



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»



Материалы международной научной конференции

«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ», посвященной 90-летию академика Л.К. Эрнста

24 сентября – 1 октября 2019 г.



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЖИВОТНОВОДСТВА –
ВИЖ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА»

Материалы международной научной конференции

**«Современные достижения и проблемы
генетики и биотехнологии в животноводстве»,
посвященной 90-летию академика Л.К. Эрнста**

Дубровицы – 2019

УДК 636.082.12+636:573.6

С 56

Современные достижения и проблемы генетики и биотехнологии в животноводстве: Материалы междунар. науч. конф., посвященной 90-летию академика Л.К. Эрнста / ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. – Дубровицы: ВИЖ, 2019. – 266 с.

Составители: Е.А. Гладырь, О.Ю. Осадчая, Е.Н. Делягина.

Оргкомитет конференции: Н.А. Зиновьева, О.Ю. Осадчая, Е.А. Гладырь, И.В. Гусев, А.В. Чинаров, Е.Н. Делягина.

Мероприятие проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 19-016-20024.

Компьютерная верстка: И.А. Науменко

Все статьи приведены в авторской редакции.

ISBN 978-5-902483-52-6

© ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2019 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ИЗУЧЕНИЕ ПОСТГЕНОМНОГО МИРА: РАЗЛИЧНЫЕ ОБЪЯСНИТЕЛЬНЫЕ И МАНИПУЛЯТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ПОСТГЕНОМНЫХ НАУК Аль-Дарабсе А.М.Ф., Маркова Е.В., Денисова Т.В.	10
СПОСОБ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ SNP RS41255693В ГЕНЕ <i>SCD1</i> КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ Архипова А.Л., Климов Е.А., Ковальчук С.Н.	14
МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ИНЖИНИРИНГ МИКРОМИЦЕТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОРМОВЫХ БЕЛКОВ КУКУРУЗЫ И АМАРАНТА Балабанова Л.А., Шкрыль Ю.Н., Сейткалиева А.В., Югай Ю.А., Марченко М.В., Авраменко Т.В., Сон О.М., Текутьева Л.А.	18
МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ ОСТЕОПЕТРОЗА И ДВОЙНОЙ ОБМУСКУЛЕННОСТИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЯСНЫХ ПОРОД Беляк О.А., Камыш Н.А., Михайлова М.Е., Тиханович Н.И.	22
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ МЯСНЫХ ПОРОД Бойко Е.В. ¹ , Коропец Л.А. ²	26
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА КАК МЕТОДА ОЦЕНКИ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ОСОБЕННОСТЕЙ ВОЛОСЯНОГО ПОКРОВА И ПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ СВИНОМАТОК ПОЛТАВСКОЙ МЯСНОЙ ПОРОДЫ Гарская Н.А., Перетяцько Л.Г.	31
ИММУНОКОРРЕКЦИЯ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ СВИНОМАТОК Гладких Л.П., Семенов В.Г., Никитин Д.А., Успешный А.В.	37
КРИОБАНК СПЕРМЫ ТРУТНЕЙ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ Гулов А.Н., Сайфутдинова З.Н.	41

УЧАСТИЕ ПРОГЕСТЕРОНА В АКТИВАЦИИ КАПАЦИТАЦИИ И ОСВОБОЖДЕНИИ Ca^{2+} ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ Денисенко В.Ю.	46
ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ РУБЦА RANGIFER TARANDUS И ВЫДЕЛЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНОГО ШТАММА С ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ Дуняшев Т.П., Ильина Л.А., Лаптев Г.Ю., Солдатова В.В., Йылдырым Е.А., Филиппова В.А. ¹ , Лайшев К.А.	50
МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА И БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА МЯСА БРОЙЛЕРОВ НА ФОНЕ РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА Дускаев Г., Яушева Е., Косян Д., Кван О., Рахматуллин Ш.	54
ИНТЕРБРИДИНГ КАК ОДИН ИЗ СПОСОБОВ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПОРОДЫ И ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ СВИНЕЙ Евдокимов Н.В., Алексеев В.А.	60
СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ГЕНА EGFP ПОД ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНЫМ (CMV) ПРОМОТОРОМ ДЛЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНТЕГРАЦИИ В ГЕНОМ КРОЛИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9 Езерский В.А., Колоскова Е.М.	64
РЫБОВОДНАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ СТЕРЛЯДИ Елизарова А.С., Глебов А.П., Шишанова Е.И., Исаев Д.А.	69
МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА БЕЛКОВ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ Еримбетов К.Т., Обвинцева О.В., Соловьева А.Г., Федорова А.В., Земляной Р.А.	73

ГИПОТЕРМИЧЕСКОЕ ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ ПОЗВОНОЧНЫХ В БЕССОЛЕВЫХ ИЗОТОНИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ Исаев Д.А., Мартынова М.Ю., Володяев И.В., Шишанова Е.И.	80
ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ФУРАЖНОМ ТРАВСТОЕ И КОНСЕРВИРОВАННЫХ КОРМАХ Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Солдатова В.В., Лаптев Г.Ю.	84
ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА МЕШОТЧАТОГО РАСПЛОДА В ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК Калинин А.Г.	88
ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИИ ИНТАКТНЫХ ЛИМФОЦИТОВ У ГИБРИДОВ ДОМАШНЕЙ КОЗЫ С СИБИРСКИМ КОЗЕРОГОМ ПО СОСТОЯНИЮ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА Кленовицкий П.М., Иолчиев Б.С., Багиров В.А.	92
ОПЫТ СОЗДАНИЯ СТАД – ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОКА ТИПА А2 БЕТА КАЗЕИНА В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф., Шахназарова Ю.Ю., Мачульская Е.В., Юницкая В.В.	97
СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ГЕНА EGFP ПОД ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНЫМ (CMV) ПРОМОТОРОМ ДЛЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНТЕГРАЦИИ В ГЕНОМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9 Колоскова Е.М., Езерский В.А.	101
ПРОФИЛАКТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРУПНОГОРОГАТОГО СКОТА АБЕРДИН-АНГУССКОЙ ПОРОДЫ ПРИ ПОМОЩИ АНАЛИЗА ДНК Коновалова Е.Н., Костюнина О.В., Романенкова О.С.	106
ВИТРИФИКАЦИЯ ДОЗРЕВШИХ <i>IN VITRO</i> ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ТРИАЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ПОЛЫХ ВОЛОКОН Корниенко Е.В., Романова А.Б., Малек Г.П.	112

ПЕРСПЕКТИВНАЯ РЕПРОДУКТИВНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАРАНОВ-ПРОБНИКОВ Лакота Е.А.	118
ИДЕИ Л.К. ЭРНСТА О РЕГУЛЯЦИИ МИКРОБИОМА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ: НАУЧНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ Лаптев Г.Ю.	121
МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН У КОРОВ-ПЕРВОТЕЛОК В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕОТЕЛЬНОГО ПЕРИОДА ПРИ РАЗНОМ УРОВНЕ ДЕПРЕССИИ ОВАРИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ Лебедева И.Ю., Соломахин А.А., Митяшова О.С., Рыков Р.А.	126
ОСОБЕННОСТИ ПАРАЗИТОФАУНЫ СУДАКА (<i>Sander lucioperca</i>) КУРШСКОГО ЗАЛИВА Мальцева И.С., Авдеева Е.В.	131
ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ КОРОВ В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА Митяшова О.С., Соломахин А.А., Лебедева И.Ю.	137
ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПО ТИПАМ КРОВИ КОРОВ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ Немцева Е.Ю., Филиппова Л.П.	143
ОЦЕНКА ЦЕЛОСТНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЖИВОТНЫХ Никиткина Е.В., Шапиев И.Ш., Мусидрай А.А., Крутикова А.А., Тимофеева С.В.	147
ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ У БЕЛОГО АМУРА (<i>STENOPHARYNGODON IDELLA</i> VAL.), ВЫРАЩИВАЕМОГО В АКВАКУЛЬТУРЕ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ Носова А.Ю., Царь А.И., Кипень В.Н., Лемеш В.А.	151

ГЕНОФОНД МОЛОЧНЫХ ПОРОД СКОТА УКРАИНЫ И ПОСЛЕДСТВИЯ ГЛОБАЛИЗАЦИИ СОВРЕМЕННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ Почукалин А.Е., Прыйма С.В., Ризун О.В.....	155
ДИНАМИКА ЖИВОЙ МАССЫ ЯГНЯТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА ИХ РОЖДЕНИЯ Прытков Ю.А., Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Волкова Н.А.	160
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКИ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ БЕСКОНТАКТНОГО ИЗМЕРЕНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК Ручай А.Н., Дорофеев К.А., Колпаков В.И., Кобер В.И., Джуламанов К.М. ...	163
ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ Сайфутдинова З.Н., Гулов А.Н.	168
ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ MYOD1 И MSTN С МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ У ОВЕЦ ПОРОДЫ МАНЫЧСКИЙ МЕРИНОС Сафарян Е.Ю., Яцык О.А.	173
ОЦЕНКА СЕЛЕКЦИОННОЙ ПЕРСПЕКТИВНОСТИ МОЛОДНЯКА КАЗАХСКОЙ БЕЛОГОЛОВОЙ ПОРОДЫ НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И БИОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ Селионова М.И., Чиждова Л.Н., Сурждикова Е.С., Плхтдюкова В.Р., Шарко Г.Н.	178
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ MEF2B И SEVRD КАК МАРКЕР МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ОВЕЦ Селионова М.И., Криворучко А.Ю.	184
ВЛИЯНИЕ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ОРГАНИЗМА КОМПЛЕКСНЫМИ ОТЕЧЕСТВЕННЫМИ БИОПРЕПАРАТАМИ НА ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА КОРОВ Семенов В.Г., Иванова Т.Н.....	189

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ СОМАТОТРОПИНА В ГРАНУЛЕЗНОМ СЛОЕ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ КУР Смекалова А.А., Лебедева И.Ю., Парвизи Н., Гроссманн Р.....	193
ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОММЕРЧЕСКИХ СРЕД, РАЗРАБОТАННЫХ ДЛЯ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА, В ЭКСПЕРМЕНТАХ ПО IN VITRO КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ГАМЕТ И ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С.....	198
МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФАЙЛИНГ КАК НАУЧНАЯ ОСНОВА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КОРОВ МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ Соломахин А.А., Митяшова О.С., Рыков Р.А., Лебедева И.Ю.	204
ЦИТОФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ <i>SUS SCROFA DOMESTICUS</i> ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДИМЕТИЛГЛИЦЕРОЛАТА КРЕМНИЯ Станиславович Т.И., Кузьмина Т.И.....	211
ПОРОДНОСТЬ ХРЯКОВ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ Таджиева А.В., Иолчиев Б.С., Требунских А.....	216
РАЗРАБОТКА ВЕКТОРА ДОСТАВКИ CRISPR/CAS 9 СИСТЕМЫ ПУТЁМ МОДИФИКАЦИИ T1 ПЛАЗМИД АГРОБАКТЕРИИ (<i>AGROBACTERIUM</i> <i>TUMEFACIENS</i>) (IN SILICO) Тарасов С.С., Веселов А.П., Крутова Е.К.	220
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ В ГЕНОМАХ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ Терлецкий В.П., Тыщенко В.И.....	224

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ АНАПЛАЗМОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА <i>ANAPLASMA MARGINALE</i> Федорина Е.А., Ковальчук С.Н.	230
ГЕН РЕЦЕПТОРА МЕЛАНОКОРТИНА 4 (MC4R) И ЕГО СВЯЗЬ С НЕКОТОРЫМИ ПОЛИГЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ Халак В.И.	234
АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ СОМАТИЧЕСКИХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ КОРОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ВИТРИФИКАЦИИ Чистякова И.В., Кузьмина Т.И.	238
НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К КОНТРОЛЮ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ Шевелёва С.А., Ефимочкина Н.Р., Минаева Л.П., Быкова И.Б., Маркова Ю.М., Пичугина Т.В., Стеценко В.В., Полянина А.С., Алёшкина А.И.	243
ИНФОРМАТИВНОСТЬ ВЫХОДНЫХ ДАННЫХ МАССИВА ХИМИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЙ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ У ТЕЛЯТ Шуба А.А., Кучменко Т.А., Черницкий А.Е., Умарханов Р.У.	252
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВРОЖДЁННЫМИ АНОМАЛИЯМИ ПОТОМСТВА У СВИНЕЙ КРУПНОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ И ЛАНДРАС Траспов А.А., Костюнина О.В., Белоус А.А., Карпушкина Т.В., Свеженцева А.А., Зиновьева Н.А.	258
АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	266

ИЗУЧЕНИЕ ПОСТГЕНОМНОГО МИРА: РАЗЛИЧНЫЕ ОБЪЯСНИТЕЛЬНЫЕ И МАНИПУЛЯТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ПОСТГЕНОМНЫХ НАУК

Аль-Дарабсе А.М.Ф., Маркова Е.В., Денисова Т.В.

ФГБОУ ВО УлГТУ ИАТУ, ул. пр-т. Созидателей, 13А, Ульяновск, Ульяновская обл.,
РФ, 432059
E-mail: amersamarah4@gmail.com

***Аннотация.** В этой статье применяется концептуальная структура Левонтина о функциях науки (манипулятивная и объяснительная) для сравнения и объяснения существующих различий в воспринимаемой социальной значимости генетики / геномики и протеомики. Мы приводим три примера, чтобы проиллюстрировать социальную значимость и сильный культурный нарратив генетики / геномики, для которой не существует аналога для протеомики. Мы утверждаем, что основное различие между генетикой / геномикой и протеомикой заключается в том, что геномика выполняет сильную объяснительную функцию из-за сильного культурного повествования о наследственности. Основываясь на качественных интервью и наблюдениях за конференциями по протеомике, мы предполагаем, что природа белков, отсутствие общественного понимания и теоретическая сложность усугубляют эту разницу для протеомики. Концепция Левонтина предполагает, что социологи могут прийти к выводу, что омические науки влияют на социальные отношения не так, как прошлый анализ генетики.*

***Ключевые слова:** протеомика, геномика, общественное понимание науки, различный, структура, научная область.*

Введение. В этой статье рассматривается, почему геномика и генетика приобретают значительно большее значение для широкой публики, чем протеомика. Для социологов социальная значимость науки была ключевой проблемой [1, с. 289]. Хотя концепция социальной значимости открыта для различных интерпретаций, для целей этой статьи мы ссылаемся на создание повествования, которое позволяет общественности интегрировать базовые представления о конкретной науке в свои представления о себе и о мире, в котором они живи и представляй. Мы утверждаем, что науки оказывают социальное воздействие различными способами, даже если они не имеют социальной значимости, как мы ее определили. Мы используем концепции Левонтина о манипулятивных и объяснительных функциях науки, чтобы критически изучить текущую социальную значимость каждой науки и проанализировать, почему одна из них [2, с. 504], по крайней

мере в настоящее время, более социально значима, чем другая. Работа Левонтина дает представление о том, как и почему наука становится социально значимой, почему она еще не может быть и почему она никогда не может быть.

Цель работы. Мы исследуем две науки: генетика / геномика, которая, как мы утверждаем, была неотъемлемой частью нашего понимания себя и окружающего нас мира, и протеомика - наука о постгеномике, которая на сегодняшний день оказывает меньшее социальное воздействие. В то время как социологи детально изучали науки, которые оказали сильное влияние на общество, меньше внимания уделялось наукам, которые кажутся менее социально значимыми.

Материал и методика исследований. Мы провели 35 полуструктурированных интервью с учеными-протеомиками и регулятивными учеными или клиницистами и участвовали в четырехлетнем наблюдении за участниками на ежегодных международных конференциях Организации по протеомам человека (HUPO) (2011–2015 годы), а также на ежегодной конференции Австралийской протеомической ассоциации. конференция (2012 и 2013). В то время как большинство респондентов находились в Канаде, США и Австралии на момент проведения интервью, многие из них прошли обучение или работали в самых разных странах. HUPO - это международный научный консорциум, созданный в 2001 году для продвижения протеомики (Австралийское общество протеомики - региональная группа HUPO) [3, с. 20]. Одной из, пожалуй, наиболее значимых инициатив HUPO на сегодняшний день является организация Проекта человеческого белка (HPP), созданного по образцу Проекта генома человека, целью которого является картирование человеческих белков в геноме. Наши интервью были сосредоточены на роли стандартов и трансляции знаний в научном процессе.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты наблюдений и интервью участников были триангулированы (аналитическое сравнение, дополнения и подтверждение интервью и наблюдения участников с другими документами) посредством изучения научных редакционных статей и обзоров, связанных с протеомикой, стандартами и клиническими приложениями. Проект получил этическое одобрение Совета по этике ис-

следований Университета Далхаузи и Комитета по этике исследований человека в Квинслендском технологическом университете. Анализ для этой статьи основан в основном на стенограммах интервью. И поэтому нельзя сказать, что мы не должны заниматься редукционистской биологией - абсолютно. Важно иметь возможность выстраивать разрешение вокруг отдельных областей [4, с. 535], но какие наиболее важные области следует искать, вы знаете? Мы можем выбрать наш любимый белок, или любимый ген, или любимый класс генов, и исследовать это до смерти, и это прекрасно, потому что это создает большое разрешение вокруг этого. Но это самое главное? Я не стал бы выступать за то, чтобы говорить, что мы должны заниматься только типами системной биологии, типами больших данных. Я думаю, что вы должны вернуться и быть в состоянии проверить и посмотреть на вещи в гораздо более высоком разрешении. Все это связано, это все независимо, поэтому вам нужно взглянуть на все это, так что я думаю, что эти вещи могут быть гораздо более интегрированными, чем они есть. (Доктор Х, клинический исследователь, который использует протеомику). Протеомика имеет дело с чрезвычайно сложными данными. Системный подход, извлекающий данные из нескольких источников (геномика, транскриптомика, метаболомика, протеомика), который дает понимание того, как отдельный элемент в организме (например, один белок) взаимодействует в более широком контексте (то есть белки, окружающие этот белок), предвещает значительный потенциал. Он отвергает единственное внимание к редукционизму, о котором сожалел Левонтин, и в то же время учитывает его сильные стороны. Перевод этой сложности и объяснение ее работы для более широкой аудитории оказалось неувловимым для протеомики, препятствуя ее объяснительной функции.

Заключение. Мы подробно описали, как и почему протеомика считается менее актуальной, чем геномика, несмотря на равный или более сильный потенциал для новых методов, практик и продуктов. Мы предположили, что это связано с большей сложностью, присущей анализу белка, что затрудняет его перевод на публику или превращение в легко понятный механистический звуковой прикус. Каковы последствия этой сложности и нехватки социальной значимости в протеомике?

Во-первых, мы предполагаем, что объяснительные и манипулятивные функции науки не зафиксированы и могут измениться. Например, даже если попытки протеомных ученых увеличить способность протеомики дать широко распространенные объяснения того, как устроен мир, не увенчаются успехом, растущее число новых приложений из этой науки может получить признание. Способность поля превзойти свой сложный предмет и увеличить свое присутствие в социальном мире может прийти с признанием разрушений, которые его прогрессивные открытия приносят в повседневный мир.

Во-вторых, расширяется разрыв между сложными научными объяснениями, присутствующими в новых постгеномных науках, и генетическим редукционизмом прошлого. Наука после геномики включает в себя усложнение больших массивов данных и анализ биологических систем. Редукционизм, который оказался настолько убедительным при объяснении прошлых наук, неудобен для анализа больших и сложных систем. Эта растущая сложность и уменьшенный редукционизм хорошо отмечены в литературе по геномике и постгеномике, хотя геномика все еще связана с геном и сопровождающим его редукционизмом. В действительности, в областях научных исследований существует напряженность между тем, как в средствах массовой информации сообщается об открытиях генома, и менее детерминированным способом, которым гены контекстуализируются. Новые науки омики создают «объект исследования, а именно живые клетки, как сложные системы, а не как простые машины».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аль-Дарабсе А.М.Ф., Май С.Д., Маркова Е.В. Методологический инструментарий устойчивости при выборе функционирования конструктивных элементов воздушного судна. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2017. Т. 19. № 4-2. С. 289-293.
2. Маркова Е.В., Аль-Дарабсе А.М.Ф., Соколова О.Ф. Проблемы сертификации персонала предприятий авиационно-космического комплекса и организаций самарской области в условиях рынка. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2018. Т. 20. № 4-3. С. 504-508.
3. Маркова Е.В., Аль-Дарабсе А.М.Ф. Модернизация "аэрокосмического образования" высших учебных заведений. // В сборнике: Проблемы и перспективы экономических отношений предприятий авиационного кластера сборник материалов. 2017. С. 20-22.
4. Al-Darabse A.M.F. Teaching and assessment strategies. // В сборнике: Студент и наука (гуманитарный цикл) - 2017 Материалы международной студенческой научно-

практической конференции. Главные редакторы Н.Н. Макарова, Е.В. Олейник. Ответственный редактор А.С. Гаан. 2017. С. 535-538.

STUDYING OF POSTGENOMIC WORLD: VARIOUS EXPLANATORY AND MANIPULATIVE FUNCTIONS OF POSTGENOMIC SCIENCES

Al Darabseh A.M.F., Markova E.V., Denisova T.V.

¹FGBOU IN Ulyanovsk State Technical University IATU, st. ave. Sozidateli, 13A, Ulyanovsk, Ulyanovsk Region, Russian Federation, 432059
Email: amersamarah4@gmail.com

Abstract. *This article uses the leventine theory of functional science (similar to measurement) to compare and explain the differences in understanding the meaning of branches / branches of genes and proteins. We present three examples illustrating the importance of relationships and detailing genetics / genetics for drug production. We show that there is a certain type of protein / protein as well as protein if the gene has the ability to represent it because of its strong nature. Based on the interaction and qualitative analysis of protein aggregations, proteins that lack complexity and complexity contribute to the differentiation of proteins. Leptin theory makes it clear that farmers perceive ombudsmen in a different relationship with previous genetic studies.*

Keywords: *proteins, genomes, general understanding of science, various, structure, scientific field.*

УДК 636.2:575.174.015.3

СПОСОБ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ SNP RS41255693В ГЕНЕ *SCD1* КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Архипова А.Л.¹, Климов Е.А.^{1,2}, Ковальчук С.Н.¹

¹ФГБНУ ЦЭЭРБ, ул. Костякова, 12/4, г. Москва, РФ, 1274222

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Ленинские горы, д. 1, Москва, РФ, 119991

E-mail: s.n.kovalchuk@mail.ru

Аннотация. *Стеарил-КоА-десатураза является ключевым ферментом биосинтеза моновенасыщенных жирных кислот. Ген, кодирующий *scd1* у крупного рогатого скота, находится в 26-й хромосоме и состоит из 6 экзонов и 5 интронов. На сегодняшний день обнаружено несколько полиморфных участков гена *scd1* у крупного рогатого скота. Есть данные о связи однонуклеотидной замены g.10329T>C (SNP rs41255693) с содержанием ненасыщенных жирных кислот в молоке и молочной продуктивностью КРС.*

Наиболее часто используемым методом идентификации аллельных вариантов генов является ПЦР-ПДРФ, основным недостатком которого является его трудоемкость. Целью данной работы была разработка способа генотипирования SNP rs41255693 в гене *scd1* КРС на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В разработанном способе используются два праймера, фланкирующие фрагмент гена *scd1* длиной 90 п.н., и два аллель-специфичных зонда TaqMan. Идентификация аллельных вариантов g.10329T>C проводится на основе сравнения флуоресценции по каналам FAM и VIC, соответственно. Разработанный нами способ идентификации SNP rs41255693 позволяет значительно сократить время проведения анализа по сравнению с методом ПЦР-ПДРФ и может быть использован для генотипирования КРС с целью с прогноза молочной продуктивности и качественного состава молока.

Ключевые слова: SCD1, SNP, rs41255693; крупный рогатый скот; ПЦР в реальном времени.

Введение. Стеароил-КоА-десатураза (stearoyl-CoA desaturase, SCD, EC 1.14.99.5) – ключевой фермент биосинтеза мононенасыщенных жирных кислот, катализирующий десатурацию пальмитиновой и стеариновой кислот [1]. Ген *scd1* КРС расположен в 26-й хромосоме, состоит из 6 экзонов и 5 интронов [2]. На сегодняшний день обнаружено несколько полиморфных участков в гене *scd1* крупного рогатого скота. SNP rs41255693 (g.10329T>C) в 5-ом экзоне приводит к замене Ala293Val [3], для которой была показана связь с более высокой концентрацией C22:0 и C22:1_{cis9} жирных кислот в молоке и молочной продуктивностью [4, 5].

Цель работы: Разработка способа генотипирования SNP rs41255693 в гене *scd1* КРС на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Материал и методика исследований. ДНК выделяли из 89 образцов цельной крови коров черно-пестрого голштинизированного скота. ПЦР проводили в 10 мкл смеси, содержащей 5 мкл реактива LightCycler® 480 Probes Master («Roche», Швейцария), по 1 мкМ праймеров SCD1-F: 5'-CCCTTATGACAAGACCATCAACC -3' и SCD1-R: 5'-GACGTGGTCTTGCTGTGGACT -3' (10 мкМ), по 0,4 мкМ аллель-специфичных зондов аллель-специфичных зондов SCD1-T:5'-FAM-CTTACCCACAGCTCCCA-BHQ1-3', SCD1-C:5'-VIC-ACCCGCAGCTCCC-3- BHQ1 и 10 нг ДНК при следующих условиях - 95 °С - 10 мин.; 95 °С - 20 сек., 55 °С - 30 сек., 72 °С 20 сек., 40 циклов. Детекция флуоресценции проводилась на стадии элонгации по каналам FAM и VIC. Для анализа ре-

зультатов использовали программы LightCycler® 96 версии SW1.1 («Roche», Швейцария).

Результаты исследований и обсуждение. На сегодняшний день одним из наиболее распространенных методов идентификации аллельных вариантов генов является ПЦР-ПДРФ. Основными недостатками ПЦР-ПДРФ являются продолжительность и трудоемкость. В данной работе нами был разработан способ детекции аллельных вариантов T/C гена *scd1* (rs41255693) на основе ПЦР в реальном времени. В разработанном методе использовали два праймера, общие для обоих аллелей гена *SCD1* и фланкирующие участок гена *scd1* длиной 90 п.н., и два аллель-специфических зонда TaqMan, меченые красителями FAM и VIC. Для образцов ДНК коров с генотипом T/T и C/C наблюдается рост флуоресцентного сигнала по каналам FAM (Рисунок 1 Б) и VIC (Рисунок 1Г), соответственно. Для гетерозиготных образцов детектируются сигналы по обоим каналам – FAM и VIC (Рисунок 1 В).

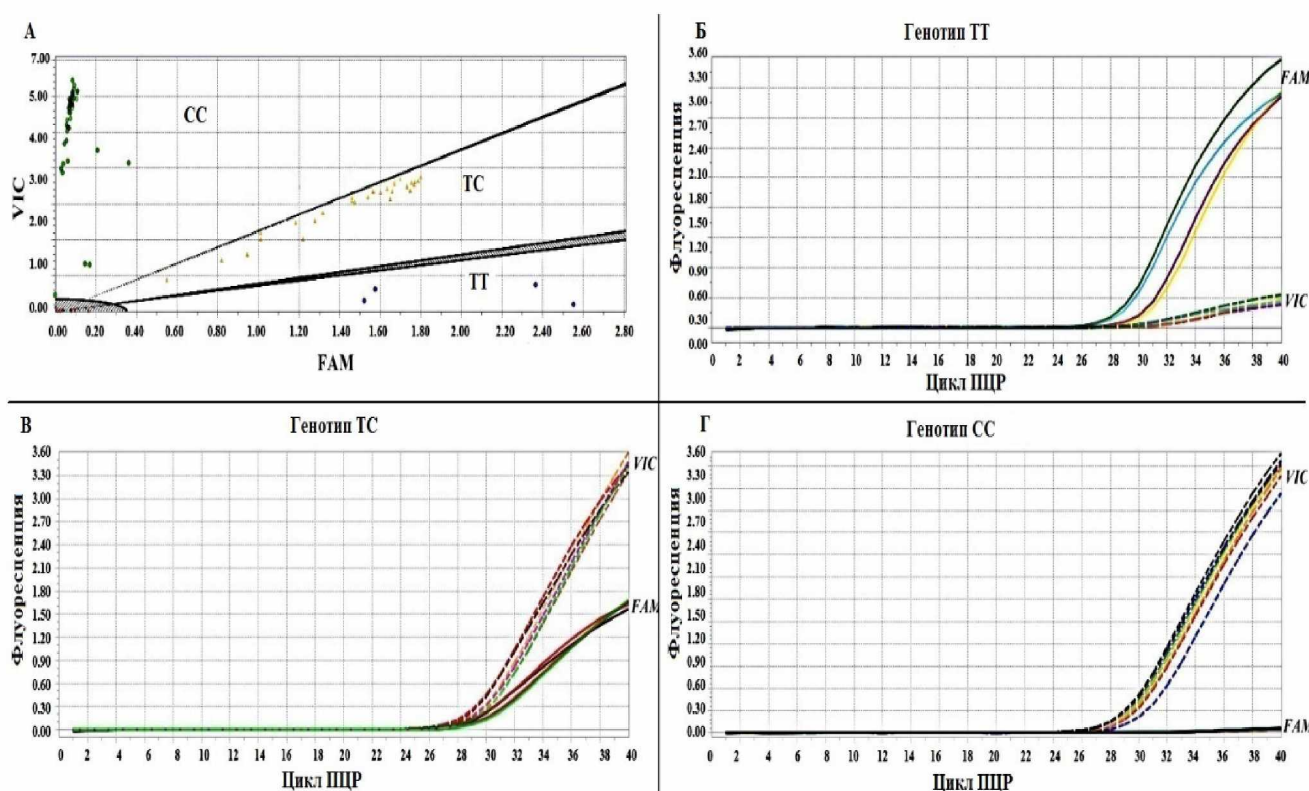


Рисунок 1. Пример детекции аллельных вариантов T и C гена *scd1* (rs41255693) КРС методом ПЦР в реальном времени. Представлены распределение генотипов (А) и кривые флуоресценции (Б-Г).

Разработанный нами метод был валидирован с помощью ПЦР-ПДРФ анализа с использованием рестриктазы FauI. Результаты обоих методов генотипирования полностью совпали, однако, разработанный нами метод позволяет значительно (до 1 часа) сократить время проведения анализа, что выгодно отличает его от ПЦР-ПДРФ анализа.

Заключение. Нами разработан эффективный способ генотипирования SNP rs41255693 гена *scd1* КРС на основе ПЦР в реальном времени с использованием аллель-специфических флуоресцентно-меченых зондов. Данный метод позволяет проводить генотипирование до 480 животных (в зависимости от модели амплификатора) в течение 1 часа и может быть использован для генотипирования крупного рогатого скота с целью с прогноза молочной продуктивности и качественного состава молока.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ntambi, J.M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol // J Lipid Res - 1999. 40(9):1549-1558.
2. Bernard, L., Leroux, C., Hayes, H., Gautier, M., Chilliard, Y., Martin, P. Characterization of the caprine stearoyl-CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon // Gene – 2001. 281(1): 53-61.
3. Taniguchi, M., Utsugi, T., Oyama, K., Mannen, H., Kobayashi, M., Tanabe, Y., Ogino, A., Tsuji S. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle // Mamm Genome – 2004. 15(2): 142-148.
4. Pegolo, S., Cecchinato, A., Mele, M., Conte, G., Schiavon, S., Bittante, G. Effects of candidate gene polymorphisms on the detailed fatty acids profile determined by gas chromatography in bovine milk // Journal of Dairy Science – 2016. 99(6): 4558-4573.
5. Raschia, M.A., Nani, J.P., Maizon, D.O., Beribe, M.J., Amadio, A.F., Poli, M.A. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with milk yield in Argentinean Holstein and Holstein x Jersey cows // J Anim Sci Technol – 2018. 60:31.

METHOD OF GENOTYPING SNP RS41255693 IN THE CATTLE *SCD1* GENE BASED ON REAL-TIME PCR

Arkhipova A.L.¹, Klimov E.A.^{1,2}, Kovalchuk S.N.¹

¹FSBSI CEERB, Kostyakova str, 12/4, Moscow, Russia, 127422

²Lomonosov Moscow State University Leninskie Gory GSP-1, Moscow, Russia 119991
E-mail: s.n.kovalchuk@mail.ru

Abstract. Stearoyl-CoA desaturase is a key enzyme in the biosynthesis of monounsaturated fatty acids. In cattle, the gene encoding *SCD1* is located on chromosome 26 and consists of 6 exons and 5 introns. To date, several polymorphic positions have been found in the cattle *scd1* gene. Association of the single nucleotide substitution g.10329T>C (SNP rs41255693) with the content of unsaturated fatty acids in the milk and milk production of cattle was shown.

The most commonly used method for identifying allelic gene variants is PCR-RFLP, the main disadvantage of which is a laboriousness. The aim of this study was to develop a method for genotyping SNP rs41255693 in the cattle scd1 gene based on real-time polymerase chain reaction with allele-specific fluorescent probes. In the developed method two primers, flanking 90-bp fragment of scd1 gene, and two allele-specific TaqMan probes are used. The identification of g.10329T>C allelic variants is based on the comparison of FAM and VIC fluorescence, respectively. The developed method for identifying SNP rs41255693 can significantly reduce the time of the analysis compared with PCR-RFLP and could be used for genotyping cattle for prediction of milk productivity and qualitative composition of milk.

Keywords: SCD1, SNP, rs41255693, cattle, RT-PCR.

УДК 577.12; 577.21; 577.29; 579.64

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ИНЖИНИРИНГ МИКРОМИЦЕТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОРМОВЫХ БЕЛКОВ КУКУРУЗЫ И АМАРАНТА

**Балабанова Л.А.^{1,2}, Шкрыль Ю.Н.³, Сейткалиева А.В.¹, Югай Ю.А.³,
Марченко М.В.², Авраменко Т.В.³, Сон О.М.², Текутьева Л.А.²**

¹ ТИБОХ им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159, Приморский кр., РФ, 690022

² ДВФУ ШЭМ, г. Владивосток, ул. Суханова, 8, Приморский кр., РФ, 690950

³ ФНИЦ Биоразнообразия ДВО РАН, пр-т 100-летия Владивостока, 159, Приморский кр., РФ, 690022

E-mail: lbalabanova@mail.ru

Аннотация. Разработана высокоэффективная экспрессионная конструкция, основанная на бинарном векторе растений pPZP-RCS2, для одновременного синтеза нескольких гетерологичных белков в мицелиальном грибе *Thermothelomyces thermophila*. Биотехнологический микробиотехнологический способ способен продуцировать запасные белки семян кукурузы *Zea mays* и амаранта *Amaranthus hypochondriacus* L. для использования в технологиях обогащения животноводческих кормов сбалансированными белками.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, запасные белки, *Zea mays*, *Amaranthus hypochondriacus* L., гетерологичная экспрессия.

Введение. Большинство кормов, используемых в сельском хозяйстве, содержат низкий уровень белка и витаминов. Этот дефицит покрывается увеличением производства растительного белка, содержащегося в кормовых культурах, либо рыбной муки и сухих молочных продуктов. Существует много альтернативных источников растительного белка для рационов скота. К ним относятся масличные и бобовые культуры, побоч-

ные продукты пищевого и агропромышленного производства, например, кукурузный глютен. Белки семян амаранта, большинство из которых являются хорошо растворимыми глобулинами, имеют идеальный аминокислотный состав и повышенное содержание незаменимых аминокислот [1]. Однако потребность в растительном белке намного превышает общее производство белка со всех пахотных земель в мире, поэтому стоимость сбалансированных рационов очень высока. Это означает, что проблема удовлетворения мирового спроса на белки для обогащения кормов остается актуальной. Было показано, что из доступного и наиболее эффективного метода является добавление дефицитных питательных веществ в форме биомассы после ферментативной обработки низкокачественных кормов, таких как солома зерновых или других промышленных отходов, лигноцеллюлолитическими грибами в сочетании с химической и физической обработкой [2]. Грибы содержат до 30–50% белка с повышенным содержанием треонина и лизина в соответствии с рекомендациями FAO [3]. Они производят витамины (тиамин, рибофлавин, биотин, ниацин, пантотеновую кислоту, пиридоксин, холин, стрептогенин, глутатион, фолиевую кислоту и п-амино-бензойную кислоту) и клетчатку (глюканы клеточной стенки). Кроме того, микромицеты имеют умеренное содержание нуклеиновых кислот (7–10%) по сравнению с бактериями и дрожжами. Продукты коммерчески доступных мицелиальных грибов, полученные с использованием лигноцеллюлозы, являются хорошим источником усваиваемых микопротеинов [3].

Цель работы - Изменение профиля экспрессии белков микромицета *Thermothelomyces thermophila* путем введения генов ценных кормовых белков семян кукурузы *Zea mays* и амаранта *Amaranthus hypochondriacus* L. Разработка высокоэффективного экспрессионного вектора для производства сразу нескольких гетерологичных кормовых белков в мицелиальных грибах.

Материал и методика исследований. Для метаболического инжиниринга использовали штамм микромицета *Thermothelomyces thermophila* F-859 (ВКМ). Условия культивирования штамма, сбора конидий, их трансформации и плазмиды описаны ранее [4]. Для получения генетических экспрессионных конструкций использовали плазмиды pSAT1-MCS,

pSAT4-MCS and pSAT6-MCS. Последовательности генов α -зеина *Z. mays* 19kDa (Z19) и альбумина *A. hypochondriacus* (A1) клонировали по сайтам рестрикции NcoI-XbaI в pSAT1-MCS и pSAT4-MCS, соответственно. Тандем промоторов CaMV 35S вырезали по сайтам AgeI-NcoI для замещения промотором TrpC или TEF. Ген *hph* клонировали как XhoI-XbaI-фрагмент под промотор TrpC в pSAT6-MCS вместо маркерного гена *kan*. Полученные генетические кассеты использовали для последовательного субклонирования в бинарный вектор pPZP-RCS2 по сайтам AscI, I-SceI, PI-PspI и I-CeuI. Все конструкции проверяли секвенированием в Инструментальном Центре Биотехнологии и Генной Инженерии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН с использованием секвенатора ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA, USA).

Оценку уровня экспрессии генов проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР) с использованием набора с интеркалирующим красителем SYBR qPCRmix-HS (Евроген) на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories). Состав реакционной смеси и температурный режим соответствовали условиям, описанным ранее [4]. Для нормализации данных кПЦР использовали ген актина микровицета. Анализ данных кПЦР проводили в программе CFX Manager Software (Версия 1.5; Bio-Rad). Относительный уровень экспрессии определяли с использованием $\Delta\Delta C_t$ метода. Анализ экспрессии включал три биологические и технические повторности для каждого варианта.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ продуктов растительных генов, кодирующих запасные белки семян кукурузы Z19 и амаранта AmA1, в штамме-продуcente *Thermothelomyces thermophila* показал, что наиболее эффективными для метаболического инжиниринга микровицета были рекомбинантные бинарные векторы pPZP-RCS2-TrpC:Hyg-TrpC:Z19/AmA1 и pPZP-RCS2-TrpC:Hyg-TEF:Z19/AmA1, в которые сначала встроили экспрессионную кассету TrpC-hph, для направленного синтеза селективного маркера - гигромицин В фосфотрансферазы (*Hph*), под контролем промотора синтеза триптофана *Aspergillus nidulans* (TrpC), затем конструкции TrpC-z19/*ama1* или TEF-z19/*ama1* для направленного синтеза белка кукурузы Z19 и амаранта AmA1 под контролем

промоторов TrpC или TEF - промотора фактора транскрипции *Aureobasidium pullulans*, соответственно (рис. 1).

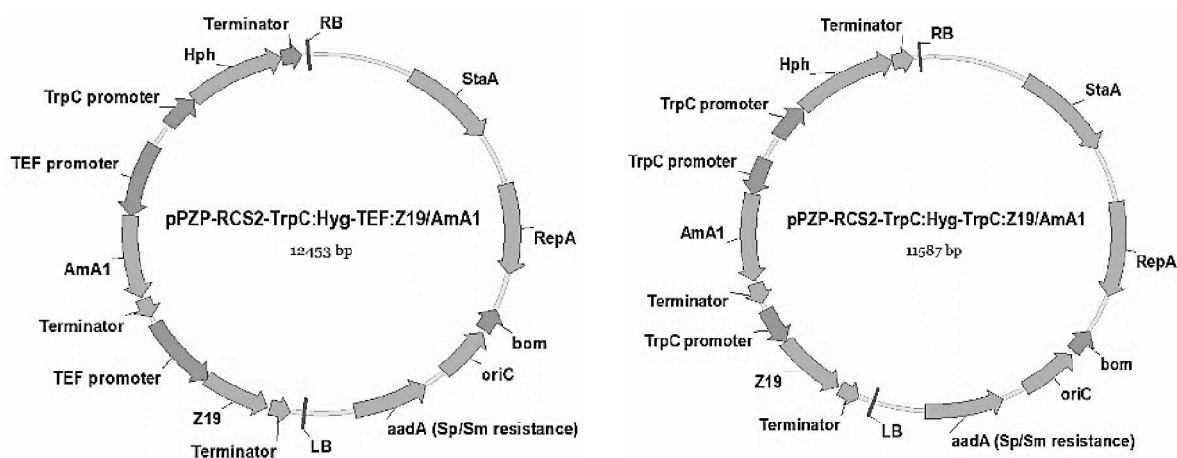


Рисунок 1. Бинарные векторы pPZP-RCS2-TrpC:Hyg-TrpC:Z19/AmA1 и pPZP-RCS2-TrpC:Hyg-TEF:Z19/AmA1 для синтеза кормовых белков Z19 и AmA1 под разными промоторами TEF и TrpC.

Однако было замечено, что уровень экспрессии белка кукурузы Z19 в 1,5-2 раза был выше под контролем промотора TrpC, тогда как уровень экспрессии глобулина амаранта AmA1 в несколько раз повышался под контролем промотора TEF.

Закключение. Методом метаболического инжиниринга микромицета получен перспективный продуцент растительных белков семян кукурузы и амаранта, используемых для обогащения кормов. Термофильный микромицет *Thermothelomyces thermophila* может являться как источником новых высокоэффективных ферментов для переработки сельскохозяйственных и промышленных отходов, так и клеточной фабрикой для производства ценных белков и вторичных метаболитов с использованием возобновляемого лигноцеллюлозного сырья.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martínez-Cruz, O., Chavez, F.C., Paredes-Lopez, O. Biochemical Characteristics, and Nutraceutical and Technological Uses of Amaranth Globulins//Globulins: Biochemistry, Production and Role in Immunity. Nova Science Publishers-2014. 3:41-70.
2. Sarnklong, C., Cone, J.W., Pellikaan, W., Hendriks, W.H. Utilization of Rice Straw and Different Treatments to Improve Its Feed Value for Ruminants: A Review//Asian-Australasian Journal of Animal Sciences-2010. 23:680-692.

3. Ritala, A., Häkkinen, S.T., Toivari, M. and Wiebe, M.G. Single Cell Protein-State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001–2016//Frontiers in Microbiology-2017. 8:Article 2009.
4. Balabanova, L.A., Shkryl, Y.N., Slepchenko, L.V., Yugay, Y.A., Gorpenchenko, T.Y., Kirichuk, N.N., Khudyakova, Y.V., Bakunina, I.Y., Podvolotskaya, A.B. Bulgakov, V.P., Seitkalieva, A.V., Son, O.M., Tekutyeva, L.A. Development of host strains and vector system for an efficient genetic transformation of filamentous fungi//Plasmid-2019. 101:1-9.

METABOLIC ENGINEERING OF MICROMYCET FOR PRODUCING FODDER PROTEINS OF CORN AND AMARANTH

**Balabanova L.A.^{1,2}, Shkryl Yu.N.³, Seitkalieva A.V.¹, Yugay Yu.A.³,
Marchenok M.V.², Avramenko T.V.³, Son O.M.², Tekutyeva L.A.²**

¹G.B. Elyakov PIBOC FEB RAS, Vladivostok, pr. 100-letya Vladivostoka, 159, Primorsky kr., 690022 Russia

²FEFU SEM, Vladivostok, st. Sukhanova, 8, Primorsky kr., 690950 Russia

³ Federal Scientific Center of The East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Pr.100-letyaVladivostoka, 159, 690022 Russia

E-mail: lbalabanova@mail.ru

Abstract. *A highly efficient expression construct based on the pPZP-RCS2 binary plant vector was developed for the simultaneous synthesis of several heterologous proteins in the *Thermothelomyces thermophilus* mycelium. Bioengineered micromycete is capable of producing storage proteins of *Zea mays* and *Amaranthus hypochondriacus* L. seeds for use in balanced proteins enrichment of animal feed.*

Keywords: *filamentous fungi, storage proteins, Zea mays, amaranth, heterologous expression.*

УДК 575.174.015.3

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ ОСТЕОПЕТРОЗА И ДВОЙНОЙ ОБМУСКУЛЕННОСТИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЯСНЫХ ПОРОД

Беляк О.А., Камыш Н.А., Михайлова М.Е., Тиханович Н.И.

Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
ул. Академическая, 27, г. Минск, РБ, 220072

E-mail: o.belyak@igc.by

Аннотация. *Разработан метод ДНК-диагностики генетических дефектов остеопетроза и двойной обмускуленности с использованием мультиплексной ПЦР для одновременного выявления мутаций в генах *MSTN* и *OST*. Использование данного метода позволяет контролировать распространение мутантных аллелей в белорусской популяции КРС мясного направления.*

Ключевые слова: генетический дефект, мясной скот, мутация, мультиплексная ПЦР, ген *OST*, ген *MSTN*.

Введение. Широкое внедрение молекулярно-генетических методов в селекционный процесс показывает, что генотипирование сельскохозяйственных животных с применением ДНК-маркеров может способствовать сохранению и наиболее полному использованию их генетического потенциала. Поиск ключевых генов, полиморфизм которых играет основную роль в проявлении хозяйственно ценных признаков, является актуальным и для мясного скота.

Анализ структуры гена миостатина (*MSTN*) у животных мясных пород Belgian Blue, Asturiana de los Valles и Piedmontese выявил делецию 11 нуклеотидов экзона 3 в позиции 937-947 п.н., которая приводит к сдвигу рамки считывания на функционально важном участке, кодирующем зрелый миостатин, причем все животные породы Belgian Blue являются гомозиготами по данной мутации [1]. У взрослых животных с фенотипом «Double muscling» наблюдается ярко выраженное увеличение мышечной массы скелетной мускулатуры (более чем на 20%), при этом мышцы имеют значительно меньшее количество соединительной ткани (коллагена). В основном это происходит вследствие гиперплазии – увеличения количества и поперечного сечения мышечных волокон [2].

Однако, несмотря на преимущества, фенотип двойной обмускуленности имеет определенные недостатки, что и относит его к дефекту. Негативными эффектами данной мутации являются большая чувствительность к стрессу и перегреву животных-носителей мутации, снижение плодовитости, удоя, повышенная смертность телят.

Остеопетроз, или «мраморная болезнь» является следствием летальной мутации, которая представляет собой делецию в 2784 п.н. в гене *SLC4A2*, локализованного на хромосоме 4. У больных животных наблюдаются такие признаки, как плоский череп, уплотненные моляры, укороченные челюсти (брахигнатия нижней челюсти) и высунутый язык, деформация скул [3]. Данная мутация обнаружена у Ангусской, Герефордской, Симмениальской и Фризской пород.

Цель работы – разработка мультиплексного метода ДНК-диагностики дефектов остеопетроза и двойной обмускуленности у КРС мясных пород.

Материал и методика исследований. В качестве биологического материала для исследования на носительство мутаций *MSTN* и *OST* были использованы пробы ткани (ушные выщипы) КРС абердин-ангусской, лимузинской и герефордской пород.

Выделение и очистка геномной ДНК осуществлялась с использованием коммерческих наборов реагентов «Нуклеосорб» («Праймтех», Беларусь) и «NucleoSpin Tissue» («Macherey-Nagel», Германия), количество выделенной геномной ДНК определялось при помощи флюориметра Qubit 2.0 («Invitrogen») с использованием набора реагентов Qubit ds DNA BR Assay kit («Life technologies», США). Выделенную ДНК разводили MQ-H₂O до рабочей концентрации.

Для получения специфичных ПЦР-продуктов исследуемых локусов генов *MSTN* и *OST* были использованы следующие олигонуклеотидные праймеры («Праймтех», Беларусь):

MSTN F 5' – GGGGGGGGAGAGATTTTGGGCTTGATTGTGA – 3' и

MSTN R 5' – GGGGGGGGTGCAATAATCCAATCCCATCCAA – 3';

OST F: 5' – GGGAAGGGAAGCACTAAGACT – 3',

OST RD: 5' – GGTGGATGTGATGGGAAGACT – 3' и

OST RN: 5' – TGGAGAGACAGCAGCAGAGAT – 3'.

ПЦР проводилась с использованием коммерческого набора реагентов Phusion U Multiplex Master Mix («Thermo scientific», EU), содержащего в оптимальном соотношении все необходимые компоненты для проведения ПЦР, а также 0,3-0,6 pM каждого праймера и 10-50 нг геномной ДНК в качестве матрицы. До конечного объема (20 мкл) реакционную смесь доводили MQ-H₂O. Амплификация исследуемых участков генов осуществлялась с использованием термоциклера Thermal Cycler C1000 («Bio-Rad», США) по следующей программе: 98°C – 2 мин.; 98°C – 10 сек., 65°C – 1 мин., 72°C – 30 сек. (35 циклов); 72°C – 5 мин.; 12°C – 10 мин.

Результаты исследований и их обсуждение. Нами разработан метод мультиплексной ДНК-диагностики дефектов остеопетроза и двойной обмускуленности у крупного рогатого скота мясных пород. Для апробации разработанного метода была проведена ПЦР по исследуемым генам *OST* и *MSTN* в моно- и мультиплексе.

Полученные амплификаты анализировались в 1,8 % агарозном геле, где в качестве интеркалирующего красителя использовался ZUBR Green-1 («Праймтех», Беларусь). Электрофорез проводился при напряжении 100-120 В в течение 60 – 80 мин, размер полученных фрагментов оценивался относительно маркера молекулярной длины DNA 50 bp Ladder («Thermo scientific», EU) (рис. 1). Гетерозиготных животных-носителей мутантных аллелей генов *MSTN* (M1C) и *OST* (OSTC) можно выявить по наличию на электрофореграмме 2-х фрагментов: 119/108 п.н. для гена *MSTN*, где гомозигота с нормальным аллелем имеет фрагмент 119 п.н., а гомозигота с мутантным аллелем – 108 п.н. Величина фрагментов гетерозиготы по гену *OST* составляет 475/330 п.н., гомозиготы с нормальным аллелем – 475 п.н.



Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР по генам *OST* и *MSTN* в моно- и мультиплексе.

Условные обозначения: М – маркер молекулярного веса 50 bp Ladder, 1-2 – амплификат *OST* (475 п.н.), 3-4 – мультиплекс *OST* и *MSTN* (475 и 119 п.н.), 5-6 – амплификат *MSTN* (119 п.н.).

Анализ величин фрагментов, полученных в результате мультиплексной ПЦР показал полное соответствие с размерами фрагментов, полученных в результате моноплексной ПЦР по каждому исследуемому гену (119 и 475 п.н. для *MSTN* и *OST* соответственно). Среди исследованных животных носителей мутантных аллелей по данным генам не выявлено.

Заключение. Применение ДНК-технологии в селекции позволяет выявлять генетические дефекты животных сразу после их рождения. ДНК-диагностика мутаций остеопетроза и двойной обмускуленности методом мультиплексной ПЦР позволяет уменьшить стоимость анализа за счет экономии времени и реактивов. Выявление и выведение из селекционного процесса особей-скрытых носителей мутаций, обуславливающих остеопе-

троз и двойную обмускуленность, позволяет оздоровить популяцию КРС мясного направления.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle / R. Kambadur // Genome Res. – 1997. – № 7(9). – P. 910–915.
2. A deletion in the myostatin gene causes double muscled phenotype in cattle / L. Grobet [et al.] // Nat. Genet. – 1997. – № 17. – P. 71–74.
3. Gholap P.N. Genetic Diseases in Cattle: A Review. / P.N. Gholap, D.S. Kale, A.R. Sirothia // Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences. – 2014. – № 2(2). – P. 24–33.

MULTIPLEX DNA IDENTIFICATION OF GENETIC DEFECTS OF OSTEOPETROSIS AND DOUBLE MUSCLING IN BEEF CATTLE BREEDS

Belyak O.A., Kamysh N.A., Mikhailova M.E., Tikhanovich N.I.

State scientific institution «Institute of Genetics and Cytology of the NASB»
Akademicheskaya str. 27, Minsk, 220072 Belarus
E-mail: o.belyak@igc.by

Abstract. A method has been developed for DNA diagnostics of genetic defects of osteopetrosis and double muscling using multiplex PCR to simultaneously detect mutations in the *MSTN* and *OST* genes. Using this method allows to control the distribution of mutant alleles in the Belarusian population of beef cattle.

Keywords: genetic defect, beef cattle, mutation, multiplex PCR, *OST* gene, *MSTN* gene.

УДК 636.2.082.453

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ МЯСНЫХ ПОРОД

Бойко Е.В.¹, Коропец Л.А.²

¹Институт разведения и генетики животных имени М.В. Зубца НААН,
ул. Погребняка, 1, с. Чубинское, Бориспольский р-н, Киевская обл., Украина, 08321

²Национальный университет биоресурсов и природоиспользования,
ул. Героев Оборона, 15, г. Киев, Украина, 03041
E-mail: boyko_lena@ua.fm

Аннотация. В результате проведенных исследований установлена дифференциация патологических форм сперматозоидов быков мясных пород, а также их взаимосвязь с основными количественными и качественными показателями спермы.

Ключевые слова: быки-производители, сперма, патологические формы сперматозоидов, первичные аномалии сперматозоидов, вторичные аномалии сперматозоидов.

Введение. Известно, что в норме в эякулятах самцов встречается определенное количество сперматозоидов с отклонениями в их морфологическом строении. W.W.Williams [1] предложил использовать изучение отклонений в морфологическом строении сперматозоидов как метод оценки их оплодотворяющей способности. N.Lagerlöf [2] в своих исследованиях разработал классификацию отклонений от нормы сперматозоидов быков, которая включает в себя десять отдельных групп. Были также предложены другие классификации патологических форм половых клеток, из которых наиболее распространена классификация L.H.Brettschneider [3]. E.Blom [4] разработал систему практической классификации форм сперматозоидов и других форменных элементов спермы быков, а также установил некоторое увеличение первичных аномалий сперматозоидов при снижении плодовитости быков. Гипоплазия или дегенерация семенников приводят к значительному увеличению части патологических форм сперматозоидов, особенно клеток с первичными дефектами. В.К.Милованов [5], J.Taylor [6] рекомендуют дифференцировать дефекты сперматозоидов на более важные – первичные, которые могут изменять уровень оплодотворяемости коров, и менее важные – вторичные – которые образуются вне процесса сперматогенеза и не влияют на уровень оплодотворяемости. **Цель работы** – разработка объективных методов оценки репродуктивной способности быков, которые бы учитывали морфологическое состояние сперматозоидов и обеспечивали их высокую оплодотворяющую способность.

Материалы и методика исследований. Было исследовано 46 образцов спермы от 20 быков-производителей (абердин-ангусской – 4 гол., герефордской – 4 гол., лимузинской – 3 гол., симментальской – 4 гол. и пьемонтские – 5 гол.) Главного селекционного центра Украины (г. Переяслав-Хмельницкий).

Количество патологических форм сперматозоидов оценивали методом подсчета под микроскопом половых клеток с отклонениями в строении головки (асимметрические, укороченные, заостренные, круглые, сплюснутые, грушеподобные, продолговатые, изолированные), шейки (утолщенные, ломанные, отклоненные назад), тела (утолщенное, изогну-

тое, ломаное) и хвостика (изолированный, загнутый, скрученный, сломанный, сложенный). Кроме того, обнаруженные патологические изменения были разделены на две группы: 1) первичные – которые появились в процессе сперматогенеза и свидетельствуют о наличии патологических процессов в сперматогенном эпителии (карликовые и гигантские формы, разные виды деформаций головок, шеек и тел сперматозоидов) и вторичные – которые возникают во время длительного пребывания сперматозоидов в выводных путях производителя или под влиянием ненормального состава секрета придаточных половых желез при их заболевании (изолированные головки, скрученные дистальные части тела, хвоста и др.).

Результаты исследований обрабатывались методом математической статистики по Н.А. Плохинскому [7], Е.К. Меркурьевой [8].

Результаты исследований и их обсуждение. В результате морфологических исследований спермы быков мясных пород установлено, что наибольшее количество аномалий сперматозоидов приходится на изолированные головки ($3,5 \pm 0,28$ %), загнутые тела ($2,7 \pm 0,20$), скрученные ($1,6 \pm 0,14$), загнутые ($1,7 \pm 0,14$) и сложенные ($3,4 \pm 0,40$ %) хвосты.

Сумма первичных аномалий сперматозоидов была значительно меньше суммы вторичных дефектов (в 6,5 раз) и составляла 13,2 % от общего числа патологических форм половых клеток, которая в среднем равнялась $14,5 \pm 0,70$ %.

При разделении патологических форм на аномалии в строении головок, шеек, тел и хвостиков по изучаемым породам (таблица) установлено, что общая сумма патологических форм половых клеток в процентах была наибольшей у быков лимузинской породы ($16,6 \pm 2,19$), у производителей других мясных пород этот показатель был меньше: у быков абердин-ангусской породы – на 17,3 %, герефордской – на 16,8, симментальской – на 17,5 и пьемонтской – на 5,7 %, хотя разница между группами быков была статистически недостоверной.

Породные отличия патологических форм сперматозоидов быков

мясных пород

Виды патологий	Порода				
	абердин-ангус	герефорд	лимузин	симментал	пьемонтезе
Патологии головок	4,2±0,83 ^a	7,0±0,55 ^b	6,7±1,08	4,7±0,66 ^c	5,2±1,08
Патологии шеек	0,6±0,16 ^d	0,3±0,24	0,6±0,30	0,6±0,34	0,1±0,12 ^e
Патологии тел	3,9±0,41 ^f	1,7±0,50 ^g	3,4±0,65 ^h	2,3±0,31 ⁱ	2,2±0,70
Патологии хвостиков	5,0±0,87	4,8±1,09	5,9±1,53	6,0±0,94	8,0±1,67
Первичные аномалии	1,7±0,62	1,8±0,49	2,9±1,03	1,7±0,43	1,9±0,48
Вторичные аномалии	12,0±0,93	12,0±1,17	13,7±1,87	12,0±1,31	13,7±2,19
Сумма патологий	13,7±1,13	13,8±1,04	16,6±2,19	13,7±1,43	15,6±2,37

Примечание: a:b, b:c, d:e g:h – P>0,95; f:g, f:i – P>0,99.

Наибольшее количество патологических форм головок имели быки герефордской породы (7,0±0,55 %), а наименьшую – абердин-ангусские производители (4,2±0,83) при P>0,95, хотя количество патологических форм в строении тел и хвостиков у герефордов была наименьшей (соответственно 1,7±0,50 и 4,8±1,09 %).

Сумма первичных и вторичных аномалий была наибольшей у производителей пород лимузин и пьемонтезе (соответственно 2,9 и 1,9; 13,7 и 13,8 %) при статистически недостоверной разнице по сравнению с быками других пород.

При проведении корреляционно-регрессионного анализа между видами патологических форм половых клеток и основными количественными и качественными показателями спермы наиболее тесная корреляционная связь установлена между подвижностью половых клеток после размораживания и количеством патологий головок (r=0,43 при P>0,95), шеек сперматозоидов (r=0,44 при P>0,95), а также общей суммой патологических форм (r=0,45 при P>0,95).

Средние по значению корреляционные связи отмечены между количеством патологий головок и шеек и подвижностью сперматозоидов в нативной сперме ($r=0,31$ и $0,30$ соответственно, $P<0,95$), патологиями головки ($r=0,30$, $P<0,95$) и общей суммой патологических форм сперматозоидов ($r=0,23$, $P<0,95$) и количеством выбракованной спермы. Между остальными парами признаков корреляционная связь почти отсутствует.

Сила влияния возраста быков на количество патологий головок была равна 24 % ($P<0,95$), патологий шеек – 4 % ($P<0,95$), тел – 26 % ($P>0,95$) и хвостиков – 37 % ($P>0,99$), на общее количество патологических форм сперматозоидов – 59 % ($P>0,999$). Влияния породного фактора на образование аномальных форм половых клеток не обнаружено.

Заключение. 1. Установлено, что у быков мясных пород количество патологий головок сперматозоидов в среднем равняется 5,5 %, шеек – 0,5, тел – 2,7 и хвоста – 5,9 %, общая сумма патологических форм половых клеток составляет 14,5 %.

2. Проведен корреляционно-регрессионный анализ между основными количественными и качественными показателями спермопродуктивности и разными видами патологических форм сперматозоидов. Наиболее тесная и статистически достоверная связь установлена между подвижностью половых клеток и количеством патологий головок ($r=0,43$), шеек сперматозоидов ($r=0,44$) и общей суммой аномальных сперматозоидов ($r=0,45$).

3. Установлена сила влияния возраста быков на различные виды патологий сперматозоидов, которая составляет от 4 до 59 %.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Williams, W.W., and A. Savage. Methods of determining the reproductive health and fertility of bulls: A review with additional notes // Cornell Vet. 1927. 17:374-384.
2. Lagerlöf, N. Morphological studies on the changes in the sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility (Trans. title) // Acta Path. Microbiol. Scand. 1934. 19:254.
3. Brettschneider, L.H. An electronmicroscopical study of sperm. –Measurements of the head (Trans. title) // Tijdschr. Diergeneeskunden. 1948. 73:233-253.
4. Blom, E. Spontaneous detachment of the capitis in spermia of bulls and stallion // Scand. Vet. 1945. 35:779-789.
5. Милованов, В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных // М.: Сельхозиздат, 1962. 433-438.
6. Taylor, J. Bovine semen collection and processing techniques // Revised second edition printed. 1991. 133.

7. Плохинский, Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников // М.: Колос, 1969. 256.
8. Меркурьева, Е.К. Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных // М.: Колос, 1970. 423.

MORPHOLOGICAL INDICATORS OF SPERM OF BULL-SIRES OF BEEF BREEDS

Boiko E.V.¹, Koropets L.A.²

¹Institute of animals breeding and genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS,
Pogrebnjaka str., 1, Chubinsky Region, Boryspil District, Kyiv Region, Ukraine, 08321

²National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
Heroiv Oborony str., 15, Kyiv. Ukraine, 03041

Abstract. *As a result of the studies, the differentiation of pathological forms of sperm of bulls-sires of beef breeds, as well as their relationship with the main quantitative and qualitative indicators of sperm, was established.*

Keywords: *bulls-sires, sperm, pathological forms of sperm, primary sperm abnormalities, secondary sperm abnormalities.*

УДК 57.081.23:636.4.082.231

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА КАК МЕТОДА ОЦЕНКИ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ОСОБЕННОСТЕЙ ВОЛОСЯНОГО ПОКРОВА И ПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ СВИНОМАТОК ПОЛТАВСКОЙ МЯСНОЙ ПОРОДЫ

Гарская Н.А.¹, Перетяцько Л.Г.²

¹Луганский национальный аграрный университет, 91008, г. Луганск-8, городок ЛНАУ
E-mail: Natalya_G@bk.ru, тел.: +38(099)239-19-71

²Институт свиноводства и агропромышленного производства НААН, 36006, г. Полтава-6, ул. Шведская могила, 1.
E-mail: lidipll@mail.ru, тел.: +38(050)655-05-30

Аннотация. *В статье приводятся материалы собственных исследований с использованием кластерного анализа, проведенного по показателям волосяного покрова, показателям продуктивности, отдельно и в общем. Исследования проводились на племенных свиноматках полтавской мясной породы различных семейств. Установлена целесообразность использования метода кластерного анализа, для выявления подобия и отдаленности семейств свиноматок, с целью совершенствования зоотехнической и селекционной работы.*

Ключевые слова: *кластерный анализ, волосяной покров, продуктивные качества, свиноматки, полтавская мясная порода.*

Введение. У сельскохозяйственных животных волосяной покров является одним из важных экстерьерных признаков, характеризующих конституциональную крепость организма, которая тесно связана с генотипом, физиологическим состоянием организма, условиями окружающей среды, адаптационными особенностями и т.д. Животные с ослабленной конституцией характеризуются низкой продуктивностью, слабым здоровьем, они малоценны в хозяйственном отношении, особенно в условиях промышленной технологии [1]. Характер изменчивости волосяного покрова связан с продуктивностью сельскохозяйственных животных [2]. Известно, что у свиней повышенная оброслость является нежелательной, так как свидетельствует о низкой продуктивности животных.

Точность оценки и последующий отбор для воспроизводства наиболее ценных маток, отличающихся крепостью здоровья, способностью выполнять основные жизненные предназначения - производство продукции и потомства, может стать источником повышения генетического потенциала животных

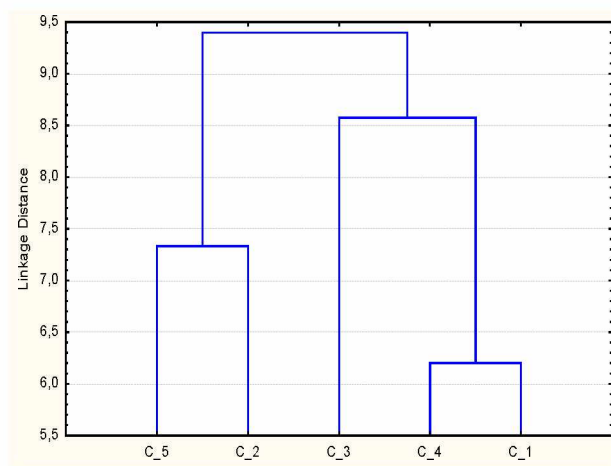
Цель исследования - изучить взаимосвязи между показателями волосяного покрова племенных свиноматок полтавской мясной породы различных семейств и продуктивными качествами.

Материалы и методы исследования. Исследования были проведены на чистопородном поголовье основных свиноматок полтавской мясной породы пяти семейств ООО «Племзавод «Беловодский»» Луганской области, Украина. Отбирали для исследования холостых, клинически здоровых животных, одного возраста по принципу пар-аналогов ($n=23$). Особенности волосяного покрова свиноматок изучали согласно методике Кацы Г.Д. (2003) [3]. Данные о генотипе и продуктивности свиноматок были взяты из материалов племенного и зоотехнического учёта. Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ «Statistika-7».

Результаты исследований и их обсуждение. С целью проведения эффективной селекции, особенно высокопродуктивных животных, оказывающих огромное влияние на результативность отбора и темпы генетиче-

ского прогресса стада, нами был использован кластерный анализ для установления взаимосвязей в межсеме́йственных различиях.

Дендрограмма с результатами кластерного анализа свиноматок полтавской мясной породы в зависимости от особенностей структуры волосяного покрова (рис. 1), показывает, что в зависимости от комплекса особенностей структуры волосяного покрова свиноматок полтавской мясной породы наиболее отдалёнными от других являются животные семейства Ворсклы: реальное расстояние составило с семейством Росинки - 19,8, с семейством Быстры - 18,9, с семейством Лигустры - 8,6, с семейством Дорзы - 12,3. Наиболее подобными по комплексу признаков волосяного покрова являются свиноматки семейств Дорзы и Лигустры (реальное расстояние составило 6,2). Изолированную позицию занимают семейства Быстры и Росинки, являясь подобными (реальное расстояние составило 7,3).



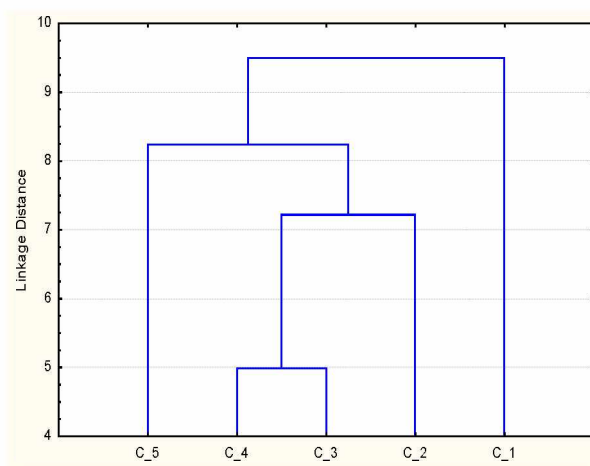
Номер семейства:

C_1 – Дорза, C_2 – Быстра, C_3 – Ворскла, C_4 – Лигустра, C_5 – Росинка

Рисунок 1. Дендрограмма с результатами кластерного анализа свиноматок полтавской мясной породы в зависимости от особенностей структуры волосяного покрова. Квадрат евклидова расстояния.

Таким образом, не смотря на одинаковую породную принадлежность, технологические и природно-климатические условия существует чёткое группирование в границах изученных семейств – все они по признакам особенностей волосяного покрова (или конституциональной кре-

пости), выявились разными.



Номер семейства:

C_1 – Дорза, C_2 – Быстра, C_3 – Ворскла, C_4 – Лигуэтра, C_5 – Росинка

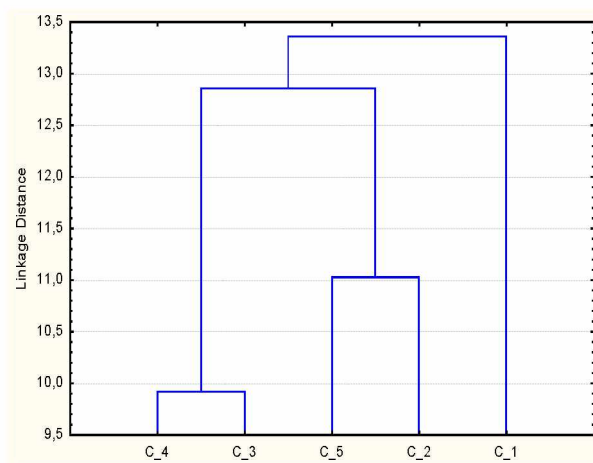
Рисунок 2. Дендрограмма с результатами кластерного анализа свиноматок полтавской мясной породы в зависимости от продуктивных качеств. Квадрат евклидова расстояния.

Отличное группирование наблюдается если подвергнуть кластерификации тех же свиноматок полтавской мясной породы, но в зависимости только от продуктивных качеств (рис. 2). Наиболее изолированным по комплексу продуктивных признаков является семейство Дорзы. При этом следует отметить, что с семейством Лигуэтры, с которой наблюдалось наибольшее подобие по волосяному покрову, по продуктивным признакам наблюдается наибольшее отдаление (реальное расстояние составило 17,7). Так же наблюдается значительное отдаление с семействами Быстры и Ворсклы (реальное расстояние – 17,1). Самыми похожими являются семейства Ворсклы и Лигуэтры (реальное расстояние – 5,0).

Таким образом, селекционно-племенная работа, нацеленная только на повышение продуктивных качеств в общем, без учёта специфики отдельных семейств будет неизменно приводить к изменениям в конституциональных особенностях животных. Длительный отбор только по прямым показателям продуктивности потеряет селекционную целесообразность в силу возможности выбытия животных из стада и селекционного процесса.

Для улучшения селекционных мероприятий в данном хозяйстве,

нами был проведён кластерный анализ формирования групп с учётом и конституциональной крепости и продуктивных качеств (рис.3).



Номер семейства:

C_1 – Дорза, C_2 – Быстра, C_3 – Ворскла, C_4 – Лигустра, C_5 – Росинка

Рисунок 3. Дендрограмма с результатами кластерного анализа свиноматок полтавской мясной породы в зависимости от особенностей структуры волосяного покрова и продуктивных качеств. Квадрат евклидова расстояния.

Целесообразным будет группирование семейств Ворсклы и Лигустры, а также Быстры и Росинки. Данные семейства наиболее подобны т.к. реальные расстояния составляют 9,9 и 11,0 соответственно. Однако при этом между семействами Ворсклы и Росинки отмечается наибольшая «непохожесть» (реальное расстояние 21,7). Наиболее отдалённым от других семейств является семейство Дорзы. Так реальное расстояние между семейством Дорзы и Быстры составляет 19,4, а Дорзы и Лигустры – 18,7. т.е. селекционные мероприятия следует разрабатывать семейства Дорзы индивидуально.

Заключение. В качестве прогностического признака успешности ведения селекционно-племенной работы необходимо использовать комплексный подход. Он должен базироваться на данных, с учётом проявления взаимосвязей как продуктивных качеств, так и качеств, отвечающих за биологические особенности организма.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Комлацкий В.И. Конституция, экстерьер и этология свиней : учебное пособие / В. И. Комлацкий, Л. Ф. Величко. – Краснодар : Куб. гос. аграрный ун-т, 2008. – 59 с.
2. Інтер'єр сільськогосподарських тварин: Навч. посібник / Й. З. Сірацький [та ін.]. – К. : Вища освіта, 2009. - 280 с.
3. Кацы Г. Д. Методы оценки защитных систем организма млекопитающих / Г. Д. Кацы, Л. И. Коюда // Учебно-методическое пособие. - Луганск : Элтон-2, 2003. - 95 с.

USING CLUSTER ANALYSIS AS A METHOD FOR OF ASSESSING INTERCONNECTIONS OF THE FEATURES OF A HAIR'S COVER AND PRODUCTIVE QUALITIES OF THE SOWS OF POLTAVA MEATY BREED

Garskay N.A.¹, Peretiatko L.G.²

¹Lugansk National Agrarian University, the town of LNAU, 1, Lugansk, 91008.
E-mail: Natalya_G@bk.ru, tel.: +38(099)239-19-71

²Institute of Pig Breeding and agroindustrial production NAAS of Ukraine, st. Swedish
grave, 1, Poltava, Ukraine, 36006.
E-mail: lidipll@mail.ru, tel.: +38(050)655-05-30

Abstract. *The article presents the materials of their own research using cluster analysis conducted on the indicators of hair's cover, productivity indicators, separately and in General. Studies were conducted on sows of Poltava meaty breed of different families. The feasibility of using the cluster analysis method to identify the similarity and distance of sow families with the aim of improving zootechnical and breeding work has been established.*

Keywords: *cluster analysis, hair's cover, productive qualities, sows, Poltava meaty breed.*

ИММУНОКОРРЕКЦИЯ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ СВИНОМАТОК

Гладких Л.П.¹, Семенов В.Г.², Никитин Д.А.², Успешный А.В.²

¹ЗАО «Прогресс», Чебоксарского района, Чувашской Республики, ул. Центральная, 14, дер. Яныши, 429523

²ФГБОУ ВО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия», ул. К. Маркса, 29, г. Чебоксары, 428003,
E-mail: semenov_v.g@list.ru

***Аннотация.** Проведена оценка эффективности применения иммуностимулирующих препаратов PigStim-C и PigStim-M супоросным свиноматкам. Установлено, что применение супоросным свиноматкам иммуностимулирующих препаратов PigStim-C и PigStim-M в дозе 5,0 мл трехкратно за 24, 17 и 10 суток до опороса способствует лучшему течению опороса, профилактике болезней послеродового периода, увеличению количества живорожденных поросят, их сохранности и стимуляции роста в период подсоса.*

***Ключевые слова:** свиноматки, поросята-сосуны, иммуностимулирующие препараты PigStim-C и PigStim-M, многоплодие, сохранность.*

Введение. Свиноводство в современных условиях характеризуется ритмичностью производства, равномерными круглогодовыми опоросами, последовательностью формирования технологических групп, комплексной механизацией и автоматизацией, отдельно-цеховой организацией труда и стандартизацией выпускаемой продукции. Технологические группы, формирующиеся при осеменении свиноматок, проходят все фазы производственного цикла до реализации откормочного поголовья на убой и отличаются высокой степенью стандартизации поголовья. Все это повышает эффективность отрасли свиноводства, упрощает работу обслуживающего персонала, но, вместе с тем, приводит к несоответствию условий среды обитания физиологическим потребностям организма и, как результат, высокой заболеваемости и снижению продуктивности свиноголовья. Особого внимания требуют к себе свиноматки, являющиеся основой формирования технологических групп. Существующие приемы содержания свиноматок подразумевают недостаточность рациона, синхронизацию половых циклов и нередко приводят к необходимости оказания родовспоможения и возникновению послеродовых осложнений. Ветеринарные

специалисты для профилактики и терапии болезней послеродового периода применяют разные средства этиотропной, патогенетической и заместительной терапии, но эффективность их часто оказывается недостаточной [2, 4]. В свете вышеизложенного, учеными Чувашской государственной сельскохозяйственной академии разработаны препараты серии PigStim, обладающие комплексным иммуностимулирующим и антибактериальным действием [1, 3].

Цель работы – реализация репродуктивных качеств свиноматок и продуктивного потенциала молодняка иммуностимулирующими препаратами.

Материал и методика исследований. Научно-исследовательская работа проведена в условиях свиноводческого комплекса ЗАО «Прогресс» Чебоксарского района ЧР. Объектами исследований были основные свиноматки и полученные от них поросята-сосуны и отъемыши. По принципу пар-аналогов были подобраны три группы супоросных свиноматок по 10 голов (контрольная, 1-я опытная и 2-я опытная).

Для определения роли иммунокоррекции в профилактике болезней послеродового периода и реализации репродуктивных качеств, свиноматкам 1-й опытной группы внутримышечно инъектировали иммуностимулирующий препарат PigStim-C в дозе 5,0 мл трехкратно за 24, 17 и 10 суток до опороса. Свиноматкам 2-й опытной группы инъектировали иммуностимулирующий препарат PigStim-M в те же сроки и в тех же дозах.

PigStim-C – комплексный иммуностимулирующий **препарат для реализации биологического потенциала сельскохозяйственных животных.**

PigStim-M – комплексный препарат для стимуляции неспецифической резистентности организма, профилактики заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных.

Результаты исследований и их обсуждение. Наблюдением за течением опороса и подсосным периодом выявлено, что у некоторых свиноматок подопытных групп возникли отклонения от нормального течения опороса, и им потребовалось родовспоможение. Так, в контрольной группе самостоятельно опоросились 6 свиноматок, четверым потребовалась помощь ветеринарного врача, в 1-й и 2-й опытных группах самостоятельно опоросились по 8 голов. В послеродовом периоде у некоторых свиноматок зарегистрированы воспалительные болезни репродуктивных органов – эндометриты. Так, в контрольной группе зафиксировано 5 случаев заболеваний

эндометритом, а в 1-й и 2-й опытных группах, соответственно 3 и 2 случая. Течение заболеваний во всех группах было аналогичным, терапия была комплексной, идентичной и эффективной. Таким образом, установлено, что применение супоросным свиноматкам иммуностропных препаратов PigStim-C и PigStim-M предупреждает осложнения опороса и профилактирует болезни послеродового периода.

Результаты анализа репродуктивных качеств свиноматок представлены в табл. 1.

Как видно из таблицы, у свиноматок 1-й и 2-й опытных групп количество живорожденных поросят было на 0,2 и 0,4 головы больше, но разница величин сравниваемых показателей была статистически недостоверной. Кроме того, в 1-й и 2-й опытных группах количество поросят при отъеме так же было больше на 0,4 и 0,6 голов, причем разница у показателя 2-й опытной группы была статистически достоверной. Выявленный факт обусловил большую сохранность поросят в опытных группах. Так, сохранность поросят в период подсоса в контрольной, 1-й и 2-й опытных группах составила $96,92 \pm 1,90$ %, $98,34 \pm 1,66$ и $98,58 \pm 1,42$ % соответственно.

Таблица 1. Репродуктивные качества свиноматок

Показатель	Группа		
	контрольная	1-я опытная	2-я опытная
Количество свиноматок, гол.	10	10	10
Многоплодие, гол.	$12,2 \pm 0,58$	$12,4 \pm 0,51$	$12,6 \pm 0,51$
Возраст отъема поросят, сут.	25	25	25
Количество отнятых поросят, гол.	$11,8 \pm 0,49$	$12,2 \pm 0,58$	$12,4 \pm 0,40^*$
Сохранность, %	$96,92 \pm 1,90$	$98,34 \pm 1,66$	$98,58 \pm 1,42$
Падеж, %	$3,08 \pm 1,90$	$1,66 \pm 1,66^*$	$1,42 \pm 1,42^*$
Живой вес при отъеме, кг	$7,6 \pm 0,07$	$7,78 \pm 0,09$	$7,86 \pm 0,08$

* $P < 0,05$.

Результаты взвешивания поросят при отъеме свидетельствуют, что поросята опытных групп имели большую живую массу, чем контрольные

сверстники. Так, живая масса поросят контрольной группы была равна $7,6 \pm 0,07$ кг, тогда как 1-й и 2-й опытных групп – $7,78 \pm 0,09$ и $7,86 \pm 0,08$ кг соответственно, что на 0,18 и 0,26 кг или на 2,4 и 3,4 % больше контрольного значения.

Заключение. Таким образом, можно заключить, что применение супоросным свиноматкам иммуностропных препаратов PigStim-C и PigStim-M в дозе 5,0 мл трехкратно за 24, 17 и 10 суток до опороса способствует лучшему течению опороса, профилактике болезней послеродового периода, увеличению количества живорожденных поросят, их сохранности и стимуляции роста в период подсоса.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гладких, Л.П. Иммунокоррекция организма в реализации биоресурсного потенциала свиней / Л.П. Гладких, Д.А. Никитин, В.Г. Семенов // Молодежь и инновации: мат. XIII всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов.- Чебоксары, 2017.- С.73-77.
2. Прокопьева, М.В. Премиксы – перспектива развития и сохранности животноводства / М.В. Прокопьева, О.П. Нестерова, Н.В. Середа // Научно-образовательные и прикладные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции: мат. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 20-летию первого выпуска технологов сельскохозяйственного производства.- Чебоксары, 2018.- С.331-337.
3. Семенов, В.Г. Роль иммунокоррекции организма свиней в реализации продуктивного потенциала / В.Г. Семенов, А.Ф. Кузнецов, Д.А. Никитин, Л.П. Гладких // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.- СПб, 2017.- №4.- С.103-105.
4. Хохлов, А.М. Воспроизводительные качества в зависимости от биологических и технологических факторов / А.М. Хохлов, Д.И. Барановский // Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии.- Кокино, 2017.- №3(61).- С.37-41.

IMMUNOCORRECTION IN REALIZATION OF REPRODUCTIVE QUALITIES OF SOWS

Gladkih L.P.¹, Semenov V.G.², Nikitin D.A.², Uspeshnyi A.V.²

¹ ЗАО «Progress»
Centralnaya St., 14, village of Yanyshi, 429523
² Chuvash State Agricultural Academy,
K. Marx St., 29, Cheboksary, 428003

Abstract. The assessment of efficiency of use the immunotroph preparation PigStim-C and PigStim-M to pregnant sows is carried out. It is established that use pregnant a sow the immunotroph preparation PigStim-C and PigStim-M in a dose of 5.0 ml is triple in 24, 17 and 10 days prior to a farrow promotes the best current of a farrow, prevention of diseases of a puerperal period, increase in quantity of live-born pigs, their safety and stimulation of growth in the period of a suction

Keywords: sows, pigs, the immunotroph preparation PigStim-C and PigStim-M, safety.

КРИБАНК СПЕРМЫ ТРУТНЕЙ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Гулов А.Н.¹, Сайфутдинова З.Н.²

¹ФГБНУ ФНЦ пчеловодства, ул. Почтовая, 22, г. Рыбное, Рязанская обл., РФ, 391110

²ФГБНУ ФНЦ ВНИИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, ул. Рязанский пр-т, 24, к. 1, г. Москва, РФ, 109428

E-mail: blee3@yandex.ru

Аннотация. Осуществлен анализ состояния криобанка спермы трутней медоносных пчел породного типа “Приокский” среднерусской породы пчел. Проведена сравнительная оценка проб спермы 2013, 2011 и 1993 гг закладки на криохранение. Диагностику *in vitro* осуществляли методом флуоресцентной микроскопии и быстрого дифференциального окрашивания. По результатам оценки все исследуемые образцы обладали достаточно высокой жизнеспособностью сперматозоидов 71-93 %. При оценке интактных и поврежденных сперматозоидов выявлены массовые деформации их головок 25-46 % в одной пробе.

Ключевые слова: криоконсервация, жизнеспособность сперматозоидов.

Введение. Метод низкотемпературного замораживания спермы трутней решает задачи по сохранению генетических ресурсов медоносной пчелы и необходим для проведения селекционных исследований. Но, медоносная пчела единственный объект, для которого эти методы находятся на стадии экспериментальной разработки [1]. Использование криоконсервированной спермы обеспечивает ветеринарную и эпидемиологическую безопасность в пчеловодстве, связанную с переносом микро- и макропаразитов [2].

Одним из условий успешного криосохранения по данной технологии является применение питательной среды С46 в качестве разбавителя спермы [3]. Основное предназначение среды С46 – культивирование постоянных линий клеток беспозвоночных. К среде С46 удалось адаптировать линии клеток дрозофилы: 67j25D, Dh14, Dh15, Dh33, Dv3g, S#3, S#2, S#1, D1, D2; тутового шелкопряда *Bombyx mori* Bm и Bm N; комаров *Aedes aegypti* Mos 20 A, *Aedes albopictus* Aa (C/6); шинельной моли *Spodoptera frugiperda* Sf9 (IPRL-21) [3]. Среду С46 обогащают добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (2-10 %) [4].

Метод длительного хранения спермы трутней в жидком азоте до конца не оптимизирован, так же как по-прежнему не изучен механизм ее консервации в семяприемнике пчелиной матки [5,6]. Недостаточно исследован вопрос о влиянии режима размораживания спермы на ее биологические характеристики [6]. На сегодняшний день до конца не выяснена целесообразность применения центрифугирования для удаления криопротектора из спермы.

Цель работы - анализ состояния спермы трутней после 5, 7 и 25 лет хранения в жидком азоте. Планировалось решить следующие задачи – выявить динамику показателей жизнеспособности сперматозоидов с момента оттаивания пробы до осеменения, установить влияние центрифугирования на качественные показатели спермы.

Материал и методика исследований. Для исследований использовали пробы замороженной спермы: 2013 г консервации в пропиленовой соломинке с объемом разбавленной спермы 30 мкл; 2011 г в криопробирке Nunc (1 мл) с объемом разбавленной спермы 100 мкл; 1993 г (два образца) в криопробирках Nunc (1 мл) с объемом разбавленной спермы по 100 мкл каждая. Размораживание образцов проводили в водяной бане при температуре 34 °С в течение 10 с, а одну пробу 1993 г при температуре 40 °С в течение 30 с [7]. Через 10 мин после водяной бани, когда в пробирке Nunc полностью растаял лед, образец делили на две равные части и переносили в стерильные пробирки Eppendorf (1,5 мл). Затем, в каждую из них добавляли по 500 мкл свежей питательной среды С46 и тщательно перемешивали.

Первую половину образца готовили для осеменения методом однократного центрифугирования в режиме 20 мин/1100 об [8]. Вторую половину готовили по методике [7]. Пробу 2013 г не подвергали центрифугированию по причине малого объема спермы.

Жизнеспособность сперматозоидов исследовали методом флуоресцентной микроскопии [9]. Исследование проводили на биологическом световом микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 LED (ООО «Альтами», Россия) при увеличении 400×. Всего подсчитывали 200 сперматозоидов. С целью визуализации интактных и поврежденных сперматозоидов использовали набор дифференциального окрашивания Diff Quick (НПФ «АБРИС+»,

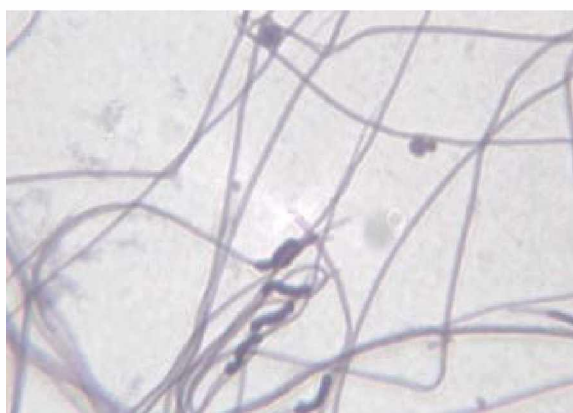
Россия). Микроскопирование образцов осуществляли с использованием масляной иммерсии при увеличении 1000×. Подсчитывали 200 сперматозоидов.

Результаты исследований и их обсуждение. После 10 с размораживания, полное оттаивание спермы произошло только в образце 2013 г. В остальных пробах, включая 1993 г с режимом оттаивания 40 °С 30 с, лед полностью растаял не через 5 мин, как было указано в методике [7], а лишь спустя 10 мин с момента размораживания. При этом все исследуемые образцы, обладали достаточно высокой жизнеспособностью сперматозоидов (табл. 1).

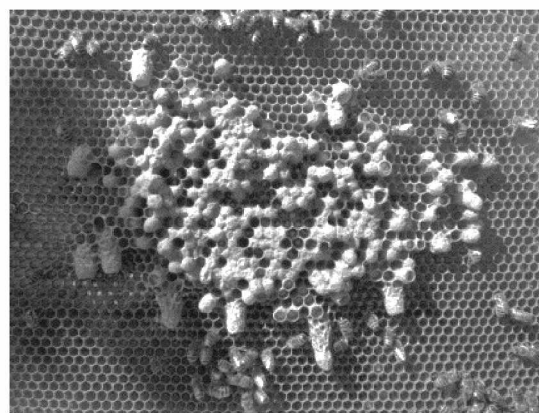
Таблица 1. **Качественные показатели спермы после длительного хранения в жидком азоте (лабораторный опыт)**

Показатели	Год криоконсервации пробы спермы			
	2013	2011	1993	1993 (40 °С, 30 с)
Жизнеспособность, %	71	88	93	85
Деформация головок, %	41	25	31	46

Интересно отметить, что более высокие показатели по жизнеспособности 93% были в пробе спермы, наиболее длительно хранившихся в жидком азоте (25 лет), это свидетельствует о том, что длительность криохранения не влияет на этот показатель. При оценке интактных и поврежденных сперматозоидов выявлены массовые деформации их головок (рис. 1).



а)



б)

Рисунок 1. Деформации головок сперматозоидов (а; (Гулов Рисунок 1.jpg) и качество печатного расплода матки, осемененной заморожено-оттаянной спермой (б; (Гулов Рисунок 2.jpg)

Наиболее низкий процент выживаемости (71%) и наиболее высокий процент по деформации головок (41%) был зафиксирован в пробе 2013 года.

В наших экспериментах было выявлено, что большое влияние на жизнеспособность оказывают процессы замораживания и оттаивания. Отметим, что проба 2013 г хранилась в соломинках, в отличие от проб 2011 и 1993 гг. Снижение жизненного ресурса спермы на 9-10 % произошло в образцах 1993 г после первых 3 мин центрифугирования, а предварительная инкубация образцов в свежей среде С46 в течение 10 мин позволила приблизить жизнеспособность сперматозоидов к исходным показателям (табл. 2).

Таблица 2. Влияние центрифугирования на жизнеспособность сперматозоидов (лабораторный опыт)

Год криоконсервации пробы	Жизнеспособность, %		
	Первые 3 мин / 3000 об	Вторые 3 мин / 3000 об (с предваритель- ной инкубацией)	20 мин / 1100 об
2011	96	97	95
1993	83	89	86
1993 (40 °С, 30 с)	76	82	42

Другая тенденция наблюдалась в пробе 2011 г. Добавление среды С46 после размораживания способствовало стабильному повышению жизненного ресурса спермы.

Полученные результаты (табл. 2) позволяют заменить двукратное центрифугирование однократным в режиме 20 мин/1100 об. При условии обязательной предварительной инкубации спермы в свежей среде в течение 10 мин. Резкое снижение жизнеспособности сперматозоидов образца 1993 г (40 °С, 30 с) после однократного центрифугирования можно объяснить недостаточным инкубированием оттаянной спермы в свежей среде С46.

Заключение. Предлагаемый метод криоконсервации [7], действительно, обеспечивает сохранение 80-95% жизнеспособных сперматозоидов после длительного хранения в жидком азоте в течение 10 лет и более.

Но, показатель жизнеспособности сперматозоидов не является достаточно объективным. Количество живых сперматозоидов в пробе до осеменения не всегда коррелирует с их оплодотворяющей способностью после осеменения маток [10].

Требуется дальнейшая разработка вопроса о механизме отбора и выживаемости сперматозоидов трутней в половых путях и семяприемнике пчелиной матки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-44-620001).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Какпаков В.Т., Кабашова О.В. Криогенетика гамет, соматических клеток и эмбрионов насекомых. Мат. Межд. конф. «Сохранение генетических ресурсов» // Цитология-2005. т.46, 9: 798.
2. Какпаков В.Т., Кабашова О.В., Бородачев А.В., Какпакова Е.С. Криобанк спермы трутней медоносной пчелы//Пчеловодство-1993. 8: 4-6.
3. Пинаев Г.П., Богданова М.С. Методы культивирования клеток//Спб.: Изд-во Политехн. ун-та-2008.
4. Какпаков В.Т. Получение и характеристика культур соматических клеток дрозофилы//Докт. дисс. М.-1989.
5. Лазарева Л.Н. Влияние биодобавок на хранение спермы трутней при положительных температурах//В сб. НИИР по пчеловодству. Киров- 2014:164-168.
6. Paillard M. Preservation of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Semen//Canada- 2016:1-7 Режим доступа: www.theses.ulaval.ca/2016/32724/32724.pdf. Без даты.
7. Бородачев А.В., Кабашова О.В. Технология длительного хранения спермы трутней в жидком азоте//ГНУ НИИП РАСХН-2007:26 с.
8. Collins A. M. A scientific note on the effect of centrifugation on pooled honey bee semen // Apidologie-2003. 34:469-470 (doi: 10.1051/apido/2003030).
9. Locke S. J., Peng Y.S., Cross N. L. A supravital staining technique for honey bee spermatozoa//Physiological Entomology-1990. 15:187-192 (doi: 10.1111/j.1365-3032.1990.tb00506.x).
10. Гулов А.Н. Воспроизводительные способности инструментально осемененных маток // Пчеловодство - 2018. 4:13-15.

HONEY BEE DRONE SPERM CRYOBANK

Gulov A.N.¹, Sayfutdinova Z.N.²

¹FSBSI FBC, Pochtovaya st., 22, Rybnoe, Ryazan region, 391110 Russia.

²FSBSI FSC VIEV, Ryazansky prospect, 24, b. 1, Moscow, 109428 Russia.

E-mail: blee3@yandex.ru

Abstract. *The analysis of honeybee semen of condition in the cryobank of pedigree type "Prioksky" of the central-russian bee breed. The sperm a comparative evaluation samples of 2013, 2011 and 1993 years on the cryopreservation. In vitro diagnostics was carried out by fluorescence*

microscopy and rapid differential staining. According to the results of the evaluation, all the studied samples had a sufficiently high viability of spermatozoa 71-93%. Mass deformations of spermatozoa heads when evaluating intact and damaged their, were found 25-46% in one sample.

Keywords: cryopreservation, viability of spermatozoa.

УДК 636.2:612.621

УЧАСТИЕ ПРОГЕСТЕРОНА В АКТИВАЦИИ КАПАЦИТАЦИИ И ОСВОБОЖДЕНИИ Ca^{2+} ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ

Денисенко В.Ю.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московское шоссе, д. 55а, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, РФ, 196601
E-mail: den.vitaly2016@yandex.ru

Аннотация. С помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклин (ХТЦ) изучали участие прогестерона в активации капацитации и освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо в сперматозоидах быков. В обработанных прогестероном (1 мкг/мл) сперматозоидах добавление отдельно ГДФ, ГТФ, dbcAMP и пролактина (ПРЛ) стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. При совместном действии dbcAMP и ГТФ, ПРЛ и ГДФ, ПРЛ и ГТФ в присутствии прогестерона отсутствовал дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. В то же время совместное действие dbcAMP и ГТФ стимулирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. С помощью ХТЦ-теста, показывающего местоположение флуоресценции хлортетрациклина в сперматозоидах, исследовали распределение сперматозоидов на группы, имеющие различный функциональный статус — некапацитированные (образец F), капацитированные (образец B) и акросома-реактивные (образец AR). Было показано, что инкубация в присутствии прогестерона в течении 4 час. при добавлении отдельно ГДФ, ГТФ, dbcAMP и ПРЛ не влияла на соотношение в количестве клеток (образцы F, B и AR). После совместной инкубации в течении 4 час. dbcAMP и ГДФ, ПРЛ и ГДФ, а также ПРЛ и ГТФ во всех изученных группах не отмечали изменения в соотношении числа клеток в образцах F, B и AR. В то же время инкубация сперматозоидов в присутствии dbcAMP и ГТФ приводила к снижению количества некапацитированных (образец F) и акросома-реактивных клеток (образец AR) и повышала число капацитированных сперматозоидов (образец B). Таким образом можно предположить, что прогестерон оказывает влияние на капацитацию, увеличивая количество капацитированных сперматозоидов и освобождение Ca^{2+} из депо при инкубации клеток в присутствии dbcAMP и ГТФ.

Ключевые слова: прогестерон, капацитация, сперматозоиды быков, кальций, внутриклеточные депо.

Введение. Капацитация и акросомная реакция в сперматозоидах являются важными внутриклеточными процессами, предшествующими оплодотворению. В сперматозоидах млекопитающих кальций играет важную роль в активации процессов акросомной реакции и капацитации и необходим для успешного оплодотворения [4]. Показано, что капацитация спермы быков зависит от Ca^{2+} и связана с увеличением внутриклеточного кальция [5]. В сперматозоидах млекопитающих внутриклеточный кальций запасается в акросомной везикуле на вершине головки и шейке спермы и ее средней части [3]. С помощью иммуноокрашивания на этих структурах обнаружены рецепторы к IP_3 на сперматозоидах быков. В то же время на сперме быков с помощью BODIPY-FLX рианоцина не показано наличие рецепторов к рианоцину [6].

Цель работы - исследование участия прогестерона в активации капацитации и освобождении Ca^{2+} из внутриклеточных депо в сперматозоидах быков.

Материал и методика исследований. В экспериментах использовали эякулят от разных быков, получаемый непосредственно перед работой. Измерение Ca^{2+} во внутриклеточных депо сперматозоидов быков проводили согласно методике, представленной в работе [1]. Условия проведения капацитации и оценка функционального статуса сперматозоидов соответствовали представленному в работе [7]. Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4-5 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. Важность для функционирования сперматозоидов Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны и входа внеклеточного Ca^{2+} уже признана, однако также имеются доказательства существования и функциональной важности внутриклеточных Ca^{2+} -запасающих органелл в сперме [2]. Ранее на сперматозоидах быков было показано, что ПРЛ и ГДФ активируют освобождение Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных внутриклеточных депо, а dbcAMP и ГТФ — из IP_3 -нечувствительных депо [1]. Присутствие дополнительного освобождения Ca^{2+} из депо свидетельствует о наличии связи и перемещении Ca^{2+} между различными депо — IP_3 -чувствительными и IP_3 -нечувствительными. В интактных сперматозоидах быков (в отсутствие прогестерона) дополни-

тельный выход Ca^{2+} из депо и увеличение количества капцитированных сперматозоидов быков происходило при взаимодействии dbcAMP и ГДФ, которые активируют различные внутриклеточные депо Ca^{2+} и обеспечивают перемещение Ca^{2+} между этими депо. В присутствии прогестерона дополнительное освобождение Ca^{2+} из депо происходит при взаимодействии dbcAMP и ГТФ, которые активируют выход Ca^{2+} из одного — IP_3 -нечувствительного депо. Таким образом, прогестерон прерывает перемещение Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо, и по-видимому, обеспечивает переход Ca^{2+} (дополнительный выход из депо) в пределах внутриклеточных депо одного типа (IP_3 -нечувствительные).

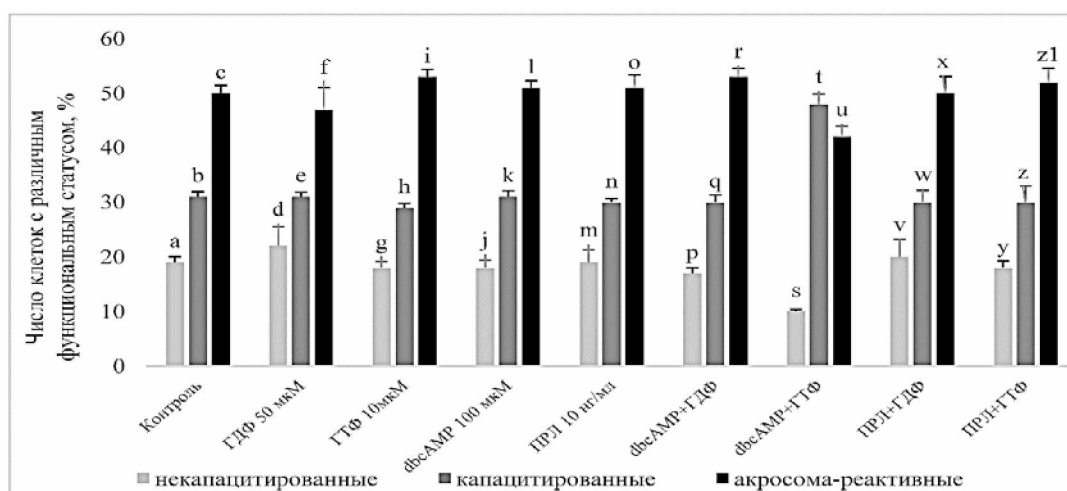


Рисунок 1. Влияние различных соединений на капцитацию сперматозоидов быков. Все клетки в экспериментах обработаны прогестероном (1 мкг/мл). Различия достоверны при s,j; s,g; t,k; t,h; u,l; u,i - $P < 0.001$.

Добавленные отдельно ГДФ, ГТФ, dbcAMP или ПРЛ не изменяли функциональный статус сперматозоидов. При совместной инкубации этих соединений только в присутствии dbcAMP+ГТФ отмечали уменьшение числа некапцитированных и акросома-реактивных клеток и увеличение количества капцитированных сперматозоидов (рисунок).

Использование отдельно ГДФ, ГТФ, dbcAMP или ПРЛ стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. В то же время дополнительный выход Ca^{2+} из депо отмечали только при совместном действии dbcAMP+ГТФ.

Выводы. Дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков в присутствии прогестерона происходит

только при совместном действии dbcAMP и ГТФ. Также прогестерон приводил к увеличению количества капацитированных сперматозоидов после совместной инкубации в присутствии dbcAMP и ГТФ.

Работа выполнена в соответствии с темой Минобрнауки России (Госзадание №АААА-А18-118021590132-9).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Денисенко В.Ю., Бойцева Е.Н., Кузьмина Т.И. Освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов *Bos Taurus* в зависимости от их функционального состояния // Цитология. – 2015. 57(3): 233-239.
2. Correia J., Michelangeli F., Publicover S. Regulation and roles of Ca^{2+} stores in human sperm // *Reproduction*. – 2015. 150(2): 65-76.
3. Costello S., Michelangeli F., Nash K., Lefievre L., Morris J., Machado-Oliveira G., Barratt C., Kirkman-Brown J., Publicover S. Ca^{2+} stores in sperm: their identities and functions // *Reproduction*. – 2009. 138(3): 425-437.
4. Darszon A., Nishigaki T., Beltran C., Trevino C.L. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa // *Physiological Reviews*. – 2011. 91: 1305-1355.
5. Handrow R., First N., Parrish J. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin // *Journal of Experimental Zoology*. – 1989. 252(2): 174-182.
6. Ho H.C., Suarez S.S. An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca^{2+} store is involved in regulating sperm hyperactivated motility // *Biology of Reproduction*. – 2001. 65(5): 1606-1615.
7. Ricart M. C., Breininger E., Rodriguez P. C. Participation of membrane adenylyl cyclase in heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa // *Andrology*. – 2015. 47(1): 30-36.

PARTICIPATION OF PROGESTERON IN THE CAPACITATION ACTIVATION AND RELEASE OF Ca^{2+} FROM EXTRACELLULAR STORES OF BOVINE SPERMATOZOA

Denisenko V.Yu.

All-Russian research institute of genetics and breeding of farm animals – the branch of Federal state budgetary scientific institution "Federal Research Center Livestock – AUIAB Academician L.K. Ernst, Moscow shosse, 55 a, Saint-Petersburg, Pushkin, 196601, Russia
E-mail: den.vitaly2016@yandex.ru

Abstract. *The participation of progesterone in the capacitation activation and the release of Ca^{2+} from intracellular stores in bovine spermatozoa with using of chlortetracycline (CTC) fluorescent probe was studied. In progesterone-treated ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$) spermatozoa, the addition of GDP, GTP, dbcAMP and prolactin (PRL) separately stimulated the release of Ca^{2+} from intracellular stores. The complex action of dbcAMP and GTP, PRL and GDP, PRL and GTP in the presence of progesterone did not cause the additional Ca^{2+} release from the intracellular store of bull sperm. At the same time, the combined action of dbcAMP and GTP stimulates the additional release of Ca^{2+} from intracellular stores. Using the CTC-test, which demonstrates the location of chlortetracycline fluorescence in spermatozoa, the distribution of spermatozoa into groups with different functional status was studied - uncapacitated (sample F), capacitated (sample B) and acrosome-reactive (sample AR). It was shown that incubation in the presence of progesterone for 4 hours when GDP, GTP, dbcAMP and PRL were separately added did not affect the ratio of cells (samples F, B and AR). After incubation for 4 hours with different substance combination: dbcAMP and*

GDP, PRL and GDP, as well as PRL and GTP did not notice a change in the cell ratio in samples F, B and AR in all studied groups. At the same time, incubation of spermatozoa in the presence of dbcAMP and GTP led to a decrease in the number of uncapacitated (sample F) and acrosome-reactive cells (sample AR) and increased the number of capacitated sperm (sample B). Thus, it can be assumed that progesterone has an effect on capacitation, increasing the number of capacitated spermatozoa and the release of Ca^{2+} from the stores during cell incubation in the presence of dbcAMP and GTP.

Keywords: progesterone, capacitation, bull sperm, calcium, intracellular stores.

УДК 576.64

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ РУБЦА RANGIFER TARANDUS И ВЫДЕЛЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНОГО ШТАММА С ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

**Дуняшев Т.П.¹, Ильина Л.А.¹, Лаптев Г.Ю.¹, Солдатова В.В.¹,
Йылдырым Е.А.¹, Филиппова В.А.¹, Лайшев К.А.²**

¹1000 «БИОТРОФ+», 196602, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ул. Малиновская, лит. А, 7-Н

²ФГБНУ «Северо-Западный Центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения»
196608, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, шоссе Подбельского, 7

Аннотация. В работе была исследована микробиота рубца северных оленей. По результатам молекулярно-генетического анализа методом NGS-секвенирования установлено, что в микробиоте рубца исследованных нами особей *Rangifer tarandus* было выявлено 25 бактериальных филумов. Значительное количество бактерий отнесено к филумам *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Spirochaetes*.

Из рубцовой жидкости 2х клинически здоровых северных оленей возрастом 1-2 года было выделено 63 бактериальных изолята. Для определения их перспективы в качестве основы для биопрепарата были изучены целлюлозолитические свойства. 29% - проявили высокую целлюлазную активность и разрушали целлюлозу до 62%. Кроме того, все изоляты показали высокий уровень биодеструкции микотоксинов.

Ключевые слова: северный олень, микрофлора рубца, кормовая добавка, NGS-секвенирование.

Введение. Известно, что рубец северных оленей населен симбиотическими микроорганизмами: бактериями, грибами, археями, простейшими. Микрофлора рубца северного оленя играет важную роль в ферментации растительных кормов [1-2]. Зимой рацион северного оленя на 70% со-

стоит из лишайников, которые очень токсичны для многих животных, например, для овец, коров из-за содержания в них усниновой кислоты – метаболита лишайников. К немаловажным функциям анаэробной микрофлоры рубца северных оленей относят ее способность к детоксификации вторичных фенольных метаболитов лишайников: усниновой кислоты и др. [3-4]. Современные знания о микробной экосистеме рубца жвачных в значительной степени основана на результатах исследования КРС, овец [5].

Целью работы являлось изучение микробиома рубца молодых и взрослых особей северных оленей *Rangifer tarandus* с применением молекулярно-генетических методов для использования полученных результатов в разработке кормовой добавки для сельскохозяйственных животных.

Материал и методика исследований. Объектом исследования были молодые (n=3) и взрослые (n=5) особи *Rangifer tarandus* Ненецкой породы. Состав бактериального сообщества рубца анализировали методом NGS (Next Generation Sequencing) в лаборатории компании ООО «БИО-ТРОФ+». Количество микотоксинов в подножных кормах определяли методом ИФА на микростриповом фотометре Stat Fax 303+.

Выделение штаммов бактерий с высокой целлюлозолитической активностью, антагонистическими свойствами в отношении патогенов и свойствами биодеструкции микотоксинов из рубцового содержимого от клинически-здоровых особей северного оленя методом посева суспензий рубцовой жидкости на селективные питательные среды.

Определение целлюлозолитической активности выделенных изолятов по методу Хендерсона, Хорвата и Блока в модификации Чюрлиса [6].

Результаты исследования и их обсуждение. Нами был проведен анализ растений на содержание микотоксинов. В результате количество микотоксинов в кормовой базе северного оленя оказалось высоким (табл. 1). В лишайниках микотоксинов выявлено меньше, чем в других растениях.

В микробиоте рубца исследованных нами особей *Rangifer tarandus* выявлено 25 филумов, значительное количество бактерий было отнесено к филумам *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Spirochaetes*. В меньшей степени в сообществе рубца оказались представлены бактерии филумов *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Euryarchaeota*, *Verrucomicrobia* и

Cyanobacteria. Остальные филумы составляют менее 1% от всего бактериального сообщества. Полученные результаты в целом соответствуют представлениям о микробиоте рубца как жвачных в целом, так и северных оленей.

Таблица 1. Количество микотоксинов в подножных кормах

Микотоксин	Количество микотоксинов, мг/кг							
	Cladonia	Nephroma	V. uliginosum	S. borealis	Смесь многолетних трав	B. pendula	B. nana	Смесь компонентов рациона
АФЛА	0,0051*	0,0033	0,1226	0,1285	0,0106	0,1111*	Исследование не проводили	0,0887***
ОТА	< п.д.о.**	< п.д.о.	0,0371*	0,0968	0,0007*	0,0895		0,041
Т-2	0,0385*	0,0179*	1,969*	1,021	0,0004	0,405		0,1058
ЗЕН	0,0365	0,1227	2,543*	2,444	0,1181	1,938		0,5172*
ДОН	0,003	0,15*	10,3	9,81	1,55*	< п.д.о.		1,7*
ЗЕН	0,0904	Исследование не проводили	0,4868*	1,251*	0,1937*	Исследование не проводили	1,7	0,7876*
ДОН	0,02*		0,13	2,6	1,02		33,8*	1,53

Известно, что ряд представителей таксонов *Bacteroidetes* и *Firmicutes* проявляют способность к детоксикации усниновой кислоты и других вторичных метаболитов, продуцируемых лишайниками. Кроме того, они синтезируют целлюлозолитические ферменты, способные расщеплять клетчатку, которая содержится в значительных количествах в растениях, входящих в состав кормовой базы северного оленя.

Из рубцовой жидкости 2х клинически здоровых северных оленей возрастом 1-2 года было выделено 63 бактериальных изолята. Для изучения их перспективы в качестве биопрепарата были изучены целлюлозолитические свойства. 29% - проявили высокую целлюлазную активность и разрушали целлюлозу до 62%.

Далее был проведен анализ биодеструкции микотоксинов изолятами микроорганизмов, выделенных из рубцовой жидкости оленя, с целью узнать, могут ли штаммы из рубцовой жидкости оленей разрушать микотоксины. Анализ показал, что биодеструкция микотоксинов достигала высоких значений по отношению к токсину Т-2 и афлатоксину. В целом все

изоляты показали высокий уровень разрушения микотоксинов. Был выявлен изолят, который разрушал все микотоксины до 87,5%.

Заключение. Таким образом, полученные результаты могут быть использованы при разработке кормовой добавки для сельскохозяйственных животных.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда для реализации научного проекта №17-76-20026 «Микробиоценоз рубца Rangifer tarandus Арктических регионов России как фундаментальная основа получения перспективных биотехнологий для сельскохозяйственных животных».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hungate R.E. The Rumen and its Microbes. - New York: Academic Press. 1996.
2. Тараканов Б.В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. - М.: Научный мир, 2006. – 188 с.
3. Orpin C.G., Mathiesen S.D., Greenwood Y., Blix A.S. Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*) // Applied and Environmental Microbiology. – 1985 – V. 50(1). - P.144-151.
4. Sundset M.A., Kohn A., Mathiesen S.D., Praesteng K.E. *Eubacterium rangiferina*, a novel acid-resistant bacterium from the reindeer rumen // Naturwissenschaften. – 2008. – V. 95. – P.721-749.
5. Jami E., Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals // PLoS ONE. – 2012. – V. 7(3): e33306.
6. Теппер Е.З., Шильникова В.К. - Практикум по микробиологии. - М.: Дрофа, 2004. – 165 с.

STUDY OF RANGIFER TARANDUS RUMEN MICROFLORA AND SELECTION OF HIGH-ACTIVE CELLULOLYTIC STRAIN OR DEVELOPMENT OF AGRICULTURAL ANIMALS FEED ADDITIVE

Dunyashev T.P.¹, Ilina L.A.¹, Laptev G.Y.¹, Soldatova V.V.¹, Yildirim E.A.¹,
Filippova V.A.¹, Laishev K.A.²

¹BIOTROF+ Ltd, Malinovskaya St., 8, liter A, 7-N, Pushkin, St Petersburg, 196602, Russia

²Northwest Center for Interdisciplinary Research of Food Security Problems,
Federal Agency of Scientific Organizations, 7, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg—Pushkin,
196608

Abstract. The microbiota of the rumen from 3 calves and 5 adult reindeer was examined. According to the results of molecular-genetic analysis, it was found that 25 phylums were identified in the rumen microbiota of the *Rangifer tarandus*, a rumen content of which was assigned to the phylums Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria and Spirochaetes. 63 isolates were isolated from rumen liquid of 2 clinically healthy reindeers aged 1-2 years. To study their prospects as a biological product, cellulolytic properties were studied. 29% of isolates showed high cellulase ac-

tivity and degraded cellulose to 62%. All isolates showed a high level of destruction of mycotoxins. One isolate destroyed all types of mycotoxins up to 87.5%.

Keywords: reindeer, rumen microbiome, feed additive, NGS-sequencing.

УДК 636.033: 579.62

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА И БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА МЯСА БРОЙЛЕРОВ НА ФОНЕ РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА

Дускаев Г., Яушева Е., Косян Д., Кван О., Рахматуллин Ш.

Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН,
ул. 9 Января, 29, г.Оренбург, РФ, 460000
E-mail: gduskaev@mail.ru

Аннотация. Исследованиями показано, что растительные экстракты, содержащие танины, могут улучшить питание и состояние здоровья сельскохозяйственных животных. Ввиду того, что есть зависимость активности танинов от источника, географического распространения, малоизученным является оценка их действия на изменение микробиоты кишечника и качество мяса животных. Экспериментальные исследования были проведены на 120 головах 7-дневных цыплят-бройлеров (4 группы, $n = 30$, в 4 повторениях). В состав рационов опытных групп был дополнительно включен экстракт *Quercus cortex*. Контрольная группа – основной рацион (ОР); I опытная – ОР+ экстракт 1 (1 мл/кг ж.м.); II опытная – ОР+ экстракт 2 (2 мл/кг ж.м.); III опытная – ОР+экстракт 3 (3 мл/кг ж.м.). Секвенирование содержимого образцов из кишечника проводилось на MiSeq Illumina (США). С увеличением концентрации экстракта снижается (I), а затем исчезают (II, III) микроорганизмы филума *Bacteroidetes*. В максимальной концентрации установлено снижение филума *Firmicutes* ($p \leq 0.05$), и увеличение *Proteobacteria* ($p \leq 0.05$). В этой же группе наблюдалось снижение представителей класса *Bacilli* ($p \leq 0.05$). В I и II группах отмечено снижение представителей класса *Clostridia* в сравнении с контрольной (на 14.6-50.5 %). Соотношение представителей микроорганизмов в кишечнике и биохимических значений в мясе зависит от количества танинсодержащих веществ в экстракте, что говорит о необходимости более подробного изучения данного фактора, как и источника данных веществ.

Ключевые слова: метагеном, микробиом, бройлер, мясо, экстракты растений.

Введение. Распространение резистентности микроорганизмов к действию различных антибиотиков привел к активному поиску веществ, способных ослабить или устранить данный эффект. Особенный интерес в

этой связи представляют собой растительные вещества и их отдельные компоненты. Многими исследованиями показано, что различные растительные экстракты, содержащие танины, может улучшить питание и состояние здоровья сельскохозяйственных животных, в том числе птицы [1.2]. Другие авторы отмечают, что включение танинсодержащих соединений в рацион питания положительно влияет на качество мяса бройлеров [3] в том числе улучшение здоровья кишечника и биоразнообразия микробиоты [4.5], подавляют активность нескольких видов кишечных патогенов [6.7]. Цель работы – оценка действия танинсодержащих веществ на изменение микробиоты кишечника биохимические значения мяса бройлеров.

Материал и методика исследований. Исследования были проведены в условиях ЦКП БСТ РАН на цыплятах-бройлерах «Смена-8». Экспериментальные исследования были проведены на 120 головах 7-дневных цыплят-бройлеров (4 группы, $n = 30$, в 4 повторениях). Контрольная группа – основной рацион (ОР); I опытная – ОР+ экстракт 1 (1 мл/кг ж.м.); II опытная – ОР+ экстракт 2 (2 мл/кг ж.м.); III опытная – ОР+ экстракт 3 (3 мл/кг ж.м.). Одновременно в состав рационов опытных групп был дополнительно включен экстракт *Quercus cortex*. Приготовление экстракта *Quercus cortex* включало в себя: измельчение (лекарственная форма), добавление дистиллированной воды (1:1), нагревание в водяной бане (30 мин.), процеживание и дополнительное фильтрование (фильтры обеззоленные). Содержание птицы и процедуры при выполнении экспериментов соответствовали требованиям инструкций и рекомендациям российского регламента (Приказ МЗ СССР 755 от 12.08.1977) и «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, Washington, D.C., 1996)». Были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшить число используемых образцов. Декапитации птицы под нембуталовым эфиром производили на 42-е сут. Оценка микробного биоразнообразия тонкого отдела кишечника птицы осуществлялась на 42 сутки и включала: отбор проб, выделение, очистку, измерение концентраций ДНК, проведение ПЦР, валидацию и нормализацию библиотек с последующим секвенированием на платформе высокопроизводительного секвенатора второго поколения MiSeq Illumina, США. Биоинформатическая обработка результатов осуществлялась с использованием

программы PEAR (Pair-End AssemblеR, PEAR v0.9.8, April 9, 2015). Жирнокислотный состав мышечной ткани —на газовом хроматографе Кристал-4000 Люкс («НПФ Мета-хром», Россия) и жидкостном хроматографе Люмахром («Люмэкс», Россия) (ГОСТ 51486-99), аминокислоты методом капиллярного электрофореза (система капиллярного электрофореза «Капель-105 М», Люмэкс). Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 10.0 RU.

Результаты исследований и их обсуждение. В слепом отделе кишечника у второй группы отмечено увеличение филума *Firmicutes* за счет представителей классов *Clostridia* и *Bacilli* и отсутствие представителей филума *Bacteroidetes*. В то же время в I и III группах отмечено высокое содержание представителей филума *Bacteroidetes* за счет семейства *Rikenellaceae*, в ранее проведенных исследованиях [7] наблюдался противоположный эффект за счет семейств *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*. Кроме того, Viveros et al. [8] обнаружили в слепом отделе кишечника бройлеров, получавших экстракты винограда, более высокую популяцию *Lactobacillus*, в нашем случае это наблюдалось лишь во второй группе.

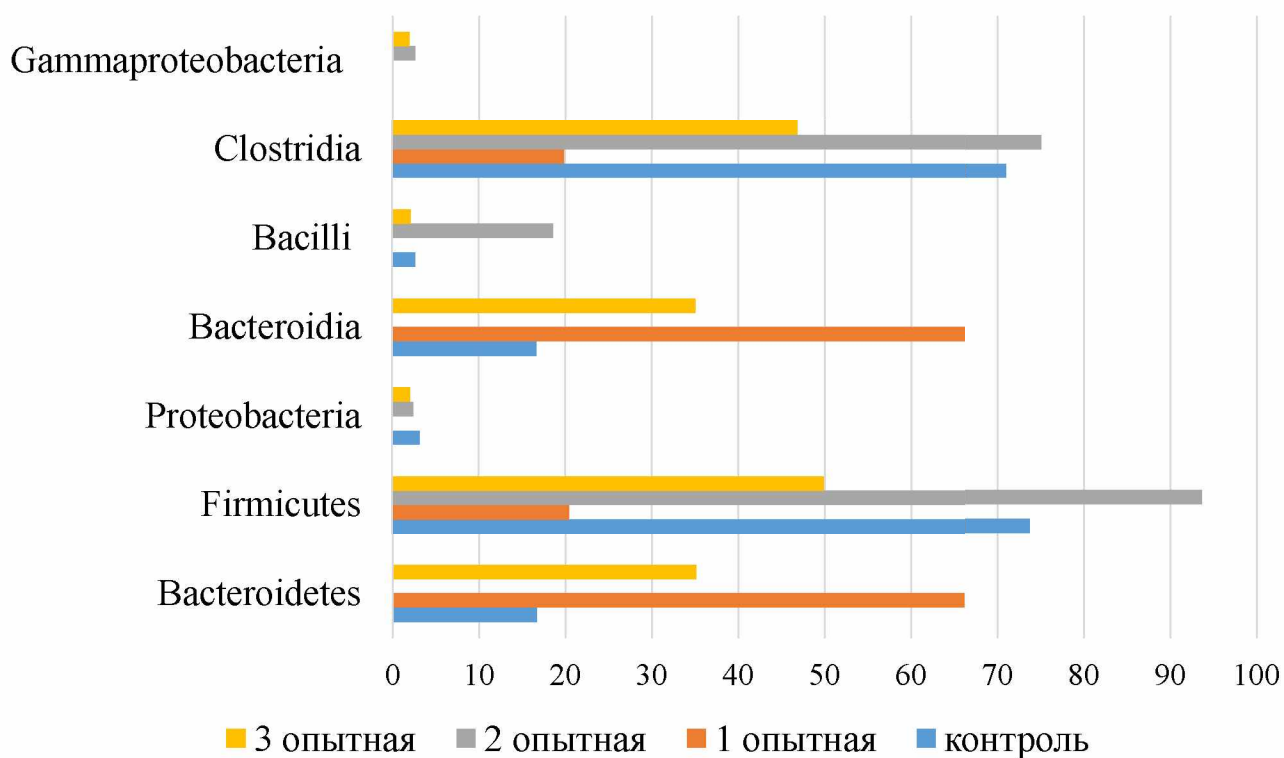


Рисунок 1. Количественное изменение филумов и классов бактерий в слепом отделе кишечника бройлеров, %

Анализ химического состава мышц показывает, что увеличение дозы экстракта в составе рациона II и III опытных групп приводит к увеличению доли жира на 0,3-2,1% и снижению сухого вещества – на 1,07-1,06% в сравнении с контролем. Анализ аминокислотного состава грудных мышц показал увеличение содержания незаменимых аминокислот в опытных группах: лизина на 1,73-3,5% ($P \leq 0,05$); лейцина – на 1,8-4,1% ($P \leq 0,05$); треонина – на 1,62 (II группа, $P \leq 0,05$) в сравнении с контролем. Анализ аминокислотного состава бедренных мышц показал снижение содержания незаменимых аминокислот во II и III группах, в сравнении с контролем. Жирнокислотный анализ грудных мышц после скармливания экстракта демонстрировал увеличение в I группе ненасыщенной жирной кислоты – пальмитолеиновой ($P \leq 0,05$), по отношению к контролю, что согласовывается с ранее проведенными исследованиями [9].

Заключение. Использование экстракта *Quercus cortex* в составе рационов с разным соотношением танинсодержащих веществ оказывает значительное влияние на микробиоту слепого отдела кишечника. Изменения затрагивают такие филумы как *Firmicutes* и *Bacteroidetes* и семейства *Bacilli*, *Clostridia*, таким образом затрагивая такие обменные процессы организма как резорбция энергии и деградация белков и полисахаридов. Соотношение представителей микроорганизмов кишечника зависит от количества танинсодержащих веществ в экстракте, что говорит о необходимости более подробного изучения данного фактора, как и источника данных веществ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект No. 16-16-10048П).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fisinin, V.I., A.S. Ushakov, G.K. Duskaev, N.M. Kazachkova, B.S. Nurzhanov, Sh.G. Rakhmatullin and G.I. Levakhin. Mixtures of biologically active substances of oak bark extracts change immunological and productive indicators of broilers. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*. 2018. 53 2 385-392.
2. Bagirov, V.A., G.K. Duskaev, N.M. Kazachkova, Sh.G. Rakhmatullin, E.V. Yausheva, D.B. Kosyan, Sh.A. Makaev and Kh.B. Dusaeva. Addition of *Quercus cortex* extract to

- broiler diet changes slaughter indicators and biochemical composition of muscle tissue. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*. 2018, 53 4 799-810
3. Starčević, K., L. Krstulović, D. Brozić, et al. Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015;95(6):1172–1178.
 4. Kamboh, A. A. and W.-Y. Zhu/ Individual and combined effects of genistein and hesperidin on immunity and intestinal morphometry in lipopolysaccharide-challenged broiler chickens. *Poultry Science*. 2014;93(9):2175–2183.
 5. Mansoori, B., A. Rogiewicz and B. A. Slominski The effect of canola meal tannins on the intestinal absorption capacity of broilers using a D-xylose test. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2015;99(6):1084–1093.
 6. Díaz Carrasco, J.M., E.A. Redondo, N.D. Pin Viso, L.M. Redondo, M.D. Farber, and M.E. Fernández Miyakawa. Tannins and Bacitracin Differentially Modulate Gut Microbiota of Broiler Chickens. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 21; 2018:1879168.
 7. Díaz Carrasco, J.M., C. Cabral, L.M. Redondo, N.D. Pin Viso, D. Colombatto, M.D. Farber and M.E. Fernández Miyakawa. Impact of Chestnut and Quebracho Tannins on Rumen Microbiota of Bovines. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:9610810.
 8. Viveros, A., S. Chamorro, M. Pizarro, I. Arija, C. Centeno and A. Brenes. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poultry Science*. 2011;90(3):566–578.
 9. Shad M. and X. S. Piao. Application of Moringa (*Moringa oleifera*) as Natural Feed Supplement in Poultry Diets. *Animals (Basel)*. 2019 Jul; 9(7): 431.

METAGENOMIC ANALYSIS OF INTESTINAL MICROBIOTA AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF MEAT IN BROILERS ON THE BACKGROUND OF PLANT EXTRACT

Duskaev G., Yausheva E., Kosyan D., Kvan O., Rakhmatullin Sh.

Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the RAS, 29, 9 Yanvarya St., Orenburg 460000, Russia

Abstract. Research shows that plant extracts containing tannins can improve the nutrition and the health status of farm livestock. In view of the fact that there is a certain dependence of the tannin activity on the source, geographical distribution, the assessment of their effects on changing the intestine microbiota and meat quality is poorly studied. Experimental studies were conducted on 120 heads of 7-day-old broiler chickens (4 groups, $n = 30$, 4 replications). The control group received the main ration (MR); the first experimental group – MR + extract 1 (1 ml/kg of live weight); the second experimental group – MR + extract 2 (2 ml/kg of live weight); the third experimental group – MR + extract 3 (3 ml/kg of live weight). An extract from *Quercus cortex* was additionally included in the composition of experimental groups' rations. Sequencing the content of samples from the small and cecal intestine was carried out at the second generation sequenator MiSeq Illumina (the United States). As the concentration of the extract increased, micro-organisms of phylum Bacteroidetes shrunk (I) and then disappear (II, III). The maximum concentration found a decrease of phylum Firmicutes ($p \leq 0.05$) and an increase of Proteobacteria ($p \leq 0.05$). This group also revealed a decline of representatives of class Bacilli ($p \leq 0.05$). In groups I and II, representatives of class Clostridia decreased by 14.6-50.5% in comparison with the control. The ratio of representatives of microorganisms in the intestine and biochemical indices depends on the number of tannin-

containing substances in the extract, which reveals the need for a more detailed examination of this factor as a source of such substances.

Keywords: *metagenome, microbiome, broiler, meat, plant extracts.*

ИНТЕРБРИДИНГ КАК ОДИН ИЗ СПОСОБОВ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПОРОДЫ И ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ СВИНЕЙ

Евдокимов Н.В., Алексеев В.А.

ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА,
Чувашская Республика, г.Чебоксары, ул.К.Маркса,29, 428003
E-mail evdonikvit@mail.ru 8-960-310-06-78

***Аннотация.** Статья посвящена изучению показателей спермопродуктивности хряков разных генераций, а именно, выращенных в условиях Тульской и Рязанской областях и Чувашской Республики (ФГУП «Колос» Цивильского и СХПК Урмарского района.) В результате сравнительного изучения этого признака установлено, что наиболее лучшие показатели имели хряки, выращенные в условиях двух областей, наиболее худшие показатели имели «местные» хряки. С целью изучения воспроизводительных качеств этих хряков сформированы три группы свиноматок по 15 голов в каждой, и они осеменялись спермой опытных хряков. Результаты оказались в пользу завозных хряков цивильской породы, с использованием которых удалось увеличить многоплодие маток на 0,8 и 1,0 поросят при одинаковом значении крупноплодности. К двухмесячному возрасту сохранность поросят и их отъемная масса была выше у маток, слученных спермой завезенных хряков. Изучение откормочных и мясных качеств свиноматок разных опытных групп показало преимущество потомства хряков из Тульской и Рязанской областей, у которых возраст достижения живой массы 100 кг оказался короче на 5 и 9 дней, среднесуточные приросты выше на 112 и 56 граммов, выше убойная масса, масса задней трети полутуши и площадь «мышечного глазка». Полученные данные свидетельствуют о том, что хряков одной и той же породы, но выращенных в другой экологической зоне, можно с успехом использовать как инструмент для совершенствования породы и целей повышения продуктивности маток.*

***Ключевые слова:** порода, конституция, популяция, генофонд, спермопродукция, эякулят, экологическая группа, многоплодие, отъемная масса, сохранность.*

Введение. В литературе появились сообщения о том, что потомство, полученное от животных одной породы, но выращенное в разных экологических зонах, обладает более крепкой конституцией, высокой жизнеспособностью и многоплодием, чем потомство, полученное от скрещивания животных разных пород сходного типа и разводимых в одной и той же зоне. Так, Жебровский Л.С., Бабуков А.В., Иванов К.М. [1] описывают случай получения внутривидового гетерозиса при спаривании животных одной и той же породы, за счет так называемого «географического гетерозиса», т.е. завоза производителя из других мест или страны, при этом ука-

зывают на положительные результаты, полученные при работе с отечественными породами в России. Вологодские ученые своей работе приводят результаты продуктивности потомства, полученного от скрещивания литовских коров с быками из Голландии, от которых удой оказался на 734 кг молока или же на 43,1 кг жира больше по сравнению со сверстницами.

Эти и другие случаи, имеющие в литературе [2.3.4], нас натолкнули на мысль и явились **целью** изучения возможности использования хряков одной породы, но выращенных в разных экологических зонах, для совершенствования породы и увеличения продуктивности свиней.

Материал и методы исследований. Исследования проведены на хряках и матках свиней цивильской породы разных популяций, хряки, завезенные из Тульской и Рязанской областей (потомки свиней, вывезенных чуть ранее из Чувашского НИИСХ). и хряки, выращенные в условиях ФГУП «Колос» Цивильского и СХПК Урмарского района Чувашской Республики. Оценка хряков проводилась по спермопродукции объем эякулята, концентрация сперматозоидов, густота и активность спермиев в лабораторных условиях с использованием общепринятых методов. При сравнении продуктивности маток использовались такие показатели как: многоплодие, крупноплодность, отъемная масса, сохранность поросят.

Для выполнения поставленных целей нами на одном из свинокомплексов республики было сформировано 4 группы хряков с учетом их происхождения, а именно: в первую группу вошли 20 голов хряков – выращенных в условиях Тульской области, во вторую-20 голов хряков, выращенных в условиях Рязанской области, в третью группу -20 голов хряков - в условиях ФГУП «Колос», в четвертую группу - 20 голов хряков - в условиях Урмарского района.

Результаты собственных исследований. На первом этапе проводимой работы мы поставили задачу сравнительного изучения показателей спермопродукции хряков разных экологических групп, на следующем этапе - сравнение показателей продуктивности маток, осемененных спермой этих хряков, на заключительном этапе работы -оценка потомства этих хряков по откормочным и мясным качествам.

Анализ спермопродукции хряков разных групп свидетельствуют о том, что от хряков, выращенных в условиях Тульской области, получена

сперма в объеме $231,0 \pm 3,1$ мл, чуть меньшим оказался объем эякулята хряков, выращенных в условиях ОПХ «Колос» Чувашского НИИСХ. Самый наименьший объем эякулята был получен от хряков, выращенных в условиях СХПК (разница хряков Тульской области и СХПК достоверна). Выявлено также преимущество по количеству спермиев в эякуляте в показателях хряков Тульской области ($49,0 \pm 2,7$ млрд штук), над хряками из Рязанской области ($48,1 \pm 3,2$ млрд штук), СХПК Урмарского района и ФГУП «Колос» ($46,0 \pm 2,1$). По концентрации сперматозоидов лучшие показатели имели хряки, завезенные из Рязанской области. Активность спермиев у изучаемого поголовья варьировала в пределах от 7,6 баллов (у хряков, завезенных из Рязанской области) до 7,0 баллов в сторону понижения (у хряков, завезенных из Урмарского района).

Сравнением показателей продуктивности маток, осемененных спермой хряков из разных экологических групп, проведенном на 3 группах маток (по 15 голов в каждой), установили, что наиболее лучшие показатели получены от сочетания маток с хряками, завезенными из свиного комплекса «Лазаревский», (III группа) при котором получено $12,50 \pm 0,90$ живых поросят на 1 опорос, при среднем значении по всему поголовью 12,11 поросят (преимущество маток этой группы сохранилось в течение последующих 2 месяцев с показателями сохранности поросят - 89,6 % при отъемной массе 15,9 кг). Достоверно лучшие показатели получены и от осеменения маток со спермой хряков из Рязанской области (II группа) с показателями: количество живых поросят $12,3 \pm 0,86$ при крупноплодности 1,24 кг

Заключение. Анализируя полученные результаты следует, что потомство хряков, выращенное в других экологических условиях, имеет достоверно лучшие показатели как по количественно - качественным показателям спермы, основным хозяйственно- полезным качествам маток, так и по откормочным и мясным качествам потомства, и, интербридинг как одну из форм разведения, можно использовать при совершенствовании породы по продуктивным качествам.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жебровский Л.С. Генофонд сельскохозяйственных животных и его использование в селекции// Л.С. Жебровский, А.В. Бабуков, К.М.Иванов.-Л.:Колос,1983.-357 с.
2. Евдокимов Н.В. Использование экологической разобщенности популяции при сохранении генофонда свиней// Н.В. Евдокимов.- Свиноводство, 2007.-№2.-с.3-5
3. Евдокимов Н.В. Методы создания, совершенствования, сохранения и эффективного использования генофонда свиней цивильской породы // Н.В.Евдокимов: автореферат дис.доктора с.х. наук.-Москва,2007.-42 с.
4. Евдокимов Н.В. Генофонд и продуктивные качества цивильской породы свиней/ Н.В.Евдокимов, Н.С.Петров //LAP.LAMBERT Academic Publishing, 2017. - .374 с.

INTERBREEDING AS ONE OF THE WAYS TO IMPROVE THE BREED AND INCREASE THE PRODUCTIVE QUALITIES OF PIGS

Evdokimov N.V., Alekseev V.A.

"Chuvash state agricultural Academy", Chuvash Republic, Cheboksary, street K. Marksa, 29, 428003

E-mail: evdonikvit@mail.ru, 8-960-310-06-78

Abstract. *The Article is devoted to the study of indicators of spermproducing boars from different generations, namely grown in the Tula and Ryazan regions and the Chuvash Republic (Federal state unitary enterprise "Kolos" and SHPK Urmarskogo Tsivilsky district.) As a result of a comparative study of this feature, it was found that the best indicators were boars grown in two regions, the worst indicators were "local" boars. In order to study the reproductive qualities of these boars, three groups of sows with 15 heads each were formed and they were inseminated with the sperm of experienced boars. The results were in favor of imported boars of the breed Tsivilsk, which managed to increase prolificacy of ewes at 0.8 and 1.0 piosenkami Odinokova the value of large-fruited. By the age of two months, the safety of piglets and their weaning mass was higher in Queens caused by sperm of imported boars. Study of fattening and meat qualities of sows of different experimental groups showed the advantage of the progeny sired from the Tula and Ryazan regions, where the age of reaching live weight 100 kg were shorter at 5 and 9 days, average daily gains above 112 and 56 grams, but the higher the slaughter weight, weight of the posterior third side and the area of "muscle eye". The findings suggest that boars of the same breed, but grown in a different ecological zone, can be successfully used as a tool for improving the breed.*

Keywords: *breed, constitution, population, gene pool, sperm production, ejaculate, ecological group, multiple fertility, weaning mass, preservation.*

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ГЕНА EGFP ПОД ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНЫМ (CMV) ПРОМОТОРОМ ДЛЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНТЕГРАЦИИ В ГЕНОМ КРОЛИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9

Езерский В.А., Колоскова Е.М.

ВНИИФБиП животных – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, г. Боровск, Калужской обл., РФ, 249013
E-mail: ez.vadim@yandex.ru, heleko3@yandex.ru

Аннотация. Высокое содержание кислого сывороточного протеина в молоке кролика делает ген этого белка **перспективным** кандидатом для замены геном фармакологически активного белка при использовании системы CRISPR/Cas9. Была создана плазмида, содержащая 5' и 3' плечи гомологии (размером 841 и 697 п.н. соответственно) к гену WAP кролика, на стыке плечей гомологии имеющую сайт для рестриктазы EagI. Фрагмент, содержащий ген зеленого флуоресцентного белка под CMV промотором, был встроен по этому сайту. Была разработана стратегия внесения двухцепочечных разрезов в ген *rbWAP* и получены четыре плазмиды *pX330*, кодирующие эндонуклеазу Cas9 и направляющие РНК. Плазмида, содержащая фрагмент *stnEGFP*, предназначена для сайт-специфичной интеграции гомологичной рекомбинацией в ген *rbWAP*, для оценки эффективности сайт-специфической работы компонентов системы CRISPR/Cas9 в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: генетические конструкции, кислый сывороточный протеин, CRISPR/Cas9, EGFP, WAP, кролик.

Введение. Применение эндонуклеазных технологий с использованием механизма прямой гомологичной рекомбинации (HDR) – эффективный метод изменения состава молока замещением генов эндогенных молочных белков у сельскохозяйственных животных с целью улучшения потребительских качеств молока, использования молочной железы животного как биореактора для продукции гетерологичных белков [1]. Трансгенные сельскохозяйственные животные, в том числе кролики, перспективны в качестве биореакторов для продукции белков фармакологического назначения с молоком или кровью [2]. Кролик – самое маленькое животное, из которого могут быть получены рекомбинантные белки фармацевтического назначения в экспериментальном и в промышленном масштабе.

Например, одобренный к применению FDA рекомбинантный ингибитор C1 эстеразы человека (Pharming BV) для лечения пациентов с наследственным ангионевротическим отеком, получают из молока трансгенных кроликов [3]. Содержание кислого сывороточного протеина в молоке кролика составляет около 15 г/л [4], что делает ген *WAP* перспективным кандидатом для замены геном фармакологически активного белка при использовании системы CRISPR/Cas9.

Цель работы. Создать генетическую конструкцию, включающую в себя фрагмент *cmvEGFP*, плечи гомологии к областям гена *WAP* кролика (*rbWAP*). Подобрать последовательности направляющих РНК для делеции фрагмента гена *rbWAP*. Разработать систему оценки потенциальных генетических модификаций локуса гена *rbWAP*.

Материал и методика исследований. Последовательность гена кислого сывороточного протеина кролика была взята из базы данных GenBank, запись NC_013678. Геномная ДНК была выделена из кончика уха кролика калифорнийской породы. В работе использовали ферменты и реактивы: *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, рестриктазы *EagI*, *BglII*, *EagI*, *BamH*, *BsmBI* с соответствующими буферами. Для промежуточного клонирования ПЦР-продуктов использовали *pTZ57R/T* и *T4 DNA* лигазу набора *InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific)*. Праймеры заказывали в ЗАО «Синтол» <<http://www.syntol.ru>>. Процедуру ПЦР проводили на амплификаторе ДНК «Терцик» («ООО ДНК-Технология», Москва). Трансформацию компетентных клеток *E.coli Dh5α*, *TGI* проводили по методике и с реагентами набора *Transform-Aid Bacterial Transformation Kit* с нашими модификациями. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* с нашими модификациями и классическим методом щелочного лизиса. Качество и количество ДНК оценивали визуально в УФ свете после электрофореза в агарозном геле. ДНК из агарозного геля выделяли с помощью набора *GeneJET Gel Extraction Kit*. Подбор праймеров, конструирование рекомбинантной ДНК, рестриктный анализ проводили с использованием программы Vector NTI.

Направляющие РНК подбирали с использованием on-line программ CHOPCHOP <http://chopchop.cbu.uib.no/>, CRISPR direct <http://crispr.dbcls.jp/>,

CRISPOR v.4.8. <http://crispor.tefor.net/>. Для получения CRISPR/Cas9 компонентов использовали плазмиду *pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9* (Addgene plasmid # 42230).

Результаты исследований и их обсуждение. Сиквенс 5' области гена *rbWAP* кролика калифорнийской породы показал полное совпадение последовательности с опубликованной. В праймеры для ПЦР-амплификации 5' и 3' плечей гомологии (5'НА и 3'НА) ввели последовательности для рестриктаз *EagI*, *BglII* и рестриктаз *EagI*, *BglII*, *BamHI* соответственно. ПЦР-амплификаты клонировали в *pTZ57R/T* вектор с получением промежуточных плазмид *pTZ5'HarbWAP* и *pTZ3'HarbWA*. После их обработки рестриктазами *BamHI* и *EagI*, дополнительной подготовки, получили плазмиду-акцептор *EagI_pTZ5'HarbWAP_BamHI* и вставку *EagI_3'HarbWAP_BamHI*. После лигирования фрагментов получили *pTZHarbWAP*, на стыке плечей гомологии имеющую сайт для рестриктазы *EagI*.

Из плазмиды *pGEMTcmvEGFP* [5] рестриктазой *BsmBI* (*Esp3I*) вырезали и очистили фрагмент *cmvEGFP-bGH polyA* с *NotI/EagI* липкими концами, клонировали в подготовленную плазмиду *pTZHarbWA*. В результате была получена плазида *pWAPcmvEGFP*, которую в циркулярном или в линейном виде (вырезав генную конструкцию рестриктазой *BglII*) можно использовать в качестве ДНК-матрицы для гомологичной рекомбинации с геном *rbWAP* с применением CRISPR/Cas9-компонентов.

Олигонуклеотиды для получения направляющих РНК были обработаны по протоколу и клонированы в плазмиду *pX330* [6]. В результате были получены плазмиды *pX330-511*, *-53*, *-33* и *-31*, кодирующие Cas9 и гРНК к соответствующим сайтам (рис.1).

К настоящему времени нами не обнаружено публикаций о модификации гена *WAP* кролика с использованием системы CRISPR/Cas9. Новизна исследований заключается в создании генной конструкции, содержащей репортерный ген, и получении компонентов системы CRISPR/Cas9 для оценки на эмбриональном уровне в условиях *in vitro* эффективности сайт-специфической интеграции трансгена.

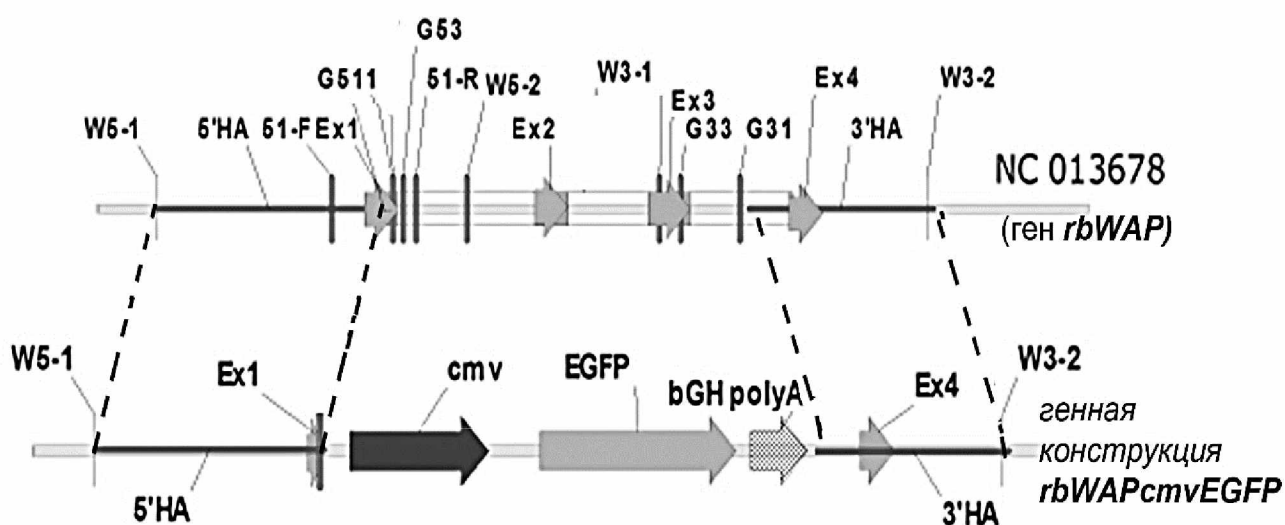


Рисунок 1. Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции WAP-cmvEGFP с геном *rbWAP* в результате работы CRISPR/Cas9. Показаны: G511, G511, G31, G33 – мишени для гРНК; плечи гомологии 5'HA и 3'HA; структурные элементы гена и конструкции; праймеры.

Заключение. Использование гена репортерного белка под CMV промотором в составе ДНК-матрицы, фланкированной плечами гомологии к фрагментам гена *WAP*, предназначенной для сайт-специфичной интеграции гомологичной рекомбинацией может стать перспективной моделью:

- для оценки эффективности сайт-специфической работы компонентов системы CRISPR/Cas9 в условиях *in vitro*.

- для использования в составе ДНК-матрицы нуклеотидных последовательностей фармакологически активных белков с перспективой получения трансгенных кроликов, продуцирующих рекомбинантные белки с молоком вместо кислого сывороточного протеина.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шепелев М. В., Калиниченко С. В., Дейкин А. В., Коробко И. В. Получение рекомбинантных белков из молока трансгенных животных: современное состояние и перспективы// АСТА NATURAE – 2018. 10 № 3 (38):42-50
2. Bosze, Z., Hiripi, L., Carnwath, J.W., and Niemann, H. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins// Transgenic. Res. -2003. 12:541–553
3. Kues W.A., Niemann H. Advances in farm animal transgenesis //Prev. Vet. Med. 2011 V. 102:146–156.
4. Baranyi M., Brignon G., Anglage P., Ribadeau-Dumas B. New data on the protein of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk//Comp. Biochem. Physiol. -1995. 111B:407-415.
5. Езерский В.А., Шевченко В.Г. Создание генно-инженерной конструкции, содержащей структурный ген лактоферрина человека под контролем регуляторных элементов гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота и репортерный ген GFP// Проблемы биологии продуктивных животных. Боровск. - 2008. Т.2: 3-12.
6. Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9// Вавиловский журнал генетики и селекции. -2016;20(6):930-944. DOI 10.18699/VJ16.214

CREATION OF GENETIC CONSTRUCTION OF EGFP GENE UNDER CYTOMEGALOVIRUS (CMV) PROMOTER FOR SITE-SPECIFIC INTEGRATION INTO RABBIT GENOME USING CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY

Ezerskii V.A., Koloskova E.M.

Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, a branch L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry
Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation, 249013
E-mail: ez.vadim@yandex.ru, heleko3@yandex.ru

Abstract. *The high content of acidic whey protein in rabbit milk makes the gene of this protein a promising candidate for its replacement by the gene of pharmacologically active protein using the CRISPR/Cas9 system. Was created plasmid that contains 5' and 3' arms of homology (size 841 and 697 bp respectively) to the rabbit WAP gene at the junction of the arms of homology with the sequence for restrictase EagI. A fragment containing a green fluorescent protein gene under the CMV promoter has been integrated into this site. A strategy was developed of making double-stranded cuts in the gene rbWAP and received four pX330 plasmids encoding the endonuclease Cas9 and guide RNAs. Plasmid containing a fragment cmvEGFP designed for site-specific integration by homologous recombination into the gene rbWAP, to assess the effectiveness of site-specificity of components of the CRISPR/Cas9 in vitro.*

Keywords: *genetic constructions, acidic whey protein, CRISPR/Cas9, EGFP, WAP, rabbit.*

РЫБОВОДНАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СПЕРМЫ СТЕРЛЯДИ

Елизарова А.С.¹, Глебов А.П.², Шишанова Е.И.¹, Исаев Д.А.¹

¹ФГБНУ ВНИИ ирригационного рыбоводства, ул. Сергеева 24, пос. им. Воровского, Ногинский р-н, Московская обл., РФ, 142460

²Можайский производственно-экспериментальный рыбоводный завод, дер. Горетово, Можайский район, Московская область, РФ, 143222

E-mail: mamonova84@gmail.com

Аннотация. *Правильная оценка качества спермы при разведении осетровых рыб необходима для обеспечения высокой частоты оплодотворения и нормального развития эмбрионов и личинок. В России традиционно применяется шкала Персова, предполагающая микроскопическое определение подвижности спермиев. На практике определение качества спермы часто ограничивается визуальной оценкой цветности и консистенции. Мы изучали различные характеристики спермы стерляди (*Acipenser ruthenus*), использованной в рыбоводстве для оплодотворения икры, с целью оценить необходимость детальных лабораторных исследований для оценки репродуктивного потенциала спермы. Показано, что микроскопическое определение концентрации и подвижности спермы является строго необходимым при проведении искусственного оплодотворения.*

Ключевые слова: *рыбоводство, осетровые рыбы, стерлядь, сперма.*

Введение. При искусственном воспроизводстве осетровых рыб от качества спермы – ее репродуктивного потенциала – зависит частота оплодотворения, дальнейшее развитие эмбрионов, личинок и мальков, и, в конечном счёте, выход рыбоводной продукции.

Для оценки качества спермы осетровых рыб на рыбоводных предприятиях в России традиционно применяется шкала Г.М. Персова, основанная на микроскопической оценке подвижности [1]. В «Техническом докладе ФАО №558» указано, что «эякуляты с концентрацией спермиев менее 1 млрд./мл не рекомендуется использовать для осеменения» [2]. Рекомендуется также визуальная оценка концентрации по цвету. Кроме того, отмечено, что «концентрация сперматозоидов может быть определена также с использованием стандартного метода гемацитометрии» [2]

На практике во время проведения нерестовых кампаний определение качества спермы часто ограничивается простой визуальной оценкой цветности и консистенции. Такой способ оценки основан, как правило, на субъективном практическом опыте специалистов-рыбоводов и полностью от него зависит. Таким образом, установление объективных критериев и способов оценки качества спермы в осетроводстве является актуальной задачей.

Целью исследования было выявление минимального набора качественных и количественных характеристик спермы осетровых рыб (на примере стерляди), достаточных для определения ее репродуктивного качества в условиях производства.

Материал и методика исследований. В исследовании использованы образцы спермы стерляди, полученные и использованные для оплодотворения икры во время проведения нерестовых кампаний в разные годы на предприятиях Центрального филиала ФГБУ «Главрыбвод» («Мосрыбвод»). Концентрацию спермы определяли при помощи счетных камер Нейбауэра, Горяева или Маклера. Сперматокрит определяли центрифугированием образцов в стеклянных гематокритных капиллярах емкостью 75 мм в течение 10 минут при 1000 G. Водородный показатель семенной плазмы определяли при помощи портативного pH-метра «Piccolo» («Hanna Instruments», Германия). Осмоляльность семенной плазмы определяли на осмометре-криоскопе «ОСКР-1» («КИВИ осмометрия», Россия). Для исследования подвижности сперму активировали разведением в 50 раз водой. Сразу после активации оценивали относительное количество прогрессивно-подвижных сперматозоидов, отмечали время, в течение которого половина сперматозоидов переходила от поступательного движения к колебательному (τ_{50}) и время полной потери подвижности (τ). Фрагментацию ДНК исследовали методом SCD-test («гало»). Расчеты выполняли с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

Результаты исследований. Единственным критерием выборки для ретроспективного статистического анализа было использование спермы для оплодотворения икры. Все образцы спермы были оценены визуально по консистенции и цветности от 2 до 5 баллов по Персову. Частота фертилизации была не ниже 80%, но связать фертильность спермы с конкрет-

ными образцами не представлялось возможным, т.к. во многих случаях сперму разных производителей смешивали. Исследованные усредненные характеристики фертильной спермы стерляди представлены в таблице.

Таблица. **Характеристики фертильной спермы стерляди (*Acipenser ruthenus*)**

	N	M±STE*	Медиана	Мин.	Макс.
Концентрация, млн/мл	25	981,2 ±131,1	870,0	135,0	2338,5
Сперматокрит, %	19	4,0±0,5	3,5	0,8	8,5
Подвижность, %	19	92,5±2,1	96,0	68,0	100,0
τ_{50} , сек**	19	89,3±6,7	98,0	37,0	132,0
τ , сек**	19	278,5±35,0	252,0	102,0	773,0
pH	19	7,5±0,1	7,4	6,5	9,0
Осмоляльность, мосмоль/кг	17	64,3±2,3	64,0	53,0	88,0
Фрагментация ДНК, % клеток	10	0,7 ± 0,1	0,7	0,3	1,2

*Среднее ± стандартная ошибка среднего;

** τ_{50} – время, в течение которого более половины подвижных сперматозоидов переходят к колебательным движениям;

*** τ – время, в течение которого подвижность полностью утрачивается.

Использование счетных камер для определения концентрации дает точные и объективные результаты, поскольку визуальная оценка может быть обманчивой. Так, по нашему опыту, 3 образца спермы, цвет которых был определен как «цвет разбавленного молока» (1–2 млрд/мл в соответствии с [2]) имели концентрацию, определенную в камере Маклера: 235, 360 и 730 млн/мл.

Сильная положительная корреляция выявлена между концентрацией спермиев и сперматокритом (Спирмена $R = 0,91$; $N = 19$; $p = 0,00$), таким образом, сперматокрит вполне может быть служить альтернативой определению концентрации, как минимум, в близком к изученному диапазоне. Корреляция между концентрацией и активностью не выявлена, а между концентрацией и общим временем подвижности τ была близка к средней (Спирмена $R = 0,48$; $N = 19$; $p = 0,04$). Примечательно, что сперматокрит коррелировал как со временем общей подвижности τ (сильная корреляция,

Спирмена $R = 0,80$; $N = 13$; $p = 0,00$), так и со временем «полупотери подвижности» τ_{50} (средняя корреляция, Спирмена $R = 0,66$; $N = 13$; $p = 0,02$), однако, это требует подтверждения на большей выборке. Иные корреляции не выявлены.

Заключение. Впервые нами представлены детальные характеристики заведомо фертильной спермы стерляди. Полученные данные показывают, что микроскопическая оценка активности должна проводиться вне зависимости от определения других характеристик (т.к. не коррелирует с ними), в то время как определение концентрации и/или сперматокрита может проводиться без оценки времени подвижности. Прочие изученные характеристики (рН и осмоляльность семенной плазмы, фрагментация ДНК) не имеют очевидной прогностической ценности в производстве.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Персов Г. М. Дозирование спермиев как способ управления оплодотворением яйцеклеток у осетровых // Доклады АН СССР – 1953. 90(6):1183-1185.
2. Руководство по искусственному воспроизводству осетровых рыб. Технический доклад ФАО по рыбному хозяйству №558. / Чебанов М. С., Галич Е. В.: ФАО, Анкара, 2013. 325 с.

EVALUATION OF STERLET SPERM QUALITY FOR FISH BREEDING

Elizarova A.S.¹, Glebov A.P.², Shishanova E.I.¹, Isaev D.A.¹

¹All-Russian Research Institute of Irrigation Fish Breeding,
24 Sergeev Str., Vorovsky township, Noginsk District, Moscow Region, 142460 Russia

²Mozhaisk Industrial-experimental Fish Farming Plant,
Goretovo village, Mozhaisk District, Moscow Region, 143222 Russia
E-mail: mamonova84@gmail.com

Abstract. *Appropriate evaluation of sperm quality for sturgeon breeding is necessary to ensure high fertilization rate and further normal development of embryos and larvae. In Russia, the 'Persov scale' is traditionally used to evaluate the sperm quality suggesting microscopic estimation of its motility. In practice, the quality assessment is often limited to simple visual evaluation of color and consistency. We studied various characteristics of the sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm used to fertilize the eggs in hatcheries in order to assess the need for detailed laboratory tests for evaluation of sperm reproductive potential. It is shown that microscopic estimates of sperm concentration and motility are strongly necessary when performing artificial insemination.*

Keywords: *fish breeding, sturgeons, sterlet, sperm.*

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА БЕЛКОВ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ

Еримбетов К.Т., Обвинцева О.В., Соловьева А.Г., Федорова А.В.,
Земляной Р.А.

ВНИИФБиП животных - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, пос. Институт,
г. Боровск, Калужская обл., РФ, 249013.
E-mail: erimbetovkt@mail.ru, тел.: +79190315034

Аннотация: *Повышение глобального спроса на адекватное белковое питание на фоне изменения климата и заботы об устойчивости животноводства требует новых и более эффективных подходов к росту продуктивных животных и производству мясной продукции. Анаболический рост достигается, когда скорости нового синтеза превышают оборот, создавая положительный баланс белка. И наоборот, ухудшение или атрофия мышечной массы является следствием отрицательного баланса белка. В раннем возрасте в периоды интенсивного роста мышечная масса стимулируется увеличением синтеза белка на уровне трансляции мРНК. На протяжении всей жизни на рост мышечной массы оказывает влияние «белокдеградирующая система», такие как аутофагия и путь протеасом убиквитина. Несколько сетей передачи сигнала направляют и координируют эти процессы наряду с механизмами контроля качества для поддержания гомеостаза белка (протеостаза). Генетические факторы, гормоны и стимулы окружающей среды влияют на контроль протеостаза, изменяя способность и / или эффективность мышечного роста. В представленной работе рассматривается современное состояние фенотипических механизмов регуляции метаболизма мышечных белков у продуктивных животных. Приводятся данные сравнительной характеристики обмена мышечных белков у бычков разного возраста и при введении β -агониста кленбутерола. Установлено, что в более зрелом возрасте бычков их высокий продуктивный потенциал целесообразно поддерживать путем использования способов и средств, направленных на снижение скорости деградации мышечных белков, поскольку известно, что по мере роста животных, «белоксинтезирующие системы» мышц менее чувствительны к изменениям условий питания и внешней среды по сравнению с «белокдеградирующими системами». Эта закономерность в регуляции метаболизма мышечных белков является одной из причин более высокой эффективности применения β -агониста кленбутерола у взрослых животных.*

Ключевые слова: *аутофагия, протеасомы, метаболизм мышечных белков, протеомика, метаболомика, быки, эффективность синтеза белков.*

Введение. Рост численности населения во всем мире увеличил глобальный спрос на адекватное белковое питание [1]. Необходимы новые стратегии для увеличения производства мяса при минимизации негативного воздействия на окружающую среду [2]. Генетические подходы к увеличению производства продуктов животного происхождения посредством селекции успешны, но при этом приводят к экономическим, экологическим и этическим осложнениям [3]. В целом, усилия по удовлетворению

мировых потребностей в белке на фоне физических, химических и биологических ограничений на продуктивность видов [4] создают большее давление на животноводство, чем когда-либо прежде. По этим причинам лучшее понимание основных механизмов метаболизма мышечного белка имеет отношение к продукции и здоровью продуктивных животных. За последние два десятилетия достижения в области геномики позволили селекционному процессу быть более информированным и таким образом целевым. Недавние технологические разработки позволили усилить, если не заменить геномный век на век протеомики и метаболомики. Эти технологии позволяют задавать еще более сложные вопросы, перемещая область от мониторинга генотипа к фенотипу [5]. Более глубокое понимание фенотипических механизмов, которые регулируют мышечную массу, в свою очередь, даст новое понимание того, как наилучшим образом решить экологические проблемы роста животных и улучшить общее состояние здоровья скота [6].

Таким образом, проблема биосинтеза белка, имеющая теоретическое и практическое значение, в течение многих десятилетий остается актуальной и составляет основу большинства направлений исследований в области биологии животных. Несмотря на определенные успехи, крайне недостаточно изучены закономерности синтеза и обновления белков тела, механизмы, регулирующие эти процессы в организме продуктивных животных. Знание механизмов обмена и путей синтеза белков открывает перспективу регуляции этого процесса в рамках биологических возможностей организма.

Целью работы было изучение последних достижений в исследовании регуляции белков в скелетных мышцах продуктивных животных.

Материалы и методика исследований. Для решения поставленной цели была проведена серия экспериментальных работ со скормливанием кленбутерола молодняку крупного рогатого скота холмогорской породы. Первая серия опытов выполнена на 12-ти бычках в переходный период выращивания с 2- до 5-месячного возраста. Животных по принципу парных аналогов в предварительный период опыта распределили в две группы – контрольную и опытную. Телятам опытной группы за 10 суток до прекращения скормливания молока в течение 58 суток ежедневно утром и

вечером выпаивали из бутылки водный раствор кленбутерола в дозе 1 мг на голову в сутки в два приема – утром и вечером во время кормления. Второй опыт проведен на 8-ми бычках в период их интенсивного доращивания и откорма с 11 до 15-месячного возраста. Животные по принципу парных аналогов были распределены в две группы: контрольную и опытную. Бычкам опытной группы ежедневно в течение 60-ти суток скармливали в составе комбикорма 0,5 мг кленбутерола на голову в сутки.

Результаты исследований и их обсуждение. В последние годы большое внимание уделяли анализу закономерностей роста животных и факторов регуляции метаболизма белков в их организме. Поскольку содержание в тканях белков определяется скоростью синтеза и распада последних, то оба эти процесса регулируют обмен белков. Для конститутивных белков, включая мышечные белки, чистое отложение отражает баланс между синтезом и распадом, поэтому изменения в одном или в обоих составляющих процессах могут увеличивать (или снижать) величину прироста. Хотя известно, что большое число факторов, включая факторы питания и гормоны, стимулируют белковый синтез в мышцах, деградацией тоже можно управлять. Так, быстрый рост мышц у некоторых генотипов (например, у *callipige*) может быть обеспечен супрессией деградации белков.

Ключевой точкой интеграции в росте и развитии мышц является протеинкиназа B / Akt киназа (RAC-альфа серин/треониновая протеинкиназа (продукт гена *akt1*)). Путь инсулин / IGF-I-Akt увеличивает синтез белков в скелетных мышцах посредством ингибирования гликогенсинтазинкиназы 3β (ингибитора образования тройного комплекса eIF2) и активации механистической мишени передачи сигналов комплекса рапамицина 1 (mTORC1). Активация mTORC1 стимулирует биосинтез белка за счёт фосфорилирования ключевых регуляторов трансляции мРНК. mTORC1 фосфорилирует ингибирующий белок EIF4EBP1, который в результате высвобождается и разблокирует фактор инициации трансляции 4E (eIF4E). Кроме этого, активированный mTORC1 фосфорилирует и активирует p70 киназу рибосомального белка S6 (S6K1), что также стимулирует синтез белка. Рапамицин ингибирует mTORC1 и блокирует размножение клеток, что используется при трансплантации для ингибирования проли-

ферации лейкоцитов и подавления иммунного ответа. Akt протеинкиназа В / Akt киназа также снижает распад мышечных белков посредством фосфорилирования факторов транскрипции Forkhead box class O (FOXO). Белки подсемейства FOXO эволюционно консервативные транскрипционные факторы, определяющие клеточный метаболизм и гомеостаз. Сигнальные пути координируют метаболизм белка в мышцах. Анаболические и катаболические стимулы интегрируются посредством передачи сигналов PKB / Akt-mTORC1 для регулирования механизмов, которые контролируют синтез и расщепление мышечного белка.

В целом, анаболические стимулы (например, гормон роста, инсулин / IGF-I, аминокислоты, тестостерон, β -агонист) активируют сигнальный путь mTORC1, тогда как катаболические стимулы (например, воспалительные цитокины, глюкокортикоиды, миостатин, голодание, низкий уровень белка) подавляют передачу сигналов mTORC1. Питательные вещества, особенно аминокислоты с разветвленной цепью, являются мощными активаторами mTORC1 в мышцах независимо от инсулина / IGF-I-Akt. Аналогичным образом факторы роста могут стимулировать передачу сигналов mTORC1 в скелетных мышцах независимо от аминокислотного питания. Обнаружено, что различные растительные стероидные соединения, называемые фитоэкдистероидами, усиливают синтез белка и активируют передачу сигналов Akt аналогично IGF-I в культивируемых миоцитах. Кормление этих и других фитоэкдистероидов вызывает у мышей эффект от ожирения. Тем не менее, недавние исследования по кормлению не смогли выявить острого воздействия 20-гидроксиэкдизона на передачу сигналов Akt или mTORC1 в скелетных мышцах, что позволяет предположить, что фитоэкдистероиды могут требовать других факторов для активности и / или регулировать долгосрочные транскрипционные изменения в «белокдеградирующей системе» по сравнению с механизмами передачи сигналов, которые регулируют белоксинтезирующей.

Как указывалось, выше, накопление белков в мышечных клетках — результат более высокой скорости синтеза белка по сравнению с его деградацией. Динамика скорости синтеза и распада мышечных белков на различных стадиях онтогенеза животных изучена недостаточно полно. Характерной чертой обмена белка в мышцах по сравнению с другими тка-

нями является заметное изменение его уровня, наблюдаемое от рождения до зрелого возраста. Для оптимальной реализации потенциала мясной продуктивности крупного рогатого скота необходимо достижение полного биологического потенциала роста скелетной мускулатуры (то есть скорости накопления белков) как можно в более раннем возрасте телят. Кроме того, необходимо поддержание достигнутого потенциала роста в течение более продолжительного периода развития бычков.

На основании данных по интенсивности роста мышц и по динамике метаболизма мышечных белков у бычков в период с 4- до 14-месячного возраста можно сделать вывод о том, что увеличение скорости их обновления имеет место только в первые месяцы жизни, поскольку на последующих этапах онтогенеза эффективность синтеза белков значительно снижается.

Таблица 1. Сравнительная характеристика обмена мышечных белков у бычков разного возраста, г / сутки на кг общей массы мышц^{0,75}

Показатели	Группы	
	контроль	опыт
4- месячный возраст		
Синтез	18,45 ± 0,41	17,52 ± 0,38
Распад	12,83 ± 0,36	11,09 ± 0,47*
Отложение	5,62 ± 0,19	6,43 ± 0,25*
Отношение синтез/распад	1,44	1,58
Эффективность синтеза, %	30,5 ± 2,0	36,7 ± 1,6*
Интенсивность роста мышечной ткани, %	1,20 ± 0,06	1,38 ± 0,04*
Интенсивность включения ¹⁴ C-лейцина в белки, имп/мин/ г ткани	5613 ± 561	8339 ± 834*
14-месячный возраст		
Синтез	13,57 ± 0,25	12,89 ± 0,29
Распад	11,02 ± 0,21	9,78 ± 0,19*
Отложение	2,55 ± 0,18	3,11 ± 0,15*
Отношение синтез/распад	1,23	1,32
Эффективность синтеза, %	18,8 ± 1,9	24,1 ± 1,2*
Интенсивность роста мышечной ткани, %	0,41 ± 0,02	0,49 ± 0,02*
Интенсивность включения ¹⁴ C-лейцина в белки, имп/мин/ г ткани	3315 ± 40	3481 ± 48

* $P < 0,05$ по U-тесту при сравнении с контролем

Согласно данным, представленным в таблице 1, интенсивность синтеза и отложения белков в скелетных мышцах в молодом возрасте значительно выше, чем скорость распада белков. В раннем возрасте процессы синтеза преобладают над процессами распада, разница между ними более заметна, она и составляет долю отложения белков. Далее эта разница сокращается, и у взрослого бычка процессы синтеза и распада приходят в равновесие. Выявлено, что в более зрелом возрасте бычков их высокий продуктивный потенциал целесообразно поддерживать путем использования способов и средств, направленных на снижение скорости деградации мышечных белков, поскольку известно, что по мере роста животных, «белоксинтезирующие системы» мышц менее чувствительны к изменениям условий питания и внешней среды по сравнению с «белокдеградирующими системами». Эта закономерность в регуляции метаболизма мышечных белков является одной из причин более высокой эффективности применения β -агониста кленбутерола у взрослых животных.

Заключение. Выявление механизмов и количественных закономерностей наращивания массы скелетной мускулатуры имеет не только теоретический, но и практический интерес, поскольку ограниченность знаний в этой области сдерживает разработку способов прогнозирования и управления количественными и качественными параметрами мясной продуктивности крупного рогатого скота. Наиболее перспективный путь выяснения этих вопросов лежит через изучение и познание механизмов регуляции процессов синтеза и распада основных белков мышечной ткани.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO. Availability and changes in consumption of animal products. Nutrition health topics: Global and regional food consumption patterns and trends. 2015 http://www.who.int/nutrition/topics/3_foodconsumption/en/index4.html.
2. Post M.J. Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. / Post M.J. // Meat science. 2012; 92:297–301. [PubMed].
3. Bassett A. Welfare and belgian blue cattle. / Bassett A. // Animal Welfare Approved Technical Advice Fact Sheet, Animal Welfare Approved. 2009:1–8. <http://animalwelfareapproved.org/wp-content/uploads/2013/07/TAFS-1-Welfare-and-Belgian-Blue-Cattle-v1.pdf>.
4. Zuo J. Constant heat stress reduces skeletal muscle protein deposition in broilers. / Zuo J, Xu M, Abdullahi Y.A, Ma L, Zhang Z, Feng D. // J Sci Food Agric. 2015;95:429–436. [PubMed].

5. Boggess M.V. The need for agriculture phenotyping: “Moving from genotype to phenotype” / Boggess M.V., Lippolis J.D., Hurkman W.J., Fagerquist C.K., Briggs S.P., Gomes A.V., Righetti P.G., Bala K. //J Proteomics. 2013;93:20–39. [PubMed].
6. Anthony T.G. Mechanisms of protein balance in skeletal muscle/ T.G Anthony //Domest Anim Endocrinol. 2016 Jul; 56 (Suppl): S23–S32. 10.1016/j.domaniend.2016.02.012.

MECHANISMS OF REGULATION OF PROTEIN METABOLISM IN SKELETAL MUSCLES

Erimbetov K.T., Obvintseva O.V. Solovyova A.G. Fedorova A.V., Zemlyanoy R.A.

Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition of animals - branch L.K. Ernst
Federal Science Center for Animal Husbandry, the village. Institute, Borovsk, Kaluga Re-
gion, Russia, 249013
E-mail: erimbetovkt@mail.ru, phone: + 79190315034

Abstract: *Increasing global demand for adequate protein nutrition against the backdrop of climate change and concern for the sustainability of animal husbandry requires new and more effective approaches to the growth of productive animals and the production of meat products. Anabolic growth is achieved when the rates of the new synthesis exceed the turnover, creating a positive protein balance. Conversely, deterioration or atrophy of muscle mass is a consequence of a negative protein balance. At an early age during periods of intensive growth, muscle mass is stimulated by an increase in protein synthesis at the level of mRNA translation. Throughout life, a “protein-degrading system,” such as autophagy and the ubiquitin proteasome pathway, affects muscle growth. Several signal transmission networks direct and coordinate these processes along with quality control mechanisms to maintain protein homeostasis (proteostasis). Genetic factors, hormones, and environmental stimuli affect the control of proteostasis, altering the ability and / or effectiveness of muscle growth. In this work, we consider the current state of phenotypic mechanisms of regulation of muscle protein metabolism in productive animals. The comparative characteristics of muscle protein metabolism in gobies of different ages and with the administration of the Clenbuterol β -agonist are presented. It was established that at a more mature age of bulls it is advisable to maintain their high productive potential by using methods and means aimed at reducing the rate of degradation of muscle proteins, since it is known that, as animals grow, the “protein synthesizing systems” of the muscles are less sensitive to changes in nutritional conditions and external environment in comparison with “protein degradation systems.” This pattern in the regulation of muscle protein metabolism is one of the reasons for the higher efficiency of the use of Clenbuterol β -agonist in adult animals.*

Keywords: *autophagy, proteasomes, muscle protein metabolism, proteomics, metabolomics, bulls, protein synthesis efficiency.*

ГИПОТЕРМИЧЕСКОЕ ХРАНЕНИЕ СПЕРМЫ ПОЗВОНОЧНЫХ В БЕССОЛЕВЫХ ИЗОТОНИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ

Исаев Д.А.¹, Мартынова М.Ю.², Володяев И.В.³, Шишанова Е.И.¹

¹ФГБНУ ВНИИ ирригационного рыбоводства, ул. Сергеева 24, пос. им. Воровского, Ногинский р-н, Московская обл., РФ, 142460

²Московский медицинский университет «Реавиз», ул. Краснобогатырская 2 стр. 2, г. Москва, РФ, 107564

³Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы 1 стр.12, г. Москва, ГСП-1, РФ, 119991
E-mail: dmais@hotmail.ru

***Аннотация.** Представлен краткий обзор наших исследований по гипотермическому хранению спермы человека, мыши и осетровых рыб в бессолевых изотонических растворах на основе глюкозы и альбумина с целью продемонстрировать универсальность данного подхода в отношении эволюционно далеких видов позвоночных. Успешный опыт практического применения гипотермического хранения спермы в репродуктивной медицине и обнадеживающие результаты наших экспериментальных работ указывают на возможность использования этих технологий в животноводстве.*

***Ключевые слова:** сперма, гипотермическое хранение.*

Введение. Необходимость сохранения спермы в течение некоторого времени связана с появлением и развитием технологий искусственного оплодотворения. История научных исследований по гипотермическому хранению спермы начинается, по-видимому, с выполненных в конце XVIII в. опытов итальянского аббата Лаззаро Спалланцани по охлаждению на снегу спермы жеребца, быка и человека, [1].

Развитие и применение в животноводстве технологий искусственного оплодотворения в конце XIX – начале XX в.в., благодаря открытиям и исследованиям русского ученого И.И. Иванова [2], потребовало улучшения методов хранения спермы, поскольку охлаждение нативной спермы не обеспечивает длительного поддержания ее фертильности. К 40-м г.г. XX в. были разработаны растворы, позволяющие сохранять сперму при температурах около +5 °С до 3 сут. Однако, уже к 60-м г.г. XX в. проблема

хранения спермы в животноводстве была радикально решена путем замораживания в жидком азоте на неопределенно длительное время.

Но хранение спермы без замораживания не утратило актуальности. Уступая криоконсервации по длительности, гипотермическое хранение имеет ряд преимуществ: независимость от источников жидкого азота или сухого льда и специального оборудования, а также безопасная транспортировка.

В 1996 г. исследователи Университета Йокогамы предложили новый способ хранения спермы при +4°C в бессолевом водном растворе глюкозы и бычьего сывороточного альбумина [3]. Эта среда, названная EFM (англ. *electrolyte free medium*), позволяла сохранять фертильность спермы человека и мыши в течение, как минимум, 2 недель, что было существенным достижением. Несмотря на высокую эффективность и безопасность метода [4], эти работы не получили должного развития за рубежом.

Целью наших работ была адаптация, разработка и оптимизация методов гипотермического хранения спермы в бессолевых средах на основе сахаров и альбумина для их возможного использования в репродуктивной медицине и животноводстве.

Материал и методика исследований. Детальное описание экспериментальных консервантов для гипотермического хранения, аналитических методик и обработки материала содержится в соответствующих оригинальных публикациях [5–8].

Результаты исследований.

Человек. Наши исследования показали, что после 2 недель гипотермического хранения в растворе EFM при +4 °C подвижность сохраняют $52,0 \pm 3,6\%$ сперматозоидов ($n=35$), при этом не установлено достоверного различия ($p=0,11$; $n=6$) между фрагментацией ДНК до и после хранения: $8,5 \pm 2,5$ и $11,2 \pm 3,1$ соответственно, что подтверждает эффективность и безопасность метода [5]. В период с 2010 по 2013 г.г. методика была применена в 96 программах лечения бесплодия при наличии добровольного письменного информированного согласия пациентов. Частота оплодотворения *in vitro* составила 78,0%, и 74,9% эмбрионов развились до стадии бластоцисты. В результате наступивших 26 беременностей родились 34 здоровых ребенка [5].

Мышь. Существенным недостатком применения среды EFM является осмотический стресс, приводящий к повреждению мембран сперматозоидов. Чтобы избежать этого, мы ввели в состав раствора трегалозу в качестве «осмотического буфера». Модифицированная среда была названа нами ISGT (*isotonic solution of glucose and trehalose*) [6]. При хранении эпидидимальных сперматозоидов лабораторных мышей (*Mus musculus*) в средах ISGT и EFM, было установлено, что трегалоза снижает относительное количество сперматозоидов с поврежденными мембранами после 14 сут хранения ($1,4 \pm 0,4\%$ и $8,2 \pm 1,2\%$ соответственно, $p=0,00$, $n=16$). В то же время, для обоих консервантов не выявлены различия по способности сперматозоидов восстанавливать подвижность после хранения ($p=0,57$, $n=16$), а также по фрагментации ДНК ($p=0,69$, $n=12$) [6].

Осетровые рыбы. Применение сред EFM и ISGT с осмоляльностью ~ 320 мосмоль/кг для гипотермического хранения спермы осетровых рыб вместо желаемого результата привело к быстрой и необратимой утрате способности к активации. Эмпирически было установлено, что наилучшая сохранность спермы осетровых рыб разных видов достигается в бессолевых растворах, близких по осмоляльности к семенной плазме [7]. По результатам экспериментальных исследований, проведенных во ВНИИ ирригационного рыбоводства в 2012–2016 г.г., нами разработана среда ISGT-80 с осмоляльностью, сходной с семенной плазмой стерляди. После хранения в ISGT-80 при $+2 \dots +4$ °C спермы стерляди в течение 6 сут. подвижными после активации становилось не менее 50 % сперматозоидов. Доля сперматозоидов с поврежденной ДНК после 6 сут. хранения не превышала 1,5 %, а сперматозоидов с поврежденными мембранами была не более 10 % [8]. При осеменении икры стерляди спермой, хранившейся 10 сут. в ISGT-80, частота оплодотворения составила не менее 90 % (ВНИИ ирригационного рыбоводства, 2018 – не опубликовано).

Заключение. Успешное применение изотонических бессолевых растворов на основе глюкозы и альбумина для гипотермического хранения спермы эволюционно далеких видов позвоночных демонстрирует универсальность такого подхода, что может быть рекомендовано для разработки новых технологий хранения спермы в животноводстве.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spallanzani L. Tracts on the natural history of animals and vegetables. Edinburgh: Printed for W. Creech and A. Constable [etc., etc.]. 1803. 2d ed. Translated from Italian. Vol. 2. 456 p.
2. Foote R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notable // J Anim Sci – 2002. 80 (E-Suppl 2):1–10.
3. Saito K. et al. A new method of the electrolyte-free long-term preservation of human sperm at 4 degrees C.// Fertil Steril - 1996. 65(6):1210–3.
4. Riel J.M. et al. Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation. Biol Reprod - 2011 Sep; 85(3):536–47.
5. Исаев Д.А. и др. Краткосрочное хранение спермы без замораживания в программах ЭКО/ИКСИ // Проблемы репродукции - 2015. 4:65–70.
6. Исаев Д.А. и др. Влияние трегалозы на сохранность мембран, подвижность и фрагментацию хроматина эпидидимальных сперматозоидов мышей при гипотермическом хранении в безэлектролитных средах // Биомедицина - 2015. 4:69–76.
7. Исаев Д.А. и др. Гипотермическое хранение спермы осетровых рыб в изотонических растворах // Рыбоводство и рыбное хозяйство - 2013. 10:41-49.
8. Исаев Д.А. и др. Подвижность, сохранность мембран и фрагментация ДНК в сперме стерляди при гипотермическом хранении в безэлектролитном растворе глюкозы и трегалозы // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство - 2016. 3:100–108.

HYPOTHERMIC STORAGE OF SPERM IN VERTEBRATES USING SALT-FREE ISOTONIC SOLUTIONS

Isaev D.A.¹, Martynova M.Yu.², Volodyaev I.V.³, Shishanova E.I.¹

¹All-Russian Research Institute of Irrigation Fish Breeding, 24 Sergeev Str., Vorovsky township, Noginsk District, Moscow Region, 142460 Russia

²Moscow Medical University “Reaviz”, Krasnobogatyrskaya Str. 2-2, Moscow, 107564 Russia

³Biological faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, 1-12 Leninskie Gory, Moscow, GSP-1, 119991 Russia

E-mail: dmais@hotmail.ru

Abstract. *A brief review of our research on the hypothermic storage of human, mouse and sturgeon sperm in salt-free isotonic solutions based on glucose and albumin is presented in order to demonstrate the universality of this approach for evolutionarily distant species of vertebrates. The successful experience of practical use of hypothermic sperm storage in reproductive medicine and the encouraging results of our experimental studies point to the possibility of applying these technologies in animal husbandry.*

Keywords: *sperm, hypothermic storage.*

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ФУРАЖНОМ ТРАВСТОЕ И КОНСЕРВИРОВАННЫХ КОРМАХ

Йылдырым Е.А., Ильина Л.А., Солдатова В.В., Лаптев Г.Ю.

ООО «БИОТРОФ», 196602, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ул. Малиновская, лит. А, 7-Н
E-mail: deniz@biotrof.ru

***Аннотация.** Микотоксины - это вторичные метаболиты токсигенных грибов родов *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium*, которые развиваются в тканях кормовых растений и получаемых из них консервированных кормах. Целью исследования было сравнение содержания микотоксинов в кормовых культурах различных видов и консервированных кормах из животноводческих хозяйств различных регионов Российской Федерации. В ходе микотоксикологической оценки кормового травостоя была обнаружена повсеместная множественная контаминация исследованных культур микотоксинами. Выявлено, что содержание микотоксинов варьировало в зависимости от вида кормовых культур. Наиболее пораженными афлатоксинами и зеараленоном оказались растения кукурузы, охратоксином А – люцерны, Т-2-токсином – смеси клевера и тимopheевки. Силос из кукурузы и сенаж оказались наиболее загрязненными кормами.*

***Ключевые слова:** микотоксины, ИФА-анализ, силос, кормовой травостой.*

Введение. Микотоксины - это вторичные метаболиты токсигенных грибов, которые развиваются в тканях кормовых растений и получаемых из них консервированных кормах [1, 2]. Доказано, что микотоксины подавляют иммунную систему животных, нарушают работу рубца, кишечника, печени, почек, репродуктивной, нервной системы и пр. Факторами, влияющими на накопление микотоксинов в процессе вегетации кормового травостоя, являются системы чередования культур, применение удобрений, густота посевов, сроки уборки урожая, физическое повреждение субстратов (например, насекомыми-вредителями), использование химических фунгицидов и др.

В связи с этим целью исследования было сравнение содержания микотоксинов: афлатоксинов (АФЛА), Т-2 токсина (Т-2), охратоксина А (ОТА), зеараленона (ЗЕН), фумонизина (ФУМ) и ДОН, - в кормовых культурах различных видов и консервированных кормах из животноводческих хозяйств различных регионов Российской Федерации.

Материал и методы исследования. В 2013-2017 гг. был проведен мониторинг содержания микотоксинов в 152 пробах кормового травостоя (монокультур ежи, козлятника, люцерны, райграса, клевера, кукурузы, фестулолиума, тритикале, тимофеевки, овса, а также их смесей) и 284 пробах силосов из 20 животноводческих хозяйств из различных регионов РФ (Северо-Западного, Центрального, Южного ФО, Центрально-Черноземного региона, Республик Мордовия и Якутия).

Лабораторные исследования проводили в молекулярно-генетической лаборатории научно-производственной компании ООО «БИОТРОФ» (г. Санкт-Петербург). Для исследования содержания микотоксинов методом иммуноферментного анализа (ИФА) применяли тест-системы AgraQuant («Romer Labs, Inc.», Австрия). Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 450$ нм с использованием микрострипового фотометра Stat Fax 303+ («Awareness Technology, Inc.», США), сопоставляя показатели для образца и для стандартов.

Математическая и статистическая обработки результатов проведены стандартными методами дисперсионного анализа (Полякова и др., 2015) с использованием программного обеспечения EXCEL XP/2010.

Результаты. В ходе микотоксикологической оценки кормового травостоя нами обнаружена повсеместная множественная контаминация исследованных культур микотоксинами. Присутствие на кормовых растениях микотоксинов: Т-2, ЗЕН и ДОН, - которые продуцируют «полевые» микромицеты, поражающие растения в процессе вегетации, не вызывает удивления. При этом крайне интересен факт обнаружения на вегетирующих растениях микотоксинов «амбарных» микромицетов: АФЛА и ОТА. Ранее считалось, что развитие «амбарных» микромицетов в процессе вегетации невозможно в связи с неблагоприятными условиями для их развития. Как показали результаты наших исследований, традиционное разделение микромицетов на «полевые» грибы и «грибы хранения» уже не актуально.

Выявлено, что содержание микотоксинов варьировало в зависимости от вида кормовых культур. Так, наиболее пораженными АФЛА и ЗЕН оказались растения кукурузы, ОТА – люцерны, Т-2 – смеси клевера и тимофеевки. Вероятно, на данных культурах формируются наиболее активные

расы токсигенных грибов. Наименее загрязненными АФЛА оказались растения ежи, ОТА – смеси клевера и фестулолиума, Т-2 – ежи и тритикале, ЗЕН – люцерны и тритикале. При этом средняя загрязненность ДОН варьировала не значительно между культурами и составляла от 1,7 до 2,6 мг/кг растительной массы. Выявленные микотоксины обнаружены в концентрациях, представляющих угрозу для здоровья животных и человека.

Результаты проведения мониторинговых исследований содержания микотоксинов в различных видах кормов из траншей животноводческих хозяйств РФ представлены в таблице 1. В связи с тем, что корма были загрязнены одновременно несколькими микотоксинами, для сопоставления результатов исследования была определена суммарная токсичность кормов, которая приравнивалась к сумме превышений уровней ПДК по афлатоксинам, охратоксину А, Т-2 токсину, зеараленону и ДОН [3] (Крюков, 2014). Эти уровни ПДК отражены в ветеринарно-санитарных требованиях Таможенного союза, утвержденных решением КТС от 18.06.2010 № 317.

Выяснилось (табл. 1), что проблема загрязнения консервированных кормов микотоксинами стоит намного острее, чем проблема контаминации зерна и комбикормов.

Таблица 1. Токсичность консервированных кормов

Микотоксины	Силос из			Зерносе- наж из ячменя	Сенаж из люцер- ны	Плюще- ное зерно ячменя
	кукурузы	бобовых/ злако- вых	ежи сбор- ной			
АФЛА	14,52	12,4	15,32	8,92*	21,32*	2,8
ОТА	83,4	45,5	24,3	51,7	29,6	3,0
Т-2	331,8	138,0	83,4	147,6	153,6	157,8
ЗЕН	125,0	210,0	90,0	138,0	453,0	6,0
ДОН	1950	1260	1930	3280	3050	450
Суммарная токсичность	29,0	17,9	12,9	19,7	21,4	4,4

Судя по средним уровням превышения ПДК и значениям суммарной токсичности силоса, силос из кукурузы и сенаж оказались наиболее загрязненными кормами.

Заключение. В ходе микотоксикологической оценки кормового травостоя было показано, что сложные комбинации микотоксинов из разных химических групп формируются уже в поле на вегетирующих растениях. Доказано, что содержание микотоксинов варьировало в зависимости от вида кормовых культур. Наиболее пораженными афлатоксинами и зеараленоном оказались растения кукурузы, охратоксином А – люцерны, Т-2-токсином – смеси клевера и тимopheевки. Проблема распространения микотоксинов в консервированных кормах из траншей животноводческих хозяйств Российской Федерации является повсеместной и не имеет географических границ. Полученные данные можно эффективно использовать в разработке цифровых программ по прогнозированию возникновения микотоксикозов у жвачных сельскохозяйственных животных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ogunade I.M., Martinez-Tupia C., Queiroz O.C.M., Jiang Y., Drouin P., Wu F., Vyas D. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation // J. of Dairy Science. – 2018. – V. 101(5). – P. 4034–4059.
2. Кононенко Г.П., Буркин А.А. О контаминации микотоксинами сенажа и силоса в животноводческих хозяйствах // Сельскохозяйственная биология. - 2014. - №6. - С. 116–122.
3. Крюков В.С. Оценка уровня контаминации кормов микотоксинами и эффективности адсорбентов // Проблемы биологии продуктивных животных. - 2014. - №3.- С. 37-50.

THE STUDY OF THE DISTRIBUTION OF MYCOTOXINS IN FEED GRASS AND SILAGE

Yildirim E.A., Laptev G.Yu., Soldatova V.V., Ilina L.A.

BIOTROF Ltd, Malinovskaya St., 8, liter A, 7-N, Pushkin, St Petersburg, 196602, Russia

Abstract. Mycotoxins are secondary metabolites of toxigenic fungi of the genera *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*. They are developed in the tissues of feed plants and silages. The aim of the study was to compare the content of mycotoxins in feed crops of various species and forages from livestock farms in various regions of the Russian Federation. In the course of mycotoxicological assessment of forage grass stand, ubiquitous multiple contamination of the studied cultures with mycotoxins was found. It was revealed that the content of mycotoxins varied depending on the type of forage crops. The most affected aflatoxins and zearalenone were corn plants, ochratoxin A - alfalfa, T-2-toxin - a mixture of clover and timothy. Corn silage and haylage turned out to be the most contaminated feed.

Keywords: mycotoxins, ELISA, silage, forage grass.

ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА МЕШОТЧАТОГО РАСПЛОДА В ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Калинин А.Г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»,
г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1 109428
Email: kalinin.andrew2010@yandex.ru

***Аннотация.** В статье показана возможность культивирования вируса мешотчатого расплода в клеточных культурах разного видового и тканевого происхождения. Отмечены проявления ЦПД в отдельных клеточных линиях. В ряде клеточных линий не наблюдалось явного проявления цитопатического действия, однако присутствие вируса в них подтверждено методом ПЦР-РВ. В изучаемых клеточных линиях были выявлены одинаковые цитоморфологические изменения, такие как присутствие крупных и мелких вакуолей в цитоплазме, разрывы оболочек, тикноз ядер.*

***Ключевые слова:** пчелы, культура клеток, монослой, вирус мешотчатого расплода, ЦПД, ПЦР-РВ, цитопатология.*

Введение. Медоносная пчела (*Apis mellifera*), как и все живые объекты, восприимчивы к широкому спектру инфекционных агентов, таких как бактерии, грибы, простейшие, паразиты, вирусы. В настоящее время известно существование более 20 вирусов пчел. Мешотчатый расплод является вирусным заболеванием, приводящим к гибели огромное количество пчелиных семей в России и по всему миру [2].

Для выявления вирусов пчел чаще всего использовались такие методы как РДП, РСК и очень редко метод *in vitro*. Впервые возможности размножения вируса *in vitro* было проведено на эксплантатах яичников нимф маток пчел [7]. Рядом исследователей продолжено культивирование ВМР в первичнотрипсинизированных культурах клеток куриных и мышинных фибробластов [5], личинок рабочих пчел, почек обезьяны [4, 8]. Ими отмечалось, что наиболее чувствительными клетками к вирусу мешотчатого расплода (ВМР) являются первичнотрипсинизированные культуры, полученные из ткани пчел, куриных эмбрионов, мышей. Использование постоянных линий клеток, таких как HELA, HEP-2, СОЦ, СПЭВ, ВНК-21

не привели к положительным результатам [4]. Однако С.Н.Кweon et al. показали, что вирус способен размножаться в постоянных линиях клеток PK-15, IBRS-2, Vero по меньшей мере до 9 пассажа без проявления ЦПД [6].

При изучении возможности репликации вируса в первичных клеточных культурах наблюдали появление зернистости и множество вакуолей.

Недостаток первичнотрипсинизированных культур клеток в том, что они получены от разных доноров и могут обладать различными характеристиками. Постоянные клеточные линии стабильны в своих культурально-морфологических характеристиках и свойствах культуры.

Поэтому, целью нашей работы стал поиск постоянных клеточных линий, которые чувствительны к ВМР и изучение репликации вируса в этих культурах клеток.

Объекты и методы исследований. В работе использовались культуры клеток: ПТ (культура клеток почки телят), ТК-ВИЭВ (культура клеток тестикулов козленка), ЛПК (постоянная культура клеток легких плода коровы), Vero (постоянная линия клеток почек обезьяны), А₄L (гибридная культура клеток почек свиньи с лимфоцитами лошади), полученные из Специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных и криобанка ВИЭВ.

В работе использовались синтетические (ИГЛА МЕМ) и гидролизатные среды (0,5% ГЛА) с добавлением сыворотки КРС 10%.

Клетки пересеивали с использованием смеси растворов 0,02% версена и 0,25% раствора трипсина в соотношении 9:1.

Материал для заражения получали от погибших личинок пчел из семьи пчел с классическими признаками проявления вируса мешотчатого расплода. Личинки растирали в фарфоровой ступке с физиологическим раствором. Центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 10 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через фильтры с размером пор 0,45 мкм и использовали для заражения клеточных культур.

Заражение культур клеток проходило в стерильных условиях с адсорбцией 1-2 ч. при $t^{\circ}=34^{\circ}\text{C}$. Культивировали при $t^{\circ}=34^{\circ}\text{C}$. Для пригото-

ления цитологических препаратов культуры фиксировали через 96-312 ч. и окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимза.

Результаты исследований и их обсуждение. При скрининге клеточных культур на возможность репликации ВМР установлено, что в клеточных моделях разного видового и тканевого происхождения проявлялись различные признаки ЦПД. Так, в культуре клеток ПТ на 3-4 сут. наблюдали большое количество плавающих клеток. На 7-8 сут. культивирования отмечали образование пустот, дегенеративные изменения, на сохранившихся участках монослоя наблюдали пикноз ядер, что совпадает с результатами работы Смирновой Н.И. [6].

В культуре клеток ТК-ВИЭВ на 7-9 сут. наблюдали формирование бесструктурных образований, отмечали много плывущих клеток, однако, разрушения монослоя не обнаруживали

В клетках легкого плода коровы (ЛПК) нарушения целостности монослоя вирусом мешотчатого расплода не отмечали. На поверхности монослоя культуры клеток ЛПК наблюдали наличие округлых клеток.

В постоянных клеточных линиях Vero, A₄L видимых проявлений ЦПД не регистрировалось. Методом ПЦР-РВ было подтверждено присутствие вируса как в культурах клеток с проявлением ЦПД, так и в культурах без признаков ЦПД. Похожие данные присутствовали у Kweon C.H. et al. [7]

На цитологических препаратах культуры клеток ПТ обнаружено, что вирус через 96-144 ч. вызывал образование пустот, нарушение целостности монослоя и разрушение оболочки клеток. В цитоплазме обоих типов клеток – эпителиоподобных и фибробластоподобных - наблюдаются крупные вакуоли. В некоторых клетках вакуоли кольцом окружают ядро. В других очень крупные вакуоли расположены с двух сторон ядра. Встречаются клетки с мелкими вакуолями, также расположенными вокруг ядра. Образование крупных вакуолей отмечается и в двухъядерных клетках. Наблюдается пикноз ядер.

Те же изменения в клетках наблюдаются и в культуре клеток ЛПК, A₄L через 96 ч., Vero через 168 ч. ТК-ВИЭВ через 312 ч.

Похожие признаки проявления действия вируса были получены в первичнотрипсинизированных культурах тканей медоносных пчел, кури-

ных и мышинных фибробластов Гробовым О.Ф. с соавт. Алексеенко Ф.М., с соавт. [1,3]

Заключение. Учитывая общность проявления цитопатологических признаков при культивировании ВМР в культурах клеток различного видового и тканевого происхождения и различия в проявлении в них признаков ЦПД, можно считать, что вирус проявляет в культивируемых клетках общие изменения в виде образования в цитоплазме большого количества вакуолей и пикноза ядер. Впервые показана возможность репликации ВМР в культурах клеток крупного рогатого скота (ПТ, ЛПК), козы (ТК-ВИЭВ), обезьяны (Vero), гибридной культуре клеток (A₄L).

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг., тема (проект) № 0578-2014-0021.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеенко, Ф.М., В.А. Ревенок, М.А. Чепурко. Справочник по болезням и вредителям пчел - 2-е изд., перераб.и доп. // К.: Урожай. – 1991. - с. 83
2. Батуев, Ю.М. Мешотчатый расплод // Пчеловодство. - 2010. - №10. - с. 24-27
3. Гробов, О.Ф., А.М. Смирнов, Е.Т. Попов. Болезни и вредители медоносных пчел: Справочник // М. - Агропромиздат. - 1987. - с.3, 5-8
4. Керимбаев А.К. Изучение некоторых биологических свойств вируса мешотчатого расплода у личинок медоносной пчелы и усовершенствование методов лабораторной диагностики заболевания // Дисс. К.б.н. - 1972.- г. Москва
5. Смирнова, Н.И. Использование куриных и пчелиных фибробластов для выделения и культивирования вируса - возбудителя мешотчатого расплода пчел // Сборник работ «Новое в разведении и генетике сельскохозяйственных животных» выпуск XXXV. – Ленинград. – 1974. - с. 97-98
6. Kweon, C., M. Yoo, J. Noh, K.E. Reddy, D. Yang, S. Cha, S. Kang. Derivation of cell-adapted Sacbrood virus (SBV) from the native Korean honeybee // Virus Research. – 2015. - №198. - P.15-21
7. Vago C., Culture de tissus d'invertébrés, Atti. simposio intern. Bibl. speriment. Pavia, mai, 1959, 9-11.
8. Xiaocui, X., Q. Mao, H. Wang, B. Zhou, T. Wey. Replication of Chinese sacbrood virus in primary cell cultures of Asian honeybee (Apis cerana), Arch Virol (2014) 159: 3435-3438. - pp. 3435-3436.

SYMPTOMS OF MANIFESTATION OF A SACBROOS VIRUS IN THE CELL CULTURES

Kalinin A.G.

FGBNU FNC VIEV of K.I. Skryabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Ryazan prosp., 24-1, 10942

Abstract. The article shows the possibility of culturing the sacbrood virus in cell cultures of different species and tissue origin. The manifestations of CPD in individual cell lines were noted. In a number of cell lines, no obvious manifestation of a cytopathic effect was observed, however, the presence of the virus in them was confirmed by PCR-RV. In the studied cell lines, identical cytomorphological changes were revealed, such as the presence of large and small vacuoles in the cytoplasm, rupture of the membranes, and pycnosis of the nuclei.

Keywords: bees, cell culture, monolayer, sacbrood virus, CPD, cytopathology.RT-PCR.

УДК636.068

ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИИ ИНТАКТНЫХ ЛИМФОЦИТОВ У ГИБРИДОВ ДОМАШНЕЙ КОЗЫ С СИБИРСКИМ КОЗЕРОГОМ ПО СОСТОЯНИЮ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА

Кленовицкий П.М., Иолчиев Б.С., Багиров В.А.

ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, Г. о. Подольск,
Московская область, 142132 Россия

Аннотация. Введение. Состояние ядрышкового аппарата, оцениваемое путем окраски азотнокислым серебром, является одним из критериев характеризующим уровень биосинтеза белка и пролиферации клеток в норме и при патологии. **Цель исследования** состоит в анализе основных характеристик аргирофильных областей в лимфоцитах разной величины у коз. **Новизна.** Впервые в клетках лимфоцитарного ряда у коз с использованием компьютерной программы изучены основные характеристики ядрышковых организаторов (ЯОР), окрашенных азотнокислым серебром. **Материалы и методы.** Состояние ядрышкообразующего аппарата изучали в лимфоцитах, окрашенных азотнокислым серебром по методу Howell W., Black D, у гибридов F_2 сибирского козерога и домашней козы. Анализ препаратов проводили на оборудовании фирмы Альтами (Россия, С.- П.). Обработку и анализ изображений проводили средствами программы Image Score 1.0. по алгоритму, описанному нами ранее. Состояние ядрышкового аппарата оценивали по числу аргирофильных зон (AgNOR), их общей площади в клетке (ΣS_{NOR}), средней плотности их окраски (D_{NOR}), и произведению двух последних показателей, являющемуся эквивалентом связанного с ядрышковыми организаторами серебра. **Результаты исследования и обсуждение.** Число аргирофильных зон (AgNOR) у исследованных коз находилось в интервале от 1 до 6. Достоверных различий между группами, различающимися по размерам лимфоцитов, по всем исследованным показателям, характеризующим состояние ЯОР, не обнаружено. **Заключение.** Отсутствие различий между группами по параметрам, характеризующим состояние ЯОР, указывает на их высокий физиологический консерватизм.

Ключевые слова: аргирофильные структуры, козы, лимфоциты, ядрышковые организаторы, площадь ядра.

Введение. Состояние ядрышкового аппарата является одним из критериев функциональной активности клетки при различных физиологических [1, 2, 3] и патологических процессах [4, 5]. Отмечена также связь параметров, характеризующих активность ядрышковых организаторов с проявлением полигенных признаков [6; 7].

Избирательная окраска хромосом азотнокислым серебром по Howell W., Black D., [8] (Ag^+ -метод) дает возможность выявлять и оценивать активность ядрышкообразующих районов (ЯОР). Интенсивность окрашивания Ag -ЯОР зависит от содержания двух аргирофильных белков нуклеолина (C23) и нуклеофозмина (B23), которые связаны с пролиферативной активностью клетки [9]. Эти белки присутствуют в ядрах клеток на протяжении всего клеточного цикла [5]

Сказанное выше свидетельствует о том, что состояние ядрышкового аппарата может служить репортерной системой, для характеристики уровня пролиферации и биосинтеза белка при оценке состояния организма.

Целью исследования явился анализ основных характеристик аргирофильных областей в лимфоцитах разной величины у коз.

Новизна. Впервые у коз с использованием компьютерной программы изучены основные характеристики ядрышковых организаторов, окрашенных азотнокислым серебром.

Материал и методы. Исследование выполнено в отделе биотехнологии ФНЦ ВИЖ им. академика Л. К. Эрнста.

Мазки крови от исследуемых животных фиксировали метиловым спиртом и окрашивали 50% раствором азотнокислого серебра по методике Хавелла-Блейка [8]. Полученный материал исследовали под масляной иммерсией (увеличение $100\times$). Анализ препаратов проводили на оборудовании фирмы Альтами (Россия, С.- П.): микроскопа Альтами БИО7 и цифровой видеокамеры UNCCD03100KPA, Результаты исследования документировали с помощью цифровой видеокамеры UNCCD03100KPA и программы Image Scope 1.0 (Системы для микроскопии и анализа, Москва). Обработку и анализ изображений проводили средствами программы Image Scope 1.0. по описанному нами алгоритму [10]

Состояние ядрышкового аппарата оценивали по числу аргирофильных зон (AgNOR), их общей площади в клетке (ΣS_{NOR}), средней плотности

их окраски (D_{NOR}) и OE_{NOR} - произведению двух последних показателей, являющемуся эквивалентом связанного с ядрышковыми организаторами серебра. Плотность окраски определяли, как разность между яркостью, соответствующей белому цвету – 254 байта и средней яркостью объекта: $D = 254 - \Phi$, где Φ — средняя яркость анализируемого объекта в байтах, а D — плотность его окраски.

Исследуемые клетки группировали по площади ядра (S_N). Величину площадей анализируемых объектов выражали в логических единицах.

Полученный цифровой материал подвергали статистической обработке по стандартным программам вариационной статистики согласно пакету программ Microsoft Excel-2007.

Результаты исследования. В результате проведенных исследования было установлено, что у исследованных животных все клетки несли окрашенную серебром метку. Число аргирофильных зон у исследованных коз варьирует от клетки к клетке и у всех обследованных нами животных находилось в интервале от 1 до 6.

Результаты статистического анализа параметров, характеризующих ядрышковые организаторы у коз, в зависимости от размеров клеток лимфоцитарного ряда приведены таблице 1.

Таблица 1. Характеристика ядрышкообразующих районов в лимфоцитах разных размеров

Группы	S_N (в пикселях)	Параметры			
		Ag_{NOR}	ΣS_{NOR}	D_{NOR}	OE_{NOR}
1	До 3185	2,64±0,19	334,92±34,22	208,58±2,65	70945,76±7710,82
2	От 3815 до 4490	2,86±0,21	346,19±32,65	204,05±4,10	70951,81±6712,84
3	4490 и более	2,79±0,27	419,21±44,48	204,85±4,03	88075,95±10289,13

Установлено, что среднее значение числа аргирофильных зон (Ag_{NOR}) в исследованных группах находилось в интервале от 2,64±0,19 в

первой группе до $2,86 \pm 0,21$ во второй. Достоверных различий между группами животных по данному показателю не обнаружено. Отмечена тенденция к увеличению площади NOR с увеличением площади лимфоцитов, но достоверных различий между группами не обнаружено. Среднее значение плотности ядрышковых организаторов (D_{NOR}) во всех группах находилось на одном уровне. Не обнаружено достоверных различий и по показателю OE_{NOR} , являющегося эквивалентом связанного с ядрышковыми организаторами серебра.

Заключение. Между клетками лимфоцитарного ряда, различающимися размерами ядра, достоверные различия по параметрам, характеризующим состояние ЯОР отсутствуют, что указывает на их высокий физиологический консерватизм.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме: «Исследование молекулярно-биологических и физиолого-эмбриологических аспектов биоинженерных технологий для совершенствования генетических ресурсов и создания новых селекционных форм сельскохозяйственных животных и птицы». Шифр темы: АААА-А18-118021590132-9.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давидьян А. Г., Кошель Е. И., Лаврова О. Б., Демин А. Г., Галкина С. А., Сайфитдинова А. Ф., Гагинская Е. Р. Функциональные особенности ядрышкового организатора в растущих ооцитах неполовозрелых самок птиц // Онтоогенез. - 2017. - Т. 48. - № 3. - С.263–269.
2. Жариков А.Ю., Луницын В.Г., Лампатов В.В., Мотин Ю.Г., Талалаева О.С., Елисеев Д.В., Павляшик Г.В. Влияние новых средств из сырья пантовых оленей на биосинтетические процессы в клетках скелетной мускулатуры крыс в условиях длительной физической нагрузки // Биомедицина. - 2016. - № 1. - С. 90-94.
3. Трухачев В.И., Квочко А.Н., Малюкин А.В., Криворучко А.Ю., Некрасова И.И., Скрипкин В.С., Мещеряков Ф.А. Параметры ядрышковых организаторов эритроцитов уток в постнатальном онтогенезе // Цитология. - 2016. - Т.58. - №3. - С.229-233.
4. Боташева В.С., Калоева А.А., Эркенова Л.Д. Характер морфологических изменений при эндемическом зобе // Фундаментальные исследования. - 2015. - № 1-1. - С. 36-40.
5. Лазарев А.Ф., Кобяков Д.С., Авдалян А.М., Лушников Е.Л., Непомнящих Л.М., Климачевский А.А. Исследование аргирофильных белков ядрышкообразующих районов и антигена KI-67 при немелкоклеточном раке легкого // Фундаментальные исследования. -2014. - № 10. - С.523-529.
6. Копытко А.С., Квочко А.Н. Оценка белково-синтетической функции у кур кросса СОВВ 500 для прогнозирования их продуктивности // Вестник АПК Ставрополя. 2014. - № 4(16). - С.107-110.

7. Медведев И.Н., Амелина И. В. Влияние функциональной активности ядрышко-образующих районов хромосом на фенотипические признаки у человека // Социальная политика и социология. – 2011. – № 10. – С.285-293
8. Howell W., Black D. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: in a one-step method // Experientia. – 1980. - V. 36. - P.1014–1015.
9. Montanaro L., Trere D., Derenzini M. Nucleolus, ribosomes, and cancer // Am. J. Path. – 2008. - V. 173. - P. 301–310.
10. Кленовицкий П.М., Онкорова Н.Т., Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Моисейкина Л.Г. Оценка ядрышек в интактных лимфоцитах овец с использованием компьютерного анализа изображений // Теоретические и прикладные проблемы АПК. – 2018. – №3. – С.42-46.

THE POPULATION ASSESSMENT OF INTACT LYMPHOCYTES HYBRIDS GOATS WITH THE SIBERIAN IBEX AS NUCLEOLAR ORGANIZER

Klenovitsky P.M., Iolchiev B.S., Bagirov V.A.

L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry
Dubrovitsy 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132 Russia

Abstract. Introduction. *The state of the nucleolar apparatus assessed by coloring with silver nitrate is one of the criteria characterizing the level of protein biosynthesis and cell proliferation in normal and pathological conditions. **The aim of the study** is to analyze the main characteristics of argyrophilic regions in lymphocytes of different sizes in goats. **Novelty.** For the first time in lymphocytic cells of goats using a computer program studied the main characteristics of nucleolar organizers (NOR), painted with silver nitrate. **Materials and methods.** The state of nucleolar apparatus was studied in lymphocytes, how Howell W., Black D, F₂ hybrids of Siberian ibex and domestic goat. The analysis of drugs was carried out on the equipment of Altami company (Russia, S. - P.). Image processing and analysis was carried out by means of the image program scale 1.0. according to the algorithm we described earlier. The state of the nucleolar apparatus was estimated by the number of argyrophilic areas (AgNOR), their total area in the cell (ΣS_{NOR}), the average density of their colour (D_{NOR}), and the product of the last two indicators, which are the equivalent associated with nucleolar organizers of silver. **Research results and discussion.** The number of argyrophilic zones (AgNOR) in the studied goats was in the range from 1 to 6. Significant differences between the groups, differing in size of lymphocytes, for all the studied parameters, characterizing the state of NOR, were not found. **Conclusion.** The absence of differences between the groups in the parameters characterizing the state of the NOR indicates their high physiological conservatism.*

Keywords: argyrophilic structures, goats, lymphocytes, nucleolar organizers, nucleus area.

ОПЫТ СОЗДАНИЯ СТАД – ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОКА ТИПА А2 БЕТА КАЗЕИНА В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Ковалюк Н.В.¹, Сацук В.Ф.², Шахназарова Ю.Ю.¹, Мачульская Е.В.,
Юницкая В.В.³

¹ ФГБНУ Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии, ул. Первомайская, 4, п. Знаменский, г. Краснодар, Краснодарский край, РФ, 350055

² ООО НПО «Юг-Плем», ул. Первомайская, 2/11, п. Знаменский, г. Краснодар, Краснодарский край, РФ, 350055

³ ФГБОУ «Кубанский государственный университет», ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, Краснодарский край, РФ, 350040
E-mail: nvk1972@yandex.ru

Аннотация. С целью выделения группы коров с CSN2 генотипом A2A2 – продуцентов A2 молока и обеспечения ведения селекционного процесса для увеличения доли животных с A2A2 генотипом, нами генотипированы группы коров и быков – производителей голштинской и айрширской пород. В результате, удалось выделить в отдельную группу 391 корову (20%) с генотипом A2A2. Также установлены быки айрширской и голштинской пород, носители CSN2 генотипа A2A2, из которых можно выбрать производителей для дальнейшего подбора.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, ген CSN2, частоты встречаемости, A2 молоко.

Введение. В странах с развитым молочным скотоводством в селекции внедряются достижения биотехнологии, например, тестирование животных, особенно быков-производителей по генам, контролирующим синтез белков молока [1]. Для одного из них, гена бета казеина (CSN2), описаны двенадцать полиморфных вариантов. В зависимости от кодона, кодирующего аминокислоту в позиции 67 бета казеина (гистидин или пролин), животные производят молоко двух типов: A1 и A2.

Исследования, проведенные в нескольких странах, показали, что существует связь между потреблением β -казеина A1 и различными заболеваниями [2].

Цель проведенных исследований - с использованием ДНК анализа выделить группу коров с CSN2 генотипом A2A2 – продуцентов A2 молока

и обеспечить ведение селекционного процесса для увеличения доли животных с A2A2 генотипом.

Для этого необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать систему тестирования животных по CSN2 генотипу;
2. Генотипировать значимую для промышленного производства молока A2 группу коров;
3. Создать базу быков – производителей отечественных племенных предприятий (потребовалось тестирование животных) и зарубежных племенных предприятий – носителей генотипа A2A2 для закрепления признака в потомстве.

Материал и методика исследований. Исследования проведены на базе лабораторий биотехнологии ФГБНУ КНЦЗВ и лаборатории молекулярно-генетической экспертизы ООО НПО «Юг-Плем».

По локусу CSN2 генотипировано 1965 голов коров (1280 – голштинской и 685 айрширской породы) АО «Агрообъединение» Кубань».

Также генотипировано 190 быков-производителей голштинской породы (ОАО «Московское» по племенной работе), 59 быков-производителей айрширской породы (ОАО «Невское» по племенной работе (n=23), ОАО «Племпредприятие «Череповецкое» (n=26) и ОАО «ГЦВ» (n=10)). Учтена информация о CSN2 генотипе 351 быка-производителя голштинской породы (ООО «Центр-Плем» WWS (n=275), ОАО «ГЦВ» (n=76)) и о генотипе 39 быков – производителей айрширской породы VikingGenetics (использованы данные сайтов: <http://www.selectsires.com>, <http://www.vikinggenetics.ru>, <https://oaohcr.ru>).

Для выделения ДНК из спермы и крови использовали наборы реагентов Diatom™ DNA Prep 100 (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва). Для постановки ПЦР реакции использовали наборы реагентов Gene Pak PCR Core (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва).

Праймеры для генотипирования по локусу CSN2 подобраны нами с использованием программы Primer Premier.

Для создания сайта рестрикции в области SNP (T→G) потребовалось введение в состав одного из праймеров нуклеотидной замены (отмечена

подчеркиванием). Использовали праймеры следующей последовательности:

5' AGG GAT GTT TTG TGG GAG GCT CTT 3'

5' ATA AAA TCC ACC CCT TTG CCC AGA 3'

В результате, фрагменты, которые амплифицируются с участка гена β – казеина варианта A2, расщеплялись эндонуклеазой – BstDEI (№ E227, НПО «СибЭнзим») на 2 фрагмента: 64 и 22 пн. Фрагмент, амплифицированный с аллеля A1, сайта рестрикции не имел (размер его составлял – 86 пн). Результаты рестрикции оценивали в 2.5% агарозном геле.

Результаты исследований и их обсуждение. По локусу CSN2 генотипировано 1965 коров айрширской и голштинской пород. Частоты встречаемости CSN2 аллелей и генотипов представлены в таблице 1. По результатам генотипирования, с использованием разработанной тест-системы в АО «Агрообъединение «Кубань» удалось выделить в отдельную группу 391 корову (20 %) с генотипом A2A2. Расчеты показывают (данные по удою предоставлены АО «Агрообъединение «Кубань»)), что от этих животных возможно получить более 4 тыс. тон молока A2 в год.

Таблица 1. Частота встречаемости генотипов и аллелей у животных айрширской и голштинской пород

Генотип/аллель	Частота встречаемости CSN2 генотипов и аллелей в группе животных	
	айрширской породы, (n=685)	голштинской породы, (n=1280)
A1A1	0,36	0,26
A1A2	0,45	0,53
A2A2	0,19	0,21
A1	0,59	0,52
A2	0,41	0,48

Также нами, с целью оценки возможностей отечественных и зарубежных племенных предприятий для ведения селекции на увеличение доли животных A2A2 по локусу CSN2, генотипировано 249 быков-производителей голштинской и айрширской пород. Учтена информация о CSN2 генотипах 390 быков-производителей. Частоты встречаемости CSN2

генотипов у быков-производителей в разрезе племпредприятий представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Частоты встречаемости CSN2 генотипов у быков-производителей голштинской породы (n=541)

Племенное предприятие	Частота встречаемости генотипа, %		
	A1A1	A1A2	A2A2
ОАО «Московское» по племенной работе, (n=190)	16	42	42
ООО «Центр-Плем» (WWS), (n=275)	14	50	36
ОАО «ГЦВ», (n=76)	21	42	37

Таблица 3. Частоты встречаемости CSN2 генотипов у быков-производителей айрширской породы (n=98)

Племенное предприятие	Частота встречаемости генотипа, %		
	A1A1	A1A2	A2A2
ОАО «Невское» по племенной работе, (n=23)	30	48	22
ОАО «Племпредприятие «Череповецкое», (n=26)	23	54	23
ОАО «ГЦВ», (n=10)	40	40	20
VikingGenetics, (n=39)	8	21	71

В результате установлены быки айрширской и голштинской пород, носители генотипа A2A2, из которых можно выбрать производителей для дальнейшего подбора.

Подобная работа проводится и в других регионах РФ. В частности, ООО «ИЦ «Бирюч-НТ», сообщает о генотипировании 7410 голов коров и телок голштинской породы и о выделении довольно большой группы животных с генотипом A2A2 (40,4%) [3].

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калашникова Л.А., Хабибрахманова Я.А., Тинаев А.Ш. Влияние полиморфизма генов молочных белков и гормонов на молочную продуктивность коров черно-пестрой

породы // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2009. - N3. - С. 49-52

2. Parashar A., Saini R. K. A1 milk and its controversy-a review // International journal of bioassays.- 2015.-№ 4.-Р. 4611-4619

3. Погребняк В.А., Зажарский П.А. Сравнительная оценка молока коров голштинской породы разных генотипов по β - и κ -казеину // Молочное и мясное скотоводство. - 2019. - № 3.- С.17-20.

EXPERIENCE of CREATION OF HERDS PRODUCING MILK TYPE A2 THE BETA CASEIN IN THE KRASNODAR REGION

Kovalyuk N.V.¹, Satsouk V.F.², Shaknarova Y.Y.¹, Machulsкая E.V., Junickaja V.V.³

¹ Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine
Pervomayskaya str., 4, p. Znamensky, Krasnodar, Krasnodar region, Russia, 350055

² LLC Research and Production Association "Yug-Plem", Pervomayskaya str., 2/1, p. Znamensky, Krasnodar, Krasnodar region, Russia, 350055

³ "Kuban state University», Stavropol str., 149, Krasnodar, Krasnodar region, Russia, 350040

E-mail: nvk1972@yandex.ru

Annotation. *In order to identify a group of cows with CSN2 genotype A2A2 – producers of A2 milk and ensure the conduct of the breeding process to increase the proportion of animals with A2A2 genotype, we genotyped groups of cows and bulls Holstein and Ayrshire breeds. As a result, it was possible to allocate in separate group 391 cow (20%) with genotype A2A2. Also have bulls of the Ayrshire and Holstein breeds, carriers of the CSN2 genotype A2A2 from which to choose manufacturers for further selection.*

Keyword: *cattle, CSN2 gene, frequency of occurrence, A2 milk.*

УДК 575.224.46; 575.2.084

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ГЕНА EGFP ПОД ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНЫМ (CMV) ПРОМОТОРОМ ДЛЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНТЕГРАЦИИ В ГЕНОМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9

Колоскова Е.М., Езерский В.А.

ВНИИФБиП животных – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, г. Боровск, Калужской обл., РФ, 249013

E-mail: heleko3@yandex.ru, ez.vadim@yandex.ru

Аннотация. Бета-лактоглобулин (β -ЛГ, BLG) – основной сывороточный белок молока почти у всех млекопитающих кроме грызунов и приматов. Регуляторные районы гена BLG овец, коз и крупного рогатого скота давно и успешно применяют в составе генетических конструкций. Ген bBLG – перспективный кандидат для замены геном гетерологичного белка при использовании CRISPR/Cas9 технологии. Была создана плаزمид, содержащая 5' и 3' плечи гомологии (размером 926 и 805 п.н. соответственно) к гену β -лактоглобулина крупного рогатого скота (bBLG), на стыке плечей гомологии имеющая сайт для рестриктазы EagI. Фрагмент, содержащий ген зеленого флуоресцентного белка под CMV промотором, был встроен по этому сайту. Плазмид, содержащая фрагмент cmvEGFP и плечи гомологии к гену bBLG предназначена для сайт-специфичной интеграции гомологичной рекомбинацией в ген bBLG при использовании CRISPR/Cas9 технологии в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: генетические конструкции, β -лактоглобулин, bBLG, CRISPR/Cas9, EGFP, крупный рогатый скот.

Введение. Основная проблема получения трансгенных животных – случайное встраивание трансгена с неконтролируемым количеством копий, низкий процент интеграции чужеродной ДНК в геном хозяина при использовании метода микроинъекции в пронуслеус зиготы. Это особенно проблематично при работе с малоплодными крупными с/х животными (козы, овцы, коровы). Применение технологии CRISPR/Cas9 с использованием механизма прямой гомологичной рекомбинации (HDR) – эффективный метод изменения состава молока замещением генов эндогенных молочных белков у сельскохозяйственных животных, коррекции состава молока [1], [2]. Бета-лактоглобулин – основной сывороточный белок молока почти у всех млекопитающих, кроме грызунов и приматов. Регуляторные районы гена β -ЛГ овец, коз и КРС (bBLG) успешно применяют в составе генных конструкций [3]. Ген bBLG – перспективный кандидат для замены геном гетерологичного белка при использовании системы CRISPR/Cas9: точное встраивание трансгена в составе генной конструкции, содержащей плечи гомологии к bBLG, обеспечит его экспрессию под управлением полноразмерных эндогенных регуляторных последовательностей. Применение в составе генных конструкций репортерных систем (в частности, генов флуоресцентных белков), подтверждающих наличие трансгена в эмбрионе, дает возможность быстро оценить эффективность интеграции трансгена HDR механизмом при выбранной стратегии CRISPR/Cas9 модификации гена.

Цель работы. Создать генетическую конструкцию, включающую в себя фрагмент cmvEGFP, плечи гомологии к областям гена bBLG.

Материал и методика исследований. Последовательность гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота (*Bos taurus*) была взята из базы данных GenBank, запись X14710. Геномная ДНК была выделена из спермы быка черно-пестрой породы по кличке Мороз (племенное хозяйство «Быково»).

В работе использовали ферменты и реактивы: FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, рестриктазы *EagI*, *BglII*, *XbaI* с соответствующими буферами. Для промежуточного клонирования ПЦР-продуктов использовали pTZ57R/T и T4 DNA лигазу набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Праймеры заказывали в ЗАО «Синтол» <<http://www.syntol.ru>>. Процедуру ПЦР проводили на амплификаторе ДНК «Терцик» («ООО ДНК-Технология», Москва). Трансформацию компетентных клеток *E.coli* Dh5 α , TG1 проводили по методике и с реагентами набора Transform-Aid Bacterial Transformation Kit с нашими модификациями. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit с нашими модификациями и классическим методом щелочного лизиса. Качество и количество ДНК оценивали визуально в УФ свете после электрофореза в агарозном геле. ДНК из агарозного геля выделяли с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit. Подбор праймеров, конструирование рекомбинантной ДНК, рестриктный анализ проводили в программе Vector NTI.

Результаты исследований и их обсуждение. Полиморфизм гена bBLG может стать причиной низкой эффективности работы компонентов CRISPR/ Cas9: яичники КРС, как правило, отбирают на мясокомбинатах от коров разных пород. В последующих экспериментах *in vitro* оплодотворение яйцеклеток будет производиться спермой одного быка. ПЦР амплификаты с геномной ДНК быка «Мороз» 5' и 3' областей гена bBLG (около 1,5 т.п.н. каждый) были клонированы pTZ57R/T вектор с целью получения последовательностей выбранных фрагментов. В праймеры для ПЦР-амплификации 5' и 3' плечей гомологии (5'НА и 3'НА) ввели последовательности для рестриктаз *XbaI*, *EagI* и рестриктаз *Eag I*, *BglII* соответственно. Фрагмент 5'НА содержит 1-й экзон гена bBLG с последовательностью сигнального пептида β -ЛГ, 1-й интрон. ПЦР-амплификаты клонировали в pTZ57R/T вектор с получением плазмид pTZ5'НАBLG и

pTZ3'HABLG. Из плазмиды pTZ5'HABLG рестриктазами XbaI, EagI вырезали фрагмент-вставку XbaI_ 5'HABLG_ EagI и после очистки клонировали в предварительно обработанную такими же рестриктазами и щелочной фосфатазой плазмиду-акцептор XbaI_ pTZ3'HABLG_ EagI. После лигирования фрагментов получили pTZHABLG, на стыке плечей гомологии имеющую сайт для рестриктазы EagI. Из плазмиды pGEMTcmvEGFP рестриктазой BsmBI (Esp3I) вырезали и очистили фрагмент cmvEGFP-bGH polyA с NotI/EagI липкими концами, клонировали в обработанную рестриктазой EagI и щелочной фосфатазой плазмиду pTZHABLG. В результате была получена плазида pBLGcmvEGFP, которую в циркулярном или в линейном виде (вырезав генную конструкцию рестриктазами EcoRI и BglII) можно использовать в качестве ДНК-матрицы для гомологичной рекомбинации с геном bBLG с применением CRISPR/Cas9-компонентов (рис.1).

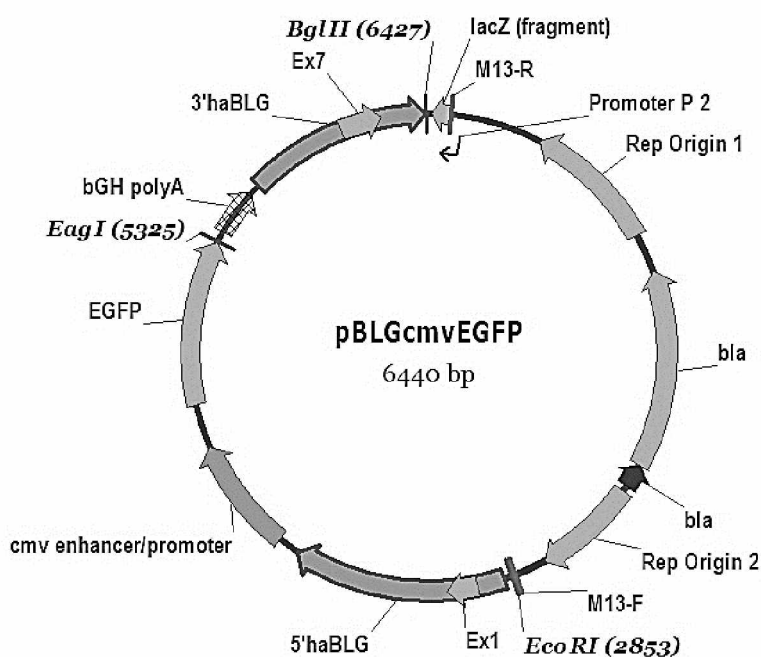


Рисунок 1. Схема плазмиды pBLGcmvEGFP, содержащей ген EGFP, фланкированный cmv промотором и bGHpolyA фрагментом, плечи гомологии 5'HA и 3'HA. Показаны основные сайты рестрикции, структурные элементы плазмиды, секвенирующие праймеры.

Известны работы по направленным модификациям гена β -лактоглобулина КРС с использованием ZFN [4], [5] и TALEN [6], [7] тех-

нологий, но не с использованием системы CRISPR/Cas9.

Заключение. Созданная плаزمид, содержащая ген EGFP под CMV промотором, фланкированный плечами гомологии к гену BLG, может быть использована в условиях *in vitro* в качестве ДНК-матрицы для направленной гомологичной репарации (HDR) гена bBLG, получившего сайт-специфичные двухцепочечные разрезы компонентами системы CRISPR/Cas9. В случае высокой эффективности HDR фрагмент cmvEGFPbGHpolyA может быть заменен кДНК или геном фармакологически активного белка с перспективой получения трансгенного крупного скота, содержащего в молоке вместо β -лактоглобулина нужный белок.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шепелев М. В., Калиниченко С. В., Дейкин А. В., Коробко И. В. Получение рекомбинантных белков из молока трансгенных животных: современное состояние и перспективы// АСТА NATURAE – 2018. 10 № 3 (38):42-50
2. Whitelaw C.B.A., Sheets T.P., Lillico S.G., Telugu B.P. Engineering large animal models of human disease // J. Pathol. – 2016.Vol. 238:247-256.
3. Трубицина Т.П., Рябых В.П., Колоскова Е.М., Езерский В.А., Максименко С.В. Использование гена β -лактоглобулина при получении рекомбинантных белков - от старых технологий трансгенеза к новым методам редактирования генома (обзор)// Проблемы биологии продуктивных животных. - 2018. № 3:15-34
4. Wei J., Wagner S., Lu D., Maclean P., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Laible G. (2015). Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome// Sci. Rep.-2015. 5, 11735
5. Sun Z., M.Wang, S. Han, S. Ma, Z. Zou, F. Ding, X. Li, L. Li, B.Tang, H. Wang, N. Li, H. Che, Y.Dai. Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA. Sci Rep. – 2018. 8:15430.
6. Luo Y., Wang Y., Liu J., Cui C., Wu Y., Lan H., Chen Q., Liu X., Quan F., Guo Z., Zhang Y. Generation of TALE nickase-mediated gene-targeted cows expressing human serum albumin in mammary glands// Sci. Rep.-2016.6: 20657
7. Wei J., Wagner S., Maclean P., Brophy B., Cole S., Smolenski G., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Wells D.N., Laible G. Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin// Sci. Rep. - 2018; 8:7661.

CREATION OF GENETIC CONSTRUCTION OF EGFP GENE UNDER CYTOMEGALOVIRUS (CMV) PROMOTER FOR SITE-SPECIFIC INTEGRATION INTO RABBIT GENOME USING CRISPR/CAS9 TECHNOLOGY

Koloskova E.M., Ezerskii V.A.

Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, a branch L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation, 249013
E-mail: heleko3@yandex.ru, ez.vadim@yandex.ru

Abstract. Beta-lactoglobulin (β -LH, BLG) is the main whey protein of milk in almost all mammals except rodents and primates. Regulatory sequences of the BLG gene of sheep, goats and

*cattle are successfully used as part of genetic constructions. The bBLG gene is a promising candidate for its replacement by the heterologous protein gene using CRISPR/Cas9 technology. A plasmid containing 5' and 3' homology arms (size 926 and 805 bp, respectively) to the bovine β -lactoglobulin gene was created, at the junction of homology arms having a site for restriction of *EagI*. A fragment containing a green fluorescent protein gene under the CMV promoter has been integrated into this site. Plasmid containing a fragment *cmvEGFP* and arms of homology to the gene *bBLG* is designed for site-specific integration by homologous recombination into the gene *bBLG* for the use of CRISPR/Cas9 technology in vitro.*

Keywords: genetic constructions, β -lactoglobulin, *bBLG*, CRISPR/Cas9, *EGFP*, cattle.

УДК 636.223.1, 636.2.033

ПРОФИЛАКТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРУПНОГОРОГАТОГО СКОТА АБЕРДИН-АНГУССКОЙ ПОРОДЫ ПРИ ПОМОЩИ АНАЛИЗА ДНК

Коновалова Е.Н., Костюнина О.В., Романенкова О.С.

ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, г.о. Подольск, Московская обл., РФ, 142132

E-mail: konoval-elena@yandex.ru, тел.: +74967651104

Аннотация. В рамках исследований были изучены генетические дефекты множественного артрогрипоза (АМ), остеопетроза (ОС) и дупликации развития (DD), проявляющиеся у крупного рогатого скота абердин-ангусской породы. Для диагностики данных дефектов были разработаны ДНК-тесты путем использования методов АС-ПЦР (для АМ и ОС) и ПЦР-ПДРФ (для DD). Посредством разработанных тест-систем был проведен популяционный анализ, который показал наличие животных-носителей АМ, ОС и DD среди российского чистопородного абердин-ангусского скота со средними частотами 1,58; 1,02 и 5,84%, соответственно. Также был оценен риск распространения мутантных аллелей путем их передачи от родителей потомству, в ходе анализа которого было выявлено статистически значимое шестикратное увеличение частоты мутантного аллеля, ассоциированного с АМ, в популяции телок по сравнению с их матерями ($p < 0,05$).

Ключевые слова: крупный рогатый скот, абердин-ангусская порода, генетический дефект, множественный артрогрипоз, остеопетроз, дупликация развития.

Введение. В настоящее время среди крупного рогатого скота абердин-ангусской породы наблюдались случаи проявления наследственных заболеваний, причиной которых являются генные мутации, передающиеся из поколения в поколение, в связи с чем высоко актуальным является разработка мер профилактики врожденных аномалий.

С 2017 г. в лаборатории молекулярных основ селекции ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста проводятся работы по проблеме генетических де-

фектов, проявляющихся у крупного рогатого скота абердин-ангусской породы [1], с особым акцентом на изучение причинных мутаций, принципов их наследования и поиск средств ДНК-диагностики.

Цель работы - создание тест-систем на основе анализа ДНК для выявления мутантных аллелей, связанных с множественным артрогрипозом (AM), остеопетрозом (OS) и дупликацией развития (DD), анализ частот встречаемости животных-носителей AM, OS и DD в российских популяциях абердин-ангусского скота и оценка риска распространения мутаций путем передачи из поколения в поколение.

Материал и методика исследований. Материалом исследования были препараты ДНК ($n=4087$) крупного рогатого скота абердин-ангусской породы различных хозяйств Центрального региона РФ, полученные из образцов биоматериала (кровь, молоко, ушной выщип и пр.) по стандартным методикам [2], и хранящиеся в банке ДНК лаборатории молекулярных основ селекции ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста.

Весь материал был исследован по генетическим дефектам AM, OS и DD посредством ранее разработанных тест-систем, основанных на использовании методов АС-ПЦР и ПЦР-ПДРФ [3-5].

Для оценки риска распространения генетических дефектов из материала исследований были выделены две популяции ($n=214$), принадлежащие одному из хозяйств: I – коровы (поколение F1) ($n=107$) и II – телки, полученные от коров популяции I (поколение F2) ($n=107$). Данные животные также были исследованы по генетическим дефектам AM, OS и DD с дальнейшим подсчетом частот встречаемости животных-носителей и частот мутантных аллелей [6]. Для статистической оценки полученных данных был использован t-тест Стьюдента, показывающий достоверность различий между поколениями, и критерий χ^2 , иллюстрирующий вероятность случайности наблюдаемых значений [7]. Различие считалось достоверным ($p<0,05$) при $t \geq 1,972$ при уровне значимости $\alpha = 0,05$. Частоты аллелей считались не случайными ($P \leq 0,05$) при $\chi^2 \geq 3,84$.

Результаты исследований и их обсуждение. В период 2018-2019 гг. были разработаны тест-системы для диагностики генетических дефектов AM, OS и DD [3-5], результаты работы которых представлены на рис. 1. Данные тест-системы дают возможность проводить раннюю идентифика-

цию животных-носителей генетических дефектов AM, OS и DD независимо от пола, возраста и физиологического состояния животных.

Посредством разработанных тест-систем был проведен массовый скрининг животных, результаты которого представлены в табл. 1.

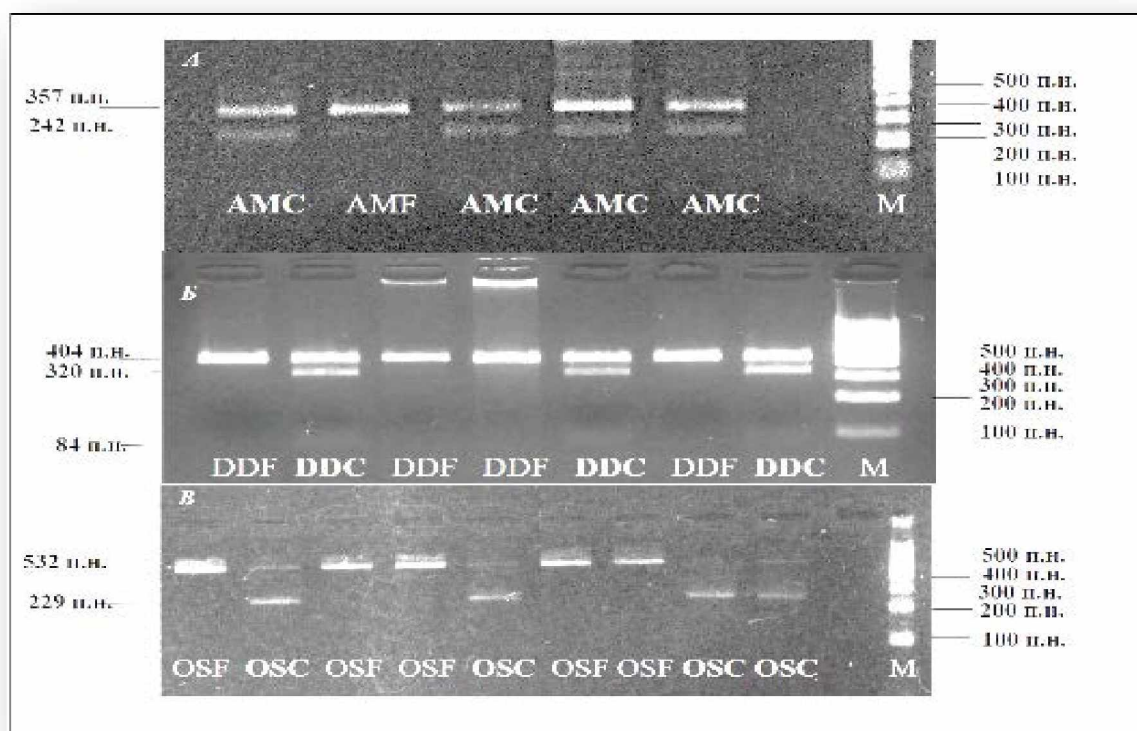


Рисунок 1. Результаты геля электрофореза. А – АС-ПЦР для диагностики множественного артрогрипоза; Б – ПЦР-ПДРФ для диагностики дупликации развития; В – АС-ПЦР для диагностики остеопетроза. АМС – животное-носитель АМ (arthrogripopsis multiplex carrier), АМФ – животное, свободное от мутации АМ (arthrogripopsis multiplex free); DDC – животное носитель мутации DD (Developmental duplication carrier), DDF – животное, свободное от мутации DD (Developmental duplication free); OSC – животное-носитель остеопетроза (osteopetrosis carrier); OSF – животное, свободное от мутации OS (osteopetrosis free); М – маркер молекулярного веса (500 пар нуклеотидов).

Таблица 1. Результаты скрининга крупного рогатого скота абердин-ангусской породы российских популяций по генетическим дефектам AM, OS и DD

Генетический дефект	N*	n**	Средняя частота встречаемости животных-носителей дефекта, %
Множественный артрогрипоз	6	1456	1,58
Остеопетроз	13	1075	1,02

Дупликация развития	12	1556	5,84
---------------------	----	------	------

**N – количество популяций; **n – число голов.*

Как видно из данных табл. 1, среди животных абердин-ангусской породы, разводимых на территории России, встречаются животные-носители генетических дефектов AM, OS и DD, частота которых в среднем по популяциям составляет 1,58, 1,02 и 5,84%, соответственно. Однако, эти средние данные не показывают всего масштаба проблемы, особенно в отношении генетического дефекта дупликации развития. Проведенные ранее на большем поголовье животных исследования выявили в отдельных популяциях животных-носителей дупликации развития в частотах свыше 20% [8].

Анализ популяций I и II, соответствующих поколениям матерей и дочерей, показал наличие AMC-, OSC- и DDC-животных, как в поколении F1, так и в поколении F2 (табл. 2).

Таблица 2. Частоты встречаемости животных-носителей генетических дефектов AM, OS и DD в поколениях родителей и потомков

Популяция	Частота встречаемости животных-носителей генетического дефекта (%)		
	AM	OS	DD
I (F1)	0,93	1,87	0,93
II (F2)	11,2	0,93	0,93

Однако, если по генетическим дефектам OS и DD значительной разницы в проценте животных-носителей между поколениями обнаружено не было, то для генетического дефекта AM частота AMC-животных в популяции F2 была почти на 10,3% выше по сравнению с популяцией F1. Частота мутантного AM-аллеля в популяции F2 была в шесть раз выше данного показателя популяции F1 (0,06 против 0,01). Данное различие оказалось статистически значимым ($t=2,85$; $p=0,004863$). При этом уровень критерия χ^2 оказался относительно низким и составил 0,01 для поколения F1 и 0,38 для поколения F2, что свидетельствует об отсутствии какого-либо

селекционного давления в отношении генетического дефекта АМ в данных популяциях [9].

Заключение. Полученные данные подтверждают актуальность проблемы генетических дефектов крупного рогатого скота абердин-ангусской породы. Наличие животных-носителей мутантных аллелей является серьезной предпосылкой их распространения в популяциях с последующим клиническим проявлением заболеваний, способных нанести существенный вред хозяйствам. Результат анализа передачи мутантного аллеля от родителей потомству на примере множественного артрогрипоза также наглядно демонстрирует высокий риск распространения мутации путем вертикальной передачи.

В связи с этим вопрос профилактики наследственных аномалий требует особого внимания, а применение для этой цели разработанных в ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста ДНК-тестов является оптимальным. Раннее выявление в генотипах животных мутантных аллелей позволит ликвидировать основной этиологический фактор наследственных заболеваний – скрещивание животных-носителей между собой. Данный подход даст возможность использовать высокоценных животных-носителей мутантных аллелей в селекционных программах без выбраковки путем скрещивания их с животными свободными от мутации и дальнейшим получением здорового потомства.

Исследования проводились в рамках задания Министерства образования и науки Российской Федерации № АААА-А18-118021590138-1 и при поддержке проекта РФФИ № 19-016-00007.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коновалова Е.Н., Гладырь Е.А. и др. Генетические дефекты мясных пород крупного рогатого скота и стратегии их контроля// Ветеринария, зоотехния и биотехнология - 2017. №7. С. 42-52.
2. Зиновьева Н.А. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных // Дубровицы: ВИЖ, 2002 // 112 с.
3. Коновалова Е.Н., Костюнина О.В. и др. Генетический дефект множественного артрогрипоза и его ДНК-диагностика у крупного рогатого скота абердин-ангусской породы Достижения АПК.
4. Коновалова Е.Н., Костюнина О.В. ДНК-диагностика генетического дефекта дубликации развития (DD) у крупного рогатого скота абердин-ангусской породы. Молочное и мясное скотоводство. С. 20-24. №4, 2018.

5. Коновалова Е.Н., Костюнина О.В. и др. Генетический дефект остеопетроза крупного рогатого скота: создание диагностического ДНК-теста и анализ частоты встречаемости животных-носителей мутации среди российских популяций // Проблемы биологии продуктивных животных. (в печати).
6. Rodriguez S., Gaunt T.R. et al. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies // American Journal of Epidemiology 2009 169(4) pp. 505-514.
7. Glantz A.S. Primer of Biostatistics //Moscow: Practica. 1998 p. 459.
8. Коновалова Е.Н., Костюнина О.В. Распространение генетических дефектов множественного артрогрипоза (АМ) и дупликации развития (DD) среди российских популяций крупного рогатого скота абердин-ангусской породы. Генетика и разведение животных. №1, 2019. с. 18.
9. Konovalova E.N., Volkova V.V. et al. Aberdeen Angus cattle breed in Russia: prevention of the genetic defects and evaluation of the risk of their spread by transferring from parents to offspring. //Conference on Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies» (AGRITECH-2019). June, 20-22 Krasnoyarsk, Russia P. 118.

THE PREVENTION OF THE GENETIC DISEASES OF ABERDEEN ANGUS BREED CATTLE BY HELPING OF DNA ANALYSIS

Konovalova E.N., Kostyunina O.V., Romanenkova O.S.

L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132 Russia.
E-mail: konoval-elena@yandex.ru, phone: +74967651104

Abstract. *In the frame of the investigations the genetic defects of Arthrogryposis multiplex (AM), Osteopetrosis (OS) and Developmental duplication (DD), appearing in Aberdeen Angus cattle, have been studied. For their diagnostics the DNA tests by using of the AS-PCR (for AM and OS) and PCR-RFLP (for DD) have been developed. By means of the developed test systems has been carried out the population analysis showed the presence of the animals-carriers of AM, OS and DD among Russian purebred Aberdeen Angus cattle with the average frequencies of 1.58, 1.02 and 5.84% respectively. It also was evaluated the risk of the spread of the mutant alleles by transfer from parents to offspring during analysis of which was revealed the significant six-fold increasing of the frequency of mutant allele associated with AM in the heifers population comparing to their mothers' population ($p < 0.05$).*

Keywords: *cattle, Aberdeen Angus breed, Arthrogryposis multiplex, Osteopetrosis, Developmental duplication.*

ВИТРИФИКАЦИЯ ДОЗРЕВШИХ *IN VITRO* ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ТРИАЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ПОЛЫХ ВОЛОКОН

Корниенко Е.В., Романова А.Б., Малек Г.П.

ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»
ул. Костякова, 12, г. Москва, РФ, 127422
E-mail: galina_malenko@mail.ru

***Аннотация.** Стандартизация обработки ооцитов крупного рогатого скота (КРС) в растворах витрификации/отогревания и возможность получения воспроизводимых результатов все еще остаются нерешенными задачами при применении вспомогательных репродуктивных методов в промышленном скотоводстве. Решением данных задач может являться применение метода витрификации в триацетатцеллюлозных полых волокнах групп, дозревших *in vitro* денудированных ооцитов КРС. Однако при применении данного метода для криоконсервации таких ооцитов, несмотря на достаточно высокие показатели выживания (79,9%) и оплодотворения (80,5%), уровень выхода бластоцист на 7-10 сутки развития (1,4 и 5,5% от культивируемых зигот соответственно) был статистически значимо ниже ($p < 0,05$) чем в контрольной группе. Данный эффект мог быть связан с недостаточной дегидратацией как самих ооцитов, так и окружающего их внутри волокна раствора перед погружением в жидкий азот. Увеличение концентрации непроникающего криопротектора сахарозы в растворе витрификации с 0,5 до 1,0М позволило существенно повысить показатели эмбрионального развития оплодотворенных после витрификации ооцитов КРС. Выход бластоцист на 7 и 10 сутки развития (15,5 и 28,4% соответственно) в этой экспериментальной группе был сопоставим с соответствующими показателями в контрольной (19,9 и 34,9% соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о возможности дальнейшей модификации протокола витрификации дозревших *in vitro* ооцитов КРС в триацетатцеллюлозных полых волокнах с целью повышения его эффективности.*

***Ключевые слова:** витрификация, ооцит, триацетатцеллюлозное полое волокно, крупный рогатый скот.*

Введение. Метод витрификации в триацетатцеллюлозных полых волокнах (hollow fiber vitrification, HFV), предложенный Matsunari et al. [1], позволяет существенно упростить и стандартизировать процедуры витрификации/отогревания групп эмбрионов млекопитающих. Именно стандартизация обработки объектов в растворах с различным содержанием проникающих и непроникающих криопротекторов в

сочетании с применением принципа охлаждения в минимальном объеме может являться преимуществом применения метода HFV при витрификации ооцитов млекопитающих, в частности ооцитов крупного рогатого скота (КРС) [1,2,3]. В нашей предыдущей работе после витрификации созревших *in vitro* ооцитов КРС был получен достаточно низкий выход бластоцист на 7-10 сутки развития при достаточно высоких показателях выживания [3]. Одним из факторов, вероятно повлиявших на эффективность витрификации, могла быть недостаточная дегидратация ооцитов и/или окружающего их раствора внутри волокна перед погружением их в жидкий азот, связанная с особенностями криоконсервируемого объекта и/или носителя [4,5,6,7]. Решить данную проблему возможно за счет повышения концентрации непроникающего криопротектора (сахарозы) в растворе витрификации.

Цель данной работы – оценка влияния повышения концентрации непроникающего криопротектора сахарозы в растворе витрификации на эффективность криоконсервации созревших *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота в триацетатцеллюлозных полых волокнах.

Материалы и методы. В работе использовали созревшие *in vitro* ооциты КРС. Созревание проводили в течение 19–20 ч в среде 199 с 10% фетальной сыворотки крови КРС, после чего ооциты освобождали от клеток кумулюса в растворе гиалуронидазы (1,1 мг/мл) при помощи Vortex. В качестве носителя для витрификации использовали триацетатцеллюлозные полые волокна с внутренним диаметром 200 мкм, толщиной стенок 15 мкм и размером пор 7 нм (Nirpo, Япония). В качестве базовой среды для приготовления растворов витрификации и отогревания использовали среду TLP-HEPES [14] с 20% ФСК и без CaCl_2 . Группы денудированных ооцитов (12-17 шт.) помещали в раствор эквilibрации, содержащий 3% (v/v) этиленгликоля. Здесь ооциты загружали в полое волокно и после 15-минутной инкубации переносили в VS, содержащий 30% этиленгликоля и 0,5 М (группа 1) или 1,0 М сахарозы (группа 2), на 60 или 30 с соответственно. Затем волокно незамедлительно погружали в жидкий азот. После извлечения из жидкого азота волокно с ооцитами погружали на 1 мин. в раствор отогревания, содержащий 0,5 М сахарозы, и затем переносили в раствор разбавления с 0,25 М сахарозы на 3 мин.

После этого волокно дважды отмывали в базовом растворе, в последней смене которого ооциты выгружали из волокна. Все растворы имели комнатную температуру (24-25 °C), кроме раствора отогревания (39 °C). В качестве контроля использовали денудированные дозревшие *in vitro* ооциты КРС, не подвергавшиеся витрификации.

Для оплодотворения использовали сперматозоиды, выделенные из криоконсервированного семени быка по методу swim-up. Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла $0,5 \times 10^6$ шт./мл. Оплодотворение проводили в среде TALP-Fert [8], содержащей гепарин (0,2 мкг/мл), в течение 19 ч, после чего определяли уровень выживания предполагаемых зигот. Часть предполагаемых зигот фиксировали в растворе Карнуа (этанол: ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1), окрашивали ацетолакмоидом и изучали под микроскопом с фазовым контрастом. Оставшиеся зиготы культивировали в модифицированной среде SOF [8] в течение 10 суток. Каждая экспериментальная группа содержала не менее четырех повторов. Дробление эмбрионов оценивали через 44–46 ч от начала оплодотворения. Количество эмбрионов, достигших стадии развития бластоцисты, учитывали на 7 и 10 сутки развития. Уровень выхода бластоцист из блестящей оболочки оценивали на 10 сутки развития.

Результаты и обсуждение. Уровень выживания в группе 1 (0,5 М сахарозы в VS) через 19 ч после начала оплодотворения составлял $79,9 \pm 7,9\%$, в группе 2 (1,0 М сахарозы в VS) — $80,7 \pm 11,1\%$. По этому показателю экспериментальные группы статистически значимо отличались от контрольной ($98,8 \pm 3,2\%$; U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$). Полученные результаты согласуются с рядом данных [4,5,6]. В нашей дальнейшей работе использовались только выжившие зиготы.

При оценке параметров оплодотворения, нормального оплодотворения и полиспермного оплодотворения статистически значимых отличий (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) между экспериментальными группами и контролем выявлено не было (табл. 1). Однако в группах 1 и 2 наблюдалась тенденция к снижению доли нормально оплодотворенных ооцитов и ооцитов с полиспермным оплодотворением. В то же время, показатель полиспермии оставался

стабильно высоким как у витрифицированных, так и контрольных ооцитов (26,1-39,4%). В целом же не наблюдалось существенного снижения уровня оплодотворения, что зачастую характерно для витрифицированных ооцитов КРС [4,5,6].

Таблица 1. Результаты оплодотворения дозревших *in vitro* денудированных ооцитов крупного рогатого скота, витрифицированных с использованием разных протоколов

Группа	Всего ооцитов, n	Оплодотворено, n (%*)	Нормально оплодотворено, n (%**)	Полиспермия, n (%**)
1	51	40 (80,5 ± 18,3)	19 (39,4 ± 15,4)	14 (26,9 ± 9,3)
2	52	43 (83,1 ± 12,7)	21 (49,7 ± 8,5)	8 (26,1 ± 8,3)
Контроль	142	126 (87,0 ± 7,4)	70 (55,9 ± 9,0)	46 (35,4 ± 13,9)

* — от числа выживших, ** — от числа оплодотворенных.

При сходных показателях оплодотворения уровень дробления эмбрионов в группе 1 был существенно ниже ($44,8 \pm 15,5\%$, 64/140 эмбрионов) чем в контрольной ($67,4 \pm 13,5\%$, 166/257 эмбрионов; U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$), а в группе 2 существенно не отличался ($58,4 \pm 9,9\%$, 97/161). В группе 1 также существенно снижались по сравнению с контролем показатели дальнейшего эмбрионального развития (табл. 2). Кроме того, бластоцисты в группе 1 были получены только в 4 из 7 повторов. Группа 2 существенно отличалась от контроля только по показателю выхода бластоцист из блестящей оболочки на 10 сутки развития (табл. 2). Однако следует учесть существенное различие по уровню выживания ооцитов между экспериментальными и контрольной группами.

**Таблица 2. Развитие эмбрионов, полученных в результате оплодотворения
дозревших *in vitro* денудированных ооцитов крупного рогатого скота,
витрифицированных с использованием различных концентраций
сахарозы**

Группа	Кол-во зигот	Выход бластоцист		
		7 суток	10 суток	
		Всего, n (%)	Всего, n (%)	Hatched, n (%*)
1	75	1 (1,4±2,8) ^a	4 (5,5 ±1,02) ^a	3 (75,00**)
2	161	24 (15,5± 9,7) ^b	44 (28,4± 11,35) ^b	30 (63,2±20,4) ^a
Контроль	257	47 (19,9±10,1) ^b	87 (34,9±6,8) ^b	69 (79,3±12,1) ^b

a, b — результаты с различными индексами статистически значимо отличаются друг от друга в рамках одной колонки (*U*-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$); * — от количества полученных бластоцист; **—выход из блестящей оболочки наблюдался только в 3 из 4 повторов.

Ооциты КРС являются достаточно крупными биологическими объектами (диаметр около 120 мкм) [8], а толщина стенок триацетатцеллюлозных полых волокон сопоставима с толщиной блестящей оболочки этих ооцитов (15 мкм) [1,3,8]. Увеличение концентрации сахарозы до 1,0М в VS вероятно позволило повысить степень дегидратации как самих ооцитов, так и вязкость окружающего их в полом волокне раствора перед погружением в жидкий азот. Это могло способствовать снижению вероятности формирования вне- и внутриклеточных кристаллов льда, являющихся одним из наиболее существенных факторов криповреждения биологических объектов во время охлаждения и отогревания при их криоконсервации по методу витрификации [4,5,6], и, таким образом, повысить жизнеспособность полученных эмбрионов.

Заключение. Увеличение концентрации непроникающего криопротектора сахарозы в растворе VS до 1,0М при криоконсервации дозревших *in vitro* ооцитов КРС по методу HFV позволило существенно увеличить показатели их эмбрионального развития после оплодотворения. Выход бластоцист на 7 и 10 сутки развития (15,5±9,7 и 28,4±11,35% соответственно) в этой группе был сопоставим с соответствующими

показателями в контрольной ($19,9 \pm 10,1$ и $34,9 \pm 6,8\%$ соответственно; U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о возможности дальнейшей модификации протокола HFV в применении к криоконсервации дозревших *in vitro* ооцитов КРС с целью повышения его эффективности. Субоптимальные условия криоконсервации в группе с более низкой концентрацией сахарозы (0,5М) в VS в первую очередь влияли на способность к эмбриональному развитию ооцитов после оплодотворения, при сохранении высоких показателей выживания ($79,9 \pm 7,9\%$) и пенетрации сперматозоидами ($80,5 \pm 18,3\%$).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matsunari H., Maehara M., Nakano K., Ikezawa Y., Hagiwara Y., Sasayama N., Nagashima H. Hollow Fiber Vitrification: A Novel Method for Vitriifying Multiple Embryos in a Single Device//J. Reprod. Dev. -2012. 58(5):599–608.
2. Корниенко Е.В., Иконописцева М.А., Маленко Г.П. Витрификация дозревших *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота в триацетатцеллюлозных полых волокнах//Достижения науки и техники АПК -2018. 32(9):84–88.
3. Arav A., Natan Y. The Near Future of Vitriification of Oocytes and Embryos: Looking into Past Experience and Planning into the Future//Transfus. Med. Hemother. -2019. 46:182–186.
4. Moussa M., Shu J., Zhang X., Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives//Sci. China Life Sci. -2014. 57(9):903–914.
5. Papis K., Stachowiak E., Duda A., Ajduk A., Modlinski J.A. Bovine oocyte *in vitro* maturation and cryopreservation: mirage or reality//Slovak J. Anim. Sci. -2015 48(4):163-17.
6. MarquesC.C., Santos-SilvaC., RodriguesC., MatosJ.E., Moura T., Baptista M.C., HortaA.E.M., Bessa R.J.B., Alves S.P., SoveralG., PereiraR.M.L.N. Bovine oocyte membrane permeability and cryosurvival: Effects of different cryoprotectants and calcium in the vitrification media//Cryobiology -2018. 81:4-11.
7. Корниенко Е.В., Романова А.Б., Махарадзе М.Т., Нестеров И.И., Попов Д.В., Маленко Г.П. Витрификация эмбрионов крупного рогатого скота без блестящей оболочки в триацетатцеллюлозном полом волокне//Ветеринария, зоотехния, биотехнология - 2017. 12:35-44.
8. Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryos, 2nd Ed. CABI Publishing. 2003. Pp. 548, ISBN 0-85199-666-3.

VITRIFICATION OF *IN VITRO* MATURED BOVINE OOCYTES USING TRIACTATE CELLULOSE HOLLOW FIBERS AS A CARRIER

Kornienko E.V., Romanova A.B., Malenko G.P.

FSBSI Center of experimental embryology and reproductive biotechnologies, Kostyakova str. 12, Moscow, 127422 Russia

Abstract. *Standardization of bovine oocyte treatment in vitrification/rewarming solution and reproducibility of the obtained results remain unsolved problems of assisted reproductive techniques applicability in livestock production. A solution to this problem may lie in the application of hollow fiber vitrification of in vitro matured demuded bovine oocytes. However use of this method for bovine oocyte vitrification resulted in significantly lower ($p < 0.05$) blastocyst yields at days 7 and 10 (1.4 and 5.5 % of cultured zygotes, respectively) compared to the control group, despite relatively high survival (79.9%) and fertilization (80,5%) rates. This effect might have been a result of insufficient dehydration before vitrification of bovine oocytes themselves and/or the surrounding solution inside the hollow fiber. Increase of unpermeating cryoprotectant concentration (sucrose) in vitrification solution from 0.5 to 1.0M allowed a significant rise in embryonal development rates in oocytes fertilized after vitrification. Blastocyst yields on days 7 and 10 in this experimental group (15.5 and 28.4%, respectively) was comparable to corresponding yields in control group (19.9 and 34.9%, respectively). Obtained results indicate that there is a possibility to further modify protocol of in vitro matured bovine oocytes vitrification in triacetate cellulose hollow fibers to increase its' effectiveness.*

Keywords: *vitrification, oocyte, triacetate cellulose hollow fiber, bovine.*

УДК 636.32/.38

ПЕРСПЕКТИВНАЯ РЕПРОДУКТИВНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАРАНОВ-ПРОБНИКОВ

Лакота Е.А.

ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока», г.Саратов, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока», 410010 Россия, г.Саратов, ул. Тулайкова, д.7
E-mail: lena.lakota@yandex.ru

Аннотация. *В статье приведены результаты использования для выборки овцематок в состоянии «охоты» баранами-пробниками с закрепленным приспособлением, препятствующим проникновению полового органа барана-пробника в половые органы овцематки. Предлагаемое приспособление, представляет собой, например, квадрат, вырезанный из отработанной камеры колеса автомобиля или колесного трактора. Размер резинового квадрата равен 30 см x 30 см. В двух верхних частях его протыкали дырочки, в каждую из которых пропускали бечевку длиной 70 см. Оба конца бечевки закрепляли узлом на спине барана-пробника, чтобы верхняя часть резинового квадрата вплотную соприкасалась с нижней частью брюха барана и находилась впереди его полового органа. Нижнюю часть резинового квадрата не фиксировали и оставляли в свободном состоянии. Во время попытки барана-пробника сделать «садку» на овцематку, находящуюся в «охоте», закрепленное приспособление полностью препятствовало проникновению полового органа барана-пробника в половые органы овцематки, то есть, позволяло избежать спаривание естественным путем. Это новый технологический способ выборки маток «в охоте». Исследования велись в ЗАО*

«Новая жизнь» Новоузенского района Саратовской области сухой стети Поволжья. ЗАО «Новая жизнь» - одно из немногих хозяйств Саратовской области, где и в настоящее кризисное для овцеводства время не допускается вольная случка маток, а также ежегодно проводится их искусственное осеменение. Исследования основывались на «Методических рекомендациях по созданию и совершенствованию заводских типов, линий и семейств овец тонкорунных и полутонкорунных пород».

Ключевые слова: овца, выборка, баран-пробник, приспособление.

Введение. Поволжье является второй после Северного Кавказа базой по развитию овцеводства, которому в этом регионе способствуют природно-климатические условия и наличие обширных площадей степных и полупустынных пастбищ [2]. С учетом современной экономической ситуации при интенсификации отрасли овцеводства актуально, что воспроизводительная способность овец приобретает особое значение, поскольку с ней связано совершенствование животных и рентабельность отрасли. ЗАО «Новая жизнь» - одно из немногих хозяйств Саратовской области, где и в настоящее кризисное для овцеводства время не допускается вольная случка маток, а также ежегодно проводится их искусственное осеменение. Ориентировочный срок осеменения – середина ноября. Делается это с целью того, чтобы массовый окот проходил с середины апреля, когда маток можно начинать пасти. Такой экстенсивный способ случки и ягнения необходим для того, чтобы меньше расходовать корма в зимний стойловый период. Целью работы послужило применение нового технологического способа выборки маток «в охоте» баранами-пробниками.

Материал и методика исследований. Научно-исследовательская работа выполнялась в ЗАО «Новая жизнь» Новоузенского района Саратовской области. Исследования основывались на «Методических рекомендациях по созданию и совершенствованию заводских типов, линий и семейств овец тонкорунных и полутонкорунных пород» [1].

Результаты исследований и их обсуждение. Нами был применен новый технологический способ выборки маток «в охоте» баранами-пробниками.

В предлагаемом способе выборки маток «в охоте» баранами-пробниками применено новое технологическое решение, которое заключалось в следующем.

Предварительно перед процессом выборки овцематок барану-пробнику закрепляли в нижней части тела приспособление, представляющее собой, например, квадрат, вырезанный из отработанной камеры колеса автомобиля или колесного трактора. Размер резинового квадрата равен 30 см х 30 см. В двух верхних частях его протыкали дырочки, в каждую из которых пропускали бечевку длиной 70 см. Оба конца бечевки закрепляли узлом на спине барана-пробника, чтобы верхняя часть резинового квадрата вплотную соприкасалась с нижней частью брюха барана и находилась впереди его полового органа. Нижнюю часть резинового квадрата не фиксировали и оставляли в свободном состоянии. Во время попытки барана-пробника сделать «садку» на овцематку, находящуюся в «охоте», закрепленное приспособление полностью препятствовало проникновению полового органа барана-пробника в половые органы овцематки, то есть, позволяло избежать спаривание естественным путем.

Технология последующего искусственного осеменения выявленных овцематок «в охоте» известна, она позволяет дробить полученную за одну садку сперму (эякулят) баранов-производителей на несколько доз. Овцематок осеменяли дозами 0,1 мл разбавленной спермы.

Заключение. Таким образом, использование баранов-пробников с закрепленным в нижней части тела приспособлением для технической выборки овцематок к осеменению способствует предохранению овцематки от полового акта с бараном-пробником. Такое технологическое решение позволит более качественно проводить в овцеводческих хозяйствах искусственное осеменение, а также рационально использовать возможности основных баранов-производителей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические рекомендации по созданию заводских типов, линий и семейств овец тонкорунных и полутонкорунных пород / ВАСХНИЛ, - М., - 1984. - 30 с.
2. Филатов, А.И. Некоторые аспекты повышения доходности овцеводства Саратовской области / А.И. Филатов // Зональные особенности научного обеспечения сельскохозяйственного производства. – Саратов, 2009. – Ч. 2. – С. 163-169.

A PROMISING REPRODUCTIVE TECHNOLOGY FOR THE USE OF SHEEP-PROBE

Lakota E. A.

FEDERAL state budgetary scientific institution "NIISH South-East", Saratov
Russia, 410010, g. Saratov, ul tulikova, d. 7
E-mail: lena.lakota@yandex.ru

Abstract: *The article presents the results of the use for the selection of ewes in the state of "hunting" sheep-probes with a fixed device that prevents the penetration of the sexual organ of the sheep-probe into the genitals of the sheep. The proposed device is, for example, a square cut from the exhaust chamber of the wheel of a car or wheeled tractor. The size of the rubber square is 30 cm x 30 cm. In the two upper parts of it pierced holes, each of which passed a string length of 70 cm. Both ends of the twine were fixed with a knot on the back of the RAM-probe, so that the upper part of the rubber square was in close contact with the lower part of the RAM's belly and was in front of his penis. The lower part of the rubber square was not fixed and left in a free state. During the attempted RAM-probe to make a "SADC" to awamutu located in "the hunt" anchored fixture completely prevented the penetration of the sexual organ of a sheep-man probe into the sex organs in ewes, i.e., avoided mating in a natural way. This is a new technological way to sample Queens "in the hunt." The study was carried out in ZAO "New life" Novouzenskiy district of the Saratov region of dry steppe of the Volga region. CJSC New life - one of the few farms of the Saratov region where and now crisis for sheep breeding time free mating of Queens is not allowed, and also their artificial insemination is annually carried out. The research was based on the "Guidelines for the creation and improvement of plant types, lines and families of sheep of fine and semi-fine breeds".*

Keywords: *sheep, sample, RAM probe, device.*

УДК 579.64

ИДЕИ Л.К. ЭРНСТА О РЕГУЛЯЦИИ МИКРОБИОМА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ: НАУЧНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Лаптев Г.Ю.

ООО «БИОТРОФ», 196602, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ул. Малиновская, лит. А, 7-Н
E-mail: georg-laptev@rambler.ru

Аннотация. *Известно, что клетчатка корма переваривается в рубце крупного рогатого скота не полностью. В 1970-х гг. по инициативе Л.К. Эрнста были начаты исследования, посвященные вопросам управления перевариванием клетчатки в рубце. Настоящая статья суммирует результаты исследований, которые направлены на повышение эффективности использования клетчатки сельскохозяйственными животными при интродукции им целлюлозолитических бактерий. Результатом стало не только детальное изучение микробиома сельскохозяйственных животных, но и создание кормовых добавок на основе целлюлозолитических бактерий из рубца жвачных животных, таких как Целлобактерин⁺ и*

Целлобактерин-Т. Данные препараты оказались эффективными для регуляции состава микробиома, улучшения переваримости кормов и повышения продуктивности не только для КРС, но также в птицеводстве и свиноводстве.

Ключевые слова: *целлюлазы, жвачные животные, микроорганизмы, рубец, гены, метаболические пути, полногеномное секвенирование.*

Введение. Сегодня корма с большим количеством клетчатки входят в рацион практически всех сельскохозяйственных животных. Однако ни одно из них не способно синтезировать целлюлазы — ферменты для переваривания одного из компонентов клетчатки — целлюлозы. Повышение усвояемости и рационального использования кормов является одной из наиболее актуальных задач практики животноводства.

Одной из крупнейших научных идей Льва Константиновича Эрнста, сформулированной им еще в 70-х г. прошлого столетия, было изучение возможности управления переваривания клетчатки в рубце. В связи с этим были начаты широкие научные исследования микробиома рубца КРС и выделение из рубцового содержимого целлюлозолитических ассоциаций.

Цель исследования состояла в изучении способов повышения эффективности использования клетчатки кормов сельскохозяйственными животными при интродукции в ЖКТ целлюлозолитических бактерий.

Материалы и методы. В работе описаны исследования, проведенные с использованием лабораторных методов (микробиологических, молекулярно-биологических, биохимических и др.) и научно-хозяйственных опытов.

Результаты. По инициативе Л.К. Эрнста в ряде научных институтов страны (ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, ВНИИ физиологии и биохимии питания животных) были начаты исследования, посвященные регуляции микробиома кишечного тракта сельскохозяйственных животных. Основная идея состояла в выделении из рубца крупного рогатого скота (КРС) и других жвачных животных микроорганизмов, способных увеличивать переваримость клетчатки кормов сельскохозяйственных животных. Во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии эти работы были начаты под руководством Н.Н. Федулиной и продолжены коллективом исследователей под руководством Г.Ю. Лаптева, что стало заделом для

дальнейшего развития этой тематики в компании «БИОТРОФ», уже с использованием современных подходов, в т.ч. молекулярно-генетических.

Коллективом зоотехнической группы ВНИИСХМ в течение 1989-1993 гг. создавалась коллекция целлюлозолитических ассоциаций бактерий рубца путем высева содержимого от крупного рогатого скота, лосей и других жвачных животных на среду Имшенецкого с добавлением простерилизованной при автоклавировании рубцовой жидкости. Всего было выделено более 100 ассоциаций, которые были способны к разложению фильтровальной бумаги. Также была изучена способность к использованию ими различных растительных субстратов, в т.ч. овсяной соломы, по результатам чего были отобраны наиболее активные ассоциации.

В серии экспериментов *in vitro* были получены интересные результаты о синергетических взаимодействиях между целлюлазами грибного и бактериального происхождения. Было установлено, что у клинически здоровых животных, вследствие конкуренции между целлюлозолитическими микроорганизмами, переваривание клетчатки не связано с дефицитом целлюлаз в рубце. Эти исследования послужили фундаментом для создания ферментативных препаратов на основе бактериальных целлюлаз, механизм действия и параметры которых принципиально отличаются от грибных.

На основе одной из целлюлозолитических ассоциаций из рубца лося был разработан Целлобактерин, сочетающий свойства пробиотика с высокой целлюлазной активностью, применение которого в рационах сельскохозяйственных животных способствует повышению усвояемости кормов, прежде всего, зерновых культур: пшеницы, ячменя, ржи, овса. Другой изолят из рубца КРС послужил основой для создания препарата Целлобактерин-Т, который сочетает высокую эффективность бактериальных целлюлаз с высокой термоустойчивостью, так как разработан на основе спорообразующей бациллы. Споры этой бактерии выживают в условиях не только гранулирования, но и экспандирования кормов, что также является уникальным свойством.

Препараты оказались эффективными для повышения переваримости кормов не только для крупного рогатого скота, но также в птицеводстве и свиноводстве. Интересно, что выявленный эффект имел прямую законо-

мерность с составом микробиоты, обитающей в пищеварительном тракте изучаемых сельскохозяйственных животных. Исследования показали, что применение Целлобактерина позволяет регулировать состав микробиома желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) организма-хозяина.

Вначале эти исследования проводились с применением классических микробиологических подходов путем посева микроорганизмов из рубца КРС, кишечника свиней, птицы на питательные среды. Однако, изучая изоляты бактерий, грибов были обнаружены проблемы - так, большинство обитающих в ЖКТ микроорганизмов были строго анаэробными, при этом даже кратковременное снижение температуры воздуха приводило к гибели большинства штаммов. В связи с этим, начиная с 2007 года, исследования были продолжены на основе молекулярно-генетических подходов.

В компании «БИОТРОФ» была создана и оснащена современным оборудованием молекулярно-генетическая лаборатория, где впервые в нашей стране были начаты исследования микробиома рубца, а также его связи со здоровьем и продуктивностью КРС. Сегодня в лаборатории с применением наиболее современных методов (NGS-секвенирование, T-RFLP-анализ, ПЦР в реальном времени) проводятся обширные исследования микробиомов различных сельскохозяйственных животных, которые позволяют одновременно детектировать изменение в микробиоме порядка тысячи микроорганизмов одновременно. На основании проведенных исследований впервые в мире были разработаны нормы содержания микроорганизмов для различных сельскохозяйственных животных.

Эффективность разработанных препаратов (Целлобактерин+, Целлобактерин-Т) была многократно подтверждена в хозяйствах Ленинградской области и других регионов России. Применение кормовых добавок приводило к оптимизации микрофлоры кишечника, улучшению пищеварения, повышению продуктивности и показателей качества продукции, улучшению состояния здоровья животных. Объемы внедрения по биопрепаратам составили свыше 7,2 млн. т комбикормов с 2010 по 2018 гг.

В 2018 году в молекулярно-генетической лаборатории компании «БИОТРОФ» было выполнено полногеномное секвенирование геномов штаммов, входящих в состав биопрепаратов, с последующим функциональным анализом реконструкции их метаболических путей, что позволи-

ло провести дополнительную оценку механизмов действия и метаболический потенциал микроорганизмов. Проведенный анализ штаммов, входящих в состав Целлобактерина, выявил уникальность метаболических возможностей данных микроорганизмов по сравнению с аналогичными видами бактерий. Показана особенность путей их углеводного обмена, в т.ч. наличия путей биосинтеза ряда жирных кислот (додекановой, декановой, гексадекановой, тетрадекановой, октадекановой и др.), ряда заменимых и незаменимых аминокислот, витаминов, антимикробных метаболитов.

Заключение. Как видно из представленных результатов, идеи Л.К. Эрнста о регуляции микробиома сельскохозяйственных животных привели к получению ряда научных и практических результатов. Созданные кормовые добавки на основе бактериальных штаммов, вырабатывающих целлюлазы, нашли широкую перспективу в кормлении сельскохозяйственных животных.

L.K. ERNST IDEAS ABOUT REGULATION OF AGRICULTURAL ANIMALS MICROBIOM: SCIENTIFIC AND PRACTICAL RESULTS

Laptev G.Yu.

BIOTROF+ Ltd, Malinovskaya St., 8, liter A, 7-N, Pushkin, St Petersburg, 196602, Russia

***Abstract.** In the 1970s at the initiative of L.K. Ernst, researches for increasing of fiber digestion by introducing cellulosolytic bacteria into the rumen have begun. The result of the research have included a detailed study of the farm animals microbiome. Feed additives based on cellulolytic isolates from ruminant (Cellobacterin + and Cellobacterin-T) was created also. These feed additives are effective for regulating the composition of the microbiome, increasing the digestibility of feed and productivity for cattle, pig and poultry.*

***Keywords:** cellulases, ruminants, microorganisms, rumen, genes, metabolic pathway, NGS-sequencing.*

МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН У КОРОВ-ПЕРВОТЕЛОК В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕОТЕЛЬНОГО ПЕРИОДА ПРИ РАЗНОМ УРОВНЕ ДЕПРЕССИИ ОВАРИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ

Лебедева И.Ю., Соломахин А.А., Митяшова О.С., Рыков Р.А.

ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, Г.о. Подольск, Московская обл., РФ, 142132

E-mail: irledv@mail.ru

***Аннотация.** В представленной работе изучали динамические изменения ряда показателей минерального обмена с конца предотельного периода и до конца первого триместра лактации у коров-первотелок молочного направления с разной функциональной активностью яичников. У всех коров содержание кальция в крови снижалось к 1-й неделе послеотельного периода с последующим постепенным повышением, которое происходило быстрее у животных, восстановивших нормальную овариальную активность. Концентрация фосфора была пониженной через 1 неделю после отела у коров с глубокой депрессией активности яичников, но оставалась неизменной у животных с активными яичниками. Кроме того, через 3 недели после отела концентрация магния в крови животных с глубокой депрессией овариальной функции была значительно ниже, чем у животных без депрессии или с умеренной депрессией. Результаты исследования свидетельствуют об особенностях минерального обмена в период ранней лактации у коров-первотелок с депрессией функциональной активности яичников, особенно с ее глубокой формой.*

***Ключевые слова:** коровы молочного направления, послеотельный период, депрессия функциональной активности яичников, минеральный обмен.*

Введение. Работа всех систем организма, включая воспроизводительную, зависит от метаболического статуса животных. У коров молочного направления большинство репродуктивных нарушений связано с метаболическим стрессом в период перехода от поздней стельности к ранней лактации [1, 2]. Согласно современным представлениям, при недостатке питательных веществ репродуктивная система получает сигналы, вызывающие снижение фертильности животных [3]. В качестве таких сигналов рассматривают концентрации метаболических гормонов (например, инсулина, гормона роста, лептина) и метаболитов в крови. К последним в первую очередь относят биохимические компоненты, связанные с энергетическим обменом, поскольку отрицательный энергетический баланс служит основной причиной ухудшения воспроизводительной способности коров после отела [1, 3]. Показано, что повышение концентрации свобод-

ных жирных кислот и кетоновых тел и понижение концентрации глюкозы в крови приводят к ослаблению репродуктивной функции и снижению общего иммунитета [4, 5]. Метаболические заболевания, ассоциированные с нехваткой минеральных веществ, также негативно влияют на воспроизводительную способность коров [2]. Вместе с тем имеющаяся по этому вопросу информация весьма ограничена и связана главным образом с недостатком в организме кальция. Обнаружено, что послеотельная субклиническая гипокальцемия вызывает задержку восстановления полового цикла [6], а также снижение фертильности коров [7]. Такие репродуктивные нарушения могут быть следствием негативного влияния гипокальцемии на энергетический обмен и иммунную функцию животных [8].

Целью представленной работы было изучение динамических изменений ряда показателей минерального обмена с конца предотельного периода и до конца первого триместра лактации у коров-первотелок молочного направления с разной функциональной активностью яичников.

Материал и методы исследования. В экспериментах были использованы коровы-первотелки черно-пестрой голштинизированной породы, содержащиеся в экспериментальном хозяйстве "Клёново-Чегодаево" Московской области. Для исследований были отобраны 47 животных, не имевших послеотельных гинекологических заболеваний. Средний удой коров за первую лактацию составил 6391 кг молока. За 2 недели до родов и через 1, 3, 5, 7 и 13 недель после родов у животных была взята кровь для биохимического анализа и определения концентрации прогестерона. Оценку функционального состояния яичников проводили методом ректального исследования и с помощью УЗИ сканера через 7 и 13 недель после отела. На основании этой оценки коров поделили на 3 группы: 1) с активными яичниками (при наличии желтых тел или крупных фолликулов у животных, восстановивших половую цикличность; n=26), 2) с умеренной депрессией активности яичников (при отсутствии желтых тел и фолликулов с диаметром более 8 мм; n=11) и 3) с глубокой депрессией активности яичников (при отсутствии желтых тел и фолликулов с диаметром более 3-4 мм; n=10). Дополнительным критерием служил уровень прогестерона в крови. В пробах сыворотки крови определяли содержание кальция, фосфора и магния на автоматическом биохимическом анализаторе ChemWell

(Awareness Technology, США) с использованием реагентов фирмы «Analyticon Biotechnology AG» (Германия). Концентрацию прогестерона в сыворотке крови измеряли методом иммуноферментного анализа с использованием планшетного спектрофотометра Униплан («Пикон», Россия) и коммерческих наборов реагентов («НВО Иммунотех», Россия). Все анализы проводили в двух повторностях при чувствительности метода 0,4 нмоль/л, коэффициент вариации не превышал 15 %. Полученные результаты подвергали статистической обработке методом дисперсионного анализа с помощью программы SigmaStat.

Результаты исследования. У животных всех исследованных групп содержание кальция в крови снижалось на 9-11% через 1 неделю после отела ($p < 0,05$ - $p < 0,001$) и затем постепенно повышалось (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация кальция в различные периоды после отела в крови коров-первотелок с разным уровнем депрессии активности яичников

Период	Концентрация кальция, ммоль/л		
	1 группа	2 группа	3 группа
2 недели до отела	$2,49 \pm 0,03^{ac}$	$2,45 \pm 0,02^d$	$2,47 \pm 0,05^f$
1 неделя после отела	$2,27 \pm 0,04^b$	$2,18 \pm 0,05^e$	$2,24 \pm 0,05^g$
3 недели после отела	$2,40 \pm 0,03^a$	$2,19 \pm 0,10^{e***}$	$2,32 \pm 0,04$
5 недель после отела	$2,44 \pm 0,03^{ac}$	$2,38 \pm 0,05$	$2,30 \pm 0,03^{g*}$
7 недель после отела	$2,52 \pm 0,03^{ac}$	$2,40 \pm 0,04^d$	$2,35 \pm 0,04^*$
13 недель после отела	$2,56 \pm 0,03^c$	$2,50 \pm 0,06^d$	$2,37 \pm 0,06^{**}$

Достоверные различия между временными периодами: $a,bP < 0,001$, $b,cP < 0,05$, $b,dP < 0,001$, $c,dP < 0,01$ (I группа); $e,fP < 0,05$, $f,gP < 0,01$ (II группа); $h,iP < 0,001$, $h,jP < 0,05$ (III группа); $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ (по сравнению с 1-ой группой).

Это повышение наблюдалось уже к 3-й неделе лактации у животных 1-й группы и только к 7-й неделе – у животных 2-й группы ($p < 0,05$). В то же время у коров 3-й группы концентрация кальция не достигала исходного уровня даже к 13-й неделе после отела и была на 8% ниже, чем в 1-й группе ($p < 0,01$). Содержание фосфора в крови коров с функционально активными яичниками не изменялось существенно на протяжении всего периода наблюдений (табл. 2).

Таблица 2. Концентрация фосфора в различные периоды после отела в крови коров-первотелок с разным уровнем депрессии активности яичников

Период	Концентрация фосфора, ммоль/л		
	1 группа	2 группа	3 группа
2 недели до отела	1,94 ± 0,03	1,96 ± 0,06	2,00 ± 0,12 ^d
1 неделя после отела	1,92 ± 0,11	1,67 ± 0,09 ^a	1,50 ± 0,07 ^{e*}
3 недели после отела	1,99 ± 0,08	1,95 ± 0,10	1,92 ± 0,11 ^f
5 недель после отела	1,91 ± 0,06	1,78 ± 0,07 ^b	1,75 ± 0,06 ^g
7 недель после отела	2,11 ± 0,07	2,00 ± 0,11	2,15 ± 0,05 ^h
13 недель после отела	1,96 ± 0,05	2,23 ± 0,12 ^{c*}	2,00 ± 0,06 ^d

*Достоверные различия между временными периодами: ^{a,c}P < 0,01, ^{b,c}P < 0,05 (II группа); ^{d,e}P < 0,001, ^{e,f}P < 0,01, ^{e,h}P < 0,001, ^{g,h}P < 0,01 (III группа); *P < 0,05 (по сравнению с I группой).*

У животных с обеими формами овариальной депрессии самое низкое содержание этого макроэлемента было обнаружено через 1 неделю после отела, причем в 3-й группе оно было ниже, чем в 1-й ($p < 0,05$). К 3-й неделе лактации концентрация фосфора в крови животных с глубокой депрессией овариальной активности возрастала на 25-30%, достигая исходного уровня ($p < 0,01$).

При этом у коров в 1-й и 2-й группе соотношение кальций-фосфор было постоянным на протяжении всего исследуемого периода, тогда как в 3-й группе оно было повышенным на 15-28% ($p < 0,05$ - $p < 0,001$) через 1 неделю лактации. Кроме того, через 3 недели после отела концентрация магния в крови животных с глубокой депрессией овариальной активности была на 15-20% ниже ($p < 0,05$), чем у животных без депрессии или с умеренной депрессией.

Заключение. В период ранней лактации у коров-первотелок с гипофункцией яичников минеральный обмен имел ряд особенностей по сравнению с животными, возобновившими нормальную овариальную активность к 7-ой неделе после отела. У коров с депрессией овариальной функции происходило более медленное восстановление исходного уровня кальция в крови, чем у коров с активными яичниками. Кроме того, у животных с глубокой формой депрессией наблюдалось более низкое содержание фосфора (через 1 неделю после отела) и магния (через 3 недели),

чем у животных с нормальной овариальной активностью. Таким образом, характер изменения содержания кальция, фосфора и магния в крови животных в динамике послеродового периода связан со степенью угнетения овариальной активности.

Работа выполнена по государственному заданию (рег. ЦИТус № АААА-А18-118021990006-9).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walsh, S.W., Williams, E.J., Evans, A.C. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows // Anim. Reprod. Sci. 2011. 123: 127-38.
2. Roche, J.R., Burke, C.R., Crookenden, M.A., Heiser, A., Looor, J.L., Meier, S., Mitchell, M.D., Phyn, C.V.C., Turner, S.A. Fertility and the transition dairy cow // Reprod. Fertil. Dev. 2018. 30: 85-100.
3. Chagas, L.M., Bass, J.J., Blache, D., Burke, C.R., Kay, J.K., Lindsay, D.R., Lucy, M.C., Martin, G.B., Meier, S., Rhodes, F.M., Roche, J.R., Thatcher, W.W., Webb, R. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows // J. Dairy Sci. 2007. 90: 4022-4032.
4. Shin, E.K., Jeong, J.K., Choi, I.S., Kang, H.G., Hur, T.Y., Jung, Y.H., Kim, I.H. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows // Theriogenology. 2015. 84: 252-260.
5. Kawashima, C., Sakaguchi, M., Suzuki, T., Sasamoto, Y., Takahashi, Y., Matsui, M., Miyamoto, A. Metabolic profiles in ovulatory and anovulatory primiparous dairy cows during the first follicular wave postpartum // J. Reprod. Dev. 2007. 53: 113-120.
6. Ribeiro, E.S., Lima, F.S., Greco, L.F., Bisinotto, R.S., Monteiro, A.P., Favoreto, M., Ayres, H., Marsola, R.S., Martinez, N., Thatcher, W.W., Santos, J.E. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates // J. Dairy Sci. 2013. 96: 5682-5697.
7. Martinez, N., Risco, C.A., Lima, F.S., Bisinotto, R.S., Greco, L.F., Ribeiro, E.S., Maunsell, F., Galvão, K., Santos, J.E. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease // J. Dairy Sci. 2012. 95: 7158-7172.
8. Santos, J.E., Bisinotto, R.S., Ribeiro, E.S. Mechanisms underlying reduced fertility in anovular dairy cows // Theriogenology. 2016. 86: 254-262.

MINERAL METABOLISM IN PRIMIPAROUS COWS IN THE DYNAMICS OF THE POSTPARTUM PERIOD AT DIFFERENT LEVELS OF DEPRESSION OF THE OVARIAN FUNCTION

Lebedeva I.Yu., Solomakhin A.A., Mityashova O.S., Rykov R.A.

L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy, 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132 Russia
E-mail: irledv@mail.ru

Abstract. *In the present work, the dynamic changes in some indicators of mineral metabolism from the end of the prepartum period to the end of the first trimester of lactation in primiparous dairy cows with different ovarian functional activities were studied. In all cows, the blood calcium level decreased by the 1st week of the postpartum period, followed by a gradual increase, which occurred faster in animals that restored the normal ovarian activity. Phosphorus concentration was reduced 1 week after calving in cows with profound depression of the ovarian activity, but it re-*

maintained unchanged in animals with active ovaries. Furthermore, 3 weeks after calving, the concentration of magnesium in the blood of animals with profound depression of the ovarian function was significantly lower than in animals without depression or with moderate depression. The results of the study indicate the peculiarities of mineral metabolism during early lactation in primiparous cows with a depression of the ovarian functional activity, especially with its profound form.

Keywords: dairy cows, postpartum period, depression of the ovarian functional activity, mineral metabolism.

УДК 576.89

ОСОБЕННОСТИ ПАРАЗИТОФАУНЫ СУДАКА (*Sander lucioperca*) КУРШСКОГО ЗАЛИВА

Мальцева И.С., Авдеева Е.В.

ФГБОУ ВО Калининградский Государственный Технический Университет, г. Калининград, Советский пр-т 1, РФ, 236022.

E-mail: irina.maltseva@klgtu.ru

Аннотация. В результате проведения полного паразитологического анализа судака определен видовой состав паразитофауны, включающий в себя 18 видов паразитических организмов. Данные организмы относятся к 8 систематическим группам: микроспоридии, микроспоридии, моногенеи, ракообразные по 1 виду каждой систематической группы, цестоды, нематоды, скребни по 2 вида, трематод 8 видов. Приводится экстенсивность и интенсивность инвазии по каждому виду паразита. Наибольшая экстенсивность инвазии зарегистрирована у паразитических ракообразных *Achtheres percarum* – 100% ежегодно и у трематод *Ichthyocotylurus platycephalus* – 90% в 2018 году. Трематоды доминируют в паразитофауне судака.

Ключевые слова: паразит, хозяин, гельминты, микроспоридии, микроспоридии, ракообразные, экстенсивность.

Введение. Куршский залив — важный рыбохозяйственный водоем северо-запада России (Калининградская область) и Литвы. Для успешного ведения рыбохозяйственной деятельности в заливе необходима оценка эпидемиологического и эпизоотологического значения паразитов рыб. Эти данные позволят предотвратить возможные заболевания людей и животных, а также эпизоотии массовых ценных пород рыб, обитающих в исследуемом водоеме.

Видовой состав паразитофауны рыб позволяет наиболее точно определить характер питания исследуемого объекта, места нагула и служит показателем изменений экологических условий в естественных водоемах.

Судак один из важнейших промысловых объектов в Куршском заливе, по данным Федерального агентства по рыболовству в 2018 году квота на вылов составила 258 т и была практически полностью освоена [1]. Однако, улов значительно снизился в сравнение с прошлым десятилетием, когда вылов составлял 300-350 т [2].

В настоящее время паразитофауна судака в данном водоеме изучена слабо, сведения о видовом составе паразитофауны носят фрагментарный характер.

Цель работы – определение видового состава паразитов, паразитирующих у судака в Куршском заливе и их эпизоотического значения.

Материал и методика исследований. Материалом для исследования послужили результаты полного паразитологического анализа 75 экземпляров судака из российской части Куршского залива, проведенного в период с 2016 по 2018 год. Рыбу отбирали из промысловых уловов. Полный паразитологический анализ проводили по методике Быховской-Павловской [3]. Средняя общая длина исследуемых рыб составляла 39 ± 3 см. При определении видов паразитических организмов использовали микроскоп «Биолам Р-5» и бинокляр «МБИ-9». Паразитов определяли по «Определителю паразитов пресноводных рыб фауны СССР» [4].

Результаты исследований и их обсуждение. В результате полного паразитологического анализа обнаружено 18 видов паразитических организмов, инвазирующих судака в Куршском заливе (табл. 1).

Тринадцать видов паразитов были обнаружены нами на протяжении всех лет исследования: *Myxobolus dispar*, *Glugea luciopercae*, *Ancyrocephalus paradoxus*, *Triaenophorus nodulosus*, *Bunocotyle cingulata*, *Diplostomum spathaceum*, *Bunodera luciopercae*, *Azygia lucii*, *Ichthyocotylurus platycephalus*, *I. variegatus*, *Acanthocephalus lucii*, *Corynosoma strumosum* *Achtheres percarum*. Данные виды можно считать основным ядром паразитофауны судака в Куршском заливе.

Паразитофауна судака представлена 4 видами паразитов с прямым жизненным циклом развития и 14 видами со сложным циклом развития.

Таблица 1. Паразитофауна судака Куршского залива в 2016-2018 гг.

№	Паразит	Год исследования								
		2016			2017			2018		
		экст. %	интенс. экз.		экст. %	интенс. экз.		экст. %	интенс. экз.	
			min	max		min	max		min	max
1	<i>Myxobolus dispar</i>	40	-	-	20	-	-	20	-	-
2	<i>Glugea luciopercae</i>	13,3	-	-	40	-	-	33,3	-	-
3	<i>Ancyrocephalus paradoxus</i>	80	4	21	86,6	6	32	80	6	24
4	<i>Triaenophorus nodulosus</i>	33,3	1	9	20	2	3	20	2	5
5	<i>Diphyllbothrium latum</i>	6,6	3	3	-	-	-	-	-	-
6	<i>Bunocotyle cingulata</i>	6,6	9	9	20	16	11	20	20	36
7	<i>Diplostomum spathaceum</i>	20	16	19	13,3	7	8	30	12	32
8	<i>Tylodelphys clavata</i>	-	-	-	6,6	12	12	30	17	28
9	<i>Bunodera luciopercae</i>	33,3	5	>100	20	21	36	20	12	15
10	<i>Azygia lucii</i>	13,3	>50	>100	40	10	>50	60	22	>50
11	<i>Ichthyocotylurus platycephalus</i>	40	32	>50	80	29	>50	90	48	>50
12	<i>I. variegatus</i>	26,6	36	58	66,6	10	>50	60	12	>50
13	<i>Bucephalus polymorphus</i>	13,3	1	13	26,6	3	40	-	-	-
14	<i>Raphidascaris acus</i>	6,6	2	2	-	-	-	-	-	-
15	<i>Camallanus lacustris</i>	6,6	2	2	-	-	-	-	-	-
16	<i>Acanthocephalus lucii</i>	6,6	2	2	13,3	3	5	10	2	2
17	<i>Corynosoma strumosum</i>	20	2	3	26,6	3	18	20	3	4
18	<i>Achtheres percarum</i>	100	1	12	100	3	19	100	3	16
Итого		14			12			11		

Из паразитов с прямым жизненным циклом у судака в Куршском заливе зарегистрированы: *Myxobolus dispar*, *Glugea luciopercae*, *Ancyrocephalus paradoxus*, *Achtheres percarum*. Миксоспоридии *M. dispar* располагались под жаберной крышкой выше жаберных дуг. В исследуе-

мый период частота встречаемости не превышала 40 %. Микроспоридии *G. luciopercae* поражали кишечник судака и пилорические придатки в зимний период с декабря по февраль.

Низкий процент зараженности в 2016 году мы связываем с проведением исследований преимущественно в весенне-летний период, тогда как в 2107 и 2018 году охватывались все сезоны года в равной степени. Судак заражается миксо- и микроспоридиями находясь в непосредственной близости ко дну водоема. Моногеней *A. paradoxus* паразитировали на жабрах. Изменения экстенсивности инвазии моногенеей по годам незначительно и составляет в среднем 82,2 %. Паразитические ракообразные *A. percarum* были обнаружены у судака в ротовой полости и на жабрах. Наблюдается 100% заражение этим паразитом во всех исследуемых годах и сезонах года.

Паразиты, которые используют промежуточных хозяев в своем жизненном цикле, представлены следующими видами: *Triaenophorus nodulosus*, *Diphyllbothrium latum*, *Bunocotyle cingulate*, *Diplostomum spathaceum*, *Tylodelphys clavata*, *Bunodera luciopercae*, *Azygia lucii*, *Ichthyocotylurus platycephalus*, *I. variegatus*, *Bucephalus polymorphus*, *Camallanus lacustris*, *Raphidascaris acus*, *Acanthocephalus lucii*, *Corynosoma strumosum*. Класс цестод представлен двумя видами паразитов *Triaenophorus nodulosus* и *Diphyllbothrium latum*, однако, последний вид был обнаружен в гельминтофауне судака только в 2016 году у единственного экземпляра. У судака эти цестоды паразитировали на стадии плероцеркоида, заражение ими происходит трофическим путем. Трематоды преобладали в паразитофауне судака и представлены 8 видами, из них 4 вида были найдены на стадии метацеркария (*Diplostomum spathaceum*, *Ichthyocotylurus platycephalus*, *I. variegatus*, *Tylodelphys clavata*) и 4 вида на стадии мариты (*Bunodera luciopercae*, *Azygia lucii*, *Bunocotyle cingulata*, *Bucephalus polymorphus*). Метацеркарии *D. spathaceum* и *T. clavata* паразитировали в хрусталике глаза и стекловидном теле рыб, *Ichthyocotylurus platycephalus* и *I. variegatus* в мускулатуре, на поверхности внутренних органов, брюшине и плавательном пузыре. Следует отметить, что степень инвазии рыб личинками трематод (в частности, метацеркариями *Diplostomum* и *Ichthyocotylurus*) - индикатор, свидетельствующий о развитии процессов эвтрофикации в

Куршском заливе. На стадии мариты *Bunodera luciopercae*, *Azygia lucii*, *Bunocotyle cingulata*, *Bucephalus polymorphus* паразитируют у судака в желудочно-кишечном тракте, заражение происходит в результате хищничества. Наибольший процент зараженности 60 % зарегистрирован нами у *A. lucii* в 2018 году. Нематоды представлены двумя видами *C. lacustris* и *R. acus*. В 2017 и 2018 годах не обнаружены у судака Куршского залива, в 2016 году имели место единичные случаи заражения. Исчезновение данного вида из паразитофауны судака свидетельствует о сокращении или исчезновении промежуточного хозяина, а именно веслоногих рачков родов *Acanthocyclops*, *Eucyclops*, *Macrocyclops*, *Megacyclops*, *Canthocamptus*. Скребни представлены также двумя видами: *Acanthocephalus lucii* и *Corynosoma strumosum*. Паразитируют в кишечнике рыб кишечника рыб. Судак заражается нематодами питаясь мирной рыбой (корюшкой), которая после нагула заходит на нерест в реки, т.е. находится в пространственной близости к судаку. Также возможно заражение в результате хищничества.

Заключение. Видовой состав паразитофауны судака представлена 18 видами паразитов. Доминируют в паразитофауне судака - трематоды. Преобладание трематод вероятно указывает на усиление антропогенного воздействия на водоем, что приводит к его эвтрофикации. Трехлетние исследования свидетельствуют о влиянии эвтрофикации на паразитов, что приводит к колебаниям экстенсивности и интенсивности заражения рыб отдельными видами паразитов или к полному исчезновению некоторых видов. Наибольшая экстенсивность инвазии судака Куршского залива зарегистрирована нами у метацеркарий трематод *I. platycephalus* (90%) и у паразитических ракообразных *A. percarum* (100%). Основной путь заражения судака паразитами – трофический, путем хищничества.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. О добыче (вылове) ВБР [Электронный ресурс]. URL: <http://www.zbtu39.ru/o-dobyche-vylove-vbr.html> (дата обращения: 26.08.2019).
2. Тылик К.В. Рыбы трансграничных водоемов России и Литвы. - Калининград: Изд-во ФГОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет», 2007. 100 с.
3. Быховская-Павловская И.Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Л.: Наука, 1985. 121 с.
4. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР/ под ред. О.К. Бауера, С.С. Шульмана: В 3 т. Л., 1984.- Т3. 588 с.

FEATURES PARASITOFAUNA PIKE PERCH (*Sander lucioperca*) CURONIAN LAGOON

Maltseva I.S., Avdeeva E.V.

Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Soviet PR-t 1, Russia, 236022
E-mail: irina.maltseva@klgtu.ru

Abstract. *A complete parasitological analysis of the pike perch of the Curonian lagoon was carried out. The analysis studied the species composition of parasite fauna, including 18 species of parasitic organisms belonging to 8 systematic groups: 1 kind myxosporidia, microsporidia, monogenean, crustaceans, 2 species of cestodes, nematodes, acanthocephala, 8 species of trematodes. Determined the extensiveness and intensity of infestation, the highest extensity of invasion is observed in the parasitic crustacea *Achtheres percarum* – 100% in each investigated year and trematodes *Ichthyocotylurus platycephalus* – 90% in 2018. The class of trematodes dominates in the parasite fauna of pike perch.*

Keywords: *parasite, host, helminths, microsporidia, crustaceans, micosporidia, extensive-ness.*

УДК 636.2:612

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ КОРОВ В УСЛОВИЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА

Митяшова О.С., Соломахин А.А., Лебедева И.Ю.

ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, г.о. Подольск, Московская обл., РФ, 142132
E-mail: mityashova_o@mail.ru

Аннотация. *В настоящей работе изучали профили тиреоидных гормонов и триглицеридов в крови коров черно-пестрой породы в динамике послеродового периода. Концентрация общего тироксина в крови снижалась после отела у всех обследованных животных, однако динамика такого снижения различалась у особей с разной репродуктивной способностью. Кроме того, у коров с коротким сервис-периодом или длительно бесплодных происходило постепенное уменьшение содержания общего трийодтиронина в системе циркуляции. В то же время у коров с длинным сервис-периодом гормональный профиль для трийодтиронина демонстрировал возрастание к 7-й неделе послеродового периода. При этом направленность изменения содержания общего трийодтиронина в крови животных с разной репродуктивной способностью была сходна с таковой для содержания триглицеридов. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что активность тиреоидной системы у коров черно-пестрой породы в ранний послеотельный период связана с репродуктивной способностью и липидным метаболизмом животных.*

Ключевые слова: *коровы молочного типа, ранний период лактации, сервис-период, ти-*

реоидные гормоны, триглицериды.

Введение. Реализация репродуктивного потенциала коров молочного направления продуктивности зависит от функционирования метаболической системы [1]. В ранний послеродовой период такие животные находятся в состоянии метаболического стресса, вызванного негативным энергетическим балансом [2]. Недостаток энергии компенсируется путем мобилизации внутренних резервов, в первую очередь жировых [3]. Вследствие этого в крови животных возрастает содержание свободных жирных кислот и кетоновых тел, которые в высокой концентрации ухудшают репродуктивную функцию и снижают общий иммунитет [4, 5]. Другим компонентом липидного обмена являются триглицериды, избыточная аккумуляция которых в ооцитах и эмбрионах негативно влияет на функцию митохондрий, что приводит к ранней эмбриональной смертности, служащей основной причиной снижения фертильности молочных коров [3]. Гормоны щитовидной железы участвуют в эндокринном контроле интенсивности и направленности метаболических процессов, в первую очередь липидного обмена [6]. Поэтому тиреоидные гормоны могут влиять на воспроизводительную функцию коров посредством регуляции обмена веществ. Показано, например, что концентрация тироксина в крови животных голштинской породы с дисфункцией яичников отличается от таковой у животных с нормальным эстральным циклом [7, 8]. Тем не менее роль гормонов щитовидной железы в регуляции репродуктивной функции коров в условиях метаболического стресса до сих пор не ясна.

Целью настоящего исследования было изучение профилей тиреоидных гормонов и триглицеридов в динамике послеотельного периода в крови коров черно-пестрой породы с разной воспроизводительной способностью.

Материал и методы исследования. Исследования проводили на базе ФГУП ЭХ "Клёново-Чегодаево" Московской области (2016-2017 гг.). В экспериментах использовали 26 коров-первотелок черно-пестрой породы со средней молочной продуктивностью 6391 ± 182 кг за 305 дней лактации. Для исследований отбирали животных, не имевших послеотельных гинекологических заболеваний и восстановивших половой цикл. Оценку функционального состояния яичников проводили методом ректального исследования и с помощью УЗИ сканера через 7 недель после отела. За 2

недели до отела и после отела (через 1, 3, 5, 7 и 13 недель) у коров отбирали кровь для анализа. Через 12 месяцев после отела проводили оценку показателей воспроизводства (наличие стельности, сервис-период). На основании данных зоотехнического и племенного учета животных разделили на 3 группы: 1) с сервис-периодом менее 100 сут ($n = 10$), 2) с сервис-периодом более 100 сут ($n = 8$) и 3) коровы, оставшиеся бесплодными ($n = 8$). Содержание триглицеридов в сыворотке крови определяли на автоматическом биохимическом анализаторе ChemWell (Awareness Technology, США) с использованием реагентов фирмы «Analyticon Biotechnology AG» (Германия). Концентрацию тиреоидных гормонов в сыворотке крови измеряли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием планшетного спектрофотометра Униплан («Пикон», Россия) и коммерческих наборов реагентов «Алкор Био» (Россия). Чувствительность метода составляла 10 нмоль/л для общего тироксина и 0,25 нмоль/л для общего трийодтиронина, коэффициент вариации не превышал 15 %. Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа с помощью программы SigmaStat.

Результаты исследования. Было обнаружено, что характер изменения концентрации тиреоидных гормонов связан с репродуктивной способностью животных. Концентрация общего тироксина в крови снижалась после отела по сравнению с таковой до отела у всех обследованных животных (рис. 1). У коров с сервис-периодом менее 100 дней (группа 1) снижение уровня тироксина было значительным уже через 1 неделю после отела ($p < 0,001$), тогда как у животных с длительным бесплодием (группа 3) – через 3 недели ($p < 0,05$), а у животных с сервис-периодом более 100 дней (группа 2) – только через 13 недель ($p < 0,05$). Кроме того, на 3-й неделе послеродового периода содержание тироксина в крови коров группы 2 было в 1,4 раза выше ($p < 0,05$), чем в крови коров группы 1.

Характер изменения сывороточных уровней общего трийодтиронина после отела коров-первотелок с разной репродуктивной способностью различался (рис. 2).

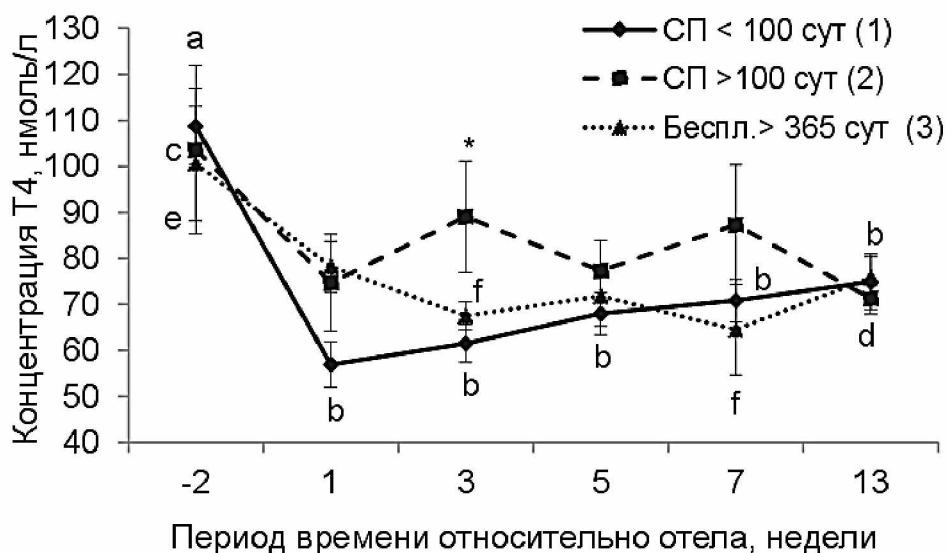


Рисунок 1. Концентрация общего тироксина (Т4) в различные периоды после отела в крови коров с разной репродуктивной способностью. Достоверные различия между временными периодами внутри группы: $^{a,b}p < 0,001$ (группа 1); $^{c,d}p < 0,05$ (группа 2); $^{e,f}p < 0,05$ (группа 3). Достоверные различия между группами: $^*p < 0,05$ (между 1 и 2).

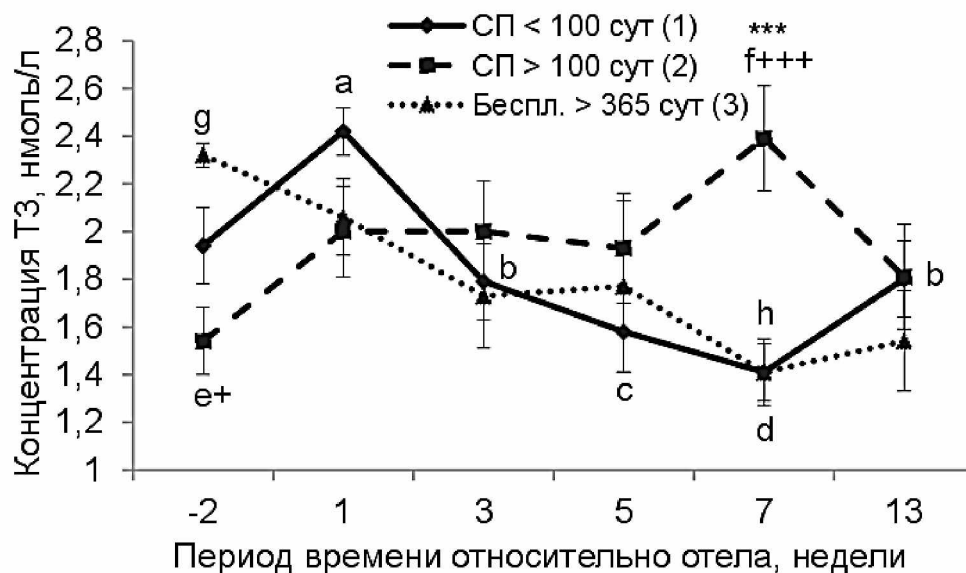


Рисунок 2. Концентрация общего трийодтиронина (Т3) в различные периоды после отела в крови коров с разной репродуктивной способностью. Достоверные различия между временными периодами внутри группы: $^{a,b}p < 0,05$, $^{a,c}p < 0,01$, $^{a,d}p < 0,001$ (группа 1); $^{e,f}p < 0,05$ (группа 2); $^{g,h}p < 0,05$ (группа 3). Достоверные различия между группами: $^{***}p < 0,001$ (между 1 и 2); $^{+}p < 0,05$; $^{+++}p < 0,001$ (между 2 и 3).

В группе 1 самое высокое содержание этого гормона было выявлено на 1-й неделе послеродового периода, после чего наблюдалось его снижение в 1,4-1,7 раза с 3-й по 7-ю неделю ($p<0,05$ – $p<0,001$). У коров группы 3 происходило постепенное снижение концентрации трийодтиронина в крови между 2-й неделей до отела и 7-й неделей после отела (в 1,6 раза, $p<0,05$). У животных группы 2 гормональный профиль для трийодтиронина, напротив, демонстрировал возрастание в 1,6 раза ($p<0,05$) со 2-й недели предродового периода по 7-ю неделю послеродового периода. При этом содержание трийодтиронина в крови коров с длинным сервис-периодом через 7 недель после отела было в 1,7 раза выше, чем в крови коров двух других групп ($p<0,001$).

После отела направленность изменения содержания триглицеридов в крови животных с разной репродуктивной способностью была сходна с изменением уровня общего трийодтиронина. Концентрация триглицеридов снижалась на 14% ($p<0,05$) между 1-й и 7-й неделями после отела у коров с коротким сервис-периодом и на 16% ($p<0,05$) между 1-й и 13-й неделями у коров с длительным бесплодием. Напротив, у коров с длинным сервис-периодом эта концентрация существенно не изменялась в течение всего периода наблюдений. Кроме того, содержание триглицеридов в крови коров группы 2 было на 13% выше ($p<0,05$), чем в крови коров группы 3 через 5 недель после отела и на 17% выше ($p<0,01$), чем в крови коров группы 1 через 7 недель после отела. При этом с 1-й по 13-ю неделю после отела содержание триглицеридов в крови животных групп 1 и 3 позитивно коррелировало с содержанием общего трийодтиронина ($r=0,24$ при $p<0,05$), тогда как у животных группы 2 такой корреляционной зависимости не выявлено.

Заключение. Данные об уменьшении активности тиреоидной системы в ранний послеотельный период у коров черно-пестрой породы в целом согласуются с результатами, полученными на животных голштинской породы [9]. В настоящей работе впервые было показано, что у коров с низкой воспроизводительной способностью происходит более позднее и менее выраженное снижение концентрации общего тироксина в крови, чем у коров с высокой воспроизводительной способностью. Кроме того, у животных с длинным сервис-периодом отсутствует понижение концен-

трации общего трийодтиронина после отела, которое наблюдается у животных с коротким сервис-периодом. При этом направленность изменения содержания общего трийодтиронина в крови животных с разной репродуктивной способностью сходна с таковой для содержания триглицеридов. Полученные данные свидетельствуют о том, что в послеродовой период тиреоидные гормоны могут влиять на репродуктивную функцию коров молочного типа путем регуляции липидного обмена.

Работа выполнена по государственному заданию (рег. ЦИТиС № АААА-А18-118021990006-9).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bisinotto, R.S., Greco, L.F., Ribeiro, E.S., Martinez, N., Lima, F.S., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows // *Anim. Reprod.* 2012. 9: 260-272.
2. Chagas, L.M., Bass, J.J., Blache, D., Burke, C.R., Kay, J.K., Lindsay, D.R., Lucy, M.C., Martin, G.B., Meier, S., Rhodes, F.M., Roche, J.R., Thatcher, W.W., Webb, R. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows // *J. Dairy Sci.* 2007. 90: 4022-4032.
3. Wathes, D.C., Clempson, A.M., Pollott, G.E. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow // *Reprod. Fertil. Dev.* 2012. 25: 48-61.
4. González, F.D., Muñio, R., Pereira, V., Campos, R., Benedito, J.L. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows // *J. Vet. Sci.* 2011. 12: 251-255.
5. Shin, E.K., Jeong, J.K., Choi, I.S., Kang, H.G., Hur, T.Y., Jung, Y.H., Kim, I.H. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows // *Theriogenology*. 2015. 84: 252-260.
6. Mullur, R., Liu, Y.Y., Brent, G.A. Thyroid hormone regulation of metabolism // *Physiol. Rev.* 2014. 94: 355-382.
7. Kafi, M., Tamadon, A., Saeb, M., Mirzaei, A., Ansari-Lari, M. Relationships between thyroid hormones and serum energy metabolites with different patterns of postpartum luteal activity in high-producing dairy cows // *Animal*. 2012. 6: 1253-1260.
8. Mutinati, M., Rizzo, A., Sciorsci, R.L. Cystic ovarian follicles and thyroid activity in the dairy cow // *Anim. Reprod. Sci.* 2013. 138: 150-154.
9. Fiore, E., Piccione, G., Ganesella, M., Praticò, V., Vazzana, I., Dara, S., Morgante, M. Serum thyroid hormone evaluation during transition periods in dairy cows // *Arch. Anim. Breed.* 2015. 58: 403-406.

INVESTIGATION INTO THE ROLE OF THYROID HORMONES IN REGULATION OF THE REPRODUCTIVE FUNCTION OF COWS UNDER METABOLIC STRESS

Mityashova O.S., Solomakhin A.A., Lebedeva I.Yu.

L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy, 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132 Russia

Annotation. *In the current work, the profiles of thyroid hormones and triglycerides in the blood of cows of the Black Pied breed in the dynamics of the postpartum period were studied. The concentration of total thyroxine in the blood decreased after calving in all the examined animals, however, the dynamics of this decrease was different in individuals with dissimilar reproductive abilities. Furthermore, in cows with a short open days period or with long infertility, there was a gradual decrease in the content of total triiodothyronine in the circulation system. At the same time, in cows with a long open days period, the hormonal profile for triiodothyronine showed an increase by the 7th week of the postpartum period. Meanwhile, the direction of changes in the content of total triiodothyronine in the blood of animals with different reproductive abilities was similar to that for the content of triglycerides. In general, the data obtained indicate that the activity of the thyroid system in cows of the Black Pied breed during the early postpartum period is associated with the reproductive ability and lipid metabolism of the animals.*

Keywords: *dairy cows, early lactation, open days period, thyroid hormones, triglycerides.*

УДК 636.082

ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПО ТИПАМ КРОВИ КОРОВ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

Немцева Е.Ю., Филиппова Л.П.

ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. Карла Маркса, 29, 428003

E-mail: EUNemtzeva@yandex.ru

Аннотация. *В статье приведены данные по изучению полиморфизма эритроцитарных антигенов крови крупного рогатого черно-пестрой породы. В исследованной популяции черно-пестрого скота было обнаружено 7 антигенных факторов, контролируемых генами 51 хромосомных локусов. Установлено, что наиболее часто встречаются антигены A1, A2 (A-системы), B1, G2, Y2, A1', A2', D', E2', Q', G'', O4 (B-системы), C2, L' (C-системы), F (Система F-V), U' (Система S). Частота распространения антигенов варьирует от 0 до 59,16 %. Определена частота встречаемости аллелей EAB-локуса групп крови и контролирующие их аллели B-локуса. С высокой частотой встречаются аллели E'2E'3, Y2A'1A'2, B1G2O3O4Y2A'1A'2, G''. В исследованиях изучена молочная продуктивность коров в связи с их наследственными различиями по типам крови. Выявлено, что при наличии у животных аллелей G'' и A'2E'2Q', молочная продуктивность была выше по удою на 244 кг и на 215 кг соответственно, а по жирномолочности на 0,02 % и 0,11 %. Для эффективного отбора племенных телок для ремонта стада данной популяции рекомендовано оставлять преимущественно телок с наличием в группе крови аллелей B-локуса: G'', A'2E'2Q'.*

Ключевые слова: *иммуногенетика, группа крови, ген, аллель, locus.*

Введение. Иммуногенетический контроль происхождения животных – одна из основных областей практического применения групп крови. Используя информацию о группах крови и других полиморфных системах, можно уточнить происхождение и систематику видов, происхождение и родство пород, их генетическую структуру и внутripородную дифференциацию, проводить планирование и контроль селекционного процесса [1].

В настоящее время больше внимание в племенном животноводстве отводится контролю за родословными племенных особей. На каждое животное составляется иммуногенетический паспорт, в котором группы крови выступают генетическими маркерами [2, 3, 4, 5].

Целью наших исследований явилось изучение возможностей использования генетического полиморфизма групп крови при селекции чёрно — пёстрого скота.

Материал и методы исследований. В исследованиях нами было проанализировано 120 голов коров черно-пестрой породы крупного рогатого скота в условиях СХПК «Новый Путь» Аликовского района Чувашской Республики. Рассчитана частота распространения антигенных факторов. Частоту антигенных факторов определяли по проценту животных. Методом семейно-генетического анализа установлены аллели и генотипы локуса групп крови В – ЕАВ.

Результаты исследований и их обсуждение. В исследованной группе коров выявлено наиболее часто встречаются антигены А1, А2 (А-системы), В1, G2, Y2, А1', А2', D', E2', Q', G'', О4 (В-системы), С2, L' (С-системы), F (Система F-V), U' (Система S). В исследованной популяции черно-пестрого скота было обнаружено 7 антигенных факторов, контролируемых генами 51 хромосомных локусов.

Частота распространения антигенов варьирует от 0 до 59,16 %. С высокой частотой встречаются аллели E'2E'3, Y2A'1A'2, B1G2O3O4Y2A'1A'2, G''.

Молочная продуктивность выше при наличии у животных аллелей G'' и A'2E'2Q'. Животные носители аллеля G'' имеют преимущество по удою на 244 кг ($7372 \pm 105,2^*$ кг), а жирномолочность на 0,02 % ($3,86 \pm 0,08^*$ %), эта разница достоверна. Не меньший интерес представляет

так же аллель A'E'2Q'. Коровы носители этого аллеля превосходят как по удою на 215 кг ($7369 \pm 291,3$ кг), так и по жиру на 0,11 % ($3,96 \pm 0,11$ %).

Таблица 1. Частота встречаемости наиболее распространенных аллелей В-системы групп крови

Группы крови и контролирующие их аллели В-локуса	Частота встречаемости аллелей, n=120
B1B2G2	0,041
B1B2O3	0,025
B1G2O3O4Y2A'1A'2	0,041
B1Y2A'2	0,025
G2I2	0,025
I2O1O2	0,033
G''	0,591
A'E'2Q'	0,05
E'2E'3	0,091
Y2A'1A'2	0,1

Закключение. Исследование аллелофонда в локусе В групп крови у коров, плеiotропного действия аллелей на продуктивность и их сочетаемости позволят лучше понять причины наличия в популяции крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы генетически обусловленного полиморфизма эритроцитарных антигенов. С целью эффективного отбора племенных телок для ремонта стада данной популяции рекомендуется оставлять преимущественно телок с наличием в группе крови аллелей В-локуса: G'', A'E'2Q'.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дунин И.М. Перспективы молочного скотоводства и конкурентоспособность молочного скота, разводимого в Российской Федерации / И.М. Дунин, А. Данкверт, А. Кочетков // Молочное и мясное скотоводство. – 2013. – № 3. – С. 1-5.
2. Голдобина Л.И. Влияние некоторых факторов на молочную продуктивность коров черно-пестрой породы / Л.И. Голдобина, Е.Ю. Немцева, Т.В. Ржанова // Научно-образовательная среда как основа развития агропромышленного комплекса и социальной инфраструктуры села: материалы международ. науч.-практ. конференции, посвященной 85-летию ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА (20 – 21 октября). – Чебоксары: Чувашская ГСХА, 2016. – С. 162 – 165.
3. Немцева, Е.Ю. Анализ селекционно-племенной работы с крупным рогатым скотом / Е.Ю. Немцева, А.Ю. Лукина // Развитие аграрной науки как важнейшее условие эффективного функционирования агропромышленного комплекса страны: материалы Всероссийской науч.-практ. конференции. – Чебоксары: Чувашская ГСХА, 2018. – С. 265 – 268.
4. Немцева, Е.Ю. Оценка быков-производителей по происхождению, качеству потомства и спермопродукции / Е.Ю. Немцева, Н.В. Сергеева // Развитие аграрной науки как важнейшее условие эффективного функционирования агропромышленного комплекса страны: материалы Всероссийской науч.-практ. конференции. – Чебоксары: Чувашская ГСХА, 2018. – С. 268 - 272.
5. Немцева Е.Ю. Молочная продуктивность коров разной линейной принадлежности // Продовольственная безопасность и устойчивое развитие АПК: материалы международ. науч.-практ. Конференции (20 – 21 октября). – Чебоксары: Чувашская ГСХА, 2015. – С. 317 – 321.

GENOTYPIC ASSESSMENT BY BLOOD TYPES OF BLACK-AND-WHITE COWS

Nemtseva E. Yu., Filippova L. P.

¹FGBOU VO Chuvash state agricultural Academy, Chuvash Republic, Cheboksary, Karl Marx str., 29, 428003, E-mail: EUNemtseva@yandex.ru

Abstract. *The article presents data on the study of polymorphism of erythrocyte antigens of blood of black-mottled cattle. 7 antigenic factors controlled by genes of 51 chromosomal loci were found in the studied population of black-and-white cattle. It is established that the most frequent antigens A1, A2 (A-system), B1, G2, Y2, A1', A2', D', E2', Q', G', O4 (In-system), C2, L' (C-system) F (System F-V), U' (S). Frequency distribution of antigens varies from 0 to 59,16 %. The frequency of occurrence of EAV-locus alleles of blood groups and B-locus alleles controlling them were determined. With high frequency alleles there are E 2E'3, Y2A'1A'2, 1A B1G2O3O4Y2A''2, G''. The studies studied dairy productivity of cows due to their hereditary differences in blood types. We found that the presence of animals alleles G'' and A 2E'2Q', milk yield was higher for the yield of milk on 244 kg and 215 kg, respectively, and butterfat 0.02 % and 0.11 %. For effective selection of breeding heifers for herd repair of this population, it is recommended to leave mainly heifers with the presence of B-locus alleles in the blood group: G'', A'2 ' 2Q'.*

Keywords: *immunogenetics, blood groups, gene, allele, locus.*

ОЦЕНКА ЦЕЛОСТНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЖИВОТНЫХ

Никиткина Е.В., Шапиев И.Ш., Мусидрай А.А., Крутикова А.А.,
Тимофеева С.В.

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

Аннотация. Одной из причин гибели клеток является нарушение переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий. Была выявлена идентичность в характере ответных реакций на действие сукцината калия и 2,4-динитрофенола при оценке дыхания сперматозоидов хряков, быков, жеребцов, северных оленей и петухов. Различия заключались лишь в силе ответа на действие тестирующих веществ. После замораживания скорость дыхания и стимуляция дыхания 2,4 ДНФ сперматозоидов всех исследуемых животных – снижалась, а стимуляция дыхания сукцинатом калия – увеличивалась, что свидетельствует о повреждениях дыхательной цепи при криоконсервации. Имеется высокая достоверная связь между величиной стимуляции дыхания 2,4-ДНФ сперматозоидов и оплодотворяющей способностью криоконсервированной спермы хряков ($r=0,70$, $P < 0,01$), быков ($r=0,62$ $P < 0,05$) и петухов ($r=0,76$ $P < 0,01$). Стимуляция дыхания 2,4 ДНФ является полезным и информативным показателем при оценке спермы, разработке и совершенствовании метода криоконсервации спермы животных.

Ключевые слова. Сперматозоиды, дыхательная цепь, фосфорилирование, АТФ, НАДН.

Введение. Центральное место в жизнедеятельности клеток занимают биохимические процессы, связанные с генерацией энергии (АТФ) - окислительное фосфорилирование и гликолиз. Чувствительным показателем функционального состояния клетки и целого организма является соотношение дыхания и фосфорилирования. [1,2]. Интенсивность окислительного фосфорилирования является объективным критерием для оценки состояния сперматозоидов при различных условиях сохранения спермы сельскохозяйственных животных [2,3,4]. Одной из причин гибели клеток является нарушение переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий.

Целью работы была сравнительная оценка целостности дыхательной цепи сперматозоидов хряков, быков, жеребцов, северных оленей и петухов.

Материалы и методы. Оценку дыхательной цепи митохондрий в сперматозоидах производили по реакции дыхания и состояния пиридин-нуклеотидов (НАД-НАДН) на добавление субстрата дыхания сукцината калия и 2,4-динитрофенала (ДНФ). В неповрежденные сперматозоиды сукцинат калия не проникает и не вызывает стимуляцию дыхания. Если дыхательная цепь повреждена, то реакция на 2,4 ДНФ слабая или отсутствует. Оценку проводили полярографическим и флуоресцентным методами. Измерения дыхания проводили на электроде Кларка. Содержание НАДН измеряли на флуоресцентном микроскопе ЛЮАМ с насадкой ФМЭЛ-1. Длина волны возбуждения люминесценции НАДН - 365нм, ФАД-465нм. Регистрацию НАДН проводили при длине волны 465нм. Количество НАДН выражали в условных единицах и рассчитывали изменение флуоресценции после каждой добавки в процентах от исходной, принятой за 100%.

Результаты и обсуждение. Была выявлена идентичность в характере ответных реакций на действие сукцината калия и 2,4-динитрофенола при оценке дыхания сперматозоидов хряков, быков, жеребцов, северных оленей и петухов. Различия заключались лишь в силе ответа на действие тестирующих веществ (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительные данные показателей дыхательной активности сперматозоидов хряков, жеребцов, быков, северных оленей, петухов

Животное, сперма		n	Подвижность, %	Скорость дыхания, н AO_2 /мин	Стимуляция дыхания	
					Сукцинатом калия	2,4 ДНФ
хряки	Свежая	6	90	178± 18,6	1,02±0,020	3,30±0,05
	замороженная	6	35	98 ±11,4	1,50±0,141	2,45±0,15
жеребцы	Свежая	10	80	281± 68	1,2 ±0,06	1,8 ±0,14
	замороженная	10	40	136±115	1,7 ±0,09	1,5± 0,11
быки	Свежая	10	80	132±7,0	1,06±0,048	2,20±0,35
	замороженная	10	50	87±11,3	1,92±0,100	1,59±0,07
Северные олени	Свежая	7	80	-	-	1,7±0,08
	замороженная	7	30	-	-	1,3±0,09

петухи	Свежая	7	90	225±21,2	1,00±0,010	1,87±0,04
	замороженная	7	45	121±12,6	1,36±0,139	1,66±0,11

После замораживания скорость дыхания и стимуляция дыхания 2,4 ДНФ сперматозоидов всех исследуемых животных – снижалась, а стимуляция дыхания сукцинатом калия – увеличивалась, что свидетельствует о повреждениях дыхательной цепи при криоконсервации. Увеличение стимуляции дыхания сукцинатом калия происходит при повреждениях плазматической и митохондриальной мембран сперматозоидов и нарушениях их проницаемости. Уменьшение величины стимуляции дыхания ДНФ является показателем возрастания свободного окисления, не связанного с окислительным фосфорилированием.

Достоверной положительной связи оплодотворяющей способности со скоростью дыхания сперматозоидов хряков, быков и петухов не выявлено. Это касается как свежей, так и криоконсервированной спермы. В то же время при осеменении коров выявлена связь между их оплодотворяемостью и величиной стимуляции дыхания 2,4 ДНФ в замороженной сперме ($r=0,62$ $P < 0,05$). Регрессивным анализом найдено уравнение, которое позволяет говорить о предположительной оплодотворяемости коров в зависимости от величины стимуляции дыхания 2,4 ДНФ - $x=76y-55$, где x - оплодотворяемость коров, а y - величина стимуляции сперматозоидов. При осеменении коров для достижения оплодотворяемости 70% и более необходимо использовать сперму со стимуляцией дыхания 2,4 ДНФ не менее 1,59 раза.

Также получена высокая достоверная связь между величиной стимуляции дыхания ДНФ замороженных сперматозоидов и оплодотворяющей способностью хряков ($r=0,70$, $P < 0,01$) и петухов ($r=0,76$ $P < 0,01$).

Исследовали также влияние тестирующих веществ: сукцината калия, 2,4 ДНФ и антимицина на флуоресценцию НАДН в свежей и криоконсервированной сперме петухов. Если перенос электронов и протонов по дыхательной цепи функционирует нормально, то разобшитель дыхания и фосфорилирования 2,4 ДНФ усиливает нефосфорилирующее окисление НАДН и его флуоресценция снижается. Антимицин блокирует перенос протонов по дыхательной цепи, что приводит к накоплению НАДН и его флуоресценция возрастает. Степень флуоресценции НАДН после добавления 2,4 ДНФ к замороженной сперме было на 9% меньше, чем в свежей.

Корреляционным анализом установлено наличие достоверной связи между величиной изменения флуоресценции НАДН после добавления ДНФ и оплодотворенности яиц ($r=0,65$, $P < 0,05$).

Заключение. Стимуляция дыхания 2,4 ДНФ является полезным и информативным показателем при оценке спермы, разработке и совершенствовании метода криоконсервации спермы животных.

Работа выполнена по Государственному заданию № № АААА-А18-118021990006-9.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скулачев В.П. Трансформация энергии в биомембранах. М.: Наука, 1972. 203 с.
2. Шапиев И.Ш. Совершенствование методов замораживания и оценки спермы хряков/ автореферат дис. ... доктора сельскохозяйственных наук. - Санкт-Петербург - Пушкин. - 1998
3. Nikitkina E.V., Plemyashov K.V., Shiryaev G.V. Assessment of energy metabolism in equine semen after freezing. *Animal Reproduction Science*. 2018. T. 194. C. e5.
4. Moraes, Meyers. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Animal Reproduction Science*. 2018. T. 194. C.71-80

EVALUATION OF THE INTEGRITY OF RESPIRATORY CHAIN IN ANIMAL SPERM

Nikitkina E., Shapiev I., Musidray A., Krutikova A., Timofeeva S.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 196601, St. Petersburg, Pushkin, Mos-cowskoye sh, 55a
Email: nikitkinae@mail.ru

Annotation. *One of the causes of cell death is a violation of the transfer of electrons along the respiratory chain of mitochondria. Identity in responses to the action of potassium succinate and 2,4-dinitrophenol when assessing respiratory sperm in pigs, bulls, stallions, reindeer and cocks was found. The differences were only in the strength of the response to the testing substances. After freezing, the respiratory rate and respiratory stimulation of 2,4 DNP of the sperm decreased in all studied animals, and the stimulation of respiration by potassium succinate increased, which indicates damage to the respiratory chain during cryopreservation. There is a significant correlation between high respiration stimulation by 2,4-DNP and fertilizing ability of cryopreserved semen in boars ($r = 0,70$, $P < 0,01$), bull ($r = 0,62$ $P < 0,05$) and cocks ($r = 0.76$ $P < 0.01$). Respiratory stimulation 2,4 DNF is a useful and informative indicator in the assessment of sperm, the development and improvement of the cryopreservation method of animal sperm.*

Keywords. *Sperm, respiratory chain, phosphorylation, ATP, NADH.*

ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ У БЕЛОГО АМУРА (*STENOPHARYNGODON IDELLA* VAL.), ВЫРАЩИВАЕМОГО В АКВАКУЛЬТУРЕ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Носова А.Ю., Царь А.И., Кипень В.Н., Лемеш В.А.

Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», ул. Академическая, 27, г. Минск, РБ, 220072

E-mail: A.Nosova@igc.by

Аннотация. В работе дана оценка генетического разнообразия белого амура (*Stenopharyngodon idella* Val.), выращиваемого в аквакультуре на территории Республики Беларусь по данным генотипирования 11 STR-локусов – Cid0001, Cid0002, Cid0004, Cid0012, Cid0017, Cid0036, Cid0058, Cid0909, Cid1525, Cid1528, Cid1529. Рассчитаны следующие показатели: среднее число аллелей на локус (N_a), эффективное число аллелей (N_e), уровни ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности, значение информационного индекса Шеннона (I), индекс фиксации F_{IS} .

Установлено, что среди производителей белого амура отсутствует выраженная тенденция к снижению генетического разнообразия. Вместе с тем, следует уделить особое внимание подбору пар производителей с учетом результатов молекулярно-генетического анализа.

Ключевые слова: белый амур, *Stenopharyngodon idella* Val., короткие тандемные повторы (STR), генетическое разнообразие, гетерозиготность, индекс Шеннона, F_{IS} индекс фиксации.

Введение. Белый амур относится к видам экологической группы дальневосточных растительноядных рыб, потребляющих первичную продукцию водоемов (фитопланктон и высшую водную растительность), практически не используемую карпом. Растительноядные рыбы обладают значительной экологической пластичностью и высокими товарными качествами.

В Республике Беларусь работы по акклиматизации растительноядных рыб начаты в 1963 г. Исходные ремонтно-маточные стада рыб были завезены из Казахстана. Из их потомства впоследствии сформировано ремонтно-маточное стадо в отделении «Белоозерское» ОАО «Опытный рыбхоз «Селец», где и происходит их воспроизводство. Однако при акклиматизации в новых условиях и одомашнивании диких видов рыб наблюдаются генетические и морфофизиологические изменения, имеется

тенденция к снижению гетерозиготности и жизнестойкости. При искусственном воспроизводстве наблюдается снижение уровня полиморфизма за счет эффекта основателя и значительного инбридинга. Для оценки генетического разнообразия белого амура активно используется полиморфизм микросателлитных локусов (англ. Short Tandem Repeat, STR) [1, 2].

Цель работы – охарактеризовать генетическое разнообразие белого амура (*Stenopharyngodon idella* Val.), выращиваемого в аквакультуре в Республике Беларусь, по результатам генотипирования 11 STR-локусов.

Материал и методика исследований. Материалом для исследований служили образцы тканей (участок хвостового плавника) от 81 особи, разводимых в аквакультуре в отделении «Белоозерское» ОАО «Опытный рыбхоз «Селец», из которых 25 были представлены производителями и 56 – сеголетками.

Выделение тотальной ДНК проводилось с использованием методик фенол-хлороформной и солевой экстракции с модификациями.

Проведен анализ разнообразия аллелей по одиннадцати STR-локусам – Cid0001, Cid0002, Cid0004, Cid0012, Cid0017, Cid0036, Cid0058, Cid0909, Cid1525, Cid1528, Cid1529 [1, 2]. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей буфер для Taq-полимеразы (650 мМ Трис-НСl, 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,2% Твин 20, рН=8,8), 0,2 мМ дНТФ, 2,5 пМ каждого праймера, 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 ед. High-Fidelity ДНК-полимеразы (ОДО «Праймтех»), 10-20 нг исследуемой ДНК. Температурный режим соответствовал параметрам, приведенным в исследовании Fu J. et al. [3]. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «ABI PRISM 3500 Genetic analyzer» относительно маркера молекулярного веса Orange 500 DNA Size Standard (Nimagen, Нидерланды), определение длин аллелей осуществляли с использованием программного обеспечения GeneMarker 5. Для статистической обработки данных использовали специализированное программное обеспечение GenAIEx v.6.5 [4], STRUCTURE v.2.3.4 [5], PAST v.3.17 [6] и POPHELPER v1.0.10 [7].

Результаты исследований и их обсуждение. По результатам генотипирования 11 STR-локусов для производителей белого амура (n = 25) было выявлено 106 аллелей, для сеголеток (n = 56) – 120 аллелей. Среднее

число аллелей (N_a) у производителей составляло $9,636 \pm 2,111$, у сеголеток – $10,909 \pm 2,386$ аллелей на локус соответственно. Необходимо отметить, что при сравнении с аналогичными значениями по результатам исследования Fu J. et al. [3], для 87 особей белого амура (обитающего в естественных условиях в р. Янцзы, Китай) $N_a = 22,091 \pm 3,936$. Данный факт еще раз подчеркивает наличие тенденции к снижению уровня полиморфизма за счет эффекта основателя и значительного инбридинга в искусственных популяциях в сравнении с популяциями, обитающими в естественных условиях.

Среднее значение индекса Шеннона (I), который отражает сложность структуры сообщества, рассчитанного для всех 11 STR-локусов, составило $1,818 \pm 0,088$ для производителей и $1,984 \pm 0,111$ для сеголеток. Полученные данные указывают на среднюю сложность структуры сообщества исследованных особей.

Самые высокие значения наблюдаемой гетерозиготности (H_o) для производителей белого амура наблюдались для Cid0002 (0,960), Cid1528 (0,840) и Cid0058 (0,760), для сеголеток – для Cid0909 (0,929), Cid1529 (0,925) и Cid0017 (0,878). Среднее значение H_o для 11 STR-локусов – $0,745 \pm 0,029$. Аналогичный параметр для особей из р. Янцзы [3] $H_o = 0,879 \pm 0,057$. Таким образом, для H_o также показаны более высокие значения для особей, обитающими в естественных условиях.

Наиболее высокие рассчитанные значения коэффициента F_{IS} для производителей были показаны для локусов Cid0012 (0,255), Cid1529 (0,248) и Cid0017 (0,210), и в среднем для 11 STR-локусов составляли $0,103 \pm 0,041$. Для сеголеток самое высокое значение F_{IS} было выявлено для локуса Cid0058 со средним значением $0,058 \pm 0,026$.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком генетическом разнообразии исследованных представителей белого амура (*Stenopharyngodon idella* Val.). В то же время, при сравнении показателей – среднее число аллелей на локус (N_a) и уровень наблюдаемой гетерозиготности (H_o), – рассчитанных для производителей, выращиваемых в аквакультуре на территории Республики Беларусь, в сравнении с особями, обитающими в естественных условиях, имеет место тенденция к снижению генетического разнообразия.

Таким образом, для успешного достижения селекционных целей – увеличения уровня полиморфизма за счет снижения эффекта основателя и максимального нивелирования негативных последствий инбридинга, – необходимо уделить особое внимание паспортизации производителей и, соответственно, подбору пар с учетом результатов молекулярно-генетического анализа.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. Liu, J.-H. Xia, Z.-Y. Bai, et al. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis // *Aquaculture*. - 2009. 297(1–4):51–56.
2. J. Xia, F. Liu, Z. Zhu, et al. A consensus linkage map of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on microsatellites and SNPs // *BMC Genomics*. - 2010. 11(1):135.
3. J. Fu, Y. Shen, X. Xu, et al. Multiplex microsatellite PCR sets for parentage assignment of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). // *Aquaculture International* - 2013. 21(6):1195–1207.
4. R. Peakall, P.E. Smouse GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update // *Bioinformatics* - 2012. 28 (19):2537–2539.
5. J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly. Inference of Population Structure Using Multi-locus Genotype Data // *Genetics* - 2000. 155(2):945.
6. O. Hammer, D.A.-T. Harper, P.D. Ryan. Past : Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica* - 2001;
7. R.M. Francis R.M. Pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure. // *Molecular Ecology Resources*- 2017. 17(1):27–32.

POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE LOCI IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA* VAL.) GROWN IN AQUACULTURE IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Nosova A.Yu., Tsar N.I., Kipen V.N., Lemesh V.A.

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences, Akademicheskaya st., 27, 220072 Minsk, Republic of Belarus
E-mail: A.Nosova@igc.by

Abstract. *In this study we evaluated the genetic diversity of 81 grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) producers grown from aquaculture in Belarus. Genotyping was obtained for 11 STR-loci (Cid0001, Cid0002, Cid0004, Cid0012, Cid0017, Cid0036, Cid0058, Cid0909, Cid1525, Cid1528, Cid1529). The following parameters were calculated: the average number of alleles per locus, the effective number of alleles, the levels of expected and observed heterozygosity, the value of the Shannon information index and the fixation index F_{IS} .*

The obtained results indicate sufficiently high genetic diversity of the studied samples of grass carp. However, in order to successfully achieve breeding goals, it is necessary to pay special attention to the selection of pairs of producers, taking into account the results of molecular genetic analysis.

Keywords: *grass carp, *Ctenopharyngodon idella* Val., short tandem repeat (STR), genetic diversity, allele, heterozygosity, Shannon index, F_{IS} fixation index.*

ГЕНОФОНД МОЛОЧНЫХ ПОРОД СКОТА УКРАИНЫ И ПОСЛЕДСТВИЯ ГЛОБАЛИЗАЦИИ СОВРЕМЕННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ

Почукалин А.Е., Прыйма С.В., Ризун О.В.

Институт разведения и генетики животных им. М.В.Зубца НААН Украины,
с. Чубинское, Бориспольский р., Киевская обл., Украина, 08321
E-mail: pochukalin.a@ukr.net

***Аннотация.** Ключевым элементом развития отрасли молочного скотоводства является количество племенных ресурсов, которые в дальнейшем сформируют основной генофонд страны. В Украине 314 тысяч голов скота – это активная часть популяции, которую поддерживают около 340 субъектов по племенному делу 13-ти специализированных молочных и комбинированных пород крупного рогатого скота. Основная часть общего массива племенных животных – созданные отечественные породы (украинская черно-пестрая, красно-пестрая, красная и бурая молочные). Породы зарубежной селекции 24,6% и только 1,92% относятся к группе сохранения генофонда (белоголовая украинская, лебединская, красная степная). Сейчас продолжаются мероприятия по сохранению локальной, приспособленной к местным условиям Закарпатья бурой карпатской породы комбинированного направления продуктивности.*

Средний удой коров популяции достаточно высок и составляет 7277 кг, с отклонениями от 8 т – коровы голишинской и швицкой пород до 3342 кг молока красной польской. Удой коров созданных отечественных пород составляет от 6 до 7 т.

Получение высоких показателей молочной продуктивности достигается за счет подбора быков-производителей с высокой племенной ценностью. В Украине представлен широкий диапазон специализированных молочных и комбинированных пород (16-ть) основных родственных групп, которые обеспечивают планомерную работу по совершенствованию хозяйственно полезных признаков молочного скота. Однако, из-за высокой доли импортируемого племенного материала сужается генеалогическая структура, которая требует постоянной корректировки планов и селекционных программ скота молочных пород.

***Ключевые слова:** породы, популяции, линии, быки-производители, геномная оценка.*

Введение. Мониторинг генофонда молочных и комбинированных пород является основой для анализа состояния племенных ресурсов каждой страны. Именно по основным показателям – размер популяции и ее размещение по климатическим зонам, а также уровень хозяйственно полезных признаков формируется стратегия селекции на будущее. Кроме то-

го, не менее важными и актуальными остаются вопросы разведения по структурным формированиям пород, особенно линиям [4], [5], [6], [7].

Цель работы – определить общий размер активной части популяции молочного скота в Украине и установить долю каждой молочной и комбинированной пород. Проанализировать генетический материал (быки-производители), который представлен для улучшения хозяйственно полезных признаков молочного скота и установить его генеалогическую принадлежность.

Материал и методика исследований. Материалом для исследования были данные годовых отчетов Государственного реестра субъектов племенного дела за 2018 [3]. Согласно имеющимся отчетов были взяты данные по численности активной части популяции, а также в разрезе пород с указанием племенных статусов. Быки-производители и их характеристика, линейная принадлежность взяты из ежегодных Каталогов быков для воспроизводства маточного поголовья 2015 и 2018 годах [1], [2].

Результаты исследований и их обсуждение. Количество субъектов по племенному делу предоставленных за 2018 год составляет 340 хозяйств, в том числе по 170 племенных заводов и репродукторов. Общая численность активной части популяции составляет 314,7 тыс. голов, из которых 131,8 тыс. коров. В племенном реестре Украины зарегистрировано 13 молочных и комбинированных пород скота, среди которых к группе черно-пестрых принадлежат белоголовая украинская, голштинская, украинская черно-пестрая молочная; красно-пестрых - айрширская, украинская красно-пестрая молочная, симментальская; красных - англеская, украинская красная молочная, красная польская, красная степная и к бурым - лебединская, украинская бурая молочная, швицкая. По родственным группам наибольший процент занимает черно-пестрые - 72,83%, далее идут красно-пестрые - 20,08, красные - 5,45% и бурые породы - 1,64%. Относительная численность пород зарубежной селекции составляет 24,6% против 75,4% отечественной. Наибольший процент по численности принадлежит украинской черно-пестрой - 165071 гол., в том числе 68202 коров (52,45% общего поголовья) и голштинской - 63520 гол., в том числе 25264 коров (20,18%) породам. Менее 1% общего поголовья занимают шесть пород, в основном это локальные и автохтонные. Доля пород, вхо-

дящих в группу автохтонных (белоголовая украинская, лебединская, красная степная) составляет 1,92%. Сейчас проходят мероприятия по восстановлению популяции местной бурой карпатской породы, которая, к сожалению осталась только у населения.

Удой подконтрольных коров активной части популяции в среднем составляет 7277 кг. Более 8 т молока имеют коровы голштинской (8646 кг) и швицкой (8777 кг) пород. Кроме того, следует отметить, украинскую черно-пеструю молочную (7243 кг), айрширскую (6909 кг), украинский красно-пеструю молочную (6793 кг) и украинскую красную молочную (6436 кг) породы. Посредственный удой зафиксировано у коров аборигенных пород - красной польской (3342 кг), красной степной (4238 кг) и белоголовой украинской (4419 кг).

В ежегодном каталоге 2018 года приведены данные 1712 быков-производителей 17-ти пород молочного и комбинированного направления продуктивности, которые рекомендованы для воспроизводства маточного поголовья. Доля быков родственной группы черно-пестрых пород составляет 77,8%, тогда как наименьшая (3,8%) - это бурые. Следует отметить, что наибольший процент быков, которые используются в воспроизводительной кампании принадлежит аллохтонным (зарубежным). Их доля в общей структуре - 81%. Также есть быки-производители, которые имеют посредственную племенную ценность, но важные для существования программ по сохранению генофонда (бурая карпатская, лебединская, белоголовая украинская и красная степная). Таких быков насчитывается 61 голова или 3,5%.

Включенные 64,8% быков-производителей относятся к 16-ти странам и имеют общепризнанные методики оценки - США (TPI), Франции (ISU), Германии (RZG), Канады (LPI) и Нидерландов и Бельгии (NVI), которые ранжированы, по отечественной оценке, (СИ – селекционный индекс) с помощью программного обеспечения СУМС «Орсек-СЦ». Кроме традиционной оценки быков по типу и продуктивности потомства является широкий выбор производителей с геномной оценкой. И хотя геномная оценка стала официальной ряда зарубежных стран с 2009 года, впервые в отечественный каталог быки оценены геномно включены в 2015 году. Так, в 2015 году доля быков с геномной оценкой составила 4,6% (38 гол.), то-

гда как в 2018 году она увеличилась в 5 раз и составляет 27,9% (478 гол.). В основном, это быки голштинской (94,4%) и джерсейской (2,3%) пород.

Важным элементом отбора и подбора быков к маточному поголовью есть разведение по линиям. Включенные быки-производители молочных и комбинированных пород имеют генеалогическую разветвленность и специфику. Так, отечественные породы представлены апробированными линиями, породы мирового значения - суженные по количеству линий, поскольку учитывается племенная ценность указанного быка на так называемых быков-лидеров. Голштинская порода представлена 26 линиями, среди которых доля быков Елевейшна 1491007, Старбака 352790 и Чифа 1427381 составляет 81% общего массива быков. Аналогичные закономерности наблюдаются в генеалогических структурах быков джерсейской, симментальской и швицкой пород. Кроме того, получение быков-производителей высокой племенной ценности немислимо без использования близкородственного спаривания. Доля таких быков Каталога 2018 года составляет 74,5%. Это следует учитывать при подборе быков-производителей и постоянно проводить мониторинг за сложившиеся ситуацией каждого племенного стада.

Заключение. Генофонд скота Украины представлен 13-ю породами специализированного молочного и комбинированного направления. Активная часть популяции составляет 314,7 тыс. голов, расположенной в 340 племенных хозяйствах. Наибольшую (72,83%) долю занимает родственная группа черно-пестрых, среди которых следует отметить голштинскую породу (20,18%). Для воспроизводства племенной части популяции может использоваться 1712 быков 17-ти пород. Быки-производители зарубежной селекции имеют суженую генеалогическую структуру, а в родословной имеется один или группа общих предков различной доли родства. Это в свою очередь требует особого внимания, по отбору быков к маточному поголовью.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гладій М., Полупан Ю., Рєзнікова Н., Прийма С. Генетичні ресурси молочного і м'ясного скотарства в Україні // Тваринництво України. – № 9-10. – 2018. – С. 14-20.
2. Дунин И., Кочетков А., Шаркаев В. Основные характеристики молочного скотоводства Российской Федерации // Зоотехния. – 2011. - № 7. – С. 2-4.
3. Шаркаев В., Кочетков А. Результаты комплексной оценки молочного скота в Российской Федерации // Молочное и мясное скотоводство. – 2012. – № 8. – С. 9-12.
4. Кругляк О. В. Економічні аспекти ефективності впровадження геномної оцінки тварин // Вісник аграрної науки. – 2014. – № 1. – С. 64-68.
5. <http://animalbreedingcenter.org.ua/derjplemreestr>
6. Каталог бугаїв молочних і молочно-м'ясних порід для відтворення маточного поголів'я в 2015 році / за ред. М. І.Башенка. – К.: 198 с.
7. Каталог бугаїв молочних і молочно-м'ясних порід для відтворення маточного поголів'я в 2018 році / за ред. Ю. П. Полупана. – К.: 311 с.

UKRAINIAN DAIRY BREED CATTLE GENE POOL AND CONSEQUENCES OF GLOBALIZATION OF MODERN GENETIC RESOURCES

Pochukalin A.Ye. , Pryima S.V., Rizun O.V.

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M. V.Zubets NAAS
Chubinskoe village, Boryspil District, Kiev Region, Ukraine, 08321
E-mail: pochukalin.a@ukr.net

Abstract. *A key element in the development of the dairy industry is the number of breeding resources that will further form the country's main gene pool. In Ukraine, 314 thousand head of cattle is an active part of the population, which is supported by about 340 subjects for breeding 13 specialized dairy and combined cattle breeds. The main part of the total mass of breeding animals is created by domestic breeds (Ukrainian black-and-white, red-and-white, red and brown milk). Breeds of foreign selection 24.6% and only 1.92% belong to the conservation group of the gene pool (Ukrainian Whitehead, Lebedinsky, Red Steppe). Now continuing activities for the preservation of the local Brown Carpathian breed adapted to the local conditions of Zakarpattia combined productive direction.*

The average milk yield of cows in the population is quite high and amounts to 7277 kg, with deviations from 8 tons - of Holstein and Brown Swiss cows to 3342 kg milk of Polish Red. The milk yield of cows created by domestic breeds is from 6 to 7 tons.

Selection of bulls with high breeding value contributes to high dairy productivity. In Ukraine, a wide range of specialized dairy and combined breeds (16) of the main related groups is presented, which provide systematic work on improvement of economically useful features of dairy cattle. However, due to the high proportion of imported breeding material, the genealogical structure is narrowing, which requires constant adjustment of dairy breeding plans and breeding programs.

Keywords: *breeds, populations, lines, bulls, genomic evaluation.*

ДИНАМИКА ЖИВОЙ МАССЫ ЯГНЯТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА ИХ РОЖДЕНИЯ

Прытков Ю.А., Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Волкова Н.А.

ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», 142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, дом 60

***Аннотация.** Проведено исследование взаимосвязи типа рождения ягнят с их живой массой при рождении и динамикой прироста. Результатами исследования установлено, что по живой массе в 90-дневном возрасте одиночки превосходят двойни на 14%, тройни – на 30% и четверни – на 32% ($p < 0,05$).*

***Ключевые слова:** тип рождения ягнят, романовская порода, гибриды, живая масса, рост и развитие.*

Овцеводство играет большую роль в обеспечении населения продуктами питания, а также ряда отраслей промышленности сырьем (1,2). В программе развития сельского хозяйства страны отрасли овцеводства уделяется особое внимание (3). Развитие отрасли обусловлено скороспелостью, многоплодностью, высокой адаптационной способностью к сложным природно-климатическим условиям (4,5). Овцеводство отличается разнообразием получаемой продукции. В структуре спроса продукции отрасли произошло существенное изменение, снижается спрос на шерсть, увеличивается спрос на молодую баранину, следовательно, производство данной продукции для хозяйств имеет существенное экономическое значение (6-8). Одним из основных факторов, влияющих на экономическую эффективность молодой баранины, является рост и развитие ягнят. Эти показатели зависят от генотипических и паратипических факторов, в том числе от типа рождения ягнят (9).

Целью данного исследования является изучение роста и развития ягнят в зависимости от типа рождения.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены в ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста». Объектом исследования являлись чистопородные

ягнята романовской породы (n=15) и гибриды третьего поколения с 12,5% кровностью по архару (n=25). Материалом для исследования служили показатели роста ягнят. Живую массу ягнят определяли в 6-и 42-х и 90-дневном возрасте. Статистическую обработку выборки проводили с использованием пакета программы анализа данных SPSS 22.0.

Результаты исследования. В исследуемой нами популяции было установлено 4 типа рождения; одницы, двойни, тройни, четверни. Средняя живая масса ягнят шестидневного возраста составила 3,65 кг. Наивысшую живую массу в этом возрасте имели ягнята одинцы - 4,90 кг, они превосходили двойни на 22,4%, тройни - на 26,1%, разница между группами статистически не достоверна. В этом возрасте данный показатель у ягнят четверни составил 2 кг, что в 2,45 раза меньше, чем у аналогов с группы одинцов ($p < 0,05$). Ягнята данной группы уступали всем аналогам из других групп. До трехмесячного возраста такая закономерность для всех групп сохранялась. Абсолютный прирост до трехмесячного возраста в зависимости от типа рождения составил: 16,1 кг у одинцов, 14,3 у двойни, 10,91 у тройни и 12,2 у четверни.

Таблица 1. Живая масса ягнят в зависимости от типа рождения

Тип рождения	Живая масса в возрасте			
	6 дней	20 дней	42 дней	90 дней
Одинцы	4,90±0,25	10,20±0,55	14,35±0,65	21,0±0,82
Двойни	3,80±0,19	6,78±0,21	10,14±0,34	18,10±0,51
Тройни	3,62±0,20	5,12±0,56	8,31±0,44	14,53±0,48
Четверни	2,00±0,08	4,80±0,28	6,80±0,37	14,20±0,40
В среднем	3,65±0,12	6,40±0,33	9,41±0,39	16,35±0,74

Суммарный прирост за 90 дней в зависимости от типа рождения составил у одинцов 16,1 кг, у двойни 28,6, у тройни 32,73, и 56,8 кг у четверни. Среднесуточный прирост у одинцов составил 179 г, у двойни - 159 г, у тройни - 121 и у четверни - 135,5 г.

Заключение. Результаты исследования показывают, что одним из факторов, влияющих на живую массу и прироста ягнят является тип рождения. Одинцы по этим показателям превосходят аналогов, при расчете

на валовой прирост от одной овцематки превосходство имеют многоплодные типы рождения.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме АААА-А18-118021590132-9 «Исследование молекулярно-биологических и физиолого-эмбриологических аспектов биоинженерных технологий для совершенствования генетических ресурсов и создания новых селекционных форм сельскохозяйственных животных и птицы».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Обеспечение продовольственной безопасности Российской Федерации. / Аналитический вестник № 34 (633) 2016.
2. Роль животноводства в устойчивом развитии сельского хозяйства в интересах продовольственной безопасности и питания / Доклад Группы экспертов высокого уровня по вопросам продовольственной безопасности и питания Июль 2016 года. ФАО.
3. Отраслевая целевая программа "Развитие овцеводства и козоводства в Российской Федерации на 2012-2014 годы и на плановый период до 2020 года". Москва 2011.-33с.
4. Белогурова В.И., Ладыш И.А., Сметанкина В.Г. Адаптационные способности и хозяйственно-полезные признаки овец разных пород в условиях Донбасса. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения Заслуженного деятеля науки РФ, доктора сельскохозяйственных наук, профессора В.М. Куликова. главный редактор А.С. Овчинников. 2015. С.245-248
5. Вдовиченко Ю.В., Иовенко В.Н., Жарук П.Г., Кудрик Н.А., Жарук Л.В. Овцеводство Украины – проблемы, перспективы//Овцы, козы, шерстяное дело. – 2013. – №2. С. 75-82.
6. Косилов В.И., Газеев И.Р., Юлдашбаев Ю.А. Рост и развитие молодняка овец эдильбаевской породы/ Вестник БГАУ № 1 .2016. с.40-46.
7. Укбаев, Х.И. Атырауская порода курдючных овец смушково-мясо-сальной продуктивности // Овцы, козы и шерстяное дело. 2011. № 12. С. 5–7.
8. Галиева, З.А. Мясная продуктивность овец пород прекос и советский меринос разных сроков рождения// Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. 2014. № 1. С. 122–124.

DYNAMICS OF LIVE WEIGHT OF LAMBS DEPENDING ON THE TYPE OF THEIR BIRTH

Prytkov Y.A., Iolchiev B.S., Bagirov V.A., Volkova N.A.

Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst
142132 Moscow region, Podolsk, Dubrovicy, 60
E-mail: prytkov_y@mail.ru, tel.+74967651151

Abstract. *The aim of the work was to study the relationship between the lambs birth type with their live weight at birth and the dynamics of growth. The results of the study showed that in terms of live weight at 90 days of age singletons surpass twins by 14%, triplets by 30% and quadruples by 32% ($p < 0.05$).*

Keywords: *type of birth of lambs, Romanov breed, hybrids, live weight, growth, development.*

УДК 631.145+ 631.17

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКИ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ БЕСКОНТАКТНОГО ИЗМЕРЕНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Ручай А.Н., Дорофеев К.А., Колпаков В.И., Кобер В.И., Джуламанов К.М.

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН»
ул. 9 Января, д. 29, г. Оренбург, Оренбургская область, 460000
E-mail: ran@csu.ru

***Аннотация.** В статье представлена новая технология и разработана автоматизированная система экспертной оценки животных. Предлагаемая технология основана на методах бесконтактной трехмерной реконструкции модели животных с помощью камер глубины Kinect. В статье решены задача создания в режиме реального времени трехмерной модели крупного рогатого скота на основе мультисенсорных данных с разных камер глубины. Предлагаемая система трехмерной реконструкции коров позволяет проводить высокоточные трехмерные измерения животных. Кроме того, предлагаемая система способна точно прогнозировать живой вес крупного рогатого скота на основе полученных бесконтактных измерений.*

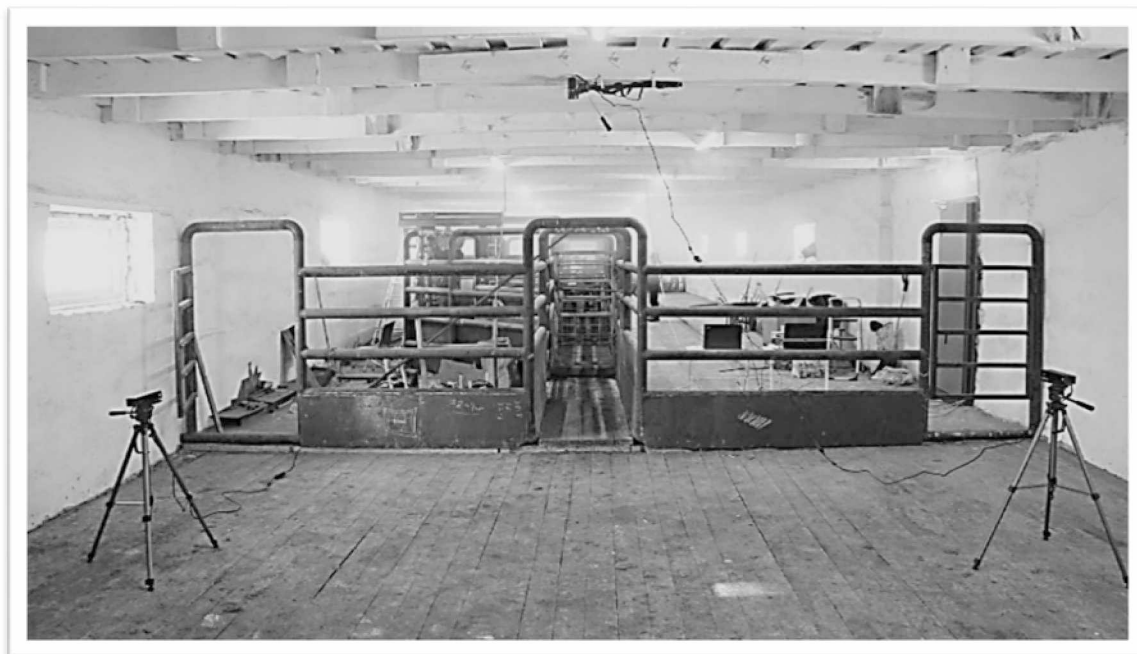
***Ключевые слова:** Животноводство, бонитировка, экстерьерная характеристика, конституция, живая масса скота, морфологические измерения, трехмерная форма тела.*

Введение. Развитие новых, быстрых и качественных методов экспертной оценки животных вызвано растущими потребностями народного хозяйства. Так для повышения производительности в сельском хозяйстве необходимы объективные и ежедневные оценки физиологического состояния и продуктивности животных на промышленных животноводческих комплексах. Учитывая трудоемкость и неточность традиционных методов экспертной оценки, разработка новых методов автоматической экспертной оценки животных с учетом современных высоких технологий является значимой научной и практически важной задачей. Перспективная технология экспертизы должна опираться на новые решения по бесконтактному измерению характеристик животного с последующей обработкой данных. Предлагаемый подход к разработке технологии экспертной оценки животных является принципиально новым, так как используются современные инженерные и научные достижения в области компьютерных наук и из процесса оценивания животных полностью исключается человеческий

фактор. Существующие системы бесконтактных измерений характеристик животных основаны на технологиях двадцатилетней давности и используют исключительно линейные характеристики для субъективной экспертной оценки. Разработанная технология позволит: сократить затраты времени на проведение ручной и субъективной бонитировки; исключить контактные измерения линейных промеров, живой массы и др.; оценить каждое животное с учетом всех прижизненных измерений морфологических характеристик по конституции и экстерьеру, породности и происхождению, продуктивности и развитию, качеству потомства и воспроизводительной способности; выполнить последующую обработку данных и сопоставление полученных материалов со вновь созданными базами данных, включающими результаты генетической экспертизы, оценки физиологического состояния и здоровья животных; применить методы анализа данных для постоянного мониторинга и прогнозирования роста сельскохозяйственных животных.

Материал и методика исследований. Для построения трехмерной модели животного рассматривались три варианта системы измерения: 1) несколько камер закреплены на платформе, движущейся по известной траектории вокруг объекта (точно известно положение камеры и упрощенная схема работы всех алгоритмических компонент системы, сложно зафиксировать животное) [1]; 2) камера находится в руках человека, который обходит объект (реальная ситуация измерения в поле, сложно зафиксировать животное) [2, 3]; 3) несколько камер одновременно фиксируют животное, проходящее через ворота (ситуация измерения в комнате, фиксация животного не требуется) [4, 5].

Мы используем три камеры глубины Kinect для одновременной



съемки животных, камеры закреплены на штативах на выходе из станка. Предложенная система решает проблему измерения движущихся животных, так как сложно зафиксировать животное, пока происходит одновременная съемка камерами с разных сторон. Сцена измерения показана на рис. 1. Камеры Kinect расположены справа и слева на расстоянии 2 метра от животного, а третья камера Kinect расположена над животным на высоте 3 метра.

Рисунок 1. Сцена измерения с тремя камерами Kinect

Все эксперименты проводились над 20 коровами породы Герефорд. Было проведено 17 ручных промеров: высота в холке, высота в спине, высота в пояснице, высота в крестце, высота в седалищных буграх, глубина груди, косая длина туловища, прямая длина туловища, боковая длина зада, ширина груди, ширина поясницы, ширина спины, ширина зада в тазобедренном сочленении, ширина зада в седалищных буграх, обхват груди, обхват пясти, полуобхват зада.

Результаты исследований и их обсуждение. Полученные измерения из 3D-модели крупного рогатого скота немного отличаются от соответствующих реальных измерений (табл. 1). Средняя ошибка измерений составила 3,6%. Наибольшая средняя ошибка (14,6%) была получена при измерении ширины груди. Наименьшая средняя ошибка (2,3%) была по-

лучена при измерении высоты в спине.

Экспериментальные результаты показывают высокую точность предлагаемой системы, однако полученные результаты имеют большую ошибку для некоторых промеров. Одной из причин ошибки является то, что во время ручного измерения бонитер прижимает шерсть животного. Также большие ошибки в измерениях можно обосновать движением модели, при этом бонитер измеряет статично стоящее животное. В предложенной системе съемка происходит движущихся животных, что приводит к большой ошибке в измерениях груди и бедра из-за наклона и подвижных суставов животного.

Таблица 1. Результаты измерений с использованием предложенной системы для автоматического трехмерного измерения коров

Промеры	Реальное (см)	Система (см)	Средняя ошибка (%)
Высота в холке	130	135	3.8
Высота в спине	131	134	2.3
Высота в пояснице	137	141	2.9
Высота в крестце	134	141	5.2
Высота в седалищных буграх	123	123	0.0
Глубина груди	72	76	5.6
Косая длина туловища	173	174	0.6
Прямая длина туловища	150	153	2.0
Боковая длина зада	53	50	5.7
Ширина груди	48	55	14.6
Ширина поясницы	61	65	6.6
Ширина спины	58	61	5.2
Ширина зада в тазобедр. сочленении	55	59	7.3
Ширина зада в седалищных буграх	33	34	3.0
Обхват груди	224	230	2.7
Обхват пясти	21	21	0.0
Полуобхват зада	52	55	5.8

Эксперимент показал, что предложенная система для реконструкции трехмерных объектов способна построить точную трехмерную модель ко-

ровы с низкой ошибкой по сравнению с другими предложенными системами [1-6].

Мы провели эксперименты по прогнозированию живой массы (LW) крупного рогатого скота на основе измерений обхвата в груди (HG) и высоты в крестце (HW). Двадцать коров были взвешены (кг), и были измерены их HG (см) и HW (см). Было рассмотрено три метода оценки веса крупного рогатого скота [6]. Был выбран самый точный метод для прогнозирования LW на основе уравнения регрессии [6]:

$$LW = 4.08 \cdot HG + 1.61 \cdot HW + 1.42 \cdot Age - 520.9$$

Точность данного метода для прогнозирования LW составляет 99-100% от их истинного живого веса со среднеквадратичной ошибкой в 3 кг или 0,5% от среднего LW. Эксперимент показал, что предлагаемая система способна точно прогнозировать живой вес крупного рогатого скота на основе полученных бесконтактных измерений.

Заключение. В этой статье мы разработали систему автоматического измерения морфологических характеристик крупного рогатого скота по трехмерной модели с точностью, превышающей существующие предложенные системы. Полученную трехмерную форму животного использовали для автоматической и точной оценки промеров тела животных и для прогнозирования массы тела крупного рогатого скота. Эксперимент показал, что предлагаемая система для восстановления 3D формы живого скота с помощью трех камер глубины является точной. Также предложенная система способна точно прогнозировать живой вес крупного рогатого скота. Предложенная система является более объективной и точной по сравнению с визуальной оценкой.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xiang Y, Nakamura S, Tamari H, Takano S and Okada Y 2016 3d model generation of cattle by shape-from-silhouette method for ict agriculture 2016 10th International Conference on Complex, Intelligent, and Software Intensive Systems (CISIS) pp 611-616.
2. Kuzuhara Y, Kawamura K, Yoshitoshi R, Tamaki T, Sugai S, Ikegami M, Kurokawa Y, Obitsu T, Okita M, Sugino T and Yasuda T 2015 A preliminarily study for predicting body weight and milk properties in lactating holstein cows using a three-dimensional camera system Computers and Electronics in Agriculture 111 186-193.
3. Guo H, Ma X, Ma Q, Wang K, Su W and Zhu D 2017 Lssa cau: An interactive 3d point clouds analysis software for body measurement of livestock with similar forms of cows or pigs Computers and Electronics in Agriculture 138 60-68.
4. Viazzi S, Bahr C, Hertem T V, Schlageter-Tello A, Romanini C, Halachmi I, Lokhorst C

and Berckmans D 2014 Comparison of a three-dimensional and two-dimensional camera system for automated measurement of back posture in dairy cows Computers and Electronics in Agriculture 100 139-147.

5. Hertem T V, Tello A S, Viazzi S, Steensels M, Bahr C, Romanini C E B, Lokhorst K, Maltz E, Halachmi I and Berckmans D 2018 Implementation of an automatic 3d vision monitor for dairy cow locomotion in a commercial farm Biosystems Engineering 173 166-175.

6. Tebug S F, Missohou A, Sabi S S, Juga J, Poole E J, Tapio M and Marshall K 2018 Using body measurements to estimate live weight of dairy cattle in low-input systems in Senegal Journal of Applied Animal Research 46 87-93.

DESIGN OF EXPERT ASSESSMENT TECHNOLOGY FOR ANIMALS BASED ON NON-CONTACT MEASUREMENT OF THREE-DIMENSIONAL MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS

Ruchay A.N., Dorofeev K.A., Kolpakov V.I., Kober V.I., Dzhulamanov K.M.

FSSI «Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the RAS»
St. January 9, 29, Orenburg, Orenburg Region, 460000
E-mail: ran@csu.ru

Abstract. *The article presents a new technology and develops an automated expert assessment system for animals. The proposed technology is based on contactless three-dimensional reconstruction of animal models using Kinect depth cameras. The article solves the problem of creating in real time a three-dimensional model of cattle based on multisensor data from different depth cameras. The proposed system of three-dimensional reconstruction of cows allows for high-precision three-dimensional measurements of animals. In addition, the proposed system is able to predict live weight of cattle accurately based on the obtained contactless measurements.*

Keywords: *animal husbandry, animal expert evaluation, exterior characteristics, body composition, live weight of cattle, morphological measurements, three-dimensional body shape.*

УДК 638.145.43

ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Сайфутдинова З.Н.¹, Гулов А.Н.²

¹ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, ул. Рязанский пр-т, 24, к. 1, г. Москва, РФ, 109428

²ФГБНУ ФНЦ пчеловодства, ул. Почтовая, 22, г. Рыбное, Рязанская обл., РФ, 391110.
E-mail: zsaifutdin@yandex.ru

Аннотация. Биотехнологические методы искусственного осеменения маток и криоконсервации спермы трутней в жидком азоте позволяют сохранить генофонд исчезающих аборигенных пород медоносных пчел. Использование этих методов дает возможность избежать полиандрии и проводить контролируемое спаривание в селекционно-генетических исследованиях. Получение культуры клеток медоносных пчел перспективно для более углубленного изучения взаимодействия с внутриклеточными инфекционными агентами, геномных и эпигеномных механизмов изменчивости этого уникального объекта.

Ключевые слова: медоносная пчела, генетические ресурсы, биотехнологические методы, искусственное осеменение, криоконсервация спермы трутней, культура клеток.

Введение. Сохранение генетических ресурсов медоносных пчел (*Apis mellifera*), является актуальной проблемой в связи с нарастающим экологическим кризисом. К началу 21-го века ситуация в пчеловодстве резко ухудшилась и появилась настоятельная необходимость использования биотехнологических методов сохранения генофонда медоносных пчел. Главной причиной этого послужило повсеместное явление, названное коллапсом пчелиных семей, вызванное комплексом негативных, до конца пока невыясненных экологических факторов. Кроме того, в биологии развития медоносной пчелы имеются видовые особенности, осложняющие проведение селекционно-генетических работ в пчеловодстве и мероприятий по сохранению их генофонда. К основным проблемам сохранения генетических ресурсов относятся биологические особенности репродукции медоносных пчел:

1. Невозможность контроля оплодотворения маток, так как их спаривание с трутнями происходит в полете на высоте свыше 10 м. За время брачного полета матка оплодотворяется примерно десятью трутнями (полиандрия), неизвестного происхождения;

2. Недостаточное количество половозрелых трутней весной, когда необходимо получение ранних плодных маток, к тому же срок их развития от яйца до имаго продолжительнее на неделю по сравнению с маткой.

3. Гибель трутней после оплодотворения, т.е. их генетический материал в естественных условиях можно использовать только один раз, в отличие от других сельскохозяйственных животных.

В последние годы нарастает необходимость в наличии надежного метода получения культур клеток медоносных пчел. Отсутствие постоянных иммортизированных линий клеток медоносных пчел, является главным ограничивающим фактором многих исследований по физиологии, ге-

нетике и инфекционным заболеваниями, что в результате отражается на сохранении генетических ресурсов этого вида.

Цель работы – разработать и оптимизировать биотехнологические методы: искусственное осеменение маток, консервацию спермы трутней и получение культур клеток из различных тканей - для решения проблем сохранения генетических ресурсов медоносных пчел.

Материалы и методика исследований. Работы проводились на медоносной пчеле породного типа «Приокский» среднерусской породы экспериментальной пасеки НИИП. Отбор спермы проводили на оборудовании SCHLEY-System модель 1.04 (A&G Wachholz, Espelkamp Deutschland) методом искусственной стимуляции выворачивания эндофаллоса у половозрелых трутней. Сперма трутней на длительное хранение в жидком азоте помещалась в криобанки НИИ коневодства и ВИЭВ. Получение культур клеток проводилось в отделе клеточной биотехнологии ВИЭВ с использованием среды Какпакова С46.

Результаты исследований и их обсуждение. Метод инструментального осеменения позволяет подбирать производителей и получать потомство с желаемым генотипом, его применение позволило существенно увеличить разрешающую способность генетического анализа у медоносных пчел и сделать его более доступным [1, 2]. В наших опытах были оптимизированы способы отбора спермы трутней и метод репродукции женских и мужских особей: трутни и матки выращивались в одной и той же семье – воспитательнице. Обнаружено, что при таких условиях выращенные матки и трутни оказались крупнее [3], и достоверно отличались по весу от контрольной группы, воспитанных в разных пчелиных семьях. Это позволяет снять влияние различных семей-воспитательниц на генотип потомства.

Криоконсервация спермы животных довольно широко применяется в практике их разведения, воспроизводства и сохранения, однако этого нельзя сказать в отношении такого объекта как медоносная пчела. В наших опытах криоконсервация спермы трутней проводилась по модернизированной методике, разработанной ранее Какпаковым с соавторами [4], и полученному ими патенту (№2173045 от 10.09.2001). По этой методике в криобанки Всероссийского института коневодства и Всероссийского ин-

ститута экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ), начиная с 1993 года, заложены образцы спермы трутней с пасек Рязанской, Тверской, Московской областей, Татарстана, Башкортостана, Башкирской опытной станции пчеловодства и с «Царской пасеки» Измайловского парка г. Москвы.

Метод криоконсервации усовершенствован в связи с необходимостью унификации отдельных этапов: отбора, хранения, оттаивания, оценки качества и введения спермы трутней в матку. Сперма отбирается в капилляр, соединенный со шприцем в приборе искусственного осеменения пчелиных маток или в специальном приборе для набора спермы. Капилляр со спермой запаивается с двух сторон, маркируется и закладывается в стерильные криопробирки, в которых транспортируется. Для хранения в жидком азоте сперма разбавляется питательной средой С46 с добавлением криопротектора (ДМСО) и фетальной телячьей сывороткой (ФТС) в определенном соотношении.

Важным моментом является оценка влияния условий криохранения спермы на ее жизнеспособность и оплодотворяющую способность. Показано, что жизнеспособность спермы после 5-ти, 10-ти и 25-ти лет хранения в жидком азоте остается достаточно высокой около 80-90%, и не зависит от длительности криохранения [5, 6]. Однако оплодотворяющая способность этих доз спермы оказалась низкой, количество печатного расплода рабочих пчел от маток, осемененных оттаянной спермой, составило менее 50%. Ведутся дальнейшие исследования по криоконсервации спермы трутней.

Получение культур клеток - современный метод клеточной биотехнологии, широко развиваемое направление исследований. Считается, что наличие культур клеток объекта определяет высокий уровень исследований биологии и генетики этого вида. К настоящему времени разработаны более 500 непрерывных линий насекомых, к сожалению, среди них нет культуры клеток пчел. В нашей стране начало отработки криобиологической технологии хранения культур клеток, а затем и репродуктивных клеток насекомых в жидком азоте было положено в 1967 году с целью сохранения и развития первой в мире линии эмбриональных клеток *Drosophila melanogaster* 67j25D [7]. Наступило время безотлагательного применения этих методов для сохранения генетических ресурсов медоносных пчел

России. Геномный криобанк репродуктивных и соматических клеток медоносных пчел необходим в решении различных проблем сохранения генетических ресурсов: последствий метизации пчел, сохранения биоразнообразия медоносных пчел, борьбы с внутриклеточными паразитами и вирусными болезнями, оценки качества продукции пчеловодства и состояния окружающей среды. Исследования по культивированию тканей имаго рабочих пчёл были начаты в семидесятые годы прошлого столетия сотрудниками Всероссийского института экспериментальной ветеринарии - ВИЭВ [8]. Были предприняты попытки культивирования различных тканей имаго рабочих пчёл: слюнные железы, мышечная ткань, гемоциты, ткань средней кишки. В настоящее время эти работы по получению культур клеток продолжены, получена первичная культура клеток из яичников пчелиных маток [9] и непостоянные линии клеток из различных тканей рабочих пчел, которые перевивались до 4-го пассажа. Монослой был представлен клетками различных размеров во всех клеточных культурах, что согласуется с сообщениями других авторов по первичным и непостоянным клеточным культурам медоносных пчел. Эти культуры сохраняли свою жизнеспособность в течение месяца. Впервые клетки имаго пчелы медоносной выживали в культуре в течение четырех пассажей.

Заключение. Таким образом, комплексное использование биотехнологических методов искусственного осеменения пчелиных маток и криоконсервации спермы трутней в целях сохранения генофонда и управления генетическими ресурсами среднерусской пчелы показал, что необходима дальнейшая разработка условий сбора, хранения, оттаивания и оценки качества репродуктивных клеток. Опыт получения первичных и долговременных клеточных культур особенно ценен в изучении болезней медоносной пчелы, для проведения исследований по генетике, и создания геномного криобанка репродуктивных и соматических клеток этого уникального объекта. Применение биотехнологических методов в пчеловодстве обеспечивает подходы к выработке оптимальной стратегии сохранения, разведения и воспроизводства пчел.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тряско В.В. Естественный партеногенез у медоносной пчелы//XX юбилейный межд. конгресс по пчеловодству. М.-1969. 356-361.

2. Бородачев А. В., Бородачева В.Т. Инструментальное осеменение маток //Пчеловодство-1990. 9: 12-13.
3. Гулов А.Н., Бородачев А. В., Березин А.С. Возраст трутней и качество спермы//Пчеловодство-2015. 9:24-27.
4. Какпаков В.Т., Кабашова О.В., Бородачев А.В., Какпакова Е.С. Криобанк спермы трутней медон-й пчелы // Пчеловодство1993. 8: 4-6.
5. Сайфутдинова З.Н. Опыт применения криоконсервации спермы трутней в сохранении генетических ресурсов медоносной пчелы // Материалы международной конференции «Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы» Пушкино 28-30 октября 2014, С. 177-179.
6. Гулов А.Н. Воспроизводительные способности инструментально осемененных маток//Пчеловодство-2018. 4:13-15.
7. Какпаков В.Т. Получение и характеристика культур соматических клеток дрозофилы//Докт. дисс. М.-1989.
8. Гробов О.Ф., Зюман Б.В. Керимбаев А.К. Использование культуры ткани медоносной пчелы в изучении возбудителей её заболеваний// Труды 23 Междунар. Конф. по пчеловодству М. 1971, стр. 507-510
9. Васильев В.А. Разработка условий и метода получения культур клеток медоносных пчел//Труды ВИЭВ-2015. т.78:109-115.

GENETIC RESOURCES OF HONEYBEES PROBLEMS OF CONSERVATION AND BIOTECHNOLOGICAL WAYS OF THEIR SOLUTION

Sayfutdinova Z.N.¹, Gulov A.N.²

¹FSBSI FSC VIEV, Ryazansky prospect, 24, b. 1, Moscow, 109428 Russia.

²FSBSI FBC, Pochtovaya st., 22, Rybное, Ryazan region, 391110 Russia.

E-mail: zsaifutdin@yandex.ru

Abstract. *Biotechnological methods of artificial insemination of Queens and cryopreservation of drone sperm in liquid nitrogen allow preserving the gene pool of endangered native breeds of honeybees. The use of these methods makes it possible to avoid polyandry and conduct controlled mating in breeding and genetic studies. Obtaining a culture of honeybee cells is promising for a more in-depth study of the interaction with intracellular infectious agents, genomic and epigenomic mechanisms of variability of this unique object.*

Keywords: *honeybee, genetic resources, biotechnological methods, instrumental insemination, cryopreservation of drone sperm, cell culture.*

УДК 575.224.22

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ MYOD1 И MSTN С МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ У ОВЕЦ ПОРОДЫ МАНЫЧСКИЙ МЕРИНОС

Сафарян Е.Ю., Яцык О.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр», ул. Никонова, д. 49, г. Михайловск, Ставропольский край, Россия, 356241
E-mail: telegina.helen@yandex.ru

Аннотация. Целью исследования явилось выявление однонуклеотидных замен, связанных с мясной продуктивностью по генам *MSTN*, *MyoD1*. Объектом исследования служили баранчики в возрасте одного года ($n=15$). Секвенирование осуществляли с использованием геномного секвенатора *GS Junior* (Roche, USA). Полученные в результате секвенирования фрагменты картировали на референсный геном *Ovis aries* сборка *Oar_rambouillet_v1.0* (National Center for Biotechnology Information, 2017) с помощью программного обеспечения *GS Reference Mapper v2.9* (Roche, USA). В ходе исследования в области гена *MSTN* обнаружено 26 однонуклеотидных замен, две из которых ассоциированы с мясной продуктивностью (с.-1404A>T, с.373+243G>A). В области гена *MyoD1* обнаружено 39 замен, с показателями мясной продуктивности связаны три (с.-1235G>A, с.*442C>T и с.*473G>T). Лучшими показателями мясной продуктивности обладают баранчики, несущие мутантный аллель с. 1235A и аллели дикого типа с.*442C, с.*473G, с.-1404A и с.373+243G в гомозиготном состоянии. В качестве маркерных аллелей-кандидатов мясной продуктивности рекомендуется использовать аллели с.-1235A, с.*442C и с.*473G, с.-1404A и с.373+243G.

Ключевые слова: *MSTN*, *MyoD1*, маньчжурский мерин, мясная продуктивность, SNP, аллель, секвенирование.

Введение. Ставропольский край исторически является центром российского тонкорунного овцеводства. Однако, в настоящее время ситуация на рынке сложилась так, что баранина востребована больше чем шерсть [2].

В связи с этим, одним из перспективных направлений в овцеводстве на сегодняшний день является получение пород, сочетающих высокую мясную и шерстную продуктивность. Одним из современных методов в животноводстве является маркер-ассоциированная селекция, с ее помощью можно вести отбор по генотипу используя ДНК – маркеры, тесно сцепленных с геном [5].

Наиболее перспективными маркерными генами для оценки и прогнозирования мясной продуктивности являются ген миостатина (*MSTN*) и ген миогенной дифференцировки-1 (*MyoD1*), напрямую влияющие на рост и развитие мышечной ткани. Фактор *MyoD1* активирует пролиферацию и дифференцировку мышечных клеток, миостатин напротив – ингибирует [1; 3; 4; 5; 6; 7].

В связи с этим, целью нашего исследования явилось выявление однонуклеотидных замен в генах *MSTN*, *MyoD1*, связанных с мясной про-

дуктивностью у овец тонкорунной породы манычский меринос, созданной на территории Ставропольского края.

Материал и методика. Исследование было проведено на базе ВНИИОК – филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ» и ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». Объектом исследования служили баранчики ($n=15$) в возрасте одного года породы Манычский меринос из Колхоза-племзавода «Россия» Апанасенковского района. У всех животных выполняли комплекс измерений наружных промеров и убойных показателей. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. Все животные были здоровыми, содержались в оптимальных условиях и получали полноценный рацион питания. Геномную ДНК выделяли из образцов крови, полученных из яремной вены в асептических условиях. ДНК выделяли из 0,2 мл крови с использованием набора PureLink Genomic DNA MiniKit (Invitrogen, USA). С целью выявления мутаций в генах проводили целевое обогащение и последующее секвенирование исследуемых фрагментов ДНК. Для обогащения целевых регионов использовали технологию NimbleGen (Roche, USA). Библиотеки фрагментов ДНК исследуемых животных, подготовленные в соответствии с протоколом Rapid Library Preparation Method Manual, подвергали процедуре обогащения с использованием зондов NimbleGen SeqCap EZ Developer Libraries в соответствии с протоколом производителя (Roche, USA). Секвенирование осуществляли с использованием геномного секвенатора GS Junior (Roche, USA). Полученные в результате секвенирования фрагменты картировали на референсный геном *Ovis aries* сборка Oar_rambouillet_v1.0 (National Center for Biotechnology Information, 2017) с помощью программного обеспечения GS Reference Mapper v2.9 (Roche, USA). Для описания обнаруженных однонуклеотидных замен (SNP) использовалась номенклатура HGVS (Human Genome Variation Society). Для статистического анализа использовали двусторонний t-критерий Стьюдента в программе Microsoft Excel для Windows.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе исследования в области гена MSTN у овец породы манычский меринос обнаружено 26 однонуклеотидных замен, две из которых ассоциированы с мясной продуктивностью (с.-1404A>T, с.373+243G>A). Замена с. 1404A>T располо-

жена в 5'-фланкирующей области, с.373+243G>A – в области первого интрона. В области гена MyoD1 обнаружено 39 замен, с показателями мясной продуктивности связаны три (с.-1235G>A, с.*442C>T и с.*473G>T). Замена с.-1235G>A расположена в 5'-фланкирующей области гена MyoD1, мутации с.*442C>T и с.*473G>T – в 3'UTR нетранслируемой области.

В ходе сравнительного анализа показателей мясной продуктивности баранчиков с различными аллелями генов MyoD1, MSTN выявлены достоверные различия по 18 убойным показателям. В таблице 1 приведена обобщающая информация о желательных генотипах и некоторых продуктивных преимуществах их носителей.

Таблица 1. Разница в показателях мясной продуктивности между баранчиками различных генотипов по генам MyoD1, MSTN

Ген	Желательный генотип	Нежелательные аллели	Показатель, кг	Преимущество баранчиков желательного генотипа над носителями нежелательных аллелей, %	P
MyoD1	с.-1235AA	с.-1235G	Предубойная живая масса	9,0	0,01
			Масса парной туши	11,0	0,05
			Абсолютная масса мякоти	15,0	0,03
	с.*442CC с.*473GG	с.*442T с.*473T	Предубойная живая масса	6,5	0,02
			Масса парной туши	6,6	0,03
			Абсолютная масса мякоти	8,3	0,04
MSTN	с.-1404AA с.373+243GG	с.-1404T с.373+243A	Предубойная живая масса	9,6	<0,01
			Масса парной туши	9,4	0,01
			Абсолютная масса мякоти	12,4	0,02

По данным таблицы видно, что лучшими показателями мясной продуктивности обладают баранчики, несущие мутантный аллель с. 1235A и

аллели дикого типа с.*442С, с.*473G, с.-1404А и с.373+243G в гомозиготном состоянии.

Заключение. В ходе проведенной работы установлено, что желательными аллелями гена миостатина являются с.-1404А и с.373+243G. Желательными аллелями гена MyoD1 являются с.-1235А, с.*442С, и с.*473G. Таким образом, в качестве маркерных аллелей-кандидатов мясной продуктивности рекомендуется использовать аллели с.-1235А, с.*442С и с.*473G, с.-1404А и с.373+243G. Однако, полученные результаты требуют проверки на большой группе животных с целью уточнения влияния этих аллельных вариантов на продуктивные качества.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трухачев, В.И. Генетические маркеры мясной продуктивности овец / В.И. Трухачев, М.И. Селионова, А.Ю. Криворучко, А.М.М. Айбазов // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – №6. – С. 1107–1119.
2. Ульянов, А.Н. Повышение мясной и шерстной продуктивности – неотложные проблемы овцеводства России / А.Н. Ульянов, А.Я. Куликова // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2013. – №2. – С. 19–24.
3. Bogdanovich, S. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade / S. Bogdanovich, T.O. Krag, E.R. Barton, L.D. Morris et al. // Nature. – 2002. – V. 420. – № 14. – P. 418–421.
4. Deng, B. Functional analysis of pig myostatin gene promoter with some adipogenesis- and myogenesis-related factors / B. Deng, J. Wen, Y. Ding, Q. Gao et al. // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2012. – V. 363. – № 2. – P. 291–299.
5. Du, R. Functional analysis of the Myostatin gene promoter in sheep / R. Du, X. An, Y. Chen, J. Qin // Science in China Press. – 2007. – V. 50. – № 5. – P. 648–654.
6. Goddard M.E. Genomic selection / M.E. Goddard, B.J. Hayes // J. Anim. Breed. Genet. – 2007. № 124. – P. 323–330.
7. Paweł, U. New SNPs in the coding and 5' flanking regions of porcine MYOD1 (MYF3) and MYF5 genes. / U. Paweł, K. Jolanta // Journal of applied genetics. – 2004. – V. 45. – № 3. – P. 325–329.
8. Thomas, M. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation / M. Thomas, B. Langley, C. Berry et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – V. 275. – № 51. – P. 40235–40243.

THE RELATIONSHIP OF GENE POLYMORPHISM OF MSTN, MYOD1 AND MEAT PRODUCTIVITY OF SHEEP BREEDS IN THE MANYCH MERINO

Safaryan E.Y., Yatsyk O.A.

All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the North Caucasus Federal Scientific Agricultural Center, Nikonov, 49, Mikhailovsk, Stavropol territory, Russia, 356241
E-mail: telegina.helen@yandex.ru

Abstract. The aim of the study was to identify single-nucleotide substitutions associated with meat productivity by genes MSTN, MyoD1. We have investigated 15 rams (n=15) at the age of one

year. Sequencing was performed using a genomic sequencer GS Junior (Roche, USA). The sequencing fragments were mapped to the *Ovis aries* reference genome Assembly Oar_rambouillet_v1.0 (National Center for Biotechnology Information, 2017) using GS Reference Mapper v2.9 software (Roche, USA). A study of the *MSTN* gene revealed 26 single-nucleotide substitutions, two of which are associated with meat productivity (c.-1404A>T, c.373+243G>A). In the *MyoD1* gene region, 39 substitutions were found, three (c.-1235G>A, p.*442C>T, and p.*473G>T) were associated with meat productivity. The best indicators of meat productivity have rams carrying a mutant allele of S. 1235A and alleles the wild-type c.*442C, c.*473G, c.-1404A and c.373+243G in the homozygous state. It is recommended to use alleles C.-1235A, c.*442C and c.*473G, c.-1404A and c.373+243G as marker alleles-candidates of meat productivity.

Keywords: *MSTN*, *MyoD1*, manychsky merino, meat productivity, SNP, allele, sequencing.

УДК 636.22/.28.082.2

ОЦЕНКА СЕЛЕКЦИОННОЙ ПЕРСПЕКТИВНОСТИ МОЛОДНЯКА КАЗАХСКОЙ БЕЛОГОЛОВОЙ ПОРОДЫ НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И БИОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Селионова М.И., Чижова Л.Н., Суржикова Е.С., Плахтюкова В.Р., Шарко Г.Н.

ФГБНУ "Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр", г. Михайловск
E-mail: m_selin@mail.ru

Аннотация. Настоящие исследования направлены на поиск и выявление генетических маркеров, биохимических тест-систем взаимосвязанных с показателями продуктивности разных генотипов молодняка казахской белоголовой породы. Выявлены индивидуальные особенности полиморфизма генов (*CAPN1*, *TG5*, *LEP*, *GH*), контролирующих мясную продуктивность, выразившиеся в специфичности аллельного спектра, частоте встречаемости генотипов в исследуемой популяции мясного скота. Установлено, что доля особо ценных генотипов, включающих 8 маркерных аллелей четырёх генов (*CAPN1*^{CC}, *TG5*^{TT}, *LEP*^{TT}, *GH*^{VV}) составляет 1,8; из 6-ти маркерных аллелей трех генов (*GH*^{VV}, *TG5*^{TT}, *LEP*^{TT}) – 12,4; из 4-х маркерных аллелей двух генов (*TG5*^{TT}, *GH*^{VV}) – 53,5%. Для оценки характера изменений, происходящих в организме, рассмотрены интегральные показатели, отображающие степень биосинтеза жирных кислот липидов крови молодняка разных генотипов казахской белоголовой породы: ИНЛ – индекс насыщенности липидов, ИИОЛ – индекс интенсивности обмена липидов, КЭМ – коэффициент эффективности метаболизации эссенциальных жирных кислот. Выявлена устойчивая коррелятивная связь интегральных показателей (ИИОЛ, КЭМ) с живой массой и среднесуточными приростами, составили: 0,26; 0,30; 0,23; 0,32; 0,26; 0,33; 0,28 гомозиготных *CAPN1*^{CC}, *TG5*^{TT}, *GH*^{VV}, *LEP*^{TT}, против 0,21; 0,22; 0,18; 0,26; 0,19; 0,26; 0,20; 0,25 – альтернативных *CAPN1*^{GG}, *TG5*^{CC}, *LEP*^{CC}, *GH*^{LL} вариантов. Полученные данные их анализ свидетельствует о том, что комплексная система способствует оптимизации сроков прижизненной оценки, прогноза генетического потенциала мясного скота в раннем возрасте.

Ключевые слова: полиморфизм, метаболизм, липиды, мясной скот.

Введение. Генетическое совершенствование разводимых пород крупного рогатого скота на основе выявления лучших генотипов и их максимального использования в селекции, является важнейшей задачей племенного животноводства. Благодаря успехам, достигнутым в кариотипировании, расшифровке генома сельскохозяйственных животных постоянно увеличивается объем знаний о генах, их полиморфных вариантах, участвующих в формировании хозяйственно-полезных признаков. Это позволяет выявлять предрасположенность животных к высокой продуктивности не только по фенотипу, но и по их генетическим характеристикам в раннем возрасте [1,2,3]. Поскольку, в процессе индивидуального развития животного организма задействована целая цепь метаболических преобразований, то биохимические параметры являются важнейшим звеном в выявлении особенностей формирования количественных, качественных показателей продуктивности. В частности, липидам, являющимся концентрированным источником энергии, входящим в состав многих активных веществ, отводится большая роль в регуляции интенсивности биохимических процессов [4,5,6]. Такие показатели, как индекс насыщенности липидов (ИНЛ), индекс интенсивности обмена липидов (ИИОЛ), коэффициент эффективности метаболизации эссенциальных жирных кислот (КЭМ) могут быть использованы в качестве оценочных критериев интенсивности липогенеза, эффективности вовлечения жирных кислот в метаболические процессы [7]. Такой подход дает возможность в многократно ускорить формирование массива племенных животных, отвечающего требованиям селекции. Что является особо актуальным в ускорении процесса создания отрасли специализированного мясного скотоводства и получения высококачественной говядины. Вышеизложенное предопределило **цель** настоящих исследований - изучение и выявление особенностей метаболизма жирных кислот липидов крови молодняка разных генотипов казахской белоголовой породы.

Материалы и методы исследований. Экспериментальная работа выполнялась на молодняке (бычки n=128) казахской белоголовой породы. Для генотипирования использовалась ДНК, выделенная из крови опытных животных с использованием набора реагентов «DIAtomtmDNAPrep» (IsoGeneLab, Москва). Полиморфизм генов TG5, LEP, GH изучался на ос-

нове ПЦР-ПДРФ с последующим рестрикционным анализом. На основе ПЦР-РВ с применением аллель-специфичных зондов для определения одной бинарной SNP-мутаций С316G гена, изучен полиморфизм гена кальпаин - CAPN1.

Анализ содержания жирных кислот проводили методом газожидкостной хроматографии в виде метиловых эфиров на газовом хроматографе «Кристалл - 200» с капиллярной колонкой HP-FFAP 50 m 0,32 mm 0,5 μ m (США), метилирование методом Моррисона и Смита. Использовался программный комплекс «Хроматэк Аналитик», предназначенный для управления, сбора и обработки хроматографической информации компьютером. В качестве расчетных (интегральных) показателей, характеризующих интенсивность и направленность липидного обмена, использовались такие константы как индекс насыщенности липидов (ИНЛ) – отношение суммы (Σ) насыщенных к сумме (Σ) ненасыщенных [8], индекс интенсивности обмена липидов (ИИОЛ) – отношение количества пальмитиновой ($C_{16:0}$) кислоты к количеству олеиновой ($C_{18:1}$) [9], коэффициент эффективности метаболизации эссенциальных жирных кислот (КЭМ) – отношение количества арахидоновой ($C_{20:4}$) к сумме всех других полиненасыщенных жирных кислот с углеродной цепью от 20 до 22 атомов углерода [10].

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ результатов генотипирования молодняка казахской белоголовой породы свидетельствует об особенностях полиморфизма аллельного профиля генов CAPN1, TG5, LEP, GH, контролирующих мясную продуктивность, выразившегося в значительной вариабельности частоты встречаемости как аллелей, так и генотипов. Частота встречаемости аллелей С и G гена CAPN1 составила 0,12 и 0,88, генотипов CC, GG, CG, соответственно – 0,06; 0,81; 0,13; аллелей Т и С гена TG5 – 0,21 и 0,79, генотипов TT, TC, CC – 0,06; 0,64; 0,30, соответственно; аллелей С и Т гена LEP 0,75 и 0,25, генотипов CC, TT, CT – 0,59; 0,10; 0,31; аллелей V и L гена GH – 0,40 и 0,60, генотипов VV, LL, LV – 0,31, 0,51, 0,18, соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Полиморфизм генов CAPN1, TG5, LEP, GH

По- ка- за- тел ь	CAPN1	TG5	LEP	GH
	генотип/	генотип/	генотип/	генотип/

	аллель			аллель			аллель			аллель		
	CC/C	CG	GG/G	TT/T	TC	CC/C	CC/C	TC	TT/T	VV/V	LV	LL/L
Частота аллеля	0,12		0,88	0,21		0,79	0,75		0,25	0,40		0,60
Частота генотипов	0,06	0,13	0,81	0,06	0,30	0,64	0,59	0,31	0,10	0,31	0,18	0,51
Частота генотипов, %	6,0	13,0	81,0	6,0	30,0	64,0	59,0	31,0	10,0	31,0	18,0	51,0

Методами генетико-статистического анализа выявлено: доля животных носителей желательного генотипа, включающего 8 маркерных аллелей четырех генов ($CAPN1^{CC}TG5^{TT}LEP^{TT}GH^{VV}$) составила 1,8 %, из 6-ти маркерных аллелей трех генов ($GH^{VV}TG5^{TT}LEP^{TT}$) - 12,4 %, из 4-х маркерных аллелей двух генов – 53,5 % (табл.2).

Таблица 2. Частота встречаемости селекционно-значимых генотипов

Желательные генотипы	Число генов/аллелей	Частота встречаемости, %
$CAPN1^{CC}TG5^{TT}LEP^{TT}GH^{VV}$	4/8	2,8
$GH^{VV}TG5^{TT}LEP^{TT}$	3/6	12,4
$TG5^{TT}GH^{VV}$	2/4	53,5

Анализ хроматограмм свидетельствует об однонаправленности популяции молодняка мясного скота разных генотипов. Однако, более высокая их интенсивность была характерна для генотипов $CAPN1^{CC}TG5^{TT}LEP^{TT}GH^{VV}$, что нашло отражение в более высоких цифровых значениях ИИОЛ и КЭМ, в среднем на 13,4 и 21,2 % ($P > 0,01$; $P > 0,001$) (табл. 3).

Таблица 3. Интегральные показатели интенсивности липидного обмена бычков разных генотипов

Ген / Генотип		Сумма жирных кислот, %		ИНЛ	ИИОЛ	КЭМ
		насыщенные	ненасыщенные			
CAPN1	CC	47,51	42,43	1,12	1,58***	0,25***
	GG	48,62	40,24	1,20	1,33	0,20
TG5	TT	47,83	44,05*	1,09	1,53**	0,24**
	CC	49,19	40,84	1,20	1,31	0,19
LEP	TT	45,94	43,32	1,06	1,47***	0,22***

	CC	47,28	41,42	1,14	1,23	0,17
GH	VV	47,04	43,94	1,07	1,52**	0,24**
	LL	48,86	40,61	1,20	1,41	0,19

Анализ корреляционных взаимоотношений свидетельствует об односторонней положительной связи между интегральными показателями липидного обмена (ИИОЛ, КЭМ) и величиной живой массы, среднесуточных приростов у всех изучаемых генотипов. Однако наиболее значимой она была у гомозиготных CAPN1^{CC}TG5^{TT}LEP^{TT}GH^{VV} генотипов, составившая, соответственно: 0,26, 0,30; 0,23, 0,32; 0,26, 0,33; 0,28 и 0,34, против 0,21, 0,22; 0,18, 0,26; 0,19, 0,26; 0,20 и 0,25 - альтернативных CAPN1^{GG}TG5^{CC}LEP^{CC}GH^{LL} вариантов (табл. 4).

Таблица 4. Коэффициенты корреляции между изучаемыми признаками

Ген Генотип		Живая масса		Среднесуточный прирост	
		ИИОЛ	КЭМ	ИИОЛ	КЭМ
CAPN1	CC	0,26	0,30	0,22	0,27
	GG	0,21	0,22	0,18	0,24
TG5	TT	0,23	0,32	0,25	0,28
	CC	0,18	0,26	0,22	0,22
LEP	TT	0,26	0,33	0,22	0,28
	CC	0,19	0,26	0,17	0,21
GH	VV	0,28	0,34	0,21	0,31
	LL	0,20	0,25	0,16	0,26

Анализ полученных данных позволяет заключить, что жирные кислоты, как звено многих биохимических реакций, отражая различные стороны метаболизма, могут служить оценочными критериями интенсивности роста, развития, формирования продуктивности мясного скота в раннем возрасте.

Заключение. Полученные данные и их анализ свидетельствуют о важной роли жирных кислот в общем обмене веществ и, как следствие – формирования продуктивности. Поскольку отбор и подбор животных с признаками специализированной продуктивности, в частности мясной, представляет собой отбор и подбор определенных биохимических призна-

ков, то можно предположить, что выявленная закономерность свидетельствует о более высокой липогенно-липолитической активности генотипов с комплексом селекционно-значимых аллелей, лучшему обеспечению энергетическими субстратами мышечной ткани – основного показателя мясной продуктивности. Генотипирование в комплексе с биохимическим маркированием позволяет дать объективную оценку генетического потенциала животных в раннем возрасте. Приведенные данные, их анализ убедительно свидетельствуют о необходимости более детального изучения метаболизма липидов в связи с ростом, развитием мясного скота, формированием его продуктивности, качеством говядины.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. О возможности использования генетических маркеров в селекции мясного скота для повышения качественных показателей мяса / В. А. Солошенко, Г. М. Гончаренко, А. А. Дворяткин, В. А. Плешаков // Вестник мясного скотоводства. 2013. 1(79) С.37-40.
2. Шакиров, Ш. К., Юльметьева Ю. Р., Гафурова Л. И. Молекулярно-генетические аспекты селекции мясного скота по мраморности мяса// Вестник мясного скотоводства. 2014. 2 (85) С. 59-64.
3. Sasazaki S., Akiyama K., Narukami T., Matsumoto H, Oyama K., Mannen H. UTS2R gene polymorphisms are associated with fatty acid composition in Japanese beef cattle// Animal Science Journal -2014 85 5 P. 499-505.
4. Алиев А.А. Незаменимые(эссенциальные) жирные кислоты и их роль в формировании продуктивности животных // Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Боровск. 2000. С.34-36.
5. Escudero, N. L., F. Zirulnik, N. N. Gomez, S. I. Mucciarell, M. S. Gimenes Influence of a protein concentrate from *Amaranthus cruentus* seeds on lipid metabolism // Exp. Biol. Med. 2006. 231 P. 50-59.
6. Gardan, D., Gondret F., Louveau I. Lipid metabolism and secretory function of porcine intramuscular adipocytes compared with subcutaneous and perirenal adipocytes Am. J. Physiol. // Endocrinol. Metab. 2006. 291 P. E372-E380.
7. Salvatori, G., Filetti F., Di Cesare C., Maiorano G. [et al.] Lipid composition of meat and backfat from Casertana purebred and crossbred pigs reared outdoors // Meat Science. 2008.80 P. 623-631.
8. Алиев А. А., Мартюшов В. М. Превращение основных жирных кислот в процессе поступления их в лимфу. // Липиды в организме животных и человека (М. Наука). 1974. С. 3-10.
9. Ефремов А. Н., Харченко Л. Н. Метаболизм высокомолекулярных жирных кислот в организме высокопродуктивных овец// Технология и экономика овцеводства. Ставрополь. ВНИИОК. 1992. С.34-41.
10. Покровский А. А. Метаболические аспекты фармакологии и токсикологии пищи //М: Медицина. 1979.183 с.

ASSESSMENT OF SELECTION PROSPECTS IN YOUNG OF KAZAKH WHITE-HEADED BREED BASED ON GENETIC MARKERS AND BIOCHEMICAL TEST SYSTEMS

Selionova M.I., Chizhova L.N., Surzhikova E.S., Plakhtyukova V.R., Sharko G.N.

Abstract. *These studies are aimed at searching and identifying genetic markers, biochemical test systems that are interconnected with the productivity indices of different genotypes in young of Kazakh white-headed breed. The individual features in polymorphism of genes (CAPN1, TG5, LEP, and GH) that control meat productivity were revealed, expressed in the specificity of the allelic spectrum, the frequency of genotype occurrence in the studied population of beef cattle. It was found that the share of specially valuable genotypes including 8 marker alleles of four genes (CAPN1^{CC}, TG5^{TT}, LEP^{TT}, GH^{VV}) is 1.8, from 6 marker alleles of three genes (GH^{VV}, TG5^{TT}, LEP^{TT}) it is 12.4, from 4 marker alleles of two genes (TG5^{TT}, GH^{VV}) it is 53.5%. To assess the nature of changes in the body, integral rates are considered that reflect the degree in biosynthesis of fatty acids of blood lipids in young animals with different genotypes of the Kazakh white-headed breed: LSI (ИИЛ) – lipid saturation index, LMI (ИИОЛ) – lipid metabolism intensity index, ERM (КЭМ) – efficiency rate of essential fatty acid metabolism. A stable correlative relationship of integral rates (LMI, ERM) with live weight and average daily gains was found, which amounted to: 0.26; 0.30; 0.23; 0.32; 0.26; 0.33; 0.28 of homozygous CAPN1^{CC}, TG5^{TT}, GH^{VV}, LEP^{TT} versus 0.21; 0.22; 0.18; 0.26; 0.19; 0.26; 0.20; 0.25 of alternative CAPN1^{GG}, TG5^{CC}, LEP^{CC}, GH^{LL} variants. The data obtained from their analysis indicate that the integrated system helps to optimize the terms of lifetime assessment, prediction of the genetic potential in beef cattle at an early age.*

Keywords: *polymorphism, metabolism, lipids, beef cattle.*

УДК 575.224.22, 636.32/.38

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ MEF2B И CEBPD КАК МАРКЕР МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ОВЕЦ

Селионова М.И.¹, Криворучко А.Ю.²

¹ВНИИОК – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ», ул. Никонова, 49, г. Михайловск, Ставропольский край, РФ, 356241

²ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», пер. Зоотехнический, 12, г. Ставрополь, Ставропольский край, РФ, 355017
E-mail: m_selin@mail.ru

Аннотация. *Целью работы явилось изучение связи полиморфизма генов транскрипционных факторов MEF2B и CEBPD с показателями мясной продуктивности у овец породы джалгинский меринос. В ходе исследований было проведено целевое секвенирование генов MEF2B, CEBPD и их фланкирующих областей. Секвенирование осуществляли с использованием геномного секвенатора GS Junior (Roche, USA). В области гена MEF2B выявлено 33 однонуклеотидные замены, в области гена CEBPD – 35. С показателями мясной продуктивности связано две однонуклеотидные замены: с.-1713G>A, расположенная в 5'-фланкирующей области гена MEF2B и с.*1828T>C, расположенная в 3'-фланкирующей области гена CEBPD. Носители мутантных аллелей с.-1713A и с.*1828C достоверно превосходили сверстников гомозигот дикого типа по большинству убойных показателей, в том числе по предубойной живой массе на 13,18 %, по массе парной туши на 15,25 %, по абсолютной массе мякоти на 24,25 %. Присутствие в геноме баранчиков однонуклеотидных замен*

*с.*1828T>C и с.-1713G>A вероятно связано с наиболее интенсивным ростом мышечной ткани и, соответственно, хорошей мясной продуктивностью. Обнаруженные мутантные аллели с.*1828C и с.-1713A, могут быть использованы в качестве новых положительных маркерных аллелей-кандидатов мясной продуктивности овец. Однако, дальнейшая работа должна быть направлена на подтверждение влияния мутаций с.*1828T>C, с.-1713G>A на мясную продуктивность и их валидацию в качестве маркеров.*

Ключевые слова: *MEF2B, CEBPD, джалгинский меринос, мясная продуктивность, SNP, аллель, секвенирование.*

Введение. В современных экономических условиях все большую значимость обретает мясная продуктивность овец, обеспечивающая до 80 % прибыли овцевода. В связи с этим получение пород, сочетающих высокие показатели мясной и шерстной продуктивности является актуальной задачей. Использование методов маркер-ассоциированной селекции может значительно ускорить процесс создания новых и улучшения уже имеющихся пород овец. Однако, для успешного внедрения маркер-ассоциированной селекции необходимо расширять список генов-кандидатов, связанных с мясной продуктивностью. Перспективными кандидатами с этой точки зрения являются гены транскрипционных факторов, влияющих на мышечное развитие, такие как факторы семейства ССААТ/энхансер-связывающихся белков и миоцит-специфические энхансерные факторы.

Миоцит-специфические энхансерные факторы (MEF) относятся к положительным регуляторам миогенеза, способны связаться с А/Т-богатыми участками ДНК в промоторах и энхансерах генов клеток миогенных линий. Белки семейства MEF взаимодействуют с регуляторами мышечного роста миостатином и генами миогенной дифференцировки [1,3]. Семейство ССААТ/энхансер-связывающихся белков (С/ЕВР) играет важную роль в поддержании баланса между клеточной пролиферацией и апоптозом, вовлечено в процессы дифференцировки и пролиферации скелетных мышц. Белки семейства (С/ЕВР) взаимодействуют с промоторами генов миостатина и кальпаина [2,4].

В связи с этим, **целью нашей работы** явилось изучение связи полиморфизма генов транскрипционных факторов *MEF2B* и *CEBPD* с показателями мясной продуктивности у овец породы джалгинский меринос, характеризующейся сочетанием высокой мясной и шерстной продуктивности.

Материал и методика. Исследование было проведено на базе ВНИИОК – филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ» и ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». Объектом исследования служили баранчики (n=15) 12 мес. возраста породы джалгинский меринос из СПК «Племзавод Вторая пятилетка» Ипатовского района Ставропольского края. Геномную ДНК выделяли из образцов крови, полученных из яремной вены в асептических условиях. Пробы крови отбирали в пробирки Vacutainer® со стабилизатором ЭДТА. ДНК выделяли из 0,2 мл крови с использованием набора PureLinkGenomic DNA MiniKit (Invitrogen, USA). С целью выявления мутаций в генах проводили целевое обогащение и последующее секвенирование исследуемых фрагментов ДНК. Для обогащения целевых регионов использовали технологию NimbleGen (Roche, USA). Зонды для целевых регионов были разработаны в сотрудничестве с фирмой Roche NimbleGen (USA). Библиотеки фрагментов ДНК исследуемых животных, подготовленные в соответствии с протоколом Rapid Library Preparation Method Manual, подвергали процедуре обогащения с использованием зондов NimbleGen SeqCap EZ Developer Libraries в соответствии с протоколом производителя (Roche, USA). Секвенирование осуществляли с использованием геномного секвенатора GS Junior (Roche, USA). Полученные в результате секвенирования фрагменты картировали на референсный геном *Ovis aries* сборка Oar_rambouillet_v1.0 (National Center for Biotechnology Information, 2017) с помощью программного обеспечения GS Reference Mapper v2.9 (Roche, USA). Для описания обнаруженных однонуклеотидных замен (SNP) использовалась номенклатура HGVS (Human Genome Variation Society). Для статистического анализа использовали двусторонний t-тест Стьюдента в программе Biostat 2009 Pro 5.8.4 Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе работы впервые был изучен полиморфизм генов *MEF2B*, *CEBPD* и их фланкирующих областей у овец породы джалгинский меринос. В области гена *MEF2B* и его фланкирующих последовательностей обнаружено 33 однонуклеотидные замены, в области гена *CEBPD* – 35. Связь между присутствием мутантных аллелей и параметрами мясной продуктивности была выявлена

по заменам с.-1713G>A, расположенной в 5'-фланкирующей области гена *MEF2B* и с.*1828T>C, расположенной в 3'-фланкирующей области гена *CEBPD*.

Носители мутантного аллеля с.-1713A достоверно превосходили сверстников генотипа с.-1713GG по 16 убойным показателям, в том числе по предубойной живой массе на 10,27 %, по массе парной туши на 13,52 %, косой длине туши на 4,45 %, абсолютной массе мякоти на 21,54 %. Таким образом присутствие мутантного аллеля с.-1713A связано с лучшими показателями мясной продуктивности.

Баранчики, несущие мутацию с.*1828T>C, достоверно превосходили сверстников, несущих в гомозиготном варианте дикий аллель с.*1828T по 19 убойным показателям, в том числе по предубойной живой массе на 11,15 %, по массе парной туши на 12,50 %, косой длине туши на 3,56 %, абсолютной массе мякоти на 20,09 %. Наличие мутантного аллеля с.*1828C ассоциировано с лучшими показателями мясной продуктивности.

Совместное присутствие в геноме баранчиков двух анализируемых мутаций (с.*1828T>C и с.-1713G>A) также связано с наиболее высокими показателями мясной продуктивности. Носители обеих желательных мутаций достоверно превосходили животных дикого генотипа по 19 убойным показателям. Наиболее значимые различия отражены в таблице 1.

Таблица 1. Разница в показателях мясной продуктивности между баранчиками различных генотипов

Нежелательные мутации	Нежелательные аллели	Показатель	Превосходство носителей мутаций над гомозиготами дикого типа, %	<i>p</i>
с.*1828T>C <i>CEBPD</i> с.-1713G>A <i>MEF2B</i>	с.*1828T <i>CEBPD</i>	Предубойная живая масса	13,18	0,01
		Масса парной туши	15,25	0,01
	с.-1713G <i>MEF2B</i>	Косая длина туши	4,53	0,01
		Абсолютная масса мякоти	24,25	0,01

Присутствие в геноме баранчиков однонуклеотидных замен с.*1828T>C и с.-1713G>A связано с наиболее интенсивным ростом мышечной ткани и хорошей мясной продуктивностью.

Заключение. Изучение связи полиморфизма генов транскрипционных факторов *MEF2B* и *CEBPD* с продуктивными показателями позволило обнаружить новые мутантные аллели, которые могут быть рассмотрены в качестве маркерных аллелей-кандидатов мясной продуктивности овец. По результатам проведенных исследований, лучшими показателями мясной продуктивности по сравнению с баранчиками гомозиготами дикого типа обладали сверстники несущие мутантные аллели с.*1828C и с.-1713A. Дальнейшая работа должна быть направлена на подтверждение влияния мутаций с.*1828T>C, с.-1713G>A на мясную продуктивность и их валидацию в качестве маркеров.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Копанцева Е.Е. Регуляторы скелетно-мышечного миогенеза / Копанцева Е.Е., Белявский А.В. // Молекулярная биология – 2016. – Т. 50, № 2 – С.195–222.
2. Allen D.L. CCAAT/enhancer binding protein-delta expression is increased in fast skeletal muscle by food deprivation and regulates myostatin transcription in vitro. / Allen D.L., Cleary A.S., Hanson A.M., Lindsay S.F., Reed J.M. // American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology – 2010. – Т. 299, № 6 – C.R1592-601.
3. Du R. Some motifs were important for myostatin transcriptional regulation in sheep (*Ovis aries*). / Du R., An X., Chen Y., Qin J. // Journal of biochemistry and molecular biology – 2007. – Т. 40, № 4 – С.547–53.
4. Jing L. Transcriptome analysis of mRNA and miRNA in skeletal muscle indicates an important network for differential Residual Feed Intake in pigs / Jing L., Hou Y., Wu H., Miao Y., Li X., Cao J., Michael Brameld J., Parr T., Zhao S. // Scientific Reports – 2015. – Т. 5, № October 2014 – C.11953.

POLYMORPHISM OF GENES TRANSCRIPTION FACTOR MEF2B AND CEBPD AS A MARKER OF MEAT PRODUCTIVITY IN SHEEP

Selionova M.I.¹, Krivoruchko A.Yu.²

¹All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding – branch of the North Caucasus Federal Scientific Agricultural Center, Nikonov, 49, Mikhailovsk, Stavropol territory, Russia, 356241

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Stavropol State Agrarian University», 12, Zootekhnichesky, Stavropol territory, Russia, 355017
E-mail: m_selin@mail.ru

Abstract. The aim of the research was to study association of the transcription factor *MEF2B* and *CEBPD* genes polymorphism with indicators of meat productivity in Dzhalginsky Merino sheep breed. In the course of the studies, targeted sequencing of the *MEF2B*, *CEBPD* genes and their flanking regions was carried out. Sequencing was performed using a genomic sequencer GS Junior (Roche, USA). During the sequencing, we have found 33 single nucleotide substitutions in *CEBPD* gene and 35 in *MEF2B* gene. Two single nucleotide substitutions are associated with

parameters of meat productivity: c. 1713G> A located in the 5'-flanking region of the MEF2B gene and c. *1828T> C located in the 3'-flanking region of the CEBPD gene. Sheep with the mutant allele of c.*1828T>C and c. 1713G>A SNP complex showed an increase in the majority of slaughter parameters compared with those of wild homozygous type including pre-slaughter live weight by 13.18%, hot carcass weight by 15,25 %, total flesh meat by 24,25 %. Thus, the presence of single-nucleotide substitutions c.*1828T>C and c. 1713G>A in the genome of sheep is probably associated with the most intensive growth of muscle tissue and, as a consequence, good meat productivity. The detected mutant alleles c.*1828C and c.-1713A can be used as new positive marker alleles-candidates of meat productivity of sheep. Further work should be aimed at confirming the effect of mutations c.*1828T>C, c.-1713G>A on meat productivity and their validation as markers.

Keyword: MEF2B, CEBPD, Dzhalginsky Merino, meat productivity, SNP, allele, sequencing.

УДК 619:618.11

ВЛИЯНИЕ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ОРГАНИЗМА КОМПЛЕКСНЫМИ ОТЕЧЕСТВЕННЫМИ БИОПРЕПАРАТАМИ НА ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ КАЧЕСТВА КОРОВ

Семенов В.Г., Иванова Т.Н.

ФГБОУ ВО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия»,
ул. К. Маркса 29, г. Чебоксары, Чувашская Республика, РФ, 428003
E-mail: semenov_v.g@list.ru

Аннотация. Предложен производству способ профилактики болезней послеродового периода и реализации биоресурсного потенциала репродуктивных качеств черно-пестрого скота за счет активизации неспецифической резистентности организма стельных коров биопрепаратами серии Prevention. Установлено, что если у коров в контрольной группе, где не использовались биопрепараты, сроки отделения плодных оболочек составили в среднем $12,6 \pm 1,02$ ч, то в 1-й и 2-й опытных – $7,2 \pm 0,42$ и $5,8 \pm 0,66$ ч, то есть ниже на 5,4 и 6,8 ч соответственно. Из заболеваний послеродового периода зафиксирована субинволюция матки у 3 коров контрольной группы. Эта патология также была выявлена у 1 коровы в 1-й опытной, а во 2-й опытной – не наблюдалась. Первая половая охота у коров в 1-й опытной группе наступала раньше на 8,6 сут, а во 2-й опытной – на 14,4 сут, чем в контроле. Индекс осеменения коров 1-й и 2-й опытных групп оказался ниже в 1,4 и 1,8 раза соответственно, чем у животных контрольной группы. Сервис-период у коров 1-й опытной группы был короче на 24,6 сут, а у 2-й опытной – на 31,4 сут, чем в контроле. Установлено, что в контрольной группе в 1 охоту оплодотворились 20% коров, в 1-й опытной – 40 % и во 2-й опытной – 60 %.

Ключевые слова: коровы, стельность, биопрепараты, неспецифическая резистентность, воспроизводительные качества.

Введение. В поддержании оптимального уровня молочного животноводства фундаментальное значение имеет правильная организация воспроизводства стада. Она включает в себя комплекс организационных и зооветеринарных мероприятий, куда входят выращивание племенного молодняка, содержание и эксплуатация коров с соблюдением гигиенических норм и правил, составление сбалансированных рационов кормления, организация ремонта стада и искусственного осеменения, подготовка и повышение квалификации кадров и др. [2, 3].

Воспроизводительные качества и продуктивность коров представляют собой главное звено в скотоводстве. Однако эти качества у коров реализуются недостаточно, и перед отраслью встает задача их повышения [1, 2, 4].

Высокие производственные показатели часто сопровождаются нарушением воспроизводительной функции коров. В настоящее время это одна из основных проблем рентабельности животноводства. От бесплодных коров хозяйства недополучают значительное количество приплода и годового удоя, большое количество молодых коров выбраковывается еще до того, как окупятся средства на их выращивание. Содержание и кормление бесплодных коров, их лечение, многократные осеменения значительно удорожают продукцию [4].

Цель работы – реализация биоресурсного потенциала воспроизводительных качеств черно-пестрого скота биопрепаратом серии Prevention.

Материал и методика исследований. Экспериментальные исследования проведены в условиях молочно-товарной фермы ООО «Смак-Агро» Мариинско-Посадского района Чувашской Республики. Объектами исследований были стельные (за 60 суток до отела) и новотельные (3-5 суток после отела) коровы черно-пестрой породы. Были подобраны три группы сухостойных коров по принципу групп-аналогов с учетом клинико-физиологического состояния, возраста и живой массы по 10 животных в каждой.

С целью активизации неспецифической резистентности организма стельных коровам 1-й опытной группы инъецировали внутримышечно АСД-Ф2 с элеовитом в соотношении 1:9 за 60 суток до предполагаемого

отела, 2-й опытной группы – разработанный препарат в дозе 10 мл трехкратно за 45-40, 25-20 и 15-10 суток до отела, контрольной группы – биопрепараты не инъектировали.

Результаты исследований и их обсуждение. Параметры физиологического состояния животных были в пределах физиологических норм, и разница в соответствующих величинах по сравнению с контролем оказалась несущественной. Результаты исследований по заболеваемости коров до и после родов и воспроизводительной функции представлены в табл. 1.

Установлено, что если в контрольной группе животных сроки отделения плодных оболочек составили в среднем $12,6 \pm 1,02$ ч, то в 1-й и 2-й опытных группах – $7,2 \pm 0,42$ и $5,8 \pm 0,66$ ч, то есть ниже на 5,4 и 6,8 ч соответственно.

Из заболеваний послеродового периода зафиксирована субинволюция матки у 3 коров контрольной группы, и она сопровождалась с периодической задержкой лохи. Эта патология также была выявлена у 1 коровы в 1-й опытной группе, а во 2-й опытной – не наблюдалась. В результате задержания последа и субинволюции матки у 3 коров контрольной группы выявлено послеродовое острое катаральное воспаление слизистой оболочки матки. В 1-й опытной группе указанное заболевание выявлено у 1 коровы, а во 2-й опытной – не зарегистрировано. Кроме того, у 2 коров контрольной группы зарегистрирован мастит, в то время как у животных обеих опытных групп указанное заболевание не выявлено.

Таблица 1. **Заболеваемость и воспроизводительные качества коров**

Показатель	Группа животных		
	контрольная	1 опытная	2 опытная
Количество животных	10	10	10
Сроки отделения последа, ч	$12,6 \pm 1,02$	$7,2 \pm 0,42^*$	$5,8 \pm 0,66^*$
Задержание последа	4	-	-
Субинволюция матки	3	1	-
Эндометриты	3	1	-
Мастит	2	-	-
Сроки наступления 1 охоты, сут.	$43,2 \pm 1,64$	$34,6 \pm 0,93^*$	$28,8 \pm 0,56^*$
Индекс осеменения	$2,6 \pm 0,26$	$1,8 \pm 0,24^*$	$1,4 \pm 0,36^{**}$
Сервис-период, сут	$89,2 \pm 3,02$	$64,6 \pm 1,62^{**}$	$57,8 \pm 1,50^{**}$
Оплодотворилось коров: в первую охоту	2	4	6

во вторую охоту	2	3	4
в третью охоту	6	3	-

Первая половая охота у коров в 1-й опытной группе наступала раньше на 8,6 сут, а во 2-й опытной – на 14,4 сут, чем в контроле. Индекс осеменения коров 1-й и 2-й опытных групп оказался ниже в 1,4 и 1,8 раза соответственно, чем у животных контрольной группы. Сервис-период у коров 1-й опытной группы был короче на 24,6 сут, а у 2-й опытной – на 31,4 сут, чем в контроле. Установлено, что в контрольной группе в 1 охоту оплодотворились 20% коров, в 1-й опытной – 40 % и во 2-й опытной – 60 %.

Заключение. Внутримышечная инъекция коровам 1-й и 2-й опытных групп биопрепаратов в разные сроки до отела предупреждала гинекологические заболевания в родовой и послеродовой периоды и повышала воспроизводительную функцию организма, при более выраженном эффекте биопрепарата серии Prevention.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баймишев, М.Х. Профилактическая эффективность адаптогенов при патологии послеродового периода у коров /М.Х. Баймишев, В.С. Григорьев // Ветеринария. - М., 2010.- №6.- С. 39-42.
2. Воробьев, А.В. Способ лечения и профилактики послеродовых заболеваний у коров / А.В. Воробьев, Ю.В. Лимова, Р.С. Гришин // Труды Кубанского ГАУ. - Краснодар, 2009.- №1.- Ч. 2.- С. 153-157.
3. Григорьева, Т.Е. Болезни матки и яичника у коров / Т.Е. Григорьева // Монография. - Чебоксары: «Новое Время», 2012.- 172 с.
4. Никитин, Д.А. Эмбриотоксические и тератогенные свойства иммунокорректирующего препарата ПС-6 / Д.А. Никитин, В.Г. Семенов // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». - М., 2012.- № 1(7).- С.83-85.

INFLUENCE OF IMMUNOCORRECTION OF THE ORGANISM COMPLEX DOMESTIC BIOLOGICAL PRODUCTS ON REPRODUCTIVE QUALITIES OF COWS

Semenov V.G., Ivanova T.N.

«Chuvash state agricultural academy», K. Marx St. 29, Cheboksary, Chuvash Republic,
Russian Federation, 428003
E-mail: semenov_v.g@list.ru

Abstract. *The way of prevention of diseases of the postnatal period and realization of biore-source potential of reproductive qualities of the black and motley cattle due to activization of non-specific resistance of an organism of stylish cows is offered by Prevention series biological prod-*

ucts to production. It is established that at cows in control group where biological products were not used, terms of office of fetal covers averaged 12.6 ± 1.02 h, in the 1st and 2nd skilled – 7.2 ± 0.42 and 5.8 ± 0.66 h, that is are 5.4 lower also than 6.8 h respectively. From diseases of the postnatal period subinvolution of a uterus at 3 cows of control group is recorded. This pathology was also revealed at 1 cow in the 1st skilled, and in the 2nd skilled – was not observed. The first sexual hunting at cows in the 1st skilled group stepped on 8.6 days earlier, and in the 2nd skilled – on 14.4 days, than in control. The index of insemination of cows of the 1st and 2nd skilled groups was lower in 1.4 and 1.8 times respectively, than at animals of control group. Service period at cows of the 1st skilled group was 24.6 days shorter, and at the 2nd skilled – on 31.4 days, than in control. It is established that in control group in 1 hunting 20% of cows, in the 1st skilled – 40% and in the 2nd skilled – 60% were impregnated.

Keywords: cows, stylishness, biological products, nonspecific resistance, reproductive qualities.

УДК 636.5:591.1

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ СОМАТОТРОПИНА В ГРАНУЛЕЗНОМ СЛОЕ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ КУР

Смекалова А.А.¹, Лебедева И.Ю.¹, Парвизи Н.², Гроссманн Р.²

¹ФГБНУ ФНЦ – ВИЖ им. Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, г.о. Подольск, Московская обл., РФ, 142132

²Институт генетики сельскохозяйственных животных, Мариензее, 31535 Германия
E-mail: araksiya@gmail.com

Аннотация. В настоящей работе были исследованы изменения концентрации рецепторов соматотропного гормона (СТГ) в гранулезном слое преовуляторных фолликулов в динамике фолликулогенеза и овуляторного цикла у кур разного возраста и репродуктивного статуса, а также в условиях стимуляции и ингибирования синтеза стероидных гормонов. Концентрация рецепторов СТГ в клетках гранулезы возрастала в процессе созревания преовуляторных фолликулов независимо от возраста и репродуктивного статуса птиц. У кур в зрелом возрасте, сохранивших высокую интенсивность яйцекладки, наблюдалось повышение этой концентрации в середине овуляторного цикла, что может быть связано с поддержанием репродуктивной функции. Ингибирование продукции овариальных стероидных гормонов проводило к увеличению числа соматотропных рецепторов в гранулезных клетках. Таким образом, содержание рецепторов СТГ в гранулезном слое преовуляторных фолликулов кур-несушек зависит от степени созревания фолликула, процессов репродуктивного старения и продукции стероидных гормонов в яичнике.

Ключевые слова: куры-несушки, соматотропный гормон, половые стероидные гормоны, репродуктивное старение.

Введение. Соматотропный гормон (СТГ) оказывает модулирующее действие на овариальную функцию птиц, влияя на продукцию половых

стероидных гормонов и инсулиноподобных факторов роста, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз фолликулярных клеток, а также на чувствительность последних к воздействию лютеинизирующего гормона [1, 2]. Рецепторы СТГ и их матричные РНК присутствуют в различных структурных элементах яичника кур на разных стадиях развития [3, 4]. Ранее было показано, что у кур в возрасте 41-47 недель концентрация соматотропных рецепторов в клетках гранулезы (КГ) изменяется в процессе созревания преовуляторных фолликулов, а также в динамике овуляторного цикла, однако нет никакой информации о факторах, определяющих такие изменения [3]. Как известно, основными эндокринными регуляторами созревания овариальных фолликулов птиц служат гонадотропные и половые стероидные гормоны [5]. Во время заключительной фазы роста преовуляторных фолликулов происходит резкое уменьшение продукции андрогенов и эстрогенов фолликулярными клетками, тогда как секреция прогестерона значительно усиливается, особенно в самом зрелом фолликуле [6]. К тому же в течение овуляторного цикла наблюдаются волнообразные изменения содержания стероидных гормонов в крови и фолликулярных тканях [6, 7]. Это позволяет предположить, что половые стероидные гормоны могут участвовать в регуляции концентрации рецепторов СТГ в фолликулах кур.

С возрастом репродуктивный потенциал самок постепенно снижается, что в первую очередь связано с изменениями, происходящими в яичниках: истощением фолликулярного резерва и ухудшением его качества. Кроме того, нарушение репродуктивной функции может быть прямым следствием возрастных изменений в функционировании эндокринной системы [8]. Таким образом, онтогенетические факторы способны играть значительную роль в регуляции соматотропной оси, включая экспрессию рецепторов СТГ в фолликулярных клетках.

Цель работы – исследовать изменения концентрации рецепторов СТГ в гранулезном слое преовуляторных фолликулов в динамике фолликулогенеза и овуляторного цикла у кур разного возраста и репродуктивного статуса, а также в условиях стимуляции и ингибирования синтеза стероидных гормонов.

Материал и методика исследований. В экспериментах были ис-

пользованы три группы кур породы белый леггорн: 1) в возрасте 29-31 недели с длинными циклами яйцекладки (> 10 яиц на цикл), 2) в возрасте 62-82 недели с длинными циклами яйцекладки и 3) в возрасте 62-82 недели с короткими циклами яйцекладки (3-6 яиц на цикл). Овариоэктомию птиц проводили через 1,5 или 14,5 ч после овуляции. Курам в группе 1 внутривенно вводили овечий лютеинизирующий гормон (ЛГ; NIAMDD-oLH-23, США), повышающий концентрацию овариальных стероидных гормонов в крови, и/или ингибитор синтеза стероидов аминоглутетимид (АГ; Sigma, США), понижающий эту концентрацию в крови кур. Птицам контрольной группы вместо ЛГ и АГ вводили физиологический раствор (ФР). Применяли следующую схему экспериментов [9]: 1) 100 мг АГ (или ФР) вводили дважды, через 10 и 12 ч после яйцекладки, 2) 100 мкг ЛГ (или ФР) вводили немедленно после второй инъекции АГ, 3) овариоэктомию проводили через 4 ч после последней инъекции. Для анализа были использованы три преовуляторных фолликула (от F1 до F3, где F1 – самый большой фолликул). Для каждого экспериментального условия было использовано по 6 птиц.

Слой КГ выделяли согласно методу A.B. Gilbert и соавт. [10]. Анализы связывания [125 I]СТГ с КГ проводили в соответствии с разработанным ранее методом [3]. Концентрации рецепторов СТГ в клетках (B_{max}) определяли путем обработки данных насыщения с помощью метода Скэтчарда, используя компьютерную программу MultiCalc (Perkin Elmer Wallac, Германия). Данные, выраженные в фемтомолях (фМ) связанного меченого гормона на 10^6 клеток, обрабатывали методом дисперсионного анализа по программе SigmaStat.

Результаты исследований и их обсуждение. В начале овуляторного цикла во всех исследованных группах содержание рецепторов СТГ в гранулезном слое не изменялось с переходом фолликулов от стадии F3 к стадии F2. При достижении фолликулами стадии F1 это содержание возрастало ($P < 0,05$) со 181 ± 19 до 256 ± 17 фмоль/ 10^6 КГ (группа 1), со 176 ± 12 до 234 ± 11 фмоль/ 10^6 КГ (группа 2) и с 200 ± 15 до 260 ± 22 фмоль/ 10^6 КГ (группа 3). Сходное повышение концентрации рецепторов СТГ в клетках (в 1,3-1,4 раза, $P < 0,05$) происходило и в середине овуляторного цикла при созревании фолликулов от стадии F3 до стадии F1. Кроме того, у ста-

рых кур, сохранивших высокую интенсивность яйцекладки (группа 2), содержание соматотропных рецепторов в гранулезном слое было выше в середине, чем в начале овуляторного цикла (F1: 296 ± 17 против 234 ± 11 фмоль/ 10^6 КГ, F3: 235 ± 14 против 176 ± 12 фмоль/ 10^6 КГ, $P < 0,01$). Таким образом, чувствительность КГ к СТГ определяется степенью созревания преовуляторных фолликулов независимо от биологического возраста курицы. В то же время повышение этой чувствительности в середине овуляторного цикла может быть связано с поддержанием репродуктивной функции в зрелом возрасте.

Введение курам ЛГ не оказывало никакого влияния на содержание соматотропных рецепторов в гранулезном слое всех исследованных преовуляторных фолликулов (рис. 1). В то же время обработка птиц АГ, блокирующим стероидный синтез, приводила к возрастанию ($P < 0,05$) концентрации рецепторов СТГ в клетках гранулезы из фолликулов F1 и F2. Эта концентрация также была повышена в фолликулах F1 у кур при одновременном введении АГ и ЛГ по сравнению с курами, обработанными одним ЛГ ($P < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют об ингибирующем влиянии овариальных стероидных гормонов на экспрессию соматотропных рецепторов в гранулезной ткани преовуляторных фолликулов кур-несушек.

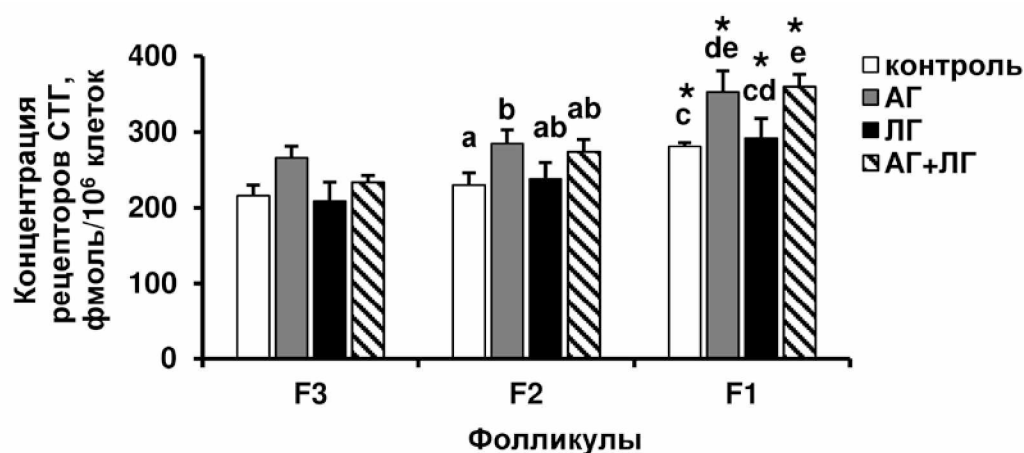


Рисунок. 1. Концентрация рецепторов соматотропина в гранулезном слое преовуляторных фолликулов кур при различных гормональных обработках. Каждый столбик – среднее для 6 экспериментов. Разные буквы над столбиками показывают достоверные различия между средними значениями при различных обработках ($P < 0,05$). * - достоверные различия между фолликулами с разной степенью зрелости (F1 против F3 и F1 против F2; по крайней мере, $P < 0,05$).

Заключение. Концентрация рецепторов СТГ в гранулезных клетках возрастает в процессе созревания преовуляторных фолликулов независимо от возраста и репродуктивного статуса курицы. Возрастание чувствительности гранулезных клеток к СТГ в середине овуляторного цикла, обусловленное увеличением числа рецепторов, может быть связано с поддержанием репродуктивной функции у кур в зрелом возрасте. Ингибирование синтеза овариальных стероидных гормонов вызывает повышение экспрессии соматотропных рецепторов в гранулезном слое. Таким образом, содержание рецепторов СТГ в гранулезном слое преовуляторных фолликулов кур-несушек зависит от степени созревания фолликула, процессов репродуктивного старения и продукции стероидных гормонов в яичнике.

Работа выполнена по государственному заданию (рег. ЦИТиС № АААА-А18-118021990006-9).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hrabia, A. Growth hormone production and role in the reproductive system of female chicken // Gen. Comp. Endocrinol. 2015. 220: 112-118.
2. Hrabia, A., Sechman, A., Rzas, J. Effect of growth hormone on basal and LH-stimulated steroid secretion by chicken yellow ovarian follicles. An in vitro study // Folia Biol. (Kra-kow). 2014. 62: 313-319.
3. Lebedeva, I. Y., Lebedev, V. A., Grossmann, R., Kuzmina, T. I., Parvizi, N. Characteri-zation of growth hormone binding sites in granulosa and theca layers at different stages of follicular maturation and ovulatory cycle in the domestic hen // Biol. Reprod. 2004. 71: 1174-1181.
4. Hrabia, A., Paczoska-Eliasiewicz, H.E., Berghman, L.R. Harvey, S., Rzas, J. Expression and localization of growth hormone and its receptors in the chicken ovary during sexual maturation // Cell Tissue Res. 2008. 332: 317-328.
5. Etches, R.J. The ovulatory cycle of the hen // Crit. Rev. Poult. Biol. 1990. 2: 293-318.
6. Bahr, J.M., Wang, S.C., Huang, M.Y., Calvo, F.O. Steroid concentrations in isolated the-ca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen // Biol. Reprod. 1983. 29: 326-334.
7. Etches, R.J., Cheng, K.W. Changes in the plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle-stimulating hormone to the theca of follicles during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*) // J. Endo-crinol. 1981. 91: 11-22.
8. Brown-Borg, H.M. Hormonal control of aging in rodents: the somatotropic axis // Mol. Cell. Endocrinol. 2009. 299: 64-71.
9. Lebedeva, I.Y., Lebedev, V.A., Grossmann, R., Parvizi, N. Age-dependent role of ster-oids in the regulation of growth of the hen follicular wall // Reprod. Biol. Endocrinol. 2010. 8:15.
10. Gilbert, A.B., Evans, A.J., Perry, M.M., Davidson, M.H. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the

ONTOGENETIC AND HORMONAL REGULATION OF SOMATOTROPIC RECEPTORS IN THE GRANULOSA LAYER OF HEN PREOVULATORY FOLLICLES

Smekalova A.A.¹, Lebedeva I.Yu.¹, Parvizi N.², Grossmann R.²

¹L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry
Dubrovitsy, 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132 Russia

²Institute of Farm Animal Genetics, FLI, Mariensee, 31535 Germany
E-mail: araksiya@gmail.com

Abstract. *In this work, we studied changes in the concentration of somatotrophic hormone (STH) receptors in the granulosa layer of preovulatory follicles in the dynamics of folliculogenesis and the ovulatory cycle in hens of different ages and reproductive status, as well as when stimulating or inhibiting steroid hormone synthesis. The concentration of STH receptors in granulosa cells increased during the maturation of preovulatory follicles, regardless of the age and reproductive status of the birds. In aged hens retaining a high egg laying intensity, an increase in this concentration was observed in the middle of the ovulatory cycle, which may be associated with maintaining the reproductive function. Inhibiting the production of ovarian steroid hormones led to an increase in the number of somatotrophic receptors in granulosa cells. Thus, the content of STH receptors in the granulosa layer of preovulatory follicles of laying hens depends on the degree of follicular maturation, the processes of reproductive aging and the production of steroid hormones in the ovary.*

Keywords: *laying hens, somatotrophic hormone, sex steroid hormones, reproductive aging.*

УДК 636.2.082.4:59.089.3:591.3

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОММЕРЧЕСКИХ СРЕД, РАЗРАБОТАННЫХ ДЛЯ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА, В ЭКСПЕРМЕНТАХ ПО IN VITRO КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ГАМЕТ И ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Сметанина И.Г.¹, Татарина Л.В.¹, Кривохарченко А.С.²

¹ВНИИФБиП животных – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К.Эрнста, 243013, Калужская обл., Боровск

²Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва

В последние годы нашей исследовательской группой изучалась возможность использования ряда коммерческих сред, разработанных для человеческих эмбрионов, в экспериментах по in vitro оплодотворению и культивированию гамет и эмбрионов крупного рогатого скота (КРС). Лучшие результаты были получены при использовании сред фирмы "Life Glob-

al” (США). Вместе с тем, полученные результаты указывают, что для *in vitro* оплодотворения лучше использовать специальную среду собственного приготовления. Видимо, оплодотворение – этап критический, на котором видоспецифичность культуральных сред сказывается наиболее явно.

Ключевые слова: гаметы, крупный рогатый скот, культивирование *in vitro*, коммерческие среды для эмбрионов человека.

Введение. В последние годы нашей исследовательской группой изучалась возможность использования ряда коммерческих сред, разработанных для человеческих эмбрионов, в экспериментах по *in vitro* оплодотворению и культивированию гамет и эмбрионов крупного рогатого скота (КРС). По нашему мнению, это представляет интерес как с практической, так и с научной точек зрения. Известно, что данные коммерческие среды проходят предварительное тестирование на мышинных эмбрионах. Однако, нам представляется возможным проводить этот предварительный этап и на других видах млекопитающих, например, на эмбрионах КРС. С другой стороны, до сих пор среды для культивирования гамет и эмбрионов КРС готовятся исследователями в каждой лаборатории индивидуально, “вручную”, что существенно снижает воспроизводимость методик и сравнение экспериментальных данных, полученных в разных лабораториях. Использование готовых коммерческих сред позволило бы существенно нивелировать отрицательное влияние этого фактора. С научной точки зрения подобное “межвидовое” использование сред позволит лучше изучить метаболические процессы и потребности доимплантационных эмбрионов различных видов млекопитающих *in vitro*.

Цель работы: изучить эффективность использования коммерческих сред, разработанных для эмбрионов человека, в экспериментах по культивированию *in vitro* гамет и эмбрионов крупного рогатого скота.

Материал и методика исследований. Получение ооцитов и их созревание осуществляли так, как нами было описано ранее [1, 2, 3]. Для созревания ооцитов использовали безбелковую среду МЕМ-альфа (“Sigma”, США) с добавлением 1 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (ФСГ, “ФСГ-супер”, ООО “Агробиомед”, ВНИИФБиП с/х животных, Россия), 0.3 ед./мл хорионического гонадотропина человека (“Intervet”, Германия), 0.2 mM пирувата натрия (“Sigma”, США), 2 mM глутамина (“Sig-

та'', США). После созревания ооциты помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами. Использовали сперму быка "Мороз" черно-пестрой породы. Для оплодотворения (in vitro fertilization – IVF) применяли среду Тироде собственного приготовления с 25 мМ бикарбоната натрия [4], дополненную 6 мг/мл БСА, или среды для IVF коммерческих фирм. В качестве капацитирующего агента использовали 10 мкг/мл гепарина ("Sigma", США). Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла $1.5-2 \times 10^6$ /мл. Совместную инкубацию яйцеклеток и сперматозоидов осуществляли в течение 22-24 ч при температуре 38.5°C в атмосфере 5%-ного CO₂ в воздухе.

Для оценки способности оплодотворенных ооцитов к дальнейшему развитию in vitro их помещали на культивирование (in vitro culture – IVC) в среды коммерческих фирм или в микрокапли SOF собственного приготовления [5] объемом 50 мкл без глюкозы с заменимыми (по рецептуре MEM, "Sigma", США) и незаменимыми (по рецептуре Игла, "Sigma", США) аминокислотами, содержащей 1 мМ глутамин, 0.33 мМ пируват натрия, 3 г/л БСА (N3311, "Sigma", США). Через 42 ч после начала оплодотворения эмбрионы переносили в новые микрокапли среды SOF объемом 30 мкл, дополненной 20% эстральной сыворотки. Через 2 суток в культуральную среду добавляли глюкозу ("Serva", Германия) до концентрации 4 мМ. Культивирование осуществляли в течение 210 ч при температуре 38.5°C в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂).

В работе использовали среды следующих коммерческих фирм: "Cook" (Австралия), "Medicult" (Дания), "Sage" (США), "LifeGlobal" (США).

Результаты исследований и их обсуждение. Наименее удачной оказалась попытка использовать среды фирмы "Medicult" (Дания), в которых наблюдали низкий процент дробления (порядка 20%) и отсутствие полноценного развития до продвинутых стадий (единичные морулы при использовании для оплодотворения собственной среды IVF). В средах фирмы "Sage" (США) эмбрионы развивались лучше.

В экспериментах со средами фирмы “Cook” (Австралия) мы выявили один принципиальный момент. На наш взгляд важно использовать специальную среду IVF собственного приготовления (см. данные таблицы 1).

С Видимо, оплодотворение – этап критический, на котором видоспецифичность культуральных сред сказывается наиболее явно.

То же можно сказать и относительно сред фирмы “Life Global” (США), на которых мы получили наилучшие результаты. Использование среды IVF собственного приготовления значительно повышает процент первоначального дробления. Следует отметить, что именно среда фирмы “Life Global” обеспечивала наивысший процент развития эмбрионов до преимплантационных стадий.

Таблица 1. Данные по использованию ряда коммерческих сред, разработанных для эмбрионов человека, в экспериментах по культивированию гамет и эмбрионов КРС

Система in vitro оплодотворения (IVF) и in vitro культивирования (IVC)	Дробящихся эмбрионов (%)	Морул (%)	Бластоцист (%)
IVF(собственная) +IVC(собственная)	52.4	32.2	16.1
IVF(собственная) +IVC(“Cook”)	56.3	18.1	2.4
IVF(“Cook”) +IVC(“Cook”)	29.4	11.8	3.9
IVF(собственная) +IVC(“Medicult”)	13	-	-
IVF(“Medicult”) +IVC(“Medicult”)	20	10.9	-
IVF(“Sage”) + IVC(“Sage”)	29.8	7.7	1.9
IVF(собственная) +IVC (“Life Global”)	59.4	24.8	20.8
IVF(“Life Global”) +IVC (“Life Global”)	28.1	21.9	15.6

Следует отметить, что приведенные данные являются предварительными, так как получены в процессе текущей лабораторной работы, а не спланированных экспериментов, поэтому о статистической обработке полученных данных и, соответственно, достаточном уровне достоверности речь пока идти не может. Мы отмечаем только тенденции, наблюдавшиеся в том и ли ином случае.

В то же время, по нашим наблюдениям, переживаемость спермы как в коммерческих, так и в приготовленных нами средах была очень хорошей. Поэтому можно предположить, что снижение эффективности оплодотворения и, как следствие, ухудшение первоначального дробления при использовании коммерческих сред может быть связано с нарушениями процессов капацитации.

Вместе с тем, в качестве положительного момента работы с коммерческими средами следует выделить их более высокую устойчивость к контаминации. Однако отметим, что все используемые коммерческие среды содержали человеческий альбумин, то есть не являлись полностью “определенными”.

Заключение. Таким образом, нами показана принципиальная возможность использования сред, разработанных для человеческих эмбрионов, в экспериментах по культивированию гамет и эмбрионов КРС. Но между средами разных фирм имеются существенные различия. “Межвидовое” использование сред может позволить лучше изучить метаболические процессы и потребности доимплантационных эмбрионов различных видов млекопитающих *in vitro*. Полученные данные могут быть также использованы при разработке отечественных сред для ветеринарного ЭКО в рамках программ импортозамещения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние состава культуральных сред на созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*//Онтогенез - 2000. 31:139-143.
2. Кривохарченко А.С., Сметанина И.Г., Татарина Л.В. Оплодотворение и последующее развитие ооцитов крупного рогатого скота после сокращенной инкубации со сперматозоидами//Онтогенез - 2001. 32: 283-287.
3. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в безбелковой культуральной системе//Онтогенез - 2006. 37:438-443.
4. Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium//Biol. Reprod. - 1983. 28:235-247.
5. Tervit H.R., Whittingham D., Rowson L. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova//J. Reprod. Fertil. 1972. 30:493-497.

POSSIBILITY OF USE OF THE COMMERCIAL MEDIUMS DEVELOPED FOR HUMAN EMBRYOS IN EXPERIMENTS ON *IN VITRO* TO CULTIVATION OF BOVINE GAMETES AND EMBRYOS

Smetanina I.G.¹, Tatarinova L.V.¹, Krivokharchenko A.S.²

¹All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry, and Nutrition of Animals – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry – Ernst All-Russian Research Institute for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga oblast, 249013

²Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991
E-mail:sme.irina2011@yandex.ru

*In recent years, our research team has studied the possibility of using a number of commercial media developed for human embryos in *in vitro* fertilization and cultivation of bovine gametes and embryos. The best results were obtained using the mediums of the company “Life Global” (USA). However, the results indicate that *in vitro* fertilization is better to use a special medium of their own preparation. Apparently, the fertilization – a stage critical and specificity of a kind in this case affects most clearly.*

Keywords: gametes, bovine, cultivation *in vitro*, commercial mediums for human embryos.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФАЙЛИНГ КАК НАУЧНАЯ ОСНОВА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КОРОВ МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ

Соломахин А.А., Митяшова О.С., Рыков Р.А., Лебедева И.Ю.

ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, г.о. Подольск, Московская обл., РФ, 142132

E-mail: alsolomahin@yandex.ru

Аннотация. В представленной работе проведено сравнительное исследование метаболических профилей, ассоциированных с функцией печени, с конца предотельного периода и до конца первого триместра лактации у черно-пестрых коров-первотелок с разной активностью яичников. Метаболическое состояние животных с глубокой гипофункцией яичников характеризовалось пониженным содержанием альбуминов и общего холестерина в крови с 1-й по 13-ю неделю после отела и повышенным содержанием билирубина с 1-й по 3-ю неделю по сравнению с животными, восстановившими половой цикл, что указывает на серьезные нарушения в функционировании печени. В то же время у коров с умеренной депрессией овариальной активности наблюдались лишь незначительные изменения исследуемых биохимических профилей. Таким образом, содержание альбуминов, общего холестерина и билирубина в крови коров-первотелок в ранний период лактации может служить маркером для прогнозирования низкой активности яичников в первый триместр лактации.

Ключевые слова: коровы молочного направления продуктивности, послеотельный период, гипофункция яичников, альбумины, холестерин, билирубин.

Введение. Переход от беременности к лактации характеризуется высокой метаболической нагрузкой на организм коров молочного направления продуктивности. Способность животных адаптироваться к транзитному периоду критически важна для нормального функционирования всех физиологических систем, включая репродуктивную [1]. Для поддержания лактации организму требуются дополнительные ресурсы, что приводит к негативному энергетическому балансу и модифицированному метаболизму, которые лежат в основе нарушений воспроизводительной функции [2]. К таким нарушениям относят удлинение послеотельного анэструса, послеродовые воспалительные заболевания репродуктивных органов, раннюю эмбриональную смертность, различные типы дисфункции яичников, включая их гипофункцию [3]. Различают две формы функциональной де-

прессии яичников, которые соответствуют остановке развития фолликулов на стадии инициации роста (глубокая гипофункция) или на стадии селекции доминантного фолликула (умеренная гипофункция) [4]. Полагают, что в основе депрессии овариальной функции лежат различные причины метаболического характера [5], однако точный механизм возникновения обеих форм гипофункции до сих пор не ясен.

Высокая метаболическая нагрузка в период ранней лактации коров негативно влияет на состояние печени, которая через систему циркуляции крови связана с яичниками [6]. Показано, что ухудшение функции печени обуславливает задержку активации яичников после отела [7], а ее серьезные повреждения приводят к изменению биохимического состава фолликулярной жидкости и снижению качества ооцитов [8]. Поэтому показатели работы печени могли бы служить маркерами репродуктивного потенциала животных.

Целью представленной работы было сравнительное исследование метаболических профилей, ассоциированных с функцией печени, с конца предотельного периода и до конца первого триместра лактации у коров молочного типа с разной активностью яичников.

Материал и методы исследования. Эксперименты выполняли в ЭХ «Кленово-Чегодаево». Объектом исследования служили 47 коров-первотёлок чёрно-пёстрой голштинизированной породы, не имевших послеотельных гинекологических заболеваний, связанных со структурными или функциональными повреждениями половой системы. Рацион кормления животных соответствовал их продуктивности. Состояние полового аппарата оценивали методом ректального исследования и с помощью УЗИ-сканера WED 300W с линейным датчиком 7,5 МГц. Коровы-первотёлки были разделены на три группы. В группу I входили коровы, восстановившие половую цикличность, что подтверждалось нормальным проявлением половой охоты и наличием доминантных фолликулов и/или желтых тел в яичниках ($n = 26$). Коровы двух других групп не проявляли признаков половой охоты. К группе II относили животных с умеренным уровнем депрессии овариальной функции (диаметр фолликулов не более 8 мм в отсутствие желтых тел). Группа III включала коров с глубоким уровнем депрессии функциональной активности яичников (уменьшение обоих

яичников в размерах при отсутствии желтых тел, а также фолликулов более 3-4 мм). Диагностику овариальной активности проводили дважды (через 7 и 13 недель после отела). Перед отелом (за 2 недели) и после отела (через 1, 3, 5, 7 и 13 недель) у коров отбирали кровь для определения биохимических показателей. В пробах сыворотки крови измеряли содержание альбуминов, билирубина, холестерина, мочевины, глюкозы, а также активность ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) на автоматическом биохимическом анализаторе ChemWell (Awareness Technology, США) с использованием реагентов фирмы «Analyticon Biotechnology AG» (Германия). Полученные результаты обрабатывали методом однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа при помощи программы SigmaStat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

Результаты исследования. Молочная продуктивность за 305 дней лактации была сходной в сравниваемых группах и составляла 6393 ± 175 кг (группа I), 6054 ± 251 кг (группа II) и 6088 ± 424 кг (группа III).

Сывороточная концентрация альбуминов была пониженной ($p < 0,01$) с 1-й по 3-ю неделю после отела у животных, восстановивших половой цикл, и с 1-й по 13-ю неделю – у животных с глубокой депрессией яичников, причем у последних эта концентрация была меньше на 12-18% ($p < 0,05$ - $p < 0,001$), чем в двух других группах (рис. 1).

К 3-й неделе после отела в группе I начиналось возрастание содержания в крови общего холестерина (рис. 2), которое продолжалось вплоть до 13-й недели (в 1,8-1,9 раза по сравнению с 1-й неделей, $p < 0,001$). В группе II это возрастание становилось заметным только к 5-й неделе и, в целом, было менее выраженным (в 1,5-1,6 раза, $p < 0,001$). У животных группы III содержание общего холестерина в крови снижалось в 1,3-1,5 раза к 1-й неделе после родов ($p < 0,01$), а затем происходило его постепенное повышение, которое становилось существенным только к 13-й неделе ($p < 0,001$). Как следствие, у коров с глубокой гипофункцией яичников в течение всего исследуемого послеродового периода этот показатель был значительно ниже, чем у коров с нормальным половым циклом ($p < 0,05$ - $p < 0,001$). У коров с умеренной гипофункцией яичников содержание обще-

го холестерина в крови с 5-й по 13-ю неделю после отела также было ниже, чем у циклирующих животных ($p < 0,05$ - $p < 0,001$).

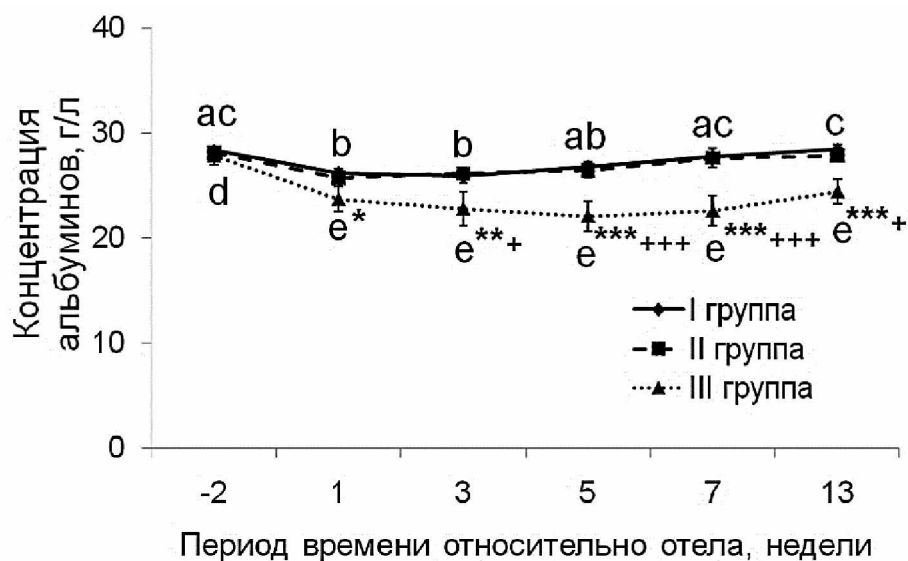


Рисунок 1. Концентрация альбуминов в различные периоды после отела в крови коров-первотелок с разной функциональной активностью яичников. Средние значения, помеченные разными буквами, показывают достоверные различия между временными периодами внутри группы ($p < 0,05$ - $p < 0,001$). Достоверные различия между группами: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (между I и III), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ (между II и III).



Рисунок 2. Концентрация холестерина в различные периоды после отела в крови коров-первотелок с разной функциональной активностью яичников. Средние значения, помеченные разными буквами, показывают достоверные различия между временными периодами внутри группы ($p < 0,05$ - $p < 0,001$). Достоверные различия между группами: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (между I и III и между I и II), ++ $p < 0,01$ (между II и III).

У коров I и II группы концентрация билирубина в крови резко возрастала по сравнению с предотельным периодом (в 1,8 раза, $p < 0,01$) через 1 неделю после отела, а затем снижалась до исходного уровня к 5-7-ой неделе (рис. 3). Это возрастание было еще более значительным (в 2,6 раза, $p < 0,001$) у животных III группы. Кроме того, у коров с глубокой гипофункцией содержание билирубина в крови было выше, чем у коров с активными яичниками ($p < 0,01$) через 1 и 3 недели после отела, достигая дородовых значений только к 13-ой неделе.

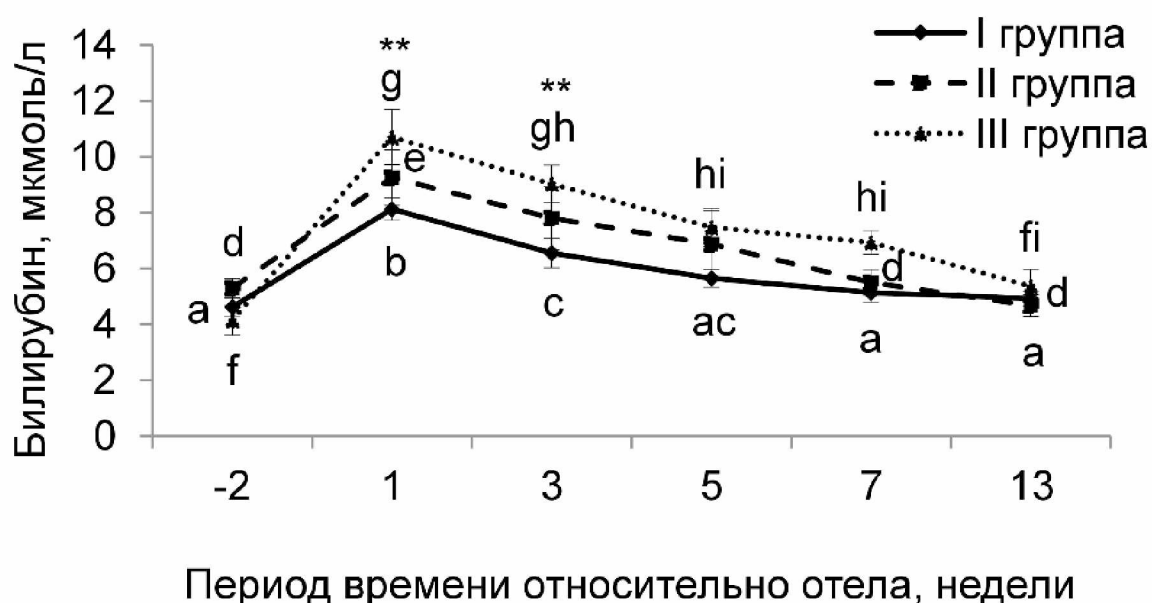


Рисунок 3. Концентрация билирубина в различные периоды после отела в крови коров-первотелок с разной функциональной активностью яичников. Средние значения, помеченные разными буквами, показывают достоверные различия между временными периодами внутри группы ($p < 0,05$ - $p < 0,001$). Достоверные различия между группами: ** $p < 0,01$ (между I и III).

Не обнаружено существенных различий между сравниваемыми группами в отношении послеродовых профилей для мочевины и глюкозы. Для особей с глубокой депрессией яичников была наиболее характерна пониженная в 1,4 раза ($p < 0,05$) активность АЛТ через 7 недель после отела и повышенная в 1,4 раза ($p < 0,01$) активность АСТ через 1 неделю после отела.

Ранее было показано, что концентрации альбуминов, холестерина и

билирубина в крови представляют минимально необходимый комплекс показателей, характеризующий состояние печени коров в период ранней лактации [6]. В представленной работе направленность изменения данных показателей крови в послеродовой период у черно-пестрых коров-первотелок с восстановленным половым циклом была сходна с таковой, обнаруженной другими исследователями у здоровых голштинских коров после второго отела [6]. Это свидетельствует об общих механизмах адаптации коров молочного типа к метаболическому стрессу в ранний период лактации.

Заключение. У черно-пестрых коров-первотелок с разной активностью яичников наибольшие различия в биохимических профилях после отела были выявлены для содержания альбуминов, общего холестерина и билирубина в крови. Результаты нашего исследования указывают на серьезные нарушения в функционировании печени у животных с глубокой депрессией овариальной активности, что может являться основной причиной возникновения тяжелой формы гипофункции яичников. В то же время у коров с умеренной депрессией овариальной активности наблюдались лишь незначительные изменения исследуемых биохимических профилей. Таким образом, содержание альбуминов и общего холестерина в крови с 1-ой по 7-ю недели после отела, а также билирубина (с 1-ой по 3-ю недели) у коров-первотелок может служить маркером для прогнозирования низкой активности яичников в первый триместр лактации.

Исследования профилей альбуминов, билирубина и глюкозы выполнены в рамках государственного задания (рег. ЦИТиС № АААА-А18-118021990006-9). Исследования профилей холестерина, мочевины, АСТ и АЛТ выполнены при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-016-00227).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roche, J.R., Burke, C.R., Crookenden, M.A., Heiser, A., Loor, J.L., Meier, S., Mitchell, M.D., Phyn, C.V.C., Turner, S.A. Fertility and the transition dairy cow // Reprod. Fertil. Dev. 2018. 30: 85-100.
2. Chagas, L.M., Bass, J.J., Blache, D., Burke, C.R., Kay, J.K., Lindsay, D.R., Lucy, M.C., Martin, G.B., Meier, S., Rhodes, F.M., Roche, J.R., Thatcher, W.W., Webb, R. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows // J. Dairy Sci. 2007. 90: 4022-4032.
3. Walsh, S.W., Williams, E.J., Evans, A.C. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows // Anim. Reprod. Sci. 2011. 123: 127-38.
4. Wiltbank, M.C., Gümen, A., Sartori, R. Physiological classification of anovulatory condi-

tions in cattle // Theriogenology. 2002. 57: 21-52.

5. Peter, A.T., Vos, P.L., Ambrose, D.J. Postpartum anestrus in dairy cattle // Theriogenology. 2009. 71: 1333-1342.

6. Berton, G, Trevisi, E. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds // Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 2013. 29: 413-431.

7. Montagner, P., Krause, A.R., Schwegler, E., Weschenfelder, M.M., Rabassa, V.R., Schneider, A., Pereira, R.A., Brauner, C.C., Del Pino, F.A., Gonçalves, F.M., Corrêa, M.N. Reduction of liver function delays resumption of postpartum ovarian activity and alters the synthesis of acute phase proteins in dairy cows // Res. Vet. Sci. 2016. 106: 84-88.

8. Tanaka, H., Shibano, K., Monji, Y., Kuwayama, T., Iwata, H. Liver condition affects bovine oocyte qualities by changing the characteristics of follicular fluid and plasma // Reprod. Domest. Anim. 2013. 48: 619-626.

METABOLIC PROFILING AS A SCIENTIFIC BASIS FOR PREDICTING THE REPRODUCTIVE POTENTIAL OF DAIRY COWS

Solomakhin A.A., Mityashova O.S., Rykov R.A., Lebedeva I.Yu.

L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy, 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132 Russia

E-mail: alsolomahin@yandex.ru

Annotation. *In the present work, a comparative study of metabolic profiles associated with the hepatic function was carried out from the end of the prepartum period to the end of the first trimester of lactation in black-pied primiparous cows with different ovarian activities. Compared to cycling animals, the metabolic state of animals with the deep ovarian hypofunction was characterized by a reduced content of albumins and total cholesterol in the blood from the 1st to 13th week after calving and an increased content of bilirubin from the 1st to the 3rd week, indicating serious disturbances in the functioning of the liver. At the same time only insignificant changes in the studied biochemical profiles were observed in cows with moderate depression of ovarian activity. Thus, in primiparous cows, the content of albumin, total cholesterol and bilirubin in the blood during early lactation can serve as a marker for predicting a low ovarian activity in the first trimester of lactation.*

Keywords: *dairy cows, postpartum period, ovarian hypofunction, albumins, cholesterol, bilirubin.*

ЦИТОФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ *SUS SCROFA* *DOMESTICUS* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДИМЕТИЛГЛИЦЕРОЛАТА КРЕМНИЯ

Станиславович Т.И., Кузьмина Т.И.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московское шоссе, д. 55а, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, РФ, 196601
E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Аннотация. Несмотря на несомненные успехи в разработке системы дозревания ооцитов *Sus Scrofa Domesticus*, технологиях клонирования и трансгенеза, где применяют клетки гранулезы (КГ), выход нативных и реконструированных эмбрионов недостаточно высок. Использование в технологии экстракорпорального созревания 3D – систем культивирования на основе гидрогелей – важная составляющая моделирования условий завершения мейоза в женской гамете. Цель настоящего исследования – оценить эффект диметилглицеролата кремния (ДМГК, ИОС УрО РАН) на жизнеспособность клеток гранулезы свиней с перспективой возможности его использования в клеточных репродуктивных технологиях. Клетки гранулезы выделяли из антральных фолликулов (диаметром 3-6 мм) яичников свиней, породы Ландрас (возраст 6-8 месяцев) и экспонировали в течении 3 часов при 37°C в фосфатно-солевом буфере с 5% фетальной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США). Показатели жизнеспособности оценивали методом проточной цитофлуориметрии согласно инструкции, представленной в наборе AnnexinV-FITC Apoptosis detection kit («Sigma-Aldrich», США). Анализ образцов проводили на проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beckman-Coulter, США). Выявлено цитопротекторное действие ДМГК в концентрации 0,2% на показатели жизнеспособности клеток гранулезы. Эффект выражался в снижении доли апоптотических клеток (13% против 21% в контроле, $P < 0,05$), увеличении числа жизнеспособных клеток на 9% (86% против 77% в контроле, $P < 0,05$), и снижении доли клеток в состоянии некроза (0,2% против 0,4% в контроле, $P < 0,05$).

Ключевые слова: клетки гранулезы свиней, диметилглицеролат кремния, апоптоз, некроз.

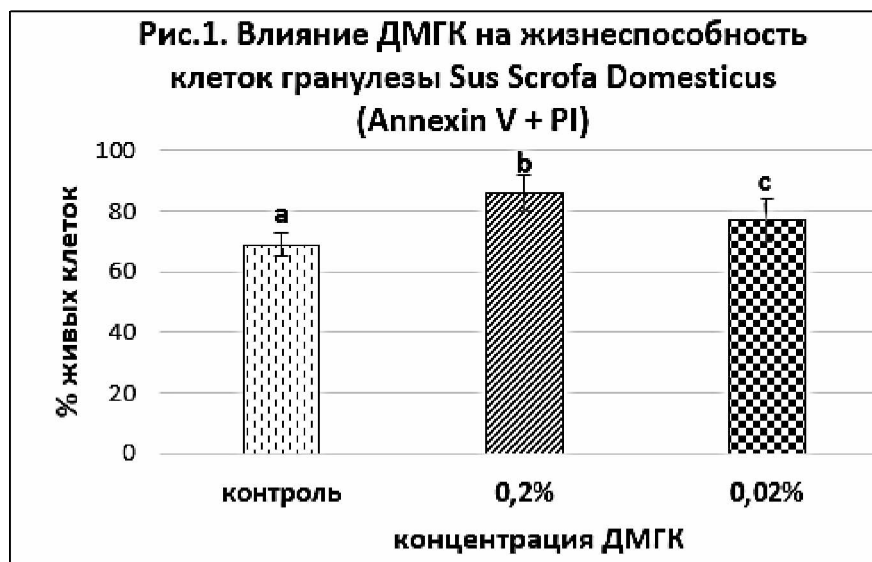
Введение. Клетки гранулезы (КГ) активно вовлекаются в регуляторные механизмы фолликуло- и оогенеза [2] и являются важной составляющей систем для экстракорпорального созревания ооцитов. Генетический материал КГ используется в качестве донорских ядер при соматическом клонировании [3]. Актуальным на сегодняшний день является вопрос оптимизации технологии трехмерных клеточных культур (3D). 3D культи-

вирование клеток предполагает введение дополнительных структурирующих компонентов. Одним из которых может являться гидрогель [1]. Гидрогели на основе кремния (Si) прочно зарекомендовали себя в медицине и ветеринарии как средства для местного и наружного применения [5]. Важная биологическая роль кремния является предпосылкой для использования соединений кремния в качестве пенетранта - переносчика различных биологически активных веществ, в том числе и гормонов. На основе водорастворимых ДМГК предложен и запатентован ряд фармацевтических композиций, обладающих комплексом ценных фармакологических свойств [6]. Однако, несмотря на имеющуюся обширную информацию о применении ДМГК в биомедицине и ветеринарии, механизмы его воздействия на клеточном уровне окончательно не ясны.

Цель работы. Цель настоящего исследования – выявить характер воздействия ДМГК на показатели жизнеспособности КГ свиней.

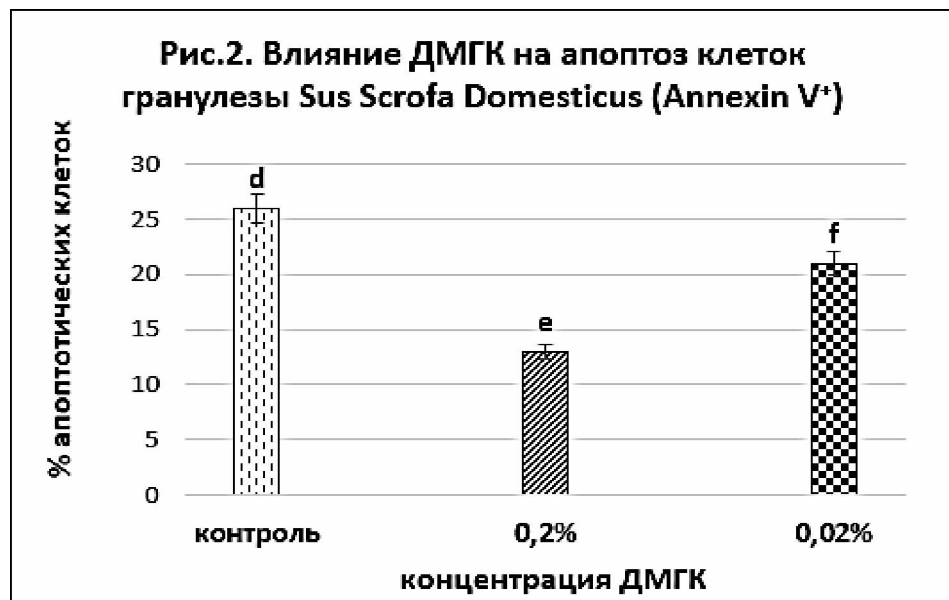
Материал и методика исследований. КГ получали из фолликулов свиней породы Ландрас в возрасте 6-8 месяцев. Критерии отбора яичников, фолликулов и протоколы выделения КГ представлены в методиках, разработанных нами ранее [4]. КГ инкубировали в фосфатно-солевом буфере (Sigma, USA) с 5% фетальной бычьей сыворотки (Sigma, USA) при температуре 37⁰ С, 90% влажности, в течении 3 часов. В экспериментальные группы добавляли 0,2% или 0,02% ДМГК. В отборе концентраций руководствовались рекомендациями производителей препарата [6]. Концентрация КГ в образце - 1,3x10⁶ кл/мл, эксперименты проводили в 3-5 повторностях. По завершении культивирования КГ подвергались цитофлуориметрическому анализу согласно инструкции, представленной в наборе AnnexinV-FITC Apoptosis detection kit («Sigma-Aldrich», США). Анализ образцов проводили на проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beckman-Coulter, США).

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты анализов показателей жизнеспособности и деструктивных процессов в нативных КГ при воздействии ДМГК представлены на рисунках 1-4. Обнаружен достоверный рост доли жизнеспособных клеток в обеих экспериментальных образцах по сравнению с контролем (рис.1).



a:b;a:c,b:c $P < 0,05$ χ^2 -тест

В образцах КГ, содержащих 0,02% ДМГК доля апоптотических клеток превышала таковую в образцах с 0,2% ДМГК на 8% ($P < 0,05$). Введение в среду инкубации ДМГК в обозначенных концентрациях значительно снижало долю клеток в состоянии апоптоза (рис.2).



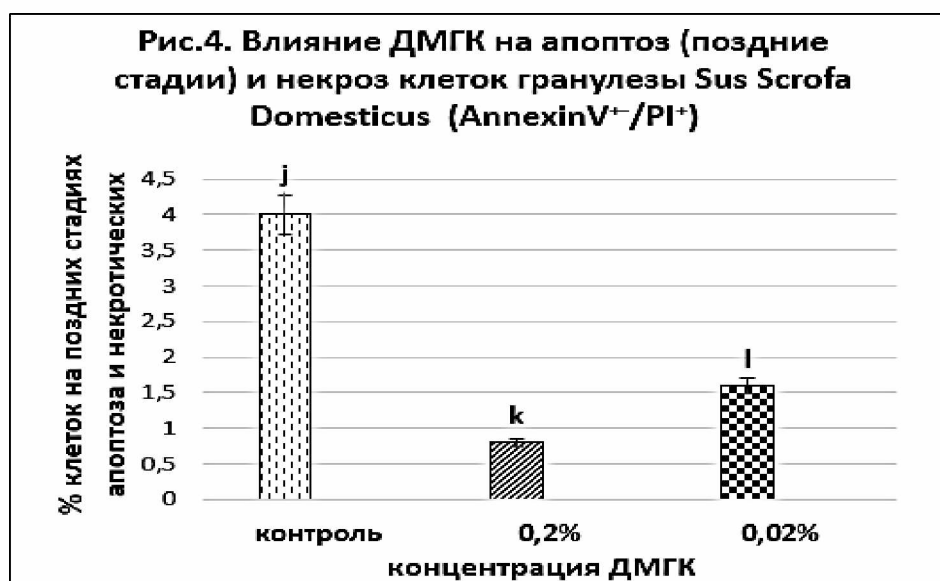
d:e;d:f,f:e $P < 0,05$ χ^2 -тест

Анализ некротических процессов в анализируемых образцах также выявил позитивное влияние ДМГК на сохранность КГ (рис.3). Эффект более выражен при использовании ДМГК в концентрации 0,2%, 4% клеток в

контрольной группе находились на поздних стадиях апоптоза и некроза (рис.4), что оказалось значительно выше аналогичных показателей в экспериментальных группах.



g,i,g,h,i,h $P < 0,05$, χ^2 -тест



j,i,j,l,k,l $P < 0,05$, χ^2 -тест

Заключение. Впервые охарактеризованы деструктивные процессы, имеющие место при воздействии ДМГК на сохранность КГ из овариальных фолликулов свиней. В целом ДМГК в концентрациях 0,2% и 0,02% оказывал позитивное действие на жизнеспособность клеток и уровень деструктивных изменений его хроматина. Эффект носил дозозависимый характер, с более выраженным положительным влиянием ДМГК в концен-

трации 0,2%. Выявленный цитопротекторный эффект ДМГК предполагает возможность его использования при моделировании систем клеточных культур.

Работа выполнена в соответствии с темой Минобрнауки России, номер госрегистрации– АААА-А18-118021590132-9.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoarau-Véhot J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? / J. Hoarau-Véhot et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(1), 181.
2. Ogneva I.V. Mechanical characteristics of mesenchymal stem cells under impact of silica-based nanoparticles / I.V. Ogneva, S.V. et al. // *Nanoscale Res Lett.* 2014. V.9 (1). P. 284.
3. Park M.J. Effective oocyte vitrification and survival techniques for bovine somatic cell nuclear transfer// *Cell Reprogram.* 2015. V. 17(3).P.199-210.
4. Кузьмина Т.И. Методы получения эмбрионов свиней in vitro / Т.И. Кузьмина, Х. Альм, Х. Торнер // СПб – Пушкин. 2008. 41 С.
5. Хонина Т.Г. Фармакологически активные полиолаты кремния и титана и гидрогели на их основе: синтез, свойства, применение: Автореф. дис. докт. хим. наук. – Казань, 2012.
6. Патент 2382046 (RU) Водорастворимые кремнийорганические производные полиолов и гидрогели на их основе /О.Н. Чупахин, Т.Г. Хонина и др. 20.02.10, Бюл. № 5 – 22 с.

CYTOFLUOROMETRIC ANALYSIS OF SUS SCROFA DOMESTICUS GRANULOSE CELLS VALUABILITY AT THE EFFECT OF SILICON DIMETHYLGLYCEROLATE

Stanislavovich T.I., Kuzmina T.I.

All-Russian research institute of genetics and breeding of farm animals – the branch of Federal state budgetary scientific institution "Federal Research Center Livestock – named by Academician L.K. Ernst, Moscow shosse, 55 a, Saint-Petersburg, Pushkin, 196601, Russia
E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

The use of 3D hydrogel-based culture systems in IVM technology is an important component in modeling the conditions for finishing of meiosis in a female gamete. The purpose of this study is to evaluate the effect of silicon dimethylglycerolate (SDMG, IOS of UD RAS) on the viability of porcine granulosa cells (GC) with the prospect of the possibility of its use in cellular reproductive technologies. GC were isolated from antral follicles (3-6 mm in diameter) of pig (Landras breed, 6-8 months of age) ovaries and exposed for 3 hours at 37 ° C in phosphate-buffered saline with 5% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA). Viability indicators were evaluated by flow cytometry using the instructions provided in the AnnexinV-FITC Apoptosis detection kit (Sigma-Aldrich, USA). Samples were analyzed on a Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman-Coulter, USA). The cytoprotective effect 0.2% of SDMG on the viability of GC was revealed. The effect was expressed in a decrease of the proportion of apoptotic cells (13% v.s. 21% in the control, $P < 0.05$), an increase in the number of viable cells by 9% (86% v.s. 77% in the control, $P < 0.05$), and a decrease in the proportion of cells in necrosis state (0.2% v.s. 0.4 % in the control, $P < 0.05$).

Keywords: porcine granulosa cells, silicon dimethylglycerolate, apoptosis, necrosis.

ПОРОДНОСТЬ ХРЯКОВ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Таджиева А.В.¹, Иолчиев Б.С.², Требунских А.²

¹ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6,
г. Москва, РФ, 117198

E-mail: tadzhieva2012@yandex.ru

²ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К.Эрнста, пос. Дубровицы, 60, Г.о. Подольск, Московская
обл., РФ, 142132

Аннотация. *От уровня достоверности оценки биологической полноценности спермопродукции зависят показатели воспроизводства стада. Сперматозоиды отличаются высокой вариабельностью морфометрических показателей. Исследования показывают, что от морфометрических показателей сперматозоидов зависит их криорезистентность, фрагментация ядерной ДНК, активность. Полученные результаты, свидетельствуют, что одним из биотических факторов влияющих на морфометрические показатели сперматозоидов хряков является их породность.*

Ключевые слова: *сперматозоид, морфометрические показатели, хряки, порода.*

Создание современных конкурентоспособных селекционных стад, отвечающих требованиям индустриального свиноводства, является приоритетной задачей отрасли в среднесрочной перспективе [5].

В настоящее время большинство российских производителей, имеющие в своем составе племенные предприятия и товарные хозяйства, работают по принципу «локальной гибридизации» [3, с. 19]. Современное свиноводство основано на гибридизации трех чистых пород: йоркшир или крупная белая (Yorkshire), ландрас (Landrace) и дюрок (Duroc). Продуктивность гибридов свиней выше продуктивности животных, полученных путем промышленного скрещивания, на 8-10%. В США, Канаде, Дании, Голландии, Германии и других странах с интенсивным свиноводством, до 90% товарных свиней являются гибридами. В Российской Федерации по различным оценкам производится от 30 до 50% гибридов [1, с. 20, 3, с. 21].

Ведущие мировые лидеры имеют многоплодие свиноматок более 14 голов в год от одной свиноматки, получают 2,48 опороса, около 30 поросят в год, приросты свиней на откорме превышают 900 г. Такие результа-

ты стали возможны благодаря четкой организации селекционной работы и внедрения современных методов селекции. В мировом племенном свиноводстве начинают применять геномную селекцию. Ее технологии позволяют расшифровать генотип свиней уже при рождении и отбирать для разведения лучших животных, увеличив селекционную точность и надежность оценки прогресса селекционной работы [6].

Оценка племенных качеств свиней производится с использованием метода «BLUP». Разработаны специализированные селекционные индексы для селекции в отцовских и материнских линиях свиней. Значительные исследования проводятся по частной генетике свиньи на хромосомном уровне. Внедряются в практику ДНК-технологии, которые являются альтернативой традиционным методам отбора [3, с. 21].

Исходя из выше изложенного, оценка количественных и качественных показателей спермы будет способствовать эффективному осеменению и получению молодняка.

Детальная оценка семени может быть достигнута только при комплексном исследовании морфологических, функциональных, биохимических и других показателей, характеризующих биологическую полноценность спермиев [4, с. 12, 7, с. 69].

От уровня достоверности оценки биологической полноценности спермопродукции зависят показатели воспроизводства стада.

Определение живых, мертвых и патологических форм спермиев является критерием при отборе спермы у производителей. Однако, в условиях производства зачастую определение наличия патологических форм спермиев проводится не всегда. Сперма, в которой содержится более 30% патологических спермиев, не пригодна для осеменения. К патологическим формам относятся спермии с отклонениями в строении головки, шейки тела и хвоста [2, с. 34].

При определении качества спермы не менее важными показателями являются оценка акросомы спермиев. Акросома является важнейшей органеллой спермия, состояние которой в значительной степени определяет их оплодотворяющую способность. Это связано с тем, что внутри акросомы содержится фактор первого этапа оплодотворения – фермент гиалуронидаза, необходимый для разрыхления клеток лучистого венца яйцеклет-

ки, скрепленного гиалуроновой кислотой. Кроме того, в акросоме содержится фермент акрозин, который необходим для проникновения спермия через прозрачную оболочку яйцеклетки. Морфологически акросома формирует передний край головки спермия и может быть выявлена микроскопически с использованием фазового контраста или флюоресценции. Для обеспечения оплодотворяющей способности спермиев необходима морфологически нормальная акросома, находящаяся в виде колпачка, плотно обтягивающая переднюю половину головки спермия. Передний край ее гладкий, с одной стороны образует заметное утолщение [4, с. 12, 7, с. 69].

Целью данного исследования являлось изучение морфометрических показателей сперматозоидов хряков в зависимости от породы.

Материалы и методы Материалом для исследования служили сперма разных пород: крупная белая (n=52), дюррок (n=24), ландрас (n=37). Сбор спермы проводили мануальным методом. Активность и концентрацию сперматозоидов определяли с помощью компьютерной технологии (программное обеспечение «ЗооСперм»). Для окрашивания мазков использовали набор для быстрого окрашивания биопрепаратов «Дифф-Квик» Диахим (Россия). Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью пакета программ SPSS 15. Для изучения влияния фактора породной принадлежности проводили однофакторной дисперсионный анализ. Разницы между группами определяли с помощью теста Тьюки.

Результаты исследований. Для диагностики фертильности хряков-производителей изучили морфометрические показатели сперматозоидов. Сперматозоиды отличаются высокой вариабельностью этих показателей (табл. 1).

Таблица 1. **Морфометрические показатели сперматозоидов хряков-производителей разных пород**

Показатели	Породная принадлежность		
	Крупная белая	Ландрас	Дюррок
Длина сперматозоида	52,88±1,21	52, 62±1,26	51,83±2,27
Длина головки	9,47±0,33	9,33±0,29	9,35±0,27
Длина жгутика	43,47±1,27	43,42±1,87	42,22± 2,92

Ширина головки	5,04±0,26	4,58±0,31	4,63±0,33
Периметры головки	22,95±0,74	23,24±0,90	23,19±0,85
Площадь головки	38,79±1,25	39,28±1,53	39,20±1,44

Общая длина сперматозоидов в среднем составила $52,55 \pm 1,55 \mu\text{m}$ (крупная белая $52,83 \pm 1,21$, ландрас $52,62 \pm 1,26$ и дюрок $51,83 \pm 2,27$). При этом у крупной белой породы показатели выше такие как: длина сперматозоида на $1,05 \mu\text{m}$ и длина жгутика на $1,25 \mu\text{m}$ по отношению к породе дюрок ($p < 0,05$); длина головки на $0,14 \mu\text{m}$ по отношению к породе ландрас ($p < 0,05$) (табл.1). Ширина головки сперматозоидов у крупной белой породы была наибольшая и составила $5,04 \pm 0,26$, что больше на $0,41 \mu\text{m}$ чем у дюрока и на $0,46 \mu\text{m}$, чем у ландраса.

Однако, периметр головки $23,24 \pm 0,90$ и площадь головки $39,28 \pm 1,53$ наивысшим были зафиксированы у породы ландрас ($p < 0,05$).

Заключение. Наше исследование подтверждает гипотезу влияния породности хряков на морфометрические показатели сперматозоидов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гибридизация в свиноводстве [Электронный ресурс]. URL: https://vuzlit.ru/696028/gibridizatsiya_svinovodstve (дата обращения: 19.08.2019 г).
2. Иолчиев, Б.С., Багиров, В.А., Кленовицкий, П.М., Кононов, В.П., Таджиева, А.В. Индекс фрагментации ДНК хроматина в сперматозоидах при оценке качества семени у быков-производителей /Б.С. Иолчиев, В.А. Багиров, П.М. Кленовицкий, В.П. Кононов, А.В. Таджиева //Сельскохозяйственная биология. – 2012. -№ 4. –С. 31-35.
3. Зарубежный и отечественный опыт разработки и применения мер и инструментов поддержки по созданию отечественных конкурентоспособных пород свиней [Электронный ресурс] Информационный отчет / ФГБНУ «Росинформагротех»; Мишуров, Н.П., Кузьмин, В.Н, Голубев, И.Г., Маринченко, Т.Е, Кузьмина, Т.Н., Чавыкин, Ю.И., Франкевич, В.С. – Правдинский, 2018. – https://rosinformagrotech.ru/images/pdf/otchet_svino_vod_s_tvo_2018 (дата обращения 05.08.2019г).
4. Каряка, В.В., Хохлов, А.М. Оценка воспроизводительных особенностей хряков и свиноматок современных генотипов в программах гибридизации /В.В. Каряка, А.М. Хохлов // Молодой учёный. - 2015.- № 5.2. (85.2). - С 11-14. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.moluch.ru> (дата обращения: 22.08.2019).
5. Медведева А. Мировые лидеры свиноводства [Электронный ресурс]. URL: <https://www.agroxxi.ru/zhivotnovodstvo/stati/mirovye-liderysvinovodstva.html> (дата обращения: 12.08.2019).
6. Проблемы селекции и гибридизации свиней [Электронный ресурс]. URL: http://pticainfo.ru/article/?ELEMENT_ID=6613 (дата обращения: 19.08.2019г).
7. Хлопицкий, В.П., Нарижный, А.Г., Сорокина, Е.О. Основные аспекты технологии искусственного осеменения в системе воспроизводства свиней /В.П. Хлопицкий, А.Г. Нарижный, Е.О. Сорокина // Свиноводство. – 2012. - №5. – С. 67-70.

BREED OF BOARS AND MORPHOMETRIC PARAMETERS OF SPERMATOZOA

Tadzhieva A.V.¹, Iolchiev B.S.², Trebunskiy A.²

¹RUDN University, Miklukho Maklaya st. 6, Moscow, 117198, Russia

²L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry

Dubrovitsy 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132 Russia

Abstract. *The level of reliability of the assessment of biological usefulness of sperm production depends on the indicators of reproduction of the herd. The spermatozoa are characterized by high variability of morphometric characteristics.*

Studies show that cryoresistance, nuclear DNA fragmentation, and activity of sperm cells depend on their morphometric parameters. Thus, our study proves that one of the biotic factors affecting the morphometric characteristics of boar sperm is their breed.

Keywords: *spermatozoa, morphometric parameters, a male pig, breed. The spermatozoa are characterized by high variability of morphometric characteristics.*

УДК 577.2:579.25:579.6+578.28+571.27

РАЗРАБОТКА ВЕКТОРА ДОСТАВКИ CRISPR/CAS 9 СИСТЕМЫ ПУТЁМ МОДИФИКАЦИИ T1 ПЛАЗМИД АГРОБАКТЕРИИ (*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*) (IN SILICO)

Тарасов С.С.¹, Веселов А.П.^{1,2}, Крутова Е.К.¹

¹ФГБОУ ВО Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, г.

Нижний Новгород, Россия

E-mail: tarasov_ss@mail.ru

²ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия

Аннотация. *Проводили моделирование T1 плазмиды агробактерии в программе Snapgene. В область T ДНК встраивали гены: CRISPR кассету, содержащую спейсеры идентичные протоспейсерам консервативных участков вируса иммунодефицита человека (HIV 1), гены, кодирующие Cas 9 нуклеазу, гены, кодирующий рецепторы вируса CCR5 и CXCR4, гены, кодирующий белки оболочки и капсида, ген обратной транскриптазы, осуществляющей только сборку CRISPR/Cas комплекса. Полученные плазмиды предлагается использовать для трансгенеза растений с целью получения антивирусных частиц против HIV 1.*

Ключевые слова: *CRISPR/Cas 9 система, HIV, агробактериальная трансформация растений, T1 плазида, вирусные векторы доставки генов.*

Введение. Система CRISPR/Cas была открыта относительно не давно, являясь по сути иммунной системой прокариот. У бактерии и архей

CRISPR кассета состоит из повторяющихся участков, с которой считывается её РНК (RNA) копия. Спираль ДНК (DNA) раскручивается потом РНК по принципу комплементарности узнает этот участок и CRISPR/Cas система разрезает обе нити ДНК. Возникает двунитевой разрыв. Чужеродная DNA фага попадая в клетку бактерии подвергается нуклеазной рестрикции. После чего кусочки, полученные в результате этого процесса, встраиваются в CRISPR-кассету тем самым формируя новые спейсеры. Данная бактерия после вышеупомянутого приобретает иммунитет к вирусу. С измененной CRISPR-кассеты начинается синтез РНК и идет процесс транскрипции. Молекула РНК начинает взаимодействовать с tracr-RNA и из них образуется sg-RNA, которая в свою очередь взаимодействует с белком Cas. Cas нуклеаза взаимодействует с sg-RNA и направляется к вирусу, разрезая его. Когда DNA фага снова появляется в клетке, то система быстро срабатывает, разрезая чужеродную DNA. С лева или с права от этого участка не дальше 10 нуклеотидов должна быть PAM последовательность, к которой прикрепляется Cas нуклеаза. Каждая Cas нуклеаза имеет свой специфический PAM [1, 3, 4, 6, 8].

Данная система оказалась высокоэффективна в современной генной инженерии. Её начали стремительно исследовать в сельском хозяйстве, медицине, фармакологии, ветеринарии и других областях. Одним из наиболее перспективных направлений применения данной системы является борьба с вирусами растений, животных и человека которые встраиваются в геном хозяина. Наиболее актуальным и острым для общества является борьба с вирусом иммунодефицита человека, полного излечения от которого в настоящее время невозможно, однако показано возможность вырезания провируса из DNA лейкоцитов у модифицированных мышей [7]. Одним из главных проблем применения CRISPR/Cas системы является её доставка к месту работы, т.е. в целевые клетки мишени.

Цель работы: разработать *in silico* систему создания антивируса синтезирующий sg RNA-Cas 9 комплекс в клетках мишенях на примере вируса иммунодефицита человека (HIV 1).

Материал и методика исследований. Геном про вируса HIV 1 анализировали в системе **nucleotides** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), протоспейсеры подбирали путём анализа CRISPR кассет в системе

<https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/crispr/> совпадения спейсера и протоспейсера осуществляли в специально созданной программе, PAM последовательность определяли согласно методике F. J. M. Mojica et al., 2009 с последующей визуализацией в **WebLogo3** [5]. Модификацию Ti плазмид агробактерии проводили в программе **Snapgene**.

Результаты исследований и их обсуждения. Встраиваемый участок содержал CRISPR кассету идентичную спейсеру консервативных участков HIV 1 минимум в двух местах, гены, кодирующие Cas нуклеазу, гены, кодирующий рецепторы вируса CCR5 и CXCR4, гены, кодирующий белки оболочки и капсида, гены обратной транскриптазы осуществляющую только сборку CRISPR/Cas комплекса, для этого между генами оболочки рецепторов и CRISPR/Cas встраивали особые участки иницирующие обратную транскрипцию только CRISPR/Cas RNA. Геном антивируса встраивается в растительный геном путём стандартной процедуры трансгеноза [2]. Далее производится селекция генно-модифицированных растений и их микроклональное размножение. Взрослое растение содержат частицы антивируса, извлечение проводится путём фракционного разделения тканей растений. Из фракций, содержащих высокую концентрацию антивируса, готовится препарат, уничтожающий HIV 1 вырезая провирус из генома клеток человека. Проникновение вируса в поражённой клетки осуществляется аналогичным с HIV путём, т.е. с участием рецепторов CCR5 и CXCR4. Далее осуществляется работа CRISPR/Cas комплекса. Т.к. геном антивируса не содержит никаких иных генов то его репликация и сборка вирусных частиц в поражённых HIV клетках невозможно. Единственная функция антивируса — вырезать провирус HIV 1. совместно с ВААРТ (высокоэффективная антиретровирусная терапия) появляется возможность полностью избавить организм от вируса иммунодефицита. Проверка успешности трансгеноза проверяется ПЦР на наличие генома антивируса. Подбор праймеров осуществляется в программе <https://www.primer3.ut.ee>, проверка успешности сборки осуществляется выше упомянутым образом. Первичные испытания должны проводиться на клеточных культурах имеющие рецепторы к ВИЧ: CD4 + лимфоцитах, макрофагах, глиальных клетках (клетки спутники нейронов) содержащих провирус HIV 1. В

случае успешного проникновения антивируса и успешного синтеза комплекса sg RNS Cas 9 можно говорить, что антивирус работает, а HIV может быть полностью уничтожен.

Заключение. Разработан биоинформатический инструмент создания антивируса HIV 1, найдены протоспесеры CRISPR/Cas 9 комплекса и РАМ последовательности, которые могут быть использованы против HIV. Создана генетическая конструкция Ti плазмиды агробактерии (*Agrobacterium tumefaciens*) (in silico) которую можно использовать для генетической трансформации растений. Встроенные гены T DNA участка плазмиды способной образовывать частицы антивируса HIV 1, проникая в клетки мишени животных и человека способны синтезировать sg RNS Cas 9 комплекс и вырезать провирус из генома.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гоглева. А. А. Исследование CRISPR-систем прокариотического иммунитета методами сравнительной геномики. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук, 03.01.09 - математическая биология, биоинформатика. 2016 г. 101 с.
2. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под редакцией Вл. В. Кузнецова, В. В. Кузнецова, Г. А. Романова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2011 г. 487 с.
3. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий // ACTA NATURAE. 2014 г. Том 6. №3 (22) С. 20 – 42
4. Шмаков С.А. Разработка биоинформатического подхода для поиска новых CRISPR-Cas систем. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук, 03.01.09 - математическая биология, биоинформатика. 2017 г. 104 с.
5. F. J. M. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, and C. Almendros, “Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system.,” *Microbiology*, vol. 155, no. Pt 3, pp. 733–740, Mar. 2009.
6. M. M. Harrison, B. V. Jenkins, K. M. O’Connor-Giles, and J. Wildonger, “A CRISPR view of development,” *Genes Dev.*, vol. 28, no. 17, pp. 1859–1872, 2014.
7. Prasanta K. Dash, Rafal Kaminski, Ramona Bella, Hang Su , Saumi Mathews , Taha M. Ahooyi, Chen Chen, Pietro Mancuso, Rahsan Sariyer, Pasquale Ferrante, Martina Donadoni, Jake A. Robinson, Brady Sillman , Zhiyi Lin , James R. Hilaire , Mary Banoub , Monalisha Elango , Nagsen Gautam, R. Lee Mosley, Larisa Y. Poluektova, JoEllyn McMillan, Aditya N. Bade, Santhi Gorantla, Ilker K. Sariyer, Tricia H. Burdo, Won-Bin Young, Shohreh Amini, Jennifer Gordon, Jeffrey M. Jacobson, Benson Edagwa, Kamel Khalili & Howard E. Gendelman Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice // NATURE COMMUNICATIONS. 2019. 10:2753 | <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10366-y> (www.nature.com/naturecommunications)
8. Tautvydas Karvelis, Giedrius Gasiunas, Joshua Young, Greta Bigelyte, Arunas Silanskas, Mark Cigan and Virginijus Siksnys. Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements // *Genome Biology*. Article number: 253. Pub-

DEVELOPMENT OF A DELIVERY VECTOR OF CRISPR / CAS 9 SYSTEMS FOR MODIFICATION OF TI PLASMID AGROBACTERIUM (AGROBACTERIUM TUMEFACIENS) (IN SILICO)

Tarasov S.S.¹, Veselov A.P.^{1,2}, Krutova E.K.¹

¹Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, Nizhny Novgorod, Russia
E-mail: tarasov_ss@mail.ru

²The National Research Nizhny Novgorod State University. N.I. Lobachevsky, Nizhny
Novgorod, Russia

Annotation. *Ti plasmid Agrobacterium was simulated using the Snapgene program. Genes were inserted into the T region of DNA: a CRISPR cassette containing spacers identical to the protospacers of conserved HIV 1 sites, genes encoding Cas 9 nuclease, a gene encoding CCR5 and CXCR4 virus receptors, a gene encoding envelope and capsid proteins, a reverse transcriptase gene performing CRISPR assembly only / Cas complex. The resulting plasmids are proposed to be used for plant transgenesis in order to obtain anti-virus particles against HIV 1.*

Keywords: CRISPR / Cas 9 system, HIV, agrobacterial transformation of plants, Ti plasmid, viral gene delivery vectors.

УДК 579.62: 579.253.4

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ В ГЕНОМАХ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Терлецкий В.П.^{1,2}, Тыщенко В.И.¹

¹ВНИИГРЖ - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Московское ш. 55а, Санкт-Петербург-Пушкин, РФ, 196625

²ГАОУ ВО ЛО «Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина»
Петербургское ш. 10, Санкт-Петербург-Пушкин, РФ, 196605
E-mail: valeriter@mail.ru

Аннотация. В материале рассмотрены вопросы использования генотипирования в решении вопросов молекулярной эпизоотологии, таких как выявление путей передачи инфекции и идентификация источника патогена на примере штаммов кишечной палочки. В ходе предыдущих исследований на ряде патогенных микроорганизмов был разработан метод генотипирования, основанный на идее двойного расщепления и избирательного мечения фрагментов ДНК (ДРИМ). Метод был использован для выявления вариаций в последовательно-

стях геномной ДНК кур и индеек промышленных птицефабрик. Показаны и обсуждены конкретные результаты генотипирования изолятов кишечной палочки. В частности, 18 изолятов патогена, выделенных от павших и больных кур, распределились в семи генетически отличающихся штаммах. Генотипирование бактерии, выделенной от индеек (19 изолятов) показало существование 17 штаммов. Таким образом, доказано высокое генетическое разнообразие бактериальных штаммов, циркулирующих у птиц. У индеек выявлено всего две пары изолятов с идентичными генетическими профилями, причем эти пары представляли собой изоляты, выделенные из разных органов одной особи. Интересным представляются генетический профиль (количество и распределение фрагментов ДНК на фильтре) изолята бактерии №19, выделенной из индейки №1 птичника №12, который оказался близким к двум идентичным изолятам 1с и 2п из этой же особи (разные органы). В данном случае можно предположить появление мутаций при размножении бактерии в разных органах. Доказаны пути передачи патогенных штаммов кишечной палочки между отдельными особями в пределах одного птичника, а также между птицефабриками.

Ключевые слова: профилактическая ветеринария, кишечная палочка, генотипирование, штаммы.

Введение. Бактериальные заболевания у сельскохозяйственной птицы наносят существенный урон отрасли. Часто патогенные бактерии осложняют течение вирусных болезней, вызывая отход птицы. ИхЭту проблему рассматривают также и с социальной и медико-биологической точки зрения, так как птицы могут быть носителями патогенных для людей микроорганизмов, основными из которых являются кишечная палочка, сальмонеллы, клостридии, кампилобактерии, шигеллы и другие [1].

Актуальность исследований по разработке и использованию высокоэффективного метода генотипирования штаммов патогенных микроорганизмов заключается в необходимости быстро находить пути распространения, а также выявлять источники инфекции. Циркулирование возбудителей во внешней среде приводят к периодическим вспышкам заболеваний. Использование современных методов генотипирования позволяет ответить на ряд вопросов эпизоотологического плана, в частности, каким путем происходит передача возбудителя и где находится источник инфекции [3]. Эти сведения необходимы для предотвращения новых вспышек заболевания. Если генотипы двух сравниваемых изолятов бактерий совпадают, то делают вывод об эпизоотическом контакте особей, т.е. о передаче инфекции [3; 4]. Аналогично, используя данные о времени появления инфекционных очагов и сведения об идентичности/отличии генетических профилей бактериальных изолятов, устанавливают источник инфекции

(место, откуда патоген распространяется на другие объекты). Ранее нами был предложен метод генотипирования, основанный на двойном расщеплении и избирательном мечении фрагментов ДНК (ДРИМ), который доказал свою эффективность на примере нескольких важных патогенов и бактерий-антагонистов [2].

Цель работы - выяснение генетического разнообразия и генотипирование изолятов кишечной палочки, выделенных от кур и индеек, для определения путей передачи инфекции.

Материал и методика. Материалом исследования служила чистая культура бактериальных изолятов *E.coli*, полученных из различных органов больных и павших кур породы Хайсекс коричневый (29 изолятов от 9 особей). Высевы на мясопептонный бульон делали из отдельных колоний, выращенных в чашках Петри на твердой питательной среде. Источником микроорганизмов служили сердце, печень, легкие, селезенка, яичные фолликулы, двенадцатиперстная и слепая кишка больных и павших кур. В другом эксперименте использовали культуры кишечной палочки (19 изолятов), выращенные от больных и свежепавших индеек.

Существует множество методов генотипирования микроорганизмов. Некоторые из них отличаются высокой разрешающей способностью (секвенирование) и, одновременно, дороговизной. Другие – дают низкое разрешение и могут использоваться лишь для предварительного анализа эпизоотологической ситуации [4]. Нами предложена альтернативная методика генотипирования, основанная на двойном расщеплении геномной ДНК одновременно двумя ферментами рестрикции и избирательном мечении получаемых фрагментов ДНК (ДРИМ). В качестве метки выступает биотинилированный дезоксицитозинтрифосфат (Bio-dCTP). Избирательность мечения достигается мечением только небольшой части фрагментов, несущих 3-штрих усеченные концы, получаемых в результате использования фермента *XbaI*, которые могут включать метку с помощью *Taq*-полимеразы. Второй фермент рестрикции (*PstI*) необходим только для уменьшения размера фрагментов ДНК до приемлемого уровня с целью их разделения в агарозном геле. Следующим этапом процедуры является быстрый перенос всех фрагментов ДНК с геля на нейлоновый фильтр и выявление метки биотина. Перенос ДНК проводится в специальном аппа-

рате, создающем вакуум в 40 мБар. Детекция ДНК проводится с применением конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза, который специфично связывается с местами на фильтре, где локализуются меченые фрагменты ДНК. Красители нитро-синий тетразолий (NBT) и бром-хлор-индолил-фосфат (BCIP) в присутствии щелочной фосфатазы дают цветную реакцию с образованием нерастворимого продукта в виде четко различимых полос (фрагментов ДНК). Конечный результат проявляется в виде набора четко различимых фрагментов ДНК, количество и распределение которых специфично для каждого бактериального штамма [2].

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты генотипирования проявлялись в виде «штрих-кода» четко различимых фрагментов ДНК в диапазоне 400 – 23000 пар оснований. По результатам генотипирования 18 изолятов *E.coli*, выращенных от кур, было выявлено 7 различных генотипов, включая близкородственные варианты. Изучение молекулярно-эпизоотологических вопросов на примере птицефабрик позволило выявить несколько групп идентичных бактериальных изолятов, имеющих одинаковый профиль всех фрагментов ДНК. Самой большой группой идентичных штаммов оказались изоляты под номерами 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 и 14, которые были отнесены к генотипу 1. Все перечисленные 12 изолятов были получены из разных органов четырех кур, содержащихся в одном птичнике. Идентичность изолятов свидетельствует о возможном перезаражении разных кур друг от друга в пределах одного птичника.

В таблице представлены данные второго эксперимента, в котором генотипировали 19 патогенных изолятов кишечной палочки, выделенных из органов свежепавших и вынужденно убитых индеек. Генотипирование позволило выявить 17 бактериальных генотипов. Генотип 1 включал два генетически идентичных изолята - 1с и 2 п, которые были выделены из сердца и печени индейки птичника №12, соответственно. Идентичными были также два изолята 11с и 20д, выделенные из сердца и двенадцатиперстной кишки одной индейки из птичника №14. Сравнение количества и распределения фрагментов ДНК на фильтре позволило найти изолят бактерии №19, выделенной из двенадцатиперстной кишки индейки №1 из

птичника №12, который оказался генетически близким к двум идентичным изолятам 1с и 2п из этой же особи.

Таблица. Результаты ДРИМ-генотипирования изолятов *E.coli*, выделенных из различных органов индеек

номера генотипов	номера идентичных изолятов*	номера генетически близких изолятов*	номера генетически удаленных изолятов*	№ птичника / № особи
1	1с; 2п			12/1
1а		19д (отличие на 3 фрагмента от генотипа 1)		
2			3п	1/1
3			12д	
4			4с	13/1
5			5п	
6			16д	
7			6с	13/3
8			7п	
9			17д	13/2
10			8п	14/2
11			9ж	
12			10с	
13			15д	
14	11с; 20д			14/3
15			14д	14/1
16			21д	14/4

*Обозначения: с - сердце, п - печень, ж – желчь.

Различие составило всего 3 фрагмента ДНК. В этом случае можно предполагать возникновение мутаций у бактерий, растущих в разных органах одного и того же макроорганизма. Во всех остальных случаях различия составляли больше 10 фрагментов ДНК, что подтверждает природное генетическое разнообразие бактерий *Escherichia coli* и циркулирование большого количества патогенных штаммов.

Заключение. Таким образом, предлагаемый метод генотипирования ДРИМ является эффективным инструментом идентификации бактериаль-

ных штаммов, решения эпизоотологических вопросов в профилактической ветеринарии (выявление путей распространения инфекции, идентификация источника патогена и т.д.). Доказано циркулирование в птичниках большого числа генетически различающихся штаммов кишечной палочки.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жебрун А.Б., Мукомолов С.Л., Нарвская О.В. Генотипирование и молекулярное маркирование бактерий и вирусов в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии-2011. 4:28–36.
2. Терлецкий В. П., Тыщенко В. И., Новикова И. И., Бойкова И. В., Тюлебаев С.Д., Шахтамиров И. Я. Эффективный метод генетической паспортизации штаммов *Bacillus subtilis* – перспективных продуцентов биопрепаратов//Микробиология-2016.85:50-55. DOI: 10.7868/S0026365616010134
3. Lukinmaa, S., U-M. Nakari, Eklund M., and A. Siitonen. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens//APMIS-2004. 112:908-929.
4. Van Belkum. Guidelines for the validation and application of typing methods for the use in bacterial epidemiology//Clin. Microbial. Infect. -2007. 13. Suppl. 3:1–46.

GENETIC VARIATIONS IN GENOMES OF PATHOGENIC STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* IN POULTRY

Terletskiy V.P.^{1,2}, Tyshchenko V.I.²

¹Pushkin Leningrad State University, Peterburgskoye sh. 10, St. Petersburg-Pushkin, 196605 Russia

²RRIFAGB – Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Moscovskoye sh. 55a, St. Petersburg-Pushkin, 196625 Russia
E-mail: valeriter@mail.ru

Abstract. *The presented material is focused on the use of genotyping in solving molecular epizootological issues, such as identifying infection transmission routes and pointing out the pathogen source using E. coli strains as an example. In previous studies on a number of pathogenic microorganisms, a genotyping method was developed based on the idea of double digest and selective labeling of DNA fragments (DDSL). The method was used to detect variations in the genomic DNA sequences in chicken and turkey under industrial poultry farm settings. The specific results of Escherichia coli isolates genotyping are shown and discussed. In particular, 18 pathogen isolates collected from dead and sick chickens were distributed in seven genetically different strains. Genotyping of bacteria isolated from turkeys (19 isolates) showed the existence of 17 strains. Thus, a high genetic diversity of bacterial strains circulating in birds has been proven. In turkeys, only two pairs of isolates with identical genetic profiles were identified, and these pairs were isolates collected from different organs of the same individual. An interesting point is that the genetic profile (number and distribution of DNA fragments on the filter) of bacterial isolate No. 19 collected from turkey No. 1 kept at the house No. 12, turned out to be close to two identical isolates named 1c and 2p from the same individual (but different organs). In this case, we can assume the appearance of mutations during the reproduction of bacteria in different bird organs. The routes of transmission of*

pathogenic strains of Escherichia coli between individuals within the same house, as well as between poultry farms, have been demonstrated.

Keywords: preventive veterinary medicine, *Escherichia coli*, genotyping, strains.

УДК 636.2:619:579.881.31:577.21

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ АНАПЛАЗМОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *ANAPLASMA MARGINALE*

Федорина Е.А., Ковальчук С.Н.

ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»,
127422, Москва, ул. Костякова, дом 12, стр. 4.

E-mail: efedorina@inbox.ru

Аннотация. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) – внутриэритроцитарный патоген, который является возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота, приносящего значительный экономический ущерб животноводству во всем мире. В статье представлены результаты молекулярно-генетического исследования российских изолятов *A. marginale*, полученных из образцов крови зараженных животных. Генетическое разнообразие *A. marginale* оценивалось на основе полиморфизма гена *msp1α*, кодирующего белок внешней мембраны. Часть гена, содержащая tandemные повторы и микросателлиты была амплифицирована, клонирована и секвенирована для 17 образцов. Молекулярная характеристика изолятов *A. marginale* выявила значительное генетическое разнообразие. Было обнаружено 16 новых генотипов *A. marginale*, восемь новых tandemных повторов, найдены шесть генотипов микросателлитов, один из которых ранее не был описан. Семь животных (41%) были заражены *A. marginale* нескольких разных генотипов.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; анаплазмоз; *Anaplasma marginale*; *msp1α*; генетическое разнообразие.

Введение. *Anaplasma marginale* (порядок Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae) – облигатный внутриклеточный паразит, вызывающий анаплазмоз крупного рогатого скота и распространенный в разных странах мира [1]. Заболевание проявляется лихорадкой, анемией, потерей веса и снижением продуктивности, может привести к гибели животного. Кроме домашнего скота к анаплазмозу восприимчивы и другие жвачные. Животные, перенесшие острую форму заболевания, становятся постоянными носителями инфекции и служат резервуарами ее распространения. *A. mar-*

ginale переносится клещами, механически кровососущими насекомыми или при использовании загрязненных кровью инструментов, а также трансплацентарно. Известно много штаммов *A. marginale*, которые отличаются по генотипу, антигенным характеристикам и переносимости клещами [1, 5]. Штаммы *A. marginale* характеризуют с помощью белков внешней мембраны (MSP), белок MSP1 α участвует в адгезии и в переносе *A. marginale* клещами и у разных штаммов различается числом и последовательностью tandemных повторов. Генетическое разнообразие *A. marginale*, изученное на основе последовательности MSP1 α , описано для изолятов из многих стран мира, известно более 250 вариантов tandemных повторов MSP1 α [2, 5, 6]. В России анаплазмоз крупного рогатого скота зарегистрирован во многих областях. О генетическом разнообразии *A. marginale* в России данных нет.

Цель работы - молекулярная характеристика и оценка генетического разнообразия изолятов *A. marginale*, полученных из образцов крови крупного рогатого скота из Московской и Саратовской областей.

Материалы и методы. Для получения фрагмента гена *msp1 α* , содержащего tandemные повторы пользовались методом полувложенной ПЦР как описано ранее [2]. В качестве матрицы использовалась ДНК, полученная из образцов крови инфицированных коров, в которых ДНК *A. marginale* была идентифицирована нами ранее с помощью ПЦР в реальном времени на основе гена *msp4* [3]. Полученные ампликоны длиной от 300 п.н. до 1500 п.н. вырезали из геля, очищали и клонировали в *E.coli* DH5 α . Плазмиды, содержащие вставку соответствующего размера, были выделены из трех независимых клонов и секвенированы в обоих направлениях. Анализ полученных последовательностей проводился с помощью программ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Последовательности выравнивались, редактировались и анализировались с помощью пакета программ MEGA 6.0 [4]. При анализе tandemных повторов использовалась номенклатура, предложенная ранее [5, 6]. Анализ последовательностей микросателлитов проводили согласно Estrada-Peña et al. [7]. Для филогенетического анализа пользовались пакетом программ MEGA 6.0 [4]. Новые последовательности *msp1 α* *A. marginale* были зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами MG570149 – MG570164.

Результаты и обсуждение. Хотя анаплазмоз крупного рогатого скота все чаще встречается в разных областях России, возбудитель его почти не изучен. Генетическая вариабельность изолятов *A. marginale* в нашей работе оценивалась на основе полиморфизма гена *msplα*. Образцы, в которых с помощью ПЦР в реальном времени была обнаружена ДНК *A. marginale* [3], были использованы для получения фрагмента гена *msplα*, несущего тандемные повторы. Область тандемных повторов *msplα* была амплифицирована, клонирована и секвенирована для 17 образцов. В результате анализа структуры вариабельного участка гена *msplα* выявлены 11 новых генотипов *A. marginale* в образцах из Московской области и 5 в образцах из Саратовской. Преобладающим был генотип RM8, который был найден в шести образцах (35%). Были обнаружены 8 новых повторов (ru1 - ru8). Все повторы состоят из 28 аминокислот, число повторов в разных генотипах варьирует от одного до шести. Большинство из них встречается в разных генотипах и изолятах *A. marginale*. Наиболее часто встречался повтор ru6, который был найден в 9 генотипах и 12 изолятах. Интересно, что все обнаруженные нами тандемные повторы и генотипы встречаются только в российских изолятах *A. marginale*. В нашей работе 41% животных (7 из 17) были инфицированы *A. marginale* нескольких разных генотипов. Микросателлиты локализованы в 5'-нетранслируемой области гена *msplα* и имеют следующую структуру: (G/A TTT)_m (GT)_n T ATG [7]. В результате анализа микросателлитов гена *msplα* нами были обнаружены генотипы J, G, E в образцах, полученных от животных в Московской обл. и генотипы A, B и L (новый) в образцах из Саратовской области. Филогенетический анализ российских изолятов *A. marginale* показал дивергенцию между исследованными образцами, которые формируют 4 отдельные группы.

Заключение. Молекулярная характеристика изолятов *A. marginale* показала значительное генетическое разнообразие. Шестнадцать новых генотипов *A. marginale* было обнаружено в образцах крови 17 животных. Были найдены восемь новых тандемных повторов, выявлены шесть генотипов микросателлитов, один из которых ранее не был описан. Семь животных (41%) были заражены разными штаммами *A. marginale*. Получен-

ные данные могут быть использованы при проведении эпидемиологического мониторинга анаплазмоза и разработке мер борьбы и профилактики.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., Meléndez, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle.//Clin. Microbiol. Rev. -2003. 16:698–712.
2. Castaneda-Ortiz, E.J., Ueti, M.W., Camacho-Nuez, M., Mosqueda, J.J., Mousel, M.R., Johnson, W.C., Palmer, G.H. Association of *Anaplasma marginale* strain superinfection with infection prevalence within tropical regions.//PLoS One.-2015. 10: e0120748.
3. Косовский Г.Ю., Ковальчук С.Н., Федорина Е.А., Архипова А.Л., Ларионова О.С., Красникова Е.С. Молекулярно-генетическая идентификация и типирование российских изолятов *Anaplasma marginale*.//Аграрный научный журнал.- 2017. 7:29-32.
4. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.//Mol. Biol. Evol. -2013. 30:2725-2729.
5. de la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M.S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A.J., Rodríguez, S.D., Jiménez, R., Vicente, J., Moretta, R., Torina, A., Almazán, C., Mbatia, P.M., de Echaide, S.T., Farber, M., Rosario-Cruz, R., Gortazar, C., Kocan, K.M. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences.//Vet. Microbiol. – 2007. 119:382–390.
6. Cabezas-Cruz, A., Passos, L.M.F., Lis, K., Kenneil, R., Valdés, J.J., Ferrolho, J., Tonk, M., Pohl, A.E., Grubhoffer, L., Zweggarth, E., Shkap, V., Ribeiro, M.F.B., Estrada- Peña, A., Kocan, K.M., de la Fuente, J. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis.//Plos. One.-2013. 8:1-13.
7. Estrada-Peña, A., Naranjo, V., Acevedo-Whitehouse, K., Mangold, A.J., Kocan, K.M., de la Fuente, J. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance.//BMC Biol. – 2009. 7:57.

GENETIC DIVERSITY OF RUSSIAN ISOLATES OF THE CAUSATIVE AGENT OF BOVINE ANAPLASMOSIS *ANAPLASMA MARGINALE*

Fedorina E.A., Kovalchuk S.N.

Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology, ul. Kostyakova 12/4, Moscow 127422, Russia
e-mail: efedorina@inbox.ru

Abstract. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) is a tick-borne intraerythrocytic pathogen of cattle and a causative agent of bovine anaplasmosis. Outbreaks of anaplasmosis cause economic losses to the cattle industry over the world. The article presents the results of molecular assay of Russian isolates *A. marginale* obtained from blood samples of cattle. The genetic diversity of *A. marginale* strains was analyzed based on the *msp1a* gene encoding the major surface protein. The partial *msp1a* gene containing tandem repeat sequences and 5'-UTR microsatellite was amplified, cloned and sequenced for 17 *A. marginale* positive samples. The molecular characterization of *A. marginale* isolates based on the *msp1a* showed the high genetic diversity. Sixteen new genotypes of *A. marginale* and eight novel tandem repeats were found, six microsatellite genotypes were identified, and one of them described for the first time. Seven animals (41%) were infected by several different genotypes of *A. marginale*.

ГЕН РЕЦЕПТОРА МЕЛАНКОРТИНА 4 (MC4R) И ЕГО СВЯЗЬ С НЕКОТОРЫМИ ПОЛИГЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ

Халак В.И.

Государственное учреждение Институт зерновых культур НААН Украины
г. Днепр, Украина, 49027
E-mail: v16kh91@gmail.com

Аннотация. Приведены результаты исследования откормочных и мясных качеств молодняка свиней крупной белой породы и установлено ассоциацию полиморфизма g.142G>A гена *Mc4r* с указанными группами признаков.

Результаты исследований показали, что за основными показателями откормочных и мясных качеств превосходят минимальные требования класса элита по возрасту достижения живой массы 100 кг на 8,57 %, толщине шпика на уровне 6-7 грудных позвонков – на 30,9 %, длине охлажденной туши – на 3,8 %. Достоверную разницу выявлено между животными разных генотипов (AG - AA) по среднесуточному приросту живой массы за период контрольного откорма (8,10 %), возрасту достижения живой массы 100 кг (6,79 %), длине охлажденной туши (1,33 %) и ее беконной половины (3,15 %), а также индексу О. Вангена (14,28 %).

Коэффициент корреляции (r) между толщиной шпика на уровне 6-7 грудных позвонков, индексом О. Вангена и T_1 – фактором колеблется в пределах от +0,512 до +0,971, что свидетельствует о эффективности использования указанных интегрированных показателей в селекционно-племенной работе.

Ключевые слова: молодняк свиней, порода, генотип, откормочные и мясные качества, изменчивость, корреляция.

Введение. Результаты исследований отечественных и зарубежных ученых подтверждают факт ассоциации генетических маркеров с воспроизводительными качествами свиноматок и хряков-производителей, откормочными и мясными признаками их потомства [1-5]. Актуальным при этом, наряду с использованием традиционных методов оценки племенной ценности животных остается вопрос ведения селекционной работы на уровне ДНК.

Цель работы – изучить откормочными и мясными качествами молодняка свиней крупной белой породы и установить ассоциацию с g.1426G>A гена *Mc4r*

Материал и методика исследований. Исследования проведены в

условиях агроформирований Днепропетровской области, лаборатории животноводства ГУ ИЗК НААН и. Объектом исследований был молодняк свиней крупной белой породы венгерского происхождения.

Генотипирование животных проводили в лаборатории генетики Института свиноводства и АПП НААН по методике K.S. Kim et al. [6].

Оценку животных указанной производственной группы по откормочным и мясным качествам проводили с учетом следующих показателей: среднесуточный прирост живой массы за период контрольного откорма, кг, возраст достижения живой массы 100 кг, дней; длина охлажденной туши, см; длина беконной половины охлажденной туши, см, толщина шпика на уровне 6-7 грудных позвонков, мм. Интегрированную оценку молодняка свиней по откормочным и мясным качествам проводили по индексу О. Вангена [цит. по 7] и Т-фактору (отношение толщины шпика на уровне 6-7 грудных позвонков к длине охлажденной туши (см) [8].

Биометрическую обработку результатов исследований проводили методом вариационной статистики по методике Г.Ф. Лакина [9].

Результаты исследований и их обсуждение. Проведенные исследования показали, что среднесуточный прирост живой массы за период контрольного откорма молодняка свиней ($n=20$) составляет $0,568 \pm 0,0067$ кг ($C_v=5,25\%$), возраст достижения живой массы 100 кг – $173,7 \pm 2,06$ дней ($C_v=5,31\%$), толщина шпика на уровне 6-7 грудных позвонков – $21,4 \pm 0,45$ мм ($C_v=9,39\%$), длина охлажденной туши – $96,7 \pm 0,52$ см ($C_v=2,42\%$), длина беконной половины охлажденной туши – $81,2 \pm 1,33$ см ($C_v=7,36\%$), индекс О. Вангена – $34,20 \pm 0,696$ баллов ($C_v=9,10\%$), Т-фактор – $0,219 \pm 0,0048$ баллов ($C_v=9,86\%$).

Результаты исследований откормочных и мясных качеств молодняка свиней разных генотипов по геном *Mc4r* приведены в таблице 1. Установлено, что разница между животными разных генотипов (AG, AA) по среднесуточному приросту живой массы за период контрольного откорма составляет $0,048$ кг ($td=6,57$; $P<0,05$), возрасту достижения живой массы 100 кг – $12,1$ дней ($td=2,27$; $P<0,05$). Молодняк свиней генотипа AA характеризовался меньшей толщиной шпика на уровне 6-7 грудных позвонков (на $1,8$ мм; $td=2,22$; $P<0,05$), длиной охлажденной туши (на $1,3$ см; $td=1,28$; $P>0,05$) и длиной беконной половины охлажденной туши (на $2,6$ см; $td=0,97$; $P>0,05$). Разница между группами по показателю «Т – фактор» и

индекс О. Вангена составила 0,012 ($td=1,27$; $P<0,05$) и 5,3 балла ($td=13,94$; $P>0,001$) соответственно. Коэффициент изменчивости откормочных и мясных качеств молодняку свиней колеблется в пределах от 1,46 (длина охлажденной туши (см) у животных генотипа АА) до 9,93 % (длина беконной половины туши (см) у животных генотипа АG).

Таблица 1. Откормочные и мясные качества молодняку свиней в зависимости от генотипа по гену *Mc4r*, $n = 10$

Показатели, единицы измерения	Биометрический показатель	Генотип	
		АА	АG
Среднесуточный прирост живой массы за период контрольного откорма, кг	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	0,544±0,0055	0,592±0,0049
	σ	0,0176	0,0156
	$C_v, \%$	3,23	2,63
Возраст достижения живой массы 100 кг, дней	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	178,2±1,85	166,1±1,33
	σ	5,87	4,21
	$C_v, \%$	3,29	2,53
Толщина шпика на уровне 6-7 грудных позвонков, мм.	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	20,5±0,58	22,3±0,57
	σ	1,84	1,82
	$C_v, \%$	8,97	8,16
Длина охлажденной туши, см	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	96,1±0,44	97,4±0,92
	σ	1,41	2,91
	$C_v, \%$	1,46	2,99
Длина беконной половины охлажденной туши, см	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	79,9±0,67	82,5±2,59
	σ	2,13	8,19
	$C_v, \%$	2,67	9,93
T_1 – фактор	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	0,213±0,0059	0,225±0,0074
	σ	0,0188	0,0236
	$C_v, \%$	8,82	10,48
Индекс О. Вангена	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	31,79±0,190	37,09±0,338
	σ	0,601	1,069
	$C_v, \%$	1,89	2,88

Достоверные коэффициенты парной корреляции (r) установлено между толщиной шпика на уровне 6-7 грудных позвонков (мм) и индексом

О. Вангена ($+0,512 \pm 0,2025$, $tr=2,53$), толщиной шпика на уровне 6-7 грудных позвонков (мм) и T_1 – фактором ($+0,971 \pm 0,0564$, $tr=17,23$).

Заключение. 1. Установлено, что молодняк свиней крупной белой породы подконтрольного стада характеризуется достаточно высокими показателями откормочных и мясных качеств, которые отвечают минимальным требованиям I класса и класса элита.

2. В зависимости от генотипа по гену *Mc4r* (AG AA) выявлено достоверную разницу между животными по среднесуточному пиросту живой массы за период контрольного откорма, возрасту достижения живой массы 100 кг, длине охлажденной туши и ее беконной половины, а также индексу О. Вангена.

3. Коэффициент корреляции (r) между толщиной шпика на уровне 6-7 грудных позвонков, индексом О. Вангена и T_1 – фактором колеблется в пределах от $+0,512$ до $+0,971$, что свидетельствует о эффективности использования указанных интегрированных показателей в селекционно-племенной работе.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бублик Е. М. Влияние генов *Mc4r*, *POULF1*, *ESR* на продуктивные качества свиней / Е. М. Бублик // Молодой ученый. – 2013. – №. 6 (53). – С. 238-239.
2. Костюнина О. В. Полиморфизм гена рецептора меланокортина *MC4R* и его влияние на мясные и откормочные качества свиней / О. В. Костюнина, Н. А. Зиновьева, Е. И. Сизарева, А. И. Калугина, Е. А. Гладырь, Л. В. Гетманцева, М. С. Форнара, В. Р. Харзинова // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – №. 8. – С. 49-51.
3. Лядский И. К. Связь *Asp298Asn*–полиморфизма гена *MC4R* с толщиной спинного сала у свиней крупной белой породы / И. К. Лядский, А. А. Гетья, К. Ф. Почерняев // Цитология и генетика. – 2011. – №2. – С. 52–56.
4. Михайлов Н. В. Перспективные гены-маркеры продуктивности свиней / Н. В. Михайлов, Л. В. Гетманцева, Н. А. Святогоров, Е. М. Бублик // Вестник Донского государственного аграрного университета. – 2013. – Вип. 3 (9). – С. 16-19.
5. Park H. B. Melanocortin 4 receptor (*MC4R*) genotypes have no major effect on fatness in a Large White x Wild Boar intercross / H. B. Park, O. Carlborg, S. Marklund, L. Andersson // Animal Genetics. – 2002. – Vol. 33. – P. 155-157.
6. Kim, K.S., Lee J.J., Shin, H.Y., Choi, B.H., Lee, C.K., Kim, J.J., Cho B.W., Kim, T.H. 2006. Association of melanocortin 4 receptor (*MC4R*) and high mobility group AT-hook 1 (*HMGA1*) polymorphisms with pig growth and fat deposition traits. Anim. Genet. 37:419-421.
7. Козловский В. Г. Племенное дело в свиноводстве // В. Г. Козловский, Ю. В. Лебедев, В. А. Медведев и др. - М.: Колос, 1982. – 272 с.
8. Hazei L. N., Mechanical Measurement of Fatness and Carcass Value in Live Hogs / L. N. Hazei, E.A. Kline // J. Anim. – 1952. – № 2 – Sci., 2.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учеб. пособие для биол. спец. вузов – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.

MELANOCORTIN 4 RECEPTOR GENE (MC4R) AND ITS RELATIONSHIP WITH SOME POLIGENE SIGNS OF YOUNG PIG

Khalak V.I.

State institution Institute of Grain Crops of NAAS of Ukraine, Dnipro, Ukraine, 49027
E-mail: v16kh91@gmail.com

Annotation. The results of a study of the fattening and meat qualities of young pigs of large white breed are presented, and the association of the polymorphism g.142G> A of the Mc4r gene with the indicated groups of sows.

The research results showed that behind the main signs of fattening and meat qualities they exceed the minimum requirements of the elite class in age of reaching a live weight of 100 kg by 8.57 %, the thickness of the fat at the level of 6-7 chest vertebrae - by 30.9 %, the length of the chilled carcass - by 3.8%. A significant difference was found between animals of different genotypes (AG - AA) by the average daily live weight cake for the control period from the feed (8.10 %), the age at which live weight reached 100 kg (6.79 %), and the length of the chilled carcass (1.33 %) and its bacon half (3.15 %), as well as the O. Wangen index (14.28 %).

The correlation coefficient (r) between the thickness of the fat at the level of 6-7 thoracic vertebrae, the index of O. Wangen and T_1 - the factor ranges from +0.512 to +0.971, which indicates the effectiveness of using these integrated indicators in breeding and breeding.

Keywords: young pigs, breed, genotype, feeding and meat qualities, variability, correlation.

УДК 636.2:612.621

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ СОМАТИЧЕСКИХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ КОРОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ВИТРИФИКАЦИИ

Чистякова И.В., Кузьмина Т.И.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московское шоссе, д. 55а, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, РФ, 196601
E-mail: itjerena7@gmail.com

Аннотация. Создание криобанка женских гамет животных – актуальная проблема трансляционных инновационных эмбриотехнологий (клонирование, трансгенез, получение эмбрионов *in vitro*, создание линий эмбриональных стволовых клеток). В настоящем исследовании

довании проведён сравнительный мониторинг показателей криорезистентности соматических и половых клеток овариальных фолликулов *Bos taurus* при использовании различных моделей витрификации: интра- и экстра-овариальной (ИОВ и ЭОВ). Оценку статуса хроматина ооцитов и окружающих их клеток кумулюса осуществляли после 24 часов культивирования *in vitro* в TC-199 с 10% фетальной бычьей сыворотки, 10^6 клеток/мл гранулезы, 50 нг/мл бычьего пролактина, дополненной наночастицами 0,001% высокодисперсного кремнезёма (нВДК) в концентрации. Оценка компетентности к созреванию ооцитов, витрифицированных в фрагментах яичников, после культивирования в средах, дополненных нВДК проведена впервые. Клетки кумулюса ооцитов, витрифицированных в фрагментах яичников, отличались низкими показателями криорезистентности. Доля клеток кумулюса с пикнотическими ядрами и в состоянии апоптоза (TUNEL-test) составила соответственно: 15% и 44% при экстра-овариальной витрификации; 31% и 62% при интра-овариальной витрификации; 13% и 21% в контроле. Деструктивные процессы, спровоцированные сверхнизкими температурами, наблюдали как в клетках кумулюса, так и в ооцитах. Показана возможность завершения мейотического созревания ооцитов, подвергшихся интра-овариальной витрификации, что выражалось в отсутствии достоверных различий в достижении стадии метафазыII ооцитами, витрифицированными интра- (49%) или экстра-овариально (52%) при 82% на фоне контроля (нативные ооциты).

Ключевые слова: ооцит, экстра-, интра-овариальная, витрификация, кумулюс, апоптоз.

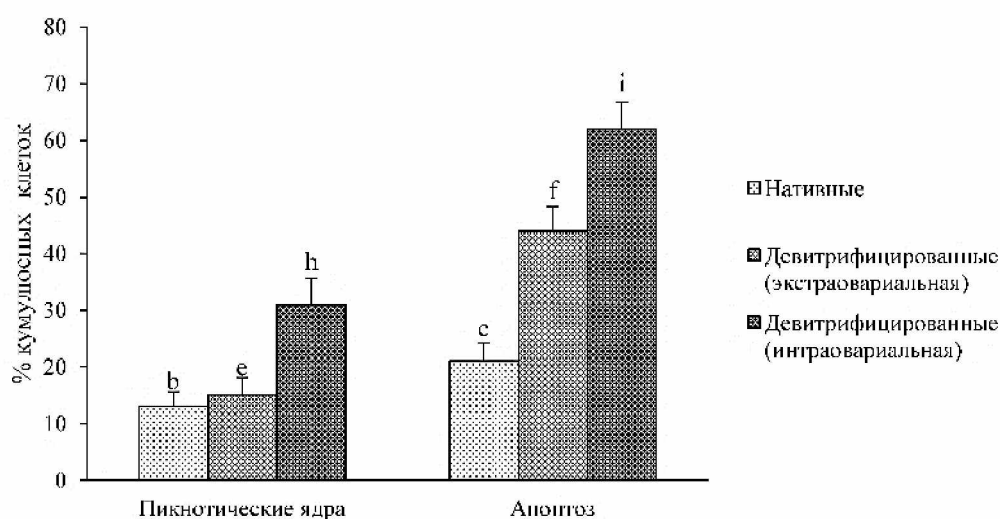
Введение. Несмотря на значительный прогресс в разработке и совершенствовании способа витрификации ооцитов животных, число компетентных к созреванию и оплодотворению девитрифицированных ооцитов остаётся низким [7]. Воздействие на ооциты сверхнизких температур существенно нарушает функционирование структурных элементов цитоскелета, митохондрий, вызывает деструктивные изменения хроматина [9,8]. При витрификации ооцит и окружающие его клетки кумулюса (КК) должны рассматриваться, как единый функциональный блок (ооцит-кумуляусный комплекс, ОКК), т.к. для формирования полноценной яйцеклетки во время созревания необходимо взаимодействие ооцита с окружающими его КК [5,6].

Цель работы – оценка деструктивных процессов (пикноз, апоптоз) в соматических (КК) и половых клетках (ооциты) *Bos taurus*, подвергшихся процедуре ИОВ или ЭОВ.

Материал и методика исследований. Материалом для исследований служили ОКК из антральных фолликулов коров черно-пестрой породы. Процедуры замораживания/оттаивания ооцитов и фрагментов яичников проводили по протоколам, представленными ранее [1]. Пайеты с ОКК и мешочки с фрагментами яичников хранили в жидком азоте. ОКК куль-

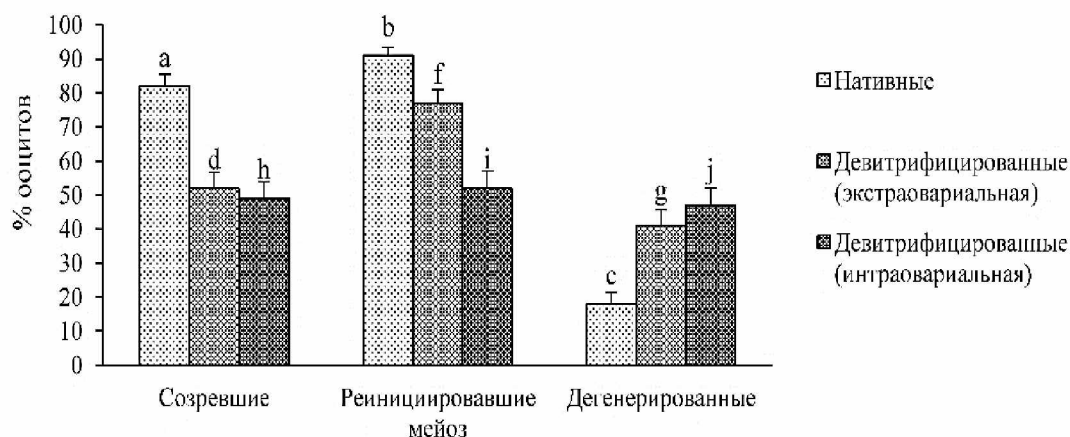
тивировании в среде Т-199 с 10% фетальной бычьей сыворотки, 10^6 клеток/мл гранулезы, 50 нг/мл бычьего пролактина, 0,001% нВДК [3]. Режим 24-часового культивирования ОКК коров соответствовал представленному в методических рекомендациях [2]. Статус хроматина оценивали методами Тарковского [10] и TUNEL [5].

Результаты исследований и их обсуждение. КК играют важную роль при созревании ооцита, поэтому очень важно обеспечить их сохранность при витрификации [4]. Наименьшие показатели деструкции хроматина КК (пикноз, апоптоз) обнаружены в контрольной группе (нативные ооциты): 13% и 21% (рис.1). При использовании ИОВ ооцитов уровень КК в состоянии апоптоза значительно превышал таковой при ЭОВ (62% против 44%, $P < 0.001$). После ЭОВ 77% ооцитов реинициировали мейоз, при ИОВ – 52%, что оказалось значительно ниже, чем в нативных ооцитах – 91% (рис. 2). Дегенерации подверглись 18% нативных ооцитов, 41% экстра- и 47% интра-овариально витрифицированных ооцитов. Более половины ооцитов при ЭОВ (52%), достигли завершающей стадии созревания (метафаза-II), при ИОВ этот показатель составил 49%.



Достоверность различий χ^2 -test: $h:e; b:h; c:i; f:i$ $P < 0,001$

Рисунок 1. Анализ показателей криорезистентности клеток кумулюса ооцитов коров, подвергшихся ЭОВ или ИОВ (n клеток – 78100; 3 повторности).



Достоверность различий χ^2 -test: $a:d; a:g; e:h; b:h; c:f; c:i P < 0,001; b:e P < 0,01$

Рисунок 2. Статус хроматина девитрифицированных ооцитов после 24 часов культивирования (число ооцитов – 661; 3 повторности).

Заключение. Впервые оценена компетентность к созреванию ооцитов *Bos Taurus*, витрифицированных в фрагментах яйчников, после культивирования в средах, дополненных нВДК. Деструктивные процессы, спровоцированные сверхнизкими температурами, наблюдали как в КК, так и в ооцитах. Эффект выражался в значительном росте доли КК с пикнотическими ядрами и в состоянии апоптоза при ЭОВ по сравнению с ИОВ и контролем. Анализ показателей криорезистентности ОКК коров, подвергнутых процедурам ЭОВ и ИОВ, выявил возможность завершения ядерного созревания ооцитов до 50% при использовании обоих способов витрификации.

Работа выполнена в соответствии с темой Минобрнауки России, номер госрегистрации – АААА-А18-118021590132-9.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганджа А.И., Леткевич Л.Л., Кузьмина Т.И. Криоконсервация и криотолерантность ооцитов сельскохозяйственных животных // Зоотехническая наука Белоруссии. – 2017. 52(1): 46-52.
2. Кузьмина Т.И. Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*: методические рекомендации / Т.И. Кузьмина; Х.Альм; Х.Торнер. ВНИИГРЖ. – Спб.-Пушкин, 2009 – 42 с.
3. Chistiakova I., Kuzmina T., Stanislavovich T., Kovtun S. Effects of highly dispersed silica nanoparticles on the cryoresistance of the bovine cumulus-oocyte complexes // Cryobiology. – 2018. 85: 176.

4. Coticchio G., Dal Canto M. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization // Human Reproduction Update - 2015. 21(4): 427-54.
5. Feng W. G., & Pan Z. F. The effect of granulosa cells apoptosis on the cumulus expansion and the developmental competence of bovine oocytes // Advanced Materials Research – 2014. 997: 251–254.
6. Makarevich A., Foldesiova M., Olexikova L. Possibilities of cattle ovarian tissue conservation: A mini-review // Slovak Journal of animal science – 2017. 50(3): 128-133.
7. Mullen S.F., G.M. Fahy A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs, and sheep // Theriogenology – 2012. 78(8): 1709-1719.
8. Paul A.K. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container // Animal scientific journal – 2018. 89(2): 307-315.
9. Pitchayapipatkul J., Somfai T., Matoba S. Microtubule stabilisers docetaxel and paclitaxel reduce spindle damage and maintain the developmental competence of in vitro-mature bovine oocytes during vitrification // Reproduction, fertility and development. – 2017. 29(10): 2028-2039
10. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs // Cytogenetic. – 1966. 1: 394-400.

ANALYSIS OF CRYORESISTANCE INDICATORS OF SOMATIC CELLS AND GAMETES OF BOVINE OVARIAL FOLLICLES WITH USAGE OF DIFFERENT VITRIFICATION MODELS

Chistyakova I.V., Kuzmina T.I.

All-Russian research institute of genetics and breeding of farm animals – the branch of Federal state budgetary scientific institution "Federal Research Center Livestock – AUIAB
Academician L.K. Ernst, Moscow shosse, 55 a, Saint-Petersburg, Pushkin, 196601, Russia
E-mail: itjeren7@gmail.com

Abstract. *The creation of farm animal female gametes cryobank is an urgent problem of translational innovative embryotechnologies (cloning, transgenesis, in vitro embryo production, creation of embryonic stem cell lines). In this study, a comparative monitoring of the cryoresistance indicators of somatic cells and gametes of ovarian bovine follicles was carried out using various vitrification models: intra- and extra-ovarian (IOV and EOY). The chromatin status of oocytes and the cumulus cells surrounding them was assessed after 24 hours of in vitro culture in TC-199 + 10% fetal bovine serum with 10^6 cells / ml granulosa, 50 ng / ml bovine prolactin supplemented with highly dispersed silica nanoparticles (nHDS) at a concentration of 0.001 %. Assessment of the competence to maturing of bovine oocytes vitrified in ovarian fragments after culture in media supplemented with nHDS was carried out for the first time. Cumulus oocyte cells, vitrified with fragments of ovaries, were characterized by low cryoresistance. The portion of cells with pyknotic nuclei and in the apoptotic state was respectively: 15% and 44% (extra-ovarian vitrification – EOY); 31% and 62% (intra-ovarian vitrification - IOV) vs. control group (13% and 21%, respectively). The possibility of the completing the meiotic maturation of extra-ovary vitrified oocytes has been shown. It was expressed in the absence of significant differences in the achievement of metaphase II stage by oocytes, vitrified intra- (49%) or extra-ovarian (52%) at 82% v.s. of control group.*

Keywords: oocyte, vitrification, intra-, extra-ovarian, cumulus cells, apoptosis.

НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К КОНТРОЛЮ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Шевелёва С.А., Ефимочкина Н.Р., Минаева Л.П., Быкова И.Б.,
Маркова Ю.М., Пичугина Т.В., Стеценко В.В., Полянина А.С.,
Алёшкина А.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи
(ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)
109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14
E-mail: sheveleva@ion.ru, тел. +7(495)698-53-83

Аннотация. Изучена загрязнённость бактериями рода *Campylobacter* 400 проб отечественных пищевых продуктов, включая мясо и субпродукты бройлеров, кур, перепелов, индеек сырые; молоко коровье сырое, а также более 100 смывов с оборудования и инвентаря на предприятиях по переработке птицы и общественного питания.

Установлена устойчивая связь возбудителя кампилобактериоза *C. jejuni* с сырыми птицепродуктами и сырым молоком. При этом наиболее высокая частота обнаружения *Campylobacter* spp. (более 45% сл.) была выявлена для бройлерных кур, а в сыром молоке колебалась от 8,3% (при анализе бакпосевом) до 16,6% (при использовании мультипраймерной ПЦР). В птицепродуктах и смывах с оборудования птицефабрик находки патогенных микробов рода *Campylobacter* имели место в 2-2,5 раза чаще, чем находки *Salmonella* spp. Кроме того, более чем в 60% сл. кампилобактерии обнаруживались в пробах с повышенной обсеменённостью колIFORMами, которая в свою очередь указывала на низкое санитарное обеспечение производства.

Описаны особенности биологических свойств кампилобактерий пищевого происхождения, демонстрирующие их хорошую приспособляемость вне организма-хозяина (в первую очередь, реализации механизма трансформации с переходом ДНК от антибиотикоустойчивых штаммов к чувствительным, быстрому образованию биоплёночного матрикса) и способности переживать технологические стрессовые воздействия, сохраняя жизнеспособность.

Показано, что режимы биоцидной обработки оборудования, инвентаря и воды для охлаждения битой птицы (раствором НУК, УФ-облучением), рассчитанные на элиминацию традиционных микробных контаминантов, в том числе сальмонелл, недостаточны для ингибции кампилобактерий, возможно, из-за высокой вероятности образования ими биопленок.

Обоснована необходимость актуализации действующих и разработки новых отраслевых критериев для оценки эффективности профилактики перекрёстной контаминации на птицеперерабатывающих предприятиях и внедрения в производственный лабораторный контроль исследований продукции и объектов окружающей среды на новые патогены рода *Campylobacter*. Разработаны методические подходы к контролю данных возбудителей в пищевой продукции и смывах с оборудования на основе ускоренного бактериологического, ИФА и ПЦР анализа и оценки их антибиотикорезистентности.

Ключевые слова: Кампилобактериоз, птицепродукты, молоко, биоплёнки, антибиотикорезистентность, ПЦР анализ.

Введение. Заболеваемость людей острыми кишечными инфекциями (ОКИ) кампилобактериозной природы повсеместно растёт, несмотря на принимаемые меры профилактики. По данным ВОЗ она составляет уже пятую часть от всех регистрируемых диарей вирусной и бактериальной этиологии, превышая заболеваемость сальмонеллёзом. В РФ число заболевших кампилобактериозом остаётся неизвестным, но частота обнаружения его возбудителей – термофильных бактерий рода *Campylobacter* у больных с диагнозом «пищевая токсикоинфекция» (12,8%), соответствует аналогичным показателям стран с налаженной лабораторной диагностикой этих патогенов (10-15% в структуре ОКИ) [1].

Эпидемиологические данные указывают на превалирование при кампилобактериозе пищевого пути передачи. Являясь представителями кишечной флоры животных и птицы, зоонозные патогены рода *Campylobacter* попадают в вырабатываемое сырьё и продукцию. Но остаётся непонятным, каким образом высоко чувствительные к факторам окружающей среды, в первую очередь, кислороду, и обладающие специфическими биологическими свойствами (микроаэрофильность, термо- и капнофильность) *Campylobacter* spp. персистируют в неблагоприятной для них среде ферм и перерабатывающих предприятий. Хотя способность переходить в некультивируемые формы, характеризующиеся отсутствием роста и сниженным метаболизмом уже известна, механизмы выживания этих бактерий при воздействии высоких и низких температур, антимикробных веществ, как и причины активизации вне организма-хозяина также остаются малоизученными [2].

Поэтому для разработки мер предотвращения контаминации бактериями рода *Campylobacter* spp. оборудования предприятий, минимизации роли пищевого пути передачи при кампилобактериозе, необходимо изучение путей адаптации данных патогенов в окружающей среде, способов формирования их устойчивости к стрессовым воздействиям, создание эффективных методических подходов для анализа трудно культивируемых микроорганизмов, в том числе для выявления их некультивируемых форм.

Материал и методика исследований. Объектами исследования контаминации *Campylobacter* spp. служили образцы пищевой продукции раз-

личных видов (тушки, полуфабрикаты, субпродукты цыплят-бройлеров, кур, перепелов, индеек сырые; молоко коровье сырое; салаты листовые и овощи резаные; говядина сырая, упакованная в полимерные пленки), а также смывы с поверхностей оборудования и инвентаря на предприятиях по переработке птицы и общественного питания. Изучено 400 проб продуктов и 100 смывов.

Выявление и подсчёт *Campylobacter* spp. в пищевых продуктах проводили путём бакпосева в микроаэробных условиях с идентификацией изолятов до вида, а также путём ПЦР в реальном времени с родо- и видоспецифичными праймерами на гены 16S rPHK и *cdt B*. Чувствительность к антибиотикам пищевых изолятов кампилобактерий (95 шт.) определяли диско-диффузионным методом с интерпретацией результатов по EUCAST [3], маркеры мутационной и трансмиссивной плазмидной резистентности к макролидам, хинолонам, аминогликозидам, тетрациклину - методом амплификации участков генов 23S rPHK, протонной помпы *smcB*, белков защиты рибосом L4, L22, ДНК-гиразы *GZgyrA*, аминогликозид модифицирующих ферментов *aphA*, ингибиторов синтеза белка на 30S субъединице рибосом *tetO*, и ПЦР с интеркалирующими красителями SYBR+ROX. Ингибирующее действие биоцидов и УФ облучения оценивали по соотношению общего числа *Campylobacter* spp. и числа жизнеспособных клеток в популяциях штаммов методом количественной ПЦР в реальном времени по содержанию геном-экв. КОЕ с использованием заранее разработанных калибровочных кривых.

Образование биоплёнок пищевыми изолятами *C.jejuni* (10 шт.) изучали в моделях совместного культивирования с *K.pneumoniae*, *E.cloacae*, *E.coli*, *S.enteritidis* методом импеданса с использованием автоматического анализатора в режиме реального времени по интенсивности сигнала, соответственно нарастанию размеров полисахаридного пленочного матрикса, сопровождающего прикрепление бактерий к поверхности планшетов.

Результаты исследований и их обсуждение. Установлено, что частота обнаружения *Campylobacter* spp. в сырых птицепродуктах (преимущественно в мясе и субпродуктах бройлерных кур) составляет 40,6% сл. при достаточно низкой численности этих микробов ($M_e=0$, $M_{cp}.6,5\pm5,7$ КОЕ/г), что свидетельствует о перекрёстном обсеменении ими в процессе

убоя и переработки. В смывах с поверхностей оборудования птицеперерабатывающих предприятий, использующих технологии погружного охлаждения, кампилобактерии выявлены в 37,5% сл. (против 15% для бактерий рода *Salmonella* и 22,5% для БГКП). Установлена устойчивая взаимосвязь сырых птицепродуктов с наиболее часто фиксируемым в клинике возбудителем кампилобактериоза - *C.jejuni*, к нему принадлежало 70% изолятов из птицы и 91% изолятов из смывов [4].

Впервые получены данные о широкой загрязнённости *Campylobacter* spp. молока-сырья из хозяйств центрального региона России, в том числе в 8,3% сл. - жизнеспособной формой патогена, в 62% сл. - некультивируемой. Все молочные изоляты принадлежали к виду *C.jejuni*, средний уровень содержания не превышал 100 КОЕ/мл ($M_{cp.} 2,0 \times 10^1$).

Ни в каких видах готовых продуктов и в смывах с оборудования вне сырьевых предприятий эти бактерии обнаружены не были. Учитывая способность кампилобактерий к персистенции в неактивном состоянии, можно полагать, что основной вклад в заболеваемость данной ОКИ у населения вносят сырые птицепродукты и сырое молоко, а ведущий механизм распространения возбудителя – перекрёстная контаминация.

Воспроизведен и адаптирован вариант мультипраймерной ПЦР с участками генов 16S rРНК и факторов патогенности *Campylobacter* spp. в моделях с ассоциациями разных микробов, который позволил в 2 раза повысить открываемость *C.jejuni* в контаминированном молоке с высоким уровнем посторонней флоры, показать наличие корреляции формата ПЦР с праймерами на гены *cdtB* и *ciaB* с выявлением живых (колониеобразующих) клеток и подтвердить пригодность формата ПЦР с родоспецифическими праймерами 16S rРНК для обнаружения всего пула этих бактерий, включая инактивированные и некультивируемые формы.

У половины изолированных из разных продуктов и смывов кампилобактерий (51%) установлено наличие резистентности к клинически значимым для лечения данной ОКИ антибиотикам макролидам и линкозамидам, у изолятов из птицы - практически тотальной резистентности к фторхинолонам (96% сл.), в подавляющем большинстве случаев - к тетрациклинам, в высоком проценте случаев – множественной устойчивости (рис.1).

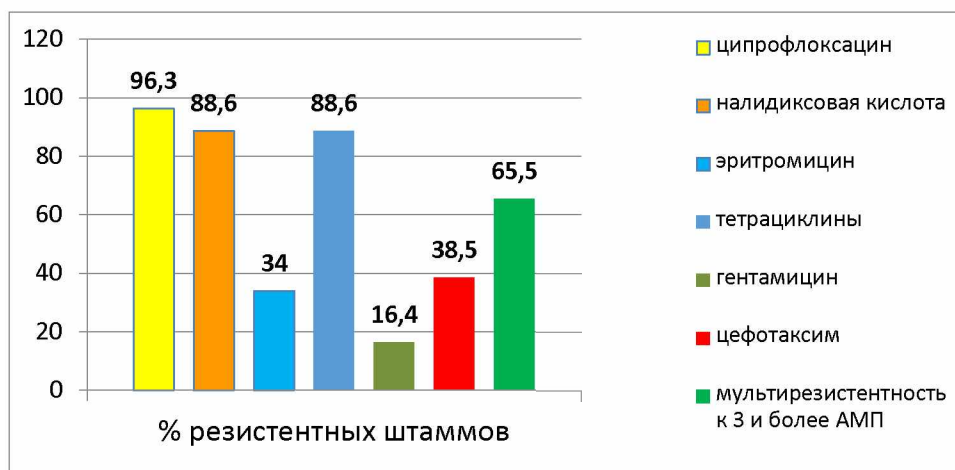


Рисунок 1. Антибиотикорезистентность *C.jejuni*, выделенных из отечественных птицепродуктов в 2015-2016 гг. (n=55).

Установлена высокая частота присутствия генов приобретённой устойчивости у резистентных кампилобактерий из пищи. Так, маркерные гены резистентности трансмиссивного типа к макролидам (*meV*, белков L22 и L4), тетрациклинам (*tetO*), хинолонам (*GZgyrA*) найдены в 72, 64 и 71% сл., соответственно, тогда как, например, маркер мутации, ответственный за хромосомную резистентность к макролидам в гене 23SrRNA, - в 18% сл.

Показана возможность реализации механизма трансформации с переходом ДНК от устойчивых к хинолонам штаммов *C.jejuni* к чувствительным в условиях, имитирующих влияние стрессовых воздействий в среде (наличие субингибиторных доз налидиксовой кислоты). Рекомбинация воспроизводилась с частотой в пределах $1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-6}$, зависела от дозы ДНК штамма-донора, а трансформированные культуры сохраняли фенотипическую устойчивость к налидиксовой кислоте при пересевах и приобретённые детерминанты *GZgyrA*. Это подтверждает, что тотальная устойчивость к фторхинолонам у изолированных из птицы кампилобактерий может индуцироваться при использовании профилактических доз антибиотика, а для её минимизации и снижения интенсивности интергеномного трансфера резистентности необходим отказ от применения хинолонов у здоровой птицы.

В модельных опытах с заражением тушек кур *C.jejuni* (рис. 2) показано, что технологические режимы, используемые для снижения микробной

обсеменённости при погружном охлаждении битой птицы (0,04% р-р надуксусной кислоты - 25 мин - 2°C) и обработке поверхностей (УФ облучение - 15W - 20 мин), не обеспечивали ингибиции этого патогена до безопасного уровня (на 5 lg КОЕ/г от исходного). Возбудитель сохранялся при всех вариантах воздействия, в том числе в неактивной форме при жёстком УФ облучении в течение 60 мин. Эти результаты свидетельствуют о необходимости актуализации мер профилактики перекрёстного загрязнения при переработке птицы, рассчитанных в основном на традиционных загрязнителей [5], и их гармонизации с принятыми международной практике т.н. «performance standards» - отраслевыми критериями оценки эффективности технологий производства и санитарно-гигиенических мероприятий [6].

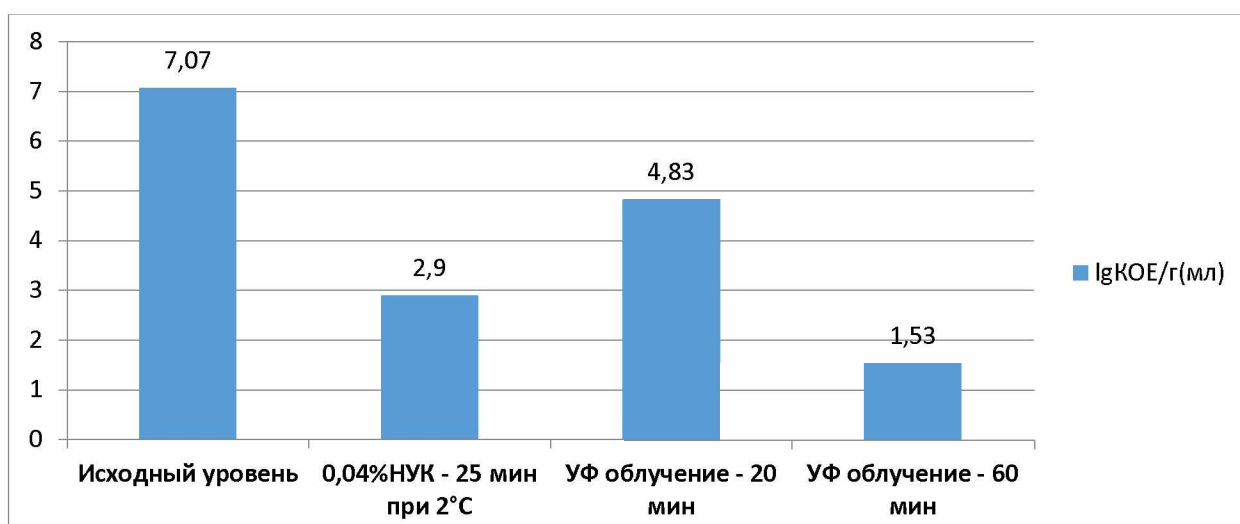


Рисунок 2. Содержание *S.jejuni* в искусственно заражённом мясе кур после анти-микробной обработки

У пищевых изолятов *S.jejuni* выявлена способность к быстрому образованию биоплёночного матрикса, протекающему с максимальной интенсивностью в первые 5 ч культивирования и усиливающемуся в разы при наличии в среде факторов стресса: кислорода, субингибиторных доз хинолонов, сопутствующей конкурентной микрофлоры. Из рис.3 видно, что синтез биоплёнок *S.jejuni* в смеси с *E.coli* и *E.cloacae* происходит в 9-13 раз более активно, чем у чистых культур.

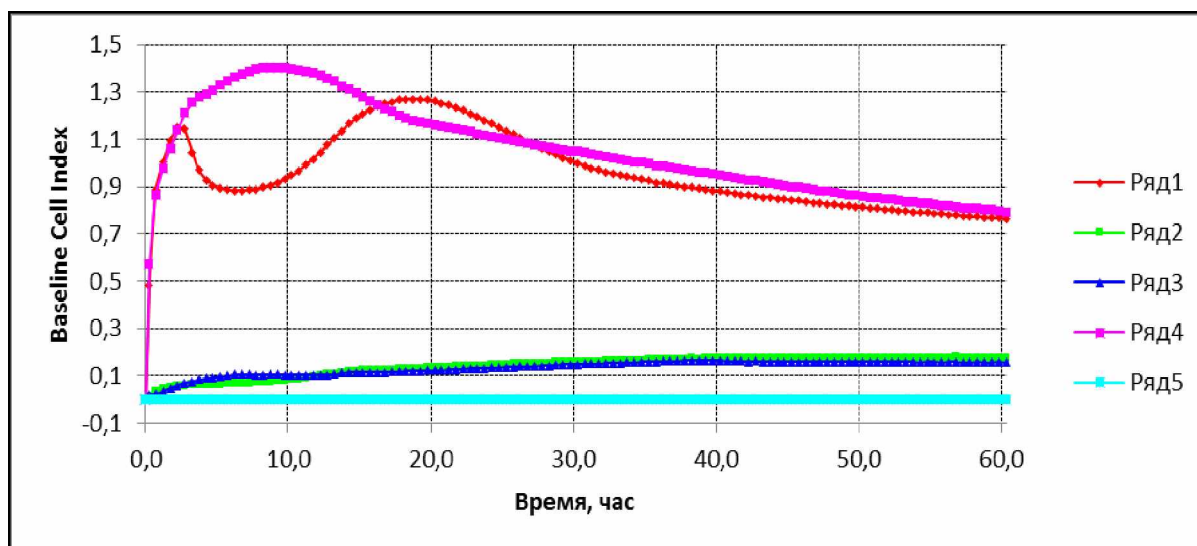


Рисунок 3. Динамика образования биоплёнок при культивировании *C.jejuni* с колиформными бактериями в микроаэрофильных условиях

Ряды: 1 – *C.jejuni* + *E.coli*, 2 – *C.jejuni*, 3 – *E. cloacae*, 4 – *C.jejuni* + *E. cloacae*, 5 – контроль (стерильная среда)

Как известно, образование биопленок на оборудовании снижает эффективность антимикробной санитарной обработки, и выживающие в составе биоплёнок патогены могут перекрестно инфицировать продукцию на различных стадиях технологического процесса. Полученные результаты дают основание рекомендовать сокращение продолжительности операций эвентрации, разделки, упаковки на предприятиях по переработке птицы, где колиформные бактерии и *Campylobacter spp.* являются самыми распространёнными микробными контаминантами, до технологически достижимого минимума в целях предупреждения формирования биоплёнок из *C.jejuni* и колиформ.

Заключение. Данные о высоком уровне загрязнения бактериями рода *Campylobacter* наиболее востребованных в рационах населения продуктов животного происхождения (мясо птицы и молоко), а также о выраженной приспособляемости этих бактерий к технологическим стрессовым факторам, превалировании приобретённой антибиотикорезистентности и др. изменённых свойств, указывают на широкую циркуляцию в пищевой цепи новых (эмерджентных) патогенов. В этих условиях необходимой мерой управления риском кампилобактериоза у потребителей должна стать ориентированность профилактики на первичное звено производства птицы и молока в сельском хозяйстве, а также актуализация отраслевых кри-

териев оценки эффективности технологий переработки мяса птицы и молока в отношении перекрёстной контаминации продукции, с внедрением в схемы производственного контроля, в первую очередь на птицеперерабатывающих предприятиях, дополнительного показателя по патогенам рода *Campylobacter*.

В результате исследований по проекту усовершенствованы методические подходы к контролю данного трудно культивируемого возбудителя, разработаны МУК 4.3.3545-18 «Методы ускоренного определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевой продукции и оценка их антибиотикорезистентности». В МУК включены адаптированные для целей производственного контроля методы детекции и количественного подсчета термофильных кампилобактерий в пищевой продукции и в смывах с объектов производственной среды на основе бактериологического, иммунофлуоресцентного и ПЦР анализа, методы определения антибиотикочувствительности изолятов *Campylobacter spp.*, пригодные для целей мониторинга резистентности возбудителей кампилобактериоза, а также процедура анализа рисков в критических контрольных точках производства на птице- и мясоперерабатывающих предприятиях и рекомендации по оценке эффективности санитарной обработки оборудования и инвентаря.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булахов А.В. ПЦР-диагностика контаминации пищевых продуктов бактериями рода *Campylobacter* и кампилобактериоза у людей. / Автореферат дисс. на соиск. ученой степени канд. мед. наук, М., 2012, 26 с.
2. Le M.T., van Vliet A.H.M. Genome and transcriptome evolution in the genus *Campylobacter* // *Campylobacter Ecology and Evolution* // Ed. S.K. Sheppard. Norfolk, 2014. Chapter 5. P.43 – 53
3. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, January. – 2015/
4. Шевелёва С.А., Ефимочкина Н.Р., Минаева Л.П., Быкова И.Б., Маркова Ю.М., Пичугина Т.В., Стеценко В.В., Полянина А.С., Алёшкина А.И. Меры снижения распространения возбудителя кампилобактериоза в пищевой цепи: специфика подходов// Вопросы питания. 2018. Т.87 №5 Приложение. С. 200-201
5. Инструкция о мероприятиях по снижению микробной обсемененности тушек птицы, скорлупы яиц, продуктов из мяса птицы и яиц и деконтаминации их от сальмонелл (№ 01 - 19/12 – 11, 1994 г.)
6. Code of Federal Regulations. Title 9, vol.2, 2016. Part 200. Animals and Animal Products. § 381.94 (b) raw poultry products performance standards.

SCIENTIFIC SUBSTANTIATION OF APPROACHES TO THE CONTROL OF CAMPYLOBACTERIOSIS AGENTS IN FOOD PRODUCTS

Sheveleva S.A., Efimochkina N.R., Minaeva L.P., Bykova I.B., Markova Yu.M., Pichugina T.V., Stetsenko V.V., Polyanina A.S., Aleshkina A.I.

Federal state budgetary institution of science Federal Research Center of nutrition, biotechnologies and food safety, 109240, Moscow, Ustinsky proezd, 2/14
E-mail: sheveleva@ion.ru; tel. 8 (495) 698-53-83

Abstract. *The contamination of the domestic food products by Campylobacter spp. was studied. In total, 400 samples were analyzed, including broiler chicken meat and chicken raw by-products (chilled and frozen), turkey, quail, raw milk as well as more than 100 swabs from the equipment surfaces at poultry processing plants.*

The stable connection of C. jejuni with raw chicken poultry products and raw milk was established. The highest level of detection of campylobacteria (over 45%) was established for chicken broilers. In raw milk it ranged from 8.3% (cultural method) to 16.6% (when using multi-primer PCR assay). Quantitative levels of the pathogen in all cases were low - from 0.1 to 100 CFU / g (ml), reflecting the cross-contamination mechanism. In poultry products and swabs from poultry farm equipment, the findings of pathogenic microbes of the genus Campylobacter occurred respectively 2-2,5 times more often than the findings of Salmonella spp. The study revealed a common pattern of Campylobacter penetration in raw materials and food products with inadequate sanitary treatment of certain sites of production: in most cases Campylobacter spp. was isolated from samples contaminated with coliforms (over 60% of samples).

The features of the biological properties of foodborne campylobacteria are described. They demonstrate good adaptability outside the host organism (first and foremost, the implementation of the mechanism of transformation with transfer DNA from antibiotic-resistant strains to sensitive, rapid formation of biofilm matrix) and the ability to survive the technological stress factors, maintaining vitality.

It is shown that the treatment of water and equipment using biocides and UV irradiation, designed for elimination of traditional microbial contaminants, including Salmonella, insufficient for inhibition of campylobacteria, perhaps because of the high probability of the formation of biofilms.

The necessity of updating the existing and development of new industry criteria to assess the effectiveness of the prevention of cross-contamination in poultry processing plants and the introduction of production laboratory control studies of products and objects of the environment for Campylobacter spp. Methodical approaches to control of these pathogens in food products and swabs from equipment on the basis of accelerated bacteriological, ELISA and PCR analysis and evaluation of their antibiotic resistance have been developed.

Keywords: *campylobacteriosis, poultry products, milk, biofilms, antibiotic resistance, PCR assay.*

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ВЫХОДНЫХ ДАННЫХ МАССИВА ХИМИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЙ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ У ТЕЛЯТ

Шуба А.А.¹, Кучменко Т.А.¹, Черницкий А.Е.², Умарханов Р.У.¹

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»
394006, г. Воронеж, проспект Революции, д. 19

²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии»

Аннотация. Проведены клинические исследования и лабораторные исследования телят первого месяца жизни с определением гематологических и биохимических маркеров воспаления (лейкоцитоз, повышение концентрации гаптоглобина в сыворотке крови), возбудителей вирусных и бактериальных инфекций, сопровождающихся поражением органов дыхания у телят. Предложено ранжирование на группы «здоровые со стороны дыхательной системы», «с субклиническим течением респираторных заболеваний», «с симптомами поражения органов дыхания». Установлено, что наиболее показательными клиническими признаками для ранжирования на диагностические группы являются шкала WI, спонтанный и индуцированный кашель, в том числе после функциональной нагрузки (30-секундного апноэ на выдохе), дыхательный объем. По расчетным параметрам массива сенсоров идентифицированы отдельные классы легколетучих органических соединений в газовой фазе над биопробами, как дополнительный диагностический критерий воспалительных процессов органов дыхания у телят. Установлена корреляция между клиническими и лабораторными показателями и выходными данными массива сенсоров (A_{ij}^{\max} , m_{ij} , α_{ij}). Построена регрессионная модель методом проекции на латентные структуры, прогнозирующая общеклиническое состояние животного (показатель WI), которая позволяет выделять все диагностические группы с погрешностью менее 4 %.

Ключевые слова: телята, респираторные болезни, неинвазивная диагностика, химические сенсоры, вещества-маркеры воспаления.

По масштабу распространения, смертности, снижению прироста массы тела у телят респираторные заболевания превалируют над другими патологиями, и могут достигать 60 % поголовья скота. У телят первого месяца жизни воспаление дыхательных путей часто имеет стертую клиническую картину и на ранних этапах развития болезни протекает бессимптомно [1], поэтому актуальна разработка быстрых и неинвазивных способов диагностики заболеваний органов дыхания. При попадании в организм животного патогенных микроорганизмов (бактерий, вирусов, микро-

скопических грибов) происходит изменение состава газовой фазы над инфицированными биопробами (носовая слизь, трахеальные смывы, конденсат выдыхаемого воздуха), которое можно оценить с применением химических сенсоров. В мировой практике имеются единичные исследования по поиску информативных биомаркеров респираторных болезней, в том числе летучих, в пробах конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ), носовой слизи, а также по применению коммерческих газовых сенсорных систем с ограниченными возможностями получения диагностической информации [2].

Цель исследования – установить достаточные клинические, лабораторные признаки и информативные выходные данные массива сенсоров для ранжирования телят первого месяца жизни на диагностические группы по состоянию органов дыхания.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования выбраны пробы носовой слизи ($n=8$) и конденсата выдыхаемого воздуха ($n=8$) телят, как условно здоровых, так и с признаками поражения органов дыхания. КВВ у телят собирали в утренние часы до кормления с помощью специального устройства (патент РФ на полезную модель № 134772). Во время процедуры сбора КВВ учитывали объем выдыхаемого теленком воздуха. Отбор проб носовой слизи проводили стерильными ватными тампонами в индивидуальные стерильные контейнеры. Всех телят подвергали детальному клиническому исследованию с обязательным лабораторным контролем в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии»: проводили бактериологические и молекулярно-генетические (ПЦР) исследования носовых смывов, определяли гематологические (лейкограмма, концентрация гаптоглобина) показатели воспаления в крови. Состояние телят оценивали по балльной системе (шкала WI), разработанной в Университете Висконсин-Мэдисон (США) [3].

Исследовали равновесную газовую фазу (РГФ) над пробами КВВ с инъекционным способом ввода РГФ объемом 3 см^3 и газовую фазы над пробами носовой слизи при фронтальном способе ввода при $20\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ на анализаторе газов «МАГ-8» с массивом из восьми пьезосенсоров (ООО «СНТ», Россия). Регистрация и обработка выходных данных сенсоров

осуществлялась в специальном программном обеспечении «MAG-Soft». Для оценки постоянства состава газовой фазы над биопробами и идентификации веществ-маркеров воспаления применяли расчетные параметры (A_{ij}^{\max} , m_{ijn} , α_{ijn}) [4].

В качестве селективных покрытий пьезокварцевых резонаторов, ПКР (ОАО «Пьезо», Москва, базовая частота 10,0 МГц) для создания сенсоров выбраны фазы: 1) полиэтиленгликоль ПЭГ-2000 (ПЭГ-2000); 2) дициклогексано-18-краун-6 (ДЦГ18К6); 3) метиловый оранжевый (МО); 4) тритон X-100 (ТХ-100); 5) бромкрезоловый зеленый (БКЗ); 6) многослойные углеродные нанотрубки, карбоксилированные азотной кислотой (МУНТ); 7) полиэтиленгликоль себацинат (ПЭГС)/ полидиэтиленгликоль сукцинат (ПДЭГС); 8) полиоксиэтилен сорбитан-моноолеат Tween 40 (Tween).

Изготовление пьезосенсоров осуществляли по описанной ранее методике [5]. Для стабилизации неполимерных реагентов (МО, БКЗ) применяли подложку из МУНТ массой 1-2 мкг. МУНТ синтезировали в Институте особо чистых материалов (г. Черноголовка).

Результаты и обсуждение. На основании результатов клинических исследований, определения гематологических и биохимических маркеров воспаления (лейкоцитоз, повышение концентрации гаптоглобина в сыворотке крови), возбудителей вирусных и бактериальных инфекций, сопровождающихся поражением органов дыхания у телят, предложено ранжирование на группы «здоровые со стороны дыхательной системы», «с субклиническим течением респираторных заболеваний», «с симптомами поражения органов дыхания».

Установлено, что деление телят первого месяца жизни на 3 диагностические группы по шкале WI статистически значимо ($p < 0,1$) по рассчитанному критерию Крускала-Уоллиса ($H_{\text{расч.}} = 4,50 > H_{4,2,2} = 4,45$), так как воспалительные процессы из-за недоразвитости компенсаторных функций организма быстро приводят к появлению клинических симптомов. При этом наиболее показательными клиническими признаками для ранжирования на диагностические группы являются: отсутствие/наличие индуцированного и спонтанного кашля, а также кашля после физиологической

нагрузки (30-секундного апноэ на выдохе) и общее клиническое состояние по шкале WI.

Впервые установлены вещества-маркеры в РГФ над пробами КВВ в зависимости от клинического состояния телят по идентификационным параметрам массива сенсоров (табл. 1).

Таблица 1. Набор веществ-маркеров патологии органов дыхания в РГФ над пробами КВВ телят до 10 дней жизни для разных диагностических групп

Здоровые со стороны дыхательной системы	С субклиническим течением респираторных заболеваний	Ранние признаки респираторного заболевания
Уксусная кислота Аммиак, алкиламины	Этанол, бутанол, масляная кислота, этандиаль, триэтиламин, C ₁ -C ₃ алкиламин Бензальдегид, метилбензальдегид	Сероводород, сульфиды
	Изомасляная, валериановая кислоты, фенол, этилацетат, аминоспирты	

Наличие пиперидина в РГФ над пробами конденсата выдыхаемого воздуха может быть связано с введением лекарственных препаратов (антибиотики, вакцины).

Установлена статистически значимая взаимосвязь между клиническим показателем WI и 23 расчетными параметрами массива сенсоров для группы телят первого месяца жизни. С клиническими и функциональными признаками поражения органов дыхания коррелируют сигналы сенсоров с пленками МО и МУНТ, а также параметры m_{358} , m_{368} , m_{378} , α_{138} , α_{168} . Для общеклинической оценки состояния органов дыхания также важны параметры m_{248} , m_{568} . Построена регрессионная модель методом проекции на латентные структуры (ПЛС), прогнозирующая общеклиническое состояние животного (показатель WI, рисунок), которая позволяет выделять все диагностические группы (выделены областями) с погрешностью менее 4 %. При этом из 15 параметров наиболее важными являются m_{136} , α_{137} , α_{138} , α_{168} , A_{16}^{\max} . При построении ПЛС-модели по выходным данным массива

сенсоров для проб носовой слизи телят также можно выделить диагностические группы без учета дыхательной недостаточности.

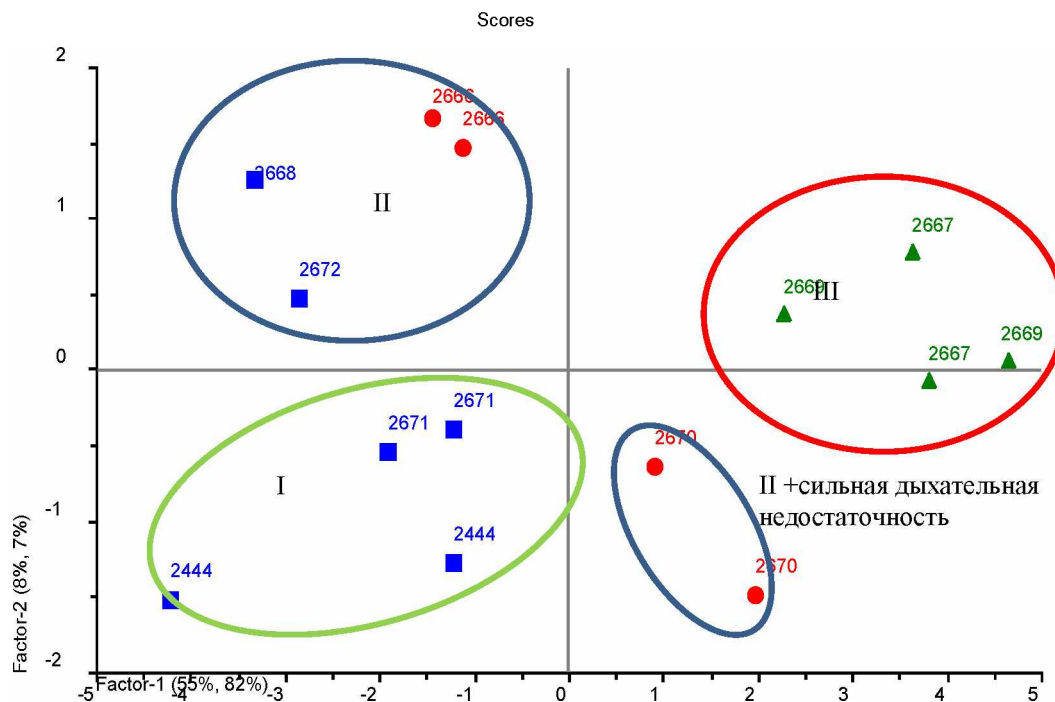


Рисунок. График счетов ПЛС-моделей для прогнозирования индекса WI по выходным данным массива сенсоров при анализе РГФ над пробами КВВ от новорожденных телят: I – группа «здоровы со стороны дыхательной системы», II – группа «с субклиническим течением респираторных заболеваний», III – группа «с признаками поражения органов дыхания»

Заключение. Установлены наиболее показательные клинические признаки и вещества-маркеры для ранжирования телят первого месяца жизни на диагностические группы по состоянию органов дыхания и их взаимосвязь с выходными данными массива сенсоров, по которым построена ПЛС-модель для экспресс-диагностики респираторных болезней у телят.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шабунин С.В., Шахов А.Г., Черницкий А.Е., Золотарев А.И., Рецкий М.И. Респираторные болезни телят: современный взгляд на проблему // Ветеринария. 2015. № 5. С. 3.
2. Cathcart M.P., Hughes K.J. The application of exhaled breath gas and exhaled breath condensate analysis in investigation of lower respiratory tract in veterinary medicine: A re-

view // The Veterinary Journal. 2012. V. 191. № 2. P. 282.

3. McGuirk S.M. Disease management of dairy calves and heifers // Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2008. V. 24. № 1. P. 139.

4. Кучменко Т.А., Шуба А.А. Информативность выходных сигналов «электронного носа» на пьезосенсорах // Аналитика и контроль. 2017. Т. 21. № 2. С. 71.

5. Кучменко Т.А., Мишина А.А. Особенности сорбции паров аминов на тонких пленках кислотно-основных индикаторов // Журнал аналит. химии. 2011. Т. 66. № 8. С. 816.

INFORMATIVITY OF OUTPUT DATA OF AN ARRAY OF CHEMICAL SENSORS FOR DIAGNOSIS OF PATHOLOGIES OF RESPIRATORY ORGANS IN CALVES

Shuba A.A.¹, Kuchmenko T.A.¹, Chernitskyi A.Ye.², Umarkhanov R.U.¹

¹Federal State Budgetary Establishment of Higher Education "Voronezh State University of Engineering Technologies"
394006, Voronezh, Revolution Avenue, 19

²Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy"

Abstract. *Clinical and laboratory studies of calves up to 1 months life have been carried out with the determination of hematological and biochemical markers of inflammation (leukocytosis, increasing the concentration of haptoglobin in serum), pathogens viral and bacterial infections involving lesions of the respiratory organs in calves. A ranking was proposed for the groups "healthy on the part of the respiratory system," "with a subclinical course of respiratory diseases," "with symptoms of respiratory failure." It was established that the most indicative clinical signs for ranking on diagnostic groups are the WI scale, spontaneous and induced cough, including after functional load (30-second expiratory apnea), tidal volume. According to the calculated parameters of the sensor array, individual classes of volatile organic compounds in the gas phase over biological samples have been identified as an additional diagnostic criterion for the inflammatory processes of the respiratory organs in calves. A correlation was established between clinical and laboratory parameters and the output data of an array of sensors (A_{ij}^{\max} , m_{ijn} , α_{ijn}). A regression model was constructed using the projection method on latent structures, which predicts the general clinical state of the animal (WI index), which allows you to select all diagnostic groups with an error of less than 4%.*

Keywords: *calves, respiratory diseases, non-invasive diagnostics, chemical sensors, substances - markers of inflammation.*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВРОЖДЁННЫМИ АНОМАЛИЯМИ ПОТОМСТВА У СВИНЕЙ КРУПНОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ И ЛАНДРАС

**Траспов А.А., Костюнина О.В., Белоус А.А., Карпушкина Т.В.,
Свеженцева А.А., Зиновьева Н.А.**

*ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Г.о. Подольск, Дубровицы, 60
traspovalex@gmail.com, kostolan@yandex.ru, tati.kriz@gmail.com, n_zinovieva@mail.ru,
svegentseva@nsgc.ru*

Аннотация. *Выявление областей генома, прямо или опосредовано связанных с признаками пороков развития у домашних свиней, может способствовать идентификации генетических мишеней, используемых в качестве биомаркеров индивидуальных особенностей формирования экстерьера, их метаболический статус, а также подверженность генетическим заболеваниям. Подобные исследования связаны с повышением экономической эффективности, так как позволяют выявлять и исключать из селекционного процесса животных-носителей нежелательных генов, фенотип которых может не проявляться. В данной работе был проведён поиск подобных целевых генов и геномных регионов с помощью полногеномных-ассоциативных исследований (GWAS) с использованием ДНК-чипов PorcineSNP60K BeadChips (Illumina, San Diego, USA). Всего было проанализировано 48 хряков свиней крупной белой породы СГЦ «Знаменский» Орловской области по 21 недостатку экстерьера и дефектам развития у 39153 их потомков. Расчёты производили по линейной модели смешанного типа в программном пакете GEMMA.*

Исследования проводили на хряках крупной белой породы и их потомках, разводимых в ООО «Знаменский селекционно-гибридный центр» Орловской области. Было произведено полногеномное генотипирование хряков (n=48) с использованием ДНК-чипа средней плотности Porcine SNP60BeadChip (Illumina Inc., США). По результатам контроля качества, проведенного в программном пакете Plink 1.9, по параметрам качества генотипирования 90%, для одного SNP (--geno 0.1) и для одного образца (--mind 0.1), частот минорных аллелей не более 0,5% (--maf 0.05) [5]. В итоге, всего фильтрацию прошло 36704 полиморфных SNP.

Ключевые слова: *маркер-зависимая селекция, количественные признаки, SNP-чипы, полногеномные ассоциативные исследования, пороки развития свиней.*

Введение. В свиноводстве болезни приводят к большим экономическим потерям не только из-за затрат на медикаментозное лечение, но и вследствие снижения продуктивных показателей больных свиней. Расширение знаний о причинах болезней позволит нивелировать их влияние на организм, благодаря более совершенным программам разведения [9]. От-

клонения от нормального развития могут затрагивать различные органы и системы, ухудшая физическое состояние животного или даже приводя к смерти. Анатомические аномалии или дефекты, встречаются, по крайней мере, у 1% новорожденных поросят. Они могут быть вызваны как генетическими, так и экологическими факторами. В отдельных стадах такие аномалии могут встречаться с достаточно высокой частотой, приводя к значительным экономическим потерям [6].

Одной из стратегий снижения экономических потерь, обусловленных наследственными болезнями, является выявление и исключение из разведения животных, являющихся генетически чувствительными к таким заболеваниям. Дополнение индексов племенной ценности (EBV) информацией, полученной на основании анализа непосредственно генотипа животного, делает возможным создание нового типа индекса – GEBV (Genetic Evaluation Breeding Value), характеризующегося более высокой точностью. Таким образом, дополнение традиционных методов оценки молекулярно-генетическими данными, является шагом вперед в направлении повышения интенсивности искусственного отбора. Выявление молекулярных маркеров, ответственных за желательные фенотипические эффекты, облегчают селекционный процесс и ускоряют получение прибыли в производстве [4]. Исследования ассоциаций ДНК-маркеров в свиноводстве привлекают внимание ученых как в нашей стране, так и за рубежом [2], [3]. Современные методы полногеномных исследований (детекция SNP, полногеномное секвенирование) находят применение в выявлении генетических факторов и, как следствие, в понимании биологических процессов, лежащих в основе развития экстерьера у свиней. С учётом возможного сцепленного наследования и коэкспрессии соседних генов, детекции отдельных SNP может быть недостаточно для детального исследования комплексных признаков заболеваний или резистентности к ним. Включение в селекционные программы ДНК-маркеров QTL в качестве дополнительного критерия позволяет повысить точность оценки племенной ценности животных в аспекте их продуктивности, с учётом потенциального носительства генетических дефектов или наличия резистентности к ряду заболеваний [7], [8].

Материалы и методы. Исследования проводили на хряках крупной белой породы и их потомках, разводимых в ООО «Знаменский селекционно-гибридный центр» Орловской области. Было произведено полногеномное генотипирование хряков ($n=48$) с использованием ДНК-чипа средней плотности Porcine SNP60BeadChip (Illumina Inc., США). По результатам контроля качества, проведенного в программном пакете Plink 1.9, по параметрам качества генотипирования (выше 90%), частоты минорных аллелей (не более 0,5%), ошибок по Менделю (не более 1%), неравновесного сцепления генов (с шагом 50 kb), для анализа было отобрано 36704 полиморфных SNP [5].

У потомков хряков ($n=39153$) проводили учет фенотипических признаков, включающих продуктивные показатели и недостатки (пороки) экстерьера. Расчёт племенной ценности (EBV) по пяти продуктивным показателям, включая количество живорождённых поросят (LB), вес поросят при рождении и к отъёму (BW, BT), количество мумифицированных плодов (MU), сохранность поросят к отъёму (PT), проводили с использованием программного пакета BLUPF90.

Также были рассчитаны частоты встречаемости генов у особей (потомков) с учетом их статуса (носитель / не носитель) по 21 признаку, характеризующему пороки экстерьера и другие нежелательные качественные показатели: крипторхизм (CR), недоношенность (AF), атрезия ануса (AA), чёрные и серые пятна на шкуре (BD, GD), недоразвитие при рождении (LW), несоответствие породе (WB), общий вес при рождении (CW), проблемы с пищеварением (DP), гермафродитизм (HM), наличие грыж (пупочная и паховая) (CH, UH), низкий материнский индекс (LSI), пониженное либидо у хряков (LL), несовершенный эпителиогенез (SL), низкая интенсивность роста (SG), некачественное семя у хряков-производителей (LSQ), синдром спастического тремора поросят (TP), уродства (UP), искривление конечностей (CL) и аномалии копыт (HA).

Полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) проводили в программном пакете GEMMA, используя линейную модель смешанного типа, отдельно для показателей EBV и частот встречаемости

В пакете GEMMA была получена либо оценка максимального правдоподобия (Maximum Likelihood Estimate - MLE), либо ограниченный

максимум оценки правдоподобия (Restricted Maximum Likelihood Estimate - REML). Для подтверждения достоверного влияния SNP и определения значимых регионов в геноме животных были использованы тесты Бонферрони (BFR) с пороговым значением $P \geq 0,1$ и $P \geq 0,05$ ($P < 1,42 \times 10^{-6}$), и $0,1$ ($P < 2,86 \times 10^{-6}$) по ожидаемой доле ложных отклонений В. Efron. При вычислении скорректированных индексов Q, был использован список р-значений, полученных в результате одновременного тестирования многих гипотез (Wald, Likelihood ratio или Score) [1].

Идентификацию генов и их функциональную аннотацию проводили по базе взаимосвязей STRING (<https://string-db.org/cgi/input.pl>).

Результаты. По результатам исследования были установлены значимые (согласно критериям BFR, с пороговым значением $P \geq 0,1$ и $FDR = 0.05$) ассоциативные связи для одного (количество мумифицированных плодов, MU) из пяти изученных продуктивных показателей и трех (атрезия ануса, AA; синдром спастического тремора поросят, TP; аномалии копыт, HA) из 21 проанализированного качественного показателя хряков-производителей. 3 SNP с высокими значениями достоверности обнаружено для признака MU ($P = 1.393e-06 - 2.288e-08$), 5 – для AA ($P = 1.16e-06 - 3.68e-09$), 5 - для TP ($P = 1.721e-06 - 1.24e-08$) и 14 - для HA ($P = 1.766e-06 - 1.737e-09$) (Табл. 1). Достоверность полученных результатов по хозяйственно-полезным признакам приближалась к нормальному распределению, и имела слабое отклонение от потенциально-ожидаемого для MU, AA и TP ($\lambda \sim 1$), за исключением HA, где было выявлено наличие близко-расположенных SNP, входящих в одинаковые группы генов со значительными превышениями P порога (ASGA0104521, $P = 1.737e-09$). Значимые нуклеотидные полиморфизмы были локализованы внутри отдельных генов.

Таблица 1. Достоверные ассоциации единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP), сопряженных с оцениваемыми признаками у поросят, и их локализация в геноме *Sus scrofa*

Пр-к	SNP	RS	Ch	Pos	P	A	a	β	AF	Gene
AA	ALGA0051997	rs81407818	9	27603177	2.666e-06	A	C	2.001394e-03	0.056	-
	ASGA0106167	rs81306460	10	31302650	1.158e-06	A	G	2.081251e-03	0.056	FANCC
	MARC0082230	rs81265837	12	6136945	1.419e-07	G	A	2.193750e-03	0.056	ARMC7
	ASGA0052617	rs81435284	12	6229056	1.419e-07	G	A	2.193750e-03	0.056	ENSSSCG000000017216
	ASGA0068580	rs80936660	15	1015164	3.681e-09	G	A	2.383802e-03	0.056	RND3
TP	H3GA0025901	rs81415828	9	1626616	1.24e-08	A	G	6.081343e-03	0.056	ENSSSCG0000000032665
	ASGA0099429	-	9	4656663	1.24e-08	C	A	6.081343e-03	0.056	-
	ASGA0040658	rs81413027	9	1417890	3.107e-07	G	A	4.690571e-03	0.083	-
	MARC0013008	rs81275805	9	1438136	1.721e-06	G	A	3.828089e-03	0.097	RIC3
	ASGA0054790	rs81435622	12	45034446	9.638e-07	G	A	3.975254e-03	0.083	-
HA	ASGA0104521	rs81304512	2	141925578	1.737e-09	C	A	2.346000e-03	0.056	ENSSSCG000000040250
	ALGA0014069	rs81360100	2	85105474	1.755e-06	G	A	1.872074e-03	0.083	PAWR
	ASGA0027165	rs81386880	5	106682107	1.266e-07	A	G	2.036564e-03	0.069	-
	ASGA0090791	rs81309195	6	34358134	1.953e-06	A	G	1.764154e-03	0.1	-
	ALGA0053356	rs81412069	9	64845247	3.115e-07	A	C	2.010894e-03	0.083	NTM
	ALGA0053410	rs81412202	9	65286501	3.115e-07	A	C	2.010894e-03	0.083	NTM
	MARC0024097	rs81292427	9	65379314	3.115e-07	A	G	2.010894e-03	0.083	OPCML
	MARC0051180	rs81242341	9	65591835	3.115e-07	A	C	2.010894e-03	0.083	OPCML
	DRGA0009397	rs81294295	9	65650293	3.115e-07	A	G	2.010894e-03	0.083	-
	M1GA0012732	rs81415754	9	12012638	1.766e-06	A	C	1.807143e-03	0.083	-
	ALGA0053344	rs81412038	9	64410416	2.514e-06	G	A	1.799440e-03	0.1	ENSSSCG000000017018
	MARC0041414	rs81235185	16	60218765	1.766e-06	G	A	1.807143e-03	0.083	ENSSSCG000000017018
	MARC0112574	rs81283873	16	60220801	1.766e-06	G	A	1.807143e-03	0.083	-
	H3GA0055670	-	17	52247420	1.766e-06	G	A	1.807143e-03	0.083	-

Анализ SNP, статистически-значимо связанных с пороками развития поросят крупной белой породы, выявил несколько генов, имеющих отношение к различным биологическим процессам. Так, гены *ARMC7*, *FANCC* участвуют в репарации ДНК и клеточном цикле; *FANCC* – принимает участие в передаче анемии Фанкони, *RND3* – выступает как регулятор цитоскелетных структур клетки, препятствующих адгезии, *UBAP2* - функционирует в процессе убиквитинирования и может проявлять повышенную экспрессию в надпочечниках и лимфатических узлах, *RUBCNL* – участвует в эндоцитарном транспорте и аутофагии, *PAWR* – является опухолевым супрессором, который селективно индуцирует апоптоз в раковых клетках через внутриклеточные и внеклеточные механизмы, *RIC3* - влияет на свертывание и сборку рецепторных субъединиц в эндоплазматическом ретикулуме и адгезию на поверхности клетки. Гены *NTM* и *OPCML* экспрессируются совместно и находятся на соседних участках хромосомы SSA9: 58,700,168 - 58,967,505 и 59,037,716 - 59,271,936 п.н., соответственно (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/84?genome_assembly_id=317145). *NTM* способствует росту и адгезии на поверхности нейронов, и тесно связан с родственным членом семейства, опиоидным связывающим белком - активатором клеточной адгезии *OPCML*.

Обсуждение. Полученные нами в процессе проведения исследований данные могут быть использованы при разработке селекционных программ, направленных на элиминацию пороков развития и других нежелательных количественных качественных признаков свиней, в том числе являющихся сложными признаками. Увеличение степени разрешения сканирования от 100 000 SNP и выше, а также увеличение размера выборки от нескольких сотен животных и более сделает возможным выявление значительно большего количества SNP - кандидатов с высоким уровнем достоверности ($P \geq 0,01$), а также уменьшение «генетического шума» (False Positive Components). В итоге, такой метод детекции позволит не только выявлять животных-носителей генов-кандидатов нежелательных признаков, но и создать дешёвые тест-системы для их идентификации. Хряков-производителей, имеющих подобные генетические особенности, необходимо оценивать с помощью комплексных моделей расчёта племенной ценности с учётом выявленных маркеров (GEBV), и в случае крайне

низких показателей продуктивности - выбраковать, а их потомство исключать из воспроизводства.

Заключение. Прделанная работа иллюстрирует необходимость проведения дополнительных исследований с использованием методов GWAS в аспекте характеристики популяций сельскохозяйственных животных по ДНК-маркерам и идентификации комплексных генотипов, ассоциированных с селекционно-значимыми признаками как пороков развития, так и продуктивных качеств. Данное направление является крайне необходимым в современных условиях высокоэффективного воспроизводства сельскохозяйственных животных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 1995, 57: 289-300. doi: 10.2307/2346101
2. Ciobanu, D., Lonergan, S., Huff-Lonergan, E. (2011). *The genetics of the pig*. University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68588, USA. ISBN 9781845937560. doi: 10.1079/9781845937560.0355
3. Dolmatova A. Skovorodin E. The use of DNA polymorphism in the selection of pigs / A.V. Dolmatova, // Materials of the International Scientific and Practical Conference "Modern Problems of Intensification of Pork Production in the CIS Countries": dedicated to the 75th anniversary of the Honored Scientist of the Russian Federation, Professor V.E.Ulitko. July 7-10, 2010 - Ulyanovsk. - 2010. - P. 138-143.
4. Ernst, C. W., Steibel, J. P. (2013). Molecular advances in QTL discovery and application in pig breeding. *Trends in Genetics*, 29(4), 215–224. doi:10.1016/j.tig.2013.02.002.
5. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M., Bender D., Maller J., Sklar P., Bakker P., Daly M., and Sham P. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *The American Journal of Human Genetics*, 81:559–575, 2007.
6. See T., Max F., Rothschild C., Christains J. *Swine Genetic Abnormalities*. Pork Information Gateway, 2006, PIG 06-06-01.
7. Sermyagin A., Kovalyuk N., Ermilov A., Yanchukov I., Satsuk V., Dotsev A., Deniskova T., Brem G., Zinovieva N.A. Associations of Bola-drb3 genotypes with breeding values for milk production traits in russian dairy cattle population. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, V. 51, № 6, pp. 775-781. doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.775eng.
8. Sermyagin, A., Gladyr E, Plemyashov K, Kudinov A, Dotsev A, Deniskova T, Zinovieva, N. (2018). Genome-Wide Association Studies for Milk Production Traits in Russian Population of Holstein and Black-and-White Cattle. 591-599. doi: 10.1007/978-3-319-62870-7_62 ISBN 978-3-319-62869-1.
9. Waide, E., "Molecular and quantitative genetic basis and control of severe combined immunodeficiency and porcine reproductive and respiratory syndrome in pigs" (2015). Graduate Theses and Dissertations. 14878.

IDENTIFICATION OF GENES ASSOCIATED WITH CONGENITAL ABNORMALITIES OF OFFSPRING IN PIGS OF LARGE WHITE BREED AND LANDRACE

Traspov A.A., Kostyunina O.V., Belous A.A., Karpushkina T.V., Svejenceva A.A.,
Trebunskih E.A., Zinovieva N.A.

L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Podolsky urban district, Dubrovitzky, 60, 142132.

traspovalex@gmail.com, kostolan@yandex.ru, tati.kriz@gmail.com, n_zinovieva@mail.ru, svegentseva@nsgc.ru

Abstract. Identification of the regions in the genome directly or indirectly associated with malformation traits in domestic pigs can contribute to the identification of genetic targets used as biomarkers of individual features of the formation of the exterior, their metabolic status, as well as susceptibility to genetic diseases. Such studies are associated with increased economic efficiency, as they allow to identify and exclude animals-carriers of unwanted genes from selection process, with not manifested phenotype. In this paper, the search for these target genes and genomic regions was carried out with using Genome-Wide Association Studies (GWAS) using DNA PorcineSNP60K BeadChips (Illumina, San Diego, USA). In total 48 boars of pigs of large white breed of SGC "Znamensky" in the Orel region were analyzed on 21 traits of an exterior and defects of development at 39153 their descendants. Calculations were performed using a linear mixed-type model in the GEMMA software package.

Studies were carried on boars of large white breed and their descendants bred in SGC "Znamensky breeding and hybrid center" of the Orel region. Full genotyping of boars ($n=48$) was performed using the Porcine SNP60BeadChip medium density DNA chip (Illumina Inc., USA.) According to the results of quality control carried out in the software package Plink 1.9, the quality parameters of genotyping 90%, for one SNP (--geno 0.1) and for one sample (--mind 0.1), the frequency of minor alleles is not more than 0.5% (--maf 0.05) [5]. As a result, a total set from 36704 polymorphic SNPs were obtained.

Keywords. Marker assign selection, quantitative trait loci, SNP-chips, genome-wide association studies, malformations.

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Авдеева Е.В., 130
Авраменко Т.В., 18
Алексеев В.А., 59
Алёшкина А.И., 240
Аль-Дарабсе А.М.Ф., 10
Архипова А.Л., 14

Б

Багиров В.А., 91, 158
Балабанова Л.А., 18
Белоус А.А., 255
Беляк О.А., 22
Бойко Е.В., 26
Быкова И.Б., 240

В

Веселов А.П., 217
Волкова Н.А., 158
Володяев И.В., 79

Г

Гарская Н.А., 31
Гладких Л.П., 37
Глебов А.П., 68
Гроссманн Р., 191
Гулов А.Н., 41, 166

Д

Денисенко В.Ю., 46
Денисова Т.В., 10
Джуламанов К.М., 161
Дорофеев К.А., 161
Дуняшев Т.П., 50
Дускаев Г., 54

Е

Евдокимов Н.В., 59
Езерский В.А., 63, 100
Елизарова А.С., 68
Еримбетов К.Т., 72
Ефимочкина Н.Р., 240

З

Земляной Р.А., 72
Зиновьева Н.А., 255

И

Иванова Т.Н., 187
Ильина Л.А., 50, 83
Иолчиев Б.С., 91, 158, 213
Исаев Д.А., 68, 79

Й

Йылдырым Е.А., 50, 83

К

Калинин А.Г., 87
Камыш Н.А., 22
Карпушкина Т.В., 255
Кван О., 54
Кипень В.Н., 149
Кленовицкий П.М., 91
Климов Е.А., 14
Кобер В.И., 161
Ковальчук С.Н., 14, 227
Ковалюк Н.В., 96
Колоскова Е.М., 63, 100
Колпаков В.И., 161
Коновалова Е.Н., 105
Корниенко Е.В., 111
Коропец Л.А., 26

Костюнина О.В., 105, 255

Косян Д., 54

Криворучко А.Ю., 182

Кривохарченко А.С., 196

Крутикова А.А., 145

Крутова Е.К., 217

Кузьмина Т.И., 208, 235

Кучменко Т.А., 249

Л

Лайшев К.А., 50

Лакота Е.А., 117

Лаптев Г.Ю., 50, 83, 120

Лебедева И.Ю., 125, 135, 191, 201

Лемеш В.А., 149

М

Малеко Г.П., 111

Мальцева И.С., 130

Маркова Е.В., 10

Маркова Ю.М., 240

Мартынова М.Ю., 79

Марченко М.В., 18

Мачульская Е.В., 96

Минаева Л.П., 240

Митяшова О.С., 125, 135, 201

Михайлова М.Е., 22

Мусидрай А.А., 145

Н

Немцева Е.Ю., 141

Никитин Д.А., 37

Никиткина Е.В., 145

Носова А.Ю., 149

О

Обвинцева О.В., 72

П

Парвизи Н., 191

Перетятко Л.Г., 31

Пичугина Т.В., 240

Плахтюкова В.Р., 176

Полянина А.С., 240

Почукалин А.Е., 153

Прыйма С.В., 153

Прытков Ю.А., 158

Р

Рахматуллин Ш., 54

Ризун О.В., 153

Романенкова О.С., 105

Романова А.Б., 111

Ручай А.Н., 161

Рыков Р.А., 125, 201

С

Сайфутдинова З.Н., 41

Сайфутдинова З.Н., 166

Сафарян Е.Ю., 171

Сацук В.Ф., 96

Свеженцева А.А., 255

Сейткалиева А.В., 18

Селионова М.И., 176, 182

Семенов В.Г., 37, 187

Смекалова А.А., 191

Сметанина И.Г., 196

Солдатова В.В., 50, 83

Соловьева А.Г., 72

Соломахин А.А., 125, 135, 201

Сон О.М., 18

Станиславович Т.И., 208

Стеценко В.В., 240

Суржикова Е.С., 176

Т

Таджиева А.В., 213
Тарасов С.С., 217
Татарина Л.В., 196
Текутьева Л.А., 18
Терлецкий В.П., 221
Тимофеева С.В., 145
Тиханович Н.И., 22
Траспов А.А., 255
Требунских А., 213
Тыщенко В.И., 221

У

Умарханов Р.У., 249
Успешный А.В., 37

Ф

Федорина Е.А., 227
Федорова А.В., 72
Филиппова В.А., 50
Филиппова Л.П., 141

Х

Халак В.И., 231

Ц

Царь А.И., 149

Ч

Черницкий А.Е., 249
Чижова Л.Н., 176
Чистякова И.В., 235

Ш

Шапиев И.Ш., 145
Шарко Г.Н., 176
Шахназарова Ю.Ю., 96
Шевелёва С.А., 240
Шишанова Е.И., 68, 79
Шкрыль Ю.Н., 18
Шуба А.А., 249

Ю

Югай Ю.А., 18
Юницкая В.В., 96

Я

Яушева Е., 54
Яцык О.А., 171

Материалы международной научной конференции

**«Современные достижения и проблемы
генетики и биотехнологии в животноводстве»,
посвященной 90-летию академика Л.К. Эрнста**

*Мероприятие проведено при финансовой поддержке Российского фонда
фундаментальных исследований, проект № 19-016-20024*

Компьютерная верстка: Наumenко И.А.

Издательство ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Отпечатано в типографии ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Московская область, ГО Подольск, п. Дубровицы, д.30.
Заказ № 20. Печ. л. 14. Тираж 200 экз.