспозона (элемент *Gagarin* – для *H. annuus* и *MIG* – для тритикале) с высоким уровнем экспрессии, наличием транскриптов, соответствующих геномной РНК, а также коротких транскрипционных изоформ shGAG, кодирующих открытую рамку считывания белка оболочки GAG. Наличие данных характеристик является основополагающим для осуществления ретротранспозонами своей транспозиции (Oberlin *et al.* 2017), поэтому нами была проведена оценка их потенциальной способности к интеграции в геном. Для этого выделенная геномная ДНК была подвергнута обработке Plasmid-Safe экзонуклеазой с последующей амплификацией по типу катящегося кольца. С полученной ДНК, обогащённой фракцией вкДНК была проведена инвертированная ПЦР. Как для элемента *Gagarin*, так и для *MIG* были получены ампликоны, свидетельствующие о формировании вкДНК, содержащих или две LTR-последовательности. Ранее подобные были получены в исследованиях элементов *EVD* и *ONSEN* у *A. thaliana*, транспозиционная активность которых была неоднократно продемонстрирована работами различных авторов (Lanciano *et al.*, 2017; Thieme *et al.*, 2017, ). Соответствие выявленных вкДНК линейной кДНК элемента *Gagarin* было подтверждено результатами Illumina-секвенирования ДНК, обогащённой фракцией вкДНК. Поиск различий в копийности данного элемента среди геномных последовательностей 13 сортов подсолнечника выявил значительную разницу в количестве копий элемента *Gagarin* в сравниваемых геномах, что может свидетельствовать о недавней транспозиционной активности данного ретротранспозона.

В результате проведённого нами исследования впервые было продемонстрирована возможность формирования вкДНК ретротранспозонами таких культур как подсолнечник и тритикале. Полученные данные позволяют предположить, что выявленные элементы *Gagarin* и *MIG* обладают потенциальной способностью к транспозиции. Реализованный нами комплексный подход по детекции активных ретротранспозонов и оценки возможности образования ими новых копий является альтернативой полногеномному секвенированию, которое трудно реализовать для растений с большим размером генома, в т.ч. для подсолнечника и тритикале.

**Список литературы:**

1. Lanciano, S. Sequencing the extrachromosomal circular mobilome reveals retrotransposon activity in plants / S. Lanciano, M.C. Carpentier, C. Llauro, E. Jobet, D. Robakowska-Hyzorek, E. Lasserre, A. Ghesquière, O. Panaud, M. Mirouze // PLoS Genet. – 2017. – Vol. 13. – Issue 2. – e1006630.

2. Thieme, M. Inhibition of RNA polymerase II allows controlled mobilisation of retrotransposons for plant breeding / M. Thieme, S. Lanciano, S. Balzergue, N. Daccord, M. Mirouze, E. Bucher // Genome Biol. – 2017. – Vol. 18. – Issue 134. – P. 1-10.

3. Oberlin, S. A genome-wide transcriptome and translatome analysis of Arabidopsis transposons identifies a unique and conserved genome expression strategy for Ty1/Copia retroelements / S. Oberlin, A. Sarazin, C. Chevalier, O, Voinnet, A. Marí-Ordóñez // Genome Res. – 2017. – Vol. 27. – Issue. 9. – P. 1549-1562.

# УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ GINOFIP – АЛГОРИТМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОПЕРОНОВ ИНТЕРЕСА

**Кучур П.Д.[1], Афонникова С.Д. [1], Комиссаров А.С.[1]**

***1 – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург 191002***
***E-mail: chesnokova@scamt-itmo.ru***

Бактериальные геномы – один из наиболее распространенных видов данных секвенирования. По этой причине они всё чаще становятся объектами исследований. Фокус внимания исследователей постепенно смещается с анализа одной геномной сборки на сравнительный анализ нескольких геномов. Проводить его на уровне всего генома всё ещё не целесообразно, однако можно сконцентрироваться на сопоставлении отдельных его структур.

Геном бактерий представлен оперонами – функциональными единицами, которые сочетают в себе несколько генов, контролирующих общий процесс. Например, всем известен классический вариант такой структуры – лактозный оперон. Но есть и более редкие варианты. Здесь мы представляем усовершенствованный алгоритм GINOFIP, который обнаруживает опероны О-антигена.

О-антиген выбран нами не случайно. Многие гены его синтеза уже известны, но, как показала практика, далеко не все. С помощью оперонного подхода удалось выявить ранее не известные гены, которые связаны с биосинтезом этого полисахарида. Несмотря на заточенность под обнаружение О-антигенов, технически алгоритм может быть применим к поиску любых оперонных структур. Поиск ведется по генам интереса.

Первоначально алгоритм состоял из шести этапов: оценки качества данных, опционального этапа пересборки генома (для повышения качества), его аннотации, выделении и верификации границ оперонов, определения и визуализации оперонов интереса. В новой версии мы добавили этап построения филогенетического древа и возможность поиска мотивов в «брешах» между генами в оперонах. Под «брешами» подразумевается разрыв между двумя кодирующими областями, который может возникнуть при перестройках внутри оперонов (например, при делециях и инсерциях). Этап филогении позволит оценить эволюцию объекта исследования: как его генный состав изменялся у разных организмов, и какие изменения он может претерпеть в дальнейшем. Этап поиска мотивов откроет дополнительные возможности к пониманию механизмов регуляции транскрипции объекта интереса.

Новый алгоритм уже опробован на представителях семейства Morganellaceae (*Providencia sps.*) в проекте, реализованном совместно с коллегами из Института Биоинформатики [1]. На текущий момент планируется автоматизация этого алгоритма с помощью системы управления рабочими процессами Snakemake.

**Список литературы:**

1. Churkina A., Rybina A., Kuchur P., Komissarov A. Identification and comparison of somatic antigen structures of symbiotic and pathogenic bacteria from Morganellaceae family. 2021. 1:50. ISBN: 978-5-7422-7387-5

# ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФОСФОРИТНОЙ МУКИ РАСТЕНИЯМИ ПШЕНИЦЫ ТВЕРДОЙ И РЖИ С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ ЦИФРОВОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ

**Баженов М.С.**

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

Достаточное фосфорное питание важно для получения высоких урожаев сельскохозяйственных культур. Фосфоритная мука является самым дешевым фосфорным удобрением, производство и применение которого создает наименьшую угрозу для окружающей среды [1]. Однако известно, что растения пшеницы обладают плохой способностью усваивать фосфор из труднодоступных форм, а гены короткостебельности, вероятно, еще больше снижают эту способность [2]. В настоящее время в экспериментальном растениеводстве, селекции и генетике растений всё больше внедряются технологии высокопроизводительного цифрового фенотипирования с использованием мультиспектральных датчиков и сканеров [3]. Целью данной работы было проведение тестирования системы цифрового фенотипирования TraitFinder (Phenospex, Нидерланды), состоящей из двух мультиспектральных 3D-сканеров PlantEye, на примере небольшого вегетационного эксперимента, направленного на изучение способности зерновых культур усваивать фосфор из труднорастворимых соединений.

Мы провели вегетационный эксперимент, используя высокорослую яровую линию пшеницы твердой (*Triticum durum* Desf.) LD222, её почти изогенную полукарликовую линию, несущую ген короткостебельности *Rht17* (*Reduced height 17*) [4], и озимую рожь (*Secale cereale* L.) сорта Чулпан. Единичные растения выращивали в кварцевом песке в пластиковых горшках объемом 770 см$^3$ в климатической камере при температуре 22°C днем, 18°C ночью и 16-часовом фотопериоде. Плотность фотонного потока при включенном освещении – 110 мкМ/м$^2$с. Питательные вещества растения получали в растворимой форме в виде раствора Хогланда №1 [5] с добавлением растворимых фосфатов или без них. Источником фосфора в первом варианте опыта выступала фосфоритная мука (2 г на горшок), смешанного с песком по всему объему, во втором – раствор фосфорнокислого калия однозамещенного (нормальное питание в соответствии с рецептурой среды). В третьем варианте фосфор не добавлялся (без фосфора). Эксперимент был проведен в 6-кратной повторности. Во время роста растения оценивали с помощью цифровой системы фенотипирования TraitFinder по стандартному набору структурных и физиологических параметров. Через 27 дней после начала опыта вегетирующие растения были срезаны, площадь листьев измерена с помощью планшетного сканера и программы ImageJ, надземная часть растений высушена и определена её масса в воздушно-сухом состоянии. Данные опыта обработаны с помощью дисперсионного и корреляционного анализов.

Результаты опыта показали, что присутствие в среде фосфоритной муки повышает сухую биомассу и площадь листьев растений для всех генотипов эксперимента в сравнении с вариантом отсутствия источника фосфора. Однако эти же показатели растений, в варианте с применением растворимого фосфата калия существенно выше. Только лишь в варианте питания с растворимым фосфатом, высокорослая линия LD222 дала значимо большую надземную биомассу, чем её полукарликовая изогенная линия и рожь Чулпан. Это может говорить о лучшей эффективности использования фосфора высокорослыми линиями пшеницы в условиях хорошей доступности этого элемента в почве. В варианте с

фосфоритной мукой по биомассе незначительно, а по площади листьев существенно опережала другие генотипы озимая рожь. Это может говорить о лучшей способности ржи усваивать фосфор из труднодоступных форм, что может быть связано с большей мощностью её корневой системы и большей густотой корневых волосков, что наблюдалось при отмывании корней растений. Нормализованный цифровой индекс вегетации (NDVI), определенный с помощью TraitFinder, показал, что рожь хуже других генотипов в данном эксперименте переносит полное отсутствие фосфора в питательном субстрате.

Показатели площади листьев и цифровой биомассы, определенные с помощью системы цифрового фенотипирования, были значимо и сильно статистически связаны с результатами традиционных измерений (r>0,94), что говорит в пользу применения данной системы для отслеживания динамики этих и других параметров растений. Однако коэффициент регрессии для площади листьев (мм$^2$) составил 7,5, а для сухой биомассы (г) и цифровой биомассы в (мм$^3$) — $1*10^{-6}$. Таким образом, для определения реальных величин параметров растений с помощью системы TraitFinder требуется проведение «калибровки» с использованием традиционных средств и методов измерения.

**Список литературы:**


1. Энхтуяа Б., Убугунов Л.Л., Меркушева М.Г. Влияние разных форм фосфорита на урожайность и качество зерна яровой пшеницы на каштановой почве северной Монголии. *Агрохимия,* 2014. 5:47–53.
2. McGrail R.K., Sanford D.A.V., McNear D.H. Semi-dwarf winter wheat roots contain less organic acids than wild type varieties under phosphorus stress. *Crop Science*, 2021. 61:3586–3597. DOI 10.1002/csc2.20470
3. Zhao, C.; Zhang, Y.; Du, J.; Guo, X.; Wen, W.; Gu, S.; Wang, J.; Fan, J. Crop phenomics: current status and perspectives. Frontiers in Plant Science, 2019. 10:714 DOI 10.3389/fpls.2019.00714
4. Bazhenov M.S., Divashuk M.G., Amagai Y., Watanabe N., Karlov G.I. Isolation of the dwarfing *Rht-B1p* (*Rht17*) gene from wheat and the development of an allele-specific PCR marker. Molecular Breeding, 2015. 35:213. DOI 10.1007/s11032-015-0407-1
5. Hoagland D.R., Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif.: College of Agriculture, University of California, 1950. Available online: https://archive.org/details/watercultureme3450hoag/page/n29/mode/2up (03.10.2021).


## СООТНОШЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ГЕНА *E183L* ВИРУСА АЧС С КЛАССИФИКАЦИЕЙ ИЗОЛЯТОВ ПО СЕРОГРУППАМ


**Минкова С.И., Кольцов А.Ю., Холод Н.С., Кольцова Г.С.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», ул. Академика Бакулова, стр. 1, пос. Вольгинский, Владимирская обл., 601125 E-mail:soff.minkoff@gmail.com***


Африканская чума свиней (АЧС) – это высококонтагиозное вирусное заболевание диких и домашних свиней. К 2021 г. только в Российской Федерации зарегистрировано более 1500 эпизоотических вспышек. В настоящее время АЧС остаётся острой проблемой для сельского хозяйства, так как отсутствуют эффективные методы профилактики и лечения.

Возбудитель АЧС – ДНК-содержащий вирус, семейства *Asfarviridae*. Центральная область генома вируса относительно консервативна и в основном кодирует структурные белки, например, p72, продукт гена B646L. Это основной белок вирусного капсида, он также необходим для проникновения вируса в клетку хозяина. Несмотря на общую структурную идентичность белка p72, у разных изолятов имеются вариации в

последовательности его гена (B646L), а филогенетический анализ позволил провести распределение изолятов на группы. Полученные данные легли в основу классификации изолятов по генотипу, согласно которой выделяют 22 генотипа вируса АЧС [1]. Но с каждым годом увеличивается количество изолятов и возрастает неоднородность уже существующих генотипов. Чтобы разделить многочисленные изоляты внутри одной группы требуется анализ дополнительных генов. Исследователи обратили внимание на концевые области генома вирус АЧС. В этих участках отмечены вариации длины генов, которые использовали для увеличения разрешения классификации.

Одним из примеров вариабельных генов вируса АЧС является E183L. Продукт этого гена, белок p54, участвует в морфогенезе вириона, рекрутируя и трансформируя мембраны ЭПР хозяина в предшественников вирусной оболочки [2]. Филогенетический анализ изолятов по гену E183L используется в дополнение к классификации по генотипам изолятов вируса АЧС [3].

Генотипирование помогает отслеживать географическое распространение вируса, но не отражает биологических свойств изолятов. Поэтому, на основе уже функциональных исследований вируса в реакциях задержки гемагглютинации специфическими сыворотками и в иммунобиологических пробах на свиньях, было предложено разделение изолятов на серотипы. Изоляты вируса АЧС разделены на 8 серогрупп [4]. Однако экспериментальное серотипирование требует участия животных и значительных экономических затрат. Во избежание этических проблем и экономических издержек начался поиск маркерных генов, позволяющих прогнозировать серотипы *in silico*. Было предложено использовать данные филогенетического анализа последовательности CD2 и лектина, которые коррелируют с серологическими исследованиями [5].

Экспериментально подтвержденных данных по серотипам известно мало, есть группа изолятов, которые пока не удалось отнести ни к одному известному серотипу. Поэтому ведётся изучение других белков, потенциально применимых для классификации по биологическим свойствам. Поскольку p54 вариабелен и уже используется в классификации по генотипам, мы провели сравнительный анализ последовательности его гена, E183L, изолятов вируса АЧС разных серотипов.

Из базы данных GENBANK выбраны последовательности гена E183L 19 изолятов вируса АЧС, принадлежащих к разным серотипам. Кроме того, методом нуклеотидного секвенирования определены последовательности гена E183L вируса АЧС 6 изолятов из коллекции нашего института, которые ранее не анализировали. Затем, в программе UGENE было проведено множественное выравнивание нуклеотидных (алгоритмы MUSCLE, T-Coffee) и аминокислотных последовательностей (алгоритмы ClustalO и Kalign). В программе MEGA-X получено несколько вариантов филогенетических деревьев. Помимо анализа целого гена, использовали последовательность его наиболее вариабельной части.

Результаты филогенетического анализа нуклеотидной последовательности полного гена показали, что изоляты 4, 6-8 серотипов распределяются в отдельные группы. Отмечено сходство полученных филогенетических групп на основе последовательности гена E183L с имеющимися данными о серотипах по CD2v и лектину. Использование филогенетического анализа на основе аминокислотной последовательности привело к снижению эффективности распределения и ограничило возможность различия этих серотипов друг от друга.

Далее был проведён отдельный анализ вариабельного участка гена E183L, последовательность которого начинается с 300 нуклеотида до конца гена. В результате такого подхода дополнительно распределились по группам изоляты 1 и 3 серотипов. В распределении по аминокислотной последовательности вариабельного участка p54 также снизило эффективность разделения и несколько изолятов разных серотипов объединились в одну группу.

Наиболее чёткая зависимость филогенетического распределения и данных серологических исследований наблюдалась при анализе нуклеотидной последовательности

вариабельного участка гена E183L. Эту зависимость можно использовать, для дополнения классификации серотипов вируса АЧС *in silico,* но необходимо продолжение анализа с большим количеством изолятов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 20-76-10030).

**Список литературы:**

1. Bastos AD, Penrith ML, Crucière C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann E, R Thomson G. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. Arch Virol. 2003 Apr; 148(4):693-706. https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8.

2. Rodríguez JM, García-Escudero R, Salas ML, Andrés G. African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. J Virol. 2004; 78(8):4299-1313. doi:10.1128/jvi.78.8.4299-4313.2004.

3. Gallardo C, Mwaengo DM, Macharia JM, et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. Virus Genes. 2009; 38(1):85-95. doi:10.1007/s11262-008-0293-2.

4. Сероиммунологическая классификация природных изолятов вируса африканской чумы свиней. И.Ф. Вишняков, Н.И. Митин, Ю.И. Петров // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: Материалы научно-практической конференции ВНИИВВиМ. - Покров. - 1995. С. 141-143.

5. Malogolovkin A, Burmakina G, Tulman ER, et al. African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity. J Gen Virol. 2015; 96(Pt 4):866-873. doi:10.1099/jgv.0.000024.

## ПРОЕКТИРОВАНИЕ НАТУРНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ В ПРОГРАМНО-АППАРАТНОМ КОМПЛЕКСЕ СИНЕРГОТРОН

**Булатов А.П.[1], Латушкин В.В.[1], Давыдова Н.В.[2], Верник П.А.[1]**

***1 – АНО «Институт стратегий развития», 107031, Россия, г. Москва, ул. Петровка, д. 15/13, стр. 5., Email:*** *center@isd.center.*
***2 –ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Немчиновка»», 143026, Московская область, Одинцовский район, пос. Новоивановское, ул. Агрохимиков, дом 6, Email:*** *mosniish@yandex.ru.*

На сегодняшний день селекция новых сортов с учетом районирования очень длительный процесс, который, может занимать десяток лет и больше для получения конкретного сорта [1]. Это в первую очередь обусловлено нестабильностью погодных условий как в рамках одного сезона, так и несовпадения условий между условиями вегетации разных лет. На сегодняшний день задача тестирования сорта в закрытых системах, в условиях разных областей по статистическим данным нескольких лет, не решена полностью.

Решение такой задачи позволило бы построить прогностическую модель связи эмерджентных признаков биологической системы и внешних факторов среды [2]. Это позволит не только сократить срок селекции нового сорта с учетом районирования, но и улучшить прогнозируемость урожайности сорта с известными условиями среды.

На данный момент существует небольшой объем данных, доступный для использования и касающийся развития растений в закрытых системах. По этим данным невозможно качественно выстроить корреляционные связи конкретных эмерджентных свойств биологической системы, группы растений одного вида различных по генотипу, и различных факторов окружающей их среды для оценки влияния и качественной работы предсказывающих моделей.

В качестве модельного объекта была выбрана яровая мягкая пшеница, так как она является стратегически важной культурой с точки зрения продовольственной безопасности. Семена сортов «Злата» и «Эстер» были предоставлены лабораторией селекции и первичного семеноводства яровой пшеницы ФИЦ «Немчиновка». Для решения задачи ускоренной селекции по результатам натурного моделирования с использованием программно-аппаратного комплекса Синерготорон [3] модели 2 была проведена серия экспериментов натурного моделирования в закрытой системе с использованием набора данных из открытой модельной системы – полевого эксперимента.

**Материалы и методы исследования**

В лоток, имеющий габариты (LxWxH) 1000x540x150 мм, помещают жесткую металлическую дренажную сетку по всей площади лотка. Поверх укладывается минераловатный субстрат толщиной 35 мм, поверх которого насыпается слой промытого кокосового волокна (pH 7). Данный составной субстрат пропитывается до полного его увлажнения питательным раствором в концентрации 1:10 и оставляется на два – четыре часа для полного удаления гравитационным способом избытка влаги через дренажное отверстие лотка.

Состав питательного раствора – по рекомендации фирмы «Rijk Zwaan» (Нидерланды) (в мг/л): $N\text{-}NH_4$ – 5; $N\text{-}NO_3$ -140, P – 41; K – 275; Ca – 100; Mg – 24; S – 30; Fe - 0,94; Mn - 0,14; B - 0,16; Cu - 0,03; Zn - 0,13; Mo - 0,03; pH 5,5-6,0.

В подготовленный субстрат высаживают сухие семена пшеницы на глубину 35 – 40 мм, после чего верхний слой субстрата незначительно уплотняют. Семена высеивают в 4 ряда с общей густотой 400 шт./м$^2$, т.е примерно один ряд 40 шт. через 25 мм. В один лоток высеивают подряд два ряда одного сорта и другие два ряда другого сорта. Четыре повторности, (т.е. четыре лотка) с учетом рандомизации сортов при посадке в каждой повторности, помещают в закрытую систему на весь срок выращивания и извлекают кратковременно лишь для отбора проб в обозначенные ключевые точки согласно плану эксперимента. Серия экспериментов – три повторности.

Контрольным образом для сравнения выступают в данном случае аналогичные растения, высаженные в поле ФИЦ «Немчиновка» 11.05.2021 г.

Данные температуры воздуха, относительной влажности воздуха, объеме осадков на время сопоставимых наблюдений были предоставлены метеостанцией в с.Немчиновка. Начальная дата – посев семян. Полив в закрытой системе осуществляли указанным питательным раствором в концентрации 1:10. Относительную влажность субстрата поддерживали гравиметрическим методом используя встроенные тензодатчики.

Программно управляемая освещенность лотков представлена по упрощенной схеме: плавное нарастание с 5:30 до 6:00 и плавное убывание интенсивности с 22:00 до 22:30 ежедневно. Светодиодный светильник в устройстве собственной разработки. Среднее значение освещенности было установлено для данного эксперимента 500 мкмоль/м$^2$*с или примерно 28261 lx на поверхности субстрата.

**Результаты и их обсуждение**

Натурный эксперимент проводили в 2021 году. В период с 11 мая до 22 августа проходил полевой эксперимент с отбором проб в ФИЦ «Немчиновка», все пробы из разных фенологических фаз согласно плану эксперимента были подвергнуты морфологическому анализу: влажная масса, сухая масса, рост, количество листьев и пр.. Аналогичный анализ проводился и для образов из закрытой системы.

В период с 15 мая по 29 мая был поставлен первый эксперимент из серии в закрытой системе, по результатам которого было решено прервать досрочно эксперимент. Это связано с превышением значений параметров растений в Синерготроне – роста и массы за критические рамки относительно контрольного натурного образца. Анализ причин такого явления показал, что в данном эксперименте температура воздуха на этапе проращивания семян была равна температуре воздуха за соответствующий период в полевых исследованиях, с учетом инерционности системы. Закрытая система обеспечивает высокую

однородность распределения температуры, в отличии от открытой системы, где температура грунта была заметно ниже температуры воздуха. Это приводит к тому, что отклонение температуры субстрата от «истинной» в открытом грунте в сторону её увеличения до 10°С. Для следующей повторности, температура воздуха в закрытой системе на этапе проращивания семян равна температуре грунта открытой системы за аналогичный период.

В период с 29 мая по 20 июня был поставлен второй эксперимент, по результатам которого было обнаружено отклонение от контроля, а именно выявлено полегание стебля на переходе фазы кущения и колошения. Анализ результатов привел к тому, что было установлено, что влажность субстрата на этапе кущения следует регулировать иначе. Для установления оптимального значения принята коррекция влажности с распределением между лотками следующим образом 30%,50%,70%,100%.

В период с 20 июня по 31 августа был поставлен третий эксперимент, по результатам которого был получен результат близкий к контрольному. На всех фенологических фазах было получено отклонение от контрольного образца в пределах доверительного интервала не более ±10%, что является хорошим показателем для биологических систем. При этом на более поздних стадиях роста растения с влажностью субстрата в 30% и в 100% показывали заметное отставание от двух остальных, что экспериментально подтверждает справедливость рекомендации по оптимальной влажности для пшеницы в 67% и для закрытых систем.

**Список литературы:**

1. Voronov, S., & Davydova, N. (2019, December). Source material for accelerated breeding of new commercial varieties of spring soft wheat. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 403, No. 1, p. 012047). IOP Publishing.

2. Han, J., Zhang, Z., Cao, J., Luo, Y., Zhang, L., Li, Z., & Zhang, J. (2020). Prediction of winter wheat yield based on multi-source data and machine learning in China. *Remote Sensing*, *12*(2), 236.

3. Eliseeva, L. G., Osman, A. J., Ivanova, M. I., Leonova, I. B., Zelenkov, V. N., & Latushkin, V. V. (2020). Quality Management of Green Vegetables Grown in Closed Anrobio Technology Systems of Urban Phytotron Type. *International Journal of Advanced Science and Technology*, *29*(3), 11383-11394.

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

**Романов Д.В.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Курчатовский 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 значимо сказывается на стоимости конченого 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.

Нами были проанализированы две сборки конопли посевной Cs10 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_900626175.2) и Cb2 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_016165845.1) с помощью программы PyTanFinder. В результате нами были найдены 47 сателлитных повторов конопли посевной (с представленностью в геноме более 10000 п.н. – порог чувствительности FISH, один из которых показал гомологию к субтеломерному повтору [4].

Преимущество проанализированных сборок Cs10 и Cb2 состоит в том, то по ним можно примерно оценить, на каких хромосомах и в каком количестве представлены повторы. Например, повтор с представленностью в геноме более 10000 п.н., может быть распределен на разных хромосомах, причем на каждой хромосоме его представленность будет менее 10000 п.н., таким образом он не будет детектирован с помощью FISH. Для того, чтобы отфильтровать такие повторы, с помощью программы pyTanFinder были проанализированы каждая хромосома по отдельности. После этого с помощью MegaBLAST анализа (www.ncbi.nlm.nih.gov) найденные повторы были сравнены между собой для выявления гомологичных повторов. На основании проведенного анализа были отобраны 24 повтора с представленностью на минимум одной хромосоме более 10000 п.н., эти повторы были использованы для FISH-локализаии 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.

4. 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.

## СЕКЦИЯ
## «МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ»

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ У ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

**Корзун В.Н.**

***KWS SAAT SE & Co. KGaA, Grimsehlstr. 31, 37574 Einbeck, Germany***
***https://www.kws.com/corp/en/ E-mail: viktor.korzun@kws.com***

В начале XXI века общество сталкивается со сложной проблемой надежного обеспечения достаточного количества продовольствия для растущего населения на фоне сокращения земельных ресурсов и меняющегося климата. В этом контексте геномика и особенно связанные с ней молекулярно-генетические технологии играют важную роль в создании новых сортов растений, которые оптимально объединяют высокую и стабильную урожайность с устойчивостью к абиотическим стрессам и биотическим факторам среды возделывания. В течение последнего десятилетия технология молекулярных маркеров предоставила широкий спектр новаторских подходов для улучшения эффективности стратегии и методов современной селекции. Наличие новых молекулярных инструментов и технологий оказывает значительное влияние на планирование и развитие важнейших элементов селекции, необходимых для ускорения этого длительного и трудоёмкого процесса. Связанный с успешной селекцией мониторинг генетического разнообразия, целевое использование генетических ресурсов растений, примеры конкретных применений молекулярных маркеров в селекции злаковых культур, потенциал геномной селекции и применение геномики и генного редактирования в селекции зерновых культур будут представлены и обсуждены на примере злаковых культур.

**Список литературы:**

1. Gogolev Y.V., S. Ahmar, B.A. Akpinar, H. Budak, A. S. Kiryushkin, V. Y. Gorshkov, G. Hensel, K. N. Demchenko, I. Kovalchuk, F. Mora-Poblete, T. Muslu, I. D. Tsers, N. S. Yadav, V. Korzun. OMICs, Epigenetics, and Genome Editing Techniques for Food and Nutritional Security // Plants 2021. – 10. – P.1423; https://doi.org/10.3390/plants10071423

2. Rabanus-Wallace T. M., B. Hackauf, M. Mascher, T. Lux, T. Wicker, H. Gundlach, M. Báez, A. Houben, K. F.X. Mayer, L. Guo, J. Poland, C. J. Pozniak, S. Walkowiak, J. Melonek, C. Praz, M. Schreiber, H. Budak, M. Heuberger, B. Steuernagel, B. Wulff, A. Börner, B. Byrns, J. Čížková, D. B. Fowler, A. Fritz, A. Himmelbach, G. Kaithakottil, J. Keilwagen, B. Keller, D. Konkin, J. Larsen, Q. Li, B. Myśków, S. Padmarasu, N. Rawat, U. Sesiz, B. Sezgi, A. Sharpe, H. Šimková, I. Small, D. Swarbreck, H. Toegelová, N. Tsvetkova, A. V. Voylokov, J. Vrána, E. Bauer, H. Bolibok-Bragoszewska, J. Doležel, A.Hall, J. Jia, V. Korzun, A. Laroche, X.-F. Ma, F. Ordon, H. Özkan, M. Rakoczy-Trojanowska, U. Scholz, A. H. Schulman, D. Siekmann, S. Stojałowski, V. Tiwari, M. Spannagl, N. Stein / Chromosome-scale genome assembly provides insights into rye biology, evolution, and agronomic potential // Nature Genetics, 2021. – 53.– P. 564–573. DOI: 10.1038/s41588-021-00807-0

3. Reynolds M., O. K. Atkin, M. Bennett, M. Cooper, I. C. Dodd, M. J. Foulkes, C. Frohberg, G. Hammer, I. R. Henderson, B. Huang, V. Korzun, S. R. McCouch, C. D. Messina, B. J. Pogson, G. Slafer, N. L. Taylor, P. E. Wittich / Addressing Research Bottlenecks to Crop Productivity // Trends in Plant Science, 2021. – 26.– P. 607-630. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.03.011.

# ПОЛИМОРФИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У ДОМАШНИХ И ДИКИХ СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ

**Соловьева А.Д., Бардуков Н.В., Харзинова В.Р.**

***ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская область, г.о. Подольск, п. Дубровицы, дом 60, 142132, e-mail: anastastasiya93@mail.ru***

Северный олень (*Rangifer tarandus*) имеет важнейшее экономическое, социальное, культурное и экологическое значение для коренных малочисленных народов. Олени являются источником мяса, шкур, а иногда и молока, и их используют в качестве транспортных средств.

Для изучения геномов большинства видов сельскохозяйственных животных (например, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы и лошади) используется целый ряд ДНК-инструментов, таких как аннотированные сборки генома de novo, наборы данных ресеквенирования и панели множественных однонуклеотидных полиморфизмов (ДНК-чипы)[1]. Эти подходы к полногеномному исследованию предоставили важные новые знания об эволюции, одомашнивании, генетическом разнообразии, моделях отбора и адаптации видов сельскохозяйственных животных. Однако для генетических исследований северного оленя эти геномные инструменты стали доступны сравнительно недавно [2]. В связи с этим, для изучения разнообразия этого ценного биологического вида необходимо использовать информацию, полученную на основе применения маркеров разного типа. В настоящей работе проведена оценка изменчивости гаплотипов и генетического разнообразия диких и домашних популяций северного оленя на основе анализа последовательностей митохондриального гена цитохрома b (cytb). Разработка системы секвенирования и её последующая апробация проводились на диких северных оленях таймырской популяции (n=16), домашних северных оленей ненецкой породы (n=15) и тувинской популяции диких северных оленей (n=5). Полные последовательности гена cytb (1140 п.н.) анализировали секвенированием по Сэнгеру. Для построения медианной сети использовалась программа PopART 1.7. Определение лучших моделей эволюции проводилось отдельно для каждого нуклеотида в программе PartitionFinder 2 с использованием критерия Akaike с корректировкой информации (AICc). Программа DnaSP 6.12.01 использовалась для расчета параметров генетического разнообразия: количества полиморфных сайтов (S), среднего количества нуклеотидных различий (K), количества гаплотипов (H), гаплотипического разнообразия (Hd), нуклеотидного разнообразия (π).

На основе полученных данных выявлено 22 гаплотипа у 36 оленей, при этом число разнообразных гаплотипов преобладало у диких особей. Количество вариабельных сайтов было больше в дикой таймырской популяции, чем в ненецкой и тувинской (17 и 5 соответственно). Была выявлена интересная закономерность в распределении разнообразия гаплотипов: дикая и тувинская популяции показали практически равные максимальные значения показателя. Северные олени тувинской популяции характеризовались самыми низкими значениями среднего числа нуклеотидных различий и нуклеотидного разнообразия. Анализ структуры медианной сети популяций северных оленей на основе анализа полиморфизма гена cytb мтДНК показал, что дикая популяция и ненецкая порода северных оленей имеют общие гаплотипы, а у тувинской популяции были идентифицированы приватные гаплотипы. Более того, тувинская популяция северных оленей была наиболее обособлена от остальных; дикие северные олени характеризовались более высоким генетическим разнообразием, чем домашняя популяция; тувинская популяция формировала отдельный от других групп кластер и характеризовалась более высоким гаплотипическим разнообразием, чем ненецкая порода. Исследование будет

продолжено в рамках секвенирования полного митохондриального генома популяций северных оленей, обитающих на территории России.

*При выполнении исследований было использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста. Работа проведена в рамках задания Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 0445-2019-0024). Работа проведена в рамках выполнения фундаментальных научных исследований Министерства науки и высшего образования РФ по теме 0445-2019-0026, № 6 (АААА-А18-118021590138-1). Пробы были получены в рамках выполнения работы проекта РНФ №21-16-00071.*

**Список литературы:**

**1.** Weldenegodguad M., Pokharel K., Ming Y. *et al.* Genome sequence and comparative analysis of reindeer (*Rangifer tarandus*) in northern Eurasia. *Sci Rep* **10,** 8980 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-65487-y.

**2.** Zhipeng Li, Zeshan Lin, Hengxing Ba, Lei Chen, Yongzhi Yang, Kun Wang, Qiang Qiu, Wen Wang, Guangyu Li, Draft genome of the reindeer (Rangifer tarandus), GigaScience, Volume 6, Issue 12, December 2017, gix102, DOI: 10.1093/gigascience/gix102

## ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ У ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ *AEGILOPS SPELTOIDES*

**Болдаков Д.М., Давоян Э.Р., Зубанова Ю.С., Давоян Р.О., Бибишев В.А.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко», отдел биотехнологии, Краснодар, 350012***
***E-mail: boldakov.dm@mail.ru***

Стеблевая ржавчина (*Puccinia graminis Pers. f. sp. tritici Eriks. et Henn*) является одним из самых вредоносных грибковых заболеваний пшеницы. В мировой практике в результате эпифитотийного развития болезни потери урожая составляли практически 100%. В период с 50-х и до 90-х годов XX века её вредоносность была значительно снижена благодаря эффективной генетической защите (Плахотник, 1969; Койшыбаев и др., 2008; Bernardo et al., 2013).

Одним из способов генетической защиты растений является передача генетического материала от дикорастущих сородичей. Большое количество генов устойчивости к листостебельным заболеваниям пшеницы, в том числе и к стеблевой ржавчине, содержит в своём геноме вид *Aegilops speltoides*. На сегодняшний день известно о передаче от этого вида генов *Sr32, Sr39, Sr47* и *SrAes7t* (McIntosh et al., 2013). Для переноса генетического материала от *Ae. speltoides* в мягкую пшеницу была использована геномно-замещённая синтетическая форма Авродес (BBAASS). На основе данной формы, были получены интрогрессивные линии, характеризующиеся рядом ценных для селекции мягкой пшеницы признаков (Давоян и др., 1996). Исходя из их родословных, предположительно они могут нести гены устойчивости к стеблевой ржавчине, переданные от *Ae. speltoides.*

По результатам полевой оценки 23-х линий по устойчивости к стеблевой ржавчине было отобрано 16 устойчивых к данной болезни линий с типом реакции в баллах от 01 до 2.

В результате ПЦР было выявлено, что во всех анализируемых линиях отсутствует маркер, сцепленный с геном *Sr39*. Маркер *Xgwm47*, сцепленный с геном *Sr47*, был идентифицирован в устойчивых к стеблевой ржавчине линиях ДБ847, ДБ849 и ДБ869. В линиях ДБ737 (тип реакции 1) и ДБ902 (тип реакции 2) идентифицирован маркер *crSr32#2*, сцепленный с геном устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr32*.

Таким образом, устойчивость к стеблевой ржавчине в линиях ДБ847, ДБ849, ДБ869 и ДБ737, ДБ902 может контролироваться за счёт присутствия генов *Sr47* и *Sr32* соответственно. У 11 устойчивых линий искомые молекулярные маркеры не были выявлены. Таким образом, устойчивость к стеблевой ржавчине в них может быть обусловлена как за счёт присутствия гена *SrAes7t*, идентификация которого не проводилась, так и за счет новых (других) генов, отличных от *Sr32, Sr39* и *Sr47.*

**Список литературы:**

1. Давоян Р.О., Бессараб К.С., Бебякина И.В., Конюшая Е.А. Использование цитогенетических методов в селекции мягкой пшеницы в КНИИСХ. Сб. науч. тр. КНИИСХ, посвящённых 95-летию со дня рождения П.П, Лукьяненко. Краснодар, 1996. С.210-217.

2. Койшыбаев М., Болтыбаева Л.А., Копирова Г.И. Гермоплазма пшеницы с групповой устойчивостью к болезням с воздушно-капельной инфекцией. Агромеридиан. 2008. С. 34-42

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ CSN3, LGB И MGST1 У КОРОВ МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ

**Романенкова О.С.[1], Зимина А.А.[1], Сермягин А.А.[1], Кольцов Д.Н.[2]**

***1 - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Дубровицы, 142132, E-mail: y7tteaip@mail.ru***

***2 - Федеральное государственное бюджетное научным учреждение «Федеральный научный центр лубяных культур» ФГБНУ ФНЦ ЛК ОП Смоленский НИИСХ, 214025, г. Смоленск, ул. Нахимова, д. 21, E-mail: info.sml@fnclk.ru***

К настоящему времени выявлено большое количество генов, ассоциированных с параметрами молочной продуктивности крупного рогатого скота, определена их локализация в хромосомах и последовательность пар нуклеотидов в их молекулярной структуре [1]. При этом широкое использование современных технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS, next generation sequencing) геномов крс и полногеномного поиска ассоциаций (GWAS, genome-wide association studies) позволило выявить ранее неизвестные аллельные варианты генов, связанных с молочной продуктивностью [2]. В качестве потенциальных ДНК-маркеров молочной продуктивности и качества молока у крупного рогатого скота были исследованы полиморфные варианты генов каппа-казеина, лактоглобулина и микросомальной глутатион-S-трансферазы у коров бурой швицкой, джерсейской и монбельярдской пород. Ген каппа-казеина (*CSN3*) отвечает за белковомолочность и технологические свойства молока. Аллель B гена *CSN3* связан с более высокой массовой долей белка в молоке, а также более высоким выходом творога и сыра. Ген бета-лактоглобулина (*LGB*) ассоциирован с белковомолочностью, биологической ценностью и технологическими свойствами молока. Наиболее распространёнными вариантами гена LGB у большинства молочных пород являются аллели C и T. Вариант T этого белка денатурирует быстрее, чем вариант C, и, следовательно, обладает более низкой термостабильностью [3]. Белок *MGST1* относится к семейству глутатион-S-трансфераз, участвующих в детоксикации ксенобиотиков. *MGST1* катализирует конъюгацию глутатиона с электрофилами и восстановления гидропероксидов липидов. Полногеномные исследования выявили в этом гене 17 однонуклеотидных замен, ассоциированных с повышенным содержанием жира в молоке [4].

Материалы и методы. В качестве материала для исследований использовалась ткань (ушной выщип) 100 гол. коров бурой швицкой, джерсейской и монбельярдской пород.

Выделение ДНК осуществляли с использованием наборов «ДНК-Экстран» (Синтол, Россия) согласно рекомендации производителя. Полиморфизм генов *CSN3* (rs43703015), *LGB* (rs109625649) и *MGST1* (rs134637616) определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием разработанных в лаборатории тест-систем.

Проведенные исследования изучаемых ДНК-маркеров молочной продуктивности показали полиморфизм всех исследуемых генов. У коров бурой швицкой породы по гену каппа-казеина наибольшей частотой встречаемости характеризовался аллель А – 0.61. Частота встречаемости аллеля В составила 0,39. По гену бета-лактоглобулина (*LGB*) частоты встречаемости аллелей Т и С составили 0,72 и 0,28 соответственно. Частоты аллелей *MGST1* составили 0,81 для аллеля G и 0,19 для аллеля Т.

В выборке джерсейского скота в гене каппа-казеина частоты аллелей составили 0,24 для аллеля А и 0,76 для аллеля В. По гену бета-лактоглобулина (*LGB*) частоты встречаемости аллелей Т и С составили 0,6 и 0,4 соответственно. Полиморфизма в гене *MGST1* выявлено не было.

В выборке монбельярдского скота в гене каппа-казеина частоты аллелей составили 0,43 для аллеля А и 0,57 для аллеля В. По гену бета-лактоглобулина (*LGB*) частоты встречаемости аллелей Т и С составили 0,63 и 0,37 соответственно. Частоты аллелей *MGST1* составили 0,94 для аллеля G и 0,06 для аллеля Т.

Исследование бурого швицкого скота проведено при поддержке РФФИ, проект № 20-016-00161\21. Исследование джерсейского и монбельярдского скота выполнено в рамках госзадания, тема № 0445-2019-0027.

**Список литературы**:

1. Тарасова Е.И., Нотова С.В. Гены-маркеры продуктивных характеристик молочного скота (обзор). Животноводство и кормопроизводство. 2020. Т. 103. № 3. стр. 58-80. doi: 10.33284/2658-3135-103-3-58.

2. Шевцова А.А., Климов Е.А., Ковальчук С.Н. обзор вариабельности генов, связанных с молочной продуктивностью крупного рогатого скота. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2018. №11. стр. 194-200.

3. Sanchez MP, Govignon-Gion A, Ferrand M et al. Whole-genome scan to detect quantitative trait loci associated with milk protein composition in 3 French dairy cattle breeds. J Dairy Sci. 2016;99(10):8203-8215. doi: 10.3168/jds.2016-11437.

4. Littlejohn, M. D. et al. Sequence-based Association Analysis Reveals an MGST1 eQTL with Pleiotropic Effects on Bovine Milk Composition. Sci. Rep. 2016. 6, 25376; doi: 10.1038/srep25376.

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛЮТЕНИНОВ У СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ КАНАДСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

**Русманов Н.С.[1] Груздев И.В.[1,2], Ворончихина И.Н.[3], Рубец В.С.[1], Соловьев А.А.[2,3]**

***1 –ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550 E-mail: kikityp@gmail.com***
***2 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550***
***3 – ФГБУН «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН», Москва 127276***

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – важнейшая сельскохозяйственная культура, являющаяся основой хлебопекарного производства. В настоящее время увеличился спрос на высококачественные продукты питания, в том числе хлебобулочные изделия, однако качество зерна и выпекаемого хлеба, не смотря на рост производства, неуклонно снижается (Карпушин, 2017). Агротехническими приёмами сложно, дорого, а, зачастую, вообще невозможно повысить качество зерна, следовательно, в процессе селекции необходимо на генетическом уровне обеспечивать высокий технологический и хлебопекарный потенциал сортов мягкой пшеницы. Значительную роль в детерминации хлебопекарных качеств играют высокомолекулярные субъединицы глютенинов (Hight Molecular Weight Glutenin Subunits, HMW-GS), исследователями определен характер их наследования и разработана система, позволяющая косвенно оценить хлебопекарные качества нового сорта уже на этапе подбора родительских пар (Payne, Lawrence,1983; Payne et al., 1987). Для ряда ценных аллелей высокомолекулярных глютенинов разработаны надежные молекулярные маркеры, что является мощным инструментом маркер-ассоциированной селекции (Marker assistant selection, MAS) (Климушина и др., 2013). Канада является лидером в производстве высококачественного зерна, поэтому данное исследование посвящено идентификации HMW-GS и оценке их влияния на качественные характеристики зерна у сортов канадской селекции в условиях Центрального Нечерноземья.

Объектом исследования были 14 сортов яровой мягкой пшеницы канадской селекции: AC Barrie, Biggar, Bluesky, BW90, Glenlea, AC Karma, Katepwa, Laura, Laval 19, Leader, CDC Merlin, Oslo, AC Taber, Wildcat, характеризующиеся, по литературным данным, высокими хлебопекарными качествами (Knox et al., 1995; McCaig et al., 1996). В качестве стандарта выступал отечественный сорт Злата**.** Указанные сорта высевались в 2021 году в полевом опыте в трехкратной повторности на Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Идентификацию HMW-GS проводили путем электрофореза в полиакриламидном геле по методике Singh et al. (1991) с модификациями Branlard et al. (2001). Номенклатура высокомолекулярных субъединиц глютенинов приведена в соответствии с Payne, Lawrence (1983). Glu-score рассчитан по методике Payne et al. (1987). Оценку урожая и анализ элементов его структуры проводили по общепринятым методикам. Статистическую обработку данных проводили методами описательной статистики, дисперсионного анализа (Доспехов, 1985) и ранговой корреляции Спирмена (Смиряев и др., 2002).

В результате идентификации высокомолекулярных субъединиц глютенинов установлено, что у 8 сортов из числа изучаемых присутствуют субъединицы Ax2*/Bx7+By8/Dx5+Dy10 (Glu-score 10). Это сорта Злата, AC Barrie, Bluesky, Katepwa, Leader, CDC Merlin, Oslo, Wildcat. Также максимальное значение Glu-score (10) у сорта Laura, у него идентифицировано сочетание Ax1/Bx7+By8/Dx5+Dy10. У сортов Laval 19 и AC Taber идентифицированы субъединицы Ax1/Bx7+By9/Dx5+Dy10, и значение Glu-score составляет 9. Невысоким значением Glu-score 8 и 7 обладают, соответственно, сорта Biggar (Ax1/Bx7+By8/Dx2+Dy12) и AC Karma (Ax1/Bx7+By9/ Dx2+Dy12). Сорта Glenlea и BW90,

по результатам идентификации HMW-GS, являются гетерогенными, у первого из них обнаружено 3 биотипа, у второго – 4. Между тем, оба сорта характеризуются высокими средневзвешенным значением Glu-score – 9,4. Таким образом, установлено, что большинство изученных сортов обладают высоким потенциалом хлебопекарных качеств, поскольку характеризуются значением Glu-score 9-10. Кроме того, сорта с ме́ньшим значением Glu-score (7-8) несут ценные аллели локусов *Glu-A1* и *Glu-B1*.

В полевом эксперименте в условиях вегетационного периода 2021 года все изучаемые сорта показали ме́ньшую, относительно стандарта Злата (434,0 г/м$^2$), урожайность. Однако, достоверно (α=0,05) хуже стандарта были сорта AC Barrie, Bluesky, Glenlea, Katepwa, Laura, Laval 19, Leader, Oslo и Wildcat, остальные сорта достоверно от стандарта не отличались. Средняя урожайность в полевом опыте составила 339,3 г/м$^2$. В ходе анализа компонентов структуры урожая не выявлено достоверных отличий изучаемых сортов от сорта-стандарта. При сопоставлении данных об урожайности и элементов структуры урожая с результатами идентификации высокомолекулярных субъединиц глютенинов у изучаемых сортов, как по отдельным аллельным вариантам, так и по генотипам в целом, с использованием методов доверительных интервалов и ранговой корреляции Спирмена достоверных ассоциаций не установлено. В ближайшем будущем планируется оценить хлебопекарные качества изучаемых сортов лабораторными методами и установить, какое влияние оказывают высокомолекулярные глютенины на эти показатели, а также выполнить пробную выпечку. Из вышесказанного следует, что изученные образцы после детального изучения могут выступить в качестве исходного материала для селекции яровой мягкой пшеницы на высокие хлебопекарные качества.

**Список литературы:**

1. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований)/ Б.А. Доспехов — М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
2. Карпушин, Е. С. Качество хлеба в России: производство и спрос / Е.С. Карпушин // Стандарты и качество. – 2017. – № 5. – С. 98-101.
3. 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.
4. Смиряев, А.В. Моделирование: от биологии до экономики / А.В. Смиряев, А.В. Исачкин, Л.К. Харрасова. // Учебное пособие М.: Изд-во МСХА, 2002 – 122 с.
5. Branlard, G. Genetic diversity of wheat storage proteins and breadwheat quality / G. Branlard, M. Dardevet, R. Saccomano, F. Lagoutte, J. Gourdon //Euphytica. – 2001.– 119. – P. 59–67.
6. Knox, R.E. AC Karma white spring wheat / R. E. Knox, R. M. De Pauw, T.N. McCaig, J. M. Clarke, J. G. McLeod M. R. Fernandez // Can. J. Plant Sci. – 1995. – 75. – P. 899–901.
7. McCaig, T.N. AC Barrie hard red spring wheat / T.N. McCaig, R.M. DePauw, J.M. Clarke, J.G. McLeod, M.R. Fernandez, R.E. Knox.// Can. J. Plant Sci. – 1996. – 76. – P. 337-339.
8. Payne, P.I. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat / P.I. Payne, G.J. Lawrence // Cereal Res. Commun. – 1983. – 11. – P. 29–35.
9. Payne, P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality / P.I. Payne // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1987. – 38. – P.141–153.
10. 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.

## ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CXCR1 И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ КОРОВ

**Зимина А.А.[1], Романенкова О.С.[1], Сермягин А.А.[1]**

***[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 142132, Московская обл., г. о. Подольск, п. Дубровицы, д.60;***
***e-mail: filipchenko-90@mail.ru***

Современные методы молекулярной генетики позволяют определять наследуемые по кодоминантному типу аллельные варианты генов, связанные с молочной продуктивностью. К настоящему времени выявлено большое количество генов, ассоциированных с параметрами молочной продуктивности, определена их локализация в хромосомах и последовательность пар нуклеотидов в их молекулярной структуре, установлены причины возникновения полиморфизма генов в результате точковых мутаций в соответствующих локусах молекул ДНК [1, 2].

Рецептор хемокина (C-X-C) 1 (*CXCR1*), экспрессируемый на поверхностях нейтрофилов, взаимодействует главным образом с интерлейкином-8 (IL-8) и играет важную роль в иммунном ответе. В гене CXCR1 крупного рогатого скота были зарегистрированы два интересных однонуклеотидных полиморфизма (SNP), SNP *CXCR1*+777 G>C и SNP *CXCR1*-1768T>>A, которые демонстрируют связь с субклиническим маститом и качеством молока у молочного скота, соответственно. В дополнение к своему положению в локусе количественных признаков для оценки соматических клеток (SCS) и его функции в иммунном ответе, ген рецептора хемокина CXCR1, расположенный на аутосоме 2 крупного рогатого скота, является благоприятным геном-кандидатом для здоровья вымени молочного скота и продолжительности использования животных [3, 4, 5, 6, 9, 10].

В данной работе рассматривается замена нуклеотида SNP *CXCR1* T>A (rs 41255709).

Цель исследования – определение полиморфизма гена *CXCR1* у разных пород крупного рогатого скота, а также выявление ассоциации генотипов с молочной продуктивностью коров.

Исследования выполнены на образцах ДНК, выделенных из крови коров (n=298) голштинской, монбельярдской и джерсейской пород Воронежской области набором реагентов «ДНК-Экстран-1» (ООО «Синтол», Россия). Методом обнаружения полиморфизма в исследовании является ПЦР-тест с детекцией в реальном времени. Для разработки тест-системы подбор праймеров и зондов к гену *CXCR1* осуществляли через базу данных Генбанк [7] полноразмерные последовательности гена *CXCR1*. Видоспецифичность праймеров была проверена *in silico* с использованием программы *BLASTN* [8]. Данные по молочной продуктивности коров были взяты из базы «СЕЛЭКС. Молочный Скот» (форма 2-мол). Годы рождения животных варьировали с 2011 по 2017 гг. Практически все поголовье имеет импортное происхождение - Нидерланды, Франция, Дания.

В результате ДНК-диагностики по локусу гена *CXCR1* коров голштинской породы нами было исследовано 99 голов, из них 70 (70,7%) имели генотип AA; 27 (27,3%) – AG и лишь 2 (2,0%) – GG. При этом частота аллеля A составила 0,84, а аллеля G – 0,16. При исследовании коров монбельярдской и джерсейской пород полиморфизм не был обнаружен, генотипы AA составили 100 %.

Проанализировав полученные данные, была выявлена достоверная разница между средними показателями по стаду у коров голштинской, монбельярдской и джерсейской пород. Так, высоко достоверной разницей ($p \leq 0,999$) характеризовались животные голштинской породы по показателю удоя за 305 дн. первой лактации (8080 кг молока), превзойдя на 537 и 2428 кг молока коров монбельярдской и джерсейской пород соответственно. Однако, животные монбельярдской породы отличались самым высоким достоверным ($p \leq 0,999$) удоем за 305 дн. максимальной лактации (2,5 лакт.) - 9478 кг молока

(+365 и 2774 кг) и содержанием белка по этому же показателю, оказавшемуся равным 324,8 кг белка (+18,5 и 49, 9 кг) в отличие от голштинских и джерсейских коров. Монбельярдские коровы имели самый поздний возраст первого отёла - 28,9 мес. (р ≤0,999). Животные джерсейской породы превосходили коров голштинской и монбельярдской пород по МДЖ и МДБ за 305 дн. первой лактации - 5,61% против 3,90 и 3,99% по жиру и 3,89% против 3,19 и 3,46% по белку. Аналогичная картина наблюдалась по максимальной лактации: МДЖ джерсейских коров 5,66% была больше на 1,54 и 1,79% жира в молоке голштинских и монбельярдских коров. Показатели МДБ за максимальную лактацию оказались равными 4,09% у джерсейских животных, в то время как у голштинских и монбельярдских этот показатель соответственно составил 3,35 и 3,43%. Кроме того, джерсейские коровы имели более длительный срок хозяйственного использования 4,1 отела, но самый продолжительный сервис-период – 141 дн.

Касательно выявленных генотипов по гену *CXCR1* в голштинской породе можно сделать следующее заключение: несмотря на то, что не было получено достоверной разницы, лучшие показатели по ряду признаков молочной продуктивности имели животные с генотипом AG, т. е. аллель G являлся желательным в генотипе животных. Такие животные имели больший удой за первую и наивысшую лактации, а также выгодно отличались количеством молочного жира и белка за 305 дн. этих лактаций.

**Список литературы**


1. Некрасов, Д.К. Взаимосвязь полиморфных вариантов генов пролактина, гормона роста и каппа-казеина с молочной продуктивностью / Аграрный вестник Верхневолжья // Д.К. Некрасов, А.Е. Колганов, Л.А. Калашникова, А.В. Семашкин. 2017. № 1 (18). С. 40-48.
2. Тарасова Е.И., Нотова С.В. Гены-маркеры продуктивных характеристик молочного скота (обзор). Животноводство и кормопроизводство. 2020. Т. 103. № 3. С. 58-80.
3. Юдин Н. С., Воевода М. И. Молекулярно-генетические маркеры экономически важных признаков у молочного скота. Генетика. 2015. Т.51. №5. С. 600-612.
4. Яковлев А. Ф., Дементьева Н. В., Терлецкий В. П. Связь молекулярно-генетических маркеров с продолжительностью использования молочных коров. Генетика и разведение животных. 2014. №4. С. 3-7.
5. Damaj B. B, McColl S. R., Neote K., Songqing N., Ogborn K. T., Hebert C. A., Naccache P. H.. Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops.FASEB J 1996, 10:1426–1434.
6. Fontanesi L., Calo D.G., Galimberti G. et al. A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle // Anim. Genet. 2014. V. 45. № 4. P. 576–580.
7. http://blast.ncbi.nlm.nih. gov/Blast.cg
8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
9. I.Goertz, C.Baes, C.Weimann, N.Reinsch, G.Erhardt. Association between single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and somatic cell score in Holstein dairy cattle. Journal of Dairy Science, Volume 92, Issue 8, 2009, Pages 4018-4022].
10. Leyva_Baca I., Schenkel F., Martin J., Karrow N.A. Polymorphisms in the 5' upstream region of the CXCR1 chemokine receptor gene, and their association with somatic cell score in Holstein cattle in Canada // J. Dairy Sci. 2008. V. 91. № 1. P. 407–417.


## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОРТОВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (RIBES NIGRUM L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРА ИЗ РЕСУРСОВ ВНИИСПК


**Павленко А.А., Должикова М.А., Бахотская А.Ю.**

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

Смородина черная (*Ribes nigrum*) – одна их ведущих ягодных культур в России. Популярность ее объясняется высокой, стабильной урожайностью, неприхотливостью к условиям возделывания, высоким уровнем механизации, что позволяет выращивать ее в промышленных масштабах (Князев, С.Д. и др., 2004). Ведущими производителями ягод смородины черной являются Польша, Германия и Россия. В США и Канаде смородина черная не так популярна, как в Западной Европе и России (Пикунова А.В., 2019).

Формирование сортимента плодово-ягодных культур − непрерывный процесс, расширение которого ведет к необходимости идентификации посадочного материала. С помощью данных по идентификации сортов, полученных современными методами молекулярного маркирования генома, становится возможным разработать генетические паспорта. Генетическая паспортизация сортов стала очень удобным инструментом в работе с определением уникальных генотипов, в проведении анализа родословных и сортовой диагностики, в распознавании устойчивости к патогенам, а также использовать для защиты авторских прав селекционеров. Для проведения исследований по генетической паспортизации в настоящее время используются наиболее эффективные и часто используемые методы, основанные на маркерной системе, в частности SSR − маркеры.

Первые микросателлитные маркеры для представителей рода смородина были разработаны шотландскими учеными (Brennan, R. et al, 2002).

Интенсивная работа по паспортизации плодово-ягодных культур ведется во Всероссийском НИИ селекции плодовых культур (ВНИИСПК, г. Орел). В нем собрана объемная коллекция сортов основных плодовых и ягодных культур, в том числе черной смородины (*Ribes nigrum*) − более 100 сортов.

В данном исследовании объектами анализа для генетической паспортизации являются 5 сортов смородины черной селекции ВНИИСПК, а также внесенные в Госреестр селекционных достижений России. Сорта черной смородины: Гамма (762-5-82 × Экзотика); Искушение (С. 1163 × Чудесница); Кипиана (762-5-82 × Экзотика); Креолка (1163-7-80 (Белорусская сладкая × Сундербюн II) × Зуша); Орловская серенада (Ершистая × Минай Шмырёв); Экзотика (Сеянец Голубки × смесь пыльцы семьи 106). SSR-анализ проводили с использованием 10 микросателлитных маркеров (Cra-489, Cra-531, e1-O01, e1-O21, g1-M07, g1-L12, g1-A01, g2-H21, g2-L17, g2-J08).

ДНК выделяли из молодых листьев CTAB-методом (Doyle J. J., 1990).

Полимеразную цепную реакцию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 1 х ПЦР буферный раствор, 200 мкМ нуклеотидов по 2 мкМ прямого и обратного праймера, 0,3 ед. Taq ДНК-полимеразы и 10 нг. ДНК. Реакция амплификации: предварительная денатурация – 5 мин. при 95°С; денатурация – 30 с. при 95°С; отжиг праймера – 30 с.; синтез ДНК – 30 с. при 72°С (30 циклов); элонгация– 10 мин. при 72°С.

Фрагменты разделяли на приборе ABI prism Genetic Analyzer 3010. Для учета первичных данных использовали программу Peak Scanner Software – v01.

На основании анализа потока полученных размеров аллелей нами был проведена работа по генетической паспортизации задействованных в анализе сортообразцов.

Так, сорт Гамма имеет следующие амплифицированные аллели в локусах: g1-M07 − 214/223; e1-O01 − 142; g2-H21 − 247; g2-L17 − 156; e1-O21 − 298; g1-L12 − 214; g2-J08 − 156/167; Cra-489 − 240; Cra-531 − 165; g1-A01 − 207.

Сорт Искушение: g1-M07 – 217/222; e1-O01 – 142/155; g2-H21 – 247; g2-L17 – 162; e1-O21 – 295; g1-L12 – 214/218; g2-J08 – 165; Cra-489 – 247; Cra-531 – 165/171; g1-A01 – 207/211.

Сорт Кипиана: g1-M07 – 214; e1-O01 – 142/155; g2-H21 – 247; g2-L17 – 156; e1-O21 – 295; g1-L12 – 213/218; g2-J08 – 155/165; Cra-489 – 240; Cra-531 – 165; g1-A01 – 207/211.

Сорт Креолка: g1-M07 – 214; e1-O01 – 143; g2-H21 – 247; g2-L17 – 156; e1-O21 –295; g1-L12 – 213/217; g2-J08 – 155/165; Cra-489 – 241/ 244; Cra-531 – 165; g1-A01 – 207/211.

Сорт Орловская серенада: g1-M07 – 210/222; e1-O01 – 142/155; g2-H21 – 245/247; g2-L17 – 146/156; e1-O21 – 298; g1-L12 – 217; g2-J08 – 155/165; Cra-489 – 240/256; Cra-531 – 165/171; g1-A01 – 211.

Сорт Экзотика: g1-M07 – 214/216; e1-O01 – 143/156; g2-H21 – 247; g2-L17 – 156; e1-O21 – 295/298; g1-L12 –213/217; g2-J08 – 165/166; Cra-489 – 247; Cra-531 – 165; g1-A01 – 207/211.

Для всех сортообразцов получены уникальные мультилокусные профили. Поиск уникального сочетания аллелей позволит отличить сортообразцы друг от друга и станет возможным составление идентификационной формулы генотипов (генетического паспорта). Сорт Гамма имеет уникальное сочетание аллелей в локусе g2-J08 – 156/167; сорт Искушение g1-M07 – 217/222; сорт Кипиана g1-L12 – 213/218; сорт Креолка Cra-489 – 241/244; сорт Орловская серенада g1-M07 – 210/222; сорт Экзотика e1-O01 – 143/156; g2-J08 – 165/166.

В результате проведенной работы разработаны генетические паспорта 5 сортов черной смородины (*Ribes nigrum*) на основании полиморфизма микросателлитных локусов.

С помощью 10 SSR-маркеров получили редкие и уникальные аллели, которые могут быть использованы с целью подтверждения сортовой принадлежности. Полученные генетические паспорта способны облегчить создание и поддержание базовых коллекций генетических ресурсов смородины черной во ВНИИСПК.

**Список литературы:**

1. Князев, С.Д. Селекция смородины черной на современном этапе. Изд-во Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур. 2004. 238 с.

2. Пикунова А. В. и др. Исследование генома с применением ДНК-маркеров у смородины. Генетика. 2019. 55. 9: 998-1010. DOI: 10.1134/S001667581909011X

3. Brennan R., Jorgensen L., Hackett C., Woodhead M., Gordon S., & Russell J. The development of a genetic linkage map of blackcurrant (Ribes nigrum L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits. Euphytica. 2008. 161. 1:19-34. DOI: 10.1007/s10681-007-9412-8

4. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 1990. 12: 13-15.

# ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДНК-МАРКЕРА ESR1 НА ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА СВИНЕЙ ПОРОД КРУПНАЯ БЕЛАЯ И ЛАНДРАС

**Карпушкина Т.В., Свеженцева Н.А., Форнара М.С., Бардуков Н.В., Бакоев Н.Ф., Костюнина О.В.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», 142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, дом 60, E-mail: t.kriz@ya.ru***

Исследования полиморфизма в гене *ESR1* представляют интерес в связи с ассоциацией с хозяйственно-полезными признаками свиней. Целью данной работы явилось исследование влияния полиморфизма гена *ESR1* на изменчивость воспроизводительных качеств свиней пород крупная белая и ландрас.

Генотипирование проводилось по методикам центра биотехнологии и молекулярной диагностики ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста на оборудовании Центра коллективного пользования научным оборудованием «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Пробы (ушные выщипы) взяты из УНУ «Банка генетического материала домашних животных и птицы» ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. База данных зоотехнического учета продуктивных показателей предоставлена ООО «Знаменский СГЦ» Орловской области.

Всего было исследовано 132 хряка крупной белой (*LW*) породы и 156 хряков породы ландрас (*L*). Были выявлены следующие генотипы: у *LW AA* – 43,2%, *AG* – 42,4%, *GG* – 14,4%; у *L AA* – 95,5%, *AG* – 3,9%, *GG* – 0,6%. Воспроизводительные качества этих хряков оценивали по продуктивности свиноматок (14079 опоросов) и дочерей хряков (18504 опоросов). Анализ данных в т.ч. расчет средних значений оценок методом наименьших квадратов (*LSM, least square means*) воспроизводительных качеств проводили с использованием модели (*MANOVA*): $y=\mu+Breed+ESR1+Breed\times ESR1+e$, где $y$ – показатель воспроизводительных качеств (для следующих признаков: многоплодие в гол. (*Total_BP*), в т.ч. родилось живых (*Born_A*) и родилось мертвых (*Born_D*), масса гнезда при рождении в кг (*WB_Total*), масса поросенка при рождении в г (*WB*), количество отнятых поросят в головах (*Weanning*), масса гнезда при отъеме в кг (*WW_Total*), масса поросенка при отъеме в кг (*WW_PIG*), скорректированная масса гнезда при отъеме в кг (*AW_F*), скорректированная масса поросенка при отъеме в кг (*AW_P*), $\mu$ – общее среднее по выборке из n животных; *Breed* – эффект, обусловленный влиянием фактора породы; *ESR1* – эффект, обусловленный влиянием фактора гена *ESR1*; *Breed×ESR1* – эффект, обусловленный взаимодействием факторов породы и гена *ESR1*; *e* – остаточный эффект, не включенный в данную модель. Выявлено статистически значимое влияние у свиноматок эффекта гена *ESR1* при $p<0.01$ на изменчивость *WB, Weanning, AW_F*; эффекта породы при $p<0.001$ на изменчивость *Born_D*, при $p<0.01$ на изменчивость *Born_A, WB_Total, Weanning*, при $p<0.05$ на изменчивость *WW_PIG*; влияние взаимодействием факторов породы и ДНК-маркера *ESR1* при $p<0.001$ на изменчивость *Weanning, WW_Total, AW_F, AW_P*; при $p<0.05$ на *WB_Total*. У дочерей анализируемых хряков выявлено достоверное влияние фактора гена *ESR1* при $p<0.001$ на изменчивость *WW_Total, WW_PIG*; при $p<0.05$ на изменчивость *WB_Total*; фактора породы при $p<0.05$ на изменчивость *WB_Total*, влияние взаимодействием факторов породы и ДНК-маркера *ESR1* при $p<0.05$ на изменчивость *WB_Total* и *Weanning*.

Работа проведена в рамках выполнения задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации ГЗ № 0445-2021-0008.

**Список литературы:**

1. Костюнина О.В., 2016 Характеристика аллелофонда и анализ ассоциаций ДНК-маркеров с хозяйственно-полезными признаками свиней, дисс на соиск докт. Биол. Наук., ВИЖ, 2016, 392 с.

2. Мельникова Е.Е., Бардуков Н.В., Форнара М.С., Костюнина О.В., Сермягин А.А., Брем Г., Зиновьева Н.А. Влияние генотипов по ДНК-маркерам на воспроизводительные качества свиней пород крупная белая и ландрас. Сельскохозяйственная Биология, 2019, том 54,[1] 2, с. 227-238 doi: 10.15389/agrobiology.2019.2.227rus.

3. Balatsky, V. N., Saenko, A. M., & Grishina, L. P. Polymorphism of the estrogen receptor 1 locus in populations of pigs of different genotypes and its association with reproductive traits of large white sows. Cytology and Genetics, 2012, 46(4), 233–237. doi:10.3103/s0095452712040020.

4. Mencik S., Vukovic V., Spehar M., Modric M., Ostovic M., Ekert Kabalin A. (2019): Association between ESR1 and RBP4 genes and litter size traits in a hyperprolific line of Landrace × Large White cross sows. Veterinarni Medicina, 64: 109-117.

5. Muñoz G., Ovilo C., Estellé J., Silió L., Fernández A., Rodriguez C. Association with litter size of new polymorphisms on ESR1 and ESR2 genes in a Chinese-European pig line. Genetics Selection Evolution, BioMed Central, 2007, 39 (2), pp.195-206.

6. Omelka R. , Bauerová M., Mlynek J., Buchová B., Peškovičová D., Bulla J. Effect of the oestrogen receptor (ESR) gene on reproductive traits of Large White, White Meaty and Landrace pigs. Czech J. Anim. Sci., 50, 2005 (6): 249–253.

7. Rothschild, M. F., R. G. Larson, C. D. Jacobson, and P. Pearson.1991. Pvu II polymorphisms at the porcine estrogen receptor locus (ESR). Anim. Genet. 22:448

8. Terman A., Kmieć M., Polasik D. bEstrogen receptor gene (ESR) and semen characteristics of boars. Arch. Tierz., Dummerstorf 49 (2006) 1, 71-76.

9. Wu, Z.-F., Liu, D.-W., Wang, Q.-L., Zeng, H.-Y., Chen, Y.-S., & Zhang, H. (2006). Study on the Association Between Estrogen Receptor Gene (ESR) and Reproduction Traits in Landrace Pigs. Acta Genetica Sinica, 33(8), 711–716. doi:10.1016/s0379-4172(06)60103-0.

## ПОИСК МУТАЦИЙ ГЕНА *GRF2-2R* В ОБЛАСТИ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ miRNA396 У РЖИ ПОСЕВНОЙ МЕТОДОМ ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩЕГО ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

**Черноок А. Г. [1,2], Баженов М. С. [1,2], Никитина Е. А [1,2], Панченко В.В.[3]**

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

***2 – Курчатовский геномный центр-ВНИИСБ, Москва 127550***

***3 – ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко», Краснодар 350012***

***E-mail: Irbis-sibrI@yandex.ru***

Быстрые темпы развития современной биотехнологии требуют использования новейших методов для получения результатов исследований. Высокочувствительный анализ плавления (High Resolution Melting, HRM-анализ) — это метод обнаружения полиморфизмов нуклеотидной последовательности ПЦР-ампликонов, основанный на наблюдении процесса денатурации (плавления) двуцепочечной ДНК при строго контролируемом постепенном нагревании. Наблюдение денатурации ДНК происходит с применением интеркалирующего красителя и детекции флуоресценции на приборе в реальном времени. Используя данный метод, можно быстро проанализировать большое количество исследуемого материала.

МикроРНК miR396 вместе со своими мишенями — мРНК генов *Grf* (*growth regulation factors*) регулирует пролиферацию растительных клеток, рост и развитие растений [1,2]. У риса, miR396 контролирует урожай зерна влияя на размер зерновки и архитектуру метёлки [3-6]. Гены *Grf* являются транскрипционными факторами, играющими немалую роль в регуляции усвоения и использования азота растениями. Результаты изучения генов *Grf* могут дать толчок к развитию селекции на улучшенное усвоение азота растениями, что повысит урожайность сельскохозяйственных культур.

Рожь посевная (*Secále cereále* L.) — единственный вид культурной ржи, который широко распространён в мировом земледелии, в том числе и в России, как важнейшая продовольственная и кормовая культура. Из её зерна изготавливают ржаной квас, производят муку, получают крахмал, используют его как сырьё для производства спирта. Также рожь выращивают как сидеральную культуру. Странами-лидерами по выращиванию ржи являются Германия, Россия и Польша.

Для участков генов *GRF* ржи, соответствующих последовательности miR396, нами были подобрали фланкирующие праймеры. Используя коллекцию ржи, предоставленную нам Национальным центром зерна имени П. П. Лукьяненко, мы провели HRM-анализ 9 генов *GRF* в области, кодирующей сайт связывания miR396. Для гена *GRF2-2R* (гомолог гена *TraesCS2A02G398300* пшеницы мягкой) нами было обнаружено несколько температурных кластеров, что предположительно может свидетельствовать о наличии в коллекции нескольких разных аллелей этого гена. В перспективе, планируется исследование эффекта различных аллелей гена *GRF2-2R* на признаки зерна ржи.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-316-90046.

**Список литературы:**

1. Debernardi JM, Mecchia MA, Vercruyssen L, Smaczniak C, Kaufmann K, Inze D, Rodriguez RE, Palatnik JF. Post-transcriptional control of GRF transcription factors by microRNA miR396 and GIF co-activator affects leaf size and longevity. Plant J. 2014 Aug;79(3):413-26. doi: 10.1111/tpj.12567.

2. Liu, D., Song, Y., Chen, Z. and Yu, D. (2009) Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. Physiol. Plantarum, 136, 223–236. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01229.x

3. Che, R., Tong, H., Shi, B., Liu, Y., Fang, S., Liu, D., Xiao, Y. et al (2016) Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. Nat. Plants, 2, 15195. doi: 10.1038/nplants.2015.195

4. Duan, P., Ni, S., Wang, J., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Chen, H. et al (2016) Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. Nat. Plants, 2, 15203. doi: 10.1038/nplants.2015.203

5. Gao, F., Wang, K., Liu, Y., Chen, Y., Chen, P., Shi, Z., Luo, J. et al (2016a) Blocking miR396 increases rice yield by shaping inflorescence architecture. Nat. Plants, 2, 15196. doi: 10.1038/nplants.2015.196

6. Hu, J, Wang, Y., Fang, Y, Zeng, L., Xu, J., Yu, H., Shi, Z. et al (2015) A rare allele of GS2 enhances grain size and grain yield in rice. Mol. Plant, 8, 1455–1465. doi: 10.1016/j.molp.2015.07.002

# ПОИСК ЛОКУСОВ ПОД ДАВЛЕНИЕМ У КРС ТАГИЛЬСКОЙ ПОРОДЫ

**Мишина А.И., Абдельманова А.С., Доцев А.В.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, дом 60, E-mail: arinamishina32@yandex.ru***

Тагильская порода выведена на Среднем Урале в XVIII в. Привольные пастбища, а также обычай выпускать коров зимой на улицу даже в суровые 20 — 30-градусные морозы благоприятствовали созданию ценного молочного скота, приспособленного к местным условиям и суровому климату Урала. Интенсификация животноводства и повсеместное распространение специализированных коммерческих пород, таких как голштинская, привели к уменьшению численности исконно русской породы.

Был проведен попарный анализ значений Fst исследуемой породы в сравнении с голштинской. Попарный анализ Fst показал, что в различных хромосомах наблюдаются SNP, чьи частоты отличаются от нейтральной модели.

Таким образом были обнаружены следы селекции в генах отвечающих за следующие функции: PDXK - Катализирует фосфорилирование пищевых витаминов B6; CFAP221 - Сборка и движение ресничек; SPAG16 - Сборка и организация аксонемы; KLHL5 - Имунный ответ, обработка антигена: убиквитинирование и деградация протеасом; ARF1 - внутриклеточный транспорт белка, везикулярный транспорт; CEP152 - связывание протеинкиназы, сборка центриолей de novo, участвующая в дифференцировке мульти-ресничных эпителиальных клеток; VWA3B - играет важную роль в прикреплении тромбоцитов к местам повреждения сосудов, связываясь с другими белками; MBNL2 - связывание ионов металлов, регуляция альтернативного сплайсинга мРНК через сплайсосомы, последовательно-специфичное связывание двухцепочечной ДНК; LY96 - положительное регулирование выработки фактора некроза опухоли, клеточный ответ на бактериальные липосахариды, воспалительная реакция, врожденный иммунный ответ; PAPPA2 - костный морфогенез, металлопептидазная активность, связывание ионов цинка; ASTN1 - клеточная адгезия нейрона, миграция нейронов, локомоторные функции; CACNA1E - регуляция трансмембранного транспорта ионов, транспорт ионов кальция, химическая синаптическая передача; OXCT1 - Ключевой фермент катаболизма кетоновых тел; - GMDS - Процесс биосинтеза GDP-L-фукозы de novo

Исследование выполнено в рамках Государственного Задания №0445-2019-0024.

**Список литературы:**

1. Зиновьева Н.А., Доцев А.В., Сермягин А.А., Виммерс К., Рейер Х., Солкнер Й., Денискова Т.Е., Брем Г. Изучение генетического разнообразия и популяционной структуры российских пород крупного рогатого скота с использованием полногеномного анализа SNP. С.-х. биология. 2016;51(6):788-800. DOI 10.15389/ agrobiology.2016.6.788rus.
2. Лискун Е.Ф. Русские отродья крупно-рогатого скота. М., 1928.
3. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria, 2012. http:// www.Rproject.org.

# АНАЛИЗ СЕЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ ТОМАТА (*Solanum lycopersucum*) И ИДЕНТИФИКАЦИЯ У НИХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *Ph-3* УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ

**Пырсиков А.С.[1], Чайчук К.Д.[2], Милюкова Н.А.[1]**

***1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550. E-mail: andrey.pyrsikov@yandex.ru***
***2 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева», Москва 127550***

Фитофтороз (или бурая гниль) – крайне вредоносная инфекция, распространенная среди семейства паслёновых, особенно для таких важных сельскохозяйственных культур как картофель и томат. Возбудителем является гриб отдела оомицеты *Phytophthora infestans (Mont.) de Bary*. Проявляется заболевание в виде удлиненных темно-коричневых пятен или полос на стеблях и черешках растений, серовато-бурых – на листьях, коричнево-бурых – на плодах. Пораженные плоды теряют товарные качества, становятся непригодными к дальнейшим циклам реализации (переработка, транспортировка, хранение). Начинаясь с нижних ярусов листьев, патоген постепенно захватывает весь куст томата. Благоприятные условия для заражения – температура ниже 15 градусов и высокая влажность, после чего конидии прорастают в зооспоры, причем каждая способна образовывать до 16 зооспор [1].

Для эффективного предотвращения фитофтороза необходимо применение системных фунгицидов при благоприятных для возбудителя погодных условиях. Однако обильное их применение является довольно дорогостоящим и нежелательным мероприятием с экологической точки зрения, поскольку может привести к появлению новых штаммов фитофторы с более высокой патогенностью. Исходя из чего очевидно, что наилучший вариант для предотвращения эпидемий – создание сортов и гибридов с высокой устойчивостью к фитофторозу.

Все три основных гена устойчивости, используемые в селекции томатов, были ранее идентифицированы у дикого вида томатов *S. pimpinellifolium L* .[2]

Первым зарегистрированным геном устойчивости был *Ph-1*, доминантный ген, картированный на длинном плече хромосомы 7, однако дальнейшие исследования показали, что он не столь эффективен перед преобладающей расой патогена Т-1 *P. infestans* и его селекционная ценность довольно низкая.

Второй ген устойчивости томатов к бурой гнили, *Ph-2*, был идентифицирован в образце West Virginia 700. Обладая неполной доминирующей резистентностью, *Ph-2* был сопоставлен с интервалом 8,4 сМ в нижней части хромосомы 10. Хотя *Ph-2* эффективен против расы Т-1, он преодолевается агрессивными изолятами *P. infestans* и часто ассоциируется просто с уменьшением скорости прогрессирования заболевания, а не с его остановкой. Однако *Ph-2* в настоящее время используется в селекции, особенно в сочетании с геном устойчивости *Ph-3*, который на данный момент является главным источником устойчивости к фитофторозу, используемым в селекции томатов. *Ph-3* является частично доминантным геном, который придает устойчивость широкого спектра действия к ряду изолятов *P. infestans*. Ген *Ph-3* был картирован в длинном плече хромосомы 9 и, подобно всем ранее изученным генам устойчивости, *Ph-3* кодирует белок класса CC-NBS-LRR [3].

Целью данной работы был анализ образцов томата на устойчивость к фитофторозу. В качестве объектов изучения были выбраны 88 селекционных образца культурного томата *Solanum lycopersicum*. После выделения ДНК из образцов была проведена ПЦР с использованием SCAR-маркеров *Ph-3.1/Ph-3.2/Ph-3.2*, позволяющие амплифицировать

фрагмент ДНК длиной от 291 до 380 пар нуклеотидов. Визуализация результатов проводилась посредством электрофореза в агарозном геле.

При изучении 88 образцов с использованием вышеуказанных маркеров были получены следующие результаты: с маркером *Ph-3.1* при электрофорезе выявлены 44 образца с устойчивостью (27 штук дали фрагменты размером 700 пар нуклеотидов, 13 – 400 п.н., 4 – 300 п.н.), с маркером *Ph-3.2* – 62 образца, 300 п.н., с *Ph-3.3* – 35 образцов, интервал 300-400 п.н.

**Список литературы:**

1. Majid R. Foolad, Heather L. Merk, and Hamid Ashrafi. Genetics, Genomics and Breeding of Late Blight and Early Blight Resistance in Tomato. Critical Reviews in Plant Sciences, 2008, 27:75–107, DOI: 10.1080/07352680802147353;
2. Dilip R Panthee, Ann Piotrowski, Ragy Ibrahem. Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) for Resistance to Late Blight in Tomato. International journal of Molecular Science, 2017, 18(7):1589, DOI: 10.3390/ijms18071589.
3. Chunzhi Zhang, Lei Liu, Zheng Zheng, Yuyan Sun, Longxi Zhou, Yohung Yang, Feng Cheng, Zhonghua Zhang, Xiaowu Wang, Sanwen Huang, Bingyan Xie, Yongchen Du, Yuling Bai, Junming Li. Fine mapping of the Ph-3 gene conferring resistance to late blight (Phytophthora infestans) in tomato. Theoretical and applied genetics, 2013, 126(10):2643-53, DOI: 10.1007/s00122-013-2162-1

## ХАРАКТЕРИСТИКА ГОРСКОГО СКОТА ДАГЕСТАНА ПО STR-МАРКЕРАМ

**Волкова[1] В.В., Денискова[1] Т.Е., Абдельманова[1] А.С., Романенкова[1] О.С., Хожоков[2] А.А., Сермягин[1] А.А., Зиновьева[1] Н.А.**

***[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», 142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, дом 60, moonlit_elf@mail.ru***

***[2] Федеральный аграрный научный центра Республики Дагестан — ФГБНУ «ФАНЦ РД», 367014, республика Дагестан, город Махачкала, микрорайон Научный городок, улица Абдуразака Шахбанова, д. 30***

Большие территории горных пастбищ Республики Дагестан, дешевый пастбищный корм и большая продолжительность пастбищного сезона благоприятствуют разведению и выращиванию крупного рогатого скота.

В Дагестане испокон веков занимаются скотоводством и вплоть до тридцатых годов прошлого века разводили в горах и на равнине великокавказский и малокавказский скот. Горский скот создан в результате скрещивания местного скота с животными швицкой, а затем костромской и лебединской пород.

Несмотря на низкую продуктивность горский скот имеет ценные биологические особенности: крепкую конституцию при наличии прочных копыт, выживаемость, неприхотливость, приспособленность к экстремальным горным условиям, где интенсификация скотоводства затруднена природно-географическими условиями.

Цель нашего исследования — характеристика современного аллелофонда и оценка уровня генетического разнообразия горского скота Дагестана с помощью STR-маркеров.

Выборка включала 32 головы горского скота, отобранных в различных регионах во время научной экспедиции. Для сравнения были исследованы 130 образцов 4 пород КРС: красная степная (Республика Дагестан), бурая швицкая (кавказский тип), бурая швицкая (Германия) и симментальская.

Полиморфизм 11 STR-локусов, рекомендованных ISAG для проведения популяционно-генетических исследований крупного рогатого скота, оценивали на 16-канальном капиллярном генетическом анализаторе ABI3130×l (Applied Biosystems, США). Исходные данные о длине аллелей были получены в программном обеспечении Gene Mapper v.4 (Applied Biosystems, США).

Аллельное разнообразие в группе горского скота было максимальным (6,82) по сравнению с другими исследуемыми породами.

Уровень наблюдаемой гетерозиготности варьировал от 0,69 у голштинской породы до 0,74 у симментальской. У горского скота он составил 0,73.

Дефицит гетерозигот обнаружен у горского скота (0,033) и у красной степной (0,028), разводимой в Республике Дагестан.

С помощью кластерного анализа была выявлена эндемичная популяция горского скота. Остальные группы показали высокий уровень принадлежности к собственному кластеру и дифференциацию по различным линиям. Также, выявлено различия в группе бурых швицов между кавказским типом и привезенными из Германии.

Работа проведена в рамках выполнения задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации ГЗ № 0445-2019-0024.

## ГОРДЕИН-КОДИРУЮЩИЕ ЛОКУСЫ ПЛЕНЧАТЫХ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ СЕЛЕКЦИИ ОМСКОГО АГРАРНОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА

**Юсова О.А., Николаев П.Н.**

***ФГБНУ «Омский АНЦ», г. Омск, 644012***
***e-mail: yusova@55anc.ru; nikolaev@55anc.ru***

Основной задачей при создании сортов ячменя является увеличение уровня продуктивности, качества и устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды. Правильный подбор, использование и изучение исходного материала является залогом успеха [1, 2]. Сердцем любой селекционной программы является гибридизация адаптивных сортов [3]. Планомерное скрещивание тщательно подобранных родительских пар (с использованием эколого-географического принципа) в XX веке стало преобладающим методом в селекции культурных растений. В этой связи вполне справедливо утверждение Р.А. Цильке, что для повышения эффективности гибридизации один из компонентов скрещивания должен содержать значительную часть зародышевой плазмы Сибирских сортов [4].

Генетические паспорта по аллелям гордеинкодирующих локусов сортов ячменя селекции ФГБНУ «Омский АНЦ» представлены на официальном сайте ФГБНУ ”Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова” Российской академии наук.

Объект исследований – пленчатые сорта ячменя селекции ФГБНУ «Омский АНЦ» Омский 85, Омский 87, Омский 88, Омский 89, Омский 90, Омский 91, Омский 95.

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 Омский 85, Омский 88 и Омский 89 линейны по гордеин-кодирующим локусам или мономорфными по гордеинам сортами и имеют только один тип электрофореграмм.

Выявленные закономерности гордеин-кодирующих локусов сортов ячменя, безусловно, оказывают влияние на выраженность фенотипа растений [5], в связи с чем приводим краткую характеристику сортов.

Сорт ярового ячменя Омский 85 выведен путем индивидуального отбора из сорта-популяции Белогорский, среднеспелый от всходов до созревания (66-74 суток). Зерно желтое, удлиненное, средней крупности (масса 1000 зерен 33-40 г), средней высоты (50-95 см), засухоустойчивость средняя, среднеустойчив к полеганию.

Сорт ярового ячменя Омский 87 – среднеспелый сорт (от всходов до созревания 64-82 суток). Соломина средней высоты (70-96 см), устойчивость к полеганию высокая, хорошо переносит засуху. Зерно крупное (масса 1000 зерен 49-54 г). Отзывчив на минеральные удобрения, высокоурожаен.

Сорт ярового ячменя Омский 88 степной экологической группы, характеризуется повышенной засухоустойчивостью. Сорт достаточно скороспелый (64-80 суток от всходов до созревания). Устойчив к скрытно-стеблевым вредителям. Зерно желтое, крупное (масса 1000 зерен 44-52 г). По продуктивности сорт относится к высокоурожайным.

Сорт ярового ячменя Омский 89 лесостепной экологической группы, засухоустойчивость средняя, скороспелый (67-73 суток), среднеустойчив к полеганию. Зерно желтое, пленчатое, средней крупности (масса 1000 зерен 35-42 г), высокоурожаен.

Сорта Омский 95, Омский 87, Омский 90 и Омский 91 гетерогенны по гордеин-кодирующим локусам. Они характеризуются двумя и более электрофоретическими спектрами гордеинов, отличающимися по вариантам блоков компонентов, контролируемым, соответственно, одним или более локусами. Гетерогенность сортов 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.

Сорт ярового ячменя Омский 91 относится к степной экологической группе сортов, засухоустойчив, среднеспелый (62-72 суток). Зерно желтое, пленчатое, крупное. Сорт среднерослый (48-62 см), высокоурожайный.

Стандартный сорт Омский 95 также степной экологической группы сортов, засухоустойчив, среднеспелый (74-87 суток), среднерослый (76-95 см), соломина прочная. Содержание белка в зерне в среднем за 5 лет составило 13,7%. Согласно биотестированию in vitro Омский 95 входит в группу сортов с повышенной устойчивостью к неблагоприятным абиотическим факторам среды, в частности к засухе; высокоурожаен.

Сорт Омский 95 представлен двумя биотипами, отличающимися по блокам компонентов, контролируемым аллелями локусов Hrd B и Hrd F.

Сорт двурядного ярового ячменя 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 два биотипа этого сорта: Hrd A2B1F3 и Hrd A12B1F3.

Заключение

В ходе исследований была обнаружена идентичность электрофореграмм отдельных биотипов и сортов ячменя селекции ФГБНУ «Омский АНЦ». Так, сорт Омский 88 имеет идентичную электрофореграмму с одним из биотипов сорта Омский 87, что является результатом родственных связей и общей родословной данных сортов.

**Список литературы:**

1. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Орина А.С., Блинова Е.В., Лоскутов И.Г. Разнообразие видов рода Avena по морфологическим признакам и устойчивости к фузариозу зерна. Экологическая генетика. 2017.15(1):20-29. DOI: 10.17816/ecogen15120-29.

2. Войцуцкая Н.П., Лоскутов И.Г. Селекционная ценность европейских образцов овса в условиях Кубанской Опытной Станции ВИР. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2019.180(1):52-58. https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-52-58.

3. Потанин В.Г., Алейников А.Л., Степочкин П.И. Новый подход к оценке экологической пластичности сортов растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017.18(3):548-552.

4. Цильке Р.А. Изучение наследования количественных признаков мягкой яровой пшеницы в топкроссных скрещиваниях. Генетика. 1975.11(2):15-23.

5. Yusova O.A., Nikolaev P.N., Bendina Ya.B., Safonova I.V., Aniskov N.I. Stress resistance in barley cultivars of various agroecological origin under extreme continental climate conditions. Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2020.181(4):44-55. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-4-44-55.

## АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ГЕНА *LCORL* SNP A503G У КУР ПОРОДЫ ПУШКИНСКАЯ И ИХ ВЛИЯНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСТЕРЬЕРА И ЖИВОЙ МАССЫ

**Пегливанян Г.К.**

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

Рост и развитие животных играют важную роль в производстве, селекции и их адаптации к окружающей среде в изменяющихся климатических условиях [1].

Поиск локусов количественных признаков (QTL) — это один из методов, который предоставляет возможность понять генетическую архитектуру признаков и выявить области генома, контролирующие количественные вариации признаков [2]. Селекция с помощью молекулярных маркеров – один из способов повышения мясной продуктивности сельскохозяйственной птицы. Отбор и подбор родительских пар по хозяйственно-полезным признакам привели к формированию различных популяций в породах кур и увеличению генетического разнообразия.

В научной литературе прослеживается большой интерес к малочисленным породам кур [3]. Связь полиморфных вариантов гена *LCORL* с экстерьерными признаками обнаружена у многих видов сельскохозяйственных животных. Ген *LCORL* влияет на развитие мышц в эмбриогенезе, связан с размерами скелета у кур, с формированием костей, величиной корпуса, с высотой в холке. Этот ген кодирует корепрессороподобный лигандзависимый ядерный рецептор и является транскрипционным фактором, который функционирует в сперматогенезе [4]. Полиморфные варианты в гене *LCORL* в генофондных породах кур мало изучены и являются источником ценной информации для использования в будущих селекционных программах по созданию новых высокопродуктивных линий и пород при изменении конъюнктуры рынка.

Целью нашего исследования был анализ связи генотипов гена *LCOR* A503G с показателями живой массы и экстерьерным профилем у кур пушкинской породы.

Исследования проводили на базе лаборатории молекулярной генетики ВНИИГРЖ. Для исследования была взята порода кур пушкинская 2019 г. вывода (n=104), и 2020 г вывода (n=98) биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (г. Пушкин, Санкт-Петербург). Проводился индивидуальный учет продуктивных признаков у птицы. В возрасте 270 дней определяли живую массу и экстерьерные показатели. Измеряли следующие параметры циркулем (см): длина корпуса, длина корпус+шея, длина бедра, глубина груди, ширина груди в ключицах, ширина таза. И

лентой (см): обхват груди, обхват плюсны, угол груди (градус), длина киля, длина плюсны, длина голени. Объектом исследования послужила ДНК кур, выделенная из крови. Экстракцию геномной ДНК проводили по стандартной методике с использованием протеиназы К и фенола. Для генотипирования использован ПЦР-ПДРФ метод. Биометрическая обработка данных выполнена с помощью программы STATISTICA 10 (Statsoft, Inc./TIBCO, Palo Alto, CA, USA). В результате генотипирования в популяции пушкинской породы 2019 года наблюдалась высокая частота генотипа AG - 0,40, а частота гомозиготных генотипов AA и GG составила 0,31 и 0,29 соответственно. Аналогично для особей 2020 года обнаружено, что частота встречаемости гетерозиготного генотипа AG в гене *LCORL* была выше по сравнению с остальными генотипами (0,55), частота генотипа AA составила 0,25, GG - 0,20.

В популяции кур пушкинская 2019 года значение $\chi^2$ не превысило критического значения 3,84 и составило 1,01. В популяциях кур 2020 года наблюдалось смещение генетического равновесия ($\chi^2$ = 4,05), очевидно, это связано с особенностью выборки или малочисленностью группы. Анализ связи различных генотипов гена *LCORL* показал, что в выборке 2019 года куры с генотипом GG достоверно отличались от особей с другими генотипами по таким показателям как живая масса (GG к AA +0,5 кг при $p \leq 0,05$), длине корпуса ( GG к AG + 0,6 см при $p \leq 0,05$), ширине груди (GG к AA +0,3 см при $p \leq 0,05$), ширине таза (GG к AA +0,4 см при $p \leq 0,05$). В популяции 2020 года наблюдалась достоверная разница между особями с генотипом GG по отношению к особям AA по живой массе (+0,3 кг при $p \leq 0,05$), длине голени (+0,6 см при $p \leq 0,05$), длине корпуса (+0,7 см при $p \leq 0,05$), длине плюсны (+0,4 см при $p \leq 0,05$), ширине плеча (+0,4 см при $p \leq 0,05$), ширине таза (+0,7 см при $p \leq 0,05$).Таким образом, в ходе исследований нами установлены достоверные различия по живой массе и промерам у кур двух популяций породы пушкинская в зависимости от полиморфного варианта гена *LCORL*. В обеих исследуемых популяциях животные с генотипом GG отличались более высокой живой массой и крупным телосложением. Данное обстоятельство можно использовать в селекционной работе с курами.

**Список литературы:**

1. Chen Q., Huang B., Zhan J. et al. Whole-genome analyses identify loci and selective signals associated with body size in cattle. *J Anim Sci*. 2020;98(3): skaa068. doi:10.1093/jas/skaa068.

2. Lien CY., Tixier-Boichard M., Wu SW., Wang WF., Ng CS., Chen CF. Detection of QTL for traits related to adaptation to sub-optimal climatic conditions in chickens. *Genet Sel Evol*. 2017;49(1):39. Published 2017 Apr 20. doi:10.1186/s12711-017-0314-5.

3. Han YJ., Chen Y., Liu Y., Liu XL. Sequence variants of the LCORL gene and its association with growth and carcass traits in Qinchuan cattle in China. *J Genet*. 2017;96(1):9-17. doi:10.1007/s12041-016-0732-0.

4. Ларкина Т.А., Крутикова А.А., Пегливанян Г.К., Дементьева Н.В., Митрофанова О.В. Поиск SNPS в гене FABP2 с помощью секвенирования у генофондных пород кур. Аграрный вестник урала., DOI: 10.32417/1997-4868-2020-200-9-48-54

Исследование выполнено в рамках **государственного задания 0445-2021-0010** с использованием популяций кур из биоресурсной коллекции ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, Пушкин).

# АНАЛИЗ КОЛЛЕКЦИИ ПОДСОЛНЕЧНИКА НА ЛОКУС *Pl6*, ОТВЕЧАЮЩИЙ ЗА УСТОЙЧИВОСТЬ *HELIANTHUS ANNUUS* К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ

**Сидоров Л.А.[1], Милюкова Н.А.[2], Пырсиков А.С.[2]**

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

***2 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева», Москва 127434***

Ложная мучнистая роса подсолнечника (ЛМР) - это заболевание растения, которое вызывается возбудителем *Plasmopara halstedii* (Farl.) из порядка *Peronosporales*, который принадлежит к оомицетам. Является облигатным паразитом, образует в органах растения толстую ветвящуюся границу диаметром 6-9 мкм с зернистым бесцветным или желтоватым содержимым. Источниками первичной инфекции являются ооспоры, которые сохраняются в почве до 10 лет; источником вторичной инфекции являются зооспоры. Проявляется одновременно, как и системно, так и локально. Симптомами заболевания являются белый налёт на нижней стороне листа, отсутствие гелиотропизма, замедленный рост, укороченные междоузлия, карликовость.

Устойчивость к ложной мучнистой росе обуславливается группой генов, обозначенные как *Pl*. К данному моменты было идентифицировано 22 гена, но из-за небольшого их разнообразия в культуре подсолнечника за последние 50 лет появились более вирулентные расы возбудителя, поэтому необходимо вводить в сорта и гибриды как можно более широкий спектр генов устойчивости, насколько это возможно. Одним из наиболее перспективных локусов на данный момент является *Pl6*, так как обеспечивает устойчивость почти ко всем расам *P. halstedii*, за исключением одной. Он представляет из себя кластер из 13 генов, которые относятся к TIR-NBS-LRR классу, расположен в восьмой группе сцепления LG. К настоящему моменту известно 14 маркеров данного локуса, которые названы NBS1-14; они отличаются по размеру (InDel).

Целью настоящего исследования являлся анализ коллекции подсолнечника (*H. annuus*), как грызовых, так и масличных на устойчивость к ЛМР. Работа была проведена на базе лаборатории маркерной и геномной селекции ФГБНУ ВНИИСБ.

В ходе анализа было изучено 26 образцов подсолнечника (*H. annuus*), проведено выделение ДНК и постановка ПЦР. В исследовании использованы четыре пары STS-маркеров HAP3 424 и 361, которые идентифицируют устойчивость; и HAP 857 и 14678, которые дают информацию об восприимчивости организма растения к заболеванию. Продукты ПЦР разделены электрофорезом в агарозном геле.

В ходе анализа было выявлено, что всего из коллекции восприимчиво к заболеванию 12 образцов, среди которых присутствуют как и масличные, так и грызовые; 5 образцов оказались устойчивыми, все из них принадлежат к масличной группе. Остальные девять образцов требуют дальнейшего изучения.

**Список литературы:**

1. Рамазанова, С.А. Маркирование локусов *Pl5, Pl6* и *Pl8*, контролирующих устойчивость к *Plasmopara halstedii* у линий подсолнечника селекции ВНИИМК / С.А. Рамазанова, Т.С. Антонова // Масличные культуры, 2018. - №3 (175). - P.25-29.

2. 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. – Vol. 104. – P. 592–600.

3. Friskop, A. (2009). Downy Mildew of Sunflower. / A. Friskop, S. Markell, G.Tom // Sunflower Publications. IPM Publications, 2009.

4. Panković, D. Development of co-dominant amplified polymorphic sequence markers for resistance of sunflower to downy mildew race 730 / D. Panković, N. Radovanović, S. Jocić, Z. Satovic, D. ŠKorić // Plant Breeding, 2007. - Vol. 126(4). - P.440 - 444.

5. Pecrix, Yann Ten. Broad Spectrum Resistances to Downy Mildew Physically Mapped on the Sunflower Genome / Y. Pecrix, C. Penouilh-Suzette, S. Muños, F. Vear, L. Godiard // Front. Plant Sci., 2018. - P.110-112.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ОВЕЦ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-ЧИПОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ

**Денискова Т.Е., Доцев А.В., Шахин А.В., Родионов А.Н., Зиновьева Н.А.**

***ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Дубровицы 142132; E-mail: horarka@yandex.ru***

Согласно официальным данным, в России разводится двенадцать грубошерстных пород овец. Романовская порода значительно отличается по своим фенотипическим (тощий хвост, а не жирный) и пролиферативным особенностям (многоплодность и внесезонный эструс), а также по своему происхождению (европейское) от остальных грубошерстных пород. По многоплодию овцематки романовской породы превосходят другие российские породы и большинство мировых пород в 2,5-3 раза. Благодаря репродуктивным особенностям, романовская порода известна за пределами России: в США и Канаде были созданы ассоциации заводчиков романовской породы: North American Romanov Sheep Association (NARSA) и Romanov | Alberta Sheep Breeders' Association, а во Франции на её основе была получена порода Romane (или INRA 401). Помимо чистопородного разведения, широко распространено скрещивание романовских овцематок с баранами коммерческих мясных пород для увеличения выхода помесных товарных ягнят. Высокие пролиферативные качества романовской породы делают её идеальной материнской формой для создания ресурсных популяций, что было подтверждено экспериментально на ферме ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста.

Несмотря на указанные преимущества, романовская порода в настоящее время находится в пограничном состоянии и частично вытесняется жирнохвостыми породами с более высокой мясной продуктивностью (карачаевская, тувинская короткожирнохвостая и эдильбаевская).

В связи с этим, актуальным является анализ современного генетического состояния романовской породы с использованием информативных ДНК-технологий. В качестве материала для исследования были использованы образцы ткани овец романовской породы (n=48). Генотипирование отобранных образцов осуществлялось с использованием ДНК-чипов высокой плотности Ovine Infinium® HD SNP BeadChip («Illumina, Inc.», США), которые сканировались на приборе iScan Reader. Биоинформационная обработка данных генотипирования проводилась в программе в программе PLINK 1.90. и в R пакете “diveRsity”.

Анализ генетического разнообразия показал, что наблюдаемая гетерозиготность в изучаемой выборке овец романовской породы составила 0,368 и превышала среднее значение аналогичного показателя у одиннадцати грубошерстных пород (0,334). Для всех исследуемых пород овец, в том числе романовской, был зафиксирован незначительный избыток гетерозигот, который составил 3% у романовской породы и 1% в среднем по одиннадцати породам. По аллельному разнообразию особи романовской породы также превосходили жирнохвостых грубошерстных овец: 1,918 против 1,883, соответственно.

Таким образом, было установлено, что романовская порода обладает значительным запасом генетического разнообразия и не находится в критическом состоянии. Геномные исследования романовской породы будет продолжены, в том числе будет проведен поиск генетических вариантов, отвечающих за высокие пролиферативные качества, с целью использования полученной информации для улучшения воспроизводительных признаков малоплодных пород овец.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и ННФИ в рамках научного проекта № 20-516-56002.*

## РАЗРАБОТКА МАРКЕРОВ К ГЕНАМ, СВЯЗАННЫМ С СОДЕРЖАНИЕМ КРАХМАЛА В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM* L.

**Куваева Д.Д., Сергеева Е.М., Щербань А.Б, Афонников Д.А., Салина Е.А., Кочетов А.В.**

***ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск 630090***
***E-mail: diana.kuvaeva@gmail.com***

Крахмал является основным запасным углеводом растений, составляет до 85% сухой массы употребляемых в пищу частей возделываемых культур (клубни, зерна, фрукты). Крахмал широко применяется в пищевой и непищевой промышленности, главным образом в качестве продукта питания человека и животных, а также как сырьё для производства этанола, тканей, бумаги, фармацевтических препаратов. Картофель *Solanum tuberosum* L. – четвертая по значимости сельскохозяйственная культура-продуцент крахмала (после кукурузы, риса, пшеницы). Содержание крахмала в клубнях – один из важных агрономических признаков картофеля. Для селекции сортов картофеля с повышенным содержанием крахмала, требующимся для нужд различных отраслей промышленности, необходима разработка эффективных молекулярных маркеров, связанных с целевым признаком. На ряде зарубежных популяций картофеля выявлены генетические локусы количественных признаков (QTL – Quantitative Trait Locus), связанные с содержанием крахмала в клубнях [1, 2, 3].

Целью исследования является разработка ДНК-маркеров к генам, связанным с повышенным содержанием крахмала в клубнях картофеля сортов отечественной селекции. Для 18 сортов картофеля из коллекции СибНИИРС проведен анализ содержания крахмала по ГОСТ и с использованием ферментативного метода. Выделены группы сортов, различающиеся по содержанию крахмала в клубнях (низкое <14%; среднее 14-16%; высокое >16%). При этом для маркеров, ранее разработанных для зарубежных коллекций картофеля [4, 5], было показано отсутствие их связи с содержанием крахмала у изучаемой выборки отечественных сортов. В связи с этим была поставлена задача поиска новых генетических полиморфизмов, связанных с вариацией по содержанию крахмала у отечественных сортов картофеля. Выполнено секвенирование (методами Сэнгера и Illumina) последовательностей 25 генов, участвующих в синтезе крахмала в клубнях [6] у сортов с низким (Крепыш, Невский, Жуковский ранний) и с высоким и средним содержанием крахмала (Удача, Голубизна, Гусар). В результате были выявлены однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в участках генов ферментов АДФ-глюкозопирофосфорилазы *AGPL1, AGPL3,* α-гликанфосфорилазы *Pho1b, Pho2b,* крахмалсинтаз *SS1, SS2,* α-амилазы *AMY3,* сахарозосинтазы *SUS4* и ингибитора инвертазы типа Кунитц *KT-InvInh*, характерные для групп сортов с низким и средне-высоким содержанием крахмала. Для данных групп сортов были подобраны 30 специфичных комбинаций ПЦР-праймеров, которые были протестированы на выборке из 16 сортов картофеля.

Работа выполнена за счет финансирования Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН (075-15-2019-1662).

**Список литературы:**

1. Fischer M. et al. Novel candidate genes influencing natural variation in potato tuber cold sweetening identified by comparative proteomics and association mapping //BMC plant biology. – 2013. – Т. 13. – №. 1. – С. 1-15.
2. Schreiber L. et al. SNPs in genes functional in starch-sugar interconversion associate with natural variation of tuber starch and sugar content of potato (Solanum tuberosum L.) //G3: Genes, Genomes, Genetics. – 2014. – Т. 4. – №. 10. – С. 1797-1811.
3. Schönhals E. M. et al. Identification and reproducibility of diagnostic DNA markers for tuber starch and yield optimization in a novel association mapping population of potato (Solanum tuberosum L.) //Theoretical and Applied Genetics. – 2016. – Т. 129. – №. 4. – С. 767-785.
4. Li L. et al. Natural DNA variation at candidate loci is associated with potato chip color, tuber starch content, yield and starch yield //Theoretical and applied genetics. – 2008. – Т. 116. – №. 8. – С. 1167-1181.
5. Li L. et al. Validation of candidate gene markers for marker-assisted selection of potato cultivars with improved tuber quality //Theoretical and Applied Genetics. – 2013. – Т. 126. – №. 4. – С. 1039-1052.
6. Van Harsselaar J. K. et al. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (Solanum tuberosum L.) //BMC genomics. – 2017. – Т. 18. – №. 1. – С. 1-18.

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РОССИЙСКИХ ЛОКАЛЬНЫХ ПОРОД ОВЕЦ, ОСНОВАННЫЙ НА ПОЛИМОРФИЗМЕ ГЕНА ЦИТОХРОМА Б МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

**Кошкина О.А., Денискова Т.Е., Соловьева А.Д., Зиновьева Н.А.**

***ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства - ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», группа геномики и генетики мелкого рогатого скота, Дубровицы 142132***

Генетическое разнообразие популяций сельскохозяйственных животных играет жизненно важную роль в формировании признаков, ответственных за улучшение, выживание и адаптацию биологического вида [1]. Изучение генетической изменчивости современных аборигенных пород овец позволит накопить знания об их происхождении и расселении, а также понять влияние человеческой деятельности на овец с момента одомашнивания, что является актуальной задачей в современном мире. Одним из эффективных подходов к оценке генетического разнообразия является исследование митохондриальной ДНК (мтДНК). Филогенетический анализ проводится на основе данных о полиморфизме контрольной области (D-петли) или гена цитохрома B (*CytB)* [2-6]. В связи с этим, целью нашей работы стало изучение генетического разнообразия и определение гаплотипической изменчивости и гаплогруппной принадлежности российских пород овец на основе последовательностей гена *CytB*.

Работа проводилась на 56 образцах овец, принадлежащих к 24 российским породам, в том числе к девяти тонкорунным, четырем полутонкорунным и одиннадцати грубошерстным породам. Нуклеотидную последовательность гена *CytB* мтДНК определяли методом секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS) на основе амплификации трех перекрывающихся фрагментов мтДНК. Полученные продукты ПЦР очищали с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard (ЗАО Евроген, Россия) и использовали для подготовки библиотек, которые затем секвенировали на секвенаторе MiSeq («Illumina Inc.», США).

Последовательность гена *CytB* была выравнена в программном обеспечении MEGA 7.0.26 [7]. Для построения медианной сети было использовано программное обеспечение PopART 1.7 [8]. Определение наилучших моделей эволюции выполняли с помощью программы PartitionFinder 2 [9]. Анализ AMOVA проводился в программе Arlequin 3.5.2.2 [10]. Построение байесовского филогенетического дерева выполнили в программе MrBayes 3.2.7 [11] с последующей визуализацией в FigTree 1.4.3 [12]. В качестве аутгруппы была использована последовательность гена *CytB* снежного барана (Ovis nivicola) (Gene Bank accession number NC_039431.1). В программе DnaSP 6.12.01 [13] рассчитывали количество полиморфных сайтов (S), среднее число нуклеотидных различий (K), количество гаплотипов (H), гаплотипическое разнообразие (Hd), нуклеотидное разнообразие (π).

На основе полученных сиквенсов были построены филогенетическое дерево и медианные сети соединения гаплотипов, определено гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие в изучаемой выборке овец. В целом породы показали высокое генетическое разнообразие. Всего было выявлено 39 гаплотипов, при этом группы тушинской и тувинской пород были представлены единственным гаплотипом. Наибольшая генетическая дифференциация по результатам анализа AMOVA была обнаружена между породами (90,07%). Анализируемые особи принадлежали к гаплогруппам A, B, C и D, что в целом соответствует результатам предыдущих исследований у представителей иностранных пород овец [2-6]. Исследование будет продолжено на увеличенных выборках с привлечением более широкого спектра локальных пород овец, обитающих на территории России и стран СНГ.

*При выполнении исследований было использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста. Работа проведена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (РНФ № 21-66-00007). Пробы овец были получены в рамках выполнения задания Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 0445-2019-0024).*

**Список литературы:**

1. Sheriff O., Alemayehu K. Genetic diversity studies using microsatellite markers and their contribution in supporting sustainable sheep breeding programs: a review. Cogent Food Agriculture, 2018. 4:1459062.

2. Guo J., Du L.X., Ma Y.H., Guan W.J., Li H.B., Zhao Q.J., Li X., Rao S.Q. A novel maternal lineage revealed in sheep (Ovis aries). Animal genetics, 2005. 36(4): 331-336.

3. Wood N.J., Phua S.H. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. Animal genetics, 1996. 27(1): 25-33.

4. Hiendleder S., Mainz K., Plante Y., Lewalski H. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. The Journal of heredity, 1998. 89(2): 113-120.

5. Pedrosa S., Uzun M., Arranz J.J., Gutiérrez-Gil B., San Primitivo F., Bayón Y. Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. Proceedings. Biological sciences, 2005. 272(1577): 2211-2217.

6. Tapio M., Marzanov N., Ozerov M., Cinkulov M., Gonzarenko G., Kiselyova T., Murawski M., Viinalass H., Kantanen J. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. Molecular biology and evolution, 2006. 23(9): 1776-1783.

7. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular biology and evolution, 2016. 33(7): 1870-1874.

8. Leigh J.W., Bryant D. Popart: Full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol. Evol, 2015. 6: 1110–1116.

9. Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M., Senfeld T., Calcott B. PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. Molecular biology and evolution, 2017. 34(3): 772-773.

10. Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular ecology resources, 2010. 10(3): 564-567.
11. Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic biology, 2012. 61(3): 539-542.
12. Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. [(accessed on 30 July 2021)]; Available online: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree.
13. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. Molecular biology and evolution, 2017. 34: 3299–3302. (doi: 10.1093/molbev/msx248).

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ 1BL/1RS ТРАНСЛОКАЦИИ У ПШЕНИЦЫ

**Коробкова В.А.[1], Черноок А.Г.[1], Дивашук М.Г.[1], Архипов А.В.[1], Яновский А.С.[2], Воропаева А.Д.[2]**

***1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550***
***2 – ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко», Краснодар 350012. E-mail: bowlingistka@gmail.com***

Один из подходов к увеличению генетического разнообразия пшеницы основан на интрогрессивной гибридизации, обеспечивающей перенос новых генов в геном пшеницы. Этот способ использовался для получения высоко адаптивных линий пшеницы с 1BL/1RS замещением от ржи. 1RS фрагмент хромосомы ржи несет гены устойчивости к бурой ржавчине (*Lr26*), стеблевой ржавчине (*Sr31*), мучнистой росе (*Pm8*), а также жёлтой ржавчине (*Yr9*), вирусу полосатой мозаики (*Wsm*) и тле (*Gbr*) [1, 2]. Данный тип транслокации может не только способствовать устойчивости сортов пшеницы к комплексу болезней, но и увеличению массы зёрен, адаптивности сортов, и, как следствие, повышению их урожайности [1]. Однако короткое плечо ржаной хромосомы 1R несёт гены, кодирующие запасные белки ржи – секалины (*Sec1, Sec1a, Sec1b*), которые оказывают негативное влияние на хлебопекарные качества зерна [2]. Изменяется фракционный состав белка, снижается объёмный выход хлеба, показатель седиментации и реологические свойства теста.

Нами были исследованы на предмет наличия 1BL/1RS транслокации 396 сортов и линий твёрдых пшениц и 204 мягких пшениц, коллекции НЦЗ им П.П. Лукьяненко. Среди всех изученных нами образцов твёрдой пшеницы не было выявлено 1BL/1RS замещения. По нашим исследованиям у одной трети сортов мягкой пшеницы данная транслокация присутствует. Наличие пшенично-ржаного замещения 1BL/1RS определяли с помощью молекулярного маркера SCM-9 и KASP-маркера 1B1R_6110. Использование двух систем маркеров показало схожие результаты и выявило преимущества и недостатки каждой из систем: SCM-9 доминантный маркер, который также показывает наличие 1AL/1RS транслокации, а 1B1R_6110 кодоминантный маркер, однако он не показывает наличие 1AL/1RS транслокации, что при анализе может быть критичным для селекционного процесса.

Несмотря на то, что при создании форм твёрдой пшеницы используют мягкие пшеницы, имеющие 1BL/1RS замещение, частота встречаемости данного замещения у твёрдых пшениц очень низкая, что подтверждается в наших исследованиях. Причиной

этого может выступать выбраковка образцов при оценке на качество продукции в контрольных питомниках и в конкурсном сортоиспытании, если образцы имеют низкую седиментацию (SDS < 35 ед.) и низкую прочность макаронных изделий. Кроме этого, существует трудность передачи транслокации от родительских форм на начальных этапах селекции, связанная с гаметическим отбором в процессе гибридизации [2].

Чтобы достоверно судить о наличии 1BL/1RS замещения необходимо проводить проверку на разных этапах селекционного процесса с помощью молекулярных маркеров. Это может послужить одним из этапов MAS-селекции пшеницы на улучшение адаптивных свойств и дать возможность селекционерам проводить более точный отбор форм с наличием или отсутствием данной транслокации в процессе создания сорта.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ№ 21-16-00121

**Список литературы:**

1. Фомина Е. А. и др. Распространение 1BL. 1RS транслокации в коллекции сортов и линий озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Молекулярная и прикладная генетика. – 2014. – Т. 17. – С. 54–61.

2. Козуб Н. А., Созинов И. А., Созинов А. А. Сопряженность 1BL/1RS транслокации с качественными и количественными признаками у мягкой пшеницы *T. aestivum* // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35. – №. 5. – С. 74–80.

## ИНДЕКС ЭНЕРГЕТИЧЕСКИ КОРРЕКТИРОВАННОГО МОЛОКА КАК БИОМАРКЕР ПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КОРОВ

**Лашнева И.А., Сермягин А.А.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», 142132, Московская область, Городской округ Подольск,***
***e-mail: lashnevaira@gmail.com***

Всемирная тенденция увеличения молочной продуктивности в скотоводстве в течение последних десятилетий сопровождалась ростом проблем со здоровьем и фертильностью у животных. Как известно, коровам требуется достаточное количество энергии, потребляемой с кормом, для поддержания продуктивности и физиологического статуса. Корма, как правило, схожи по общему содержанию энергии, но сильно различаются по её доле, которая необходима для обеспечения жизнедеятельности организма коровы и продуцирования ею молока. Оставшаяся часть энергии корма теряется с экскрементами и избыточным тепловыделением коровы. Лактирующему животному требуется 0,74 Мкал чистой энергии для производства 1 кг молока, содержащего 4,00 % жира, а общая энергетическая ценность большинства кормов колеблется от 0,9 до 2,2 Мкал чистой энергии на кг сухого вещества. В этой связи определение эффективности преобразования корма в молоко (ECM, energy-corrected milk) может помочь в определении продуктивности коров или стада для оптимизации стратегии менеджмента.

Цель исследования заключалась в проведении сравнительной оценки показателей продуктивности и функциональных качеств коров на основе расчета индекса энергетически корректированного молока (ECM). Исследовательская база данных включала около 44000 записей от 11574 коров черно-пестрой и голштинской пород из 25 хозяйств Московской области. Была проведена оценка суточной молочной продуктивности коров на основе анализа 11 показателей состава молока, ряда признаков молочной продуктивности и воспроизводительных качеств за последнюю законченную лактацию. Информационный массив формировался с использованием выгрузки результатов анализатора CombiFoss 7

(FOSS, Дания) и баз данных племенного учета ИАС «СЕЛЭКС. Молочный скот» (РЦ Плинор, Россия). Расчет ЕСМ проводился на основе формулы, предложенной Tyrrell и Reid (1965) в модификации Schwarz (2020) как сумма произведений весовых коэффициентов с показателями массовой доли жира, белка и удоя.

Средние значения суточных показателей компонентов молока по стаду составили: 24,1 кг для удоя, 4,49% – массовой доли жира (МДЖ), 3,43% – массовой доли белка (МДБ), 4,85% – массовой доли лактозы (МДЛ), для индекса ЕСМ – 25,8 кг. Максимальные коэффициенты вариации наблюдались для оценки количества соматических клеток – 52,6% (ОКСК), бета-гидроксибутирата (БГБ) – 103,6% и следов ацетона – 75,4%. Минимальная фенотипическая вариабельность показана для СОМО –

3,7%, точки замерзания (ТЗ) – 4,2%, МДЛ – 5,6%, сухих веществ (СВ) – 6,3%, МДБ – 8,2% и показателя трудности отела – 5,6%. Средний удой за последнюю законченную стандартную лактацию по выборке коров составил 7870 кг молока, 4,28% МДЖ, 3,30% МДБ. При сопоставлении исследуемых животных на две группы (выше и ниже среднего значения индекса ЕСМ, т.е. «+» и «-» варианты) были выявлены достоверные различия для всех показателей состава молока: суточный удой (30,0 кг против 17,7 кг для «+» и

«-» вариантов соответственно), МДЖ (4,59% против 4,38%), МДБ (3,40% против 3,46%), МДЛ (4,90% против 4,79%), СВ (13,49% против 13,18%), СОМО (10,13% против 10,07%), ТЗ (-0,599 против -0,594 ) и показателей метаболического статуса (мочевина (27,1 мг×100 мл$^{-1}$ против 24,4 мг×100 мл$^{-1}$), ацетон (0,414 мМоль/л против 0,553 мМоль/л) и БГБ (0,203 мМоль/л против 0,181 мМоль/л).

У коров, для которых отмечены низкие значения ЕСМ («-» варианты относительно «+» вариант) наблюдается увеличение средней продолжительности сервис-периода на +18,6 дн. и дойных дней на +16,8 дн. Для этой группы животных отмечены и более высокие показатели количества соматических клеток (657 тыс.ед/мл), что так же может сигнализировать о физиологическом статусе в организме коров. У животных с индексом ЕСМ ниже средних показателей составляла доля трудных отелов была выше (5,59%), по сравнению с животными, имеющими высокий индекс ЕСМ (4,03%).

Данные исследования показали возможность применения расчета индекса ЕСМ на примере популяции молочного скота Московской области. Расчет ЕСМ может быть использован в качестве одного из биомаркеров первичного контроля и менеджмента в стаде. Исследования будут продолжены в направлении изучения генетической изменчивости данного показателя с целью включения его в процесс совершенствования признаков продуктивности и воспроизводительных качеств крупного рогатого скота.

**Список литературы:**

1. Tyrrell H.F., Reid J.T. Prediction of the energy value of cow's milk // J. Dairy Sci. (1965). 48, 1215–1223. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(65)88430-2.

2. Schwarz D., Kleinhans S., et al. Investigation of dairy cow performance in different udder health groups defined based on a combination of somatic cell count and differential somatic cell count // Preventive Veterinary Medicine 183 (2020) 105123 https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020

3. . Navid Ghavi Hossein-Zadeh. Estimation of genetic parameters and trends for energy-corrected 305-d milk yield in Iranian Holsteins // Archiv fur Tierzucht (2012) 55(5):420-426 DOI:10.5194/aab-55-420-2012

# СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS*) НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

**Шалаева Т.В., Шилов И.А.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, Россия, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42***
***E-mail: shalaeva.tv@mail.ru, ishilov@rambler.ru***

Сахарная свёкла (*Beta vulgaris L.*) является важной технической культурой, корнеплоды которой используют, в основном, для получения сахара. В 2020 году доля семян сахарной свёклы отечественной селекции составляла 3,05% от всей площади посева, поэтому создание высокопродуктивных гибридов является приоритетным направлением в селекции сахарной свёклы. Коммерческие гибриды сахарной свёклы получают в результате сложного, минимум трёхкомпонентного, скрещивания выровненных МС-линии, линии(й) О-типа и линии(й)-опылителя. Такие линии отбирают путем продолжительного повторяющегося самоопыления по морфологическим и хозяйственно-ценным признакам (урожайность, содержание сахара и др.). При этом возможность использования фенотипических признаков при отборе ограничена их зависимостью от условий выращивания и стадии развития растений [1].

Для получения выровненных высокопродуктивных гибридов сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) и сокращения сроков селекционного процесса необходима технология генетического анализа, позволяющая проводить оценку однородности исходных компонентов и гибридности получаемого материала.

В настоящее время наиболее перспективным подходом для различения и идентификации растительных форм на генетическом уровне является анализ полиморфизма микросателлитных локусов, с помощью которого можно получить индивидуальную характеристику каждого отдельного генотипа – ДНК-профиль [2]. Микросателлитные маркеры (SSR – маркеры) являются эффективным инструментом для изучения генетического разнообразия, поскольку они равномерно распределены в геноме растений и характеризуются специфичным расположением на хромосоме, высокой вариабельностью, точностью воспроизведения результатов и кодоминантным типом наследования, что позволяет получать информацию о гомозиготном или гетерозиготном состоянии локусов.

Целью данной работы является исследование микросателлитных локусов генома сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) и создание на их основе системы генетической паспортизации линий и гибридов.

На первоначальном этапе в исследование было взято 40 микросателлитных локусов [3, 4, 5]. Для различения и идентификации образцов сахарной свёклы были отобраны 13 локусов с наибольшей вариабельностью длин микросателлитных фрагментов (аллелей). Исследование проводили на 129 линиях сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.), включающих 24 МС-линии, 28 линий О-типа, 76 линий-опылителей и гибрид Доротея, предоставленных ФГБНУ Первомайская селекционно-опытная станция сахарной свёклы. В результате показана высокая степень однородности у 35 линий, из которых у 13 линий степень гомогенности составила 100 % [6]. Данные линии были вовлечены в селекционный процесс, в результате которого были созданы перспективные гибриды Успех, Азимут, Рубин, Первомайский, а также новые гибриды Фрегат и Корвет, переданные в Государственное испытание с 2020 года.

В настоящее время фокус исследования направлен на изучение нуклеотидных последовательностей микросателлитных локусов генома сахарной свёклы с целью создания

надёжной системы генотипирования линий и гибридов с последующей валидацией на обширной коллекции растительных образцов.

**Список литературы:**

1. Федулова Т.П. Теоретические и практические аспекты молекулярно-генетического маркирования в селекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.)* Автореферат докторской диссертации. – С. – 44.

2. Шилов И.А. Применение технологии микросателлитного анализа ДНК в растениеводстве// Проблемы агробиотехнологии; под ред. П.Н. Харченко. - М., 2012. - С. 140 - 162.

3. McGrath J.M. An open-source first - generation molecular genetic map from a sugar beet × table beet cross and its extension to physical mapping / J.M. McGrath, D. Trebbi, A. Fenwick, L. Panella, B. Schulz, V. Laurent, S. Barnes, S.C. Murray. // The Plant Genome. – 2007. – No. 1. – P. 27 – 44.

4. Fugate K.K. Generation and Characterization of a Sugarbeet Transcriptome and Transcript-Based SSR Markers / K.K. Fugate, D. Fajardo, B. Schlautman, J.P. Ferrareze, M.D. Bolton, L.G. Campbell, E. Wiesman, J. Zalapa // The Plant Genome. – 2014. –Vol. 7. – № 2. – P. 1–13.

5. Richards C.M. Polymorphic microsatellite markers for inferring diversity in wild and domesticated sugar beet (Beta vulgaris) / C.M. Richards, M. Brownson, S.E. Mitchell, S. Kresovich, L. Panella // Molecular Ecology Notes. – 2004. – Vol. 4. –No. 5. – P. 243 –245.

6. И.А. Шилов, Ю.В. Анискина, Т.В. Шалаева, О.С. Колобова, Н.С. Велишаева, В.Н. Мищенко, А.В. Логвинов Создание современных гибридов сахарной свёклы с применением микросателлитного анализа // Сахар, 2020, № 8, С. 27 – 31.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ *Ty-2* И *Ty-3* ДЛЯ ОЦЕНКИ КОЛЛЕКЦИИ ОБРАЗЦОВ ТОМАТА (*Solanum lycopersicum*) НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИРУСУ ЖЁЛТОЙ КУРЧАВОСТИ ЛИСТЬЕВ ТОМАТА (TYLCV)

**Почитаньева Н.В.[1], Пырсиков А.С.[2], Милюкова Н.А.[2]**

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

***2 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева», Москва 127434***

Вопрос повышения урожайности одной из наиболее активно потребляемых культур во всём мире – томата – представляет большой интерес для современной аграрной науки. Отдельного внимания заслуживают заболевания культуры различной этиологии – поражённые посадки претерпевают сильные предуборочные потери, а борьба с возбудителями требует комплексного подхода. В настоящее время среди известных заболеваний томата одним из наиболее опасных по праву считается вирус жёлтой курчавости листьев томата, или TYLCV (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*) [5]. Огромная скорость распространения, в том числе в новых регионах, а также риск потери до 100% урожая делают изучение природы устойчивости к TYLCV особенно важным [1, 3, 4].

Данный вирус относится к самому многочисленному роду семейства *Geminiviridae* – роду *Begomovirus*, разные виды которого могут иметь как один (монопартильные), так и два (бипартильные) типа ДНК в своём геноме. Монопартильные вирусы, к которым относят TYLCV, не имеют ДНК-В. Её функции выполняют белки, входящие в состав капсида, закодированные в ДНК-А. Генетический материал вируса упакован в капсид из двух частей, каждая их которых имеет форму неполного икосаэдра [5].

Признаки поражения вирусом различаются по степени проявления в зависимости от стадии развития растения, на которой произошло заражение. Поражённые сеянцы сильно угнетаются в росте, проявляя все признаки заболевания в яркой форме: листья укороченные, хлоротичные, заворачивающиеся чашеобразно вверх, междоузлия сокращены и утолщены, растение не формирует плодов. Поражённое цветущее или плодоносящее растение начинает проявлять симптомы только через 1-2 недели после инокуляции [5]. Сформировавшиеся до заражения органы сохраняют нормальную структуру, плоды дозревают, однако новые органы подвергаются деформации, цветки опадают, новые плоды не завязываются.

Единственным способом распространения вируса, поражающего порядка 49 видов растений, является его переносчик - табачная белокрылка (*Bemisia tabaci*) [5]. Поэтому основные методы борьбы с ним, как правило, сводятся к уничтожению вредителя инсектицидами или биологическим путём (с помощью ос *Encarsia formosa*). Кроме того, в окрестностях посадок уничтожается сорная растительность, поражаемая TYLCV.

Описанные меры существенно повышают стоимость продукции, не всегда безопасны с экологической точки зрения и редко способны защитить культуру полностью, особенно при выращивании её в открытом грунте [2]. Более безопасной и в то же время эффективной мерой по защите посадок от вируса является выведение устойчивых сортов и гибридов томата. Современные молекулярно-генетические технологии, такие как маркерная селекция устойчивости, делают этот метод более эффективным, значительно ускоряя селекционный процесс.

Генетика устойчивости культуры к TYLCV активно изучается. В настоящий момент известно 6 генов, сопряжённых с устойчивостью к заболеванию: *Ty-1/Ty-3, Ty-2, Ty-4, Ty-5* и *Ty-6,* расположенные на разных хромосомах [3, 4, 5]. Поскольку культурные растения утратили гены устойчивости, основным источником их интрогрессии являются дикие виды рода *Solanum*, такие как *S. chilense* (*Ty-1,Ty-3,Ty-4,Ty-6*), *S. habrochaites* (*Ty-2*), *S. peruvianum* (*Ty-5*) [3,4] и некоторые другие. Среди перечисленных генов отдельно стоит отметить *Ty-2* и *Ty-3*. Отличающийся от аллельного ему *Ty-1*, ген *Ty-3* способствует устойчивости не только к монопартильному TYLCV, но и к бипартильному ToMoV [1]. Локус *Ty-2* локализован близко к локусу *I-2*, отвечающему за устойчивость к фузариозу расы 2, что потенциально полезно для формирования устойчивости к обоим заболеваниям одновременно.

Цель данного исследования состояла в идентификации аллелей генов *Ty-2* и *Ty-3* в коллекции селекционных образцов культурного томата для дальнейшей их характеристики по устойчивости к вирусу желтой курчавости листьев (TYLCV). Для достижения поставленной цели были использованы маркеры Ty2-UpInDel и Ty3-SCAR1, соответственно [1, 2, 3]. Данные SCAR маркеры созданы для обнаружения InDel в участках изучаемых генов. Маркер Ty2-UpInDel позволяет увидеть на электрофореграмме участок длиной 120bp у устойчивых и 213bp у восприимчивых образцов. Ty3-SCAR1 - соответственно, 519bp (у устойчивых) и 269bp (у восприимчивых). Оба маркера позволяют визуализировать гетерозиготность образца по изучаемому гену. Для всех 88 образцов были проведены ПЦР, результаты которых были визуализированы с помощью электрофореза.

Для каждого гена многие образцы были определены как устойчивые (2 образца для Ty-2, 8 образцов для Ty-3) или неустойчивые. Ряд образцов не удалось идентифицировать даже после повторного их анализа (9 образцов для Ty-2, 5 образцов для Ty-3). Гетерозиготных образцов не было обнаружено. На основании полученных данных сделаны практические рекомендации по применению изученных образцов в дальнейшем селекционном процессе.

**Список литературы:**

1. Dong, P. Gene-Based Markers for the Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Gene *Ty-3/* P. Dong, K. Han, M. Irfan Siddique, J.-K. Kwon, M.i Zhao, F. Wang, B.-C. Kang // Plant Breed. Biotech., 2016 - Vol. 4(1). - P.79-86. http://dx.doi.org/10.9787/PBB.2016.4.1.79

2. Kim, M. Development of molecular markers for *Ty-2* and *Ty-3* selection in tomato breeding / M. Kim, Y. Park, J. Lee, S.-C. Sim // Scientia Horticulturae, https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109230

3. Lee, Jang Hee. Development and Application of Gene-Specific Markers for Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in Both Field and Artificial Infections / Jang Hee Lee, Dae Jun Chung, Je Min Lee, Inhwa Yeam // Plants, 2021. - Vol. 10(9). https://dx.doi.org/10.3390/plants10010009

4. Ji, Y. Toward Fine Mapping of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Gene *Ty-2* on Chromosome 11 of Tomato / Y. Ji, J. W. Scott, D. J. Schuster // HORTSCIENCE, 2009. - Vol. 44(3). - P. 614–618.

5. Prasad, A. Tomato Tellow Leaf Curl Virus: Impact, Challenges, and Management / A. Prasad , N. Sharma, G. Hari-Gowthem, M. Muthamilarasan, M. Prasad // CellPress REVIEWS, Trends in Plant Science, 2020 - Vol. 25, No.9 https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.015

## АНАЛИЗ ГЕНОВ ГЛЮТЕНИНОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

**Полховская Е.С., Дудников М.В., Киров И.В., Соловьев А.А.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550. E-mail: eynzeynkreyn@gmail.com***

Зерно злаковых культур содержит несколько фракций белков: альбумины, глобулины, проламины, глютелины. Последние две фракции формируют клейковину – нерастворимый в воде комплекс, определяющий основные технологические свойства хлеба. Тритикале является новым и перспективным гибридом пшеницы и ржи, который требует подробный анализ аллельного состава субъединиц запасных белков, что имеет большую практическую значимость, и, в совокупности с молекулярными методами, используется в селекции при создании сортов зерновых культур с высокими хлебопекарными качествами [1]. Гидрофобные белки глютенины вносят наибольший вклад в эластичность и вязкость теста, из которого производятся мучные изделия. Глютенины кодируются полиморфными генами Glu-1, находящиеся на длинном плече хромосом первой группы [2]. В каждом локусе (Glu-A1, Glu-B1 и Glu-R1) расположены два близко сцепленных гена: х– и у–типа. Ген х–типа определяет структуру высокомолекулярных субъединиц с большей молекулярной массой, а ген у-типа – с меньшей [3].

Изучение экспрессии запасных белков яровой тритикале осложняется тем, что данная культура имеет большое разнообразие аллельного состава данных генов, которые находится еще в процессе изучения, ввиду того, что их геномные последовательности содержат в себе высокое число повторов, следовательно, осложняет сборку последовательности [4]. Степень проявления генетически детерминированных признаков определяется целым рядом механизмов, среди которых важную роль в регуляции экспрессии генов играют эпигенетические механизмы, обеспечивающие индукцию устойчивых и наследуемых изменений в функционировании генома [5]. Одним из механизмов эпигенетической регуляции транскрипции является метилирование ДНК, однако стандарты бисульфитной конверсии ограничивают длину прочтения последовательности, что также осложняется изучение генов. Поэтому наиболее оптимальным подходом в изучении глютенинов является использование технологий Oxford Nanopore Technologies [6]. Секвенирование методами нового поколения может оказаться более выгодным по сравнению с традиционным секвенированием по Сэнгеру.

В нашем исследовании был использован новый подход CANS, то есть Cas9 опосредованное Nanopore секвенирование, что помогло нам собрать полный ген глютенина. Для секвенирования транскриптов генов глютенинов было проведено нанопоровое секвенирование кДНК на 20-й день после цветения. Полученные данные позволили провести генотипирование и идентифицировать аллели генов глютенинов, определить наличие различных вариаций, в том числе делеций, инсерций и SNP, а также детектировать метилирование.

**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. 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.

3. Груздев И. В., Дудников М. В., Соловьев А. А. Идентификация высокомолекулярных субъединиц глютенинов у некоторых образцов яровой тритикале методом SDS-PAGE // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии. – 2020. – С. 93-95.

4. Geng Y. et al. Expression of wheat high molecular weight glutenin subunit 1Bx is affected by large insertions and deletions located in the upstream flanking sequences //PloS one. – 2014. – Т. 9. – №. 8. – С. e105363.

5. Juhasz A. et al. Role of conserved non-coding regulatory elements in LMW glutenin gene expression //PloS one. – 2011. – Т. 6. – №. 12. – С. e29501.

6. Oxford Nanopore Technologies. Pinfish. 2018. https://github.com/nanoporetech/pinfish.

## АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ ТОМАТА (*SOLANUMLYCOPERSICUM*) НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КЛАДОСПОРИОЗУ

**Белова Н.И.[1], Пырсиков А.С.[2], Милюкова Н.А.[2]**

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

***2 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева», Москва 127434***

Томат (*Solanum lycopersicum*) – однолетние или многолетнее травянистое растение, вид рода Паслён (*Solanum*) семейства Пасленовые (*Solanaceae*). Поражение различными болезнями приводит к ухудшению метаболизма томата, из-за чего портится товарный вид продукции, уменьшается количество полезных веществ и уменьшается лёжкость товара. Все это приводит к серьезным финансовым потерям. Одним из основных методов борьбы с заболеваниями является выведение и возделывание устойчивых сортов и гибридов томата. Традиционная селекция является длительным процессом, а молекулярные маркеры, применяемые на различных этапах селекционного процесса, способствуют его ускорению и эффективности.

Цель данного исследования - анализ образцов томата (*Solanum lycopersicum*) на устойчивость к кладоспориозу. Научные исследования были проведены в лаборатории геномной селекции растений ФГБНУ ВНИИСБ с использованием методов молекулярно-генетического анализа. В качестве объектов для изучения были выбраны 89 селекционных

образцов культурного томата (*Solanum lycopersicum)* различных групп - крупноплодные, кистевые, черри и коктейль.

Кладоспориоз томата (*Solanum lycopersicum*) – это заболевание, которое вызывается несовершенным грибом Cladosporium fulvum Cooke, гифомицет [1,2]. При воздействии фитопатогена листья усыхают, а на плодах образуется масса выпуклых твердых пятен оливкового цвета с темным налетом. Инфекция распространена повсеместно в районах возделывания. Конидии и склероции фитопатогена сохраняют жизнеспособность в почве и пораженных растительных остатках в течение года. Конидии легко распространяются потоками воздуха и капельно-жидкой влагой. Переносить их от растения к растению могут рабочие на одежде и сельскохозяйственном оборудовании. Наибольший вред заболевание наносит томату в необогреваемых и обогреваемых теплицах во второй половине лета.

Устойчивость к кладоспориозу определяется группой *Cf*-генов. Источником генов устойчивости в основном служат дикие виды томата *S. pimpinellifolium, S. lycopersicum, S. lycopersicumvar. S. cerasiforme, S. hirsutum*. Известно более 20 основных генов (*Cf*-гены) устойчивости к кладоспориозу томата. В настоящее время наиболее эффективны в селекции гены устойчивости *Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-6, Cf-9,* обуславливающие устойчивость к различным расам возбудителя [3,4]. Устойчивость томата к кладоспориозу является доминантным признаком.

Для выявления аллелей гена *Cf-9* устойчивости к кладоспориозу был проведен ПЦР-анализ сортообразцов с применением SCAR-маркера (sequence characterized amplified region) с праймерами CS1, CS5 и DS1 [4]. Данные праймеры позволяли амплифицировать фрагменты ДНК размером 378 п. н (аллель Cf-9) и 507 п.н. (аллель 9DC).

Визуализация результатов ПЦР проводилась методом электрофореза в агарозном геле.

Таким образом, с помощью метода геномной селекции с использованием SCAR-маркера с большой точностью был проведен отбор нужных генотипов. Из исследованных 89 образцов культурного томата (*Solanum lycopersicum)* было выявлено сорок образцов, устойчивых к кладоспориозу. Остальные образцы были идентифицированы как неустойчивые.

**Список литературы:**

1. Беков, Р.Х. Томат (эффективное использование генетических маркеров в практической селекции) / Р.Х. Беков. – Москва: ФГБНУ «Росинформаготех», 2014. – 322 с.

2. Руководство по болезням томата. Практическое пособие для семеноводов, овощеводов и консультантам по сельскому хозяйству [Текст] / под ред. Б. Габора. Seminis Vegetable Seeds, 1997. – 81 с.

3. Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции [Электронный ресурс] / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013.– Т. 17, № 4/2. – С.1044-1054. – http:/www.bionet.nsc.ru/vogis/2013-year/17-4-2/ (дата обращения 19.07.2021 г.).

4. Truong, Hai Thi Hong. Use of *Cf-9* Gene-based Marker sin Marker-assisted Selection to Screen Tomato Cultivars with Resistance to Cladosporium fulvum / Hai Thi Hong Truong, Hak Soon Choi, Myoung Cheoul Cho, Hye Eun Lee, Jung Ho Kim // Hort. Environ. Biotechnol, 2011. - Vol. 52(2). - P. 204-210. – DOI 10.1007/s13580-011-0164-y.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИБРИДНОСТИ ПОТОМСТВА РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ ПО ЛОКУСАМ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛЮТЕНИНОВ

**Груздев И.В.[1], Полховская Е.С.[1], Коленков М.А.[1] Соловьев А.А.[1,2]**

***1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550 E-mail:gruzdev82mtz@mail.ru***
***2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН», Москва 127276***

Тритикале (×*Triticosecale* Wittm.) – зерновая культура, сочетающая геномные комплексы пшеницы и ржи. В производстве используются вторичные гексаплоидные тритикале (2n=42) (Грабовец, Крохмаль, 2018). Не смотря на то, что тритикале, являясь преимущественно самоопыляемым растением, характеризуется, при определенных условиях, некоторой величиной перекрестного опыления (Рубец и др., 2016). Кроме того, по данным Яровой и Тоболовой (2019) ряд сортов отечественной, белорусской и украинской селекции содержат от двух до 14 биотипов. В связи с этим, можно заключить, что при проведении гибридизации селекционер подчас не подозревает о том, какой биотип сорта или коллекционного образца в конкретном случае является родительской формой. В отличие от мягкой пшеницы, у которой хорошо изучен полиморфизм и наследование глютенинов (Payne et al., 1982) и глиадинов (Metakovsky, Novoselskaya, 1991), у тритикале проводились детальные исследования по изучению разнообразия и наследования только у высокомолекулярных глютенинов (Amiour et al., 2002; Salmanowicz, Dylewicz, 2007). В результате этих исследований показано, что, как и у пшеницы, у гексаплоидной тритикале по локусам, кодирующим высокомолекулярные глютенины (*Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-R1*) наблюдается множественный аллелизм и кодоминантный характер наследования. Таким образом, высокомолекулярные глютенины могут и должны использоваться, для установления биотипов родительских растений при гибридизации тритикале.

В ходе исследования в гибридизацию были вовлечены растения сортов Памяти Мережко, Тимирязевска 42, Dublet и Legalo, а также селекционных образцов 131/7, Л8665, П2-16-20, П13-5-2, П13-5-13, С238 и С259, которые обладают рядом хозяйственно-полезных характеристик (Абделькави и др., 2020), помимо этого ряд образцов несет аллель гена *wbm*, связанный с повышенными хлебопекарными качествами (Коленков и др., 2020). Экстракцию и фракционирование высокомолекулярных субъединиц глютенинов проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в соответствии с протоколом, описанным Singh et al. (1991) в модификации Branlard et al. (2001). В качестве маркеров размера для идентификации субъединиц использовались сорта мягкой пшеницы с известным аллельным составом: Лада (Ax1/Bx7+By9/Dx5+Dy10) и Chinese Spring (AxN/Bx7+By8/Dx2+Dy12). Номенклатура высокомолекулярных субъединиц глютенинов тритикале приведена в соответствии с Amiour et al. (2002).

По результатам SDS-PAGE были идентифицированы аллели *a*, *b* и *c* локуса *Glu-A1* (субъединицы 1, 2* и null, соответственно); аллели *b* (7+8), *c* (7+9), *f* (13+16), IV (23+18), *r* (7+18) и *s* (6,8+20y) локуса *Glu-B1*; аллели *a* ($1^r$+$4^r$), *b* ($2^r$+$6,5^r$), и *c* ($6^r$+$13^r$) локуса *Glu-R1*. Все родительские формы, кроме сортов Dublet и Legalo были многобиотипными. При изучении 100 потомков различных гибридных комбинаций установлено, что 6 из них не являются гибридами, а являются результатом самоопыления в колосе ввиду раннего созревания пыльцы или неаккуратности при кастрации. Еще у 8 потомков достоверно не удалось установить гибридность из-за наличия у родительских форм одинаковых биотипов

по локусам *Glu-A1, Glu-B1* и *Glu-R1*. Таким образом, установлено, что в интервале от 3,59% до 14,44% скрещиваний не удается достоверно установить биотипы родительских форм, тем не менее, данный подход в совокупности с фенотипической оценкой дает положительный результат. Попутно решается задача оценки в раннем поколении потенциала хлебопекарных качеств гибридных потомств, поскольку установлена их связь с аллельным состоянием локусов *Glu-A1* и *Glu-B1*. Для локуса *Glu-R1* эту задачу еще предстоит решить.

Исследование проведено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Госзазание № 0431-2019-0005).

**Список литературы:**

1. Абделькави, Р. Н. Ф. Технологические свойства зерна яровой тритикале в условиях ЦРНЗ / Р. Н. Ф. Абделькави, А. Ж. Турбаев, А. А. Соловьев // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 5. – С. 87-97.

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

3. Коленков М. А. Характеристика образцов яровой тритикале по гену WBM / М. А. Коленков, М. В. Дудников, И. В. Киров, П.А. Ожерельев, А.В. Крутова, А.А. Соловьев // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии : Сборник тезисов докладов 20-й Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, Москва, 27–29 октября 2020 года. – Москва: ФГБНУ ВНИИСБ, 2020. – С. 104-105.

4. Рубец В. С., Первичное открытое цветение и величина спонтанного перекрестного опыления озимой тритикале / В. С. Рубец, А. В. Широколава, О. В. Митрошина, В.В. Пыльнев // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2016. – № 59. – С. 320-328.

5. Ярова, Э.Т. Компонентный состав проламинов сортов яровой тритикале (Triticosecale) / Э.Т. Ярова, Г.В. Тоболова // Наследие академика Н.В. Цицина. Современное состояние и перспективы развития.: Сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 120-летию Н.В. Цицина, Москва, 08–11 июля 2019 года. – Москва: ООО "РПЦ Офорт", 2019. – С. 101-103.

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

7. Amiour N. Diversity of seven glutenin and secalin loci within triticale cultivars grownin Europe/ N. Amiour, A. Bouguennec, C. Marcoz, P. Sourdille, M. Bourgoin, D. Khelifi, G. Branlard // Euphytica. – 2002. – 123. P. 295–305.

8. Branlard, G. Genetic diversity of wheat storage proteins and breadwheat quality / G. Branlard, M. Dardevet, R. Saccomano, F. Lagoutte, J. Gourdon //Euphytica. – 2001.– 119. – P. 59–67.

9. Metakovsky E.V. Gliadin allele identification in common wheat. 1. Methodological aspckts of the analysis of gliadin patterns by one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis/E. V. Metakovsky, A. Yu. Novoselskaya//J. Genet and Breed. 1991. V.45. 4. P.317-324.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО

**Келехсашвили Л.М., Датиева И.А.**

***ФГБУН ФНЦ «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Россия, 362027, Республика Северная Осетия-Алания, г. Владикавказ, ул. Маркуса,22; E-mail: vncran@yandex.ru***

Сохранение и повышение плодородия почв как основа высокоэффективного и устойчивого производства продукции растениеводства является одной из основных задач земледелия. В решении этой проблемы ведущая роль принадлежит кормовым травам, в частности, клеверу луговому. В последнее время идет интенсивная работа с использованием современных методов селекции для создания высокопродуктивных сортов клевера.

Вместе с традиционными методами, которые основаны на оценке морфологических и биохимических признаков, используются молекулярные ДНК-маркеры. PCR-анализ, основанный на амплификации ДНК обладает большой чувствительностью и дает быстрые результаты. Для клевера лугового в Северной Осетии подобных исследований с использованием праймеров на сегодняшний день известно немного.

ПЦР — это метод амплификации in vitro заданных фрагментов ДНК с полностью или частично известной последовательностью в процессе чередования определенных температурных циклов. Каждый цикл состоит из трех этапов: денатурация — разрыв двухцепочечной структуры ДНК; отжиг — присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени и элонгация, заключающаяся в достраивании и удлинении с помощью Taq-полимеразы второй цепи ДНК с 3'- конца праймера.

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов: праймеры —играют ключевую роль в образовании продуктов амплификации, т.к. идентичны соответствующим участкам ДНК-мишени; Taq-полимераза — термостабильный фермент, катализирующий полимеризацию ДНК; смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) — используется Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК; буферный раствор (10Х-буфер) — обеспечивает необходимые условия реакции (pH, ионную силу раствора); ДНК-матрица — геномная ДНК растения, которую необходимо проанализировать.

Подготовка материала для анализа. Все работы выполняют с использованием одноразовых расходных материалов, наконечников для автоматических пипеток, пробирок, перчаток и т. д. При отборе материала, а также при подготовке проб для исследования необходимо соблюдать меры, предупреждающие загрязнение образцов объектами внешней среды.

Разделение продуктов ПЦР методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Растворы и реактивы: порошок агарозы (1,6 или 4 мг на 100 мл конечного раствора); 1Х ТАЕ — трис-ацетатный электрофорезный буфер (50Х раствор ТАЕ содержит: 2М трис, 1М уксусной кислоты, 0,05М ЭДТА, деионизированную H2O; pH 8,0); 6Х буфер для нанесения образцов на гель; раствор бромистого этидия (0,5 мкг/мл раствора на 100 мл агарозного геля); маркер молекулярного веса.

Объектами наших исследований были три сорта клевера лугового: Витязь, Дымковский и Метеор. Праймер RCS1307, который мы использовали для ДНК-типирования, относится к SSR-маркерам. Они используются для изучения полиморфизма, идентификации и генетической паспортизации селекционных достижений. Брали по 10 генотипов каждого сорта для анализа внутрисортовой изменчивости. Образцы были выделены из отдельных проростков. Качество и количественный выход ДНК проверяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле и измерением концентрации на

спектрофотометре. Хотя данные сорта клевера лугового относятся к перекрестноопыляемым культурам и состоят из гетерогенных биотипов с высоким уровнем вариабельности, наши результаты показали, что существенного внутрисортового ДНК-полиморфизма при использовании SSR-маркера не выявлено. Незначительные различия в размере фрагментов ДНК обнаружены у сорта Метеор. Эти данные позволяют прийти к заключению о выравненности генотипов в составе анализируемых сортов.

**Список литературы:**

1. Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2027 годы. Постановление от 22. 04. 2019 г. № 479. http://static.government.ru/media/files/

2. Кутлунина Н. А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений : учеб.-метод. пособие; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2017. 142 с. ISBN 978-5-7996-2142-1.

3. Чесноков Ю. В., Кочерина Н. В., Косолапов В. М. Молекулярные маркеры в популяционной генетике и селекции культурных растений. М. : ООО «Угрешская Типография», 2019. 200 с.

4. Новоселов М.Ю. Клевер луговой (Trifolium pretense L.). В кн.: Основные виды и сорта кормовых культур / М.Ю. Новоселов. – М.: Наука, 2015. – С.22-73.

5. Hirakawa, H. Genome-Wide SNP Genotyping to Infer the Effects on Gene Functions in Tomato / H. Hirakawa, K. Shirasawa, A. Ohyama et. al. – DNA Research. – 2013.- №20. – P.221-233.

6. Isobe, S. Genome-wide SNP marker development and QTL identification for genomic selection in red clover / S.Isobe, B. Boller, I.Klimenko et. al. In: Barth S and Milbourne D (eds) Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement. Springer Science + Business Media, New York. – 2012. – P.29-35.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *I-2* ДЛЯ ОЦЕНКИ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ТОМАТА (*Solanum lycopersicum*) ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ

**Василик М.П.[1], Милюкова Н.А.[2], Пырсиков А.С.[2]**

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

***2 – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева», Москва 127434***

Качество и урожайность продукции растениеводства значительно снижаются при поражении возделываемой культуры фитопатогенами.

Одним из наиболее известных возбудителей болезней томата, столь полюбившегося человеку, является фузариум остроспоровый (лат. *Fusarium oxysporum*). Этот почвообитающий аскомицет вызывает фузариозное увядание, которое, по сути, ни что иное, как трахеомикоз. На данный момент выделяется три расы фузариоза. Фузариум обладает тремя различными типами инфекционных бесполых структур (макроконидии, микроконидии, хламидоспоры) и способен сохраняться в почве до 15 лет. Заражение происходит через корневую систему, симптомы проявляются акропетально: хлороз листа, переходящий в некроз, падение тургора. Симптомы проявляются чаще в период созревания первых плодов. Наиболее благоприятны для патогена жаркие и влажные условия.

Фузариоз томатов не является наиболее экономически вредоносным заболеванием этой культуры, однако потери урожая могут доходить до 45%.

Впервые обнаруженный в 1940-х годах в штате Огайо, США, фузариум второй расы распространился к 1961 году до штата Флорида, а теперь встречается достаточно часто, чтобы селекция на устойчивость к нему стала необходимостью.

Помимо агротехнических предупредительных мер весьма эффективен выбор устойчивого к поражению сорта или гибрида. Устойчивость к фузариозу второй расы обуславливается наличием гена *I-2*, интрогрессированного из дикого родственного *Solanum pimpinellifolium*. Ген *I-2* обладает шестью гомологами, два из них, *I2C-1* и *I2C-2*, идентичны *I-2* на 82% и 88% соответственно, что может затруднять их идентификацию. Полную резистентность к фузариозу второй расы (*Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*) обеспечивает только доминантный ген *I-2*.

В данном исследовании была изучена коллекция сортообразцов томата SCAR методом маркерной селекции - 88 образцов культурного томата (*Solanum lycopersicum*).

Было проведено выделение ДНК и постановка ПЦР. В ходе исследования для идентификации аллелей гена *I-2* было предложено использовать пару SCAR-маркеров I-2/5F и I-2/5R.

Продукты ПЦР разделены электрофорезом в агарозном геле. Были амплифицированы фрагменты длинной 633 п.н. (аллель *I-2*) и 566 п.н. (аллель *I-2C*).

Молекулярно-генетический анализ показал, что из 88 изученных образцов 47 не несут доминантных аллелей генов устойчивости, в 11 из них выявлен аллель *I-2C*.

**Список литературы**:

1. Ерошевская, А.С. Молекулярно-генетический анализ гибридов томата F1 по устойчивости к фузариозу / А.С. Ерошевская, А.А. Егорова, Н.А. Милюкова, А.С. Пырсиков // Картофель и овощи, 2021. - №5. - С. 37-40. https://doi.org/10.25630/PAV.2021.44.34.006

2. Фесенко, И. А. Создание ДНК-маркера гена устойчивости томата к фузариозному увяданию / И.А. Фесенко, М. Ю. Куклев, Г. И. Карлов // Известия ТСХА, 2007. - № 1. - С. 66- 72.

3. Щербань, А.Б. Перспективы маркер-ориентированной селекции томата *Solanum lycopersicum* L. // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2019. - №23(5). - С. 534-541. DOI 10.18699/VJ19.522

4. Segal, G. Correlation of genetic and physical structure in the region surrounding the I2 Fusarium oxysporum resistance locus in tomato / G. Segal, M. Sarfatti, M.A. Schaffer, N. Ori, D. Zamir, R. Fluhr // Mol Gen Genet., 1992. - Vol. 231 (2). - P. 179–185. DOI: 10.1007/BF00279789.

5. Simons, G. Dissection of the fusarium *I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy / Simons G. et al. // Plant Cell. 1998. - Vol. 10 (6). - P. 1055–1068. DOI: 10.1105/tpc.10.6.1055.

6. Wei, C. The *I2* resistance gene homologues in *Solanum* have complex evolutionary patterns and are targeted by miRNAs / Chunhua Wei, Hanhui Kuang, Feng Li, Jiongjiong Chen // BMC Genomics, 2014. - P. 715-743.

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ

**Болотина А.А.*, Полховская Е.С., Киров И.В.**

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

Хлебопекарные качества зерна определяются запасными белками эндосперма. Значительная часть проламинов представлена глютенинами, которые наиболее интенсивно экспрессируются начиная с 10-го дня после цветения [1]. Известно, что регуляция экспрессии генов определяется не только структурными особенностями последовательностей ДНК, но и эпигенетическими модификациями нуклеотидов. Одним из возможных механизмов регуляции экспрессии является метилирование ДНК промотора гена [2-4]. Однако эпигенетический профиль генов глютенинов к настоящему моменту малоизучен. Для исследования паттернов метилирования ДНК предпочтительным методом является бисульфитная конверсия.

Бисульфитная конверсия – широко применяемый метод, который используется для анализа метилирования CpG областей. Суть метода бисульфитной конверсии заключается в ковалентном преобразовании неметилированного цитозина в урацил, тогда как защищенные метильной группой цитозины остаются неизменными [5]. После модификации цитозина в урацил проводят амплификацию ДНК с ген-специфичными праймерами. Данный анализ обладает высокой эффективностью и может быть использован для количественной оценки метилирования ДНК в промоторной части генов глютенинов.

Для идентификации влияния статуса метилирования ДНК генов глютенинов на уровень их экспрессии были подобраны праймеры на их промоторную часть. Далее проводилась бисульфитная конверсия и полимеразная цепная реакция с праймерами, специфичными для метилированных и неметилированных участков ДНК [6].

Полученные уникальные данные позволят оценить изменения паттерна метилирования в процессе развития зерновки и изучить связь метилирования и экспрессии генов глютенинов.

**Список литературы:**

1. 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.
2. Duan L. et al. Analyzing the action of evolutionarily conserved modules on HMW-GS 1Ax1 promoter activity //Plant molecular biology. – 2020. – Т. 102. – №. 1. – С. 225-237.
3. Zhou Z. et al. Promoter DNA hypermethylation of TaGli-γ-2.1 positively regulates gluten strength in bread wheat //Journal of Advanced Research. – 2021.
4. Anderson O. D., Abraham-Pierce F. A., Tam A. Conservation in wheat high-molecular-weight glutenin gene promoter sequences: comparisons among loci and among alleles of the Glu-B1-1 locus //Theoretical and applied genetics. – 1998. – Т. 96. – №. 5. – С. 568-576.
5. Максимова В. П. и др. Современные подходы к выявлению и изучению эпигенетически активных ксенобиотиков //Успехи молекулярной онкологии. – 2019. – Т. 6. – №. 3.
6. Henderson I. R. et al. Accurate sodium bisulfite sequencing in plants //Epigenetics. – 2010. – Т. 5. – №. 1. – С. 47-49.

## ДИНАМИКА РОСТА И РАЗВИТИЯ РЕСУРСНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОВЕЦ.

**Петров С.Н., Денискова Т.Е., Зиновьева Н.А.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», 142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, дом 60, E-mail: citelekle@gmail.com***

Современное состояние научно-технического обеспечения исследовательских методов позволяет использовать новые аспекты при планировании и проектировании в изучении влияния генетики исследуемых объектов на их морфофункциональные характеристики. Одним из таких подходов является создание и использование ресурсной популяции животных для поиска ассоциаций в геноме субъекта с хозяйственно-полезными признаками. Использование таких субпопуляций для проведения полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) способствует повышению уровня точности и снижению возможности получения ложноположительных результатов.

На базе физиологического двора ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, в результате скрещивания карачаевской и романовской породы овец и их потомков, создана ресурсная популяция в виде первой и второй генерации животных.

В качестве родительских форм для получения животных первой генерации ресурсной популяции были использованы два барана карачаевской породы и матки романовской (13-15 голов). Затем помесных баранчиков F1 случали с овцами, для получения второго поколения. Случка проводилась естественная из расчета 18-19 маток на одного барана. Таким образом были получены генерации животных: первая - F1 популяция(32 гол.), вторая – беккроссовые группы (42 и 52 гол). Полученное потомство первой и второй генерации было оценено по следующим фенотипическим показателям: масса тела(МТ), высота в холке(ВХ), высота в крестце(ВК), высота в спине(ВС), глубина груди(ГГ), обхват груди(ОГ), ширина груди за лопатками(ШГ), ширина в маклоках(ШМ), длина туловища(ДТ), косая длина туловища(КДТ), обхват пясти(ОП), длина головы(ДГ), длина головы 2(ДГ2), расстояние между ушей(РУ), расстояние между глаз(РГ), длина носового зеркала(ДЗ), расстояние от ануса до кончика хвоста(АХ), расстояние от ануса до кончика хвоста 2(АХ2), расстояние от ануса до скакательного сустава(АС), расстояние от ануса до края безволосой области(АБ), обхват хвоста(ОХ).

Для анализа полученных данных был проведен дисперсионный анализ с применением многофакторной модели с взаимодействием (MANOVA) и рассчитаны средние значения оценок методом наименьших квадратов (LSM, least square means) с использованием программы STATISTICA 10. В результате было выявлено влияние фактора «кровности» на изменчивость следующих исследованных фенотипических показателей: при $p \leq 0{,}001$ – МТ, АХ, АХ2, АС, АБ, ОХ, ГГ, ОГ, ШГ, ОП, ДТ, КДТ, ДГ, ДГ2, РУ, ДЗ; при $p \leq 0{,}5$ – РГ. Кроме того, было обнаружено достоверное влияние взаимодействия эффектов «кровности и пола» животных на изменчивость таких морфометрических признаков как: при $p \leq 0{,}001$ – ДГ; при $p \leq 0{,}01$ – ОХ, ГГ, КДТ, РГ; при $p \leq 0{,}5$ – МТ, АБ, ГГ, ДТ, ДЗ.

Проведенные исследования фенотипического разнообразия и различий в ресурсной популяции позволяют в дальнейшем проводить исследовательскую работу с применением ДНК-чипов, основанных на генотипировании множественных SNP-маркеров, для проведения исследования генетического разнообразия и взаимоотношений пород овец на полногеномном уровне, а также осуществлять поиск локусов, находящихся под давлением естественной селекции и искусственного отбора.

Исследование выполнено в рамках проведения научно-исследовательской работы по теме ГЗ 0445-2019-0024.

**Список литературы:**

1. Ерохин А.И., Карасев Е.А., Ерохин С.А. Состояние, динамика и тенденции в развитии овцеводства в мире и в России // Овцы, козы, шерстяное дело. 2019. № 3. С. 3-6.

2. Денискова Т.Е., Доцев А.В., Форнара М.С., Петров С.Н., Рейер Х., Виммерс К., Брем Г., Зиновьева Н.А., Багиров В.А. Геномная характеристика межпородного семейства овец как основы для создания ресурсной популяции для идентификации QTL и генов-кандидатов, ассоциированных со скоростью роста// Генетика и разведение животных. 2018. № 4. С. 16-22.

3. Кузнецов В. М. Основы научных исследований в животноводстве / В. М. Кузнецов. - Киров : Зональный НИИСХ Северо-Востока, 2006. - 568 с.

4. Jonas E., Thomson P.C., Raadsma H.W. Genome-wide association study and fine mapping of QTL on OAR 21 for body weight in sheep // In Proceeding of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig. 2010.

5. Zhang L, Liu J., Zhao F., Ren H., Xu L., Lu J., Zhang S., Zhang X, Wie C., Lu G., Zheng Y., Du L.. Genome-wide association studies for growth and meat production traits in sheep. //PLoS One. 2013. Vol. 10. No. 6. P. e0128688.

6. Mastrangelo S., Bahbahani H., Moioli B., Ahbara A., Al Abri M., Almathen F., da Silva A., Belabdi I., Portolano B., Mwacharo J.M., Hanotte O., Pilla F., Ciani E. Novel and known signals of selection for fat deposition in domestic sheep breeds from Africa and Eurasia. PLoS ONE, 2019, 14(6): e0209632 ( ). DOI: 10.1371/journal.pone.0209632

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ ГРУШИ ФНЦ САДОВОДСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТТЕЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

**Свистунова Н.Ю., Бурменко Ю.В.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр Садоводства», Россия, 115598, г. Москва, ул. Загорьевска, д. 4***
***e-mail: svistunova2020@yandex.ru***

Генофонд груши, коллекции ФНЦ Садоводства представлен 52 сортами, среди которых сорта отечественной и зарубежной селекции. Приоритетными направлениями селекционных программ ФНЦ Садоводства являются: создание морозо- и зимостойких, иммунных и высоко устойчивых к болезням и вредителям сортов, обладающих слаборослостью и компактностью габитуса, самоплодностью, пригодностью к механизированной уборке урожая, а также высокими вкусовыми качествами плодов. Все сорта отличаются высокой зимостойкостью, большинство сортов среднерослые.

Для генотипирования с использованием микросаттелитных маркеров были выбраны 10 сортов груши разных сроков созревания, выведенные и изучаемые в ФНЦ Садоводства: раннелетний (Детская), летний (Банановая, Видная, Петровская, Летняя Забава), позднелетний (Ровесница), осенний (Велеса, Дюймовочка), позднеосенний (Верная) и раннезимний (Юрьевская).

Амплификацию отобранных для анализа SSR-локусов проводили с использованием реактивов производства Диалат (Россия) согласно условиям, описанным в работе (Liebhard et al.). Для амплификации использовали праймеры, содержащие флуоресцентную метку (FAM, R6G, ROX) производства компании Евроген.

Результаты ПЦР анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле. В результате для всех полученных фрагментов была определена концентрация и подтвержден ожидаемый размер фрагмента. Полученные ПЦР-фрагменты были переданы в компанию СИНТОЛ для проведения фрагментного анализа на секвенаторе ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems).

У проанализированных 10 образцов груши было выявлено 58 аллельных вариантов по десяти изученным локусам. Все использованные в работе праймеры выявляли полиморфизм исследуемых образцов по микросателлитным локусам. Количество аллелей на локус варьировало от 3 (CH04e03) до 9 (CH03d08), и в среднем составило 6,1 аллелей на локус. Для одного сорта по всем микросателлитным локусам, использованным в анализе, амплифицировалось от 14 до 20 аллелей.

**Список литературы:**

Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, Ryder CD, Tarchini R, Van de Weg WE, Gessler C (2002) Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.). Mol Breed 10:217–241

## ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕМЕННИКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**Дуденкова Н. А.**

***ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический университет имени М. Е. Евсевьева», Саранск 430007; E-mail: dudenkova_nataly@mail.ru***

С наступлением половой зрелости в мужском организме млекопитающих начинается процесс образования мужских половых клеток – сперматогенез. Этот процесс происходит в извитых семенных канальцах мужских половых желез – семенниках [2].

Извитые семенные канальцы семенников млекопитающих животных выстланы сперматогенным эпителием, который содержит клетки двух типов: гаметы с их предшественниками на различных стадиях дифференцировки (сперматогенные клетки) и поддерживающие клетки Сертоли или сустентоциты [1].

Однако очень мало данных о морфологических особенностях строения сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев семенников.

Поэтому целью нашего исследования явилось изучение морфологических особенностей строения сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев мужских половых желез (семенников).

Эксперимент выполнялся с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации, и в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

В качестве биологического тест-объекта в работе использовали белых беспородных половозрелых крыс-самцов массой 200-250 г. Выбор белых крыс для проведения исследования обусловлен тем, что они обладают сходными с человеком строением половых желез.

Всего в эксперименте было использовано 25 животных. Материалом исследования служили семенные железы (семенники) крыс-самцов.

Для гистологического исследования образцы тканей семенных желез фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина и после обезвоживания путем помещения исследуемого материала в спирты возрастающей концентрации заливали в парафин. Готовили гистологические поперечные срезы семенных желез толщиной 10-15 мкм и окрашивали их гематоксилин-эозином. Для гистологических и морфометрических исследований использовали цифровой микроскоп Axio Imager.M2 с программным обеспечением для анализа изображений AxioVision SE64 Rel. 4.8.3 и ZEN 2011.

После проведенного исследования при рассмотрении сперматогенного пласта в извитых семенных канальцах семенников самцов белых крыс было обнаружено, что сперматогонии располагаются равномерно по всему контуру канальца. Они имеют округлую, реже овальную форму.

Сперматоциты располагаются в боковых впячиваниях клеток Сертоли. Они крупные, округлой или овальной формы, несколько удалены от базальной мембраны. В их ядрах хорошо виден рисунок хроматина.

Ранние сперматиды округлой формы со сферическим ядром, находятся в средних слоях сперматогенного эпителия. Поздние сперматиды лежат в слое, прилегающем к просвету канальца. Они имеют вытянутую форму. У некоторых обнаруживается жгутик.

При изучении сустентоцитов выявлено, что их основания лежат на базальной мембране между сперматогониями, верхушки же обращены к просвету семенного канальца. Апикальная часть клетки треугольной или пирамидальной формы. Ядро округлой или овальной формы.

Полученные в ходе гистологического и морфологического исследования данные позволяют углубить понимание структурно-функциональных особенностей строения сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев мужских половых желез (семенников).

**Список литературы:**

1. Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н. Н. Гистология, цитология и эмбриология. Москва: Медицинское информационное агентство, 2005. 600 с.

2. Нишлаг Э., Бере Г.М. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. Москва: Медицина, 2005. 554 с.

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

# ЧТО НОВОГО МОЖНО УЗНАТЬ ПРИ РЕДАКТИРОВАНИИ ИНТРОНОВ ГЕНОВ lncРНК С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9

**Степанов Г.А.[1], Матвеева А.М.[1,2], Журавлев Е.С.[1], Власов В.В. [1,2]**
***1 – Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение Российской Академии наук, Новосибирск 630090, пр. ак. Лаврентьева, 8***
***E-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru***
***2 – Новосибирский государственный университет, Новосибирск 630090, ул. Пирогова, 1***

Развитие подходов к геномному редактированию позволило изменять структуру индивидуальных генов, регулировать их экспрессию и соответствующие клеточные процессы. Получившие широкое распространение методы на основе систем CRISPR/Cas значительно расширили арсенал генетической инженерии. Тем не менее, основная часть работ по геномному редактированию направлена на исследование и регуляцию экспрессии белок-кодирующих генов для получения клеточных линий и модельных организмов с заданными свойствами. Для данных целей использование систем CRISPR/Cas носит фактически рутинный характер. В связи с этим на сегодняшний день редактирование интронов представляет интересный и многообещающий инструмент изучения механизмов пост-транскрипционного созревания РНК, а также связанных клеточных процессов.

С помощью системы CRISPR/Cas9 в клетках человека были отредактированы интроны гена *Gas5* (Growth Arrest Specific 5), содержащие гены малых ядрышковых РНК (мяоРНК). Различные пути внесения неспецифических и направленных мутаций позволили предложить несколько гипотез о механизме созревания как самих мяоРНК, так и хост-гена Gas5. Так, точечное редактирование генов индивидуальных мяоРНК привело к специфическому подавлению мяоРНК-мишени, а также возникновению новых форм сплайсинга днкРНК Gas5, содержащих пропуски экзонов и новые стыки экзонов. Дальнейший анализ экспериментальных данных и метаанализ легли в основу гипотезы об м6А-зависимой регуляции созревания хост-гена мяоРНК *Gas5*. Одновременное редактирование генов терминальных мяоРНК позволило получить клеточные линии с протяженной делецией только в одном из аллелей *Gas5*. Интерес вызвало продемонстрированное в результате подавление экспрессии как интрон-закодированных мяоРНК, так и самой днкРНК Gas5. На основе полученных экспериментальных данных было выдвинуто предположение о хост-ген-независимом созревании мяоРНК и мяоРНК-зависимом созревании РНК хост-гена.

Одним из наиболее интересных направлений является разработка новых инструментов для модуляции сплайсинга, позволяющей тонко регулировать экспрессию гена, не вмешиваясь при этом в его структуру. С помощью системы CRISPR/Cas9 удалось перенаправить модифицирующую активность мяоРНК на пре-мРНК модельных генов в клетках человека. Специфическое подавление экспрессии гена-мишени продемонстрировало возможность направленной мяоРНК-опосредованной регуляции сплайсинга в модельной линии клеток человека.

Описанные результаты подтверждают, что редактирование интронов представляет собой интересный подход к изучению непосредственно механизмов созревания РНК, а также обладает мощным потенциалом для применения в различных областях фундаментальных и прикладных исследований в направлении развития средств регуляции экспрессии генов.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073 и проекта Госзадания ИХБФМ СО РАН (0245-2019-0001) (разработка методов).

# ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМЫЕ ГЕНЫ-МАТРЕШКИ КАК МИШЕНИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К РАЗЛИЧНЫМ ВИДАМ СТРЕССА: АЛГОРИТМ ПОИСКА В МОДЕЛЬНЫХ И КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЯХ

**Шешукова Е.В.[1], Ершова Н.М.[1], Поздышев Д.В.[1,2], Комарова Т.В.[1,2]**

***1 – ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991. E-mail: sheshukova@vigg.ru***
***2 – ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва 119991***

Системные защитные реакции растений в ответ на неблагоприятные воздействия биотической и абиотической природы сопровождаются активацией экспрессии стресс-индуцируемых генов. Подобная индукция экспрессии может осуществляться как на уровне транскрипции, так трансляции и стабильности мРНК. В этот процесс вовлечены транскрипционные факторы, регуляторы трансляции, а также различные белки, которые участвуют в контроле качества мРНК. Целью настоящего исследования было изучение генных систем-матрёшек, содержащих в пределах основного гена экспрессирующиеся альтернативные открытые рамки считывания (аОРС), а также выявление их роли в формировании механизмов обеспечения устойчивости растений к стрессам. Мы определили принципы организации генных матрешек, на примере идентифицированного нами неинтронированного гена *Nicotiana benthamiana NbKPILP*, кодирующего гомолог ингибитора пептидаз Кунитца, но при этом лишенного указанной ферментативной активности (1,2), исследовали ответ гена-матрёшки на вирусную и бактериальную инфекцию, а также на абиотический стресс. Показали, что важную роль в функционировании генной матрешки играет (а) длина и структурные особенности 5'-нетранслируемой области, (б) субоптимальный нуклеотидный контекст инициаторного кодона основной ОРС и благоприятный для старта аОРС, (в) наличие полипуринового блока перед стартовым кодоном аОРС, (г) расстояние между инициаторным кодоном основной ОРС и аОРС. Мы проанализировали гены *N. benthamiana*, которые сходны с геном-матрёшкой *NbKPILP* по ряду свойств: активно экспрессируются в корнях по сравнению с листьями, где их экспрессия снижена или даже не зарегистрирована; содержат потенциальные аОРС со стартовым кодоном в более благоприятном контексте по сравнению со стартовым кодоном основной ОРС. Первичный отбор последовательностей генов, экспрессия которых в листьях ниже, чем в корнях, как и для *NbKPILP*, проводили с использованием результатов анализа экспрессии генов *N. benthamiana* (3) на микрочипах. Поиск вложенных кОРС проводили с помощью sORF finder (4) и MiPepid (5). Далее мы проанализировали нуклеотидный контекст стартового кодона основной и аОРС, а также проверяли наличие полипуринового блока на отрезке не более чем 100 нт перед аОРС. В качестве референсного благоприятного контекста использовали RMNATGGS (6). Таким образом был выявлен ряд генов, по своим свойствам сходных с геном-матрёшкой *NbKPILP*.

Из базы данных коротких ОРС (кОРС) *Arabidopsis thaliana,* ARA-PEPs, с подтверждением на уровне транскриптома (RNAseq и Tiling array), нами были взяты координаты транскриптов ОРС для аннотированного генома *A. thaliana* TAIR10, далее они были соотнесены с координатами генов, кодирующих белки. Для каждого кодирующего гена была получена информация о количестве экзонов в его структуре. Оказалось, что аОРС из базы ARA-PEPs, пересекают одноэкзонные гены с большей частотой, чем многоэкзонные. Мы заключаем, что одноэкзонные гены транскриптома *A. thaliana* содержат аОРС, которые возможно участвуют в регуляции экспрессии генов. Среди одноэкзонных генов, содержащих аОРС, мы выбрали 27 аннотированных генов, обладающих свойствами, сходными со свойствами *NbKPILP*. Для этих генов были

проанализированы контекст стартового кодона, а также соотношение экспрессии лист/корень (https://web.expasy.org/protparam/, http://travadb.org/). В результате было выявлено 6 генов.

Таким образом, транскриптомы модельных растений, таких как табак и арабидопсис, предоставляют примеры предполагаемых генов-матрёшек, экспрессия которых находится на низком уровне в листьях по сравнению с корнями. Это открывает возможность поиска и экспериментальной проверки предложенной модели «молчащих» стресс-индуцируемых генов у сельскохозяйственных растений.

Для поиска кОРС в сельскохозяйственно-значимых видах растений был использован сервер PsORF (http://psorf.whu.edu.cn/), собравший геномные, транскрипционные данные, вместе с данными Ribo-seq и масс-спектрометрических экспериментов для предсказания кОРС, обладающих кодирующим потенциалом, для 35 видов растений (7). Группа кОРС, пересекающихся с 3'-НТО, потенциально может регулировать экспрессию материнского гена по тому же принципу, что и *NbKPILP*. Процент таких кОРС от общего числа кодирующих генов достигает 2,38% (высокий процент можно отметить для нескольких видов хлопчатника, а также для *Capsella rubella*). У значимых для сельского хозяйства видов высших растений, для которых доступны масс-спектрометрические данные, среди таких генов были гены, ассоциированные с ответом растения на стресс. На основании проведенного нами анализа можно заключить, что потенциальные гены-матрёшки имеются во множестве видов растений. Для некоторых культурных растений, имеющих сельскохозяйственную значимость, найдены целевые гены для последующей экспериментальной проверки предполагаемого механизма регуляции.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант №19-74-20031, исследования свойств *NbKPILP*) и РФФИ (грант №17-29-08012, биоинформатический анализ).

**Список литературы:**

1. Sheshukova E.V., Komarova T.V., Ershova N.M., Shindyapina A.V., Dorokhov Y.L. An Alternative Nested Reading Frame May Participate in the Stress-Dependent Expression of a Plant Gene. Front Plant Sci. 2017;8:2137. DOI 10.3389/fpls.2017.02137

2. Sheshukova E.V., Komarova T.V., Ershova N.M., Bronstein A.M., Dorokhov Y.L. The expression of matryoshka gene encoding a homologue of Kunitz peptidase inhibitor is regulated both at the level of transcription and translation. Biochem Mosc. 2018 Oct 1;83(10):1255–62. DOI 10.1134/S0006297918100103

3. Goralski M., Sobieszczanska P., Obrepalska-Steplowska A., Swiercz A., Zmienko A., Figlerowicz M. A gene expression microarray for Nicotiana benthamiana based on de novo transcriptome sequence assembly. Plant Methods. 2016 May 20;12(1):28. DOI 10.1186/s13007-016-0128-4

4. Hanada K., Akiyama K., Sakurai T., Toyoda T., Shinozaki K., Shiu S-H. sORF finder: a program package to identify small open reading frames with high coding potential. Bioinforma Oxf Engl. 2010 Feb 1;26(3):399–400. DOI 10.1093/bioinformatics/btp688

5. Zhu M., Gribskov M. MiPepid: MicroPeptide identification tool using machine learning. BMC Bioinformatics. 2019 Nov 8;20(1):559. DOI 10.1186/s12859-019-3033-9

6. Gupta P., Rangan L., Ramesh T.V., Gupta M. Comparative analysis of contextual bias around the translation initiation sites in plant genomes. J Theor Biol. 2016 Sep 7;404:303–11. DOI 10.1016/j.jtbi.2016.06.015

7. Chen Y., Li D., Fan W., Zheng X., Zhou Y., Ye H., et al. PsORF: a database of small ORFs in plants. Plant Biotechnol J. 2020;18(11):2158–60. DOI 10.1111/pbi.13389

# РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ТОМАТА

**Баранов Д.Ю.[1], Долгов С.В.[1,2], Тимербаев В.Р.[1,2]**

***1 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ВНИИСБ), Москва 127550***
***2 – Филиал ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ), Пущино 142290***
***E-mail: timerbaev@gmail.com***

По мере роста мирового населения растет спрос на продовольствие. Один из возможных способов решения этой проблемы – создание новых сортов сельскохозяйственных культур с ценными признаками, такими как повышенная урожайность, устойчивость к болезням, холодостойкость, улучшенная соле- и засухоустойчивость. Для производства новых сортов в течение десятилетий использовали методы традиционной селекции, но новые технологии, такие как редактирование генома, позволяют добиться желаемого результата быстрее и дешевле, путем точной модификации аллелей в разных видах и сортах растений. Менее чем за 5 лет метод, базирующийся на использовании CRISPR/Cas9, стал одним из самых широко применяемых методов в генной инженерии, в том числе растений. Некоторые системы геномного редактирования позволяют избежать встраивания чужеродной ДНК в геном экспериментального объекта или избавиться от нее в следующих поколениях.

Фитопатогенные вирусы наносят значительный вред современному сельскохозяйственному производству, вирусные инфекции не только ухудшают качество сельскохозяйственной продукции, но и приводят к значительному снижению урожайности или даже к его полной потери. Несмотря на появление новых устойчивых сортов, а также развитие стратегий по сдерживанию вирусных болезней томата, данные заболевания вызывают серьезные потери урожая в разных регионах мира. Большинство стадий вирусной инфекции включает взаимодействие между вирусными компонентами и факторами растения-хозяина. Отсутствие соответствующих факторов может приводить к устойчивости растения. Активно ведутся поиски новых хозяйских факторов, которые позволят лучше понять природу вирусной инфекции, а также создать новые устойчивые сорта. Один из таких кандидатов – эукариотический фактор инициации элонгации (eEF1), белки eEF1A и eEF1B напрямую взаимодействуют с метилтрансферазным доменом РНК-зависимой-РНК-полимеразы вируса табачной мозаики. Не исключено, что подобное взаимодействие может иметь место при инфицировании представителями других семейств заражающих томаты вирусов.

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия вирус-растение при изменении функциональной активности генов фактора элонгации, путем внесения мутаций в их нуклеотидные последовательности с применением технологии геномного редактирования. В качестве прикладного аспекта, в конечном итоге мы планируем найти пути создания растений томата с повышенной устойчивостью к инфицированию вирусами. К настоящему времени нами подобран ряд последовательностей гидовых РНК к генам-мишеням; в условиях *in vitro* протестирована эффективность расщепления целевых последовательностей нуклеазой Cas9 в присутствии выбранных гидовых РНК, а также сконструированы бинарные векторы для трансформации томата, содержащие гены, кодирующие наиболее эффективные гидовые РНК.

# РЕПЛИКАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНА EP402R IN VIVO

**Кольцов А.Ю., Крутько С.А., Белов С.В., Холод Н.С., Коротин А.В., Сухер М.М., Кольцова Г.С.**

***ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии (ФГБНУ ФИЦВиМ)», Вольгинский 60112***
**E-mail: kolcov.andrew@gmail.com**

Африканская чума свиней - контагиозная вирусная геморрагическая болезнь домашних и диких свиней с летальностью до 100 %, сопровождающаяся лихорадкой, цианозом кожи, диареей, судорогами (Montgomery, 1921). Вирус АЧС - крупный икосаэдрический цитоплазматический вирус семейства *Asfarviridae* (Dixon et al., 2012).

С момента регистрации первых случаев АЧС в 2007 году свиноводческая отрасль России испытывает серьезные экономические потери. Вакцины против АЧС не разработаны, а прогресс создания безопасных и эффективных вакцин сдерживается недостатком знаний о степени разнообразия штаммов вируса АЧС и вирусных антигенах, обеспечивающих защитный иммунитет у свиней. Несмотря на многолетние исследования функции многих белков вируса АЧС не изучены. Кроме того, продемонстрировано, что одни и те же белки разных штаммов могут обладать различными функциональными особенностями в инфицированных вирусом клетках. Таким образом, изучение функциональной геномики вируса АЧС является крайне актуальной задачей.

Белок CD2v представляет собой гемагглютинин вируса АЧС (Ruíz-Gonzalvo, et al., 1993). Была продемонстрирована возможная роль этого белка в патогенезе инфекции, в тропизме тканей, уклонении от иммунитета и усилении репликации вируса в организме хозяина (Borca M. V., et al., 1994, Sereda A.D., et al., 2018). С момента первоначального описания CD2-подобный белок, кодируемый геном EP402R, был предложен в качестве одного из основных протективных антигенов вируса АЧС. Было показано, что иммунизация свиней с использованием различных вирусных векторов, несущих белок CD2v, может индуцировать сильный гуморальный и клеточный иммунитет, а ДНК-вакцины, экспрессирующие ген EP402R, могут эффективно активировать иммунный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов. Хотя описанные иммунизации и не приводили к полной защите от заражения вирулентным вирусом АЧС, в некоторых исследованиях сообщалось о частичных защитных эффектах (Argilaguet J.M., et al., 2012; Lacasta A., et al., 2014; Argilaguet J.M., et al., 2013). Ранее нами также было продемонстрировано, что белки CD2v и C-type lectin необходимы, но не достаточны для индукции защитного иммунитета (Burmakina G., et al., 2016). Кроме того, мы идентифицировали Т-клеточные эпитопы в структуре вирусных белков CD2v и лектин, что указывает на их важную роль в Т-клеточном ответе при АЧС (Burmakina G., et al., 2019).

С целью дальнейшего изучения роли белка CD2v в формировании фенотипа аттенуированных и вирулентных вариантов вируса АЧС и его репликации в организме хозяина в рамках данной работы было принято решение получить и охарактеризовать рекомбинантные штаммы вируса АЧС с делецией гена EP402R.

Два гомологичных родительских штамма вируса АЧС К49 и КК262, принадлежащих серогруппе 2 (Genotype I) и существенно отличающихся по вирулентности, были использованы для создания рекомбинантных вирусов, в геноме которых ген EP402R, кодирующий белок CD2v, был удален и заменен геном EGFP. Следует отметить, что аттенуированный штамм КК262 был получен из вирулентного штамма К49 путем многократного пассирования на культурах клеток. Клетки A4C2 и COS-1 инфицировали штаммами К49 и КК262 соответственно, а затем трансфицировали «рекомбинационной

кассетой». Рекомбинантные вирусы были получены методом предельных разведений в первичной культуре клеток макрофагов свиней и COS-1 путем селекции по репортерной флюоресценции EGFP.

Рекомбинантные вирусы эффективно реплицировались в первичной культуре клеток макрофагов свиней и ККМС, однако в отличие от родительских штаммов их репликация в клетках в присутствии эритроцитов свиней не сопровождалась развитием гемадсорбции. Было продемонстрировано, что кинетика репликации *in vitro* делеционных мутантов была идентична родительским штаммам.

С целью изучения биологических свойств рекомбинантных вирусов и роли белка CD2v в размножении вируса *in vivo* были проведены серии экспериментов с животными. В рамках эксперимента по заражению двух групп животных (n=5) родительским (К49) и рекомбинантным штаммом ΔК49CD2v в дозе 1000 TCID50, было продемонстрировано, что делеция гена EP402R не приводит к снижению вирулентности вируса. Однако титры вируса в крови животных, инфицированных рекомбинантным штаммом ΔК49CD2v, на 3 сутки после заражения (д.п.з.) были ниже, чем у животных, инфицированных штаммом К49. Существенной разницы на 5 и 7 д.п.з. не было обнаружено. Сроки гибели и клинические признаки у всех животных были сопоставимы.

Схожие результаты были получены в экспериментах (n=10) с использованием рекомбинантного штамма ΔCongoCD2v и его родительского аттенуированного штамма КК262. Было отмечено, что репликация *in vivo* аттенуированного рекомбинантного варианта вируса АЧС с делецией гена EP402R была значительно снижена по сравнению с родительским штаммом. Хотя геном рекомбинантного вируса был обнаружен в органах инфицированных животных, что указывало на репликацию данного штамма в организме хозяина.

Эти данные указывают, что белок CD2v не влияет на репликацию вируса в макрофагах свиней *in vitro*, но может иметь решающее значение для *in vivo* репликации или виремии как вирулентных, так и аттенуированных вариантов вируса АЧС.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 20-76-10030).*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ VPG ВИРУСА Y С ФАКТОРАМИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ EIF4E КАРТОФЕЛЯ

**Ражина О.Л., Злобин Н.Е., Лебедева М.В.**

***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550; E-mail: Oksana-razhina@yandex.ru***

Картофель занимает ведущие позиции среди всех сельскохозяйственных культур. Под его возделывание уходят значительные территории, как частных хозяйств, так и крупных агрохолдингов.

Наибольший вред картофелю наносят вирусные заболевания. Вирусы поражают растения, замедляя их развитие, а также приводят к снижению количества и качества урожая. Между растением и его семенем есть естественная преграда, защищающая зародыш от большинства вирусных инфекций, так происходит обновление посадочного материала. Поэтому вирусные инфекции наиболее опасны для вегетативно размножаемых культур. Картофель обычно размножают клубнями, при этом обновление растительного материала через семена не происходит, а значит, вирус накапливается из поколения в поколение. Нарастающая вирусная нагрузка приводит к снижению урожая до 80-90%. Среди вирусов для растений семейства Solanaceae наиболее распространённым и опасным является вирус картофеля Y (PVY).

На сегодняшний день единственным хорошо изученным механизмом устойчивости к PVY связан с нарушением взаимодействия фактора инициации трансляции eIF4E и вирусного белка VPg. Белок VPg ковалентно прикреплен к 5'-концу генома PVY, представляющий собой ss (+) РНК размером приблизительно 9,7 т.п.н. с шагом спирали 3,4–3,5 нм. Одной из функций VPg является имитация кэп-структуры, что обеспечивает взаимодействие с факторами инициации трансляции и запуск синтеза вирусных белков.

Показано что, взаимодействие с фактором eIF4E является ключевым для развития инфекции. Достаточно даже одиночных замен в структуре этих двух белков для нарушения взаимодействия. Впервые рецессивная устойчивость, опосредованная eIF4E, была обнаружена у мутантов Arabidopsis thaliana, теряющих восприимчивость к вирусу гравировки табака (TEV; Potyvirus), что связано с мутацией в гене eIFiso4E, изоформы eIF4E, приводящая к появлению стоп-кодона. Последующие исследования показали, что eIF4E-опосредованная устойчивость к потивирусам обнаруживается у нескольких устойчивых культурных сортов, включая перец (Capsicum annuum), салат (Lactuca sativa) и дикий томат (Solanum habrochaites). Однако для картофеля таких данных нет.

Факторы инициации трансляции eIF4E у растений кодируются небольшим мультигенным семейством, состав которого зависит от вида. Причем у разных растений вирусный белок способен связываться с разными факторами. Так в перце VPg взаимодействует с eIF4E-1, а в томате как с eIF4E-1, так и с eIF4E-2.

Мультигенное семейство картофеля состоит из eIF4E-1, eIF4E-2 и eIF(iso)4E. Ранее нами было показано, что VPg штамма NTN (на данный момент наиболее опасный штамм, занимающий все большие территории) способен взаимодействовать с eIF4E-1 и eIF4E-2 картофеля, но при этом не взаимодействует с eIF(iso)4E. На основании литературных данных мы подобрали ряд мутаций в eIF4E-1, находящиеся в области взаимодействия двух белков. Эти мутации приводят к замене одной аминокислоты на другую с противоположными свойствами и потенциально способны не дать VPg связаться с фактором инициации трансляции. Все варианты проверялись на функциональность и способность взаимодействовать с наиболее распространенным природным VPg-NTN. В результате было отобрано два варианта, которые отвечали всем критериям, то есть: перестали взаимодействовать с базовым вариантом вирусного белка и оставались функциональными.

Однако, VPg PVY способен взаимодействовать с двумя факторами инициации трансляции картофеля, поэтому нами было решено внести две удачные мутации в eIF4E-2. Для этого были заказаны специфические праймеры для ПЦР-мутагенеза, несущие требуемые мутации, и получены мутантные варианты фактора eIF4E2.

Однако изменения в факторе могли привести к тому, что он перестанет быть функциональным. Для этого был проведен комплементарный анализ, основанный на том, что в штамме дрожжей Jo55 эндогенная копия eIF4E нокаутирована. Такие дрожжи выживают за счет введенной копии человеческого фактора инициации трансляции eIF4E под промотором, индуцируемым галактозой. Варианты мутантных факторов трансляции eIF4E-2 клонируются в плазмиду под промотор, индуцируемый наличием глюкозы в среде. То есть на селективной среде, содержащей глюкозу, дрожжи будут расти только в случае, если исследуемый вариант eIF4E-2 функционален и способен связываться с кэп мРНК клетки, что мы и показали в нашей работе.

Далее мы проверили способность мутантных вариантов eIF4E-2 взаимодействовать с VPg штамма NTN с помощью дрожжевой двугибридной системы.

Факторы клонировались в вектор pGADT-7, а VPg в pGBKT7. Метод дрожжевого анализа основан на использовании двух компонентов специфичного транскрипционного фактора, запускающий активация репортерного гена (чаще всего ген синтеза аминокислот), причем не обязательно физическое взаимодействие двух доменов (Binding Domain, Activation Domain), достаточно их нахождение в непосредственной близости. Только в том случае если фактор инициации трансляции будет взаимодействовать с VPg, клонированный

в вектор pGBKT-7, дрожжи ауксотрофные по гистидину(H), смогут расти на селективной среде DO-LWH. Что интересно, обе мутации, взнесённые во второй фактор инициации трансляции привели к прекращению взаимодействия с базовым вариантом VPg.

Широко известно, что вирусы очень быстро мутируют. Было опубликовано несколько работ, где показано, что мутации в VPg способны привести к тому, что он начинает взаимодействовать с измененным или другим фактором инициации трансляции. Исходя из этого мы проанализировали все доступные последовательности VPg вируса Y штамма NTN, представленные в базе данных NCBI. Мы учитывали растение-хозяина вируса и наличие полиморфизмов в VPg. В результате было отобрано 10 природных вариантов VPg, встречающихся на картофеле. От наиболее распространённого базового варианта VPg они отличались одной или несколькими аминокислотными заменами. С помощью ПЦР-мутагенеза были воспроизведены все эти варианты VPg. Мутантные факторы eIF4E-1 и eIF4E-2 были проверены на способность взаимодействовать этими вариантами VPg в условиях дрожжевой двугибридной системы. Оба мутантных варианта eIF4E-1 не взаимодействовали ни с одним из вариантов природных VPg. Однако, одна из этих замен, перенесённая во второй фактор, не нарушила взаимодействие eIF4E2 с большинством вариантов VPg.

Таким образом, была выявлена аминокислотная замена, которая приводила к нарушению взаимодействия обоих факторов eIF4E картофеля с рядом природных вариантов VPg штамма NTN, но не влияла на их функциональность.

## ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕРНЫХ ВИРУСОВ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ БЕЛКИ P54 И P30

**Кольцова Г.С., Сухер М.М., Рудакова С., Крутько С.А., Белов С.В., Холод Н.С., Кольцов А.Ю.**

***ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии (ФГБНУ ФИЦВиМ)», Вольгинский 60112***
**E-mail: burmakinags@gmail.com**

Африканская чума свиней (АЧС) – вирусная геморрагическая лихорадка диких и домашних свиней с летальностью до 100%, которая, возможно, является наиболее серьезной угрозой свиноводства во всем мире. Распространение болезни за пределы Африки на территорию России (с 2007 г.), европейских стран (с 2014 г.) и стран Азии (с 2018 г.) привело к огромным экономическими потерям и серьезным экологическим последствиям.

Стоит отметить, что до сих пор не зарегистрированы вакцины для профилактики АЧС. Тем не менее, продемонстрировано, что иммунизация рекомбинантными и живыми ослабленными вирусами может обеспечивать защиту от заражения гомологичными штаммами вируса. К сожалению, молекулярные и иммунологические механизмы развития иммунитета при АЧС плохо изучены. 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 определение серотип-специфических антигенов необходимы для дизайна и разработки вакцины.

Ранее мы продемонстрировали, что вирусные белки CD2v и лектин C-типа вируса АЧС обуславливают серологическую специфичность в реакции задержки гемадсорбции и важны для защиты от гомологичной инфекции вируса АЧС (Burmakina et al., 2016; Koltsova et al., 2021). Однако замена генов, кодирующих данные белки, не позволяла получить полную защиту от заражения АЧС, что свидетельствует о наличии дополнительных

защитных антигенов. Таким образом, идентификация протективных вирусных антигенов является актуальной задачей изучения патогенеза АЧС.

Целью работы являлось создание и изучение рекомбинантных штаммов вируса АЧС, несущих гены, кодирующие структурные белки p54 и p30 гетерологичного штамма вируса.

При проведении сравнительного анализа полных геномов вируса АЧС различных сероиммунотипов были идентифицированы 42 вирусных антигена, кодированных наиболее генетически вариабельными генами вируса. С целью изучения роли идентифицированных потенциальных протективных антигенов в формировании иммунного ответа при АЧС были получены химерные вирусы АЧС на основе аттенуированного штамма МК200, содержащие гетерологичные гены штамма К49.

Рекомбинантные векторы («рекомбинационные кассеты») для введения в состав генома дополнительных гетерологичных генов вируса АЧС и гена репортерного белка были получены на основе вектора pUC57. На первоначальном этапе родительский аттенуированный штамм МК200 (SG3, Genotype V) был использован для создания химерного вируса, в котором нативные гены, кодирующие лектин и CD2v были удалены и заменены генами из гетерологичного вирулентного штамма К49 (SG2, генотип I). Рекомбинантный штамм был получен путем гомологичной рекомбинации и отобран методом предельных разведений в культуре клеток макрофагов свиней.

Полученный рекомбинантный штамм был использован для дальнейшего генерирования химерных вирусов, содержащих гетерологичные гены белков p54 и p30 вируса АЧС.

Результаты исследований рекомбинантных вирусов *in vitro* позволили подтвердить экспрессию гетерологичных антигенов, а также их способность к репликации в макрофагах свиней. Полученные данные указывают на возможность использования химерных вирусов для иммунизации восприимчивых животных с целью изучения их протективного потенциала *in vivo* на следующем этапе проекта.

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

## СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕСИИ ГЕНА ДЕФЕНЗИНА Sm-AMP-D2 ИЗ Stellaria media L. В РАСТЕНИЯХ ТОМАТА

**Михель И.М.**

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

Среди овощных культур томат занимает первое место в мире по объему производства. На его долю приходится более 15% мирового производства овощей (более 177 миллионов тонн в 2016 году по данным www.fao.org) [Rothan et al, 2019]. Являясь важной культурой, томат поражается большим числом патогенов вирусной, бактериальной и грибной природы, в результате значительно снижается продуктивность растений и теряется большая доля урожая [Brahimi et al, 2017]. Современная селекция привела к появлению новых сортов, устойчивых к болезням, однако появление новых штаммов патогенов часто приводит к снижению устойчивости за короткий период времени [Tsutomu et al, 2007]. Наиболее широко используемой генно-инженерной стратегией повышения устойчивости растений к патогенам является введение в растительный геном

гетерологичных генов защитных белков и антимикробных пептидов (АМП) [Халилуев, 2013].

Наиболее перспективными источниками генов АМП являются дикорастущие виды растений. К таким растениям относят звездчатку среднюю (*Stellaria media* L.), распространенную повсеместно в Европе и Америке. В последние годы в отношении фитопатогенных организмов обнаружили защитное действие некоторых белков и пептидов из *S. media* L, в числе которых дефензины Sm-AMP-D и альфа-харпинины Sm-AMP-X. Для этих защитных белков определили транслируемые и регуляторные последовательности генов [Slavokhotova et al, 2011; Slavokhotova et al, 2013]. Выделенные из *S. media* L. защитные белки и пептиды представляют интерес для повышения устойчивости культурных растений к патогенам.

Для успешной экспрессии гетерологичных генов необходимы сильные конститутивные промоторы. Эталонным и наиболее часто используемым в генетической инженерии растений является промотор вируса мозаики цветной капусты CaMV35S.В большинстве случаев промотор CaMV35S обеспечивает высокий уровень экспрессии гетерологичных генов в растениях, тем не менее, он имеет ряд существенных недостатков. Из-за вирусного происхождения CaMV35S инфицирование трансгенных растений вирусом CaMV может приводить к сайленсингу гетерологичного гена под контролем CaMV35S. Множество трансгенных растений проявляют феномен гомологично-зависимого генного сайленсинга, который возникает при взаимодействии между собой тесно связанных повторяющихся элементов на одной молекуле ДНК или на гомологичных молекулах ДНК, в обеих аллельных и неаллельных позициях. Кроме этого, сайленсинг возникает, когда CaMV35S используется в качестве одного и того же промотора двух и более генов в векторах для трансформации растений. При переносе целевого гена в трансгенное растение, которое уже содержит ген с промотором CaMV35S, введение добавочных копий этого промотора может усиливать метилирование и сайленсинг несвязанных гомологичных копий.

Недавно во ВНИИСБ клонировали промотор гена Sm-AMP-D из *S. media* L. Установили, что в трансгенных растениях арабидопсиса и картофеля он сопоставим по эффективности с CaMV35S и может быть рекомендован для генетической инженерии.

Первоначальной задачей настоящего исследования является создание генетической конструкции для агробактериальной трансформации растений, содержащей ген дефензина *Sm-AMP-D2* из *S. media* L., под контролем собственного промотора. Исходная структура гена *Sm-AMP-D2* известна и включает 5'- и 3'-нетранслируемые области, транслируемую область и интрон. Транслируемая область кодирует сигнальный (32 а.о.) и антимикробный пептиды (50 а.о).

С целью повышения эффективности экспрессии гена при создании конструкции отказались от использования интрона и 3'-нетранслируемой области и оптимизировали кодоновый состав сигнального и антимикробного пептидов для повышения эффективности трансляции рекомбинантного белка в клетках растений томата.

В дальнейшем планируется клонирование вставки в растительный вектор *pCAMBIA2301* для проведения агробактериальной трансформации томата и получения трансгенных растений, экспрессирующих ген антимикробного пептида.

**Список литературы**

1. Rothan C., Diouf I., Causse M. Trait discovery and editing in tomato. The Plant Journal, 2019, 97, 73-90.

2. Brahimi, M.; Boukhalfa, K.; Moussaoui, A. Deep learning for tomato diseases: classification and symptoms visualization. Appl. Artif. Intell. 2017, 31, 299–315.

3. Tsutomu Arie, Hideki Takahashi, Motoichiro Kodama, Tohru Teraoka. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. Plant Biotechnology, 2007, 24, 135–147.

4. Халилуев, М. Р. Генно-инженерные стратегии повышения устойчивости томата к грибным и бактериальным патогенам / М. Р. Халилуев, Г. В. Шпаковский // Физиология растений. – 2013. – Т. 60. – № 6. – С. 763.

5. Anna A. Slavokhotova, Tatyana I. Odintsova, Eugene A. Rogozhin, Alexander K. Musolyamov, Yaroslav A. Andreev, Eugene V. Grishin, Tsezi A. Egorov, Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (Stellaria media L.) seeds, Biochimie, Volume 93, Issue 3, 2011, Pages 450-456.

6. Anna A. Slavokhotova, Eugene A. Rogozhin, Alexander K. Musolyamov, Yaroslav A. Andreev, Peter B. Oparin, Antonina A. Berkut, Alexander A. Vassilevski, Tsezi A. Egorov, Eugene V. Grishin, Tatyana I. Odintsova. Novel antifungal a-hairpinin peptide from Stellaria media seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution. Plant Molecular Biology. October 2013.

## СОЗДАНИЕ УДОБНОГО ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУС-РАСТИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

**Колесникова В.В.[1], Лебедева М. В.[2]**

[1] ***Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Пущинский государственный естественно-научный институт, Москва 125993;***

[2] ***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550;***

**E-mail: kolesnikovavicto@yandex.ru**

Вирусные болезни приносят наиболее значимый ущерб вегетативно размножающимся культурам, таким как картофель. В качестве мер борьбы с вирозами используют устойчивые сорта и здоровый посадочный материал. Эффективные химические препараты против вирусов недоступны на рынке.

Y вирус картофеля (PVY) - экономически важный патоген картофеля, который приводит к значительным потерям урожая. PVY является типичным представителем семейства *Potyviridae*. Его геном представлен молекулой РНК(+) размером 10 Kb. Нахождение ключевых элементов взаимодействия вируса с растением необходимо для определения целевых признаков (генов) при выведении устойчивого растения, а так же позволило бы ускорить процесс селекции. Раннее отмечалось, что для развития вируса необходимо физическое взаимодействие между белком VPg PVY и фактором инициации трансляции eIF4E растения. По данным некоторых статей, для нарушения взаимодействия VPg PVY и eIF4E достаточно одной или нескольких аминокислотных замен, поэтому данное явление рассматривают как потенциальную мишень для образования рецессивной устойчивости.

Инокуляция вирусом позволяет отобрать наиболее толерантные формы растений. При этом, результаты заражения одним лишь охарактеризованным изолятом вируса не будут репрезентативными. Проведение оценки растений на восприимчивость к разным изолятам вируса, в том числе с разными вариантами VPg, позволило бы выявить растения с долгосрочной перспективой толерантности к вирусу, и возможно даже варианты с абсолютной устойчивостью.

В связи с вышеизложенным, сборка рекомбинантного полноразмерного инфекционного клона вируса в лаборатории является более реальной задачей, в сравнение со сбором и поддержанием разных изолятов вируса, представленных в полевых условиях. Инокуляция полноразмерным клоном вируса с разными вариантами VPg более точно модулирует условия взаимодействия PVY и картофеля, чем изучение белок-белкового

взаимодействия с помощью методов *in vitro*. Кроме того, рекомбинантный вирус предотвращает возможный ложноотрицательный результат. Так как, визуально заметные симптомы на растение появляются при достаточном накоплении вируса в тканях и зависят от уровня толерантности отдельных растений. Интеграция в последовательность вируса маркеров помогла бы ответить на два основных вопроса: взаимодействует ли вирус с клетками растения-хозяина и как быстро и далеко он распространяется по тканям растения. Основными требованиями к маркерным последовательностям являются стабильность вставки и отсутствие влияния на скорость репликации вирусных частиц. В данной работе была создана генетическая конструкция для создания рекомбинантного PVY, несущего маркерную последовательность для визуального трекинга.

В качестве основы для создания вектора, несущего копию генома PVY с маркерным геном GFP, была выбрана высококопийная плазмида, несущая селективный ген устойчивости к ампициллину. Для наиболее эффективной инокуляции ДНКой РНК-вируса в плазмиде содержится терминатор (NOS) и промотор (CaMV35S). Между промотором и терминатором вставлен ДНК-фрагмент, необходимый для клонирования вирусного генома в вектор. Геном вируса был разбит на фрагменты, амплифицирован с кДНК вируса и клонирован в вектор.

После трансформации вектором и фрагментами вируса были отобраны колонии и проведена их проверка с помощью ПЦР на участки фрагментов вирусной последовательности. Проведенный ПЦР-скрининг и последующее секвенирование показали, что последовательность вируса восстановлена правильно. Полученная конструкция, несущая полный геном вируса Y будет наработана в достаточном количестве и использована для заражения растений.

## ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ПЕТУНИИ С ПРИЖИЗНЕННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕОРГАНИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК В УСЛОВИЯХ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

**Демиденко Д.В.[1,2], Халилуев М.Р. [1,2]**

***[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550 E-mail: Frankenvini1998@mail.ru***
***[2] Российский государственные аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550***

Цитоскелет является основой множества фундаментальных процессов, происходящих клетке, включая морфогенез, клеточное деление и транспортировку везикул [1]. Микротрубочки – элементы цитоскелета с внешним диаметром около 25 нм, состоящие из гетеродимеров, включающих в себя глобулярные α- и β- молекулы тубулина. Так как они представляют собой полые цилиндры, микротрубочки обладают достаточной прочностью и неподвижностью, что позволяет им объединяться в большие внутриклеточные структуры [2]. Эти структуры необходимы для клеточного функционирования и включают в себя митотические и мейотические веретена, которые обеспечивают нормальное деление клеток у эукариотических организмов [3]. Если говорить конкретнее, микротрубочки выполняют несколько динамических функций в растительных клетках, такие как везикулярный транспорт, движения хромосом и определение полярности клетки, а также могут играть роль в сигнальной трансдукции [4].

Петуния — одно из самых популярных однолетних растений в Европе и Соединенных Штатах Америки [5]. Ее широкое распространение не только в качестве

садовой культуры, но и в качестве модельного объекта в научной сфере объясняется наличием ряда выгодных характеристик, например, неприхотливость в выращивании, короткий жизненный цикл, наличие доступных молекулярных инструментов, созданной обширной библиотеки кДНК генов и т.д. [6]. Многие исследования направлены непосредственно на получение новых хозяйственно ценных признаков, например, окраски лепестков венчика [7], повышение устойчивости к абиотическим [8-9] и биотическим [10] стрессовым факторам, но есть и те, целью которых служит понимание внутренних фундаментальных процессов [11]. Получение трансгенных растений петунии с прижизненной визуализацией цитоскелета в качестве модели для дальнейших исследований реорганизации микротрубочек в условиях абиотического стресса является актуальной задачей, так как ее решение позволит более подробно изучить роль цитоскелета при действии различных стрессовых факторов.

В настоящей работе была произведена агробактериальная трансформация петунии (*Petunia hybrida* L.) трех генотипов, а именно: «Белый шар», «Суперкаскадная синяя F1» и самосовместимые клоны петунии гибридной, с использованием векторной конструкции pCMU-MTUBr (Addgene, № 61196), которая содержит целевую последовательность MAP-MBD, кодирующую слитый репортерный белок *mCherry* для прижизненной детекции микротрубочек, а также селективный ген *nptII*, обуславливающий устойчивость к канамицину. Эксперименты по трансформации растений петунии проводили методом сокультивирования листовых эксплантов размером 1х2 см с разбавленной суспензией агробактерии. Индукцию процессов морфогенеза проводили на питательной среде, составленной по прописи Мурасиге-Скуга (MS), дополненной 5 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИУК, 5 мг/л AgNO3, 300 мг/л тиментина для элиминации агробактерии и 25 мг/л канамицина. Концентрацию канамицина на шестом пассаже увеличили до 50 мг/л.

В результате проведенной агробактериальной трансформации на 84-е сутки эксперимента было получено 7 независимых побегов петунии (3 у генотипа «Белый шар», 4 у генотипа «Суперкаскадная синяя F1»), регенерация которых происходила из каллусной ткани, прошедшей селекцию на высокой концентрации селективного антибиотика (50 мг/л канамицина). Листовые экспланты петунии самосовместимого клона (растительный материал для исследований любезно предоставлен к.б.н. Е.В. Захаровой) не прошли отбор на селективной питательной среде, что указывает на их нетрансгенную природу. Таким образом, эффективность отбора на селективной питательной среде для генотипов «Белый шар» и «Суперкаскадная синяя F1» составили 6,9 и 21,1% соответственно. Полученные экспериментальные данные согласуются с результатами других исследователей, что эффективность агробактериальной трасформации существенно зависит от генотипа. В настоящее время все независимые канамицин-устойчивые регенеранты петунии культивируются на питательной среде для индукции ризогенеза, содержащей ½ дозы макросолей от прописи MS, 2% сахарозы, 0,2 мг/л индолилмасляной кислоты и канамицин в концентрации 50 мг/л. В дальнейшем будет проведен молекулярно-генетический анализ для подтверждения их истинного трансгенного статуса.

**Список литературы:**

1. Sampathkumar, A. Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in Arabidopsis / A. Sampathkumar, J.J. Lindeboom, S. Debolt, R. Gutierrez, D.W. Ehrhardt, T. Ketelaar, S. Persson // The plant cell. – 2011. – Vol. 23. – P. 2302-2313.

2. Janke, C. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions / C. Janke, M.M. Magiera // Nature reviews molecular cell biology. – 2020. – Vol. 21. – № 6. – P. 307-326.

3. Kelliher, M.T. crotubule control of functional architecture in neurons / M.T. Kelliher, H.A. Saunders, J. Wildonger // Current opinion in neurobiology. – 2019. – Vol. 57. – P. 39-45.

4. Fosket, D.E. Structural and functional organization of tubulin / D.E. Fosket, L.C. Morejohn // Annual review of plant physiology and molecular biology. – 1992. – Vol. 43. – P. 201-240.
5. Gebhardt, C. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research / C. Gebhardt // Theoretical and applied genetics. – 2016. – Vol. 129. – P. 2281-2294.
6. Gerats, T. A model system for comparative research: Petunia / T. Gerats, M. Vandenbussche // Trends in Plant Science. – 2005. – Vol. 10. – № 5. – P. 251-256.
7. Bashandy, H. Genetically engineered orange petunias on the market / H. Bashandy, T.H.Teeri // Planta. – 2017. – Vol. 246. – № 2. – P. 277-280.
8. Pennycooke, J.C. Down-regulating galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia / J.C. Pennycooke // Plant physiology. 2003. – Vol. 133. – № 2. – P. 901-909.
9. Wang Jundan Dehydrin gene transformed Petunia showed strong resistance to drought stress / Wang Jundan, Hu Yuanlei, Wei Xiao, Yu Pengzhi, Che Daidi, Lin Zhongping // Molecular plant breeding. – 2004. – Vol. 2. – № 3. – P. 369-374.
10. Sun, D. Comparative transcriptome profiling uncovers a Lilium regale NAC transcription factor, LrNAC35, contributing to defence response against cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus / D. Sun, X. Zhang et al. // Molecular plant pathology. – 2019. – Vol. 20. – № 12. – P. 1662-1681.
11. Morimoto, T. Functional characterization of Prunus SLFLs in transgenic Petunia / T. Morimoto, R. Tao // Acta Horticulturae. – 2019. – Vol. 1231. – P. 85-90.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОМОТОРА pro-SmAMP-X В МОДЕЛЬНЫХ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

**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***

Несмотря на развитие генетической инженерии растений, в настоящее время актуален вопрос расширения спектра растительных промоторов для биотехнологии модельных и сельскохозяйственных растений. Изолированные промоторы растительного происхождения могут сохранять свои основные функции в гетерологичных растениях, однако качественные и количественные вариации экспрессии рекомбинантных генов под их контролем не являются редкостью и должны быть изучены для каждого промотора, предлагаемого для биотехнологии растений.

Ранее нами из генома растения мокрицы (*Stellaria media*) был клонирован промотор гена *альфа-гарпинина SmAMP-X*. Было установлено, что в геноме мокрицы существует не менее двух версий промотора, обозначенные нами pro-SmAMP-X1 и pro-SmAMP-X2, которые благодаря 27 % полиморфизму демонстрируют различающиеся наборы цис-элементов. Для оценки промоторной эффективности создали различные 5'-делеционные варианты pro-SmAMP-X1 (-206, -283, -416 и -1268 п.н. относительно инициирующего кодона ATG) и pro-SmAMP-X2 (-440 п.н. относительно инициирующего кодона ATG), которые поместили в растительный экспрессионный вектор для трансформации растений pCambia 2301. В данных генетических конструкция 5'-делеционные варианты промоторов контролировали экспрессию гена *uidA*, кодирующего репортерный белок GUS.

С использованием генетических конструкций выполнили агробактериальную трансформацию растений *Arabidopsis thaliana* методом погружения соцветий в суспензию агробактерий. Затем создали гомозиготные линии поколения $T_3$ для каждого делеционного варианта промотора, экспрессирующие репортерный ген *uidA*. Линии растений

использовали для определения активности репортерного белка GUS методом гистохимического окрашивания с использованием в качестве субстрата X-gluc и для количественных измерений с использованием в качестве субстрата 4MUG.

Установили, что активность репортерного белка GUS присутствует у трансгенных растений *A. thaliana* со всеми делеционными вариантами версий промотора pro-SmAMP-X, на всех изученных стадиях роста и развития. В частности, активность репортера наблюдали в корнях, стеблях, листьях, соцветиях, плодах и некоторых органах цветка (лепестки, чашечка, тычиночная нить), хотя её интенсивность могла различаться в зависимости от линии растений. Наиболее интенсивную окраску демонстрировали стебли и жилки листьев, что может свидетельствовать о повышенной специфичности нового промотора для проводящих тканей. Полученные результаты оказались удивительными, поскольку в интактных растениях мокрицы по данным реверс-ПЦР экспрессия гена *альфа-гарпинина SmAMP-X* присутствовала преимущественно в проростках и цветках (Slavokhotova et al., 2014). С точки зрения физиологии растений промотор pro-SmAMP-X оказался в значительной степени конститутивным в трансгенных растениях арабидопсиса.

С использованием количественных измерений установили, что 5'-делеционные варианты промотора pro-SmAMP-X обеспечивают уровень активности GUS в диапазоне от 2400 до 6600 пмоль/мин х мг; при использовании известного промотора 35S уровень активности составил 8400 пмоль/мин х мг. Все делеционные варианты версии pro-SmAMP-X1 оказались слабее ($p$ = 0.05) сильного промотора 35S, а вариант pro-SmAMP-X2 сопоставим с ним по эффективности. Сравнение сопоставимых по длине делеционных вариантов 416 и 440 п.н. разных промоторных версий, с идентичностью нуклеотидных последовательностей 83%, свидетельствует о функциональности наблюдаемого между ними полиморфизма. Эту особенность можно использовать для понимания фундаментальных механизмов работы растительных промоторов и для «тонкого» тюнинга эффективности промотора в трансгенных растениях. Установили, что все варианты нового промотора сохраняют свою эффективность в поколениях трансгенных растений и способны эффективно работать, находясь в аллельных положениях в гомозиготных линиях трансгенных растений. Это свойство промотора принципиально важно при селекции трансгенных культур, размножаемых семенами.

Для оценки эффективности промотора pro-SmAMP-X в сельскохозяйственных растениях выполнили агробактериальную трансформацию растений картофеля клубненосного (*Solanum tuberosum* L.) сорта Вектор в соответствие с опубликованной ранее методикой (Ветчинкина и др. 2016). Для этого использовали созданные нами ранее генетические конструкции с вариантами промоторов pro-SmAMP-X1 (-283 п.н.) и pro-SmAMP-X2 (-440 п.н.). В результате независимых трансформационных событий создали, соответственно, пять и семь трансформантов картофеля, устойчивых к антибиотику канамицину (C=75 мг/л) и продуцирующих репортерный белок GUS. С помощью гистохимического окрашивания с использованием субстрата X-gluc показали наличие активности GUS в листьях, черешках, стеблях и некоторых органах цветка (пыльники и чашечка) трансгенных растений картофеля. Визуально отметили, что наиболее высокая активность промотора присутсвует в проводящей системе стеблей, черешков, листьев и клубней. Наименьшую активность наблюдали в цветках и составляющих их органах, а также в придаточных корнях при прорастании клубней. Визуально отметили, что интенсивность окраски в изученных органах ожидаемо выше при использовании более длинного делеционного варианта промотора второй версии, чем при использовании более короткого варианта первой. С использованием субстрата MUG установили, что в теплице у трансгенных растений картофеля в разных органах уровень активности GUS варьирует в диапазоне значений от 100 до 21000 пмоль/мин х мг. Наиболее высокий уровень активности GUS от 265 до 21000 пмоль/мин х мг наблюдали в стеблях растений; при использовании более длинного делеционного варианта версии pro-SmAMP-X2 он был примерно в 7 раз выше, чем при использовании pro-SmAMP-X1. В листьях и клубнях каждого

трансформанта наблюдали сопоставимые уровни активности, которые в целом составляли от 100 до 6500 пмоль/мин х мг, при этом более длинный делеционный вариант второй версии был на порядок сильнее в листьях и до 7 раз сильнее в клубнях. В целом, промотор pro-SmAMP-X2, включающий полноразмерную проксимальную область, предпочтительнее для высокоуровневой экспрессии рекомбинантных генов в клетках растений картофеля.

Полученные результаты свидетельствуют, что промотор pro-SmAMP-X может быть рекомендован для биотехнологии растений в качестве эффективного регуляторного элемента с целью контроля экспрессии «целевых» генов.

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

**Список литературы**:

**1.** Slavokhotova A.A. Novel antifungal a-hairpinin peptide from Stellaria media seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution / A.A. Slavokhotova, E.A. Rogozhin, A.K. Musolyamov, Y.A. Andreev, Oparin P. B., A.A. Berkut, A.A. Vassilevski, T.A. Egorov, E.V. Grishin, T.I. Odintsova // Plant Molecular Biology, 2013 - 84(1-2). - с 189-202.

**2.** Ветчинкина Е.М. Экспрессия растительного гена антимикробных пептидов pro-SmAMP2повышает устойчивость трансгенных растений картофеля к возбудителям альтернариоза и фузариоза / Е.М. Ветчинкина, В.В. Комахина, Д.А. Высоцкий и др. // Генетика, 2016. – т. 52. – с. 1055-1068.

## ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПЕТУНИИ С ГЕНОМ *codA* ИЗ *Arthrobacter globiformis*

**Каракай М.В.[1,2], Халилуев М.Р. [1,2]**

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

***[2] Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва 127550 E-mail: milenalfkflf@gmail.com***

Петуния является не только ценной декоративной культурой, но и важным объектом для фундаментальных исследований. Абиотические стрессовые воздействия, такие как засуха, затопление, низкие или повышенные температуры, низкие положительные и отрицательные температуры, избыток ультрафиолета могут вызывать значительное снижение ростовых процессов растений петунии, а также ее декоративных свойств. Помимо традиционных методов селекции для повышения устойчивости к действию различных стрессовых факторов абиотической природы широко используются методы генетической трансформации. Одной из эффективных генно-инженерных стратегий повышения устойчивости растений к осмотическому стрессу является повышение активации синтеза осмопротекторов – нейтрализаторов активных форм кислорода (АФК), которые генерируются при действии стрессовых факторов, и мембранных систем. Для защиты культурных растений от осмотического стресса успешно используют трансформацию растений генами, которые усиливают синтез молекул, обладающих осмопротекторными свойствами, например, низкомолекулярных углеводов, сахароспиртов, а также аминокислот (глицина, пролина и др.). К одному из таких соединений, обеспечивающих эффективную защиту клеткам как некоторых прокариот, так и ряда растений, относится глицинбетаин – осмопротектор, обуславливающий увеличение осмотического давления внутри клетки, поддерживая тургор, предохраняя клетку от потери воды и стабилизируя мембраны и белки. У некоторых почвенных бактерий он синтезируется из предшественника — холина только ферментом холиноксидазой в одну

реакцию, тогда как в растительных клетках — из других предшественников в несколько реакций и минимум двумя ферментами. В настоящей работе для повышения устойчивости растений петунии к оксидативному стрессу, индуцируемому избыточным действием АФК, была использована векторная конструкция pBIcodA, содержащая полусинтетический ген холиноксидазы *codA* из почвенной бактерии *Arthrobacter globiformis*, снабженный сигнальной последовательностью гена *rbcS* гороха, направляющая продукт гена в хлоропласт, а также селективный ген *nptII* для отбора трансгенных растений.

В настоящей работе была произведена агробактериальная трансформация петунии (*Petunia hybrida L.*) сорта «Белый Шар». Эксперименты по трансформации растений петунии проводили методом сокультивирования листовых эксплантов с разбавленной суспензией агробактерии. Донорные экспланты были получены от асетических растений, полученных из семян. Индукцию процессов морфогенеза проводили на питательной среде, составленной по прописи Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением 5 мг/л БАП; 1 мг/л ИУК, 5 мг/л AgNO3, 25 мг/л канамицин, 300 мг/л тиментин.

В результате проведенной агробактериальной трансформации на 84-е сутки эксперимента было получено 40 независимых побегов петунии, регенерация которых происходила из каллусной ткани, прошедшей селекцию на высокой концентрации селективного антибиотика (50 мг/л канамицина). Листовые экспланты петунии прошли отбор на селективной питательной среде, благодаря чему можно предположить о большой вероятности их трансгенной природы. Регенерирующие канамицин-устойчивые побеги были перенесены на питательную среду для индукции ризогенеза, которая содержит ½ дозы макроэлементов по прописи MS, ИМК в концентрации 0,5 мг/л, а также канамицин в концентрации 50 мг/л. В настоящее время 17 независимых линий успешно сформировали корни на среде для ризогенеза с добавлением селективного антибиотика в концентрации, летальной для нетрансформированных растений. В дальнейшем из канамицин-устойчивых регенерантов предполагается выделить ДНК и провести молекурно-генетический анализ методом ПЦР для подтверждения интеграции чужеродных генов.

**Список литературы**:

1. А.А. Гулевич, Л.В. Куренина, Е.Н. Баранова. Использование системы таргетинга ферментов Fe-зависимой супероксиддисмутазы и холиноксидазы в хлоропласт как стратегия эффективной защиты растений от абиотических стрессов

# ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГОСЯ РЕТРОТРАНСПОЗОНА ARABIDOPSIS THALIANA

**Константинов З.С.[1,2], Лебедева М.В.[2], Корчинская В.Ю.[3], Таранов В.В.[2], Киров И.В.[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: kirovez@gmail.com***
***3 - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ул. Колмогорова, д. 1***

Мобильные элементы – последовательности ДНК, которые способны менять свою локализацию в геноме. Среди них выделяют ретротранспозоны – мобильные элементы, использующие процесс обратной транскрипции для своей транспозиции. Всплески активности транспозонов в ходе эволюции многих сельскохозяйственых культур приводили к увеличению размера их геномов.[2] Поэтому им приписывается исключительно большая роль в процессах эволюции генома.

Большая часть ретротранспозонов растений метелированы и не активны в нормальных условиях. Однако, последние исследования показывают, что некоторые ретротранспозоны экспрессируются в нестрессовых условиях, формируют ретротранскриптом (совокупность всех РНК ретротраснпозонов клетки). Биологическая роль таких транскриптов остаётся неясной. Мы провели биоинформатический анализ экспрессирующихся ретротранспозонов Arabidopsis thaliana и выявили несколько ретротранспозонов к высокой экспрессией. Было проведено геномное редактирование одного из ретротранспозонов с целью его полного или частичного удаления. Был проведён ПЦР скрининг 59 растений с последующим секвенированием ПЦР продуктов. Результаты ПЦР показывают успешное геномное редактирование целевого ретротранспозона. Полученные растения послужат ценным материалом для изучения биологического значения ретротранскриптома растений.

**Список литературы:**

1.TRANSPOSABLE (MOBILE)EUKARYOTIC DNAPart 2. Role in gene regulation and genome evolution V. A. GVOZDEV

2. Vitte C., Panaud O. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model //Cytogenetic and genome research. – 2005. – Т. 110. – №. 1-4. – С. 91-107.

## СЕКЦИЯ
## «КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОСКОПИЯ»

# РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТОВ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ СВЕКЛЫ СТОЛОВОЙ

**Заячковская Т.В., Минейкина А.И., Кан Л.Ю., Заячковский В.А., Домблидес Е. А.**

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

Большая экономическая значимость свеклы столовой (*Beta vulgaris* L. ssp. *europaea* Krass. var. *atrorubra* Krass.), как одной из основных корнеплодных овощных культур России, требует в настоящее время внедрения в селекционный процесс современных биотехнологических методов, в частности культуры неопыленных семяпочек *in vitro*, с возможностью получения удвоенных гаплоидных растений для ускоренного создания на их основе высокопродуктивных гибридов. Наиболее распространенным объектом биотехнологических исследований семейства Амарантовые (Chenopodiaceae Vent.) является свекла сахарная. Различные технологии культуры тканей *in vitro*, генетическая трансформация, методы молекулярной биологии используются для усовершенствования характеристик свеклы сахарной (Gurel et al., 2008; Lux et al., 1990; Жужжалова и др., 2016) и лишь единичные литературные источники содержат сведения по применению репродуктивных биотехнологий, в частности, метода гиногенеза (Baranski, 1996) и андрогенеза (Goreska, 2017) у свеклы столовой. В этих публикациях приводятся лишь данные об индукции процесса гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* и андрогенеза в культуре микроспор *in vitro*. В связи с этим создание высокоэффективной, воспроизводимой технологии, позволяющей получить удвоенные гаплоиды свеклы столовой является актуальной задачей не только для России, но и для мировой селекции.

Объектом исследований являются сортообразцы из гибридных популяций свеклы столовой (Betta vulgaris L. ssp. europaea Krass. var. atrorubra Krass; синонимы: Beta vulgaris ssp. rapaceae var.atrorubra Krass; Beta vulgaris L. ssp. europea Krass. convar. esculenta Salisb. var. rubra) сортотипа Бордо, сортопопуляции свеклы столовой – Нежность и Добрыня.

Для успешной индукции гиногенеза у свеклы важную роль играет период развития цветоносных побегов донорных растений и стадия развития зародышевого мешка в семяпочках. Необходимо использовать семяпочки, содержащие зрелый зародышевый мешок, которые соответствуют бутонам, расположенным на участке колосовидного цветоноса длиной 2-5 см выше раскрывшегося цветка. Повреждение семяпочки при выделении ее из завязи ингибирует гиногенез.

Показано, что для успешной индукции гиногенеза рекомендуется использовать разработанную в лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ ФНЦО питательную среду IMB (Induction Medium for Beta vulgaris) с 0,4 мг/л тидиазурона. Был подобран оптимальный температурный режим для индукции гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* для свеклы столовой – культивирование в темноте при 28 $^{0}$C в течении четырех недель. При регенерации листовых розеток свеклы столовой из образовавшегося в индуцированных семяпочках каллуса/эмбриоидов лучшие результаты были получены на твердой питательной среде MS (Murashige, Skoog, 1962) с 2% сахарозой, 3г/л фитогеля, с 1мг/л БАП или 1мг/л БАП в сочетании с 0,1 мг/л ГК. Пересадку на свежую питательную среду необходимо производить каждые две-три недели. Для лучшей стабилизации ростовых процессов регенерантов небольшие листовые розетки субкультивировали на твердой безгормональной питательной среде MS (Murashige, Skoog, 1962) с 2% сахарозой, 3г/л фитогеля.

Для укоренения полученных микропобегов необходимо переносить их на безгормональную среду ½ MS (Murashige, Skoog, 1962) с 2% сахарозой, 3г/л фитогеля с предварительным погружением основания побегов в раствор индолилмасляной кислоты в концентрации 5 мг/л, что способствует появлению корней с частотой 77%.

В результате оптимизации технологии индуцировать образование эмбриоидов и каллуса удалось у шести из 11 включенных в исследование образцов свеклы столовой. В зависимости от генотипа доля семяпочек, индуцирующих гиногенез варьировала от 3,4% до 21,1%. Максимальная отзывчивость к индукции гиногенеза наблюдалась у сорта Нежность – 21,1%. Среднее число индуцированных семяпочек (шт/на чашку Петри) варьировало от 1,2±0,37 у №135/20 до 7,4±0,23 у сорта Нежность. Регенерация листовых розеток свеклы столовой из образовавшихся в индуцированных семяпочках эмбриоидов наблюдалась в результате разрастания семядольных и гипокотильных участков. После нескольких этапов субкультивирования образовавшихся каллусных структур на регенерационной питательной среде у четырех из шести отзывчивых на этапе индукции генотипов наблюдалось формирование меристематических очагов для инициации перехода к процессу регенерации. Регенерационная способность каллусных структур определялась генотипом и варьировала от 0 до 27,3%. У отзывчивого на этапе индукции образца Б-131 наблюдалось образование каллусных структур, меристематические участки которого не инициировали развитие побегов. Регенерационная способность каллусных структур из индуцированных семяпочек сорта Добрыня составила 12,5%. Наибольшая морфогенетическая активность каллусных структур и выход растений-регенерантов отмечены у сорта Нежность, у которого все семяпочки индуцировали развитие морфогенного каллуса.

Цитофотометрическая оценка уровня плоидности регенерированных растений свеклы столовой в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* выявила гаплоидные формы с одинарным (n=9) набором хромосом, что свидетельствует о происхождении растений из гаплоидных неоплодотворенных семяпочек без включения соматических клеток. Применение цитологического метода с помощью пропионно-лакмоидного метода окрашивания клеток регенерантов свеклы столовой подтвердило гаплоидный набор хромосом полученных растений.

Таким образом, научно-исследовательская работа по оптимизации условий индукции гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек свеклы столовой позволила не только индуцировать процесс гиногенеза в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*, но и получить растения-регенеранты.

**Список литературы:**

1. Barański. R. In vitro organogenesis in red beet (*Beta vulgaris* L.): effects of ovule culture conditions. Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 1996. 65 (1-2): 57-60.

2. Górecka K., Krzyżanowska D., Kowalska U., Kiszczak W., Podwyszynska M. Development of embryoids by microspore and anther cultures of red beet (*Beta vulgaris* L. subsp. vulgaris). Journal of Central European Agriculture. 2017. 18 (1): 185-195. DOI: 10. 5513/JCEA01/18.1.1877.

3. Gürel E., Gürel S., Lemaux P. G. Biotechnology applications for sugar beet. Crit Rev Plant Sci. 2008. 27: 108-140. doi: 10.1080/07352680802202000.

4. Lux H., Herrman L, Wetzel C. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. Plant Breed. 1990. 104:177–183. doi: 10.1111/j.1439-0523.1990.tb00420.x.

5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum. 1962. 15. (3): 473-497.

6. Жужжалова Т. П., Подвигина О. А., Знаменская В. В., Васильченко Е. Н., Карпеченко Н. А., Землянухина О.А. Гаплоидный партеногенез *in vitro* у сахарной свеклы (*Beta vulgaris*): факторы и диагностические признаки. Сельскохозяйственная биология. 2016. 51. (5): 636-644 doi: 10.15389/agrobiology.2016.5.636rus.

# РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КУЛЬТУРЫ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ИЗ МАТЕРИАЛА, ПОЛУЧЕННОГО ЧЕРЕЗ 10 ЧАСОВ ПОСЛЕ СМЕРТИ ГИБРИДА ОВЦЫ И СНЕЖНОГО БАРАНА

**Ворожбит Т.А., Сингина Г.Н.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Дубровицы 142132. E-mail:tima_voron2008@mail.ru***

Одной из задач соматического клонирования является сохранение редких или уникальных животных [1]. В качестве доноров ядер в таких случаях как правило используются фибробласты кожи, также возможно использование и других клеток, полученных от живых животных. Однако, возможны ситуации, когда уникальное животное погибло, а от него так и не были получены образцы соматических клеток. В таком случае возникает вопрос о методе получения культуры соматических клеток от мертвого животного, и в течение какого времени это еще возможно [2].

Целью работы являлась оценка возможности получения культуры соматических клеток от погибшего животного (гибрид овцы и снежного барана).

Материал (уши), для выделения первичной культуры соматических клеток был получен от гибрида овцы и снежного барана. Работа по получению первичной культуры соматических клеток началась через 10 часов после смерти животного. Поступивший в лабораторию материал тщательно промыли под проточной водой, после чего обработали 70% этиловым спиртом. С части ушной раковины лезвием удалили волосяной покров, кожу обработали 70% этиловым спиртом. Для выделения соматических клеток было решено использовать кусочки уха с хрящом и кусочки кожи без хряща. Для получения кусочков с хрящом от уха отрезали тонкие полосы с помощью ножниц. Кусочки кожи получали, снимая ее с помощью лезвия. В дальнейшем работу с кусочками кожи и кусочками уха с хрящом вели раздельно. Образцы многократно промыли в физиологическом растворе с антибиотиками (пенициллин — 200 МЕ/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл), а после доставки в стерильный бокс многократно промыли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с антибиотиками и антимикотиком (пенициллин — 100 МЕ/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл, амфотерицин — 100 нг/мл). После тщательной промывки кусочки исходной ткани максимально возможно измельчили с помощью лезвий, после чего однократно отмыли центрифугированием в ФСБ (7 минут 2000 оборотов) и подвергали обработке 0,25 % раствором трипсина в течение 20 мин при 37 °С. Трипсин нейтрализовали эквивалентным объемом среды DMEM, содержащей 5 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и гентамицин (50 мкг/мл). Суспензию центрифугировали 7 минут при 2000 оборотов, после чего осадок с кусочками ткани ресуспендировали и высеяли в культуральные планшеты с ростовой средой DMEM, дополненной 15 % ФБС, 1 % несущественных аминокислот и гентамицином (50 мкг/мл) для культивирования.

Культивирование проводили в инкубаторе при 38 °С, 5% $CO_2$ с частичной заменой ростовой среды раз в три дня, контроль планшетов проводился ежедневно. На второй день культивирования в одном из культуральных планшетов с кожей были найдены одиночные клетки и небольшие колонии. Через пять дней культивирования во всех планшетах найдены единичные закрепившиеся на культуральном пластике кусочки ткани, образовавшие центры роста для клеток двух типов. Большая часть выделенных клеток представляет собой фибробласты кожи, но встречаются также участки эпителиальной ткани. Через девять дней культивирования клетки были сняты 0,25 % раствором трипсина и перенесены в новые культуральные планшеты без кусочков исходной ткани. После достижения монослоя

клеточная культура была заморожена в пробирках с криопротектором 10% DMSO + 40% ФБС + 50% DMEM, и хранится при -80°С.

Таким образом, с помощью приведенной выше методики, удалось получить культуру соматических клеток из материала, полученного через 10 часов после смерти гибрида овцы и снежного барана.

**Список литературы:**

1. Tunstall T, Kock R, Vahala J, et al. Evaluating recovery potential of the northern white rhinoceros from cryopreserved somatic cells. Genome Res. 2018;28(6):780-788. doi:10.1101/gr.227603.117

2. Wang T, Li Z, Zheng D, Liu W, Huang P, Zeng Z, Xu C, Wang B, Wei J. Establishment and characterization of a fibroblast cell line from postmortem skin of an adult Chinese muntjac (Muntiacus reevesi). In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2020 Feb;56(2):97-102. doi: 10.1007/s11626-019-00422-8. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31898011.

## ЭМБРИО- И КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕМЯЗАЧАТКОВ *CUCURBITA PEPO L.*

***Осминина Е.В., Соловьева Ю.А., Монахос С.Г.***

***ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, 127550, E-mail: info@rgau-msha.ru***

Ускорение селекции сельскохозяйственных растений предполагает внедрение современных методов культуры in vitro и молекулярной селекции, направленных на снижение временных, трудовых и финансовых затрат на производство коммерческих конкурентноспособных F1-гибридов (Shmykova N.A. et al., 2015, Domblides E.A., 2019, Осминина Е.В. и др., 2020). Одним из перспективных на сегодняшний день способов ускорения селекции является производство удвоенных гаплоидов, который позволяет сократить сроки создания гомозиготных линий с 6-8 лет до 1-2 лет (Shmykova N.A. et al., 2015). Технологии создания удвоенных гаплоидов разработаны для многих культур: морковь (Чистова А.В., 2014), капуста (Монахос С.Г., 2014), лук репчатый (Монахос С.Г., 2014) и др. Однако для кабачка нет высокоэффективных стабильных протоколов. Целью данного исследования было оценить влияние факторов на эмбрио- и каллусогенез в культуре изолированных семязачатков кабачка (C. pepo L.) для оптимизации существующих протоколов.

**Материалы и методы.** В качестве растительного материала использовали гибриды кабачка F1 Ангелина, , F1 Марселла и образцы из коллекции Селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева №, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, S6, S7, S, FАнгS. Донорные растения выращивали в контейнерах с торфом в обогреваемой теплице с дневной температурой 24° С, ночной - 18° С при естественном освещении.

Неопыленные завязи кабачка отбирали за 1-2 дня до раскрытия бутона в фазе окрашенного венчика. С завязи удаляли околоцветник и промывали под проточной водопроводной водой. Далее стерилизовали в 2%-ном растворе NaOCl с добавлением 2-3 капель Tween 20 с последующим трехкратным промыванием в стерильной воде в течение 1, 5, 10 мин. Семязачатки выделяли при помощи пинцета и скальпеля в асептических условиях с использованием стереомикроскопа ZEISS STEMI 2000-C и инокулировали на твердую питательную среду СВМ (Gemes Juhasz et al., 2002). Чашки Петри с эксплантами инкубировали в световой комнату при температуре 22°С, режиме освещения 16 ч. день/ 8 ч. ночь в течение 14 суток. Далее экспланты пересаживали на регенерационную питательную среду СВМ без регуляторов роста с добавлением 30 г/л сахарозы и 3 г/л фитогеля. Пересадку на свежую регенерационную среду осуществляли каждые 2-3 недели.

Проросшие семязачатки пересаживали на питательную среду MS (Murashige T., Skoog F., 1962) с 30 г/л сахарозой, 3 г/л фитогеля.

В настоящей работе изучали влияние регуляторов роста, тидиазурона (TDZ) 0,2 мг/л и 2,4-D 2 мг/л, источников углеводов сахарозы 5 % и мальтозы 5 %, желирующего агента фитогеля 0,3 % и агара 0,7 % и температурной предобработки 33 °С в течение 4-7 суток на частоту образования эмбриоидов и каллуса в культуре изолированных семязачатков. Для статистического анализа данных использовали IBM SPSS Statistics 26 (тест Манна-Уитни).

Результаты. В результате исследования установлено преобладающее влияние фактора регулятора роста на частоту эмбриогенеза, по сравнению с другими факторами - элементами питательной среды и температурной предобработкой. В меньшей степени на образование проростков в культуре изолированных семязачатков кабачка оказывали влияние тип желирующего агента (фитогель, агар) и источник углеводов (сахароза, мальтоза). При этом, отмечена положительная тенденция увеличения выхода проростков на питательной среде с добавлением сахарозы и агара. Температурная предобработка оказала разнонаправленное действие в отношении высоко отзывчивых генотипов (F1АнгS и F1 Ангелина). На фоне сочетания менее благоприятных факторов (TDZ, мальтоза, агар) температурная предобработка дала положительную тенденцию на увеличение числа проросших семязачатков. Установлено, что генотип в значительной мере влияет на выход проростков в культуре изолированных семязачатков. Наиболее отзывчивыми оказались F1 Ангелина и FАнгS, образцы № 1, 4, 6, 8, S6 оказались неотзывчивыми.

Полученные результаты данного исследования позволят оптимизировать и унифицировать технологию создания удвоенных гаплоидов кабачка в культуре изолированных семязачатков.

**Список литературы:**

1 Монахос С.Г. Создание чистых линий-удвоенных гаплоидов капусты в культуре изолированных микроспор и селекции F1-гибридов на основе современных методов биотехнологии: методические рекомендации //Москва: Изд-во РГАУ–МСХА имени КА Тимирязева. – 2014.

2 Монахос С.Г., Богданова В.Д., Ветчинкина Е.М. Создание чистых линий – удвоенных гаплоидов лука репчатого (Allium cepa L.) и селекция F1-гибридов на основе современных методов биотехнологии: метод. рекомендации. М.: Изд-во РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2014 г., 45 с.

3 Осминина Е.В., Соловьева Ю.А. ИЗУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ CUCURBITACEAE В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕМЯЗАЧАТКОВ //СБОРНИК СТУДЕНЧЕСКИХ НАУЧНЫХ РАБОТ. – 2020. – С. 322-325.

4 Чистова А. В., Монахос С.Г. Получение удвоенных гаплоидов моркови в культуре пыльников //БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, ЖИВОТНОВОДСТВЕ И ВЕТЕРИНАРИИ. – 2014. – С. 59.

5 Domblides E. A. et al. DH-plant production in culture of unpollinated ovules of cucumber (Cucumis sativus L.) //Vegetable crops of Russia. – 2019. – №. 6. – С. 3-9.

6 Shmykova N. A. et al. Prospective of development of doubled haploid plants of Cucurbitaceae family //Vegetable crops of Russia. – 2015. – №. 3-4. – С. 28-31.

# ЭНДОГЕННЫЙ ФОРМАЛЬДЕГИД КАК ФАКТОР, ВОЗВРАЩАЮЩИЙ КЛЕТКАМ ОПУХОЛИ СПОСОБНОСТЬ К АПОПТОЗУ

***Липскеров Ф.А.[1,2], Шешукова Е.В.[2], Ершова Н.М.[2], Комарова Т.В.[1,2]***

***1 – ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва 119991. E-mail: fedor@lipskerov.ru***
***2 – ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991***

Рост и метастазирование раковой опухоли в организме человека обеспечивается рядом приобретенных ею отличительных признаков (1), среди которых устойчивость к клеточной смерти (2). Более того, уже несколько десятилетий существует концепция, согласно которой механизм программированной гибели клеток может служить естественным барьером для возникновения и развития рака (3). Среди различных путей, которые используют раковые клетки для уклонения от клеточной смерти, метаболизм становится одним из ключевых факторов (4). Клеточные метаболиты могут регулировать функции про- и антиапоптотических белков. Важно отметить, что основной целью большинства методов лечения рака является индукция смерти опухолевых клеток с целью освобождения организма от опухоли. Поэтому выявление факторов, возвращающих способность к апоптозу злокачественным клеткам, будет способствовать как профилактике раковых заболеваний, так и улучшению их терапии. Одним из таких факторов может быть метаболический формальдегид (ФА). В организме человека ФА является продуктом различных метаболических путей и участвует в С1-цикле, который является источником одноуглеродных соединений для синтеза и модификации таких молекул как ДНК, РНК и аминокислот. При этом концентрация ФА в крови поддерживается на низком уровне около 0.1 мМ (5). Однако, в раковых клетках уровень ФА поднят за счет повышения общего метаболизма аминокислот и нуклеотидов, но при этом и метаболизм ФА более активный. Такие клетки характеризуются более высокой экспрессией как алкогольдегидрогеназ (6), так и альдегиддегидрогеназ (ALDH1 и 2). Мы предположили, что подавление окисления эндогенного ФА при одновременном стимулировании накопления ФА в раковой клетке может способствовать ее гибели за счет повышения уровня ФА до токсического. Для проверки этого предположения мы использовали ингибитор альдегиддегидрогеназы, дисульфирам (DSF). Мы продемонстрировали способность DSF ингибировать пролиферацию и индуцировать гибель культивируемых клеток аденокарциномы молочной железы BT-474, SKBR-3 и MCF-7, а также определили уровень ФА в клеточных лизатах в ответ на обработку DSF. Оказалось, что гибель опухолевых клеток в культуре сопровождается повышением уровня ФА. Также мы оценили влияние DSF на развитие злокачественной со́лидной опухоли на мышиной модели с перевитой меланомой. Мышей делили на группы и внутрибрюшинно вводили тестируемые вещества. 1 группа - DSF (100 мг/кг); 2 группа - DSF (100 мг/кг) + ингибитор алкогольдегидрогеназы 4-метилпиразол (4-MP) (10 мг/кг); 3 группа – физиологический раствор. Через 24 часа после введения у мышей отбирали кровь и образцы опухоли. В сыворотке крови измеряли содержание ФА. В контрольной группе концентрация ФА в сыворотке составила 55±5 μM; в 1 группе (DSF) – 66,7±5,6 μM; во 2 группе (DSF+4-MP) - 66,9±6,3 μM. Полученные данные указывают на то, что уровень ФА в крови животных растет при введении DSF. Кроме того, было отмечено плохое самочувствие животных в экспериментальных группах 1 и 2, связанное со стремительным разрушением опухоли и гибелью ее клеток в результате воздействия DSF. Однако, это не является самим по себе действием DSF на организм мыши, т.к. в предварительных экспериментах на здоровых мышах мы показали, что введение DSF не приводит к подобным негативным последствиям.

Таким образом, показано, что введение DSF мышам с перевитой опухолью приводит к повышению уровня ФА в сыворотке крови и апоптозу клеток опухоли.

**Список литературы:**

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013

2. Messmer T, Meyenn F von, Savino A, Santos F, Mohammed H, Lun ATL, et al. Transcriptional Heterogeneity in Naive and Primed Human Pluripotent Stem Cells at Single-Cell Resolution. Cell Rep. 2019 Jan 22;26(4):815-824.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.12.099

3. Ucker DS, Levine JS. Exploitation of Apoptotic Regulation in Cancer. Front Immunol. 2018;9:241. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00241

4. Matsuura K, Canfield K, Feng W, Kurokawa M. Chapter Two - Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. In: Jeon KW, Galluzzi L, editors. International Review of Cell and Molecular Biology [Internet]. Academic Press; 2016 [cited 2021 Oct 4]. p. 43–87. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644816300570

5. Heck H d'A, Casanova M. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. Regul Toxicol Pharmacol RTP. 2004 Oct;40(2):92–106. DOI: 10.1016/j.yrtph.2004.05.001

6. Orywal K, Szmitkowski M. Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in malignant neoplasms. Clin Exp Med. 2017 May;17(2):131–9. DOI: 10.1007/s10238-016-0408-3

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ КАБАЧКА (*CUCURBITA PEPO* L.) В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК *IN VITRO*.

**Ермолаев А.С., Домблидес Е.А.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО), 143080, Московская область, Одинцовский район, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14***
***e-mail: alexeyermolaev@vniissok.ru, edomblides@mail.ru***

Самое продолжительное время в селекционной схеме создания гибридов *Cucurbita pepo* занимает получение гомозиготных линий. Использование технологии получения удвоенных гаплоидов (DH-технологии) в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* позволяет создать 100% гомозиготную линию в течение одного года, что многократно повышает эффективность селекционного процесса, причем не только за счет его ускорения, но и ввиду реализации значительного потенциала гаметоклональной изменчивости, заложенной у этого высоко полиморфного вида. Целью исследования являлось изучение факторов влияющих на индукцию эмбриогенеза и регенерацию удвоенных гаплоидов у кабачка в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*.

На начальном этапе исследования определяли оптимальную стадию развития женского гаметофита для индукции гиногенеза. У кабачка зародышевый мешок образуется по Polygonium–типу, полностью созревает и готов к оплодотворению через несколько часов после раскрытия цветка. Проведенные эксперименты с бутонами разной степени раскрытия цветка (от 2 суток до распускания и до полностью раскрывшегося цветка) показали, что оптимальным для кабачка будет предварительно заизолированный с вечера, сорванный утром полураскрывшийся бутон в день раскрытия цветка. Только из таких бутонов, содержащих семяпочки с почти зрелым зародышевым мешком, были получены эмбриоиды у 30 из 82 изученных генотипов.

Оптимизация этапа стерилизации завязей кабачка краткосрочным обжиганием после обработки 96% спиртом, позволила сократить временные затраты с 50 минут (при

использовании ступенчатой стерилизации с использованием 5% раствора гипохлорита натрия) до трех минут для получения эксплантов со 100% отсутствием контаминации и без потери эмбриогенного потенциала семяпочек.

У видов семейства Cucurbitaceae в культуру *in vitro* можно вводить как фрагменты завязей (поперечные или продольные срезы), так и уже выделенные семяпочки. Проведенные эксперименты по изучению этих двух вариантов введения в культуру, показали неэффективность использования фрагментов завязей для индукции гиногенного развития у кабачка. Эмбриоиды у всех генотипов были получены только при культивировании изолированных семяпочек. Из средней части одной завязи выделяли обычно 50 - 75 семяпочек и помещали на индукционную питательную среду (25 семяпочек/ чашку Петри диаметром 10 см).

Предобработка завязей кабачка в течение 1-2 суток при 4 $^{0}$С снижала образование эмбриоидов и оказалась не эффективной.

Для индукции гиногенеза была использована разработанная в лаборатории индукционная питательная среда IMC с добавлением 7г/л агара, 30г/л сахарозы, 200 мг/л ампициллина и тремя вариантами регуляторов роста (2 мг/л 2,4 Д; 0,2 мг/л ТДЗ; 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК) на которую выделенные семяпочки помещали сразу после изоляции из завязей и культивировали на свету при 16/8 часов фотопериоде (2500 Lx) в течение 4-6 недель до появления эмбриоидов. Была отмечена различная генотипспецифическая реакция на использующиеся регуляторы роста. Проведенный двухфакторый дисперсионный анализ показал, что и фактор генотипа и фактор использующихся регуляторов роста, а также взаимодействие этих факторов оказывают существенное влияние на выход эмбриоидов. При этом доля влияния фактора генотипа на количество образовавшихся эмбриоидов оказалась - 19%, фактора применяемых регуляторов роста - 8,4 %, а их взаимодействие - 62%. При этом доля неучтенных факторов влияющих на количество эмбриоидов составила - 8,6%. Для девяти генотипов образование эмбриоидов происходило только на среде с 2 мг/л 2,4 D; для восьми генотипов на среде с 0,2 мг/л TDZ; для четырех на среде с 0,8 2,4 D и 1,2 НУК; восемь генотипов отзывались как на питательной среде с 2 мг/л 2,4 Д, так и с 0,2 мг/л TDZ, а один генотип на среде с 0,2 мг/л TDZ и на среде с 0,8 мг/л 2,4 D и 1,2 мг/л НУК.

У генотипа 91х1274 было отмечено образование сразу нескольких эмбриоидов внутри одной индуцированной семяпочки на среде с 2,4 Д, что не встречалось ранее и представляет интерес для дальнейшего изучения.

После подбора оптимальных изученных параметров удалось достичь максимального выхода эмбриоидов до 55 штук на 100 культивируемых семяпочек.

Образовавшиеся эмбриоиды для регенерации и укоренения переносили на безгормональную среду MS с 2 % сахарозой и 3 г/л фитогеля. Для плохо развивающихся эмбриоидов необходимо было добавление в питательную среду регуляторов роста (НУК, ГК, БАП) для индуцирования дополнительных точек роста. Через 3-4 недели образовавшиеся вторичные побеги пересаживали на свежую безгормональную среду MS. На этапе регенерации необходимо проводить клональное микроразмножение, чтоб получить как можно больше растений одного генотипа для проведения последующих скрещиваний, поскольку у *C. pepo* цветки раздельнополые, сохраняющие возможность к опылению только 5 часов, в связи с чем достаточно тяжело подобрать мужские и женские цветки одного возраста для самоопыления. Пересадку на свежую питательную среду отделенных микропобегов необходимо проводить каждые 2-3 недели. Растения в фазе 5-6 листьев и развитой корневой системой можно пересаживать в горшки с торфом для адаптации к условиям *ex vitro*.

Полученные растения-регенеранты были проверены на уровень плоидности с помощью прямого подсчёта числа хромосом в меристемных клетках с использованием пропионо-лакмоидного метода окраски, метода проточной цитометрии клеточных ядер и подсчета хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Цитометрическое исследование показало, что среди проанализированных растений-регенерантов кабачка успешно

прошедших этап адаптации, удвоенных гаплоидов — 32,35%, триплоидов — 26,47%, тетраплоидов – 33,82%, октаплоидов – 4,41%, анеуплоидов — 2,94%. Гаплоидные растения среди высаженных в теплицу растений обнаружены не были, что объяснялось их потерей на этапе регенерации, как наименее жизнеспособных. Было определено, что у диплоидных растений в замыкающих клетках устьиц содержится 10-12 хлоропластов, у триплоидов 14-16, тераплоидов 18-20.

Растения-регенеранты $R_0$ с разным уровнем плоидности и $R_1$ (от самоопыления растений 2n и 4n) также были оценены по морфологическим признакам спорофита и мужского гаметофита. Были отмечены различия в диаметре пыльцевых зерен при исследовании с использованием сканирующего электронного микроскопа у диплоидных растений (2n) он составил 101,6±0,92мкм; триплоидных (3n) - 110,6±2,03 мкм; тетраплоидных (4n) - 135,1±1,36мкм. Образование растений с нарушенной морфологией мужских и женских цветков, а также образование гинандроморфных цветков наиболее часто отмечалось у триплоидных и тетраплоидных растений.

**Финансирование:** «Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-316-90053»

**Funding**: The reported study was funded by RFBR, project number 20-316-90053

## ВЛИЯНИЕ ЦИТОХАЛАЗИНА Б НА РАЗВИТИЕ КЛОНИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ СВИНЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ПРОЦЕДУРЫ ЭНУКЛЕАЦИИ И ПЕРЕНОСА ЯДЕР СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

**Лопухов А.В., Сингина Г.Н.**

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

При соматическом клонировании механическое удаление ядра может оказывать негативное влияние на ультраструктуру энуклеируемых ооцитов, вызывая утрату и разрушение ряда функционально значимых клеточных компартментов и, как следствие, снижение метаболической активности и жизнеспособности получаемых цитопластов. По мнению ряда авторов, способность цитохалазина Б к разрушению актин-содержащих филаментов может повышать пластичность цитоскелета и устойчивость ооцита к механическим повреждениям в ходе удаления хромосомного материала и подсадки донорской соматической клетки [1,2]. Однако, вопрос о роли цитохалазина Б в энуклеации ооцитов и переносе донорского ядра все еще остается недостаточно изученным. В литературе есть данные о негативном влиянии цитохалазина Б [3] а также о получении клонированных эмбрионов без его участия [4,5]. Причина этого, возможно, в том, что в этих исследованиях не учитывался фактор длительности микроманипуляций с ооцитами в ходе их реконструирования. В рамках настоящей работы оценивали эффекты предварительной инкубации созревших ооцитов с цитохалазином Б и без указанного химического агента перед реконструированием на получение клонированных цитогибридов свиней и их развитие до стадии бластоцисты в зависимости от продолжительности процедуры энуклеации и переноса ядра соматической клетки. Ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК), выделенные из яичников свиней post mortem, созревали группами по 25-30 штук в модифицированной среде с 0,5 мкг/мл ФСГ и 0,5 мкг/мл ЛГ в течение 22 часов и в последующие 22-24 часа - в той же среде без гормонов. Созревшие ОКК обрабатывали 0,1 % раствором гиалуронидазы, механически удаляли кумулюсные клетки и отбирали ооциты с первым полярным тельцем (ППТ). Фетальные фибробласты культивировали до

сформированного монослоя, контактно ингибировали в течение 2 суток и готовили к процедуре переноса в энуклеированный ооцит в виде суспензии. Ооциты с ППТ за 15 минут до энуклеации инкубировали в среде ТС 199 с 10% ФБС в присутствии (7,5 мкг/мл) и отсутствии (контроль) цитохалазина Б. Процедуру энуклеации ооцитов и переноса соматических клеток проводили методом прямого прокола зоны пеллюцида на микроскопе Nicon Diaphot с использованием трехмерного гидравлического микроманипулятора с точной настройкой фирмы Narishige в трех вариантах продолжительности: до 30 минут (Вариант I), более или равно 30, но менее 60 (Вариант II) и от 60 до 90 минут (Вариант III). Энуклеированные ооциты объединяли с перенесенными в их перивителлиновое пространство клетками, а также активировали дальнейшему развитию одномоментно двумя последовательных импульсами постоянного тока при напряжении 25 В продолжительностью 30 мкс. Отбирали полученные цитогибриды и переносили в среду NCSU-23 для культивирования. На 2-й день инкубации проводили морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 6-й день определяли число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты. Установлено, что продолжительность процедуры энуклеации и переноса ядра соматической клетки свыше 60 минут приводила к достоверному снижению доли полученных цитогибридов с 61,6±1,3% (вариант I) и 55,0±3,2 (вариант II) до 47,6±5,4% ($p<0,05$) и эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты с 18,1±0,7% (вариант I, $p<0,001$) и 17,0±1,0 (вариант II, $p<0,05$) до 9,6±1,1%. Выявлен статистически значимый положительный эффект предварительной инкубации созревших ооцитов в цитохалазине Б на получение клонированных цитогибридов. Этот эффект зависел от продолжительности процедуры энуклеации и переноса донорского ядра и сохранялся до 60 минут. Предварительная инкубация ооцитов с ППТ в цитохалазине Б также повысила выход клонированных эмбрионов на стадии бластоцисты по сравнению с контролем при продолжительности процедуры энуклеации и переноса ядра соматической клетки до 30 минут и от 30 до 60 минут с 11,2±0,4 до 16,6±0,8% ($p<0,01$) и с 9,3±0,5 до 13,3±1,2% ($p<0,05$) соответственно. Таким образом, показано, что цитохалазин Б положительно влияет на эффективность получения клонированных эмбрионов свиней. Данный эффект зависит от продолжительности процедуры энуклеации и переноса ядра соматической клетки. Оптимальным временем этой процедуры для получения цитогибридов и клонированных бластоцист из созревших ооцитов является период до 60 минут.

**Список литературы:**

1. Tesarik J., Martinez F., Rienzi L., Ubaldi F., Iacobelly M., Mendoza C., Greco E. Microfilament disruption is required for enucleation and nuclear transfer in germinal vesicle but not metaphase II human oocytes. Fertil. and Steril. 2003. 79(1):677-681. DOI: 10.1016/s0015-0282(02)04816-1

2. Hou X., Liu J., Zhang Z., Zhai Y., Wang Y., Wang Z., et al. Effects of cytochalasin B on DNA methylation and histone modification in parthenogenetically activated porcine embryos. Reproduction. 2016. 152: 519–27. DOI: 10.1530/REP-16-0280

3. Iuso D., Czernik M., Zacchini F., Ptak G., Loi P. A simplified approach for oocyte enucleation in mammalian cloning. Cell Reprogram. 2013. 15(6):490-4. DOI:10.1089/cell.2013.0051

4. Liu Y., Lucas-Hahn A., Petersen B., Li R., Hermann D., Hassel P., Ziegler M., Larsen K., Niemann H., Callesen H. Developmental Competence and Epigenetic Profile of Porcine Embryos Produced by Two Different Cloning Methods. Cell. Reprogramm. 2017. 19(3): 171-179. DOI: 10.1089/cell.2016.0055

5. Wu C.F., Zhang D.F., Zhang S., Sun L., Liu Y., Dai J.J. Optimizing treatment of DNA methyltransferase inhibitor RG108 on porcine fibroblasts for somatic cell nuclear transfer. Reprod. Domest. Anim. 2019. 54(12):1604-1611. DOI: 10.1111/rda.13569

## МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КОК-САГЫЗА (*TARAXACUM KOK-*

## *SAGYZ RODIN)* – ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА

**Мартиросян Л.Ю.[1,2], Эсембаева М. А.[3], Мягкова Е. Р.[4], Филатова С. И.[4], Цыганкова Е. А.[3], Джумакулыева М.[3]**

***1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42. E-mail: levon-agro@mail.ru***
***2 – ФГБУН Институт биохимической физики РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.***
***3- Аграрно-технологический институт РУДН, 117198, г. Москва ул. Миклухо-Маклая, 8, корп. 2.***
***4 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет МСХА им. К.А.Тимирязева, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49***

Натуральный каучук является высоко востребованным сырьем, широко применяется при производстве медицинских и бытовых изделий, шин для авиации и военной техники. Основную часть натурального каучука получают из *Hevea brasiliensis*. Родина гевеи — Бразилия — сейчас практически не производит каучук, все плантации там поражены патогенным грибом, *Microcyclus Ulei,* бороться с которым пока еще очень сложно. Это заболевание, против которого не существует эффективных методов борьбы, поражает деревья до того, как они достигают своей физиологической зрелости, и уничтожает каучуковые плантации. Наиболее перспективным альтернативным гевее каучуконосом по праву считается кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz Rodin*) [1,2]. В его корнях синтезируется каучук, не уступающий по качеству полученному из гевеи, и его содержание у высокопродуктивных коллекционных образцов достигает до 17% к сухой массе корней. Цель работы - разработка технологии оздоровления и микроклонального размножения растений кок-сагыза. Первоочередная задача - подбор компонентов питательной среды, способствующей оздоровлению и эффективной регенерации микрорастений из каллусных тканей.

Разработка эффективных методов оздоровления от фитопатогенов и клонального микроразмножения растений in vitro является основным и необходимым условием в работах по созданию генетической коллекции и технологии для массового производства оздоровленного посадочного материала [3]. Однако при создании генетической коллекции оздоровленных растений кок-сагыза в культуре in vitro возникает ряд проблем, связанных с наличием латентной внутриклеточной бактериальной инфекции, которую изначально трудно выявить. Признаки патогена проявляются при длительном субкультивировании коллекционных образцов, при стрессовых ситуациях (высокая интенсивность света и температуры). Поэтому при введении растений в культуру in vitro были применены способы и приемы, позволяющие получать свободные от патогенов экспланты.

Семена, полученные от коллекционных образцов (коллекция ВИР), были предварительно подвергнуты термотерапии (48 часов, при 50ºС). Далее семена обрабатывали стерилизующим препаратом, надуксусной кислотой, 0,15%, 4 минут, после чего 45 сек. обрабатывали ультразвуком, в растворе, содержащем меланиноподобные вещества из культуральной жидкости дрожжей *Nadsoniella nigra.*

Каллусные ткани получали из корешков пророщенных семян, на среде ½ Мурашиге-Скуга (МС), с добавлением витаминов по Бутенко. Далее, для культивирования каллусных тканей и получения регенерантов использовали модифицированную среду МС, изменяя в её составе $CaCl_2$ на $Ca(NO_3)_2$. Кроме того, во всех вариантах добавляли стимулятор роста Циркон, в концентрации 25 мкл/л среды. Исследовали оздоровительную эффективность наночастиц серебра (Ag), меди (Cu), углерода (C), в концентрациях 25мг/л. Также

использовали среду с добавлением нитрата серебра ($Ag\ NO_3$) в концентрации 50 мг/л. Каллусные ткани одинаковых размеров и форм посадили в пластиковые контейнеры, по 5 шт. в каждом. Количество контейнеров в каждом варианте - 10 шт.

В результате регенеранты были получены во всех вариантах опыта. После двух пассажей посчитали общее количество регенерантов в каждом варианте. Наиболее эффективным оказалось применение наночастиц серебра (792 шт. регенерантов) и меди (660 шт. регенерантов). Также хорошие результаты были получены в варианте с добавлением наночастиц углерода (516 шт. регенерантов) и $Ag\ NO_3$ (444 шт. регенерантов).В контрольном варианте количество регенерантов было сопоставимо с вариантами с добавкой $Ag\ NO_3$.

Одной из особенностей культуры каллусных тканей кок-сагыза является выраженная физиологическая асинхронность развития клеточных конгломератов. Во время длительного субкультивирования калусных тканей разные группы клеток находятся в разных фазах роста: одни делятся, из других образуются морфогенные зоны и растут регенеранты, а третьи стареют, деление клеток приостанавливается. Однако после удаления регенерантов из культивационной среды наблюдается пролиферация этих групп клеток и возникают новые очаги морфогенного каллуса. За счет этого коэффициент размножения культуры кок-сагыза увеличивается на 45-60 процентов.

Дополнительные исследования показали, что с применением вышеуказанных добавок каллусные клетки и регенеранты не выделяли фенольные соединения в культуральную среду. При дальнейшей пересадке и длительном субкультивировании у растений признаки инфицирования не проявлялись.

**Список литературы**:

1. Кутузова С. Н., Брач Н. Б., Конькова Н. Г., Гаврилова В. А. Кок-сагыз-Taraxacum kok-saghyz (Asteraceae, Compositae)-источник ценного растительного сырья для резиновой, пищевой и фармацевтической промышленности //Биосфера. – 2015. – Т. 7. – №. 4.

1. Uteulin, K., Mukhambetzhanov, S., Yesbolayeva, B., Iskakova, A., Bari, G., Zheksenbai, A., Piven, V., Zhabykbaev, Ch., Zhambakin, K., Rakhimbaev, I. 2015. Introduction to in vitro culture of isolated Taraxacum kok-saghyz roots // Вестник Казахского Национального Университета (Серия биологическая).2. С.37-42

3. Martinez M. E., Jorquera L., Poirrier P., Díaz K., Chamy R. Effect of the Carbon Source and Plant Growth Regulators (PGRs) in the Induction and Maintenance of an In Vitro Callus Culture of Taraxacum officinale (L) Weber Ex FH Wigg //Agronomy. – 2021. – Т. 11. – №. 6. – С. 1181.

# ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭМБРИОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР КУЛЬТУР КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ

**Вишнякова А.В., Синицина А.А., Монахос С.Г.**

***ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева», 127434, г. Москва, Тимирязевская ул., 49, E-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru***

Возможность быстро создать полностью гомозиготное растение привлекает исследователей различных направлений – селекционеров, генетиков и биотехнологов. Гомозиготные растения, так называемые удвоенные гаплоиды, получают путем отдаленной гибридизации, с последующей элиминацией хромосом, партеногенезом, а также биотехнологическими методами: в культуре изолированных микроспор, в культуре пыльников и культуре изолированных семязачатков. Культура изолированных микроспор обладает рядом достоинств по сравнению с другими биотехнологическими методами – имеет достаточно высокий выход удвоенных гаплоидов, исключает возможность развития эмбриоидов и каллуса из соматических тканей растения и дает возможность изучать влияние различных факторов на отдельные клетки. Наиболее активно культура изолированных микроспор применяется у пшеницы, ячменя и рапса. Особую роль удвоенные гаплоиды играют в селекции культур с двухлетним циклом развития, в частности капусты белокочанной, где позволяют сократить срок создания родительских линий для F1-гибридов с 10-15 лет до 2-3.

Изучению влияния различных факторов на эмбриогенез в культуре изолированных микроспор (КИМ) у культур рода *Brassica* посвящены работы ряда российских и зарубежных ученых (Winarto, 2011; Yuan, 2012; Cristea, 2013, Шмыкова, 2015, Zeng et al., 2017, Corral-Martínez, 2020 и др.). Изучают такие факторы как температура и время экспозиции при инициации перехода микроспор к эмбриогенезу, различные тепловые предобработки, состав питательной среды для культивирования и изоляции микроспор, влияние типа и концентрации углеводов в питательной среде и др.

Нами изучено влияние pH питательной среды на эмбриогенез в культуре изолированных микроспор капусты белокочанной: культивирование микроспор во время теплового стресса на питательной среде с повышенным уровнем pH (8,0), а также последующее культивирование микроспор на средах с различным значением pH (5,8, 6,1, 6,4). Предложен способ изоляции и инициации эмбриогенеза микроспор капусты белокочанной в 13 % растворе сахарозы.

Влияние повышенного pH питательной среды на эмбриогенез изучали у 12 генотипов капусты белокочанной. Изоляцию микроспор проводили по методике Монахоса (2014), для выделения и очистки микроспор использовали питательную среду B5, содержащую 13 % сахарозы и 5 % маннитола, pH 5,8, затем питательную среду заменяли на NLN-13, содержащую 13% сахарозы, pH 8,0 и в ней инкубировали в темноте при 32,5 °C в течение 48 ч. После теплового и осмотического стресса питательную среду заменяли на NLN-13, содержащую 13% сахарозы с pH 5,8, 6,1 или 6,4 и культивировали микроспоры до появления эмбриоидов. Подсчет числа сформировавшихся эмбриоидов проводили на 25-35 день культивирования при достижении ими семядольной стадии развития. Контрольным вариантом в эксперименте была инкубация микроспор в темноте при 32,5 °C в течение 48 ч. в питательной среде NLN-13, содержащей 13% сахарозы, pH 5,8, с последующей пересадкой микроспор на ту же питательную среду. Эксперименты были заложены в 3-5 кратной повторности.

Изучение возможности изоляции и инкубирования микроспор во время теплового стресса в растворе сахарозы проводили на 6 генотипах капусты белокочанной. Изоляцию

микроспор проводили по методике Монахоса (2014), но для выделения и очистки микроспор использовали 13% раствор сахарозы, далее инкубировали микроспоры в темноте при 32,5 °С в течение 48 ч. в том же растворе сахарозы, после чего заменяли раствор сахарозы на питательную среду NLN-13, содержащую 13% сахарозы, pH 5,8. Контрольным вариантом эксперимента было выделение и очистка микроспор в питательной среде B5, содержащей 13 % сахарозы и 5 % маннитола, инкубация в темноте при 32,5 °С в течение 48 ч. в питательной среде NLN-13, содержащей 13% сахарозы, pH 5,8, с последующим культивированием микроспор на этой же среде до появления эмбриоидов. Эксперименты были заложены в 3 кратной повторности.

У 7 из 9 изученных генотипов капусты белокочанной при инициации эмбриогенеза на питательной среде NLN-13, содержащей 13% сахарозы, pH 8,0, сформировалось значимо больше эмбриоидов, чем в контрольном варианте. При пересадке микроспор после инициации эмбриогенеза на среды с pH 5,8, 6,1, 6,4 значимые различия в частоте формирования эмбриоидов наблюдали у двух из 5 изученных генотипов. Таким образом дополнительный осмотический стресс в виде повышенного pH питательной среды положительно влияет на частоту эмбриогенеза у большинства изученных генотипов капусты белокочанной, при этом последующее повышение pH питательной среды для культивирования практически не оказывает влияние на частоту эмбриогенеза.

При изоляции и инкубации микроспор капусты белокочанной при 32,5 °С в течение 48 ч. в 13% растворе сахарозы частота эмбриогенеза у всех генотипов была на уровне контрольного варианта. Таким образом показано, что для сохранения жизнеспособности микроспор при изоляции и инициации перехода их к эмбриогенезу во время теплового стресса не нужны витамины, макро и микроэлементы. Внедрение выделения микроспор в 13 % растворе сахарозы позволит сократить затраты на получение эмбриоидов на 50-60%.

**Список литературы:**

1. Corral-Martínez, P. Isolated Microspore Culture in *Brassica napus*. / Corral-Martínez P., Camacho-Fernández C., Seguí-Simarro J.M. // In: Bayer M. (eds) Plant Embryogenesis. Methods in Molecular Biology, Humana, New York, NY. – 2020 – vol. 2122. – pp. 269-282 – https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0342-0_19

2. Cristea, O. Effect of carbohydrate type over the microspore embryogenesis at Brassica Oleracea L. / O. Cristea, B. Creola, P. Maria, B. Marian // Romanian Biotechnological Letters. – 2013a. – Vol. 18. – №5 – P. 8677-8684.

3. Cristea, T.O. The influence of pH on microspore embryogenesis of white cabbage (Brassica oleracea L.) / T.O. Cristea // Not Sci. Biol. – 2013б. – Vol. 5 – № 4. – P. 485-489.

4. Winarto, B. Microspore culture protocol for Indonesian Brassica oleracea // B. Winarto, J.A. Teixeira da Silva // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2011. – Vol. 107. – P. 305-315. – D0I:10.1007/s11240-011-9981-z

5. Yuan, S.X. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage / S.X. Yuan [et al.] //Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2012. – Vol. 110. – P. 69-76. – D0I:10.1007/s11240-012-0131-z

6. Zeng, L. Reduced ascorbate and reduced glutathione improve embryogenesis in broccoli microspore culture / L. Zeng, Y. Song, J. Cui // Yan South African Journal of Botany. – 2017. – Vol. 109. – P. 275-280.

7. Монахос, С.Г. Создание чистых линий – удвоенных гаплоидов капусты в культуре изолированных микроспор и селекция F1-гибридов на основе современных методов биотехнологии: метод. Рекомендации / С.Г. Монахос. – Москва : Изд-во РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2014. – 44 с

8. Шмыкова, Н.А. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода Brassica L. / Н.А. Шмыкова, Д.В. Шумилина, Т.П. Супрунова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – № 19(1). – С. 111-120.

# ПОЛУЧЕНИЕ DH-РАСТЕНИЙ РЕДИСА ЕВРОПЕЙСКОГО В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР *IN VITRO*.

**Козарь Е.В., Домблидес Е.А., Солдатенко А.В.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства», 143080, Московская область, Одинцовский район, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, д.14***
***e-mail: koz.leno4ek@gmail.com, edomblides@mail.ru***

Редис (*Raphanus sativus* L.) - экономически значимая корнеплодная культура семейства *Brassicaceae*. С каждым годом потребности рынка повышаются, меняются условия выращивания растений и необходимо ускоренное производство сортов и гибридов для сохранения конкурентоспособности отечественных семян. Традиционная селекция редиса занимает длительное время, т.к. он является перекрестноопыляемой культурой, поэтому ускорение создания чистых родительских линий для этой культуры имеет большое значение. В настоящее время передовой технологией получения выровненного материала является культура микроспор *in vitro* (IMC), основанная на тотипотентности растительных клеток, где из одной микроспоры с одинарным набором хромосом можно получить целое растение, которое будет полностью гомозиготно по всем генам (Ferrie, Caswell, 2011). Эта технология не универсальна и дополнение ее модификациями необходимо для каждого рода или даже вида растений. Род *Raphanus sativus L.* является сложной культурой с точки зрения получения DH-растений по технологии IMC, и ранее в литературе было описано получение DH-растений только для подвида subsp. acanthiformis (Blanch) Stankev (Takahata et al., 1996; Chun et al., 2011). Для подвида sativus L. (редис европейский) нам удалось завершить полный цикл получения удвоенных гаплоидов редиса европейского впервые.

При разработки IMC технологии для редиса европейского были применены, как стандартные техники подбора оптимальных условий (цитологический анализ микроспор в бутонах, длительность тепловой стрессовой обработки и т.п.), так и оригинальные техники модификации этапов укоренения и изоляции микроспор, созданных на основе изученных особенностей редиса европейского. В исследовании было протестировано более сорока сортообразцов редиса европейского из коллекции лаборатории столовых корнеплодов “ФГБНУ ФНЦО”, четыре из которых показали свою отзывчивость к эмбриогенезу и участвовали в дальнейших опытах, где были подобраны оптимальные: тепловая стрессовая обработка - одни-двое суток при $32^0$C, в зависимости от генотипа; культивирование с использование платформы-шейкер (40 качаний в минуту); составы питательных сред для этапов: 1) индукции эмбриогенеза (NLN-13 (Lichter, 1982) и Модифицированная среда MSm-13 (Murashige and Skoog, 1962)), 2) начальной регенерации (модифицированная твердая среда MSm с 2% сахарозой (Murashige and Skoog, 1962) с добавлением 0.1 mg/L гиббереллиновой кислоты и 1 mg/L 6-бензиламинопурина) и 3) этап укоренения ( безгормональная модифицированная твердая среда MSm с 2% сахарозой (Murashige and Skoog, 1962)), а также существенно модифицированы этапы изоляции микроспор и техника укоренения DH-растений редиса европейского (Kozar et al., 2020(а, б)).

Для культур семейства Brassicaceae изоляция микроспор производится путем их разбивки в бюксах с магнитами на магнитной мешалке (Домблидес и др., 2016), или путем сжатия бутонов поворотным движением с помощью поршня (Custers, 2003). При выделении микроспор редиса такими способами, в препарат попадает много остатков разрушенных соматических клеток за счет механического воздействия. Поскольку такие элементы меньше по размеру, чем микроспоры, при фильтрации полученной суспензии они не задерживаются нейлоновыми фильтрами (диаметр пор 40 μm) и попадают в препарат, оказывая токсическое воздействие. Ввиду этого, общепринятые техники

выделения микроспор для редиса европейского не подходили и требовалось усовершенствование этого этапа технологии. В результате многочисленных экспериментов, нам удалось разработать способ выделения микроспор для редиса, который минимизирует попадание продуктов разрушения соматических клеток в препарат. Этот способ заключается в индивидуальном препарировании бутонов поперечным разрезом скальпеля, после чего половинки бутонов погружаются в стерильные пробирки с промывочной средой NLN-13 и взбалтываются на центрифуге-вортекс «Микроспин» FV-2400. При таком выделении микроспор элементы органических продуктов разрушенных соматических клеток в препаратах практически отсутствуют, что способствует улучшению условий для прохождения эмбриогенеза.

Для этапа укоренения показана важность техники пересадки. Растительные экспланты редиса европейского необходимо высаживать строго на поверхность твердой безгормональной питательной среды MSm без заглубления. Использование для индукции корнеобразования жидкой среды MSm с добавлением 0,1 мг/л кинетина в пробирках с мостиками из фильтровальной бумаги также показала высокую эффективность. Для растений, склонных к образованию корнеплодоподобных структур с вторичными опухолями, необходима многократная диссекция аномальных образований с последовательными пересадками. Модификация этапа укоренения микропобегов повысила процент успешной адаптации DH-растений в условиях in vivo с 0-14% до 95-98% (Kozar et al., 2020 (б)).

На основе полученных данных был сформирован протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор редиса европейского с эффективностью до 8 эмбриоидов на чашку Петри ( Kozar et al., 2021).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90034.

**Список литературы:**

1. Chun, C., H. Park, and H. Na (2011). Microspore-derived embryo formation in radish (Raphanus sativus L.) according to nutritional and environmental conditions.// Hort. Environ. Biotechnol. 52(5), P. 530–535.

2. Ferrie A.M.R., Caswell K.L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2011;104:301-309. DOI 10.1007/ s11240-010-9800-y.

3. Kozar, E. V.; Domblides, E.A.; Soldatenko, A. V. Factors Affecting DH Plants in Vitro Production from Microspores of Eu-ropean Radish. Vavilovskii Zhurnal Genet. Selektsii 2020(a), 24, 31–39, doi:10.18699/VJ20.592.

4. Kozar, E. V.; Kozar, E.G.; Soldatenko, A. V.; Domblides, E.A. Rooting Technique of Double Haploids Obtained in Culture of Microspore in Vitro for European Radish. Veg.Crop. Russ. 2020(б), 7132, 3–15, doi:10.18619/2072-9146-2020-5-3-15

5. Kozar, E.; Domblides, E. Protocol of European Radish (Raphanus sativus L.) Microspore Culture for Doubled Haploid Plant Production BT - Doubled Haploid Technology: Volume 2: Hot Topics, Apiaceae, Brassicaceae, Solanaceae. In; Segui-Simarro, J.M., Ed.; Springer US: New York, NY, 2021; pp. 217–232 ISBN 978-1-0716-1335-1.

6. Lichter, R. (1989) Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species.// Plant Breed, 103, P. 119–123

7. Murashige T., Scoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and big assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.. V. 15. P. 473-497

8. Takahata Y., Keller W.A. (1991) High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of Brassica oleracea L.// Plant Sci ., 74, P. 235-242

9. Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Шумилина Н.А., Заячковская Т.В., Минейкина А.И., Козарь Е.В., Ахраменко В.А., Шевченко Л.Л., Кан Л.Ю., Бондарева Л.Л., Домблидес А.С. Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные (методические рекомендации). М.: ВНИИССОК, 2016.

# ПЕРВЫЕ ШАГИ В ПОСТРОЕНИИ КАРИОТИПА *SHEPHERDIA ARGENTEA (PURSH) NUTT.*

**Боне К.Д.[1], Разумова О.В.[1], Карлов Г. И.[1]**

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

Кариотип эукариотических организмов представляет собой число, размер и форму всех хромосом. Это касается всех видов животных и растений. Кариотип используется как общее описание генетического состава отдельных видов эукариот. В большинстве случаев близкородственные виды имеют схожие кариотипы. В некоторых из них возникает сложность идентификации хромосом из-за их особенностей их морфологии таких как размеры хромосом и их форма, в результате хромосомы практические не различимы друг от друга. Одним из видов с трудноразличимыми хромосомами является шефердия серебристая (*Shepherdia argentea*).

Идентификация каждой хромосомы в кариотипе может быть использована в селекции. Шефердия интересная и перспективная плодово-ягодная культура, ягоды которой отличаются высоким содержанием полезных веществ, а само дерево может оказывать помощь в ремедиации земель благодаря содержанию азотфиксирующих бактерии на ее корнях.

Самым эффективным и современным способом для построения кариотипа является создание и локализация молекулярно-цитогенетических маркеров с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

В нашей работе после проведения полногенномного секвенирования двух растений и анализа полученных сиквенсов на содержание тандемных повторов и ретротранспозонов, для наиболее информативных сателлитов были подобраны праймеры, которые в дальнейшем использовались для изготовления зондов флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), меченых биотином или дигоксигенином.

С 11 растений, выращенных в нашей лаборатории, собирали свежие растущие корни и готовили препараты метафазных хромосом методом Steam Drop с небольшими модификациями, предфиксационную обработку проводили 2mM 8-гидроксихинолином.

FISH проводили с 8 сателлитами попарно на каждом препарате с разноцветными зондами. 6 из 8 кластеров локализировали в субтеломерных областях, два в прицентромерной области. Хромосомы мелкие, их диплоидный набор составляет 2n=26. Эта работа в дальнейшем позволит нам различить хромосомы шефердии друг от друга и построить кариотип.

Работа продолжается.

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

# ПОЛИПЛОИДНЫЕ ФОРМЫ ЛУКА (*Allium cepa* L. × *Allium fistulosum* L.) И ЧЕСНОКА (*Allium sativum* L.)

**Романова О.В., Середин Т.М., Романов В.С., Мастяев И.С.**

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

Полиплоидия играет важную роль в формировании культурных растений. В роде *Allium* большинство видов обладают полиплоидным числом хромосом, а некоторые виды образуют полиплоидные ряды. Лук репчатый (*Allium cepa* L.) относится к диплоидным формам. Тогда как *A nutans* L., *A. odorum* L., *A. schoenoprasum* L. являются полиплоидными видами, обладающим рядом ценных признаков, такие как хорошая зимостойкость и устойчивость к пероноспорозу. Однако из-за разного количества хромосом эти виды очень трудно скрещиваются с луком репчатым.

Для улучшения скрещиваемости используют метод полиплоидизации, который позволяет кратно увеличить число хромосом, то есть перевести исходные формы к одинаковому уровню плоидности (Полумордвинова, Марьяхина, 1985). Кроме того, метод полиплоидизации используют для повышения фертильности межвидовых гибридов. Так, полученные гибриды лука с одинаковым числом хромосом (2n=16) *Allium cepa* × *Allium fistulosum* образуют малое число семян. Однако, подобные гибриды, которые перешли на тетраплоидный уровень, обладают высокой фертильностью. Таким образом, были получены сорта Омский и Сибиряк (Федоров, 1959).

Для такой вегетативно размножаемой культуры, как чеснок озимый, большой проблемой является получение генетического разнообразия. Применение метода полиплоидизиции с помощью антимитотических агентов может использоваться для получения разнообразного исходного материала для селекции (Shemesh-Mayer, Kamenetsky-Goldstein, 2021). Полиплоидизация с помощью мутагенного агента колхицина вызывает высокий уровень полиплоидии (Xiao-ling, 2009). Трифуралин, один из видов гербицидов, способствует удвоению хромосом, но ингибирует рост эксплантов, индукцию каллуса и дифференциацию, и в конечном итоге вызывает гибель каллуса (Cheng et al. 2012).

Для исследования использовали семена гибрида лука репчатого и лука батуна № 20-18 (*Allium cepa* L. × *Allium fistulosum* L.) и воздушные луковицы чеснока озимого сорта Сармат (*Allium sativum* L.) из коллекции лаборатории генетики и цитологии и лаборатории луковых культур ФГБНУ ФНЦО.

Семена лука и воздушные луковицы чеснока сначала промывали в мыльном растворе коммерческого препарата «AOS», затем поверхностно стерилизовали в 70%-ном водном растворе этанола (30 с), 50%-ном водном растворе гипохлорида натрия («Белизна») с добавлением 3 капель Tween-20 (15 минут), после трехкратно промывали в стерильной дистиллированной воде, при последнем промывании в стерильную дистиллированную воду добавляли антибиотик ампициллин (Биосинтез, Пенза, Россия) в концентрации 1 мг/мл. Семена лука и выделенные из воздушных луковиц побеги чеснока помещали в 0,1%-ный водный раствор с разным временем экспозиции (24, 48 и 72 часа) по 10 шт. на каждый вариант опыта. Обработанные колхицином экспланты переносили на твёрдую питательную среду БДС (Gamborg, Eveleigh, 1968) - модифицированную среду B5 с повышенным уровнем фосфата и азота и пониженным уровнем 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) (Duston, Short, 1977), рекомендованную для луковых культур (Монахос и др., 2014). В качестве регуляторов роста применяли 2,4-D и кинетин в концентрации 0,15 мг/л. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при 25°C и

фотопериоде 14 часов, освещенности 2,5 тыс. люкс. Каждые 14 суток экспланты переносили на свежую питательную среду и культивировали до образования корней. Через 1,5 месяца полученные растения на стадии рассады переносили в горшки с торфом и накрывали пластиковыми стаканами с отверстиями для газообмена. Уровень плоидности полученных растений лука и чеснока определяли методом проточной цитометрии с использованием йодистого пропидия и проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH, Münster, Германия) с лазерным источником 532 нм (Skaptsov et al., 2016). В качестве внешних стандартов были использованы диплоидные растения-доноры лука сорта Стурон и чеснока Сармат (2n = 2x = 16).

В результате адаптации растений в условия *in vivo* было получено 14 образцов растений лука репчатого и 4 образца чеснока озимого. Растения лука репчатого сформировали округлые жёлтые луковицы массой от 2,2 до 29,4 г. Луковицы были заложены на хранение для прохождения яровизации при температуре 4°С. Один образец чеснока озимого сформировал двухзубковую луковицу, а у остальных растений продолжается вегетационный период. Методом проточной цитометрии было установлено, что 50% растений лука репчатого являются тетраплоидами, а остальные – диплоиды. Тогда как у чеснока озимого было обнаружено только одно тетраплоидное растение. Колхицинирование эксплантов было эффективно при экспозиции 48 часов для семян №20-18, при экспозиции 72 часа для чеснока озимого Сармат.

Таким образом, при обработке семян гибрида лука репчатого и лука батуна (*Allium cepa* L. × *Allium fistulosum* L.) и проростков чеснока озимого Сармат (*Allium sativum* L.) 0,1% раствором колхицина были получены растения-регенеранты с удвоенным количеством хромосом (4n = 32).

**Список литературы:**

1. Полумордвинова И.В., Марьяхина И.А. Методические рекомендации по полиплоидизации лука *in vivo* и *in vitro* с целью получения исходного материала для селекции и преодоления стерильности межвидовых гибридов. 1985: 24.

2. Федоров Г.В. Межвидовые гибриды лука. Тр. Омского СХИ. 1959: 47: 121-128.

3. Shemesh-Mayer E., Kamenetsky-Goldstein R. Traditional and Novel Approaches in Garlic (*Allium sativum* L.) Breeding. In: Al-Khayri J.M., Jain S.M., Johnson D.V. (eds) Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable Crops. Springer, Cham. 2021: 3-49. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66965-2_1

4. Xiao-ling X.I.E. Analysis on the infuences of colchicine on the growth of Allium sativum and its polyploid induction effect. J. Anhui. Agric. Sci. 2009. 9: 135. (in Korean, with English abstract).

5. Cheng Z.H., Zhou X.J., Khan M.A. et al. *In vitro* induction of tetraploid garlic with trifuralin. Genet. Mol. Res. 2012. 11(3): 2620–2628. https://doi.org/10.4238/2012.July.10.13

6. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. Can. J. Biochem. 1968. 46 (5): 417-421.

7. Dunstan D.I., Short K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. Physiol. Plant. 1977. 41: 70-72.

8. Монахос С.Г., Богданова В.Д., Ветчинкина Е.М. Создание чистых линий – удвоенных гаплоидов лука репчатого (*Allium cepa* L.) и селекция $F_1$-гибридов на основе современных методов биотехнологии: метод. рекомендации. М.: Изд-во РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. 2014: 45.

9. Skaptsov M.V.; Smirnov S.V.; Kutsev M.G.; Shmakov A.I. Problems of a standardization in plant flow cytometry. Turczaninowia. 2016. 19 (3): 120–122. DOI:10.14258/turczaninowia.19.3.9

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФРАКЦИЙ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДНК РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА CANNABACEAE И ЕЕ РОЛЬ В ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ.

**Разумова О.В[1], Бочаркина Ю.В.[2], Боне К.Д.[1], Романов Д.В.[1], Почтовый А.А.[1], Александров О.С.[1]**

***1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научноисследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва 127550 E-mail: razumovao@gmail.com***
***2 – Сколковский институт науки и технологий, Москва, Московская обл., 143026***

Семейство Cannabaceae *sensu stricto* включает два рода - род Humulus и род Cannabis с единственным крайне полиморфным видом *Cannabis sativa*. Характерной особенностью растений данных родов является наличие в кариотипе у всех видов гетероморфных половых хромосом, что является чрезвычайно редким явлением в царстве растений, при этом данные хромосомы различны у разных видов: XX/ XY с большой Y-хромосомой у конопли посевной, XX/XY с маленькой Y-хромосомой у хмеля обыкновенного и мультихромосомная система с большими половыми хромосомами XX/XY1Y2 у хмеля японского. Такое разнообразие типов половых хромосом в пределах одного семейства открывает широкие возможности для изучения эволюции пола в целом, поскольку ранее показано, что размер и количество половых хромосом у растений связано с эволюционной древностью или молодостью вида (Ming et al., 2011).

Ранее неоднократно было показано, что в дифференциации половых хромосом важную роль играет фракция повторяющейся ДНК (E Kejnovsky et al., 2009; B Vyskot and R Hobza, 2015; SF Li et al., 2016; W Jesionek et al., 2021). Однако скорость накопления или утраты блоков повторяющейся ДНК в нерекомбинирующей части половой хромосомы (как правило Y) у разных видов различна, и механизм, определяющий ее, в настоящее время не известен.

Ранее в своей работе мы провели полногеномное NGS секвенирование мужских и женских растений хмеля японского, хмеля обыкновенного и конопли посевной. Полученные данные были проанализированы в программе RepeatExplorer, выявлены основные классы повторяющихся последовательностей у данных видов, проведено сравнение фракций между видами, а также между растениями различного пола внутри вида. В результате было показано, что во всех трех родах большая часть повторяющейся ДНК представлена различными классами LTR, однако распределение внутри классов различалось. При этом в растениях хмеля обыкновенного около 13% от всей повторяющейся ДНК составляет неопределенный класс повторов. Размер генома у данного вида также наибольший среди всех изучаемых. Существует определенная вероятность, что именно распространение данного вида повторов в геноме у *Humulus lupulus* сыграло роль в увеличении генома. Стоит также отметить, что Y-хромосома хмеля обыкновенного наоборот, наименьшая среди сородичей. Все это говорит о возможной наибольшей эволюционной древности данного вида и его системы половых хромосом относительно родственных групп. Для проверки данной теории были проведены исследования по локализации выявленных классов повторяющейся ДНК на хромосомы трех видов, результаты которых находятся в обработке.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, договор № 20-316-70018\19*

**Список литературы:**

1. Ming R., Bendahmane A., Renner S. S. Sex chromosomes in land plants //Annual review of plant biology. – 2011. – Т. 62. – С. 485-514.

2.Kejnovsky, E., Hobza, R., Cermak, T. *et al.* The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* **102,** 533–541 (2009). https://doi.org/10.1038/hdy.2009.17

3.Vyskot B., Hobza R. The genomics of plant sex chromosomes //Plant Science. – 2015. – Т. 236. – С. 126-135.

4.Li, SF., Zhang, GJ., Yuan, JH. *et al.* Repetitive sequences and epigenetic modification: inseparable partners play important roles in the evolution of plant sex chromosomes. *Planta* **243,** 1083–1095 (2016). https://doi.org/10.1007/s00425-016-2485-7

5.Jesionek W. et al. Fundamentally different repetitive element composition of sex chromosomes in Rumex acetosa //Annals of botany. – 2021. – Т. 127. – №. 1. – С. 33-47.

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *THINOPYRUM SARTORII*.

**Кузнецова В. М.[1], Дивашук М. Г.[1], Крупин П. Ю.[1] Никитина Е. А.[1]**

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

В результате одомашнивания и длительной селекции мягкой пшеницы её генофонд значительно обеднел в связи со снижением генетического разнообразия по многим признакам, главным образом, устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Хорошим источником генов устойчивости для интрогрессии в геном пшеницы является дикорастущие сородичи пшеницы, в частности, различные виды пырея: *Thinopyrum bessarabicum, Th. intermedium, Th. sartorii* и другие виды [1].

*Thinopyrum sartorii* - дикорастущий тетраплоидный злак. Произрастает в прибрежной зоне, небольшими популяциями на островах Эгейского моря, также встречается в Италии [2]. Liu and Wang в 1993 году определили его геномную формулу - $J^bJ^e$ , при этом предполагаемым донором субгенома $J^b$ геном является *Th. bessarabicum*.

В нашей работе был секвенирован геном *Th. sartorii*, образец PI 531745. После фильтрации по качеству ридов длиной не менее 100bp и рандомизированного отбора 237135 ридов был проведен анализ репитома и поиск тандемных повторов с помощью пайплайна Repeat Explorer 2. В результате было найдено 13 тандемных повторов, из них два к LTR элементам. Самый распространённый сателлит достигает распространённости приблизительно 3% в геноме *Th. sartorii*, он гомологичен уже ранее найденному нами у злаков повтору CL75.

Для локализации данных повторов на хромосомах мы использовали флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). Для этой работы в качестве пробы мы использовали повторы, найденные нами ранее на других злаках и гомологичные выявленным у *Th. sartorii*, и локализовали на данном виде: П720, П170, CL75, П 525, НП 427, П 317, 132, 126.

Повтор П720 локализовался на всех хромосомах в субтеломерной на всех хромосомах, а также на четырех парах имеется дополнительный сигнал в прицентромерной области. Повтор П170 локализуется на двух парах хромосом в прицентромерной области. Повтор П525 локализуется на 1 паре в прицентромерной области. Повтор НП427 6 пар имеет сигнал данного повтора. На 1 паре сигналы распределились в теломерной, субтеломерной и прицентромерной областях. На остальных хромосомах сигнал локализуется в центромерной и прицентромерной областях. П317 локализуется на двух парах в центромерной области, на пяти парах повтор локализовался в субтеломерной области и на одной паре есть дополнительный сигнал в центромерной области. Повтор 132

локализуется на 4 парах предположительно по одной паре в каждом геноме. Повтор 126 локализации на хромосомах *Th. sartorii* не показал.

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-16-00123 от 19.04.2021*

**Список литературы:**

1. Кхуат Тхи Май Лыонг. Анализ организации повторяющихся последовательностей ДНК в геномах дикорастущих сородичей пшеницы. Автореф. дисс. … к.б.н. Москва. 2016.
2. Banfi E. A survey of the Elymus L. sl species complex (Triticeae, Poaceae) in Italy: taxa and nothotaxa, new combinations and identification key //Natural History Sciences. – 2018. – Т. 5. – №. 2.

## ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА

**Абрамова А.С.[1], Гарибян Ц.С.[2]**

***1 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств» Факультет Биотехнология, 125080, Москва, ул. Волоколамское шоссе, д.11***
***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***

Протопласты растений представляют собой отправную точку многих методик для генетической модификации целых растений и в настоящее время широко используются в качестве исходного материала для генетических манипуляций с культурными растениями. Несмотря на значительные успехи в технологии получения протопластов для ряда культурных растений, подсолнечник (*Heliáńthus ánnuus)* является одним из наиболее сложных культур в этом отношении.

Целью исследования являлось повышение выхода протопластов подсолнечника и оптимизация метода культивирования.

Известно, что выделение протопластов зависит от многих факторов, в частности от типа ткани, вида и сорта растения, физиологического состояния растения, смеси ферментов и т.д. [1]

В процессе выполнения данной работы были оптимизированы:

- условия ферментной обработки листовых эксплантов разных сортов подсолнечника;
- способы осмостабилизации протопластов;
- условия центрифугирования;
- состав питательных сред и условия для культивирования.

Для исследования были взяты два сорта растений подсолнечника: Победа и СПК (урожай 2019 года) В качестве эксплантов послужили молодые листья из 2-х недельных проростков растений подсолнечника, выращиваемых в условиях *in vitro*. Эксперименты по оптимизации условий ферментной обработки эксплантов показали, что для вышеуказанных сортов при 16-и часовой ферментации, максимальное количество жизнеспособных протопластов получается при температуре 29°С. Эффективным режимом центрифугирования оказался 4 мин. при RPM 1000об/мин.

Сложным этапом при работе с клетками подсолнечника в культуре *in vitro* является получение регенрантов из каллусной ткани, образовавшейся из микроколоний клеток. Оптимальной средой для культивирования клеток и индукции каллусогенеза из протопластов подсолнечника данных сортов оказалась питательная среда, включающая фитогормоны 0,5 мг/л НУК, 2 мг/л 6-БАП, и 60г/л мио-инозитол.

Продолжается исследование по изучению регенерационной способности подсолнечника из морфогенного каллуса.

**Список литературы**:

1. Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. В. И. Негрука; С предисл. Р. Г. Бутенко – М.: Агропромиздат, 1989. – 280 с.: ил.

## ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОКЛОНОВ *IPOMOEA BATATAS* (L.) *IN VITRO*

**Абубакаров Х.Г., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н.**

***Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127550, Россия***

В мире существует около 6000 сортов батата. Их возделывают в разных странах мира. Родиной батата являются Перу и Колумбия, а сегодня эту культуру выращивают в США, Израиле, Китае, Индии, Индонезии, Грузии, странах Средней Азии и в Украине. В Российской Федерации сладкий картофель возделывают в южных районах, где жаркий климат. Основной способ размножения батата – вегетативный. Однако при таком способе размножения происходит передача инфекции и вирусов от исходного растения-донора к последующему посадочному материалу. Поэтому поиск альтернативных путей размножения и получения оздоровленного посадочного материала в массовом количестве остается актуальной проблемой. Кроме того, для расширения ареала возделывания батата в Российской Федерации необходимо создавать сорта с повышенной устойчивостью к низким положительным температурам. Цель исследования – разработать высокоэффективную технологию быстрого размножения батата (*Ipomoea batatas* (L.)) в культуре *in vitro*.

Объектом исследования служили черенки, содержащие одну пазушную почку или верхушки побегов, изолированные с клубней батата сорта Jewel. Первичные эксплантыстерилизовали раствором сулемы ($HgCl_2$) 0,1% в течение 5 минут. После этого их промывали трижды стерильной дистиллированной водой. Микрочеренки культивировали на питательной среде, содержащей ½ минеральных солей по прописи МС, 1/3 МС, 1 МС и 1 ½ МС. В работе изучали влияние различных регуляторов роста на морфогенетическую активность культивируемых эксплантов. Изучали действие 6-бензиламинопурина (BAP), кинетина в концентрациях 0,5-2 мг/л и препарата Дропп в концентрациях 0,1-1 мг/л. Адаптацию растений-регенерантов *ex vitro* проводили двумя способами: на аэропонной установке и в почве. В качестве оборудования для адаптации микрорастений использовали GrowPlant X-Stream 120 (Нидерланды).

Экспериментально установлено, что применяемый режим стерилизации позволил получить хорошо растущую стерильную культуру в 100% случаев. При использовании в качестве первичного эксплантамикрочеренков, наблюдали активацию развития пазушных почек, формирование микропобегов, а также корней в базальной части микрочеренков уже на 7 сутки. В случае использования верхушки побегов, рост апикальных меристем и формирование корней не было отмечено. Причем в процессе всех циклов культивирования *in vitro* образование корней и побегов не происходило. Следует отметить, что уменьшение минерального состава питательной среды приводила к интенсивному росту пазушных почек. Наилучшие результаты по росту побегов и укоренению были получены на среде, содержащей минеральные соли МС в ½ нормы. Для размножения микрочеренков, в состав питательной среды ½ МС добавляли цитокинины: 6-бензиламинопурин (БАП) (0,5 - 2 мг/л), кинетин (0,5 - 2 мг/л), препарат Дропп (0,1-1 мг/л). Во всех вариантах питательных сред применяли индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,5 мг/л. Показано, что с увеличением концентрации регуляторов роста в питательной сред, снижается способность

эксплантов (микрочеренков) формировать пазушные и адвентивные побеги. В этих вариантах отмечается ингибирование роста сформировавшихся почек. Установлено, что самые высокие показатели были получены на среде, содержащей кинетин в концентрации 0,5 мг/л, а самые низкие – на среде с препаратом Дропп. Вариант питательной среды, в котором присутствовал БАП – занимал промежуточное положение. Рост микропобегов во всех вариантах сопровождался формированием в базальной части побегов мощной корневой системы. Полученные укоренившиеся микроклоны были перенесены в условия аэропоники и почвы для адаптации. Установлено, что применение аэропонной установки на последнем этапе клонального микроразмножения привело к 100%-ой акклиматизации микроклонов батата к условиям *ex vitro*. В этих условиях наблюдали активный рост как надземной, так и корневой системы (23-25 см). При использовании почвенной культуры, акклиматизация микропобегов составила 85%, а длина корневой системы не превышала 5-7 см.

## ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ МЕТАБОЛИЗМА И НАКОПЛЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО *SCUTELLARIA BAICALENSIS GEORGI*

**Бронских Е.Д., Орехова И.А., Шебитченко Т.С.**

***Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург 197376, ул. проф. Попова, д. 14***
***E-mail:*** ekaterina.bronskih@spcpu.ru

Шлемник байкальский – многолетнее травянистое растение рода *Scutellaria* семейства *Lamiaceae*, которое обладает широчайшим спектром биологически активных веществ, ценных для человека [1, 5].

В настоящее временя из *S. baicalensis* выделено 81 производное флавона [4]. Основные флавоны шлемника: байкалеин, вогонин и их глюкурониды являются физиологически активными компонентами, которые обладают антимикробным, гипотензивным и седативным действием [1]. Начиная с 2007 г. особенный интерес фармакологов привлекает флавон вогонин, который, по данным японских исследователей, избирательно вызывает апоптоз только онкогенных клеток, не затрагивая при этом обычные клетки [3].

С 80-х гг. XX в. проводятся исследования культуры ткани корня *S. baicalensis* и изучается ее химический состав. В результате обнаружено присутствие 22 соединений, среди которых 17 флавонов и 5 фенилпропаноидов; наличие флаванонов до сих пор не выявлено [5].

Ареал произрастания *S. baicalensis* в России ограничен [5], поэтому его заготовка как ценного лекарственного растения может привести к истощению природных популяций. В настоящее время большую роль приобретает изучение альтернативных путей получения ценных БАВ шлемника байкальского. В связи с этим широко разрабатывается получение продуктов метаболизма *S. baicalensis* из клеточных культур. Поэтому оценка биологической активности метаболитов данной клеточной культуры может являться ключевым показателем перспективности проводимых исследований.

**Целью работы** является определение общей белоксинтезирующей способности, а также анализ содержания флавоноидов в культивируемых клетках *Scutellaria baicalensis Georgi*.

В соответствии с целью, были поставлены **задачи**:

1. Изучить динамику роста каллусной культуры *S. Baicalensis*.

2. Определить содержание белка в различные фазы роста каллусной культуры *S. Baicalensis*.

3. Провести качественный анализ на флавоноиды каллусной культуры *S. Baicalensis.*

Исследования проводились на кафедре биохимии совместно с лабораторией культуры ткани Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета.

**Материалы и методы**

В качестве объекта исследования служила культура ткани *S. baicalensis.* В качестве эксплантов были использованы черенки стерильных растений, полученных из семян шлемника байкальского. Культивирование осуществлялось на среде по прописи MS в темноте при температуре 27-28ºС и влажности 60 – 70%.

Для приготовления гомогената культуру ткани растирали в охлажденной ступке с 0,1М калий-фосфатным буфером с pH=7,4. в соотношении 1:1. Оставляли на 30 минут при температуре 5ºС. Далее гомогенат центрифугировали 40 минут на 17 500 оборотов/мин при температуре 4ºС.

Количественное содержание белка определяли по методу Лоури. Качественный анализ на флавоноиды проводили с помощью тонкослойной хроматографии в тонком слое сорбента.

**Результаты и обсуждение**

При культивировании *S. Baicalensis* наблюдалось изменение цвета штамма от светло-коричневого до светло-жёлтого. На протяжении десяти пассажей наблюдалась гипергидрация клеток, которая практически исчезла к шестнадцатому пассажу.

На двенадцатом пассаже построили кривую роста по накоплению сырой биомассы и приросту биомассы**.** Кривая роста имеет характерную S-образную форму. Выделяются фазы роста: лаг-фаза – 1-2 сутки, экспоненциального роста - 3 сутки, линейного роста – 4-14 сутки, фаза замедленного роста – 15-17 сутки, стационарная фаза – 18-32 сутки, деградации – 33-40 сутки.

Для количественного определения содержания белка были выбраны 10, 15, 20 и 30 сутки от момента пересадки культуры ткани *S. Baicalensis*. Анализ данных показал, что с 10 по 20 сутки происходит увеличение концентрации белка. Это связано с интенсивными процессами роста культуры ткани *S. Baicalensis*. Данный период характеризуется увеличением биомассы каллусной ткани и накоплением максимального количества вторичных метаболитов. На 20 сутки от момента пересадки регистрируется максимальное содержание белка. Далее, с 20 по 30 сутки, наблюдается уменьшение концентрации белка в культуре ткани *S. Baicalensis*, что связано с переходом культуры ткани в фазу деградации, характеризующуюся уменьшением числа органелл, скорость нарастания клеточной массы становится равной нулю, происходит снижение активности синтеза вторичных метаболитов и наблюдается процесс «старения белков».

После двенадцатого пассажа проведен качественный анализ на флавоноиды с помощью тонкослойной хроматографии в тонком слое сорбента. На хроматограмме испытуемого образца были обнаружены 8 пятен желтого и желто-коричневого цвета с определенными значениями Rf, в том числе желтое пятно с соответствующим Rf на уровне пятна раствора РСО лютеолина, пятно с соответствующим Rf на уровне пятна РСО рутина и пятно с соответствующим Rf на уровне пятна РСО лютеолина– 7 – о – гликозида.

**Список литературы:**

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Литвиненко В.И., Попова Т.П., Суслов Н.И. Шлемник байкальский. Фитохимия и фармакологические свойства. Томск, 1994. 222 с.

2.Кузовкина И.Н., Гусева А.В. Культивирование in vitro генетически трансформитрованных корней шлемника байкальского как биотехнологический способ получения флавона с селективной цитотоксической активностью. // Биотехнология и общество в XXI веке. Сборник статей Международной научно-практической конференции. А.А. Ильичев - главный редактор. 2015. с. 45-53.

3. Кузовкова А.А., Фоменко Т.И., Копач О.В., Чижик О.В., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. Культура «бородатых корней» шлемника байкальского – эффективная альтернативная система для получения ценных флавоноидов // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов. 2015. с. 407-411.

4. Оленников Д.Н., Чирикова Н.К., Танхаева Л.М.. Фенольные соединения шлемника байкальского (Scutellaria baicalensis georgi) // Химия растительного сырья. 2009. №4. С. 89–98.

5. Тихонов В.Н., Калинкина Г.И., Сальникова Е.Н. Лекарственные растения, сырьё и фитопрепараты. Часть 2. / Под ред. Дмитрука С.Е. – Томск, 2004. Мир лекарственных растений NSP: Иллюстрированный справочник / под ред. П.В. Дружинина, А.Ф. Новикова; сост. И. Турова. – М., 2010

## ИЗУЧЕНИЕ ЦИКОРИЯ (*CICHORIUM INTYBUS* L.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*, КАК ИСТОЧНИКА ИНУЛИНА

**Дегтярева И.С., Панкова М.Г., Полупанова А.А., Хомутова А.А., Киракосян Р.Н.**
***Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127550, Россия***

В настоящее время наиболее перспективной областью развития пищевой промышленности является производство продуктов питания функционального и диетического назначения. К таким продуктам можно отнести продукты, в состав которых входят, например, пищевые волокна, антиоксиданты, пребиотики и др. Одним из эффективных пребиотиков является инулин, который содержится в цикории и топинамбуре. Анализ рынка производства функциональных ингредиентов показывает, что в Российской Федерации производство таких веществ практически отсутствует и российские производители используют импортный инулин. Поэтому необходимо пересмотреть системы управления производством и получать свою конкурентоспособную продукцию высокого качества.

Цикорий обыкновенный (Cichorium intybus L.) – одно из самых популярных растений с высоким содержанием инулина и биологически активных веществ (%): инулин - 60, белковые вещества - 3,6, жир - 0,3, безазотистые экстрактивные вещества - 15,4, горький гликозид интибин. Содержание перечисленных выше веществ определяет значение этой культуры.

Исходя из вышеизложенного, цель работы – изучить влияние состава питательной среды на морфогенетический потенциал *C. intybus in vitro* и накопление инулина в каллусной ткани.

Объектом исследования служили листовые экспланты, изолированные с растений *C. intybus in vitro*, сорт Петровский. С целью индукции каллусной ткани, листовые сегменты культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга (МС), а также различные ауксины –ИУК, НУК, 2,4-Д в концентрации 5,5-9,5 мг/л в сочетании с цитокинином БАП 2 мг/л. pH питательной среды во всех вариантах составляла 5,9. Содержание инулина определяли в каллусной ткани на 5 и 4 пассажах методом спектрометрии при длине волны 480 нм по методике Касьян (2015).

В результате проведенных исследований установлено, что процесс каллусогенеза, зависит от применяемого ауксина и его концентрации. Максимальный прирост каллусной ткани получен на среде МС, содержащей ИУК или НУК в концентрации 8,5 мг/л. В присутствии НУК формировался не морфогенный каллус, а при использовании ИУК – морфогенный. Применение 2,4-Д не привело к формированию хорошо пролиферирующей каллусной ткани. Экспериментально установлено, что большее содержание инулина было

отмечено в каллусе, полученном на среде с ИУК. Учитываемый показатель в этом варианте составил 5,04, в то время как в варианте с НУК этот показатель не превышал 1,15.

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ АДАПТАЦИИ МИКРОКЛОНОВ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO*

**Гущин А.В., Киракосян Р.Н., Калашникова Е.А.**

***Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127550, Россия***

Перспективным методом получения высококачественного посадочного материала растений является метод клонального микроразмножения, который широко применяется в промышленных масштабах в Нидерландах, Италии, Канаде, Польше, Эквадоре и других странах мира для размножения сельскохозяйственных, цветочных, плодовых и других растениях. В Российской Федерации исследования в этом направлении, как правило, проводятся в лабораторных условиях, и только для некоторых плодово-ягодных культур, а также для картофеля, предлагаемые технологии размножения растений в условиях *in vitro,* имеют коммерческое применение. Для большинства растений, особенно для кустарниковых, древесных лиственных и хвойных культур, отечественные разработки показывают не эффективность применения данного метода с точки зрения коммерческого применения, за счет больших издержек на используемое оборудование, расходные материалы и химические компоненты. Кроме того, для каждого генотипа необходимо разрабатывать индивидуальные питательные среды, учитывая их физиологические и биологические особенности.

Многочисленные исследования показывают, что одним из трудоемких этапов, от которых зависит успех клонального микроразмножения, является адаптация укоренившихся микропобегов к условиям *ex vitro*. Перевод микроклонов в нестерильные условия нередко бывает затруднен. Это связано с тем, что растения претерпевают стресс при переводе их из условий *in vitro* в условия *ex vitro*, что приводит к высокой гибели растений-регенерантов. Кроме того, в условиях *in vitro* микроклоны имеют слабо развитую корневую систему, не функциональный устьичный аппарат и плохо развитую кутикулу. Дополнительная гибель микроклонов *ex vitro* обусловлена также использованием нестерильного почвенного субстрата. В этих условиях возможно развитие бактерий, грибов, а иногда и насекомых паразитов при благоприятной температурной и влажностной среде. Поэтому поиск новых технологий, позволяющих повысить приживаемость клоновых растений, размноженных *in vitro*, к условиям *ex vitro* остается актуальной проблемой. Методы гидропоники и аэропоники призваны повысить производительность и экономическую эффективность технологии клонального

Цель работы – усовершенствовать технологию адаптации микроклонов растений к условиям *ex vitro*. Объектом исследования служили микроклоны *Heuchera hybrida* (L.), *Syringa vulgaris* (L.), *Echinacea purpurea* (L.), *Rubus idaeus* (L.), *Rubus caesius* (L.), *Vítis vinífera* (L.) и *Chrysanthemum indicum* (L.). Микроклоны были получены на среде Мурасига и Скуга, содержащей БАП в концентрации 1 мг/л и ИУК в концентрации 0.5 мг/л. Для адаптации применяли аэропонную систему GrowPlant X-Stream 120 (Netherlands), в качестве контроля использовали контейнеры с почвенным субстратом. Подсветку растений проводили светодиодными лампами красного и синего спектра с интенсивностью 300 μmol/ $m^2$/s. Применяли 16-часовой фотопериод.

В результате проведенных исследований установлено, что на последнем этапе клонального микроразмножения для адаптации микроклонов растений к условиям *ex vitro* целесообразно применять аэропонные технологии. Экспериментально

доказано, что при использовании данных технологий приживаемость растений составила 98-100%, отмечен интенсивный рост и заметное увеличение вегетирующей биомассы и корневой системы растений.

Экспериментально установлено, что при адаптации микроклонов хризантем можно использовать растения как с корневой системой, так и без нее. Причем положительные результаты по адаптации были получены только при применении аэропонной установки. В этих условиях наблюдали активный рост вегетирующей части растений, а также формирование мощной корневой системы. В этом варианте высота растений и длина корневой системы были выше контрольного варианта (почва) в 2 и 3 раза, соответственно. В случае использования при адаптации на аэропонике микроклонов без корней, наблюдали уже на 4-е сутки образование корневой системы. С этого времени наблюдали начало активного роста главного побега. Что касается адаптации микроклонов без корневой системы в почвенном субстрате, то уже на 3-и сутки отмечали гибель растений.

Следует отметить, что применение аэропоники оказало положительное влияние на такие важные показатели, как индекс роста микроклонов (I) и их удельную скорость роста (μ). Данные показатели были выше контрольного варианта в 1,5-2 раза.

Таким образом, наши исследования, проведенные на *Heuchera hybrida* (L.), *Syringa vulgaris* (L.), *Echinacea purpurea* (L.), *Rubus idaeus* (L.), *Rubus caesius* (L.), *Vítis vinífera* (L.), *Chrysanthemum indicum* (L.), показали преимущества применения аэропонных технологий для адаптации микроклонов растений к условиям *ex vitro*, по сравнению с классическими способами адаптации (в почве).

## INTRODUCTION TO IN VITRO CULTURE OF AMOMUM TSAO-KO CREVOST & LEMARIE SEEDS

**Khuat Van Quyet[1,2], Kalashnikova E. A.[1,*], Kirakosyan R. N.[1] , Nguyen Thanh Hai[3]**

***[1] Agronomy and Biotechnology Faculty, Russian State Agrarian University – MTAA, 49 Timiryazevskaya Street, Moscow, 127550, Russia***
***[2] Biology and Agricultural engineering Faculty, Hanoi Pedagogical University N°2, 32 Nguyen Van Linh Street, Vinh Phuc, 15000, Vietnam***
***[3] Biotechnology Faculty, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quy Town, Hanoi, 12406, Vietnam***

Cardamom (*Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié) belongs to the genus *Amomum* Roxb. (Family: Zingiberaceae), is widely used as a flavoring and spicy ingredient in many traditional Vietnamese dishes; furthermore, it is also used in many traditional Vietnamese remedies to treat digestive ailments, malaria, bad breath, tooth decay, etc. Due to the presence of hard seed coat, cardamom has low seed germination potential. Therefore the aims of the present investigation were undertaken to study the effect of different sterilization agents, mechanical scarification, and various culture media on germination parameters of cardamom seeds. From there, an efficient *in vitro* cardamom seed germination protocol allows for a high germination rate and provides efficient production of high-quality sterile seedlings was described. Intact seeds were removed from aril and were soaked in warm water for 8 hours before sterilization; in the next step, they were disinfected in 0.1% mercuric chloride for 10 minutes and rinsed 4-5 times with sterile distilled water; then, they were scarified manually by cutting 1-1.5 mm of the seed coat at the opposite site of hilum by a sterile scalpel; lastly, they were inoculated onto MS medium diluted to 1/16 concentration at 25±2ºC under a 16 h-photoperiod in cool white fluorescent light (2000-2500 lux). With this procedure, on average more than 33.33% of the seeds germinated after 90 days of culture, germination mean time (GMT) is 43.98 days, and germination rate index (GRI) is 0.1917.

# РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ ПОДСОЛНЕЧНОГО ШРОТА

**Клишин А.А., Мальцева О.Ю.**

***Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (ФГБОУ ВО «ВГУИТ»), Воронеж 394036 E-mail: post@vsuet.ru***

В современном мире назначение продуктов питания состоит не только в удовлетворении голода и обеспечении питательными веществами, но и для профилактики, предотвращения или уменьшения развития различных заболеваний, для улучшения физического благополучия. Одним из таких продуктов являются пробиотические препараты. Традиционно считается, что пробиотики возможно получить, употребляя исключительно молочные продукты. Однако на сегодняшний день рынок пробиотических продуктов довольно разнообразен и является одной из быстрорастущих отраслей производства функциональных продуктов питания, т.к. в последние годы немолочные пробиотические продукты привлекают все больше внимания из-за потребительского спроса [1]. Это связано как с проблемами здоровья населения (аллергия на молоко, непереносимость лактозы, колебания содержания холестерина), так и если человек придерживается веганской диеты. Для того, чтобы смягчить недостатки пробиотиков на молочной основе, разрабатываются немолочные пробиотические продукты, включая пищевые матрицы из фруктов, овощей и злаков.

Наибольшей популярностью для получения немолочных продуктов являются различные соки (яблочные [2], абрикосовый [3] и т.д.), зерновые культуры (в основном бобовые [4]). Однако, из-за высокой стоимости таких субстратов проводят исследования с более дешевыми аналогами.

На кафедре Биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО ВГУИТ разрабатывается пробиотический препарат на основе подсолнечного шрота. Данный субстрат является дешевым ценным сырьем, успешно перерабатывается и применяется как кормовая добавка для животных.

Субстрат обрабатывается различными ферментными препаратами для уменьшения количества клетчатки и высвобождения простых углеводов, дополняется солями. Данное сырье достаточно бедно по своему белковому и аминокислотному составу, поэтому для его обогащения используются дрожжи р. *Saccharomyces*, р. *Pichia,* р.*Yarrowia.* В качестве пробиотических микроорганизмов применяются бактерии *Bacillus subtilis* и закваска молочнокислых бактерий *Streptococcus thermophilus.*

В результате наилучшие результаты показали препараты следующего состава: *Yarrowia lipolitica* и *S. thermophilus* – данная комбинация может быть пригодна для употребления животными; *Saccharomyces cerevisiae* и *B. subtilis* – данная комбинация потенциально может быть использована для употребления человеком.

**Список литературы:**

1. Aspri M., Papademas P., Tsaltas D. Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products // Fermentation. MDPI AG, 2020. Vol. 6, № 1. P. 30.

2. Li, Z.; Teng, J.; Lyu, Y.; Hu, X.; Zhao, Y.; Wang, M. Enhanced Antioxidant Activity for Apple Juice Fermented with Lactobacillus plantarum ATCC14917. *Molecules* 2019, *24*, 51.

3. Bujna, E.; Farkas, N.A.; Tran, A.M.; Sao Dam, M.; Nguyen, Q.D. Lactic acid fermentation of apricot juice by mono-and mixed cultures of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Food Sci. Biotechnol. 2018, 27, 547–554.

4. Świeca, Michał, et al. "Lactobacillus plantarum 299V improves the microbiological quality of legume sprouts and effectively survives in these carriers during cold storage and in vitro digestion. PLoS One 13.11 (2018): e0207793

## ГАПЛОИДИЯ В УСКОРЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

**Донцова В.Ю**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Аграрный научный центр Донской», г. Зерноград, ул. Научный городок д.3 347740***
***E-mail: valja-doncova@mail.ru***

В современных биотехнологических и селекционных исследованиях основных сельскохозяйственных культур существуют проблемы, которые можно решить только с помощью новых методов выявления генетического потенциала растений. Внедрение новых клеточных технологий в сочетании с классическими методами генетики и селекции открывает широкие возможности для практического использования и решения фундаментальных проблем генетики и биотехнологии.

Вышеизложенное более актуально для метода выращивания изолированных пыльников, основанного на использовании феномена андрогенеза in vitro. Этот метод повышает эффективность получения новых форм пшеницы, устойчивых к различным неблагоприятным факторам, в кратчайшие сроки и без привлечения больших площадей. Применение метода выращивания изолированных пыльников в настоящее время является неотъемлемой частью процесса отбора пшеницы. Однако, несмотря на положительные результаты, многие проблемные вопросы все еще остаются нерешенными.

Цель исследований – оценка гибридов $F_3$ озимой мягкой пшеницы по отзывчивости пыльников и регенерации растений в культуре in vitro.

В качестве объекта исследований были взяты 4 гибридные комбинации озимой мягкой пшеницы селекции ФГБНУ АНЦ «Донской» интенсивного и полуинтенсивного типа: $F_3$ 532п/инт, $F_3$ 623 инт, $F_3$ 630 п/инт, $F_3$ 540 п/инт. Всего было высажено на искусственные питательные среды 1939 пыльников.

Растения-доноры были отобраны в поле из селекционных питомников ФГБНУ АНЦ «Донской». Основной отбор побегов с колосьями проводили в утренние часы. Побеги у которых влагалище предпоследнего листа (последний флаговый лист) находились на уровне центральной части колоса (± 1 см), срезали на уровне почвы без повреждения последующих побегов. Местоположение колоса в листовой обертке определяли вручную. В колосьях, срезанных по указанному морфологическому признаку, микроспоры находились в одноядерной стадии развития. Отобранные побеги этикетировали и хранили в сосудах с водой при температуре +1-3º С. (Суханов,1983).

Перед стерилизацией колос оставляли во влагалище флагового листа, затем помещали колос в раствор гипохлорида натрия и закрывали сверху парафильмом. Мягко встряхивая, образцы дезинфицируются 10 минут, а затем раствор сливали и промывали бидистилированной водой. В ламинарном шкафу под потоком стерильного воздуха открыв сосуд и стерильным пинцетом переносили колос в стерильную чашку Петри. Срезали все колоски стерильным скальпелем, разрезаем колосок наискосок, дастали пыльники и помещали их с помощью металлического крючка в пробирку на питательную среду. Извлечение пыльников из цветков и их посадку на питательную среду осуществляли в условиях бокса микробиологической безопасности. Еженедельно наблюдали за процессом роста культуры, удаляли инфицированные пробирки.

Культивирование проводили на трех модифицированных питательных средах, из которых три – для индукции и одна для регенерации. Индуционные среды N6(Ziand Hai-

man, 1978), W14(Ouyang et al., 1989,Barnabas B, 2003), NPB99 (Zheng et al., 2002), 190-2(J. Pauk, 2003).Среда W14 по содержанию макроэлементов была близка к среде N6, а среда NPB99 содержит примерно в два раза меньше макроэлементов по прописи. Среда W14 схожа со средой NPB99 по количеству микроэлементов, кроме того в них присутствует Mo,Cu, Co в отличии от N6. В питательной среде NPB99 находилась глютаминовая кислота, а в средах N6 и W14 ее нет. Максимальное содержание тиамина в среде NPB99. Кроме того в данной среде содержалось два ауксина: 2,4-Д (0,2мг/л) и 3-ИУК (1мг/л). В среде N6 и W14 присутствует ауксин 2,4-Д (2 мг/л). Содержание цитокенинов во всех трех средах было одинаковое - кетинин (0,5 мг/л), зеатин (0,05 мг/л).

Пробирки с пыльниками помещали в термостат и инкубировали в темноте при температуре +28°С. Через 7 дней пробирки начали просматривать под микроскопом и фиксировать время, количество и место образования каллусов (Лаврова,2006). Через 20-29 дней после посадки пыльников на индукционную среду образовавшиеся каллусы пересаживали на среду регенерации. Пробирки с пересаженными каллусами инкубировали при температуре 25 ºС в помещении с естественным освещением (Лукьянюк и Игнатова, 1980). Затем пробирки с эксплантами отправили в освещенную ростовую комнату, где они должны культивироваться 16ч/8 фотопериод, 3000 люкс освещенность. Еженедельно наблюдали за регенерацией растений (появление зеленых побегов), и удаляли инфицированные пробирки. Растения с хорошо развитой корневой системой в пробирках помещали на яровизацию в холодильник на 40 дней при температуре 4°С.

**Список литературы:**

1. Лаврова Н. В. Гаплоидные биотехнологии в селекции озимой пшеницы // Вестник КГУ им. Н. А. Некрасова. 2006. № 4. С. 22–25.

2. Zheng M.Y,Liu W, Weng Y, Polleand E, Konzak C.F, 2002// Production of doubled haploids in wheat (Triticum aestivum L.) through microspore embryogenesis triggered by inducer chemicals,73-94.

3. Суханов В. М., Клочков В. П., Хохлов С. С., Тырнов В. С. Использование культуры пыльников для получения гаплоидов // Культура клеток растений. Киев: Наукова думка, 1978. С. 312–314

4. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем in vitro: монография. — Одесса: Астропринт, 2011. — 224

5. Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А. Методы культуры тканей и органов в селекции растений: метод. рекомендации. - Одесса: ВСГИ, 1980. – 22 с.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ *BRASSICA* × *RAPHANUS*

**Спивак В.В.**

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр Садоводства», Россия, 115598, г. Москва, ул. Загорьевска, д. 4***
***e-mail: vl.spivak@mail.ru***

Отдаленная гибридизация – один из методов селекции для решения ключевых проблем современного растениеводства, позволяющий создать генотипы с уникальным набором хозяйственно-ценных признаков. Его использование сопряжено с трудностями по сохранению полученных объектов в результате их гибели на ранних этапах развития. Применение культуры изолированных зародышей для преодоления проблемы гибели зародыша при межвидовой гибридизации широко применяется в селекции различных культур.

Для получения межвидовых гибридов нами в лабораторных условиях были произведены скрещивания: *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (Mill.) Thell. × *Raphanus sativus* L., *Brassica juncea* (L.) Czern. × *R. sativus, B. juncea* × *R. sativus* (4n), *B. rapa* L. var. *rapa* × *R. sativus, B. rapa* subsp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt. × *R. sativus*. Успешной комбинацией, с завязываемостью 36% являлась только *B. juncea* × *R. sativus.*

Для сохранения полученных генотипов в эмбриокультуру на среду MS (Murashige and Skoog, 1962), содержащий 80 г/л сахарозы и 400 мг/л гидролизата казеина было введено 507 зародышей (124 собранных на 12 день после опыления, 127 на 14 день, 131 на 16 день, 125 на 18 день).

К моменту пересадки на твёрдую питательную среду B5 (Gamborg, 1968) без регуляторов роста с содержанием сахарозы 20 г/л и 8 г/л агара выжило 8 зародышей (5 введённых в эмбриокультуру на 14 день после опыления, 2 на 18 день).

После пересадки на твёрдую питательную среду выжило 2 зародыша (введённые в эмбриокультуру на 14 день после опыления).

После адаптации был сохранен один гибрид фенотипически имеющий признаки: отцовского растения (*R. sativus*) - лировидный лист, форма стручка с толстым носиком; материнского растения (*B. juncea*) - отсутствие антоциановой окраски черешка; обеих родительских форм - отсутствие опушения стебля. Отличим от обеих родительских форм окраской венчика. В ходе подсчёта было определено, что полученный гибрид (*B. juncea* × *R. sativus*) в диплоидном наборе имеет 27 хромосом.

## СЕКЦИЯ
## «СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ. РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ»

# ЛЕТУЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, ВЫДЕЛЯЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ, ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

**Плюта В.А.[1], Сидорова Д.Е.[1], Мелькина О.Е.[2], Кокшарова О.А[1,3], Хмель И.А.[1]**

***1 - ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. И.В. Курчатова, д. 2***
***E-mail: plyutaba@gmail.com***
***2 – ФГБУ «ГосНИИгенетика» НИЦ "Курчатовский институт", 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1***
***3 - НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносов, 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40***

В последние годы способность микроорганизмов синтезировать летучие органические соединения (ЛОС) и изучение их функциональной роли привлекает активное внимание исследователей различного профиля, работающих как в фундаментальных, так и в прикладных областях биологии. Известно, что бактерии и грибы выделяют огромное количество ЛОС различной химической природы. Эти вещества характеризуются низкой молекулярной массой (в среднем порядка 300 Да), липофильной природой, низкой температурой кипения. Среди них – спирты, кетоны, терпены, пиразины, альдегиды, серо- и азот-содержащие соединения и др. Опубликована база данных ЛОС, образуемых бактериями и микроскопическими грибами, включающая больше 2000 идентифицированных ЛОС. Феномен синтеза ЛОС микроорганизмами вызывает огромный интерес исследователей как новый, мало изученный аспект конкурентных отношений микроорганизмов и их взаимодействия с высшими организмами. Показано, что ЛОС могут подавлять или стимулировать рост микроорганизмов, растений, вызывать индукцию системной резистентности растений, оказывать убивающее или аттрактивное действие на насекомых и др.

Еще одно актуальное направление исследований ЛОС связано с их участием в новом типе коммуникации бактерий – дистанционной коммуникации: ЛОС как сигнальные молекулы могут действовать, переносясь по воздуху на большие расстояния, и влиять на экспрессию жизненно-важных для бактерий генов. Было показано, что ЛОС взаимодействуют с глобальными регуляторными системами бактерий – Quorum Sensing регуляцией (QS).

Кроме большого фундаментального значения, исследования ЛОС микроорганизмов могут обеспечить перспективы их использования на практике (в сельском хозяйстве, медицине, биотехнологии, и др.). Многочисленные ЛОС, образуемые бактериями, являются важным арсеналом новых химических соединений, которые могут быть полезными для получения биостимуляторов роста растений, биотоплива или как промежуточные вещества для синтеза других важных для человека продуктов. Штаммы-продуценты ЛОС перспективны для биологического контроля заболеваний растений, а препараты на основе некоторых ЛОС уже используются для фумигации с/х земель. Предпринимаются попытки получения генно-инженерных штаммов–продуцентов ЛОС. Однако, для полноценного использования этих веществ необходимо подробное изучение механизмов их действия и генетического контроля синтеза и действия ЛОС, которые в настоящее время исследовались мало.

Нами было проведено сравнительное исследование биологических активностей представителей различных типов ЛОС – кетонов (2-бутанон, 2-пентанон, 2-гептанон, 2-октанон, 2-нонанон, 2-ундеканон, ненасыщенный кетон β-ионон), спиртов (изоамиловый спирт, 2-фенилэтанол), терпенов ((-)-лимонен, (+)-α-пинен) и серосодержащего соединения

диметилдисульфида (ДМДС) по отношению к различным организмам. Показано, что ЛОС ингибировали рост и образование биопленок фитопатогенных агробактерий; снижали свимминг-миграцию бактерий, важную для формирования биопленок; подавляли рост мицелия фитопатогенных грибов. Наибольшее ингибирующее действие оказывали 2-октанон, изоамиловый спирт и 2-фенилэтанол. На модели бактерии *Serratia proteamaculans* показана роль QS регуляции в синтезе ЛОС и их действии на фитопатогенные грибы.

В опытах по изучению действия ЛОС на модельное растение *Arabidopsis thaliana* было обнаружено, что исследуемые вещества ингибировали прорастание семян и рост растений; показана роль GacA/GacS системы в эффекте ЛОС. Интересно, что кетоны 2-бутанон и 2-пентанон оказывали стимулирующее действие на рост растений - биомасса *A. thaliana* была в 1,5-2 раза больше по сравнению с контролем без ЛОС.

Плодовые мушки *Drosophila melanogaster* погибали быстрее всего в присутствии терпенов (-)-лимонена и (+)-α-пинена, которые не проявляли такого явного действия на другие исследуемые биологические объекты. При действии других ЛОС насекомые также погибали, причем с удлинением углеводородной цепи кетона выживаемость мух снижалась. Кетоны 2-нонанон и 2-ундеканон, а также ДМДС, синтезируемые штаммами *Pseudomonas* и *Serratia*, замедляли развитие и убивали нематод (*Caenorhabditis elegans*).

При изучении молекулярных механизмов действия ЛОС получены следующие результаты.

1. С использованием специфических lux-биосенсоров исследовано действие ЛОС на QS регуляцию. Показано, что 2-октанон и 2-фенилэтанол существенно снижают QS-ответ.

2. Показано, что (-)-лимонен ингибирует рост бактерий *E. coli*, индуцирует промоторы, реагирующие на окислительный стресс (pKatG'::lux и pSoxS'::lux), повреждение ДНК (SOS-ответ, pColD'::lux), повреждение белков («тепловой шок», pIbpA'::lux) и повреждение мембраны (pFabA'::lux). Эффект α-пинена намного слабее: он вызывает у бактерий только «тепловой шок».

3. Показано, что 2-гептанон, 2-нонанон, 2-ундеканон ингибируют DnaKJE-ClpB-зависимый рефолдинг термоинактивированных бактериальных люцифераз; наиболее сильное действие ЛОС оказывают на штамм *E. coli* JW3663, у которого отсутствует шаперон IbpB. (-)-Лимонен полностью ингибирует рефолдинг люциферазы, а (+)-α-пинен только частично подавляет рефолдинг в мутантном штамме Δ*ibp*B.

4. Анализ полученных транспозонных мутантов цианобактерий *Synechococcus elongatus* PCC 7942, устойчивых к 2-нонанону, выявил четыре новых гена, участвующих в чувствительности к кетонам (кодируют белки, принимающие участие в биогенезе, функционировании клеточной стенки цианобактерий и в стрессовой реакции на уровне рестрикции-модификации ДНК).

5. Установлено, что 2-ундеканон и 2-нонанон ингибируют фотосинтез цианобактерий, подавляя транспорт электронов через систему PSII.

Работа частично финансировалась Фондом в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» — ИМГ на 2020-2021 годы (№ 121030200227-6).

**Список литературы:**

1. Koksharova O.A., Popova A.A., Plyuta V.A., Khmel I.A. Four New Genes of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 are responsible for sensitivity to 2-nonanone // Microorganisms. 2020. V. 8, 1234. doi: 10.3390/microorganisms8081234

2. Веселова М.А., Плюта В.А., Хмель И.А. Летучие вещества бактерий: структура, биосинтез, биологическая активность // Микробиология, 2019, Том 88, № 3, С. 272–287. doi: 10.1134/S0026365619030169

3. Plyuta V.A., Chernikova A.S., Sidorova D.E., Kupriyanova E.V., Koksharova O.A., Chernin L.S., Khmel I.A. Modulation of *Arabidopsis thaliana* growth by volatile substances emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains // World J Microbiol Biotechnol. 2021. 37(5):82. doi: 10.1007/s11274-021-03047-w

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ HLA-II У ПАЦИЕНТОВ С ВЫСОКИМИ ТИТРАМИ IgG ПОСЛЕ COVID-19

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

***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии", Вольгинский 601125***
***E-mail: masha67111@mail.ru***

Тенденции в области изучения возбудителей инфекционных болезней животных и человека, в первую очередь, ориентированы на понимание механизмов взаимодействия возбудителя и восприимчивого организма. Новая коронавирусная инфекция человека, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2 (2019-nCoV), также требует детального изучения тонкостей иммунного ответа, в частности возможной роли HLA (класс I и II) на тяжесть течения инфекции и модуляции патогенеза за счет антитело-зависимого усиления.

В данной работе определены HLA-типы у пациентов с высокими титрами антител (IgG) в крови, после перенесенного COVID-19.

Из крови четырех доноров, переболевших COVID-19 и имеющих высокие титры антител класса G (>1:800), выделены фракции лейкоцитов по методике разделения клеток крови в градиенте плотности фиколла (Фиколл-1077 Диаколл/Diacoll «Диаэм», Россия) с использованием центрифуги многофункциональной 5804R («Eppendorf», Германия). Аликвоты клеток по $4*10^6$/мл депонированы в FBS с 10% DMSO с последующей поэтапной заморозкой при следующих условиях: комнатная температура/ +4°C 15 минут/ -20°C 20 минут/ -50°C 20 минут/ -80°C на ночь/ -196°C хранение в жидком азоте. Дополнительные аликвоты клеток в количестве $0,5*10^6$/мл заморожены при -80°C, и в дальнейшем использованы для HLA-типирования методом ПЦР в режиме реального времени.

Для выделения геномной ДНК использован набор реагентов "QIAamp DNA mini kit" ("Qiagen", Германия) согласно протоколу выделения ДНК из клеток. Для получения наиболее полной картины вариантов HLA-II типа, присутствующих в исследуемых образцах, использованы три коммерческих набора реагентов для типирования: "HLA DQA1", "HLA DQB1", "HLA DRB1" (ООО "НПО ДНК Технология", Россия).

Результаты типирования образца 1 (№ пациента 053408, группа крови AB(IV)) показали значения *0301,*0501 по типу DQA1; *0301,*0303 по типу DQB1; *09,*11 по типу DRB1.

Образец 2 (№ пациента 053670, группа крови A(II)) продемонстрировал вариант *0101,*0501 по типу DQA1; *02,*0501 по типу DQB1; *01,*03 по типу DRB1.

У образца 3 (№ пациента 053411, группа крови AB(IV)) выявлены значения *0102,*0103 по типу DQA1; *0602-8,*0602-8 по типу DQB1; *13,*15 по типу DRB1.

Образец 4 (№ пациента 053784, группа крови B(III) показал варианты *0401,*0501 по типу DQA1; *0602-8,*0602-8 по типу DQB1; *08,*13 по типу DRB1.

По аллелю DQA1 у трех пациентов из четырех обнаружен вариант *0501, по некоторым данным ассоциированный с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. Ещё один вариант DQA1 *0301 выявленный у одного пациента, также обнаружен у пациентов с другим аутоиммунным заболеванием (полигландулярный синдром 2 и 3 типа).

По аллелю DQB1 два реконвалесцента имели абсолютно одинаковые варианты (*0602-8). Среди HLA DRB1 все пациенты имели разные варианты (*09, *11, *01,*03,*13,*15,*08,*13).

Полученные данные HLA типирования в дальнейшем могут быть использованы при изучении активности рекомбинантных антител против SARS-CoV-2 в клеточных тестах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60028

# ИНТЕНСИФИКАЦИЯ БИОСИНТЕЗА СКВАЛЕНА ДРОЖЖАМИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**Клименко А.А., Мещерякова О.Л., Корнеева О.С.**

***Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Воронежский государственный университет инженерных технологий", Воронеж 394036 E-mail:*** **post@vsuet.ru**

Сквален – биологический углеводород, являющийся промежуточным продуктом биосинтеза стероидов и терпенов в мевалонатном пути синтеза у большинства организмов. Производят сквален в основном из печени глубоководных акул. Альтернативным является получение из растительных масел (оливковое, амарантовое, камелии и т.д.). Также возможно получение сквалена биотехнологическими способами.

Наибольший интерес в последнее время представляет использование сквалена в качестве адъюванта вакцин, благодаря его биосовместимости, так как он является промежуточным продуктом биосинтетических путей и легко усваивается и утилизируется организмом. Применение сквалена в качестве адъюванта предложено в [1]. Однако, в связи с резко возросшей потребностью в адъювантах вакцин из-за непрекращающейся пандемии активно ведутся споры об ущербе морских экосистем, так как печень акул является основным источником сквалена. [2].

Таким образом, поиск и совершенствование альтернативных технологий получения сквалена является актуальной задачей. Получение сквалена из растительных масел ограничено посевными площадями и трудоемкостью процесса, поэтому следует уделить внимание микробиологическом способам получения.

Одним из перспективных продуцентов являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Технологии их культивирования хорошо изучены, а их промышленное применение безопасно и подходит для различных отраслей. Дрожжи *S. cerevisiae* способны к синтезу стеролов, которые им необходимы для построения клеточных мембран. Так как сквален является предшественником в пути синтеза стеролов, то активирование этого процесса – один из шагов интенсификации производства. Одним из вариантов предотвращения окисления сквалена и дальнейшего превращения в стеролы является ограничение доступа кислорода, то есть культивирование в анаэробных условиях. Однако известный факт, что в анаэробных условиях снижается накопление биомассы клеток. Кроме того, большинство штаммов дрожжей становятся зависимыми от содержания в среде эргостерина, который они потребляют [3].

Поэтому более оптимальным следует рассматривать аэробное культивирование дрожжей и регуляцию процесса биосинтеза стеролов. Одним из вариантов регуляции является применение методов генной инженерии. Способ получения продуктов этого пути синтеза рекомбинантными дрожжами описаны в [4]. Основные гены регулирующие реакции синтеза эргостерола: HMG-CoA-редуктаза (HMGl), скваленсинтетаза (ERG9), ацил-CoA: стеролацилтрансфераза (SAT1) и скваленэпоксидаза (ERG1). Эти гены регулируются кислородом (поэтому культивирования целесообразно вести в аэробных условиях для интенсификации процесса). Основная модификация дрожжей заключается в обеспечении сверхсинтеза эргостерола и его промежуточных продуктов за счёт встраивании изменённых генов HMGl, ERG9, SAT1, иERG1. В результате нарушается регуляция синтеза и он идёт с почти конститутивной экспрессией.

Регуляция стеролов осуществляется на уровне транскрипции. Анализ делеций в области промотора ERG1 позволил идентифицировать новый регуляторный элемент. Два шести нуклеотидных прямых повтора, разделенных четырьмя нуклеотидами, а именно сиквенс AGCTCGGCCGAGCTCG, были уникальными для промотора гена скваленэпоксидазы. Фрагмент ДНК, содержащий этот фрагмент, регулировал эргостерол зависимую экспрессию гена ERG1. Делеция обнаруженного фрагмента ДНК приводила к отсутствию регуляции гена ERG1 эргостеролом [5].

Для того, чтобы добиться накопление именно сквалена возможно применение ингибиторов скваленэпоксидазы, например, в [6] предложено применение тербинафина, который ингибирует этот фермент и тормозит ферментативное окисление сквалена, что позволяет накапливать больше продукта. Подавление синтеза эргостерола тербинафином приводит к увеличению экспрессии ERG1 в 7 раз при увеличении дозы тербинафина [5].

В то же время использование генно-модифицированных штаммов в пищевой промышленности ограничено, поэтому можно использовать мутантные штаммы с аналогичными свойствами, то есть сверхсинтезом стеролов. Нами был изучен мутантный штамм *S. cerevisiae* ВГШ-2. Эффективность оценивали по содержанию стеринов, содержание которых в сухих веществах составило 8,18%, что почти в 4 раза больше, чем у *S. cerevisiae* XII. Дальнейшее повышение эффективности синтеза сквалена в данном продуценте возможно за счёт подбора оптимальных питательных сред, содержащих предшественники (фарнезилпирофосфат, β-фарнезен) и активаторы ферментов пути синтеза сквалена. Поэтому целесообразно использовать сырьё растений, в которых активно идёт синтез сквалена, например, амарант. Так в [7] описано благотворное влияние муки амаранта на свойства дрожжей. Так как, дрожжи не способны к синтезу ферментов, гидролизующих высокомолекулярные биополимеры, то целесообразно исследовать ферментативный гидролизат амарантовой муки в составе питательных сред, предположительно содержащий фарнезилпирофосфат или β-фарнезен, а также питательные вещества в более доступной для дрожжей форме.

**Список литературы:**

1. Nguyen-Contant, P., Sangster, M. Y., &Topham, D. J. (2021). Squalene-based influenza vaccine adjuvants and their impact on the hemagglutinin-specific b cell response. Pathogens, 10(3) doi:10.3390/pathogens10030355

2. Эксперты посчитали, сколько акул могут быть убиты ради вакцины от COVID // РИА Новости URL: https://ria.ru/20200928/vaktsina-1577869804.html (дата обращения: 02.10.21.).

3.Пермякова Лариса Викторовна Влияние способа обеспечения пивных дрожжей кислородом на синтез стеринов // Техника и технология пищевых производств. 2018. №2. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-sposoba-obespecheniya-pivnyh-drozhzhey-kislorodom-na-sintez-sterinov (дата обращения: 03.10.2021).

4. Патент RU2235777C2 Способ получения эргостерола и его промежуточных продуктов с использованием рекомбинантных дрожжей Альфред ВЕБЕР (DE) Альфред Вебер, Уве Клагес (DE), Марио Кеннекке (DE), Кристине Ланг (DE), Ульф Шталь (DE),Томас Полаковски (DE)

5. Leberetal. European Journal of Biochemistry 286: 914-924 (2001)

6. Мещерякова О.Л., Свиридова Т.В., Корнеева О.С Биосинтез сквалена дрожжами Saccharomices cerevisiae ВГШ-2 // Биотехнология и биомедицинская инженерия. 2018.

7. Патент № 2698901 C2 Российская Федерация, МПК A21D 2/36. Способ активации прессованных дрожжей: № 2018100785: заявл. 10.01.2018: опубл. 30.08.2019 / Н. А. Шмалько, Ю. Ф. Росляков, С. О. Смирнов; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный технологический университет" (ФГБОУ ВО "КубГТУ").

# ПОИСК БАКТЕРИОФАГОВ, ЭФФЕКТИВНЫХ ПРИ БОРЬБЕ С ФИТОПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ СЕМЕЙСТВА *PSEUDOMONAS* И *RAOULTELLA*, ПОРАЖАЮЩИХ КОК-САГЫЗ (*TARAXACUM KOK-SAGYZ RODIN*) – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА

**Мартиросян Л. Ю.[1,2], Лукьянова А. Л.[3], Америк А. Ю.[1]**

***1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42. E-mail: levon-agro@mail.ru***
***2 – ФГБНУ Институт биохимической физики РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.***
***3- Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра микробиологии, 119234, Москва, микрорайон Ленинские Горы 1, стр. 12, E-mail: tamanshii@gmail.com***

Растение кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz Rodin*) является продуцентом натурального каучука (НК). В настоящее время в связи с возрастающим спросом на НК, кок-сагыз активно возделывается как альтернативный источник каучука [1,2]. В процессе выращивания мы столкнулись с бактериозом у вегетирующих растений. Бактериальные поражения способны полностью уничтожить растение в короткий срок. Для борьбы с бактериозами кок-сагыза использовали обработку посадочного материала химическими агентами и фунгицидами, однако длительность защитного эффекта крайне мала. В качестве альтернативного решения в данном случае проводили обработку вегетирующих растений суспензиями бактериофагов, поражающих основные штаммы бактерий, характерные для данной культуры. Такая обработка позволяет эффективно и нетоксично защитить растения, поэтому поиск, изучение целевых бактериофагов является крайне актуальной задачей.

Целью данной работы был поиск бактериофагов, эффективных при борьбе с бактериозами кок-сагыза и разработка препарата для обработки растений на их основе.

На первом этапе работы было необходимо получить чистую культуру потенциального патогена и идентифицировать ее. При высеве на питательную среду LB (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl – 10 г/л, агар 15 г/л) пробы из пораженной ткани, взятой из растений с внешними признаками бактериоза, были выделены потенциальные патогены, условные названия Ksz1 и Ksz2.

Для идентификации патогенов было проведено секвенирование участка 16S рРНК с использованием стандартных праймеров (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Анализ данного участка позволяет идентифицировать культуру с точностью до рода. Дополнительно было проведено секвенирование участка бета-субъединицы гиразы gyrB (праймеры gyrB5': GGA GCA GTA CAT CAA GGA CGA, gyrB3': GGG TCC ATG GTG GTT TCC CAC A). Для большей точности секвенирования на концах участка, ПЦР продукт был предварительно склонирован в pAL2-T вектор. Этот вектор представляет собой линеаризованную плазмиду с выступающими 3'-концевыми тимидинами. Эффективное лигирование обеспечивается способностью Taq-полимеразы нематрично добавлять на 3'-конец синтезируемой ДНК дезоксиаденозин.

Анализ последовательностей показал, что: Ksz1 – Pseudomonas putida, Ksz2 - Raoultella terrigena.

Для чистых культур выделенных патогенов был проведен поиск бактериофагов стандартным методом с использованием накопительных культур. В качестве источника были взяты сточные воды из очистных сооружений поселка Горки Ленинские, Ленинский район, Московская область. В результате для обеих культур были найдены бактериофаги, успешно вызывающие лизис на бактериальном газоне. Бактериофаг против Pseudomonas putida - условно назван PP1. Бактериофаг против Raoultella terrigena – условно назван RT1.

На бактериальном газоне фаг PP1 формирует бляшки без ореола диаметром около 3 мм, фаг RT1 формирует бляшки диаметром около 2 мм, с ореолом около 1 мм.

Первичное тестирование действия смеси данных фагов на растениях с выраженными признаками бактериальной инфекции в аэропонном фитотроне показало многообещающий результат и привело к прекращению развития симптомов бактериоза корневой системы, и к индукции образования новых корней.

Таким образом, в рамках данной работы были идентифицированы патогены и выделены бактериофаги для борьбы с бактериозом *Taraxacum kok-saghyz* Rodin и первично показана высокая эффективность их применения в аэропонном фитотроне.

**Список литературы:**

1. Кутузова С. Н., Брач Н. Б., Конькова Н. Г., Гаврилова В. А. Кок-сагыз-Taraxacum kok-saghyz (Asteraceae, Compositae)-источник ценного растительного сырья для резиновой, пищевой и фармацевтической промышленности //Биосфера. – 2015. – Т. 7. – №. 4.

2. Maryam Salehi, Katrina Cornish, Moslem Bahmankar, Mohammad Reza Naghavi. Natural rubber-producing sources, systems, and perspectives for breeding and biotechnology studies of Taraxacum kok-saghyz // Industrial Crops and Products, 2021, Vol. 170, P. 614–629.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В СИЛОСЕ ИЗ АМАРАНТА

**Василаки Е.А.[1], Мельникова А.Ю.[2], Свиридова Т.В.[1], Мещерякова О.Л.[1] Шуваева Г.П.[1], Корнеева О.С.[1]**

***[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, 394036 E-mail: nauka@vsuet.ru***
***[2] ООО "МЕЖОБЛПРОЕКТ" г. Воронеж, 394033***

Производство качественного корма является важной задачей сельскохозяйственной биотехнологии, так как в растительном сырье, используемом в кормопроизводстве, наряду с ценными биологически активными компонентами накапливаются антипитательные вещества, которые негативно влияют на организм животных. Высокое содержание нитратов в кормах может приводить к развитию тканевой гипоксии, стерильности, тимпании и нарушению усвоения организмом витаминов A, D, E. Предотвращению тимпании могут способствовать танины за счет снижения пенообразования в рубце жвачных животных. Однако при чрезмерном их содержании в кормовой массе, танины могут нарушать обмен минеральных веществи как следствие снижению перевариваемости кормов. Наряду с танинами фитаты также снижают усвояемость питательных веществ за счёт образования фитатных комплексов с минеральными веществами, белками и аминокислотами. Избыточное содержание щавелевой кислоты может приводить к судорогам, нарушению работы сердца и ухудшению свертываемости крови, а при взаимодействии с кальцием образует оксалаты, которые, при чрезмерном накоплении в организме, вызывают воспалительные процессы в почках и желудочно-кишечном тракте. В связи с этим контроль содержания антипитательных веществ в растительном сырье и разработка способов их снижения является важной задачей для кормопроизводства.

В настоящее время наиболее перспективной кормовой культурой является амарант, имеющий низкую стоимость и высокую урожайность,не прихотлив в возделывании. Зерно и зеленая масса амаранта по качественным показателям превосходит традиционные культуры. В его состав входят: 14-20 % легкоусвояемого белка, сбалансированного по аминокислотному составу; 6 % растительных масел с высоким содержанием сквалена; витамины B, C, E, P, каротиноиды. По содержанию лизина амарант в 2 раза превосходит

пшеницу и в 3 раза – кукурузу. В зеленой части амаранта около 10 % пектина. Его листьябогаты калием, кальцием, фосфором, микроэлементами и другими биологически активными веществами необходимыми животным. В них, как и в листьях гречихи, накапливаются около 3 % флавонойдов. По энергетической ценности и содержанию белка амарант практически не уступает сое. Однако в нём могут накапливаться и антипитательные вещества.

В связи с этим, целью нашей работы являлось изучение накопления антипитательных веществ в процессе роста и развития амаранта и исследование влияния заквасочных культур на их содержание в амарантовом силосе.

Объектами исследования являлись зеленая часть и семена амаранта "Гигант", урожай 2018 г., амарантовый силос, заквасочные культуры.

Изучение процесса образования антипитальных веществ в ходе роста и развития амаранта показало, что в зеленой массе и семенах растения накапливались щавелевая кислота, танины, нитраты и фитаты, ингибиторы трипсина отсутствовали. Наибольшее содержание щавелевой кислоты и танинов наблюдалось на начальных стадиях развития амаранта, нитратов – в фазу плодоношения, а фитатов – в фазу цветения культуры. В семенах количество фитинового комплекса незначительное. Содержание фитатов в зеленой массе амаранта в 1,5-2 раза выше, чем в чечевице, кормовых бобах и пшенице, но ниже, чем в сое, фасоле и люпине.

Известно, что снижение количества антипитательных веществ в растительном сырье можно добиться применением ферментных препаратов, заквасочных культур, путём замачивания и сушки в поле токов СВЧ. В связи с этим, изучено влияние заквасочных культур на содержание антипитательных веществ в амарантовом силосе.

Из 20 исследуемых заквасочных культур наибольшее влияние на снижение количества антипитательных веществ в силосе оказывали только 6: «Бактосил», «Пробактил», L. plantarum B-10816, «DI-PROX M-401», «AiBiLcL20.12 FS», «AiBiLCL20.11 T2».

Влияние заквасочных культур на содержание антипитательных веществ в силосе: Без закваски - содержание нитратов 0,044±0,001 мг/кг, содержание фитатов1,56±0,01%, количество щавелевой кислоты 0,018±0,0002 %, содержание танинов 0,100±0,001%.

«Бактосил» - содержание нитратов 0,032±0,001 мг/кг, содержание фитатов 0,88±0,01, %, количество щавелевой кислоты 0,009±0,0002%, содержание танинов 0,075±0,001 %.

«Пробактил» - содержание нитратов 0,032±0,001 мг/кг, содержание фитатов 0,71±0,01, %, количество щавелевой кислоты 0,009±0,0002%, содержание танинов 0,091±0,001 %;

L. plantarum B-10816 – содержание нитратов 0,022±0,001 мг/кг, содержание фитатов 1,6±0,01, %, количество щавелевой кислоты 0,009±0,0002%, содержание танинов 0,083±0,001 %;

«DI-PROX M-401» - содержание нитратов 0,042±0,001 мг/кг, содержание фитатов 1,20±0,01, %, количество щавелевой кислоты 0,009±0,0002%, содержание танинов 0,075±0,001 %;

«AiBiLcL20.12 FS» - содержание нитратов 0,028±0,001 мг/кг, содержание фитатов 1,13±0,01, %, количество щавелевой кислоты 0,009±0,0002%, содержание танинов 0,091±0,001 %;

«AiBiLCL20.11 T2» - содержание нитратов 0,022±0,001 мг/кг, содержание фитатов 0,41±0,01, %, количество щавелевой кислоты 0,009±0,0002%, содержание танинов 0,075±0,001 %;

Установлено, что максимальное снижение антипитательных веществ в процессе силосования амаранта обеспечивала закваска AiBiLcL20.11 T2 в количестве 7·109 КОЕ/кг силосуемой массы. Её применение, способствовало снижению в силосе, через два месяца, щавелевой кислоты и нитратов в 2 раза, фитатов в 3 раза, а танинов на 25 %;

**Список литературы:**

1. Высочина Г.И. Амарант: Химический состав и перспективы использования/Химия растительного сырья. -2013.-№2.-с.5-1

2. Офицеров Е.Н. Использование амаранта в решении проблемы гипокальциемии. Бутлеровские сообщения. 2005. Т.6. №2. С. 55-66.

3. Чернышев Н.И., Панин И.Г., Шумский Н.И., Гречишников В.В. Антипитательные факторы кормов. Справочная книга. — Воронеж, ОАО «Воронежская областная типография». — 2013. — 206с

4. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine chelate, phy-tates and polyphenols / Layrisse M., García-Casal M. et al. // The Journal of nutrition.2000 (Sep.). № 130 (9). P. 2195-2199.

## ANTIBIOTIC RESISTANCE PATTERNS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI, SALMONELLA ISOLATED FROM MEAT PRODUCTS

**Ashraf Ayyal Mutar Alrashedi, Kamal Mathlum Al-khafaji, Abdulamir A.Alzahid**

***Department Medical Laboratory Technical, Alsafwa University College, Karbala, Iraq***
***Email: Dr.ashraf@alsafwa.edu.iq***

ABSTRACT

This study was aimed at assessing the types of bacterial isolates. Food-borne pathogens are a major cause of illnesses and expenses. Their occurrence in meat and other food is considered a global health problem. The burden of food-borne disease is increasing due to antimicrobial resistance which represents a greater risk of treatment failure. However, very little is known about the antibiotic resistance profile of food-borne pathogens in karbala city. This study was conducted to examine the antibiotic resistance profile of common food-borne bacterial pathogens isolated from raw meat sold in Karbala city. A total of 100 between November 2019 to February 2020 meat samples were collected from the market and analyzed.

Keywords: Staphylococcus, Salmonella, E.coli, PCR, raw meats, Antibiotic resistance.

INTRODUCTION

Raw meat and meat products are considered as an excellent source of high quality animal protein, vitamins especially B complex, and certain minerals, especially iron.[(1)]The microbiological quality of these items is determined by a variety of influences, including the nature of the raw materials used, the effectiveness of the cooking procedure, the cleanliness of the environment, and personal hygiene. When low-quality meat is used and/or the food is undercooked, complications may occur[2]. Intrinsic influences, such as moisture content, pH, nutritive value, and the absence of inhibitors or inhibitory substances to micro-organism growth, also influence microbial growth in both raw meat and meat products. Temperature, relative humidity, oxygen supply, and other extrinsic factors such as chemical and physical properties are also examples of extrinsic factors[3].

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples: A total of 100 random samples from raw meat were purchased from different butcher shops in Karbala city between November 2019 to February 2020 for the isolation and identification of microbial pathogens. Swabbing in a template of 5 cm x 10 cm region of carcasses was done with sterile cotton tipped swabs and soaked in buffered peptone water. Swab for culture should be directly put in its cover and transformed in the laboratory within a half hour of taking. The swab was inoculated onto culture media and incubated for 24 hours at 37°C.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of this study after doing culturing and identification showed anEscherichia coli is most Gram-negative found on meat samples about(45 samples) with percentage 45% from all samples and this results agree with[3] and[2] as well as[3] were found the Escherichia coli as following

40%,50% and 31% respectively. Also the results showed about (30 samples) with percentage 30% from samples contaminated with Gram-positive bacteria (Staphylococcus) these results agree with[4] and[(1)] were found that Staphylococcus contamination about 29% and 28% , respectively. Contamination with any of these microorganisms may take place throughout handling as well as preparation, or as a result of post-processing contamination, or they may be left unrefrigerated over many hours, and during that time Staphylococcus multiplies and occasionally produces enterotoxin .[4]This study showed the Salmonella also found and occupied 5.83%, this organism that have several roles in contaminations and cases diseases, also it was agreement with[3,4] and[4]. they are 19% (24 samples) of samples were non growth because several factors such as the handling was improper, improper dilutions, defect in incubation conditions and other environmental factors.

**REFERENCES:**


1. Eman M. Jarallah, SeaabImad Sahib & Khalid Yassen. Isolation and Identification of some pathogenic Bacterial Species Contaminated from Meats in Butchers Shops and KebabRestaurants in ALKut city. Euphrates Journal of Agriculture Science-6 (4): 30-37 , (2014)
2. NematiM,Ghorbanpourh, razavieh s & Hoseini m. .Chemical composition and microbiological quality of the bonab kebabs sold in tabriz market. Journal of food safety 28 (2008).
3. Moshood A. Yusuf, Tengku Haziyamin Abdul Tengku Abdul Hamid & Ibrahim Hussain. Isolation and Identification of Bacteria Associated with Balangu Sold in Bauchi. Nigeria. IOSR Journal of Pharmacy. Vol. 2, Issue 6, Nov-Dec. 2012 PP. 38-48 4. Agbodaze d, nmai p, Robertson f, Yeboah-manu d, Owusu- darkok. & addo k. Microbiological quality of “khebab” consumed in the accra metropolis, ghana medical journal. 2005 volume 39, number 2 Maryland, 2000, 60-89.
4. Agbodaze d, nmai p, Robertson f, Yeboah-manu d, Owusu-darkok. & addo k. Microbiological quality of “khebab” consumed in the accra metropolis, ghana medical journal. 2005 volume 39, number 2


## DISTRIBUTION OF HEPATITIS E VIRUS GENOTYPES FROM HUMAN AND ANIMAL RESERVOIRS


***Ahmed M. El-Adly*** [1;2]

**[1] Botany and Microbiology Department, Faculty of Science, Al-Azhar University, Assiut, Egypt**

**[2] Microbiology and immunology Department, Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy. E-mail: ahmedeladly.ast@azhar.edu.eg**


Hepatitis E virus (HEV) belongs to the genus *Hepevirus* in the family *Hepeviridae*. HEV is a small, icosahedral, spherical particle of 27-34 nm, non-enveloped virus with a single-stranded, positive sense RNA genome of approximately 7.2 kb containing three open reading frames (ORFs), ORF1, ORF2 and ORF3, where ORF3 partially overlaps ORF2. HEV is distributed all around the world, and classified into four genotypes and at least two putative new genotypes belong to only one serotype that can infect mammals, named after the place of isolation of the reference strains. Two of the genotypes contain strains which infect only humans (HEV-1 "Burma", HEV-2 "Mexico"); the other two genotypes (HEV-3 "USA", HEV-4 "China") contain viruses isolated from both human and animal samples. HEV has been genetically identified from rat, wild boar, domestic swine, mongoose, rabbits, chickens, ferrets, cutthroat trout, bats, and deer. HEV is considered hyperendemic in many developing countries of prevalence high 25 %, acute hepatitis cases which transmitted by the fecal-oral route and associated with contamination of drinking water by HEV genotypes 1 and 2. While, HEV is considered endemic in industrialized countries, where there is a prevalence of HEV less than 25% acute hepatitis cases. Zoonotic

transmission of HEV occurs either by consumption of contaminated meat and meat products or by contact with infected animals. There are at least three main approaches to the future control of HEV infection. These are sanitation, immunoprophylaxis, and vaccination measures. This review summarize the published data on distrubution, characterization and route of transmission of hepatitis E virus genotypes between human and animal species.

**Keywords:** Genotype; HEV; Hyperendemic; Zoonotic transmission.

**References:**

1. Abravanel F., Lhomme S., El Costa H., Schvartz B., Peronm J.M., Kamar N. and Izopet J. Rabbit hepatitis E virus infections in humans, France. Emerging Infectious Diseases. 2017. 23: 1191–1193.

2. Balayan M.S. Andjaparidze A.G. Savinskaya S.S. Ketiladze E.S. Braginsky D.N. Savinov, A.P. and Poleschuk, V.F. Evidence for a virus in Non-A, Non-B hepatitis transmitted via faecal-oral route. Intervirology. 1983. 20: 23-31.

3. Di Bartolo I. De Sabato L. and Marata A. Serological survey of hepatitis E virus infection in farmed and pet rabbits in Italy. Arch Virol. 2016.161:1343-1346.

4. Faber M. Willrich N. Schemmerer M. Rauh C. Kuhnert, R. Stark K. and Wenzel J.J. Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. Journal of Viral Hepatitis. 2018. 25: 752–758.

5. Geng Y. Zhao C. and Geng K. High seroprevalence of hepatitis E virus in rabbit slaughterhouse workers. Transbound Emerg Dis.2019. 66:1085–1089.

6. Huang F.F. Haqshenas G. Guenette D.K. Halbur P.G. Schommer S.K. Pierson F.W. Toth T.E. and Meng X.J. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. J Clin Microbiol. 2002. 40: 1326–1332.

7. Izopet J. Dubois, M. and Bertagnoli, S. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. Emerg Infect Dis. 2012. 18:1274-1281.

8. Kwon H. Sung H. and Meng X.J. Serological prevalence, genetic identification, and characterization of the first strains of avian hepatitis E virus from chickens in Korea. Virus Genes.2012. 45: 237–245.

9. Lee G.H. Tan B.H. Teo E.C. Lim S.G. Dan Y.Y. Wee A. Aw P.P. Zhu Y. Hibberd M.L. and Tan, C.K. Chronic infection with camelid Hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk Gastroenterol. 2016. 150: 355-357.

10. Liu B. Chen Y. Sun Y. Nan Y. Li H. and Du T. Experimental infection of rabbit with swine-derived hepatitis E virus genotype 4. Vet Microbiol.2019. 229:168–75.

11. Meng X.J. Recent advances in hepatitis E virus. J Viral Hepat. 2010. 17:153–61.

12. Purdy M.A. Harrison T.J. Jameel S. Meng X.J. Okamoto H. and derVan Poel W.H. ICTV virus taxonomy profile: Hepeviridae. Journal of General Virology. 2017. 98: 2645–2646.

13. Saad M.D. Hussein H.A. Bashandy M.M. and Kamel H.H. and Earhart K.C. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. Infect Genet Evol. 2007. 7: 368–373.

14. Smith D.B. Purdy M.A. and Simmonds P. Genetic variability and the classification of hepatitis e virus. Journal of Virology. 2013. 87: 4161–4169.

15. Smith D.B. Simmonds P. Jameel S.; Emerson S.U. Harrison T.J. Meng X.J. Okamoto H. Van der Poel, W.H.M. and Purdy, M.A. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. Journal of General Virology.2014. 95:2223–2232.

16. Takahashi M. Kusakai S. Mizuo H. Suzuki K. Fujimura K. Masuko K. Sugai Y. Aikawa T. Nishizawa, T. and Okamoto H. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. J. Clin. Microbiol.2005. 43 (1), 49–56.

17. Vasickova P. Psikal I. Kralik P. Widen, F. Hubalek, Z. and Pavlik, I. Hepatitis E virus: a review. Vet. Med. 2007. 52: 365-84.

18. Wang L. Zhang Y. Gong W. Song W.T. and Wang L. Hepatitis E virus in 3 types of laboratory animals, China, 2012–2015. Emerging Infectious Diseases. 2016. 22: 2157–2159.
19. Worm, H.C.; van der Poel, W.H.M. and Brandst-tter, G. Hepatitis E: an overview. Microbes Infect. 2002. 4: 657-66.
20. Xia J. Zeng H. and Liu L. Swine and rabbits are the main reservoirs of hepatitis E virus in China: detection of HEV RNA in feces of farmed and wild animals. Arch Virol. 2015. 160:2791-2798.

## РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ ПОДСОЛНЕЧНОГО ШРОТА

**Клишин А.А., Мальцева О.Ю.**

***Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (ФГБОУ ВО «ВГУИТ»), Воронеж 394036 E-mail: post@vsuet.ru***

В современном мире назначение продуктов питания состоит не только в удовлетворении голода и обеспечении питательными веществами, но и для профилактики, предотвращения или уменьшения развития различных заболеваний, для улучшения физического благополучия. Одним из таких продуктов являются пробиотические препараты. Традиционно считается, что пробиотики возможно получить, употребляя исключительно молочные продукты. Однако на сегодняшний день рынок пробиотических продуктов довольно разнообразен и является одной из быстрорастущих отраслей производства функциональных продуктов питания, т.к. в последние годы немолочные пробиотические продукты привлекают все больше внимания из-за потребительского спроса [1]. Это связано как с проблемами здоровья населения (аллергия на молоко, непереносимость лактозы, колебания содержания холестерина), так и если человек придерживается веганской диеты. Для того, чтобы смягчить недостатки пробиотиков на молочной основе, разрабатываются немолочные пробиотические продукты, включая пищевые матрицы из фруктов, овощей и злаков.

Наибольшей популярностью для получения немолочных продуктов являются различные соки (яблочные [2], абрикосовый [3] и т.д.), зерновые культуры (в основном бобовые [4]). Однако, из-за высокой стоимости таких субстратов проводят исследования с более дешевыми аналогами.

На кафедре Биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО ВГУИТ разрабатывается пробиотический препарат на основе подсолнечного шрота. Данный субстрат является дешевым ценным сырьем, успешно перерабатывается и применяется как кормовая добавка для животных.

Субстрат обрабатывается различными ферментными препаратами для уменьшения количества клетчатки и высвобождения простых углеводов, дополняется солями. Данное сырье достаточно бедно по своему белковому и аминокислотному составу, поэтому для его обогащения используются дрожжи р. *Saccharomyces*, р. *Pichia,* р.*Yarrowia.* В качестве пробиотических микроорганизмов применяются бактерии *Bacillus subtilis* и закваска молочнокислых бактерий *Streptococcus thermophilus.*

В результате наилучшие результаты показали препараты следующего состава: *Yarrowia lipolitica* и *S. thermophilus* – данная комбинация может быть пригодна для употребления животными; *Saccharomyces cerevisiae* и *B. subtilis* – данная комбинация потенциально может быть использована для употребления человеком.

**Список литературы:**

1. Aspri M., Papademas P., Tsaltas D. Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products // Fermentation. MDPI AG, 2020. Vol. 6, № 1. P. 30.

2. Li, Z.; Teng, J.; Lyu, Y.; Hu, X.; Zhao, Y.; Wang, M. Enhanced Antioxidant Activity for Apple Juice Fermented with Lactobacillus plantarum ATCC14917. *Molecules* 2019, *24*, 51.

3. Bujna, E.; Farkas, N.A.; Tran, A.M.; Sao Dam, M.; Nguyen, Q.D. Lactic acid fermentation of apricot juice by mono-and mixed cultures of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Food Sci. Biotechnol. 2018, 27, 547–554.

4. Świeca, Michał, et al. "Lactobacillus plantarum 299V improves the microbiological quality of legume sprouts and effectively survives in these carriers during cold storage and in vitro digestion." PLoS One 13.11 (2018): e0207793

## МЕТОД ОПОСРЕДОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ТИТРА ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА РВ-97 С ПРИМЕНЕНИЕМ ОТ-ПЦР-РВ В СЫРЬЕ ДЛЯ ВАКЦИНЫ

**Доронин М.И.[1], Мудрак Н.С.[1], Михалишин Д.В.[1]**

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

Бешенство (Rabies) занимает первоочередное место в ряду вирусных болезней человека и животных, является одним из высокоопасных зоонозов, вызывает поражение центральной нервной системы, энцефаломиелиты, параличи с неизбежным летальным исходом. Данное заболевание представляет собой мировую проблему, которой уделяют особое внимание международные организации (ВОЗ, МЭБ, ФАО, GARC) и ветеринарные службы многих стран мира. Система мер для борьбы с бешенством и его профилактики предусматривает иммунизацию домашних, сельскохозяйственных и диких плотоядных, а также контроль уровня напряженности поствакцинального иммунитета

При изготовлении аттенуированной антирабической вакцины вируссодержащую суспензию, полученную в перевиваемой суспензионной клеточной линии ВНК-21, исследуют на определение инфекционного титра вируса бешенства штамма РВ-97 для оценки его активности в клетках. В 1,0 мл суспензии вируса определяют количество клеточных культуральных инфекционных доз, вызывающих 50%-ное поражение клеток, что фактически отражает концентрацию полных вирусных частиц, содержащих РНК. В классическом варианте определения инфекционного титра вируса бешенства используют монослойную клеточную линию почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/2-17, с помощью которой вычисляют минимальную дозу вируса, способную вызвать лизис 50% клеток. Данный метод имеет некоторые ограничения: длительная процедура анализа (не менее 3 суток), определенная степень субъективности при оценке результатов исследования, высокая стоимость клеточной линии как тест-системы и затраты на ее поддержание, высокая вероятность риска контаминации культуры клеток.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке метода опосредованного определения инфекционного титра вируса бешенства производственного штамма РВ-97 методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

В сравнении с классическим методом предложенный подход отличается более высокой чувствительностью и специфичностью, является экономичным, позволяет одновременно исследовать несколько десятков проб неинактивированного вируссодержащего материала для производства вакцины, и сократить время постановки анализа до 3 часов.

В работе применяли культуральный вирус бешенства штамма РВ-97. Для разработки математической модели зависимости порогового цикла амплификации и инфекционного титра вируса подготавливали серию разведений положительного контроля вируса бешенства штамма РВ-97 со следующими титрами: $10^0$, $10^1$, $10^2$, $10^3$, $10^4$, $10^5$, $10^6$, $10^7$, $10^8$ ККИД$_{50}$/мл. В качестве отрицательного контроля применяли суспензию клеток ВНК-21, не зараженную вирусом бешенства.

Проводили выделение РНК жидкофазным фенольно-хлорофомным методом. Для постановки обратной транскрипции применяли MMLV-ревертазу (5 е.а.). Осуществляли ПЦР-РВ с применением классического набора компонентов. Для проведения теста применяли оригинальные олигонуклеотидные праймеры и зонд: Upstream-5'-NF-RV-97-quant-праймер (5'-GTTATGTCACCACCACGTTCAA-3'), Downstream-5'-NR-RV-97-quant-праймер (5'-GACTCTTCATATCTGGGATCA-3'),5'-NP-RV-97-quant-Cy5/BHQ3-зонд (5'-Cy5-GCATGTAGAGCCGCATACAA-BHQ3-3').

Последовательности разработанных олигонуклеотидных праймеров и зонда проверили на наличие нежелательных совпадений с другими последовательностями нуклеиновых кислот с использованием Банка данных последовательности нуклеиновых кислот вируса бешенства. Последовательности праймеров и зонда также проанализировали на наличие внутренних вторичных структур с помощью программы сворачивания нуклеиновых кислот с помощью программы Mfold. Выявлено, что для разработанных олигонуклеотидов нежелательных совпадений с другими последовательностями нуклеиновых кислот, а также наличия внутренних вторичных структур не обнаружено. Для анализа каждого разведения культурального вируса бешенства проводили 30 повторностей для получения результатов с высокой достоверностью. Определяли величину порогового цикла амплификации, обратно пропорциональную количеству копий РНК вируса и, соответственно, содержанию вирионов, вызывающих цитопатическое действие в клетках животных.

По итогам анализа получили выборки параллельно установленных значений инфекционного титра и пороговых циклов амплификации. На основе этих данных была выявлена математическая зависимость двух величин в виде логарифмической функции: $T_{ВБ\ РВ\text{-}97} = 10^{(-0,3012 \cdot Ct\ +10,2040)}$, где $T_{ВБ\ РВ\text{-}97}$ – инфекционный титр вируса бешенства штамма РВ-97, $C_t$ – пороговый цикл амплификации. Эффективность реакции амплификации составила 99,99%, достоверность аппроксимации – 0,9927, что соответствовало общепринятым требованиям, предъявляемым к молекулярно-биологическим тест-системам.

Диагностическая чувствительность (DSe) разработанной тест-системы составила 99,74% (в 95%-ном доверительном интервале: 98,58-99,99%), диагностическая специфичность (DSp) – 100% (в 95%-ном доверительном интервале: 98,17-100%), k-критерий (индекс Каппа Коэна) – 0,996, прогностичность положительного результата (PPV) – 100%, прогностичность отрицательного результата (NPV) – 99,50% (в 95%-ном доверительном интервале: 98,58-99,93%), диагностическая точность (DAc) – 99,83% (в 95%-ном доверительном интервале: 99,06-100,00%) (n=388).

Таким образом, разработан высокочувствительный, специфичный и точный метод опосредованного определения инфекционного титра культурального вируса бешенства штамма РВ-97 в сырье для вакцины с применением ОТ-ПЦР-РВ, который может быть вспомогательным к основному методу исследования качества вакцинного материала.

## SSR-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* НА ТЕРРИТОРИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2018-2020 ГГ.

**Чижик В.К., Соколова Е.А.**

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

Фитофтороз, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans*, является одним из важнейших заболеваний картофеля. Актуальным для борьбы с фитофторозом является применение биологических методов, таких как мониторинг популяций патогена и создание новых устойчивых сортов. Для мониторинга применяются различные молекулярные маркеры, в том числе SSR маркеры, которые являются нейтральными к отбору. Для типирования *P. infestans* традиционно используют набор из 12 SSR маркеров (Li et al., 2013), позволяющий сравнивать популяции патогена, собранные в разных точках мира.

Задачей исследования было изучить полиморфизм патогена *P. infestans* на основе 12 SSR маркеров на одной площадке в течение 3-х лет.

В качестве материала для исследования были отобраны образцы *P. infestans*, собранные с сортов и межвидовых гибридов картофеля на поле ВНИИФ (ОПИ «Раменка») в августе 2018, 2019 и 2020 гг.

Нами были получены данные о полиморфизме популяций в течение 2018-2020гг, выявлены доминирующие клональные линии и показано, что популяции на территории Московской области обладают большим полиморфизмом, и каждый год происходит смена доминирующей клональной линии *P. infestans*.

**Список литературы:**

Li, Y. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans* / Y. Li, D.E.L. Cooke, E. Jacobsen,T. van der Lee. // Journal of microbiological methods. – 2013. – №92(3). – P. 316-322

## ПОСТУПЛЕНИЕ САХАРОЗЫ В КЛЕТКИ ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЕ ПРОГРАММЫ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КАМБИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ У БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ

**Серкова А.А., Тарелкина Т.В., Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., Софронова И.Н., Иванова Д.С., Семенова Л.И.**

***Институт леса - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук". Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия, 185910. SerkovaAleksandra1996@yandex.ru***

В настоящее время растворимые сахара рассматриваются не только как метаболиты, но и как сигнальные молекулы, участвующие в регуляции морфогенеза клеток и тканей. Ранее на древесных растениях было показано, что повышенное содержание сахаров в тканях может влиять на экспрессию большого числа генов [1–4]. Метод кольцевания ствола широко используется для изучения особенностей морфогенеза проводящих тканей в условиях различной концентрации сахаров в тканях. В результате кольцевания на участке ствола, расположенном выше кольца, накапливаются сахара, при этом в зоне, расположенной непосредственно над кольцом, накопление фотоассимилятов происходит наиболее интенсивно [5]. Мы провели эксперимент с кольцеванием стволов березы повислой (*Betula pendula* Roth) с целью изучения особенностей ксило- и флоэмогенеза данного вида в условиях поступления избытка фотоассимилятов к клеткам камбиальной зоны.

Были отобраны 32 дерева березы, произраставших в одинаковых почвенно-климатических условиях на опытном участке Института леса КарНЦ РАН в 2 км к югу от

г. Петрозаводск. Были выбраны деревья, близкие по возрасту (19-22 года), высоте (10±0,5 м) и диаметру ствола на высоте 1,3 м (10±0,2 см). Все деревья имели хорошо развитую крону и не имели видимых повреждений. 19 июня 2017 г. на стволах 20 деревьев березы было выполнено кольцевание. На высоте 1,3 м острым ножом удаляли кольцо тканей коры шириной 5 см вплоть до зоны формирующейся ксилемы. 12 деревьев были помечены как контрольные, на их стволах были выполнены неглубокие проколы тканей коры с целью маркировки начала эксперимента. Образцы тканей ствола отбирали через 10 дней после кольцевания и после окончания вегетационного периода (октябрь). Отбор тканей проводили на 2 уровнях: на 1 и 35 см выше верхней границы кольца (зоны ВК1 и ВК35 соответственно). На контрольных деревьях образцы отбирали на высоте, соответствовавшей уровням ВК1 и ВК35 у окольцованных деревьев. Фиксацию образцов и изготовление поперечных срезов тканей проводили по общепринятым методикам. Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica.

Основной транспортной формой фотоассимилятов у березы повислой является сахароза [6]. У окольцованных деревьев большое количество избыточной сахарозы в зоне ВК1 вызвало остановку ксилогенеза и стимулировало флоэмогенез, в результате чего сформировались широкие приросты проводящей флоэмы (450 мкм). Умеренное повышение уровня сахарозы в зоне ВК35 также стимулировало флоэмогенез (ширина приростов проводящей флоэмы 213 мкм), однако остановки ксилогенеза мы не наблюдали (ширина прироста ксилемы 1600 мкм). У контрольных деревьев процессы флоэмо- и ксилогенеза протекали типично для вида, значения приростов флоэмы (65 и 68 мкм) и ксилемы (2502 и 2397 мкм) на уровнях ВК1 и ВК35 не отличались.

Также мы наблюдали существенное изменение в пропорциях различных типов клеток, слагающих проводящую флоэму березы. Соотношение ситовидных трубок к паренхиме у контрольных деревьев составило 57:43. У окольцованных – 9:91 и 38:62 в зонах ВК1 и ВК35 соответственно.

Наблюдаемой анатомической картине соответствовали изменения уровней экспрессии генов через 10 дней после кольцевания. Во флоэме окольцованных деревьев активность гена *APL*, кодирующего транскрипционный фактор, участвующий в дифференциации элементов флоэмы, был в 2,18 (ВК1) и в 3 (ВК35) раза выше по сравнению с контрольными деревьями. Уровень экспрессии гена *Suc*, кодирующего трансмембранный переносчик сахарозы, был выше в зонах ВК1 и ВК35 в 2,24 и 2,51 раз соответственно по сравнению с контролем, что указывает на активную загрузку сахарозы в клетки и коррелирует с объемом живых паренхимных клеток. Кольцевание также вызвало прерывание нисходящего полярного транспорта ауксина. Уровень экспрессии гена *PIN1*, кодирующего транспортер ауксина, был наиболее высоким в зоне ВК35, где он был в 2,1 раз выше по сравнению с контролем. В зоне ВК1 активность *PIN1* была в 1,7 раз ниже по сравнению с ВК35, что соответствует нарушению дифференциации ситовидных трубок флоэмы, для которой необходим ауксин.

Таким образом, значительное повышение уровня сахарозы в тканях ствола березы стимулировало флоэмогенез и угнетало ксилогенез, что согласуется с данными о более высокой чувствительности ксилемных производных камбия к уровню сахаров [7]. Активная загрузка сахаров в клетки и снижение полярного транспорта ауксина, по-видимому, послужили сигналом для изменения программы развития камбиальных производных в сторону активной дифференциации паренхимных клеток.

Исследование выполнялось в рамках Государственного задания Института леса КарНЦ РАН и гранта РФФИ (проект № 19-04-00622_а).

**Список литературы:**

1. Mao J. et al. Transcriptome analysis revealed glucose application affects plant hormone signal transduction pathway in “Red Globe” grape plantlets // Plant Growth Regul. 2018. Vol. 84, № 1. P. 45–56.

2. Tarelkina T.V. et al. Expression Analysis of Key Auxin Biosynthesis, Transport, and Metabolism Genes of *Betula pendula* with Special Emphasis on Figured Wood Formation in Karelian Birch // Plants. 2020. Vol. 9, № 11. P. 1406.

3. Novitskaya L.L. et al. The formation of structural abnormalities in Karelian birch wood is associated with auxin inactivation and disrupted basipetal auxin transport // J. Plant Growth Regul. 2020. Vol. 39. P. 378–394.

4. Barbier F. et al. Sucrose is an early modulator of the key hormonal mechanisms controlling bud outgrowth in *Rosa hybrida* // J. Exp. Bot. 2015. Vol. 66, № 9. P. 2569–2582.

5. De Schepper V. et al. Detailed analysis of double girdling effects on stem diameter variations and sap flow in young oak trees // Environ. Exp. Bot. 2010. Vol. 68, № 2. P. 149–156.

6. Колесниченко В.М. Динамика содержания и превращения ассимилятов у древесных растений: Автореф. дис.... канд. биол. наук. Воронеж: ВГУ, 1985. 22 р.

7. Krabel D. Influence of sucrose on cambial activity // Cell and Molecular Biology of Wood Formation / ed. Savidge R.A., Barnett J.R., Napier R. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 2000. P. 113–125.

## ПРИМЕНЕНИЕ СОЛЕЙ ТЕРПЕНОВЫХ КИСЛОТ ЖИВИЦЫ СОСНЫ СИБИРСКОЙ КЕДРОВОЙ В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА СЕЛЬСКОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

**Никитин Е.Н., Шаронова Н.Л., Теренжев Д.А., Белов Т.Г., Шуматбаев Г.Г., Рахмаева А.М., Крупин Е.О.**

***Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Российская Федерация,420111, Российская Федерация, Татарстан, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я 261Казань 420111***

В связи с интенсификацией сельскохозяйственного производства крайне остро стоит проблема повышения урожайности и качества продукции растениеводства. Использование регуляторов роста способствует реализации генетического потенциала растений, повышению устойчивости к факторам окружающей среды, фитопатогенным микроорганизмам, росту урожайности и улучшению качества продукции. В условиях экологизации сельского хозяйства предъявляются особые требования к ассортименту применяемых препаратов, наблюдается повышенный интерес к природным веществам, экстрагируемым из растений, в качестве эффективной альтернативы промышленно синтезированным химическим веществам [1]. Высшие растения способны синтезировать и накапливать широкий спектр веществ специализированного обмена – вторичные метаболиты, которые активно используются в различных отраслях промышленности [2]. Вторичные метаболиты растений в большинстве случаев выступают в качестве протекторов в отношении патогенных микроорганизмов, животных-вредителей, химических препаратов [3]. По некоторым оценкам к концу 2023 г объем мирового рынка растительного сырья составит 111 миллиардов долларов, совокупный годовой темп роста за 2017-2023 гг. ~ 7,2% [4]. В связи с этим актуальной задачей является поиск соединений растительного происхождения для создания новых экологически безопасных и эффективных препаратов.

В качестве регуляторов роста растений исследовали соли терпеновых кислот живицы сосны сибирской кедровой (Алтайский край, Российская Федерация). Соли получали по методике [5]. Полевые эксперименты проводили на базе Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» Республике Татарстан (Российская Федерация), а также в производственных опытах на

территории ООО «Ягодная долина» (с. Ямаш, Альметьевский район, Республика Татарстан).

В качестве объектов были исследованы картофель сорт Жуковский ранний, озимая пшеница сорт Казанская 560 и земляника садовая *сорт Мармелада GL*.

*Предпосадочную обработку клубней картофеля* водными растворами солей терпеновых кислот проводили непосредственно перед посадкой на специальной установке барабанного типа в концентрации 10 г/л. Предпосевная обработка семян озимой пшеницы путем опрыскивания зерен с одновременным перемешиванием рабочим раствором в концентрации 0,1% при расходе 0,1 л/т семян. Некорневая обработка растений озимой пшеницы проводилась двукратно при концентрации рабочего раствора 0,01% из расчета 300 л/га. Некорневая обработка земляники садовой осуществлялась двукратно в фазу цветения и начала созревания плодов при концентрации рабочего раствора 10 г/л из расчета его расхода 500 мл на 1 га..

*Предпосадочная обработка клубней картофеля способствовала повышению его урожайности более чем на 20% по сравнению с контролем. Качество полученного урожая также улучшалось по показателям массовой доли сухих веществ и содержанию крахмала в клубнях.*

Предпосевная обработка семян озимой пшеницы оказывала стимулирующее влияние на полевую всхожесть семян. Предпосевная обработка и однократная осенняя некорневая обработка проростков способствовала увеличению содержания сахаров до 9%. Во всех вариантах обработки получен прирост урожайности зерна по сравнению с контролем. При этом показатель крупности зерна варьировал в диапазоне 36-38 г с наибольшими значениями в случае предпосевной обработки.

В производственных опытах установлена эффективность применения солей терпеновых кислот живицы сосны сибирской на количественные и качественные показатели урожая при некорневой обработке земляники садовой. Хозяйственная урожайность земляники садовой составила 27-30 т/га. Наибольшие показатели урожайности были зафиксированы при некорневой обработке растений препаратами на основе живицы. Также установлено увеличение массы 100 ягод по сравнению с контролем. Некорневые обработки растений земляники садовой солями живицы способствовали повышению содержания суммы сахаров, а также пектина в ягодах.

Таким образом, в полевых и производственных экспериментах при выращивании различных сельскохозяйственных культур установлена эффективность обработок посевного материала и некорневых обработок растений в процессе вегетации в отношении урожайности и качества полученной продукции по комплексу показателей.

**Списоклитературы:**

1. Sharonova N., Nikitin E., Terenzhev D., Lyubina A., Amerhanova S., Bushmeleva K., Rakhmaeva A., Fitsev I., Sinyashin K. Comparative assessment of the phytochemical composition and biological activity of extracts of flowering plants of *Centaurea cyanus* L., *Centaurea jacea* L. and *Centaurea scabiosa* L. *2021. 10:*279. DOI:10.3390/plants10071279

2. Dhyani R., Srivastava S.K., Shankar K., Ghosh T., Beniwal A., Navani N.K. A chemical genetic approach using genetically encoded reporters to detect and assess the toxicity of plant secondary metabolites against bacterial pathogens. 2021.418:126399. DOI:10.1016/j.jhazmat.2021.126399

3. Vanisree M., Lee C.-Y., Lo S.-F., Nalawade S.M., Lin C.Y. Tsay H.-S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures.2004. 45:1-22.

4. Elghandour M.M.M.Y., Reddy P.R.K., Salem A.Z.M., Reddy P.P.R., Hyder I., Barbabosa-Pliego A., Yasaswini D. Plant bioactives and extracts as feed additives in horse nutrition. 2018. 69:66-77. DOI:10.1016/j.jevs.2018.06.004

5. Terenzhev D., Sharonova N., Ermakova A., Gumerova S., Bushmeleva K., Lyubina A., Nikitin E., Belov T. Potassium salts of terpene acids of *Siberian pine* resin as an effective drug in

the cultivation of potatoes in the conditions of organic farming.2020. 32(9):2329-2334. DOI:10.14233/ajchem.2020.22843

# ДЕЙСТВИЕ МЕТИЛЖАСМОНАТА НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА, ПОДВЕРГНУТЫХ НИЗКОТЕМПЕРАТРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

**Игнатенко А.А., Репкина Н.С., Таланова В.В., Титов А.Ф.**

***Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск 185035***
***E-mail: angelina911@ya.ru***

Жасмоновую кислоту и ее производные, в частности метилжасмонат (МЖ), относят к регуляторам роста и развития растений (Васюкова, Озерецковская, 2009). К настоящему времени известно их участие в регуляции цветения, созревания плодов, формирования луковиц, клубней, роста корней и движения листьев, запуске программы старения (Wasternack, Song, 2017; Per et al., 2018). В последние годы обнаружено положительное влияние жасмонатов на устойчивость растений к действию абиотических факторов, включая низкие температуры (Wang et al., 2020). Однако такие работы единичны. В связи с этим, целью работы было изучение действия МЖ на ответную реакцию растений огурца, подвергнутых низкотемпературным воздействиям разной интенсивности.

Опыты проводили на растениях *Cucumis sativus* L. гибрида F1 Зозуля, которые по достижении недельного возраста помещали на раствор МЖ (1 мкМ) и через 1 сут подвергали действию низкой закаливающей (12ºС) или повреждающей (4ºС) температуры. О холодоустойчивости судили по изменению выхода электролитов из семядольных листьев с использованием кондуктометра. Уровень перекисного окисления липидов оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА), уровень пролина определяли с помощью нингидринового реактива, а активность антиоксидантных ферментов – спектрофотометрически. Накопление транскриптов генов изучали методом ПЦР в режиме реального времени.

В результате проведенных исследований было установлено, что МЖ оказывает защитное действие на растения огурца, подвергнутые действию низких температур (12°С и 4°С), которое проявлялось в существенном снижении выхода электролитов из семядольных листьев. Показано также, что МЖ способствует поддержанию ростовых процессов: под его влиянием длина и площадь семядольных листьев растений снижались в меньшей степени, чем в вариантах с низкими температурами, но без МЖ.

Действие низких температур приводило к повышению в листьях растений огурца уровня окислительного стресса, о котором мы судили по накоплению МДА. Как оказалось, у проростков, предобработанных МЖ, содержание МЖ было ниже, чем у контрольных растений (без обработки) в течение всего периода охлаждения.

Один из защитных механизмов, который вызывает повышение устойчивости растений к низким температурам под влиянием фитогормонов, связан с их способностью регулировать работу антиоксидантной системы (АОС). Изучение влияния МЖ на активность ряда антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и гваякол-специфичной пероксидазы (ГПО) в листьях огурца позволило установить, что МЖ повышает активность ферментов ещё до начала охлаждения (при 22°С). При действии низкой закаливающей (12°С) и повреждающей (4°С) температур активность СОД, КАТ и ГПО в листьях огурца существенно превышала таковую в контрольном варианте.

Кроме того, было обнаружено, что в условиях низкотемпературного стресса МЖ усиливает экспрессию генов, кодирующих антиоксидантные ферменты – *Cu/ZnSOD*, *MnSOD* и *CAT*.

Анализ содержания одного из низкомолекулярных соединений – свободного пролина в листьях огурца показал, что его уровень под влиянием МЖ повышался еще до начала действия низких температур (при 22°С). В течение всего периода действия низких температур (12°С и 4°С) в листьях растений, обработанных МЖ, был обнаружен более высокий уровень пролина, чем в листьях контрольных проростков.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что предобработка растений огурца МЖ вызывает активизацию защитно-приспособительных механизмов. Последнее находит свое выражение в меньшем торможении ростовых процессов под влиянием низких температур, усилении работы компонентов АОС (увеличении активности антиоксидантых ферментов и содержания низкомолекулярных защитных соединений) и снижении уровня окислительного стресса. Это, в конечном итоге, способствует формированию повышенной устойчивости растений огурца в условиях действия низкой закаливающей температуры и частично нивелирует негативное действие на них повреждающей температуры.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема № 0218-2019-0074).

**Список литературы:**

1. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Жасмонатзависимая защитная сигнализация в тканях растений. 2009. 56:643–653.

2. Per T.S., Khanb M.I.R., Anjuma N.A., Masooda A., Hussaina S.J., Khana N.A. Jasmonates in plants under abiotic stresses: Crosstalk with other phytohormones matters. 2018. 145:104–120. DOI 10.1016/j.envexpbot.2017.11.004

3. Wang J., Song L., Gong X., Xu J., Li M. Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress // 2020. 21:1446. DOI 10.3390/ijms21041446

4. Wasternack C., Song S. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by protein activating and repressing transcription. 2017. 68:1303–1321. DOI 10.1093/jxb/erw443

## ВЛИЯНИЕ УФ-Б НА ПРОРАСТАНИЕ ПЫЛЬЦЫ И РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК Petunia hybrida L.

**Зинкевич В.В., Захарова Е.В.**

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

Уровень УФ-В, достигающий поверхности Земли увеличивается из-за антропогенного воздействия. В связи с этим исследование механизмов действия УФ на физиологические процессы, в частности, на опыление сельскохозяйственных и дикорастущих растений, приобретает большое значение.

Основная задача нашего исследования заключалась в установлении эффекта действия УФ-В на прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок (ПТ) петунии – объекта исследования регуляторных механизмов прогамной фазы оплодотворения.

Исследования выполнены с использованием растений петунии из лабораторной коллекции, которые выращивали в условиях оранжереи при естественном освещении. Для работы брали по 2 мг пыльцы каждого образца, помещали в чашку Петри диаметром 4 см. Для исключения экранирования кисточкой наносили пыльцу в чашку Петри, разбивали в монослой, закрывали пленкой, облучали УФ-В, заливали 2 мл среды, содержащей сахарозу (0.4М) и борную кислоту (1.6мМ), и культивировали 3 ч в термостате при 25 $^0$С.

В ходе эксперимента установлено, что по мере увеличения экспозиции (5- 45 мин), наблюдается постепенное угнетение прорастания пыльцы и роста ПТ. Летальным для пыльцы петунии является УФ-В облучение лампой интенсивностью 5 Вт/м$^2$ в течение 45 мин.

## ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ПЕСТИКОВ ИНГИБИТОРОМ КАСПАЗО-ПОДОБНОЙ ПРОТЕАЗЫ (AC-DEVD-CHO) НА РОСТ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ (*Petunia hybrida* L.)

**Соболев Д.С., Демьянчук И.С., Захарова Е.В.**

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

*Petunia hybrida* L. является классическим объектом для изучения явления самонесовместимости. Для нее характерна самонесовместимость S-РНКазного типа. При совместимом опылении пыльцевые трубки растут по проводниковым тканям пестика и достигают завязи через 30 часов после опыления, далее происходит оплодотворение и, в конечном итоге, завязывание семян. При самонесовместимом опылении рост пыльцевых трубок прекращается через 8 часов после опыления на уровне примерно 8 мм от поверхности рыльца. Остановка роста самонесовместимых пыльцевых трубок происходит при повышении уровня активности каспазо-подобных протеаз в первые часы опыления и к моменту остановки роста пыльцевых трубок наблюдаются все признаки программируемой клеточной смерти (Kovaleva et al., 2020).

Согласно плану обработки на рыльце цветка наносили 5 мкл ингибирующего раствора с разной концентрацией Ac-DEVD-CHO (0.25, 0.5, 1 и 1,99 mM) за 2 часа до опыления, через 2 часа после опыления и в одновременно с опылением. Контролем в

данном опыте служили неопыленные цветки, на рыльца пестиков которых наносили каплю дистиллированной воды. Сбор и фиксацию материала (опыленных пестиков) производили через 2, 4, 6 и 24 часа после опыления.

Визуализация растущих в тканях пестика пыльцевых трубок петунии, с окрашиванием анилиновым голубым и флуоресцентной микроскопией, показала, что после перекрестного совместимого опыления и самонесовместимого опыления почти все пыльцевые зерна прорастают, а пыльцевые трубки растут в рыльце и в тканях столбика. В совместимом варианте длина пыльцевых трубок после 24 часов опыления равнялась 17322±266 мкм и составляла 80,95% от длины всего пестика, при самонесовместимом опылении пыльцевые трубки достигали длины 8123±344 мкм, что составляло 31,97% от всей длины пестика.

Наиболее интересные результаты получены при обработке ингибитором каспаз Ac-DEVD-CHO в концентрации 0,25 mM. Во всех вариантах обработок (за 2 часа до опыления, одновременно с опылением, через 2 часа после опыления) длина самонесовместимых пыльцевых трубок увеличивалась до уровня совместимых, а на рост совместимых пыльцевых трубок данная обработка практически не оказывала влияния. Во всех вариантах совместимого опыления завязались семена.

**Список литературы:**

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

## ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ТОМАТА ДИКОГО ВИДА *SOLANUM PENNELLII COR*.

**Тукусер Я.П., Байков А.А., Романова О.В., Домблидес Е.А., Гинс М.С.**

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

Настоящее исследование было направлено изучению влияния спектров света на физиологические процессы у томата дикого вида (*Solanum pennellii Cor*.). В селекции дикорастущие формы используют для передачи полезных признаков, в частности устойчивость к вредителям и болезням, физиологические свойства – повышенную холодостойкость, засухоустойчивость (Atarés et al., 2011). Качество света (спектральный состав), количество (поток фотонов плотность) и продолжительность (фотопериод) имеют большое значение при изучении морфогенеза растений. Свет - это источник энергии для фотосинтеза. Качество света (спектральный состав), количество (поток фотонов плотность) и продолжительность (фотопериод) имеют большое значение при изучении морфогенеза растений. Он контролирует многие аспекты развития растений, а также оказывает сильное влияние на рост и развитие растений. Вент (1957) описал эксперимент, проверявший влияние спектрального качества на томатах (*Lycopersicon esculentum*). Данные показывают, что проростки, выращенные в условиях низкой интенсивности плотности энергии красного и синего света, обладают более развитыми вегетативными тканями, чем те, которые были выращены при той же плотности потока энергии белого света (преимущественно красный, синий и зеленый свет) (Folta, Maruhnich, 2007).

Лиу (2018) исследовали фотосинтез и развитие листьев проростков томатов черри *(Solanum lycopersicum var. Cerasiforme),* выращенных при пяти различных комбинациях красного и синего света, обеспечиваемого светодиодами. Данное исследование показало,

что свежая биомасса значительно увеличилась при обработке с процентным содержанием синего света 50, 60 и 75%, при этом 50% проростков, выращенных в синем свете, накапливают значительно больше сухой массы. Сеянцы, выращенные на 25% в синем свете, были явно слабее, чем при других обработках светодиодами. Увеличение чистой скорости фотосинтеза при воздействии синего света (25–60%) было связано с увеличением массы листа на единицу площади листа, плотности листа, числа устьиц, развития клеток хлоропластов и мезофилла, а также содержания хлорофилла.

В эксперименте использовали селекционный образец томата дикого вида (*Solanum pennellii Cor.*) из коллекции лаборатории пасленовых культур ФГБНУ ФНЦО. Растения томата были выращены по технологии *in vitro* с использованием техники клонального микроразмножения. Методом черенкования верхушки растения томата были перенесены на питательную среду Ms +$B_5$ (в соотношении 1:1) без добавления гормонов роста растений (Murashige Skoog, 1962; Gamborg, Eveleigh, 1968).

Стеклянные банки с растениями помещали в установку «ФОТОН» (Россия) в камеры с освещением разного спектрального состава 1 режим (499,49 ммоль·м-2·с-1 из них белый дневной – 207,69 ммоль·м-2·с-1; синий - 76,05 ммоль·м-2·с-1; красный - 64,24 ммоль·м-2·с-1; дальний красный - 151,51 ммоль·м-2·с-1); 2 режим (315,00 ммоль·м-2·с-1 из них синий - 169,00 ммоль·м-2·с-1; красный - 146,00 ммоль·м-2·с-1); 3 режим (511,54 ммоль·м-2·с-1 из них белый дневной – 258,00 ммоль·м-2·с-1; красный - 144,54 ммоль·м-2·с-1; дальний красный – 109,00 ммоль·м-2·с-1) при фотопериоде свет: темнота – 14:10 часов. Контроль выращивали на стеллажах с люминесцентными лампами (OSRAM LUMILUX L36W/865) со спектром белого света при фотопериоде свет: темнота – 16:8 часов.

Спектры света с заданными интенсивностями в различных диапазонах с изменением освещения во времени позволяют проводить сложные эксперименты по физиологии и биохимии растений и получать результаты для направленного воздействия на конкретные культуры и фазы развития.

Различный спектральный состав света оказывал разное воздействие на развитие растений томата дикого вида (*Solanum pennellii Cor.*). При освещении с преобладанием белого дневного света (1 режим) длина стебля на 5 см была больше, чем в контроле, изменилась окраска растений томата на светло-зеленую. На 2 световом режиме длина стебля была меньше на 3 см по сравнению с контролем, окраска растений томата осталась неизменной. С использованием освещения с отсутствием спектра синего света (3 режим) длина стебля на 2 см была больше, чем в контроле, окраска растении томата изменилась с тёмно-зелёной на светло-зеленую. На всех трёх световых режимах наблюдали интенсивное корнеобразование и образование боковых побегов растений томата.

Изучение влияния спектрального состава света на растения томата дикого вида (*Solanum pennellii Cor.*) показало, что спектр белого дневного света с добавлением дальнего красного (режим 1 и 3) способствует увеличению длины стебля (на 3 - 5 см), но вызывает изменение естественной интенсивности окраски растений томата: с тёмно-зелёной на светло-зелёную. Отсутствие в спектре белого света и дальнего красного снижает интенсивность роста стебля (режим 2). Изменение спектрального состава света не влияет на образование корней и боковых побегов.

**Список литературы**

1. Atarés A. et al. An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species Solanum pennellii //Plant cell reports. – 2011. – Т. 30. – №. 10. – С. 1865-1879.

2. Casal JJ, Yanovsky MJ. Regulation of gene expression by light. International Journal of Developmental Biology 2005. 49: 501–511.

3. Chen M, Chory J, Fankhauser C. Light signal transduction in higher plants. Annual Review of Genetics 2004. 38: 87–117.

4. Devlin PF, Yanovsky MJ, Kay SA. A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. Plant Physiol. 2003. 133:1617–1629.

5. Folta K.M., Maruhnich S.A. Green light: a signal to slow down or stop. J. Exp. Bot., 2007, 58(12):. 3099–3111, doi:10.1093/jxb/erm130

6. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture metods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. Can. J. Biochem. 1968.46(5): 417-421.

7. Liu X. Y. et al. Photosynthesis and leaf development of cherry tomato seedlings under different LED-based blue and red photon flux ratios //Photosynthetica. – 2018. – Т. 56. – №. 4. – С. 1212-1217.

8. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum.1962;15:473–497.

9. Quail P.H. Phytochrome photosensory signalling networks. Nature Reviews Molecular and Cell Biology 2002.3:85–93.

10. Went F.W. The experimental control of plant growth. Waltham, MA: Chronica Botanica. 1957.

## ОБРАБОТКА ИНГИБИТОРОМ КАСПАЗО-ПОДОБНЫХ ПРОТЕАЗ (AC-DEVD-CHO) СНИМАЕТ ДЕГРАДАЦИЮ ДНК, ВЫЗВАННУЮ САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬЮ S-РНКАЗНОГО ТИПА У *Petunia hybrida L.* в ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

**Демьянчук И.С., Соболев Д.С., Захарова Е.В.**

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

В последние годы накоплено значительное количество доказательств указывающих на участие каспазо-подобных протеаз в программируемой смерти клеток (ПКГ) растений. В наших предыдущих исследованиях было показано, что ПКГ является фактором самонесовместимости S-РНКазного типа у *Petunia hybrida* L. Остановка роста самонесовместимых пыльцевых трубок происходит при повышении уровня активности каспазо-подобных протеаз в первые часы опыления и к моменту остановки роста пыльцевых трубок наблюдаются все признаки ПКС (нарушение целостности плазматической мембраны, деградация/фрагментация ДНК, разрушение внутренней структуры пыльцевой трубки: отсутствие вакуолей, нарушение тургора и отделение клеточной плазматической мембраны от клеточной стенки) (Zakharova et al., 2021).

В нашем эксперименте, согласно плану обработки на рыльце пестика наносилось 5 мкл ингибирующего раствора Ac-DEVD-CHO в разной концентрации (0.25, 0.5, 1 и 1,99 mM) за 2 часа до опыления, через 2 часа после опыления и одновременно с опылением. Контролем в данном опыте служили неопыленные цветки, на рыльца пестиков которых наносили каплю дистиллированной воды. Сбор и фиксацию материала (опыленных пестиков) жидким азотом производили через 2, 4, 6 и 24 часа после опыления.

Использование электрофоретического анализа в качестве метода разделения фрагментов ДНК позволило выявить наличие ДНК-деградации в образце через 6 часов после самонесовместимого опыления, в той же точке после совместимого опыления ДНК-деградация отсутствовала. Однако, в образцах, подвергнутых обработке ингибитором каспаз Ac-DEVD-CHO в концентрациях 1, 0,5, 0,25 mM ДНК-деградация отсутствует как после совместимого, так и самонесовместимого опылений.

**Список литературы:**

1. Zakharova, E. V., Timofeeva, G. V., Fateev, A. D., & Kovaleva, L. V. (2021). Caspase-like proteases and the phytohormone cytokinin as determinants of S-RNAse–based self-incompatibility–induced PCD in Petunia hybrida L. *Protoplasma*, *258*(3), 573-586.

# INFLUENCE OF DIFFERENT LAND CONFIGURATION AND PHOSPHORUS FERTILIZER APPLICATION ON GROWTH PARAMETERS AND YIELDS PERFORMANCE OF BLACK–EYED BEAN (*VIGNA UNGUICULATA* L.) IN SEMI-ARID REGION OF AFGHANISTAN

**Feroz babazoi[1] and Bashir Ahmad Babazoi[2]**

***Afghanistan National Agricultural Sciences and Technology University, Kandahar, Afghanistan***

A field experiment was carried out at the Afghanistan National Agricultural Sciences and Technology University (ANASTU), Kandahar, during the rainy (*kharif*) season (April, 30 – August, 5) of 2017, to study the influence of different land configuration and phosphorus fertilizer application on growth parameters and yields performance of black–eyed bean (*Vigna unguiculata* L.) in Kandahar, semi–arid region of Afghanistan. The treatments consisted of three land configuration treatments, viz. broadcast, line sown and raised bed planting method, allocated to main plots and four levels of phosphorus fertilization, viz. 0, 20, 40 and 60 kg $P_2O_5$/ha, in subplots. The experiment was conducted in a three-time replicated split plot. The result revealed that different land configuration significantly influenced growth parameters like plant height, leaf area, leaf area index, dry matter accumulation above–ground/plant, root dry weight/plant, number of nodules/plant at maximum flowering stage and tape root length/plant at maximum flowering stage, numerically higher magnitude of these growth parameters was observed under raised bed planting method. Moreover, raised bed planting method significantly recorded the highest plant height (53.5 cm), leaf area (494.0 $cm^2$), leaf area index (1.77), dry matter accumulation above–ground (41.4 g)/plant, root dry weight (2470.8 mg)/plant, number of nodules (2.39)/plant at maximum flowering stage and tape root length (25.0 cm) at maximum flowering stage, which finally resulted in significantly higher yield attributes, seed and stover yields. Owning to higher seed and stover yields were also higher with raised bed planning method. Among the phosphorus fertilizer application levels, application of 60 kg $P_2O_5$/ha, resulted in the highest values of all growth parameters, which led to significantly higher yield attributes, seed yield (2.18 t/ha) and stover yield (6.10 t/ha) compared to all other phosphorus levels.