

Анализ генетического разнообразия фитопатогенных бактерий, выделенных на территории Беларуси, методом ПЦР

Научный руководитель – Сидоренко Анастасия Вячеславовна

Белявцева Ксения Викторовна

Студент (бакалавр)

Белорусский государственный университет, Биологический факультет, Кафедра микробиологии, Минск, Беларусь

E-mail: kseniyabelyavtseva@protonmail.com

Болезни сельскохозяйственных растений, вызываемые фитопатогенными микроорганизмами приводят к ежегодным потерям 20-30% урожая, нанося колоссальный экономический ущерб. Высокая вредоносность бактериальных патогенов, взрывной характер распространения и сложность контроля эпифитотий, актуализируют необходимость совершенствования методов диагностики возбудителей болезней и выявления источников инфекции. В настоящее время активно создаются тест-системы для детекции и идентификации различных видов фитопатогенных бактерий, однако недостаточно внимания уделяется разработке методов их внутривидовой (штаммовой) дифференциации. Поскольку такие свойства, как специализация, вирулентность, устойчивость к средствам защиты, являются индивидуальными для отдельных штаммов, разработка подходов для идентификации бактерий на внутривидовом уровне приобретает особую актуальность. В настоящее время для этой цели используется метод полимеразной цепной реакции, основанный на амплификации произвольных участков генома (RAPD-ПЦР), и участков, ограниченных консервативными повторяющимися последовательностями ДНК (REP-ПЦР).

В данной работе проведен сравнительный анализ разрешающей способности методов Rep-ПЦР (с праймерами ERIC-R1, BOX) и RAPD-ПЦР (с праймерами M13, 1254) для внутривидовой дифференциации и выявления генетических особенностей фитопатогенных бактерий видов *Clavibacter michiganensis*, *Pantoea agglomerans*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium wasabiae*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas congelans*, выделенных на территории Беларуси. Оптимизированы температурно-временные профили амплификации с каждым из праймеров. Установлено, что при амплификации с праймером BOX число ПЦР-фрагментов в фингерпринтах фитопатогенных бактерий варьирует от 4 до 16 размером 265-3885 п.н., в ERIC-фингерпринтах - от 2 до 15 размером 185-5500 п.н. При проведении RAPD-PCR с праймером M13 получены штаммоспецифичные профили, содержащие от 2 до 6 ампликонов размером 349-1892 п.н., с праймером 1254 - от 3 до 13 ампликонов размером 279-20000 п.н. Показано, что использование BOX-ПЦР позволяет получить наиболее воспроизводимые и четкие профили для всех исследуемых фитопатогенных бактерий.

Для нескольких коллекционных штаммов *Ps. syringae* и *Ps. corrugate*, фингерпринты, полученные с праймерами ERIC-R1, BOX, M13, 1254, были одинаковыми, что указывает на их идентичность. Фингерпринты некоторых штаммов *Ps. syringae*, *C. michiganensis*, *Pec. wasabiae* отличались только при амплификации с одним или двумя праймерами, что свидетельствует о высоком уровне сходства их геномов. Профили большинства анализируемых фитопатогенных бактерий отличались по количеству и размеру ПЦР-продуктов, что позволило их дифференцировать и выявить внутривидовую генетическую гетерогенность штаммов, циркулирующих на территории Беларуси.

Полученные результаты подтверждают хорошую разрешающую способность RAPD- и Rep-ПЦР для дифференциации фитопатогенных бактерий на штаммовом уровне.