

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ МЕТОДОМ ПЦР

Ерчик В.М., Иванюк В.Г.

РУП "Институт картофелеводства НАН Беларуси"
п. Самохваловичи, Минский район, Республика Беларусь

Евтушенков А.Н.

"Белорусский государственный университет"
г. Минск, Республика Беларусь

Бактериальная кольцевая гниль, вызываемая *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), широко распространенное заболевание картофеля, имеющее большое экономическое значение, особенно в системе семеноводства этой культуры. Возбудитель заболевания является карантинным объектом, включенным в список А2 Европейской организации по защите растений (ЕОЗР). Кольцевая гниль вызывает серьезные потери урожая, поражая растения в поле и клубни в период хранения. Несмотря на серьезные меры, предпринятые в Европейском Союзе по выявлению и ликвидации очагов кольцевой гнили, отмечаются всё новые случаи поражения картофеля болезнью. Наличие латентной формы заболевания, способствующее быстрому и незаметному его распространению, отсутствие иммунных сортов и эффективных средств борьбы ставит кольцевую гниль картофеля в ряд наиболее опасных объектов, причиняющих огромный экономический ущерб сельскому хозяйству многих стран.

Болезнь представляет серьезную угрозу для семеноводства картофеля и в нашей республике. Эффективный контроль заболевания с использованием современных методов диагностики латентной инфекции возбудителя кольцевой гнили позволит не допустить распространения патогена по территории Беларуси и предотвратить финансовый ущерб, связанный с браковкой зараженных партий картофеля. Одним из ключевых методов идентификации патогена является полимеразная цепная реакция (ПЦР).

В иностранной литературе опубликованы различные способы диагностики Cms при помощи ПЦР Schneider и др. (1993), Firrao и Locci (1994), Hu и др. (1995); Karjalainen и др. (1995), Li и deBoer (1995), Slack и др. (1996), Lee и др. (1997), Mills и др. (1997), Pastrik и Rainey (1999), Pastrik (2000), однако наиболее подходящими признаны методики, предложенные Mills и др., (1997) и Pastrik (2000).

Целью нашего исследования было идентифицировать штаммы *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* при помощи полимеразной цепной реакции.

Методика исследований: Штаммы *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* выделяли из клубней картофеля с типичными симптомами заболевания. Видовую принадлежность патогена устанавливали на основании результатов непрямого флуоресценции, физиолого-биохимических характеристик и биотеста на баклажанах.

Культуру возбудителя кольцевой гнили выращивали в жидкой среде YGM в течение трех суток при температуре 25 °С. Экстракцию хромосомной ДНК осуществляли по Pospiech and Neumann (1995).

Для постановки ПЦР использовали праймеры PSA-1 (5'-ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa-3') и PSA-R (5'-tac tga gat gtt tca ctt ccc c-3') к нуклеотидной последовательности межгенного спейсера 16S-23S рПНК. Размер продукта ПЦР 502 п.о. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 5 мкл ПЦР буфера (10×), 5 мкл БСА (10×), 5 мкл дНТФ 0,2 мкМ, 2,5 мкл каждого праймера (производства ИФОХ), 0,2 мкл Taq-полимеразы, 1 мкл выделенной ДНК.

Протокол амплификации включал: 1 цикл продолжительностью 3 мин при 95 °С; 10 циклов при 95 °С в течение 1 мин, 64 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин и 25 циклов при 95 °С – 30 с, 62 °С – 30 с и 72 °С – 1 мин. После последнего цикла реакционную смесь выдерживали при 72 °С в течение 5 мин и в последующем хранили при температуре 4 °С (Patrik, 2000).

Для разделения продуктов амплификации использовали электрофорез в 2 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий (0,5 мкг/мл), необходимый для визуализации ДНК. Для подтверждения специфичности ПЦР использовали рестрикционный анализ. 10 мкл продукта ПЦР каждого штамма инкубировали с рестриктазой Bgl II при 37 °С 2 часа. Продукты рестрикции анализировали в 2 % агарозном геле с бромистым этидием (Patrik, 2000).

Результаты исследований:

Амплификация ДНК штаммов E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 методом ПЦР с праймерами PSA-F и PSA-R выявила у всех бактерий фрагмент ДНК ожидаемого размера – 502 п.о. (Рис. 1). После рестрикции амплифицированного фрагмента ДНК ферментом BglII появлялись 2 фрагмента размером 282 п.о. и 220 п.о. Таким образом, результаты анализа ДНК выделенных из клубней картофеля штаммов подтвердили видовую принадлежность бактерий, идентифицированных ранее нами с помощью метода непрямого иммунофлуоресценции, биотеста на баклажанах и физиолого-биохимических тестов как *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Полимеразная цепная реакция в настоящее время является наиболее точным и чувствительным диагностическим методом, позволяющим

быстро выявлять латентную инфекцию различных фитопатогенов, в том числе и возбудителя бактериальной кольцевой гнили картофеля.

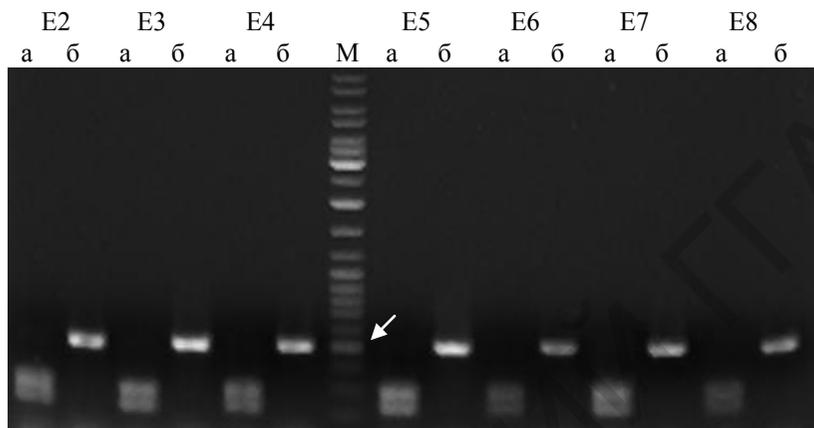


Рис. 1 Результаты рестриктоного и ПЦР анализа штаммов *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

а – рестрикты продукта ПЦР ферментом BglII
б – продукт ПЦР, фрагмент ДНК размером 502 п.о.

Литература

1. Firrao, G. and Locci, R. (1994) Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology* 40; 148-151.
2. Hu, X., Lai, F.M., Reddy, A.S.N. and Ishimaru, C.A. (1995) Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 85; 1468-1473.
3. Karjalainen, R., Kangasniemi, A., Hamalainen, J. and Tegel, J. (1995) Evaluation of PCR methods for the diagnosis of bacterial ring rot infections in potato. *Bulletin OEPP /EPPO Bulletin* 25; 169-175.
4. Lee, I.M., Bartoszyk, I.M., Gundersen, D.E, Mogen, B. and Davis, R.E. (1997) Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Applied & Environmental Microbiology* 63; 2625-2630.
5. Li Xiang and De Boer, S.H. (1995) Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology* 85; 837-842.
6. Mills, D., Russell, B.W. and Hanus, J.W. (1997) Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. *Phytopathology* 87; 853-861.
7. Pstrik, K.H. and Rainey, F. (1997) Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology* 147; 687-693.
8. Pstrik, K.H. (2000) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology* 106; 155-165.

9. Pospiech, A, Neumann, B (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria.
10. Schneider, B.J., Zhao, J. and Orser, C.S. (1992) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by DNA amplification. FEMS Microbiology Letters 109; 207-212.
11. Slack, S.A., Drennan, J.L., Westra, A.A.G., Gudmestad, N.C. and Oleson, A.E. (1996) Comparison of PCR, ELISA, and DNA hybridization for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown potatoes. Plant Disease 80; 519-524.

Резюме

Кольцевая гниль – опасное заболевание картофеля, представляющее серьезную угрозу семеноводству этой культуры. Наличие латентной формы болезни затрудняет диагностику патогена и способствует быстрому и незаметному его распространению. ПЦР является одним из наиболее эффективных методов позволяющих идентифицировать *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) и определять наличие скрытой инфекции кольцевой гнили в клубнях картофеля. В статье сообщается о результатах идентификации 7 штаммов Cms методом ПЦР.

Summary

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (Cms) is the causal agent of bacterial ring rot of potato, an economically important disease for the potato seed industry of Belarus. It can survive latently in potato tubers for long period without causing symptoms. PCR assay is a highly specific and sensitive detection of the pathogen. This study describes identification Cms strains by PCR.

УДК 633.255:631.526.325

РОЛЬ ГИБРИДА В ФОРМИРОВАНИИ УРОЖАЯ ЗЕЛЕННОЙ МАССЫ КУКУРУЗЫ

Янкевич Р.К.

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

Во всем мире под кукурузу занято примерно 132 млн. га посевных площадей. По урожайности и валовым сборам она в настоящее время вышла на первое место, опередив пшеницу и рис (1).

Крупнейший производитель кукурузы – США. Из общих занятых под кукурузу площадей в США примерно 70% дают зерно, а большая часть остальных – силос. Небольшие посевы кукурузы используются как пастбища для домашнего скота. Зерно кукурузы служит кормом, главным образом для свиней и домашней птицы.