

УДК 632.35:634.10(476)

**МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ
БАКТЕРИАЛЬНОГО КОРНЕВОГО РАКА
ПЛОДОВЫХ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУР
(AGROBACTERIUM TUMEFACIENS)**

Кизелевич Н. Ю., Брукши Д. А.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь

Заболевания, вызываемые фитопатогенными бактериями, снижают урожайность, ухудшают качество продукции, способствуют преждевременной гибели растений [1]. По этой причине актуальной задачей становится их идентификация, чтобы иметь возможность предложить необходимые мероприятия по защите культуры.

Применяемые в бактериологии классические методы идентификации бактерий требуют больших затрат на дорогостоящие дифференциально-диагностические среды, реактивы, посуду, что делает проводимые исследования не всегда окупаемыми. К тому же они сопряжены с длительными сроками (до 20 дней) [3]. Поэтому перед нами стояла цель найти наиболее перспективный метод идентификации изучаемой нами бактерии (*Agrobacterium tumefaciens*).

Существует много различных методов и их модификаций по идентификации возбудителей бактериальных болезней: визуальный, микробиологический, ферментативные тесты; иммунофлуоресцентная микроскопия (ИФМ), иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Однако в последнее время все большую роль в диагностике фитопатогенов играет метод ПЦР, который приобрел широкое распространение благодаря относительной простоте, чувствительности и высокой специфичности. В случае анализа методом

ПЦРа для детекции достаточно около 10 копий ДНК или кДНК целевого гена. Этот метод позволяет идентифицировать любой вид по специфической нуклеотидной последовательности его генома и является наиболее точным и чувствительным диагностическим методом, позволяющим быстро выявлять бактерии, вызывающие бактериальный корневой рак плодовых семечковых культур [2, 3, 4].

Подготовка бактериальной культуры к идентификации методом ПЦР. Пять граммов образцов почвы добавляют к 30 мл стерильной дистиллированной воды в химических стаканах емкостью 100 мл и встряхивают в течение 30 минут при 70 оборотах в минуту. Допускается оставить образцы на 10 минут для полного осаждения осадка. Затем 50 мкм надосадочной жидкости инокулируют на подготовленную питательную среду. Культура выдерживается при 28°C в течение 5-7 дней до появления колоний.

Для корневых образцов 3 грамма ткани измельчают с помощью ступки и пестика и затем продельвают ту же самую процедуру, что и с почвенными образцами.

ПЦР-диагностику колоний проводят следующим образом: одну выбранную колонию добавляют к 100 мкл стерильной дистиллированной воды, кипятят в течение 5 мин и 5 мкл супернатанта используют в качестве ДНК-матриц. Реакционный раствор содержит 4 мкл ДНК-матриц, реакционные смеси (25 мкл), включающие праймеры олигонуклеотидов по 10 пмоль (пикомоль) в каждом, 200 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов в каждом, 1 U термостабильной ДНК-полимеразы (hylabs), реакционный коктейль, поставляемый производителем (в данном случае на примере Perkin-Elmer содержащий 10 мМ Трис-основания [рН 8,3 при 258°C], 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,001% желатина [Sigma G2500] и Epicenter включающий 50 мМ Трис-буфера [рН 9,0 при 258°C], 20 мМ сульфата аммония, 1,5 мМ MgCl₂). ПЦР начинается посредством денатурации при 94°C в течение 5 минут, затем отжига при 50°C в течение 1 мин и удлинение при 72°C в течение 1 минуты и конечным удлинением при 72°C в течение 10 минут. Эту процедуру повторяют 35 циклов. ПЦР-продукты разделяются с помощью электрофореза на 2% агарозном геле и визуализируются под ультрафиолетовым светом после прокрашивания в растворе бромистого этидия.

В результате проведенного анализа для постановки полимеразной цепной реакции предлагается использовать универсальные праймеры для обнаружения *Agrobacterium*. Последовательность смысловой нити праймера следующая: 59-GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT-39 (координаты 8867 в 8884 в ссылке 3), последовательность антисмыс-

ловой цепи праймера. СУТ9 – 59-GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT-39 (координаты 9293 в 9276 в ссылке 3). Эта пара праймеров дает 427 п.о. (пар оснований). Процедура ПЦР позволяет дифференцировать между патогенными и непатогенными *Agrobacterium* [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурдинская, В. Ф. Бактериозы виноградной лозы / В. Ф. Бурдинская, Н. О. Арестова // Защита и карантин растений : ежемесячный журнал для специалистов, ученых и практиков. – 2010. – №6. – С. 49-52.
2. Завриев, С. К. Эффективный и экономичный метод чувствительной диагностики и идентификации патогенов картофеля / С. К. Завриев, Д. Ю. Рязанцев, Т. Е. Кошкина, Д. Д. Абрамов // Картофелеводство России: актуальные проблемы науки и практики. М.: ФГНУ: «Росинформагротех», 2007. – С. 100-103.
3. Морозкина, Е. В. Бактериальные болезни картофеля в Беларуси / Е. В. Морозкина, И. И. Бусько, Д. А. Ильяшенко // Земляробства і аховараслін. – 2011. – № 5. – С. 30-34.
4. Скурат, Э. К. Экспресс-методы диагностики бактериальных болезней у рыб / Э. К. Скурат, В. А. Сиволошкая, Р. Л. Асадчая // Ученые записки УО «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». Т. 39. Ч. 2. – Витебск, 2003. – С. 101-103.
5. Jerry, H. H. M. Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains / H. H. Jerry, W. M. Larry, R. Walt and Shula // Applied and Environmental Microbiology 1995. – № 61(8). – P. 2879-2884.