

ПЦР-идентификация бактерий *Pantoea agglomerans*

А.А. НАЛБАНДЯН, канд. биол. наук

А.С. ХУССЕЙН, канд. биол. наук, **Г.А. СЕЛИВАНОВА**, канд. биол. наук

ФГБНУ «Всероссийский НИИ сахарной свёклы и сахара им. А.Л. Мазлумова»

(e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Введение

В последние годы бактериальные заболевания сахарной свёклы стали проявляться всё чаще и при интенсивном развитии причинять огромный ущерб, приводя к большим экономическим потерям. Особо опасным является сосудистый бактериоз, вызываемый комплексом фитопатогенных бактерий родов *Pseudomonas*, *Pectobacterium* и *Pantoea*. Бактерия *Pantoea agglomerans* pv. *betae* в составе бактериально-грибного комплекса патогенов приводит к увяданию корнеплодов сахарной свёклы, очаговому поражению растений. Бактерии развиваются в сосудах ксилемы, нарушая транспорт воды и питательных веществ к листьям и обратный отток продуктов фотосинтеза в корнеплод, при этом выделяя токсичные для растения вещества в процессе своей жизнедеятельности. Болезнь обладает высокой вредоносностью, поскольку часть урожая гнивает в поле, другая часть — инфицированное свекловичное сырьё — гнивает в полевых буртах и кагатах сахарных заводов [1, 3].

Целью данной работы являлся поиск и отбор молекулярно-генетических маркеров, позволяющих идентифицировать фитопатогенные микроорганизмы — штаммы бактерий *Pantoea agglomerans* в чистой культуре. В связи с важностью проблемы поражения сахарной свёклы бактериозами необходимо разработать комплекс мероприятий, позволяющих достоверно выявлять и осуществлять скрининг патогенных микроорганизмов молекулярно-генетическими методами.

Условия и методы исследований

В качестве материалов для исследований были использованы чистые культуры бактерий. Выделение возбудителей проводилось из сосудистых пучков и прилегающих к ним тканей потерявших тургор корнеплодов на свекловичную и картофельно-глюкозную агаризованные питательные среды и селективные среды Кинг-Б, WBC и YDC, позволяющие провести первичную идентификацию бактерий. Выделенные изоляты проверялись на патогенность методом замачивания семян сахарной свёклы в бак-

териальных суспензиях с последующим их проращиванием во влажной камере и наблюдением за ростом проростков. Изоляты бактерий, угнетающие рост проростков и вызывающие потемнение их корешков, отбирались для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

Для проведения экспериментов была произведена экстракция суммарной ДНК бактерий с применением 8М ацетата аммония [4, 5].

Качественный и количественный анализ ПЦР-продуктов проводился при помощи электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, в присутствии TBE буфера и бромистого этидия. Визуализация результатов происходила под УФ-лучами.

Для осуществления амплификации были подобраны следующие параметры:

— предварительная денатурация: 95 °С в течение 5 мин;

— 40 циклов: 94 °С — 60 сек; температура отжига 68 °С — 60 сек; 72 °С — 120 сек;

— финальный этап элонгации цепи: 72 °С — 10 мин.

Изоляты бактерий были протестированы с помощью следующих видоспецифических праймеров [2, 6]:

1. PagB/F — 5, -TGCATTTGAACTGGCAGGC — 3, PagB/R — 5, -AGCGTCAGTCTTTGTCCAGG — 3
2. PagRrt/F — 5, -ACGGTGCGTTCCGCAATA — 3, PagRrt/R — 5, -GGCGCCGGGAAAACATAC — 3
3. 8 F — 5, -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG — 3, 1525 R — 5, -ACGGCTACCTTGTACGACTT — 3.

Результаты экспериментов и их анализ

Для идентификации штаммов фитопатогенных бактерий в чистой культуре был оптимизирован процесс выделения суммарной ДНК из их биомассы, в частности, исключено использование высокотоксичных агентов — фенол-хлороформной смеси. Известно, что фенол является высокотоксичным аллергеном. Мы исключили его применение и инактивировали белки 20%-ным додецилсульфатом натрия (SDS). Затем осаждали их 8М ацетатом аммония. Увеличено было также количество промывки супернатанта.

В ходе работы проводилась амплификация ДНК-образцов трёх бактерий, выделенных из корнеплодов сахарной свёклы. Использовались три пары праймеров (PagRrt F/R, 8 F/1525 R и Pag B F/R). Праймер 8 F/1525 R не выявил принадлежность образцов к роду *Pantoea*, так как на электрофореграмме не было обнаружено ПЦР-продуктов ожидаемой длины 900 п.н.

При дальнейшем тестировании образцов было установлено: номер КП 8 характеризуется продуктом амплификации длиной 126 п.н., что соответствует ожидаемому размеру при работе с праймером PagB F/R (рис. 1).

Амплификация с видоспецифическим праймером PagRrt F/R выявила у изолята под номером 2 (П2-Ю4) ампликон длиной 60 п.н., что соответствует ожидаемому размеру при работе с данным праймером (рис. 2).

Выводы

В результате молекулярно-генетических исследований модифицирован способ выделения ДНК бактерий из чистой культуры.

Апробированы и отобраны видоспецифические праймеры к *Pantoea agglomerans* (PagRrt2 F/R, PagB F/R), позволившие выявить два образца данных фитопатогенов в чистой культуре. Вместе с тем данные исследования являются поисковыми и будут продолжены в плане увеличения количества изучаемого материала и используемых праймеров для подтверждения заявленных фитопатогенных микроорганизмов в чистой культуре и определения их видовой принадлежности.

Список литературы

1. Селиванова, Г.А. Методика учёта распространённости и развития сосудистого бактериоза сахарной свёклы / Г.А. Селиванова // Сахарная свёкла. — 2016. — № 5. — С. 20–21.
2. Deletoile, A. Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea agglomerans* Strains by Multilocus Gene Sequencing / A. Deletoile [and oth.] // Journal of Clinical Microbiology. — 2009. — P. 300–310.
3. Edens, D. First Report of *Pantoea agglomerans* Causing a Leaf Blight and Bulb Rot / D. Edens, R. Gitaitis, F. Sanders // Plant Disease. — 2006. — V. 90. — № 12. — P. 1551.
4. Hussein, A.S. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis / A.S. Hussein [and oth.] // Russian Agricultural Sciences. — 2014. — V. 40. — Issue 3. — P. 177–178.
5. Rogers, S. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. Rogers, A. Bendich // Plant Molecular Biology. — 1985. — V. 5. — P. 67–69.



Рис. 1. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов, полученных с помощью праймера Pag B F/R: 1 – П1-3, 2 – П2-Ю4, 3 – КП 8, М – маркер молекулярных масс (сизбэнзим) 100–3 000 п.н.

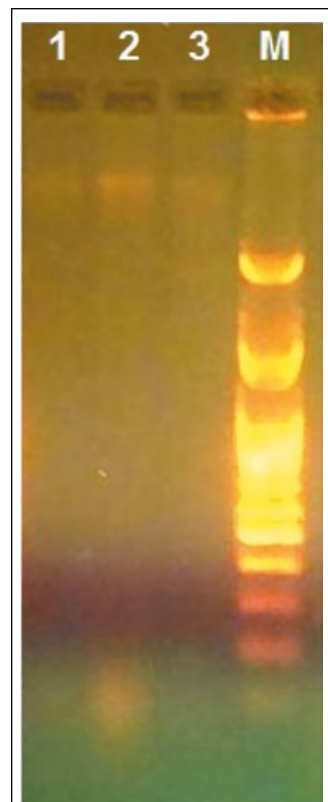


Рис. 2. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов, полученных с помощью праймера Pag Rrt2 F/R: 1 – П1-3, 2 – П2-Ю4, 3 – КП 8, М – маркер молекулярных масс (сизбэнзим) 100–3 000 п.н.

6. Braun-Kiewnick, A. Development of species-, strain- and antibiotic biosynthesis-specific quantitative PCR assays for *Pantoea agglomerans* as tools for biocontrol monitoring / A. Braun-Kiewnick [and oth.] // Journal of Microbiological Methods. — 2012. — V. 90. — P. 315–320.

Аннотация. В статье приведены результаты ПЦР-анализа по подбору видоспецифических праймеров для идентификации бактерий *Pantoea agglomerans*. В соответствии с характеристиками используемых праймеров оптимизированы условия проведения ПЦР. С помощью PagRrt2 F/R и PagB F/R выявлены 2 образца фитопатогенов. **Ключевые слова:** полимеразно-цепная реакция (ПЦР), праймеры, сахарная свёкла.

Summary. In article, the results of using PCR-analysis method of selection of species-specific primers to identify *Pantoea agglomerans* bacteria are presented. Conditions of polymerase chain reaction conduction were optimized in concordance with characteristics of the used primers. With the PagRrt2 F/R and PagB F/R primers allowed revealing 2 samples of phytopathogens.

Keywords: polymerase chain reaction (PCR), primers, sugar beet.