

## ПЦР-ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ГРИБНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ТОМАТА

Барейко А.А.<sup>1</sup>, Потуремский Д.С.<sup>1,2</sup>, Купцов В.Н.<sup>1</sup>, Валентович Л.Н.<sup>1,2</sup>,  
Сидоренко А.В.<sup>1</sup>, Титок М.А.<sup>2</sup>, Коломиец Э.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск,

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск,

*bareiko.hanna@gmail.com*

Томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) занимает одно из ведущих мест в мировом производстве овощей, преобладая в структуре посевных площадей экономически развитых стран. Данная культура широко возделывается в овощеводческих хозяйствах и частном секторе Республики Беларусь. Из-за климатических условий выращивание томата в нашей стране производится преимущественно в защищенном грунте [1, 2].

Одной из причин, приводящих к потерям урожая томата и снижению экономической эффективности его выращивания, является подверженность данной культуры многочисленным заболеваниям бактериальной и грибной этиологии. Благоприятный микроклимат, который поддерживается в теплицах, способствует не только активному росту растений, но также развитию фитопатогенных бактерий и грибов. Большая скученность растений приводит к массовым поражениям, часто носящим характер эпифитотий.

Для снижения экономических потерь при выращивании томата, а также повышения качества получаемой продукции, особую важность приобретают своевременная детекция и точная идентификация возбудителей заболеваний для применения эффективных средств защиты. Классические методы выявления и идентификации фитопатогенных микроорганизмов длительны по времени, трудоемки и зачастую не дают однозначного ответа. Поэтому в практику все шире внедряются более чувствительные и специфичные молекулярные методы диагностики, такие как различные модификации полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4].

Цель данной работы – разработка и тестирование праймеров для ПЦР-диагностики наиболее распространенных и вредоносных бактериальных и грибных возбудителей заболеваний томата в условиях открытого и защищенного грунта.

Определен перечень видов фитопатогенных грибов и бактерий, вызывающих болезни томата в Республике Беларусь и странах ближнего зарубежья: *Alternaria* sp. (сухая пятнистость листьев, альтернариозный рак стебля), *Cladosporium cladosporoides* (кладоспориоз или бурая оливковая пятнистость), *Fusarium* sp. (фузариозное увядание, фузариозная гниль), *Botrytis cinerea* (серая гниль), *Sclerotinia sclerotiorum* (белая гниль), *Colletotrichum coccodes* (антрактноз), *Verticillium dahliae* (вертициллезное увядание),

*Pseudomonas syringae* (бактериальная пятнистость), *Pseudomonas corrugata* (некроз сердцевины или пустостебельность), *Pectobacterium carotovorum* (водянистая гниль плодов), *Clavibacter michiganensis* (бактериальный рак), *Agrobacterium tumefaciens* (корневой рак). На основании нуклеотидных последовательностей консервативных участков генома и генов, кодирующих факторы патогенности и вирулентности, доступных в базах данных NCBI, сконструированы родо- и видоспецифичные праймеры для детекции и идентификации целевых фитопатогенных микроорганизмов (табл. 1). Для фитопатогенных грибов *Fusarium* sp. и *S. sclerotiorum* выбраны праймеры на основании данных литературы.

Проверка специфичности праймеров с использованием геномной ДНК 40 коллекционных штаммов грибов *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Cl. cladosporoides*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *C. coccodes*, *V. dahliae* и 38 штаммов бактерий *Ps. syringae*, *Ps. corrugata*, *P. carotovorum*, *C. michiganensis*, *A. tumefaciens* подтвердила, что ампликоны ожидаемого размера получаются только при постановке ПЦР с нуклеиновыми кислотами микроорганизмов целевого вида (рода). Ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЦР не выявлено. В некоторых случаях отмечено образование неспецифических продуктов ПЦР, однако их наличие не препятствовало выявлению целевого патогена. Чувствительность ПЦР для детекции *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *P. carotovorum*, *Ps. corrugata*, *Ps. syringae* составила  $10^3$  геномных эквивалентов (гэ)/мл, *C. cladosporioides*, *A. tumefaciens*, *C. michiganensis*, *X. campestris* –  $10^4$  гэ/мл, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *C. coccodes*, *V. dahlia* –  $10^5$  гэ/мл.

Часто заболевания томата со схожей симптоматикой могут вызывать различные патогены. Для увеличения производительности диагностики разработана мультиплексная ПЦР для детекции в одной реакции фитопатогенных грибов и бактерий, вызывающих гнили (*B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *P. carotovorum*), пятнистости (*Alternaria* sp., *C. cladosporioides*, *Ps. syringae*, *X. campestris*), увядания (*Fusarium* sp., *C. michiganensis*, *Ps. corrugata*). Подтверждена возможность выявления целевых патогенов в присутствии в реакционной смеси как ДНК одного, так и ДНК трех-четырех видов фитопатогенных микроорганизмов. Чувствительность метода для детекции фитопатогенных бактерий составляет  $10^3$ - $10^4$  гэ/мл, фитопатогенных грибов –  $10^3$ - $10^5$  гэ/мл в зависимости от патогена.

В экспериментах на искусственно зараженных фитопатогенными бактериями *C. michiganensis* и грибами *F. oxysporum* растениях томата подобрана методика выделения суммарной ДНК из растительного материала для использования в ПЦР-диагностике. Показана возможность применения разработанной видоспецифичной ПЦР для выявления бактериальных и грибных патогенов в вегетативных и генеративных частях растений томата.

**Таблица 1** – Праймеры для детекции бактериальных и грибных возбудителей болезней томата.

Патоген	Название праймера	Диагностический локус	Размер продукта, п.н.	Ссылка
<b>Фитопатогенные грибы</b>				
<i>Alternaria</i> sp.	Alt-sp1F	ITS	310	-
	Alt-sp1R			
<i>Botrytis cinerea</i>	BC-bot2-F	ген <i>BcBOT2</i> , кодирующий терпенциклазу	600	-
	BC-bot2-R			
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Cclad4F	ITS	433	-
	Cclad4R			
<i>Colletotrichum coccodes</i>	CCpelA-F	ген <i>pelA</i> , кодирующий пектатлиазу	488	-
	CCpelA-R			
<i>Fusarium</i> sp.	Fus-F	ITS	380	[5]
	Fus-R			
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ssaspr-F	ген <i>aspS</i> , кодирующий аспартилпротеазу	588	[3]
	Ssaspr-R			
<i>Verticillium dahliae</i>	VD-lov-F	ген <i>pks</i> , кодирующий нонакетидсинтазу	733	-
	VD-lov-R			
<b>Фитопатогенные бактерии</b>				
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	At-virD-F	ген <i>virD</i> , кодирующий компонент системы секреции IV типа	1126	-
	At-virD-R			
<i>Clavibacter michiganensis</i>	Cm-celA-F	ген <i>celA</i> , кодирующий эндо-1,4-глюканазу	858	-
	Cm-celA-R			
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Pc-pelB-F	ген <i>pelB</i> , кодирующий пектатлиазу	452	-
	Pc-pelB-R			
<i>Pseudomonas corrugata</i>	rfl-chek-F	ген <i>rflA</i> , кодирующий транскрипционный регулятор	1012	-
	rfl-chek-R			
<i>Pseudomonas syringae</i>	Ps-flgL-F	ген <i>flgL</i> , кодирующий флагеллин	329	-
	Ps-flgL-R			
<i>Xanthomonas campestris</i>	Xc-hrpF-F7	ген <i>hrpF</i> , кодирующий компонент системы секреции III типа	573	-
	Xc-hrpF-R10			

С помощью видоспецифичной и мультиплексной ПЦР проведен анализ 20 растений томата, предоставленных тепличными комбинатами и частными хозяйствами. В 2 пораженных растениях (увядание, гниль плодов) и 4 растениях без симптомов болезни обнаружены фитопатогенные грибы *F. oxysporum* и *C. cladosporioides*, других бактериальных и грибных фитопатогенов не выявлено. Результаты ПЦР-анализа во всех случаях подтверждены данными культурального фитопатологического исследования. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения ПЦР с разработанными праймерами для выявления и идентификации бактериальных и

грибных возбудителей болезней томата непосредственно в растительном материале, в том числе до появления видимых симптомов поражения.

### Литература

1. Кильчевский А.В., Слука И.С., Добродькин М.М., Пугачева И.Г. Изучение хозяйственно ценных признаков томата типа черри в защищенном грунте. Вестник БГСХА. 2017. №1. С. 71-75.
2. Поликсенова, В.Д. Микозы томата: возбудители заболеваний, устойчивость растений. Минск: БГУ, 2008. 159 с.
3. Abd-Elmagid A., Garrido P.A., Hunger R., Lyles J.L., Mansfield M.A., Gugino B.K., Smith D.L., Melouk H.A., Garzon C.D. Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus *Sclerotinia*. J Microbiol Methods. 2013. Vol. 92, No 3. P. 293-300.
4. de Oliveira E.F., dos Santos P. R. R., dos Santos G. R. Seeds of weeds as an alternative host of phytopathogens. Arq. Inst. Biol. 2018. Vol. 85. P. 1–7.
5. Quintero-Vasquez G.A., Bazan-Tejeda M.L., Martinez-Penafiel E., Kameyama-Kawabe L., Bermudez-Cruz R.M. Multiplex PCR to detect four different tomato-infecting pathogens. Folia Microbiol. 2013. Vol. 58, No 4. P. 269-276.