

10. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика, М: Мир, 1991, с. 466–477.
11. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика, Минск: Высшая школа, 1973, с. 80–83.
12. Hundle B. S., O'Brien D. A., Alberti M., Beyer P., Hearst J. E. // Biochemistry. – 1992. – Vol. 89. – pp. 9321–9325.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНИЛЕЙ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ХРАНЕНИИ

Е. И. Карпович, А. В. Богачева

В настоящее время существует опасность широкого распространения возбудителя бурой бактериальной гнили. С 1997 г. *Ralstonia solanacearum* занесена в список карантинных объектов стран-участниц СНГ и стран Балтии. Имеются сообщения о выделении этих бактерий на граничащих с Беларусью территориях (Иванюк и др., 2003). Это позволяет ожидать распространений этого патогена на территории нашей республики.

Основной целью нашей работы являлось выделение и идентификация фитопатогенных бактерий с помощью физиолого-биохимических тестов и молекулярно-биологических методов; обнаружение, выделение чистой культуры возбудителя бурой бактериальной гнили клубней картофеля *Ralstonia solanacearum*, а также описание морфологических, физиолого-биохимических и биологических свойств данного патогена.

Исследование проводилось на 13 образцах картофеля различных сортов (Явор, Скарб, Аксамит, Лазурит, Альтаир, Сантэ), имеющих характерные для бурой гнили симптомы поражения клубней, находящихся на хранении. Из них были выделены чистые культуры 103 штаммов микроорганизмов.

Первоначальная диагностика изолированных бактерий заключалась в изучении морфологии, грампринадлежности и подвижности клеток. В итоге для дальнейшего исследования было оставлено 24 штамма, которые морфологически наиболее сходны с коллекционными штаммами *Ralstonia solanacearum*: грамтрицательные мелкие, короткие, толстые, подвижные палочковидные бактерии.

По основным физиолого-биохимическим тестам часть выделенных штаммов совпадают с использованными в исследованиях коллекционными штаммами *Ralstonia solanacearum*, однако наблюдаются различия по ряду признаков как с типовыми штаммами бактерий, так и исследуемых штаммов между собой. По результатам физиолого-биохимических тестов штаммы были поделены на группы (Таблица 1).

Группы штаммов бактерий, выделенных из пораженных клубней картофеля

группа	№ штамма	Название группы
А	25, 44, 50	<i>Erwinia carotovora</i>
В	32	По физиолого-биохимическим свойствам сходны с <i>Erwinia</i> , не секретируют пектатлиаз, целлюлаз и протеаз, но вызывают мацерацию тканей клубней
С	33	
Д	36	По физиолого-биохимическим свойствам близок к <i>Ralstonia solanacearum</i> , но имеет некоторые отличия. Наблюдается выделение характерного коричневого водорастворимого пигмента
Е	51, 55, 60, 93	Сходны по физиолого-биохимическим свойствам с <i>Erwinia</i> , но не являются вирулентными для клубней и стеблей, не выделяет экзоферменты
F	61	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
G	70	По физиолого-биохимическим свойствам сходны с <i>Ralstonia solanacearum</i> , но имеют некоторые отличия, не являются вирулентными для стеблей и не вызывают мацерацию тканей клубней
Н	84	
И	85	
К	91, 94, 96, 99	По физиолого-биохимическим свойствам наиболее близки к <i>Ralstonia solanacearum</i> , но имеют некоторые отличия
Л	87, 92, 95, 97, 98, 100	

Проверку вирулентности штаммов производили на клубнях картофеля сорта скарб и 4-х недельных стеблях картофеля того же сорта. По результатам этого эксперимента штаммы группы А являются *Erwinia carotovora*. Также были определены группы, штаммы которых совпадают по основным физиолого-биохимическим тестам с использованными в исследованиях коллекционными *Ralstonia solanacearum*, однако наблюдаются некоторые различия.

Дальнейшим этапом изучения *Ralstonia solanacearum* были молекулярно-биологические методы исследования. Основной задачей было разработка быстрого и надежного метода молекулярной идентификации фитопатогенных бактерий *R. solanacearum*, основанного на ПЦР (полимеразная цепная реакция) с последующим RFLP-анализом амплифицированных фрагментов ДНК. Для этого штаммы бактерий выращивали в рыбном бульоне при 28°C. Бактериальную хромосомную ДНК выделяли стандартным методом с использованием гексадецилтриметиламмонийбромида (СТАВ) (Ausubel et al., 1993). Амплификацию осуществляли в смеси стандартного состава (Ausubel et al., 1993) с Taq-полимеразой производства Sigma; температура отжига праймеров варьировала от 45 до 60°C в зависимости от матрицы и праймеров (Таблица 2), а время элонгации от 30 до 90 секунд.

Таблица 2

Последовательности используемых олигонуклеотидов

Название	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
RS11	5' GCAGCGGGGGTAGCTTGCTACCT 3'
RS12	5' TACCGTCATCCACACCAGGTATTAACC 3'
RS21	5' CATTGCTGGATCAGGGTTG 3'
RS22	5' CGAGTGGCGAACGGGTGA 3'
8f	5' AGAGTTTGATGMTGGCTCAG 3'
1492R	5' TACGGHTACCTTGTTACGACTT 3'

Экспериментально было установлено, что наибольший выход продуктов амплификации с парой праймеров RS11-RS12 наблюдается при температуре отжига праймеров плюс 60°C; с парой праймеров RS21-RS22 при температуре отжига праймеров плюс 55°C; с парой праймеров 8f – 1492R при температуре отжига праймеров плюс 54°C.

Ожидаемые размеры фрагментов при рестрикции различными эндонуклеазами участка 16S рДНК *Ralstonia solanacearum*, амплифицируемого при помощи праймеров RS21-RS22 представлены ниже в таблице 3 и на рисунке 1.

Таблица 3

Результаты рестрикции амплифицированных фрагментов при помощи праймеров RS21-RS22

Рестрикционная эндонуклеаза	Сайт узнавания	Размеры фрагментов, п.н.
Bcu I	ACTAGT	56, 245
Eco147 I	AGGCCT	115, 186
TasI	AATT	266, 35

Таким образом, нам удалось специфически амплифицировать участок 16S рДНК коллекционных штаммов *R. solanacearum*. Используемые наборы рестриктаз позволяют в дальнейшем при проведении рестрикционного анализа легко и быстро идентифицировать *R. solanacearum* по специфичным для нее продуктам рестрикции, что дает возможность применять данный подход при дифференциации указанного фитопатогена.

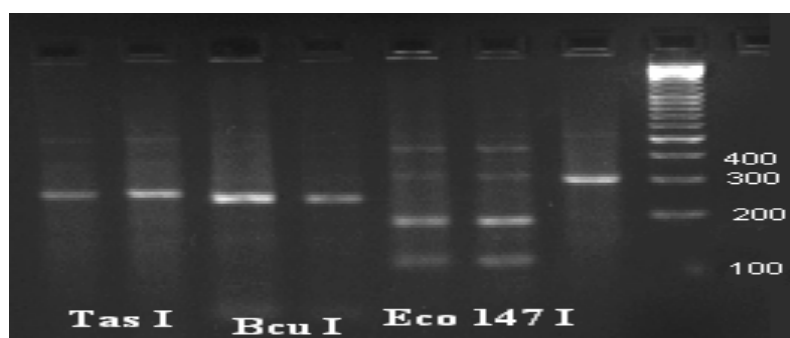


Рис.1 Продукты рестрикции ПЦР-продукта, амплифицируемого при помощи праймеров RS21-RS22

**Результаты рестрикции амплифицированных фрагментов
при помощи праймеров 8f-1492R**

Рестрикционная эндонуклеаза	Сайт узнавания	Размеры фрагментов, п.н.
Rsa I	GTAC	120, 402, 479, 498

Ожидаемые размеры фрагментов при рестрикции различными эндонуклеазами 16S рДНК *Ralstonia solanacearum*, амплифицируемого при помощи праймеров 8f-1492R представлены в таблице 4 и на рисунке 2.

Таким образом, оптимальными параметрами ПЦР при идентификации *Ralstonia solanacearum* являются: для пары праймеров RS11-RS12 температура отжига 60°C, время элонгации 30 сек, количество циклов 35; для пары праймеров RS21-RS22 температура отжига 53°C, время элонгации 30 сек, количество циклов 35. Выделенные в Беларуси близкие к *Ralstonia solanacearum* возбудители бурой гнили картофеля по рестрикционным профилям гена 16S рРНК разделяются на три группы: группа I – штамм 36, группа II – штамм 70, группа III - штаммы 84, 85, 91, 94, 96, 99, 87, 92, 95, 97, 98, 100. Выделенные нами штаммы по гену 16S рРНК не являются идентичными коллекционным штаммам *Ralstonia solanacearum* В 316 NCPPВ 909 и В 317 NCPPВ 4160. Таким образом, можно предположить, что *R. solanacearum* среди выделенных нами штаммов либо нет, либо, возможно, в Беларуси выделяется раса, которая отличается от описанных в литературе.

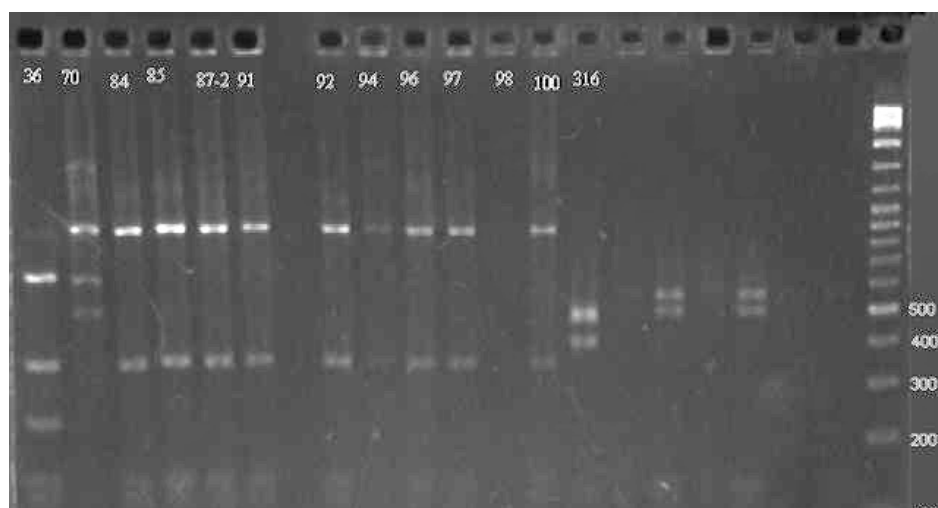


Рис.2 Продукты рестрикции ПЦР-продукта, амплифицируемого при помощи праймеров 8f-1492R

Литература:

1. *Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К.* Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. – Мн.: РУП «Белорусский НИИ картофелеводства», 2003. – 550с.
2. *Ausubel F.A., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K.* Current protocols in molecular biology // Canada: John Wiley & Sons LTD, 1993. – 2 Vols.