**Здравствуйте, уважаемые коллеги!**

В современном мире проблема идентификации продовольственного сырья и пищевой продукции по праву считается одной из наиважнейших. На сегодняшний день, она в наибольшей степени соотносится с продовольственной безопасностью страны, в т.ч. в части контроля за оборотом некачественной, контрафактной и фальсифицированной продукции.

Среди множества аналитических методов отдельно следует выделить те, которые способствуют аутентификации продовольственного сырья и пищевой продукции по биологической и географической принадлежности. В этом ракурсе наиболее целесообразно применение высокоэффективных ДНК-технологий.

**[слайд] *ДНК-аутентификация продовольственного сырья и пищевой продукции*** – процесс подтверждения их подлинности (аутентичности) с учетом индивидуальных особенностей наследственного материала исследуемых компонентов биологических объектов.

**[слайд] В о*сновные этапы ДНК-аутентификации*** входят экстракция нуклеиновых кислот из исследуемых образцов, амплификация ДНК, т.е. увеличение числа копий ДНК, синтезируемой преимущественно методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), последующий этап электрофорезной или гибридизационно-флуоресцентной детекции синтезированной ДНК, дополнительная процедура секвенирования ДНК с интерпретацией полученных результатов программным обеспечением генетического анализатора, сторонними приложениями и биоинформационными ресурсами при сопоставлении исследуемых проб с соответствующими эталонами и референсными нуклеотидными последовательностями.

При этом генетической мишенью для анализа служат информативные локусы ядерной, митохондриальной, хлоропластной ДНК с широким спектром применяемых ДНК-маркеров.

Из обширной области ДНК-аутентификации продовольственного сырья и пищевой продукции можно выделить ряд перспективных направлений, требующих развития.

**[слайд] *ДНК-аутентификация зерна злаковых культур, муки и мучных изделий***, в частности по анализируемым локусам генов, ассоциированных с высокими мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна, например, высокомолекулярных субъединиц глютенинов, ряд из которых повышают качественные показатели сырья, а также *Waxy*-генов, влияющих на образование крахмала амилопектинового типа.

**[слайд]** Скрининг генотипов пшеницы по аллельным вариантам генов *Waxy* и HMW субъединиц глютенинов является составным звеном маркер-ориентированной селекции сортов с высокими значениями показателей мукомольно-хлебопекарных и технологических свойств зерна.

При этом процесс маркер-ассоциированной селекции можно рассматривать с позиции прижизненного формирования состава и технологических свойств сырья в рамках системы контроля качества готовой продукции.

**[слайд]** Системы молекулярного маркирования аллельных вариантов перечисленных генов на основе ДНК-технологий, подбираемые с учетом знаний об их полиморфизме, позволяют идентифицировать перспективные генотипы и расширять круг доноров и источников хозяйственно-ценных аллелей.

В целом, ДНК-технологии интегрированы в фундаментальные и прикладные исследования, направленные на поиск, мобилизацию и сохранение генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей, а также управление селекционным процессом создания новых генотипов растений с высокими хозяйственно-ценными признаками продуктивности, устойчивости к био- и абиострессорам.

[**слайд**] Одним из подходов к идентификации аллельных вариантов *Waxy*-генов пшеницы является общеизвестный способ проведения ПЦР с праймерами, инициирующими амплификацию соответствующих аллель-специфичных фрагментов.

Существенным недостатком данного способа проведения ПЦР является трудность дифференциации ряда аллельных вариантов.

Для эффективной аллельной дискриминации нами были разработаны оригинальные способы генотипирования, повышающие точность ДНК-анализа.

В частности, сочетанием общепринятого и предложенного нами способа генотипирования для комплексной идентификации аллельных вариантов *Waxy*-генов пшеницы достигается точность ДНК-анализа с эффективной дифференциацией аллелей *A1*-локуса.

[**слайд**] А использованием другого предложенного нами способа проведения ПЦР для идентификации аллельных вариантов *B1*-локуса *Waxy*-гена пшеницы повышается точность интерпретации результатов генотипирования с эффективной дискриминацией функциональных аллелей от неактивного нуль-аллеля благодаря более лучшему разделению амплифицированных фрагментов в агарозном геле в сравнении с прототипом.

 [**слайд**] Предложенные способы генотипирования позволили провести молекулярно-генетическую оценку образцов яровой пшеницы отечественной селекции на предмет идентификации и установления наиболее перспективных генотипов, рассматриваемых в качестве исходного материала для дальнейшей селекционной работы по созданию сортов яровой пшеницы с крахмалом амилопектинового типа.

[**слайд**] Одним из подходов к идентификации аллельных вариантов HMW субъединиц глютенинов пшеницы являются способы проведения ПЦР с соответствующими наборами праймеров для идентификации аллелей *A-* и *D-*локусов с детекцией полученных результатов преимущественно методами капиллярного или вертикального гель-электрофореза.

Отличительным признаком разработанных нами способов генотипирования от прототипов является дополнительное введение этапа ПДРФ-анализа, основанного на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов при эндонуклеазном расщеплении ампликонов рестриктазой для последующей детекции полученных результатов методом горизонтального электрофореза в агарозном геле с высокой разрешающей способностью.

[**слайд**] Предложенные способы генотипирования позволили провести молекулярно-генетическую оценку образцов яровой пшеницы отечественной селекции на предмет идентификации и установления наиболее перспективных генотипов, рассматриваемых в качестве исходного материала для дальнейшей селекционной работы по созданию сортов яровой пшеницы с высокими качественными показателями зерна.

 **[слайд]** ***ДНК-аутентификация винного сырья и винной продукции*** – технологический процесс проверки их подлинности геноидентификацией основного растительного компонента посредством молекулярно-генетического анализа экстрагируемых нуклеиновых кислот винограда (*Vitis vinifera* L.).

Методы ДНК-аутентификации винного сырья и винной продукции основаны на применении спектра генетических маркеров ядерной, митохондиральной и хлоропластной ДНК.

Нами ведутся исследования в данном направлении. По итогам работы планируется внедрение разработок в систему менеджмента качества с обеспечением прослеживаемости всего жизненного цикла продукта и мониторинга контрафактной и фальсифицированной продукции.

**[слайд]** Так, в рамках геноидентификации сортов винограда и ДНК-аутентификации производимых из них вин нами сконструирован оригинальный набор праймеров для амплификации одного из полиморфных локусов анализируемого гена методом ПЦР с локализацией во фланкируемом регионе единичных нуклеотидных замен, интерпретируемых секвенированием.

В результате тестирования соответствующих праймеров получен технический результат, выраженный в эффективной амплификации специфичного ПЦР-фрагмента длиной 99 п.н., пригодного для секвенирования.

[**слайд**]. Также планируется разработка систем ДНК-аутентификации сырья и напитков категорий пивоваренной и безалкогольной продукции.

В части пивоваренной промышленности – геноидентификация солода, хмеля, дрожжей и ДНК-аутентификация производимого пива и пивных напитков.

В части безалкогольной промышленности – геноидентификация плодовых, зерновых культур, дрожжей и ДНК-аутентификация производимых соков, нектаров, морсов и квасов.

 **[слайд] *ДНК-аутентификация молока и молочной продукции***. В первую очередь, это идентификация видовой принадлежности молока и сырьевого состава молочной продукции с выявлением частичной подмены заявленного вида молока ПЦР-анализом локусов митохондриальной ДНК. Дополнительно анализируемый ген каппа-казеина, ассоциированный с технологическими свойствами молока, и предопределяющий его сыропригодность и термоустойчивость.

**[слайд]** Одним из подходов к детекции единичных нуклеотидных замен и идентификации аллельных вариантов хозяйственно-ценных генов является метод проведения ПЦР в реальном времени. Нами разработаны способы проведения Real-time ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям генов каппа-казеина и диацилглицерол-ацилтрансферазы 1 (*DGAT1*) в формате гибридизационно-флуоресцентной детекции, которые вместе с их прототипами относятся к категории анти-праймер-опосредованной количественной ПЦР.

Основное отличие разработанных нами способов от прототипов кроется в конструктивных особенностях 5/-флуоресцентно-меченых прямых аллель-специфичных праймеров, полностью состоящих из ген-специфичных последовательностей, на которых, в том числе и путем конкурентной гибридизации, отжигается комплементарный анти-праймер меньшей длины, меченый гасителем флуоресценции с 3*/*-конца олигонуклеотида.

В результате практических исследований, направленных на апробацию разработанных способов проведения ПЦР в реальном времени нами получен технический результат, выраженный в эффективной идентификации искомых генотипов ввиду корректной интерпретации данных кривых увеличения интенсивности флуоресценции.

[**слайд**] В целом, скрининг генетических маркеров хозяйственно-ценных признаков является составным звеном маркер-ориентированной селекции и может позиционироваться и как элемент ДНК-технологии прижизненного формирования молочной продуктивности животных, а также состава и технологических свойств сырья-молока в контексте интенсификации молочного скотоводства, [слайд] и как элемент ДНК-технологии прижизненного формирования мясной продуктивности животных, а также состава и технологических свойств мясного сырья в контексте интенсификации мясного скотоводства.

[**слайд**] В селекционно-племенной работе также важен скрининг генетических маркеров устойчивости к лейкозу крупного рогатого скота как элемент ДНК-технологии прижизненного формирования качественного и экологически безопасного сырья.

Лейкоз крупного рогатого скота является хроническим инфекционным заболеванием опухолевой природы, наносящим весомый экономический ущерб отрасли молочного скотоводства вследствие недополучения продукции и снижения ее качества, падежа животных и затрат на проведение противоэпизоотических мероприятий. Возбудитель болезни – вирус бычьего лейкоза (ВБЛ).

 **[слайд] *Генотипическая идентификация вируса бычьего лейкоза в сырье и продуктах его переработки*** относится к области обеспечения безопасности и качества продовольственного сырья и пищевой продукции.

Продукты питания от животных из стад, неблагополучных по лейкозу, могут представлять опасность для человека из-за влияния вредных метаболитов канцерогенного действия. Вирус бычьего лейкоза обнаруживается в сырье и продуктах его переработки, оставаясь потенциальным источником инфицирования человека.

Научные сведения указывают на обнаружение провирусной ДНК в эпителиальных клетках молочных желез женщин, больных раком молочной железы, с выдвижением концепции, что вирус влияет на дестабилизацию генома хозяина и приводит к развитию ракового перерождения клетки.

Молекулярный мониторинг инфицированности стад крупного рогатого скота генотипами ВБЛ в системе противолейкозных мероприятий позволит прояснить экологию возбудителя с объективным контролем эпизоотического процесса и перспективой эффективного искоренения инфекции.

При этом логистическая дифференциация исследуемого сырья, в частности сборного молока и вырабатываемого сухого молока по административно-территориальному делению, может обеспечить полномасштабный мониторинг инфицированности дойных стад генотипами вирусного патогена.

**[слайд]** Усовершенствованной нами стратегией ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВБЛ, согласуемой с его филогенетической классификацией идентифицируются все десять открытых на сегодняшний день генотипов изучаемого вирусного патогена диагностически значимой интерпретацией генерируемых 57 генотип-ассоциированных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей.

Установлением генотипической принадлежности изолятов ВБЛ, циркулирующих в популяциях крупного рогатого скота Республики Татарстан, с использованием ПЦР-ПДРФ и филогенетического анализа секвенируемых последовательностей фрагмента *env*-гена возбудителя констатируется факт циркуляции в исследуемом ареале четырех из десяти известных генотипов ВБЛ – представителей 1-го, 4-го, 7-го и 8-го генотипов, последний из которых открыт нашей группой исследователей.

[слайд] В заключении, в контексте темы доклада хотелось бы акцентировать внимание на уже существующие и успешно реализуемые отечественные коммерческие тест-системы, а также планируемые к разработке в коллаборации с научными организациями и научно-производственными объединениями.