

десятилетия. Однако самое важное «улучшение», которое требуется от этих методов, заключается в снижении их стоимости, что особенно актуально для геномной селекции, поскольку генотипирование по-прежнему значительно дорого. Поскольку наука и техника продолжают двигаться в этом направлении, трудно предсказать, какой прогресс станет доступен для селекционеров через два или три десятилетия.

Список использованных источников

- 1 Rangan P., Furtado A., Henry R. J. New evidence for grain specific C4 photosynthesis in wheat //Scientific reports. – 2016. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-12.
- 2 Yang W. et al. Synthetic hexaploid wheat and its utilization for wheat genetic improvement in China //Journal of Genetics and Genomics. – 2009. – Т. 36. – №. 9. – С. 539-546.
- 3 Poland J. A. et al. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach //PloS one. – 2012. – Т. 7. – №. 2. – С. e32253.
- 4 Bassi F. M. et al. Breeding schemes for the implementation of genomic selection in wheat (*Triticum* spp.) //Plant Science. – 2016. – Т. 242. – С. 23-36.
- 5 Shan Q. et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system //Nature protocols. – 2014. – Т. 9. – №. 10. – С. 2395-2410.
- 6 Zhang W. et al. Meiotic Homoeologous Recombination-Based Alien Gene Introgression in the Genomics Era of Wheat //Crop Science. – 2017. – Т. 57. – №. 3. – С. 1189-1198.
- 7 Ghosh S. et al. Speed breeding in growth chambers and glasshouses for crop breeding and model plant research //Nature protocols. – 2018. – Т. 13. – №. 12. – С. 2944-2963.
- 8 Fahlgren N., Gehan M. A., Baxter I. Lights, camera, action: high-throughput plant phenotyping is ready for a close-up //Current opinion in plant biology. – 2015. – Т. 24. – С. 93-99.

УДК 57

ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* В ОБРАЗЦАХ ВОДЫ И ТКАНЕЙ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР

Щипун Наталья Вячеславна

Natasha.shipun@mail.ru

Магистрант факультета естественных наук ЕНУ им.

Л.Н.Гумилева, г. Нур-Султан, Казахстан

Научный руководитель- Сегизбаева Гульсим Жалгасовна

Аннотация: *Flavobacterium psychrophilum* является возбудителем бактериальной болезни холодной воды и синдрома мальков радужной форели, двух заболеваний, ведущих к высокой смертности. Обнаружение возбудителя в основном осуществляется с использованием культур, поэтому необходимы более быстрые и чувствительные методы.

Ключевые слова: *F. Psychrophilum*, количественная ПЦР, ген *groS*, болезнь холодной воды.

Введение: Флавобактерии - неферментирующие, каталазо- и оксидазоположительные, грамотрицательные, желтые палочки, часто выделяемые из различных экосистем.

Некоторые виды, в частности *Flavobacterium branchiophilum*, *F. columnare* и *F. Psychrophilum*, являются опасными возбудителями болезней рыб, ответственными за вспышки заболевания на рыбных фермах по всему миру [1-5] .

F.psychrophilum вызывают поражение кожи, жабр и плавников, а также системные заболевания внутренних органов рыб, так называемую бактериальную болезнь холодной

воды (BCW) и синдром мальков радужной форели (RTFS), которые могут приводить к высокой смертности в популяциях. [6].

Диагностика инфекций, вызванных *F. psychrophilum*, основывается главным образом на макроскопических симптомах, микроскопическом исследовании свежих образцов селезенки рыб и посевах образцов тканей на неселективную агаризованную среду [7-8]. Из-за часто лишь поверхностного расположения болезни на рыбе, а также низкой плотности и медленного роста возбудителя ранние стадии инфекции легко не заметить. Это может привести к ложноотрицательным результатам, увеличивая количество неверных диагнозов [9].

Недавно была описана флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) для диагностики инфекций *F. psychrophilum* у рыб: метод быстрый, надежный и позволяет обнаруживать концентрации *F. psychrophilum* $>10^5$ клеток/мл в образцах воды и селезенки. В некоторых случаях FISH дает количественные результаты, но этот специфичный для *F. psychrophilum* FISH позволяет только качественное обнаружение, но не количественное определение патогена [10].

В последние несколько лет были описаны методы ПЦР для обнаружения и диагностики инфекций, вызванных *F. psychrophilum*. ПЦР, как и вложенная ПЦР, высокочувствительны, быстры и позволяют одновременно обнаруживать разные патогены. Доступные в настоящее время методы ПЦР могут быть использованы для обнаружения *F. psychrophilum* в образце [11].

Количественная ПЦР в реальном времени (кПЦР) использовалась в нескольких исследованиях для повышения чувствительности методов обнаружения и количественного определения бактерий [12]. Благодаря высокой чувствительности этот метод широко используется для выявления малых количеств ДНК возбудителя в окружающей среде или в организме при инфекции, для мониторинга ее распространения, а также для изучения здоровых носителей как резервуаров возбудителя. Недавно были разработаны две количественные ПЦР для *F. psychrophilum* [13], однако обе они были протестированы только на тканях рыб, и по-прежнему существует потребность в количественных методах, позволяющих определять количество *F. psychrophilum* в полевых образцах, таких как вода и почва.

Выбор видоспецифического маркерного гена имеет решающее значение для хорошей диагностической ПЦР. *rpoC*, однокопийный ген, присутствующий в *Flavobacterium* spp., использовался для оценки филогенетических отношений и частоты мутаций у разных родов и видов, и было показано, что он более изменчив на межвидовом уровне, чем ген 16S рРНК [14]. Более того, каждая бактериальная клетка может содержать различное количество копий генов 16S рРНК. Например, *F. psychrophilum* содержит в среднем 6 копий генов 16S рРНК, что затрудняет точную количественную оценку количества бактерий в образце. Таким образом, нацеливание на гены с одной копией позволяет проводить более точное количественное определение патогена, при этом одна копия гена соответствует одной бактериальной клетке [15].

Кроме того, изменчивость *rpoC* может обеспечить специфическую амплификацию целевой последовательности *F. Psychrophilum*, что делает *rpoC* хорошим кандидатом для использования в количественной ПЦР.

Таким образом, цель этого исследования заключалась в разработке количественной ПЦР с использованием гена *rpoC* в качестве мишени для быстрого обнаружения и количественного определения *F. psychrophilum* в естественной среде.

Результаты. Все стандарты количественной ПЦР и прогоны образцов соответствовали критериям надежности, определенным в методах. Мы наблюдали хорошую корреляцию между значениями порога цикла (Ct) и количественными показателями стандартов, с наклоном кривой линейной регрессии в 7-логарифмическом диапазоне от 2×10^7 до 2×10^0 копий гена *rpoC*, равным -3,18 ($R^2 = 0,998$), что указывает на КПД 106%. Поэтому очищенные разведения амплифицированных фрагментов использовали для

всех последовательных количественных определений в качестве стандартов. Предел обнаружения (LOD) составлял 20 копий гена на реакцию (LOD 100%). Амплифицировать 2 копии гена *rpoC F. psychrophilum* за реакцию удавалось в 90% случаев. Это значение ниже теоретического значения, указанного Bustin et al., которые пришли к выводу, что наиболее чувствительным теоретически возможным LOD будет 3 копии на реакцию с 95% вероятностью включения по крайней мере 1 копии гена. Предел количественного определения (QL) составлял 10^3 копий гена на реакцию (QL 96%). Это сравнительно высокое значение можно объяснить потерями при выделении ДНК в образцах с низкой концентрацией бактерий.

КПЦР показала слабую перекрестную реакцию с самыми высокими концентрациями чистой ДНК *F. branchiophilum* и *F. johnsoniae* (соответственно 10^6 клеток и 10^7 клеток на реакцию, в среднем 50 и 100 обнаруженных копий). Однако эти значения показали стандартное отклонение >25% и, таким образом, должны были рассматриваться как отрицательные в соответствии с принятыми нами правилами проверки надежности. Чтобы исследовать перекрестную реакцию с другой ДНК патогенных флавобактерий рыб, метод количественной ПЦР был протестирован на смесях ДНК *F. psychrophilum* и *F. columnare* или *F. branchiophilum*. Наша количественная ПЦР показала высокую специфичность в отношении *F. psychrophilum* и соответствие между наблюдаемыми и ожидаемыми значениями смешанных образцов было очень хорошим даже при низком количестве копий гена *rpoC F. Psychrophilum*.

F. psychrophilum можно было надежно обнаружить также в селезенках с шипами (линейные результаты до 20 клеток на реакцию, $R^2 = 0,9991$). Количественная оценка воспроизводилась без какого-либо наблюдаемого взаимодействия между ДНК ткани селезенки и зондом и праймерами для количественной ПЦР.

Обнаружение и количественная оценка *F. psychrophilum* в пробах окружающей среды.

Никакие *F. psychrophilum* не были обнаружены ни в одной из проб воды с помощью посева или FISH.

Однако *F. psychrophilum* можно было обнаружить с помощью количественной ПЦР в 7 % проб воды на входе и в 53 % проб воды в резервуаре (LOD ≥ 20 копий, т.е. 66 клеток *F. psychrophilum* /мл отобранных проб) в подгруппе из 60 ,60 проб из резервуаров для воды с рыбных ферм, где в 2018 г. было сообщено как минимум об одной вспышке *F. psychrophilum* ; положительное значение на входе коррелировало с положительными пробами из резервуара ($n = 4$), в то время как соответствия не наблюдалось на 29 фермах, которые имели положительные пробы воды в резервуаре (минимальное и максимальное значения: от 42 до 3200 клеток/мл), но отрицательную воду на входе. Значения выше КЖ (3300 клеток *F. psychrophilum* /мл отобранной пробы) наблюдались только в 1 паре проб воды на входе и в баке со значениями $1,5 \times 10^4 \pm 352$ и $3,5 \times 10^4 \pm 724$ кл/мл. Из-за сравнительно большого количества проб воды из резервуаров, давших положительный результат на *F. psychrophilum* в первой подгруппе исследованных образцов, мы решили проверить все образцы из резервуаров 2020 года. Однако из 85 проб воды из резервуаров, собранных в 2020 г., только 8 (10%) оказались положительными (диапазон: от 43 до 3000 клеток/мл).

В отличие от культивирования или FISH, *F. psychrophilum* был обнаружен у здоровых и количественно определен у инфицированных рыб с помощью количественной ПЦР. Плотность *F. psychrophilum* у здоровых особей была значительно ниже QL в диапазоне от 0 до 15 000 клеток на селезенку, тогда как в селезенке больных рыб плотность бактерий превышала QL в диапазоне от 7 000 до $7,7 \times 10^8$ клеток на селезенку. Положительные результаты количественной ПЦР были зарегистрированы для всех селезенки, полученных в результате 4 вспышек; FISH позволил выявить *F. psychrophilum* во всех очагах, тогда как посев показал *F. psychrophilum* только в 3 очагах.

Выводы. Это исследование показало, что количественная ПЦР с использованием гена *rpoC* может использоваться в качестве надежного специфического диагностического

инструмента для обнаружения и количественной оценки колонизации и инфекций *F. psychrophilum*. Этот метод можно использовать для проверки наличия патогена на рыбных фермах с целью предотвращения разрушительных вспышек. qPCR также может применяться в исследованиях вертикальной передачи патогенов [16], для изучения факторов риска, включая различные стрессовые состояния, и для проверки вспышек из-за сетевых структур среди рыбных хозяйств [17]. Бессимптомное присутствие *F. Psychrophilum* которые мы наблюдали в некоторых образцах рыбы, указывает на то, что выживание патогена может способствовать значительному риску вспышек, вызванных торговлей рыбой, когда здоровые носители вступают в контакт с другими особями другого происхождения.

Список использованной литературы.

1. Baker GC, Gaffar S, Cowan DA, Suharto AR. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;**200**(1):103–109. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10700.x.
2. Eiler A, Bertilsson S. Flavobacteria blooms in four eutrophic lakes: linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Appl Environ Microbiol.* 2007;**73**(11):3511–3518. doi: 10.1128/AEM.02534-06.
3. Peeters K, Willems A. The *gyrB* gene is a useful phylogenetic marker for exploring the diversity of *Flavobacterium* strains isolated from terrestrial and aquatic habitats in Antarctica. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;**321**(2):130–140. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02326.x
4. Barnes ME, Brown ML. A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and Bacterial Cold Water Disease prevention and treatment. *Open Fish Sci J.* 2011;**4**:1–9.
5. Bernardet JF, Kerouault B. Phenotypic and genomic studies of “*Cytophaga psychrophila*” isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl Environ Microbiol.* 1989;**55**(7):1796–1800.
6. Hesami S, Allen KJ, Metcalf D, Ostland VE, MacInnes JI, Lumsden JS. Phenotypic and genotypic analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Ontario salmonids with bacterial coldwater disease. *Can J Microbiol.* 2008;**54**(8):619–629. doi: 10.1139/W08-058.
7. Madetoja J, Dalsgaard I, Wiklund T. Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments. *Dis Aquat Organ.* 2002;**52**(2):109–118.
8. Valdebenito S, Avendano-Herrera R. Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *J Fish Dis.* 2009;**32**(4):321–333. doi: 10.1111/j.1365-2761.2008.00996.x.
9. Wakabayashi H, Huh GJ, Kimura N. *Flavobacterium branchiophila* sp. nov., a causative agent of Bacterial Gill Disease of freshwater fishes. *Int J Syst Bacteriol.* 1989;**39**(3):213–216. doi: 10.1099/00207713-39-3-213.
10. Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Haesebrouck F. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *J Fish Dis.* 2003;**26**(10):563–574. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00488.x.
11. Anderson JI, Conroy DA. The pathogenic myxobacteria with special reference to fish diseases. *J appl Bact.* 1969;**32**:30–39. doi: 10.1111/j.1365-2672.1969.tb02186.x.
12. Carlson RV, Pacha RE. Procedure for the isolation and enumeration of myxobacteria from aquatic habitats. *Appl Microbiol.* 1968;**16**(5):795–796.
13. Lehmann J, Mock D, Stürenberg FJ, Bernardet JF. First isolation of *Cytophaga psychrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids. *Dis Aquat Organ.* 1991;**10**:217–220.
14. Pacha RE. Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. *Appl Microbiol.* 1968;**16**(1):97–101.
15. Rangdale RE, Richards RE, Alderman DJ. Isolation of *Cytophaga psychrophila*, causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive fluids and egg surfaces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Bull Eur Ass Fish Pathol.* 1996;**16**(2):63.
16. Strepparava N, Wahli T, Segner H, Polli B, Petrini O. Fluorescent *in situ* Hybridization: a new tool for the direct identification and detection of *F. psychrophilum*. *PLoS One.* 2012. In Press.

17. Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, Welling GW. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* 1995;**61**(8):3069–3075.

УДК 57

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ВИДА *N. BENTHAMIANA* К ВИРУСУ TBSV ПРИ ОБРАБОТКИ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Яхимович Влада Сергеевна

vlada.yahim@mail.ru

Магистрант факультета естественных наук ЕНУ им. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан
Научный руководитель – МукияноваГульжамалСлямгазиевна

Аннотация.Было доказано, что салициловая кислота (СК) способна предотвращать инфекцию растений вида *N. benthamiana*, вызванного вирусом кустистости томатов (TBSV). Чтобы изучить влияние СК на защиту растений от вирусов и то, как СК повышает устойчивость растений к вирусам, были использован метод с помощью окрашивания нитросинимтетразолием (NBT) зараженных растений вирусом TBSV. Лечение СК облегчало индуцированное TBSV окислительное повреждение и увеличивало накопление активных форм кислорода (АФК) во время заражения TBSV *N. benthamiana*. Наши результаты показали, что применение СК у *N. benthamiana* повышает устойчивость к TBSV-инфекции.

Ключевые слова: *N. benthamiana*, салициловая кислота, *Tomatobushy stunt virus* (TBSV), АФК.

Введение.Вирусные заболевания угрожают растениеводству и сельскому хозяйству во всем мире. Растение эволюционировало и разработало сложные механизмы для защиты от вирусных инфекций. Вирус кустистости томатов (TBSV) является типичным представителем рода *Tombusvirus* семейства *Tombusviridae*, переносимый через почву патоген растений, легко передается при механической инокуляции. Симптомы, вызванные TBSV, в значительной степени зависят от растения-хозяина и проявляются в виде некротических и хлоротических поражений. Предполагается, что применение экзогенной салициловой кислоты у *Nicotianabenthamiana* повысит устойчивость растений к TBSV-инфекции посредством модулирования гомеостаза АФК путем контроля экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты.

Активные формы кислорода (АФК) постоянно вырабатываются в растениях как побочные продукты различных физиологических и метаболических путей и первоначально были признаны токсичными молекулами, вызывающими окислительное повреждение белков, ДНК и липидов в растениях. АФК включают в себя свободные радикалы, такие как супероксидный радикал и гидроксильный радикал, а также нерадикалы, такие как перекись водорода. Также АФК считаются важной сигнальной молекулой в растениях, и она участвует в регуляции широкого спектра процессов, таких как рост, развитие, защита и ответы на различные абиотические и биотические стрессы. Чтобы использовать АФК в качестве сигнальных молекул, АФК должны поддерживаться на нетоксичном уровне за счет тонкого равновесия между путями продукции. Растения в ходе эволюции развили сложные системы очистки и регуляции для мониторинга окислительно-восстановительного гомеостаза АФК, чтобы избежать чрезмерного накопления АФК в растительных клетках.

В совокупности обработка растений экзогенной СК может повышать устойчивость к вирусам за счет повышения стабильности клеточной мембраны и поддержания