

засухоустойчивость. Поэтому при селекции на короткостебельность наиболее ценным является исходный материал, который помимо генетически обусловленной низкой высоты растений имеет ряд других селекционно-ценных положительных признаков. Проведенный анализ показал наличие слабой положительной зависимости между урожайностью зерна образцов и высотой растений в 2019 и 2020 гг. ($r = 0,28$ и $r = 0,16$) и наличие средней положительной зависимости в 2021 г. ($r = 0,42$) при критическом значении коэффициентов $r_{005} = 0,113$, $r_{001} = 0,148$. То есть наиболее высокорослые сортообразцы пшеницы потенциально имели большую урожайность зерна. Причем, чем более засушливыми были условия вегетации, тем сильнее прослеживалась данная связь. Слабая положительная связь в 2020 г. была отмечена между продолжительностью периода всходы-колошение и высотой растений ($r = 0,19$).

Выводы. Таким образом, в результате исследований 2019-2021 гг. было выделено 15 генетических источников короткостебельности с высотой растений 40-62 см. Данные образцы являются ценным материалом для проведения селекционных скрещиваний для корректировки высоты растений.

Библиографический список:

1. Дёмина И.Ф. Селекционная ценность сортов пшеницы мягкой яровой разных эколого-географических групп по устойчивости к полеганию / И.Ф. Дёмина // Сурский вестник. – 2019. - № 2 (6). – С. 27-30.

2. Дёмина И.Ф. Результаты оценки исходного материала яровой мягкой пшеницы на устойчивость к полеганию / И.Ф. Дёмина, С.В. Косенко // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2015. – № 8 (130). – С. 18-22.

3. Захаров В.Г. Сопряженность анатомо-морфологических признаков с устойчивостью к полеганию яровой мягкой пшеницы в условиях Среднего Поволжья / В.Г. Захаров, В.В. Сюков, О.Д. Яковлева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. - № 3. – С. 506-510.

4. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Вып. 1. М., 2019. – 329 с.

5. Пшеницы мира: видовой состав, достижения селекции, современные проблемы и исходный материал / В.Ф. Дорофеев [и др.]. – Л., 1987. – 560 с.

УДК:577.213.3: 579.62

ДИЗАЙН СИСТЕМЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АМПЛИФИКАЦИИ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ ГРУППЫ *tet* у БАКТЕРИЙ

Тимофеева Ирина Александровна, научный сотрудник отдела молекулярной биологии ФГБУ «ВГНКИ», i.timofeeva@vgnki.ru

Курсанова Наталья Александровна, научный сотрудник отдела молекулярной биологии ФГБУ «ВГНКИ», n.kirsanova@vgnki.ru

Путинцева Анастасия Владимировна, научный сотрудник отдела молекулярной биологии ФГБУ «ВГНКИ», a.suhoedova@vgnki.ru

Крылова Екатерина Викторовна, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной биологии ФГБУ «ВГНКИ», e.krylova@vgnki.ru

Прасолова Ольга Владимировна, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной биологии ФГБУ «ВГНКИ», o.prasolova@vgnki.ru

Солтынская Ирина Владимировна, заведующий отделом молекулярной биологии ФГБУ «ВГНКИ», i.soltynskaya@vgnki.ru

Аннотация: Осуществлен выбор генов-мишеней для разработки методики выявления генов устойчивости к тетрациклинам и множественное выравнивание фрагментов генов из различных баз данных. Подобраны праймеры и зонды, оптимизирован режим амплификации. Проведена проверка специфичности на панели образцов.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, олигонуклеотиды, гены резистентности, тетрациклины

Введение. Тетрациклины, представляют собой семейство антибиотиков, широкого спектра действия, проявляющими активность в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий. Применяются для лечения инфекций домашней птицы, крупного рогатого скота, овец и свиней. Используются в аквакультуре для борьбы с инфекциями у лосося, сома и омаров. Их также распыляют на фруктовые деревья и другие растения для лечения заражения *Erwinia amylovora*, вводят в пальмы для лечения микоплазменных инфекций и используют для борьбы с заражением семян *Xanthomonas campestris* (черная гниль). Они также находят применение в лечении насекомых, имеющих коммерческую ценность; например, окситетрациклин используется для лечения гнильца медоносных пчел, который вызывается либо *Bacillus*, либо *Streptococcus pluton* [1].

Устойчивость к тетрациклинам часто связана с приобретением новых генов, которые кодируют энергозависимый отток из клетки или белок, защищающий бактериальные рибосомы от действия тетрациклинов. Большинство генов *tet* у бактерий связаны с мобильными плазмидами, транспозонами, конъюгативными транспозонами и интегронами (генными кассетами). Ген *tetA* кодирует белок, осуществляющий выведение (эффлюкс) тетрациклинов из бактериальной клетки путем активного транспорта. Данный механизм резистентности к тетрациклинам широко распространен среди энтеробактерий, выделяемых от животных, птиц и из пищевых продуктов. Гены *tetM* и *tetO* кодируют белки, взаимодействующие с 23S рибосомальной РНК и препятствующие связыванию тетрациклинов с рибосомой. Данный механизм резистентности к тетрациклинам («защита мишени») распространен как среди грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Локализация *tetM* и *tetA* на мобильных генетических элементах способствует их

горизонтальному переносу между микроорганизмами, в том числе таксономически и экологически отдаленными.

Целью настоящего исследования являлась разработка набора олигонуклеотидных праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени, используемой для выявления фрагментов генов устойчивости к тетрациклинам *tetA*, *tetM* и *tetO* из образцов продовольственного сырья, пищевых продуктов, от животных (фекалии) и на объектах их содержания.

Материалы и методы. Для выбора праймеров и оценки качества выбранных праймеров использовали онлайн-ресурс «PrimerQuest Tool» (IDT) [PrimerQuest Tool (IDT), URL: <https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>], PCR Primer Stats [PCR Primer Stats, URL: http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html (дата обращения 01.12.2021)], Oligo Analysis Tool [Oligo Analysis Tool, URL: <https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis.aspx> (дата обращения 01.12.2021)]. Специфичность праймеров оценивали при помощи онлайн-ресурса «Primer-Blast», расположенном на сайте NCBI [Ye J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction //BMC bioinformatics. – 2012. – Т. 13. – №. 1. – С. 134.]. Для множественного выравнивания последовательностей использовали программу Ugene [Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit //Bioinformatics. – 2012. – Т. 28. – №. 8. – С. 1166-1167]. и алгоритм Clustal omega [Sievers F., Higgins D. G. Clustal omega //Current protocols in bioinformatics. – 2014. – Т. 48. – №. 1. – С. 3.13. 1-3.13. 16.]. Выделение ДНК из образца, осуществляли с помощью наборов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИЭ), «PureLink Genomic DNA» (Invitrogen), «QIAamp DNA Mini Kit» (Qiagen) в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты исследований. Для выбора генов-мишеней при разработке методики были проанализированы литературные данные о встречаемости генов группы *tet* в бактериях ветеринарного и медицинского происхождения. Кроме того, учитывались результаты собственных исследований (полногеномное секвенирование изолятов) в рамках ветеринарного мониторинга антибиотикорезистентности в РФ.

Последовательности и характеристики, выбранных праймеров и зондов для детекции генов *tetA*, *tetM*, *tetO* и множественное выравнивание фрагментов гена из различных баз данных представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1

Характеристики праймеров и зондов для детекции генов *tetA*, *tetM*, *tetO*

Наименование	Последовательность	Длина праймера, п.н.	T _m , °C	GC%	Длина ампликона, п.н.
<i>tetA-F</i>	CGGTCTTCTTCATCATGCAACT	22	62.9	45.5	134
<i>tetA-Z</i>	ROX-TTTCGGCGAGGATCGCTTTCACT-	23	68.1	52.2	

	BHQ2				
<i>tetA-R</i>	GAGTGAATGCAGAATGCCAAATG	23	62.8	43.5	116
<i>tetM-F</i>	GGTACAACGAGGACGGATAATAC	23	61.9	47.8	
<i>tetM-Z</i>	ROX- ACGTCAGAGAGGAATTACAATTCAG ACAG-BHQ2	29	67.4	43.3	
<i>tetM-R</i>	CCTGGCGTGTCTATGATGTT	20	61.9	50	
<i>tetO-F</i>	GAGCGTAGATGAAGGCACAA	20	62.0	50	133
<i>tetO-Z</i>	FAM- TCACTGCTGTCTGGATAGTGATTCCC- BHQ1	26	67.1	50	
<i>tetO-R</i>	ATGGCCTGGCGTATCTATAATG	22	61.9	45.5	

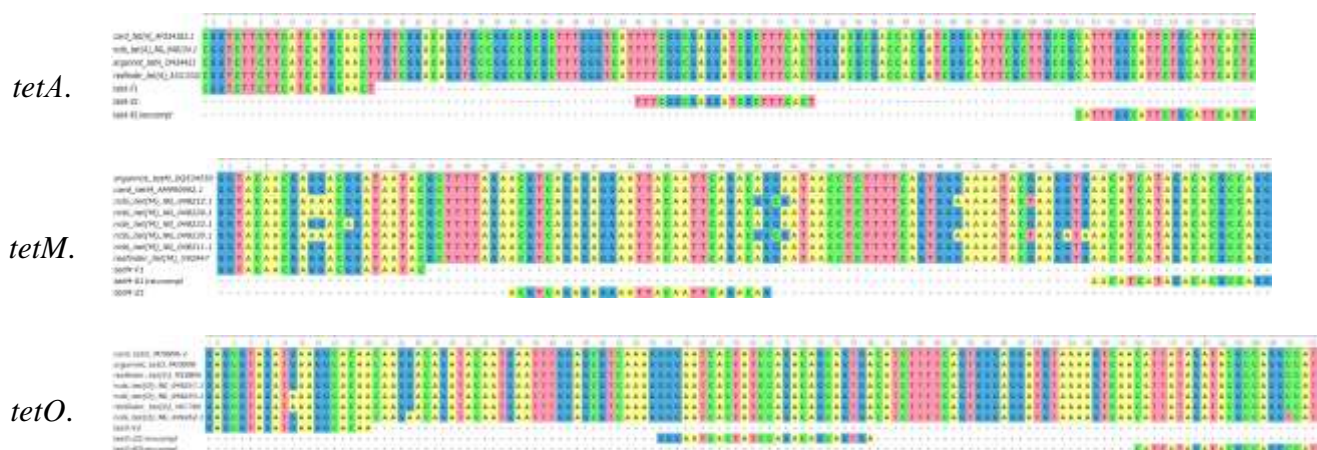


Рисунок 1– Множественное выравнивание последовательностей гена *tetA*, *tetM* и *tetO*. Последовательность праймеров *tetA-R1*, *tetM-R1*, *tetO-R2* дана в виде «reverse-complement»

Выбранные комплекты праймеров и зондов не предназначены для выявления других генов устойчивости к тетрациклам, например *tet(B)*, (*K*), (*L*), (*S*), *tet(38)* и др.

После оптимизации и подбора соотношений реактивов для постановки ПЦР в режиме «реального времени» использовали ДНК-полимеразу SynTaq, 10x ПЦР-Буфер-Б, реагент «MgCl₂» с концентрацией 25 ммоль/дм³, смесь дНТФ 25мМ (все ЗАО «Синтол»). Методика адаптирована для амплификаторов Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). При оптимизации режимов температура отжига всех олигонуклеотидов составила 62 °С.

Для подтверждения специфичности использовали панель, содержащую ДНК, выделенную из различных чистых бактериальных культур исследовательской коллекции ФГБУ «ВГНКИ». В качестве контрольных использовали изоляты, которые охарактеризованы полногеномно, с указанием на присутствие или отсутствие каких-либо из таргетных генов: *tetA*, *tetO*, *tetM*, а также отсутствие или присутствие других генов из группы *tet* (таблица 2).

Таблица 2

Результаты амплификации фрагментов генов *tetA*, *tetM*, *tetO*, выделенных из чистых культур бактерий

№ пп	Ожидаемый результат амплификации фрагментов генов	Полученный результат амплификации фрагмента гена		Наименование образца
		Повтор1	Повтор2	
1	–	–	–	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , чувствительный к тетрациклинам
2	<i>tetA, tetM</i>	<i>tetA, tetM</i>	<i>tetA, tetM</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Infantis</i> , резистентный к тетрациклинам, с генами <i>tetA/tetR, tetM</i>
3	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Infantis</i> , резистентный к тетрациклинам, с генами <i>tetA/tetR, tetB</i>
4	<i>tetA,</i>	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>	<i>E.coli,</i> резистентный к тетрациклинам, с генами <i>tetA/tetR</i>
5	<i>tetO</i>	<i>tetO</i>	<i>tetO</i>	<i>Enterococcus faecalis,</i> резистентный к тетрациклинам, с геном <i>tetO</i>
6	<i>tetM</i>	<i>tetM.</i>	<i>tetM,</i>	<i>Enterococcus faecium,</i> резистентный к тетрациклинам, с геном <i>tetM</i>
7	<i>tetM</i>	<i>tetM</i>	<i>tetM,</i>	<i>Enterococcus faecalis,</i> резистентный к тетрациклинам, с геном <i>tetM</i>
8	<i>tetM</i>	<i>tetM,</i>	<i>tetM,</i>	<i>Enterococcus faecalis,</i> резистентный к тетрациклинам, с генами <i>tetM</i> и <i>tetL</i>
9	<i>tetO,</i>	<i>tetO</i>	<i>tetO</i>	<i>Campylobacter jejuni,</i> резистентный к тетрациклинам, с геном <i>tetO</i>
10	<i>tetO,</i>	<i>tetO</i>	<i>tetO</i>	<i>Campylobacter coli,</i> резистентный к тетрациклинам, с геном <i>tetO</i>

По результатам проведенного исследования получен патент на изобретение [1].

Заключение. Молекулярно-генетические методики, в частности на основе ПЦР в режиме реального времени, направленные на выявление генов, ассоциированных с резистентностью, характеризуются высокой чувствительностью и скоростью получения результатов, а также могут быть стандартизованы. Важной особенностью является отсутствие необходимости манипуляций с живыми бактериальными культурами, что способствует предотвращению распространения и циркуляции микроорганизмов внутри лабораторных учреждений.

Преимуществом разработанной нами методики является экспресс-выявление генов резистентности к антибиотикам, наиболее часто применяемых в ветеринарной практике.

Библиографический список:

1. Патент № 2794156 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/6806. Набор олигонуклеотидов для выявления генов устойчивости к тетрациклинам из группы tet у бактерий методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».-№ 2022118597 : заявл. 07.07.2022 : опубл. 12.04.2023 / О.Е. Иванова, О.В. Прасолова, Е.В. Крылова [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов». – EDN WSBXDG.
2. PrimerQuest Tool (IDT), URL: <https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>
3. PCR Primer Stats, URL: http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html (дата обращения 01.12.2021)
4. Oligo Analysis Tool, URL: <https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis.aspx> (дата обращения 01.12.2021)
5. Ye J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction //BMC bioinformatics. – 2012. – Т. 13. – №. 1. – С. 134.
6. Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit //Bioinformatics. – 2012. – Т. 28. – №. 8. – С. 1166-1167
7. Sievers F., Higgins D. G. Clustal omega //Current protocols in bioinformatics. – 2014. – Т. 48. – №. 1. – С. 3.13. 1-3.13. 16.

УДК 58.084.1

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ АСЕПТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ *ALTERNANTHERA REINECKII* BRIQ.

Хлебникова Дарья Анатольевна, старший преподаватель кафедры биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, khlebnikova@rgau-msha.ru
Чередниченко Михаил Юрьевич, доцент кафедры биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, cherednichenko@rgau-msha.ru

Аннотация: В работе представлены данные корреляционной зависимости морфометрических показателей асептических растений *Alternanthera reineckii* Briq. от содержания ионов минеральных компонентов питательной среды. Полученные данные могут быть использованы для оптимизации состава питательной среды для культивирования водного растения *A. reineckii*.

Ключевые слова: *Alternanthera reineckii*, *in vitro*, минеральный состав, морфометрические показатели