

робактерий // Сборник научных трудов Краснодарского научно-го центра по зоотехнии и ветеринарии. – Краснодар. - 2018. – Вып. 7. - Т. 1.– С. 174-179.

2. Ермаков, В.В. Действие условно-патогенных и патогенных микроорганизмов у крупного рогатого скота в условиях Самарской области / В.В. Ермаков, Ю.А. Курлыкова // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – Краснодар. - 2018. – Вып. 7. - Т. 1.– С. 179-184.

3. Ермаков, В.В. Модификация дифференциально-диагностической среды для выявления и дифференциации энтеробактерий / В.В. Ермаков, О.О. Датченко // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2018. – Т. 7. – № 1. – С. 174-179.

4. Сычева, М.В. Биологические эффекты антимикробных веществ животного и бактериального происхождения : Автореф. дис. ... доктора биологических наук. – Уфа, 2016. – 48 с.

5. Ермаков, В.В. Одноразовый стерильный микробиологический г-образный шпатель / патент на полезную модель RUS 163 081 11.01.2016

[DOI: 10.34617/rg7j-xq92](https://doi.org/10.34617/rg7j-xq92)

УДК 579.262:578.4:639.512

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ
ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И ДНК-ЛИГАЗЫ ВИБРИОФАГОВ
Т4-ТИПА ДЛЯ ВЫБОРА НОВЫХ МАРКЕРОВ ФАГОВ
ДЛЯ ТЕРАПИИ ВИБРИОЗОВ В АКВАКУЛЬТУРЕ
PHYLOGENETIC STUDY OF DNA POLYMERASE AND
DNA LIGASE GENES OF T4-TYPE VIBRIOPHAGES FOR
THE SELECTION OF NEW MARKERS OF PHAGES FOR
VIBRIOSIS THERAPY IN AQUACULTURE**

Зимин Андрей Антонович¹, канд. биол. наук,

Никулин Никита Алексеевич¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФГБНУ
«Пушинский научный центр биологических

исследований» РАН, Российская Федерация, г. Пущино,
Ян Цунги², Ph.D.

²Школа наук о жизни, Университет Тайчжоу, Чжэцзян, Тайчжоу
Китайская Народная Республика,

Кононенко Сергей Иванович³, д-р с.-х. наук, профессор,

Скобликов Николай Эдуардович³, канд. мед. наук,

Осепчук Денис Васильевич³, д-р с.-х. наук

³Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии,
г. Краснодар, Российская Федерация,

Назипова Нафиса Наиловна⁴, канд. физ.-мат. наук

⁴Институт математических проблем биологии РАН – филиал
Института прикладной математики РАН им. М.В. Келдыша,

г. Пущино, Московская область, Российская Федерация ,

Zimin Andrey Antonovich¹, Ph. D. Biol. Sci.,

Nikulin Nikita Alekseevich¹,

¹G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of
Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Pushchino
Russian Federation,

Yang Zhongyi², Ph.D.

²School of Lifescience, Taizhou University, Taizhou 318000,
Zhejiang, China,

Kononenko Sergey Ivanovich³, Dr. Agr. Sci., Professor,

Skoblikov Nikolay Edvardovich³, Ph. D. Med. Sci. ,

Osepchuk Denis Vasilyevich³, Dr. Agr. Sci.

³Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary
Medicine, Krasnodar, Russian Federation ,

Nazipova Nafisa Nailovna⁴, Ph. D. Phys.-Mathem. Sci.

⁴Institute of Mathematical Problems of Biology – the branch of Kel-
dysh Institute of Applied Mathematics, Russian Academy of
Sciences, Pushchino, Russian Federation.

Аннотация: с целью выбора генетических маркеров для анализа вибриофагов проведен филогенетический анализ генов ДНК-полимераз и ДНК-лигаз вибриофагов T4-типа и родственных бактериофагов. Полученные данные обсуждаются в контексте использования этих маркеров для терапии и профилактики заражений аквакультуры пресноводных креветок вибриозами.

Ключевые слова: аквакультура креветок; вибриозы креветок; бактериофаги; ген ДНК-лигазы, ген ДНК-полимеразы.

Abstract: in order to select genetic markers for the detection of vibriophages, a phylogenetic analysis of DNA polymerase and DNA ligase genes of T4-type vibriophages and related bacteriophages was performed. The findings are discussed in the context of using these markers for the treatment and prevention of aquaculture contamination of freshwater shrimp with vibrioses.

Key words: shrimp aquaculture; shrimp vibrioses; bacteriophages; DNA ligase gene, DNA polymerase gene.

Промышленная аквакультура несет большие экономические потери, связанные с бактериальными инфекциями. Бактерии рода *Vibrio* являются одним из наиболее важных патогенов, вызывающих вибриоз в KVP40 и ряд близких к нему культурах креветок, рыб и моллюсков. Устойчивость бактерий к антибиотикам вызывает необходимость новых подходов. Фаговая терапия для борьбы с патогенными микроорганизмами рода *Vibrio* привлекает интерес у исследователей. Бактериофаг вибриофагов зарекомендовали себя как потенциальные агенты против вибриозов. Потенциал фага широкого спектра KVP40 был исследован для контроля четырех различных штаммов *V. anguillarum* у рыб [1].

Поиск новых бактериофагов требует исследования новых генетических маркеров бактериофагов, которые позволяют надежно устанавливать степень родства или, наоборот, расхождения между вновь выделенными и хорошо изученными штаммами бактериофагов. В этой работе проводится сравнение двух генетических маркеров этих бактериофагов с гомологичными маркерами других бактериофагов семейства *Tevenvirinae*. В качестве маркеров использовались гены ключевых белков, участвующих в репликации ДНК, – ДНК-полимераза и ДНК-лигаза. Гены этих белков (гены 43 и 30) обозначены цифрами у бактериофага T4.

Методика. Для выбора последовательностей было проведено сравнение белков программой PSI-BLAST [2] с базой данных белков GenBank. Предварительное множественное выравнивание

нивание и построение филогенетических деревьев проводилось с использованием свободно распространяемого пакета программ Мегаб [3].

Для исследования были взяты аминокислотные последовательности ДНК-полимеразы (идентификатор GenBank – NP_899330.1) и ДНК-лигазы (NP_899305.1) вибриофага KVP40. Для реконструкции филогении и построения филогенетического дерева белков использовался статистический метод наибольшего правдоподобия (Maximum Likelihood). Филогенетический тест проведен методом бутстрэппинга (Bootstrap method) с 500 репликациями. Аминокислотные замены учитывались с помощью JTT статистической модели (Jones-Taylor-Thornton model) [4], частично учитывались бреши во множественном наложении при перекрытии в 50 %. Инициаторное дерево было построено методом Maximum Parsimony.

Результаты исследований и их обсуждение. Эволюционные филогенетические деревья ферментов репликации вибриофагов и других бактериофагов Т4-типа представлены на рисунке 1. Все деревья имеют сходную топологию, хотя их ветвление и различается, но это практически не касается ветвей, относящихся к генетическим маркерам вибриофагов. Различия в ветвлении касаются бактериофагов Т4-типа других экологических групп. Оба дерева образуют две основные ветви, хотя все эти бактериофаги родственны друг другу. Это связано с тем, что в исследованной выборке представлены две различающиеся группы этих фагов.

Вибриофаги по результатам исследования филогенетически относятся к группе так называемых псевдо-Т-четных бактериофагов. Бактериофаги RB43 и RB49 – это колифаги и они вполне могут быть встречены в тех же биотопах, что и вибриофаги. То есть при выборе олигонуклеотидной последовательности для конструирования праймеров следует обратить особое внимание на возможность артефактного положительного ответа за счет возможного наличия в пробах воды псевдо-Т-четных фагов.

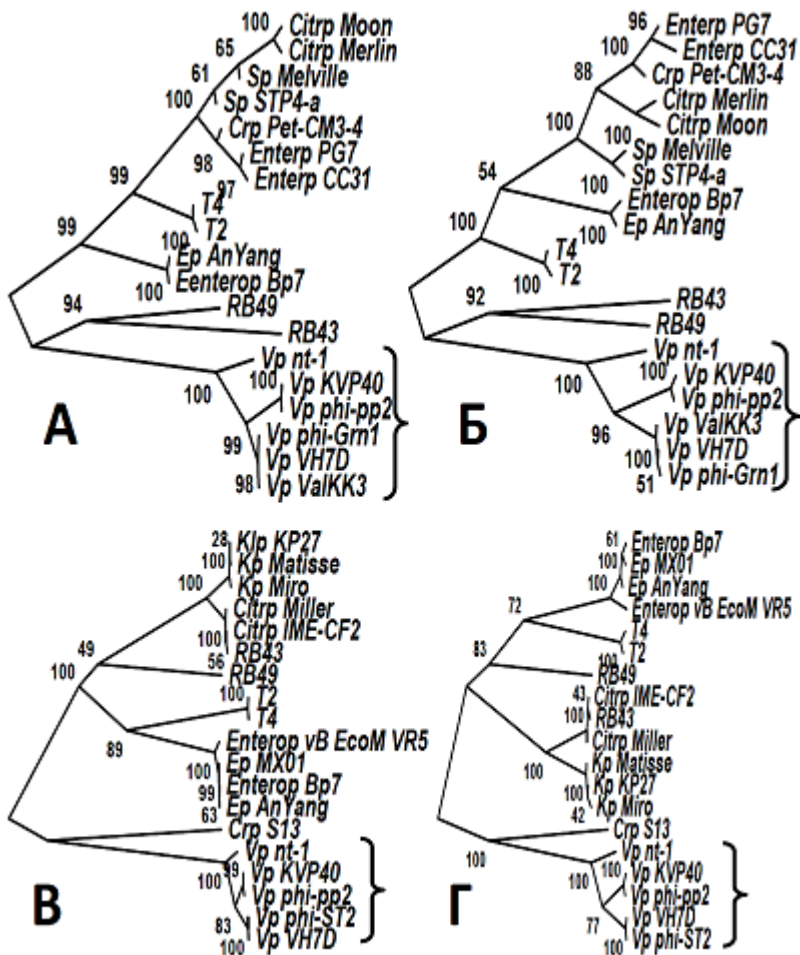


Рис. 1. Филогенетические деревья ДНК-полимераз (рисунок А), ДНК-лигаз (В) и их генов (Б – гены ДНК-полимераз, Г – гены ДНК-лигаз). Методы построения деревьев и условия анализа представлены в разделе «Материалы и методы». Фигурной скобкой выделено положение маркеров вибриофагов.

Кроме того, надо заметить, что эволюционные расстояния, отделяющие эти гены вибриофагов и их белки от соответствующих генетических маркеров псевдо-T-четных фагов, значительны. В остальном, как гены, так и белки вибриофагов, сильно эволюционно отделены от маркеров других T4-фагов, они образуют компактную близкородственную группу. Филогенетический анализ белков дополняет анализ генов и говорит о реальной возможности использования этих маркеров для их использования в детекции вибриофагов при их выделении, более точной характеристике и контроле в аквакультуре при проведении ее фаговой терапии.

Исследование было частично поддержано грантом РФФИ №19-07-00996 (для Назиповой Нафисы Наиловны).

Список литературы

1. Rorbo, N., et al. Exploring the Effect of Phage Therapy in Preventing *Vibrio anguillarum* Infections in Cod and Turbot Larvae. *Antibiotics* (Basel). – 2018. – 16;7(2). pii: E42.

2. Altschul, S.F., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucl. Acid. Res.* – 1997. – 25:3389-3402.

3. Tamura, K., et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – 30: 2725–2729.

4. Jones, D.T., et al. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences // *Comp. App. Biosci.* – 1992. – 8: 275-282.

[DOI: 10.34617/5vb7-m674](https://doi.org/10.34617/5vb7-m674)

УДК 619: 616.988.6:636.22/.28

МОРФОГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАПИЛОМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА MORPHOHISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PAPILLOMAS IN CATTLE

Кудачева Наталья Александровна, канд. вет. наук