

ГЕНЕТИЧНА ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ШТАМІВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* НА ОСНОВІ RAPD-ПЛР АНАЛІЗУ

Л.М. Буценко, Л.А. Пасічник

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: plant_path@ukr.net

Усестороннє дослідження бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* дозволяє отримати важливу інформацію фундаментального характеру, що дасть відповідь на питання сучасного систематичного статусу цього збудника, дозволить встановити структуру популяції збудника в Україні, виявляти та відстежувати поширення агресивних штамів. Отримані дані надають важливу інформацію для селекціонерів щодо створення та впровадження сортів пшениці, стійких до бактеріозу. **Мета.** Визначення генетичної гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу *P. syringae* pv. *atrofaciens* на основі RAPD-ПЛР аналізу. **Методи.** ДНК виділяли, використовуючи набір реактивів «ДНК-сорб Б» за інструкцією. RAPD-ПЛР ампліфікацію здійснювали з праймером OPA-13 (5'-CAGCACCCAC-3'). Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом в 1,5% агарозному гелі в TAE буфері 30 хв при 100U. **Результати.** За використання праймеру OPA-13 були отримані спектри ампліфікованих фрагментів, які були подібними для всіх досліджуваних нами штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Діапазон поліморфних локусів становив від 500 до 1300 т.п.н. **Висновки.** На основі RAPD-профілювання з праймером OPA-13 встановлено, що виділені з різних рослин-хазяїнів в II областях України штами *P. syringae* pv. *atrofaciens* представляють генетично однорідну групу.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, RAPD-ПЛР, популяція, генетична гетерогенність.

Pseudomonas syringae pv. *atrofaciens* є основним збудником бактеріальних хвороб зернових культур як в Україні [1], так і в інших країнах [2, 3, 4]. Зміна кліматичних умов та способів господарювання, використання великої кількості хімічних речовин за умов інтенсивного ведення сільського господарства в кінцевому результаті призводить до модифікації розповсюдженості та структури популяції збудника, зростання його агресивності та збільшення долі бактеріальних хвороб в загальній кількості хвороб зернових культур. Усестороннє дослідження бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* дозволяє отримати важливу інформацію фундаментального характеру, що дасть відповідь на питання сучасного систематичного статусу цього збудника, дозволить встановити структуру популяції збудника в Україні, встановлювати та відстежувати поширення агресивних штамів. Отримані фундаментальні дані є важливими для селекціонерів щодо створення та впровадження сортів пшениці, стійких до бактеріальних хвороб.

Для вивчення різноманіття та генотипової класифікації досить розповсюдженим є метод ДНК-ДНК гомології. Однак цей метод є досить коштовним і потребує тривалого періоду для здійснення дослідження, а тому не може бути використаний для швидкого аналізу великої кількості бактеріальних ізолятів, що необхідно при здійсненні популяційних досліджень [5]. Для дослідження геномів використовують також інші методи: рестрикційний аналіз ДНК [6], аналіз повторюваних елементів ДНК, що отримані в результаті ампліфікації з REP-, ERIC-, BOX-праймерами (rep-ПЛР) [7, 8, 9].

Однією з основних складностей при використанні ПЛР для аналізу мінливості геномів є необхідність отримання інформації про послідовності нуклеотидів у геномі чи у варіабельних ділянках ДНК для підбору праймерів. Цю складність вдається подолати за використання для популяційних досліджень методу RAPD-ПЛР. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – довільно ампліфікована поліморфна ДНК – продукт ПЛР з довільними праймерами [10, 11]. Праймери, що використовують для RAPD-ПЛР, мають відносно невеликі розміри (8-12 нуклеотидів), довільну нуклеотидну послідовність і [G + C] – склад не нижче 50% [10].

У випадку використання довільних праймерів зникає необхідність з'ясування нуклеотидної послідовності ділянки ДНК, яка ампліфікується, що значно спрощує аналіз. Зразки електрофоретичного розподілу ампліфікованої ДНК (RAPDs) з різних генетичних джерел можуть бути об'єктом порівняльного аналізу, на базі якого визначається рівень спорідненості. Оскільки за допомогою RAPD-ПЛР можливо тестувати велику кількість локусів, цей метод є перспективним для генетичних досліджень багатьох об'єктів.

Метою роботи було визначення генетичної гетерогенності популяції збудника базального бактеріозу *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 на основі RAPD-ПЛР аналізу.

Матеріали і методи. В роботі досліджували штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які було ізольовано в різних регіонах України впродовж 20 років моніторингу посівів зернових культур на наявність збудників бактеріальних хвороб. Характеристику штамів наведено в таблиці 1.

Для порівняння були використані штами фітопатогенних бактерій, що належать до різних патоварів виду *P. syringae*: *P. syringae* pv. *lachrymans* 7595, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 4012, *P. syringae* pv. *aptata* 8544, *P. wieringae* 7922, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 9066, *P. syringae* pv. *tomato* 140R, *P. corrugata* 9070, *P. syringae* pv. *tabaci* 223, *P. syringae* pv. *syringae* 8511, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281, *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9030. Всі ці штами зберігаються у колекції культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАНУ.

Вірулентні властивості штамів визначали шляхом штучного зараження рослин пшениці та жита в польових умовах. Агресивність штамів оцінювали за 4-бальною шкалою [12]. Високоагресивні штами за штучного зараження спричинювали ураження три-чотири бали. Слабоагресивні – ураження один-два бали.

Таблиця 1

Характеристика штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

№	Штам	Місце виділення, область	Вид рослини	Сорт	Джерело виділення	Серогрупа*	Агресивність**
1	2	3	4	5	6	7	8
1	7118	Хмельницька	жито	Росіянка	насіння	2	4
2	7864	Київська	жито	Селект.матеріал	лист	2	3
3	7910	Закарпатська	жито	Харківське 60	лист	2	3
4	7778	Київська	жито	Київське	лист	1	4
5	8122	Волинська	жито	Белта	лист	2	2
6	8312	Житомирська	жито	Орловське	лист	1	3
7	8317	Житомирська	жито	Нива	лист	1	0
8	8548	Київська	жито	Чушпан	колос	1	3
9	8769	Закарпатська	жито	Харківське 78	колос	1	3
10	8844	Закарпатська	жито	Харківське 60	колос	1	4
11	7194	Полтавська	жито	Олімпіада 80	насіння	6	4
12	7959	Закарпатська	жито	Добриня	лист	4	2
13	8099	Рівненська	жито	Белта	лист	5	3
14	8247	Київська	жито	Харківське 194	лист	4	0
15	8268	Київська	жито	Українське тетра	обгортковий лист	4	0
16	8540	Київська	жито	Таловське 12	колос	2	0
17	8904	Київська	жито	Селект. матеріал	колос	4	2
18	8967	Київська	жито	Селект. матеріал	лист	2	4
19	9006	Київська	жито	Українське тетра	лист	2	4
20	9011	Київська	жито	Українське тетра	лист	6	4
21	П203	Київська	пшениця	Марлебен	лист	2	3
22	П204	Київська	пшениця	Марлебен	лист	2	3
23	912	Ів.-Франківська	пшениця	Миронівська 808	лусоцка	2	4
24	К1025	Вінницька	пшениця	Аврора	лусоцка	2	4
25	1322	Київська	пшениця	Селект. матеріал	лист	2	4

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5	6	7	8
26	7247	Полтавська	жито	Зазерське	зерно	6	1
27	8241	Київська	жито	Белта	лист	6	0
28	8462	Чернігівська	жито	Саратовське 5	лист	6	2
29	8904	Київська	жито	Селект. матеріал	лист	4	2
30	9010	Київська	жито	Белта	лист	6	4
31	788	Київська	пшениця	Ювілейна 50	лист	6	4
32	948	Волинська	пшениця	Полська 70	лист	5	д/в
33	962	Волинська	пшениця	Ювілейна 50	колос	4	д/в
34	1200	Волинська	пшениця	д/в	лусочка	4	д/в
35	1392	Київська	пшениця	Южноукраїнка	стебло	5	д/в
36	2399	Полтавська	пшениця	Миронівська 808	зерно	6	3
37	2824	Луганська	пшениця	д/в	лист	4	д/в
38	9400	Київська	пшениця	Рання 93	лист	2	4
39	9401	Київська	овес	Скакун	лист	1	4
40	9403а	Київська	пшениця	Авангард	колос	4	4
41	9405	Київська	пшениця	Полська 90	лист	4	4
42	9410а	Київська	пшениця	Полська 90	лист	4	4
43	9417	Київська	пшениця	Рання 93	лист	4	0
44	9443	Київська	пшениця	Полська 90	колос	4	1
45	9482	Київська	пшениця	Полська 90	лист	2	3
46	9489	Київська	пшениця	Полська 90	лист	4	3
47	9492	Київська	пшениця	Полська 90	лист	6	3
48	9507	Київська	пшениця	Полська 90	лист	4	2
49	9511	Київська	пшениця	Полська 90	лист	6	3
50	9517	Вінницька	пшениця	Шестопапівка	лист	4	2

Примітки: д/в – дані відсутні, «*» – серогрупа за схемою Пастушенко і Симонович (1979), «**» – агресивність в балах за 4-бальною шкалою [12].

Для виділення ДНК використовували набір реактивів «ДНК-сорб Б» («AmpliSens», РФ) за інструкцією виробника. ДНК виділяли із 18 – 20 год культури бактерій, що вирости на МПБ при 28°C в умовах струшування (160 об/хв). Клітини осаджували центрифугуванням при 8000g 10 хв і відмивали в тому самому режимі.

Для постановки ПЛР використовували праймер ОРА-13 (5'-CAGCACCCAC-3'), який добре зарекомендував себе в роботі з бактеріями роду *Pseudomonas* [13, 14].

Для ампліфікації з RAPD-праймерами готували суміш (25 мкл), що містила: 200 нг геномної ДНК; 25 пмоль праймеру; 2,5 Units SynTaq полімерази; 0,2 мМ кожного дезоксинуклеотиду трифосфату; 2,5 мкл 10-ти кратного ПЛР буферу. Кожна реакційна суміш була ампліфікована у термоциклері Gene ATAQ Controller (Pharmacia LKB) за таким режимом: початкова денатурація 95 °С – 5 хв; 45 циклів: 94 °С – 1 хв, 38 °С – 1 хв, 74 °С – 1 хв; термінальна елонгація 72 °С – 7 хв [13].

Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом у 1,5 %-му агарозному гелі з додаванням етідіуму броміду (0,5 мкг/мл) у TBE буфері 40 хв за напруги 90 В. Як маркери використано 100 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas) та 2000 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas).

Спорідненість одержаних профілів порівнювали візуально та аналізували за допомогою комп'ютерної програми Gel-Pro Analyzer, PAST ver.1.81. На основі отриманих результатів будували дендрограми спорідненості штамів *P. syringae*.

Результати. Штами збудника базального бактеріозу було ізольовано із зернових культур, що були відібрані в 11 областях України (табл. 1). Ці штами було ізольовано як із рослин з ознаками ураження базальним бактеріозом, так і ззовні здорових рослин (епіфітне існування). Ідентифікацію всіх штамів було здійснено на основі вивчення їх морфолого-культуральних, біохімічних, серологічних та патогенних властивостей.

За фізіолого-біохімічними властивостями досліджувані штами не відрізнялися між собою та відповідали відомим з літератури даним. Досліджувані штами належали до I, II, IV, V, VI серогруп, що є типовим для бактерій *P. syringae* (рис. 1), які ізольовано із агроценозів зернових куль-

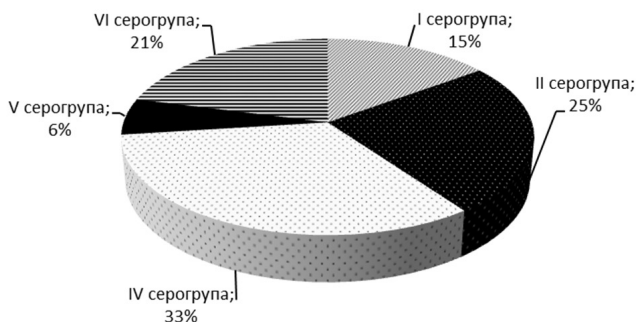


Рис. 1. Розподіл досліджуваних штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* на серогрупи

тур [15]. Відомо, що патогенні штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізолювані із пшениці, розподілені на чотири серологічні групи (II, IV, V, VI) за схемою серогрупування фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae*. Ізолювані з жита – до п'яти серогруп (I, II, IV, V, VI). А штами *P. syringae* pv. *coronafaciens*, виділені з рослин вівса, належать до двох серологічних груп (I і V) [15]. Такий самий розподіл на серогрупи спостерігали і серед досліджуваних нами штамів *P. syringae*.

Досліджувані штами відрізнялися за агресивністю. Більшість штамів (65 %) були високоагресивними (рис. 2). 21 % штамів були слабоагресивними, а 14 відсотків виявилися авірулентними. За штучного зараження рослин пшениці вірулентні штами спричинювали симптоми, подібні до природних ознак ураження базальним бактеріозом.

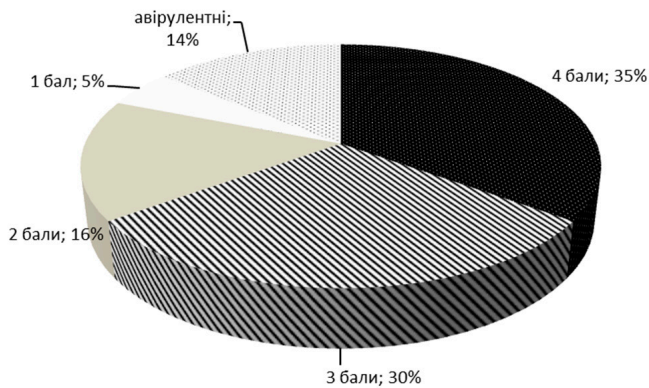


Рис. 2. Розподіл досліджуваних штамів за агресивністю

Для вивчення генетичної гетерогенності штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* нами було використано RAPD-ПЛР із праймером, який дозволив здійснити типування штамів *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. alkaligenes*, *P. fluorescens*, *B. cepacia*, ізолюваних з водних джерел у Греції, [13] та розділення на групи штамів *P. syringae*, які було ізолювано із бур'янів, що росли на пшеничному полі [14]. Отримані за використання праймеру ОРА-13 спектри ампліфікованих фрагментів дали можливість розподілити штами, виділені з сегетальних рослин пшеничного поля, на дві групи: перша мала високий ступінь спорідненості зі збудником базального бактеріозу пшениці, друга виявилася високо спорідненою з *P. syringae* pv. *syringae* [14].

За використання праймеру ОРА-13 для ампліфікації ДНК штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* були отримані спектри ампліфікованих фрагментів, які були подібними для всіх досліджених нами штамів. Діапазон поліморфних локусів становив від 500 до 1300 т.п.н. (рис. 3, 4).

Для всіх штамів домінуючим продуктом був фрагмент ДНК розміром близько 700 т.п.н. Такий фрагмент був відсутнім лише за ампліфікації ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9443 (рис. 4).

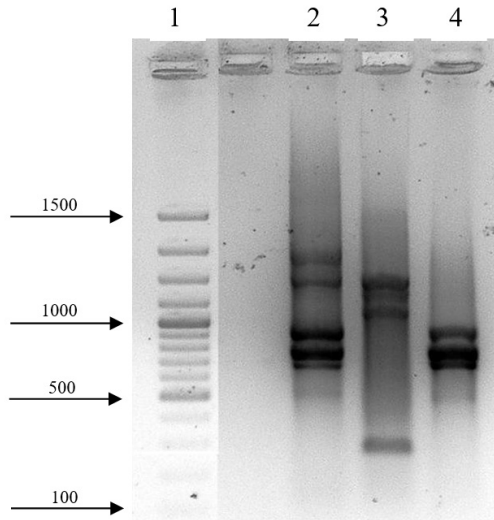


Рис. 3. Електрофоретичний розподіл фрагментів ДНК у 1,5 % агарозному гелі:

- 1 – маркер 100 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas);
- 2 – продукти RAPD-ПЛР *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 з праймером OPA-13;
- 3 – продукти RAPD-ПЛР *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 з праймером OPD-13 (5'-GGGGTGACGA-3');
- 4 – продукти RAPD-ПЛР *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8967 з праймером OPA-13

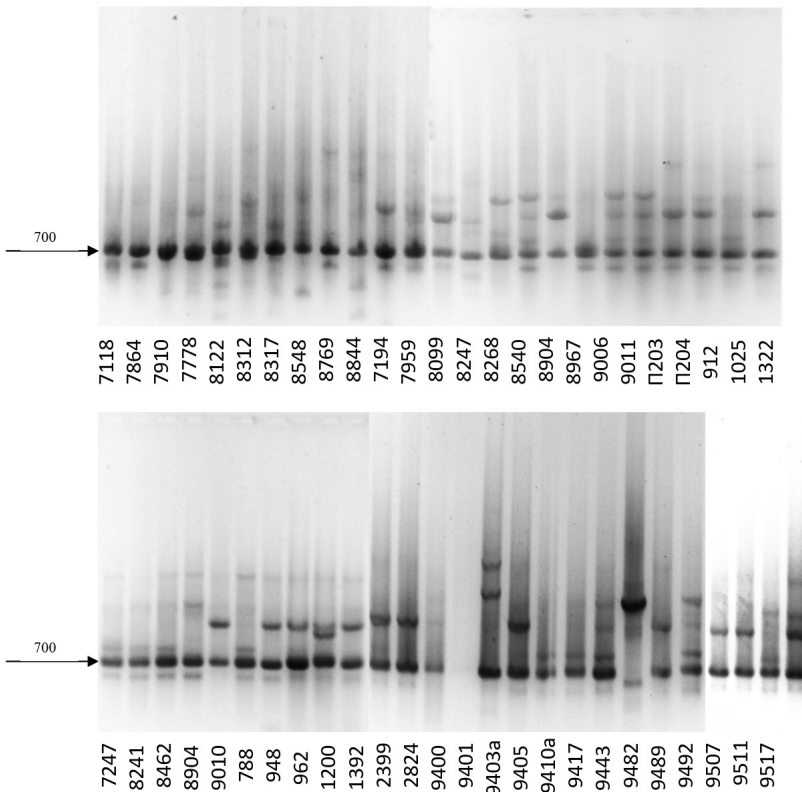


Рис. 4. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* з використанням праймеру OPA-13 у 1,5 % агарозному гелі

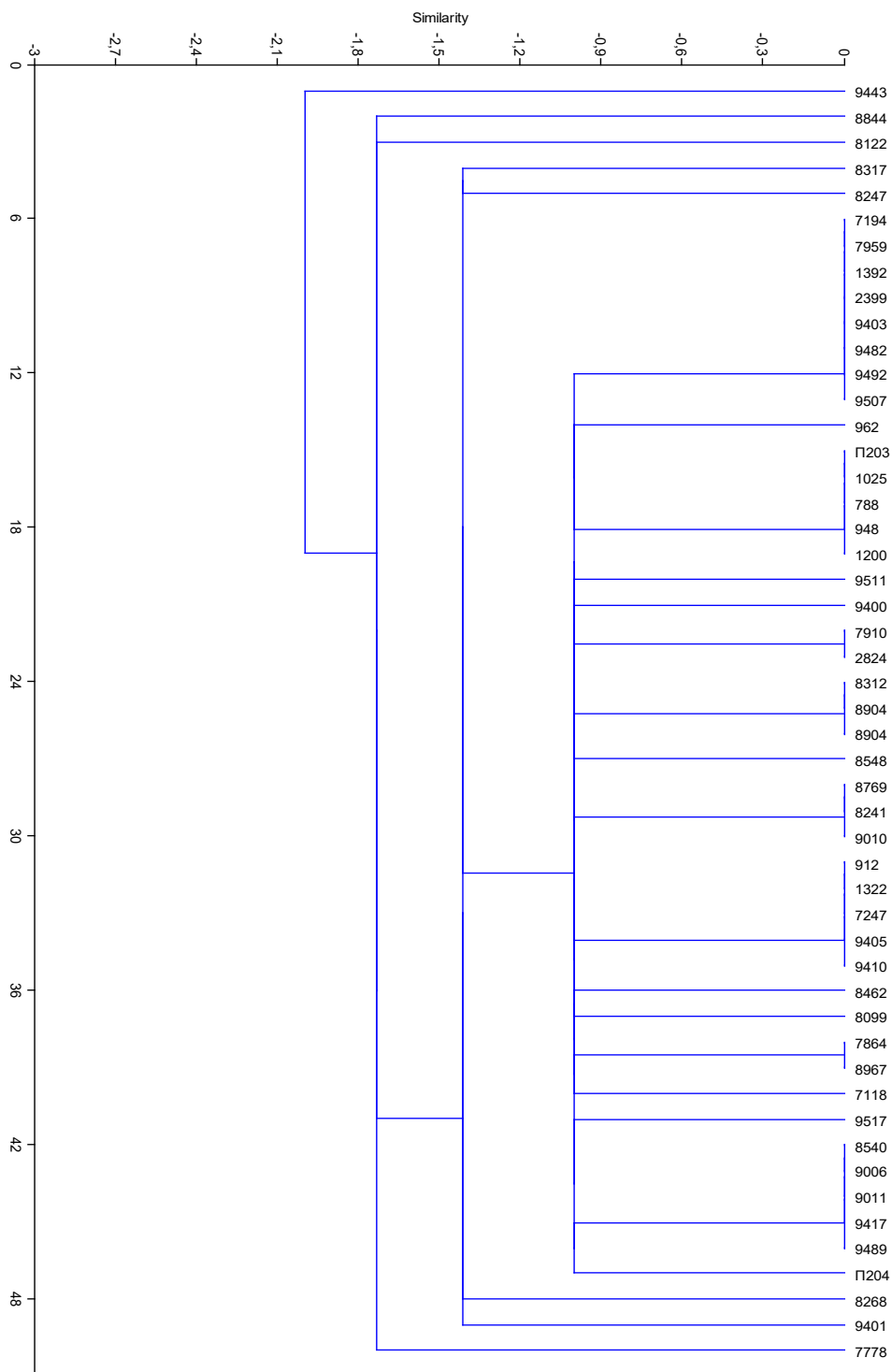


Рис. 5. Дендрограма спорідненості патогенних для зернових культур бактерій роду *Pseudomonas syringae* рв. *atrofaciens*, побудована за результатами RAPD-профілювання з праймером OPA-13

За використання методів кластерного аналізу було побудовано дендрограму спорідненості штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* (рис. 5). Всі штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* незалежно від географічного регіону виділення, рослини, з якої було ізольовано бактерії, приналежності до серогрупи та агресивності утворили споріднену групу (рис. 5).

Найбільше від усіх штамів відрізнявся штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9443, приналежність якого до *P. syringae* pv. *atrofaciens* може бути переглянута після проведення цих досліджень. Три штам, що відрізнялися від загальної групи *P. syringae* pv. *atrofaciens*, а саме: *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8317, 8247, 8268, були авірулентними. Оскільки приналежність бактерій до певного патовару пов'язана із їх здатністю спричинювати хвороби певного виду рослин, можливо, вказані авірулентні штам не належать до патовару *atrofaciens*.

Для підтвердження відтворюваності результатів ампліфікації було використано дві проби ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8904, після розділення та аналізу продуктів електрофорезу було підтверджено ідентичність цих двох проб, що свідчить про високу точність і відтворюваність отриманих даних.

Результати вивчення спектрів продуктів ампліфікації ДНК *P. syringae* pv. *atrofaciens* із праймером ОРА-13 дозволяють зробити висновок, що досліджувані нами штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* є генетично однорідною групою.

Від близькоспорідненої групи, яку утворили штам *P. syringae* pv. *atrofaciens*, відрізнявся також штам *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9401 (рис. 5), який виділено із вівса. Цей факт дав нам підставу для подальшого аналізу продуктів ампліфікації ДНК різних патоварів виду *P. syringae* з праймером ОРА-13.

Встановлено, що використання праймеру ОРА-13 дозволяє отримати продукти RAPD–ПЛР, за якими можна встановити різницю між різними патоварами виду *P. syringae* (рис. 6).

Відомо, що за морфолого-культуральними, фізіологічними, біохімічними властивостями штам *P. syringae*, які належать до різних патоварів, не відрізняються між собою. За використання методів кластерного аналізу встановлено, що спорідненість між штамми, які належать до одного патовару, є більшою, ніж спорідненість між штамми, що належать до різних патоварів.

Обговорення. RAPD–ПЛР аналіз успішно використовується для генетично-популяційного аналізу широкого кола мікроорганізмів [16] та, зокрема, для генетичного аналізу популяцій видів *Pseudomonas* [16, 17, 18, 19, 20].

Отримані нами результати свідчать, що штам збудника базально-го бактеріозу, виділені в одинадцяти областях України з рослин жита і пшениці, є близькоспорідненими. Найбільше від усіх штамів відрізнявся штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9443, систематичне положення якого може бути переглянута після проведення додаткових досліджень. Серед штамів, що відрізнялися від загальної групи *P. syringae* pv. *atrofaciens*, були три авірулентних (*P. syringae* pv. *atrofaciens* 8317, 8247, 8268) та три вірулентних (*P. syringae* pv. *atrofaciens* 7778, 8122, 8844). Кожен із цих

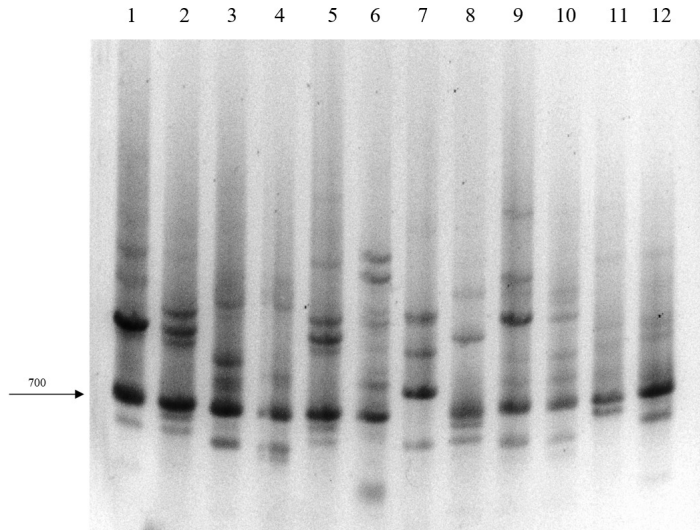


Рис 6. Електрофоретичний розподіл продуктів RAPD-ПЛР патоварів *P. syringae* з використанням праймеру ОРА-13 у 1,5 % агарозному гелі:
 1 – *P. syringae* pv. *lachrymans* 7595; 2 – *P. syringae* pv. *phaseolicola* 4012;
 3 – *P. syringae* pv. *aptata* 8544; 4 – *P. wieringae* 7922; 5 – *P. syringae* pv. *phaseolicola* 9066;
 6 – *P. syringae* pv. *tomato* 140R; 7 – *P. corrugata* 9070; 8 – *P. syringae* pv. *tabaci* 223;
 9, 10 – *P. syringae* pv. *syringae* 8511; 11 – *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281;
 12 – *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9030

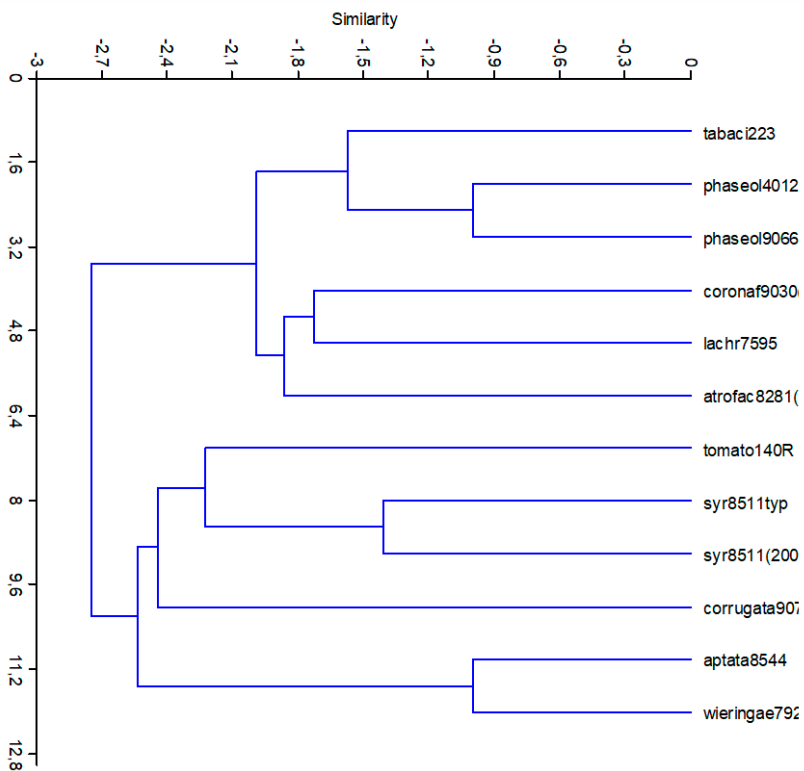


Рис. 7. Дендрограма спорідненості патоварів *P. syringae*, побудована за результатами RAPD-профілювання з праймером ОРА-13

штамів був унікальним і вони не можуть бути об'єднані. Вказані штами за усіма вивченими фенотиповими властивостями беззаперечно належать до *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Для пояснення відмінностей цих штамів від загальної близькоспорідненої групи *P. syringae* pv. *atrofaciens* необхідно провести RAPD-ПЛР з іншими праймерами.

В більшості досліджень генетичного поліморфізму фітопатогенних бактерій, ізольованих з різних рослин, штами об'єднувалися у групи зі спільною рослиною-хазяїном [21, 22]. Однак досліджені нами штами, що належать до одного патовару *P. syringae* pv. *atrofaciens*, але були виділені із жита або із пшениці, неможливо було розділити на окремі групи. Російськими дослідниками за REP-ПЛР, ERIC-ПЛР, BOX-ПЛР показана висока ступінь генетичної варіабельності штамів бактерій роду *Pseudomonas*, ізольованих з уражених базальним бактеріозом зернових культур. На основі цих даних сформовано дві генетичні групи: “*Syringae*” і “*Fluorescens*” [9]. Раніше методом RAPD–профілювання з праймером ОРА-13 нами встановлено, що штами *P. syringae*, виділені з сегетальної фітобіоти агрофітоценозу пшениці, мали високий ступінь спорідненості зі збудником базального бактеріозу пшениці, що є найпоширенішим на зернових культурах. Лише три штами бактерій, що ізольовані із сегетальної фітобіоти, мали спільні продукти реакції з менш поширеним на пшениці збудником бактеріального опіку *P. syringae* pv. *syringae* [14].

Бактерії *Pseudomonas syringae* є одними з найбільш поширених і шкодочинних фітопатогенів. До цього виду належить 41 патовар, що відрізняється за здатністю уражувати певні види рослин-хазяїнів [23]. Питання щодо систематичного значення такого таксону, як патовар у фітопатогенних бактерій, зокрема бактерій виду *P. syringae*, досить давно дискутується в науковій літературі.

Багато дослідників вказують на близьку спорідненість патоварів за біохімічними, фізіологічними та навіть генетичними ознаками [6, 8]. В літературі з'являються роботи, які свідчать, що генетична спорідненість в середині виду *P. syringae* не співпадає з його розподілом на патовари [23].

Продукти ампліфікації ДНК штамів, що належать до різних патоварів (*P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. wieringae*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*) з праймером ОРА-13 відрізнялися утворенням більшої кількості продуктів ампліфікації порівняно із штамми *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Встановлено, що всі патовари утворюють дві групи. В першу входять переважно збудники хвороб зернобобових культур (*P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *tabaci*), а в іншу – патовари, що є збудниками хвороб овочевих культур (*P. syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. wieringae*, *P. syringae* pv. *syringae*) (рис. 6).

Проте отримані нами дані недостатні для ствердження про наявність генетичної відмінності між цими збудниками і потребують подальшого дослідження.

Отже, на основі RAPD–профілювання з праймером ОРА-13 встановлено, що виділені з різних рослин-хазяїнів в 11 областях України штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що були гетерогенними за серологічними властивостями, представляють генетично однорідну групу.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* НА ОСНОВЕ RAPD-ПЦР АНАЛИЗА

Л. Н. Буценко, Л. А. Пасичник

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

Резюме

Всестороннее исследование бактерий *P. syringae* pv. *atrofaciens* позволяет не только получить важную информацию фундаментального характера, которая даст ответ на вопрос современного систематического статуса этого возбудителя, позволит установить структуру популяции возбудителя в Украине, выявлять и отслеживать распространение агрессивных штаммов, но и даст важную информацию для селекционеров относительно создания и интродукции сортов пшеницы, устойчивых к бактериозу.

Цель. Определение генетической гетерогенности популяции возбудителя базального бактериоза *P. syringae* pv. *atrofaciens* на основе RAPD-ПЦР анализа. **Методы.** ДНК выделяли, используя набор реактивов «ДНК-сорб Б» согласно инструкции. RAPD-ПЦР амплификацию осуществляли с праймером ОРА-13 (5'-CAGCACCCAC-3'). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле в ТАЕ буфере 30 мин при 100U. **Результаты.** При использовании праймера ОРА-13 получены спектры амплифицированных фрагментов, которые были подобны у всех исследованных нами штаммов *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Диапазон полиморфных локусов составлял от 500 до 1300 т.п.н. **Выводы.** На основе RAPD–профилирования с праймером ОРА-13 установлено, что выделенные из разных растений-хозяев в 11 областях Украины штаммы *P. syringae* pv. *atrofaciens* представляют генетически однородную группу.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, RAPD-ПЦР, популяция, генетическая гетерогенность.

GENETIC HETEROGENICITY OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* STRAINS BASED ON RAPD-PCR ANALYSE

L.M. Butsenko, L.A. Pasichnyk

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary

A comprehensive study of *P. syringae* pv. *atrofaciens* allows not only to receive important fundamental information that will give an answer to the question of the current systematic status of this pathogen, will allow to establish the structure of the pathogen population in Ukraine, to identify and track the spread of aggressive strains, and will provide important information for breeders regarding the creation and introduction of wheat varieties, resistant to bacteriosis. **Aim.** Determination of genetic heterogeneity of the causative agent of basal bacteriosis *P. syringae* pv. *atrofaciens* by RAPD-PCR analysis. **Methods.** DNA was isolated using a set of DNA-sorb B reagents according to the instructions. RAPD-PCR amplification was performed with the OPA-13 primer (5'-CAGCACCCAC-3'). The amplification products were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel in TAE buffer for 30 minutes. at 100U. **Results.** Using the OPA-13 primer, spectra of amplified fragments were obtained, which were copious in all strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens*. The range of polymorphic loci was from 200 to 700 kb. **Conclusions.** Based on RAPD-profiling with the OPA-13 primer, it was established that isolated from different plant hosts in 11 regions of Ukraine strains of *P. syringae* pv. *atrofaciens* represent a genetically homogeneous group.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, RAPD-PCR, population, genetic heterogeneity.

1. Pasichnyk LA, Patyka VP, Khodos SF, Vinnichuk TS. [Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical receptions on its spread]. Microbiol Z. 2012; 74(4):37-44. Russian.
2. Matveeva YeV, Pekhtereva ESH, Polityko VA, Ignatov AN, Nikolaeva EV, Schaad NW Distribution and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, causal agent of basal glume rot, in Russia. In: Iacobellis NS, Collmer A, Hutcheson SW, Mansfield JW, Morris CE, Schaad NW, Stead DE, Surico G, Ullrich MS (eds). Presentations from the 6th International Conference on *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens, (Maratea, Italy, September 15–19). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 2003. p.97-105.
3. Kazempour MN, Kheyrgoo M, Pedramfar H, Rahimian H Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.). African Journal of Biotechnology. 2010; 9(20):2866-2871.
4. Lazariyev AM. *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulluch) Young, Dye & Wilkie – Bazalniy bakterioz pshenitsy. In: Afonin AN; Grin SL; Dziubenko NI; Frolov A.N. (red.) Agroekologicheskii atlas Possii i sopredelnykh stran: ekonomicheskii znachimye rasteniia, ikh vrediteli, bolezni i sornye rasteniia [DVD-versiia]. 2008, http://www.agroatlas.ru/en/content/related/Lonicera_edulis/. Russian.

5. Rademaker JL, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijn FJ. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol. Microbiol.* 2000; 50(2):665-677.
6. Young JM, Jones DS, Gillings M. Relationships between populations of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* determined by restriction fragment analysis. *Plant Pathology.* 1996; 45:350-357.
7. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(7):2286-2295.
8. Louws FJ, Rademaker ILW, de Bruijn FJ. The three DS of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and diseases diagnosis. *Ann Rev Phytopathol.* 1999; 37:81-125.
9. Bobrova VK, Milyutina IA, Troitskii AV. [Genetic diversity in *Pseudomonads* associated with cereal cultures infected with basal bacteriosis]. *Mikrobiologiya.* 2005; 74(4):463-470. Russian.
10. Williams YGK, Kubelik AR, Livar KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res.* 1990; 18(22):6531-6535.
11. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res.* 1990; 18(24):7213-7218.
12. Patyka VP, Pasichnyk LA, Gvozdyak RI, Petrychenko VF, Korniychuk OV, Kalinichenko AV et al. Fitopatohenni bakterii. Metody doslidzhen. Monografiia. T. 2. Za red. VP Patyky. Vinnytsia: TOV Vingruk; 2017. Ukrainian
13. Sazakli E, Leotsinidis M, Vantarakis A, Papapetropoulou M. Comparative typing of *Pseudomonas* species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis. *J Appl Microbiol.* 2005; 99:1191-1203.
14. Savenko OA, Butsenko LM, Pasichnyk LA, Patyka VP. [Rapid-analysis phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae*, isolated from weeds in agrophytocenoses of wheat]. *Mikrobiologiya i biotekhnologiya.* 2014; 27(3):15-22. Ukrainian.
15. Pasichnyk LA, Butsenko LM. [Serological features of bacteria *Pseudomonas syringae* agroecosystems of cereal]. *Mikrobiol Z.* 2018; 80(4):41-54. Ukrainian.
16. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:1661-1669.
17. Elaichouni A, Verschraegen G, Claeys G, Devleeschouwer M, Godard C and Vaneeschoutte M. *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by Arbitrary Primer PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:666-671.
18. Haase A, Melder A, Smith-Vaughan H, Kemp D. and Currie B. RAPD analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with recurrent melioidosis. *Epidemiol Infect.* 1995; 115:115-121.
19. Renders N, Romling U, Verbrugh H. and Van Belkum A. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:3190-3195.

20. Hernandez J, Ferru's M, Herna'ndez M, Owen RJ. () Arbitrary primed PCR fingerprinting and serotyping of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. FEMS Immunol Med Microbiol. 1997; 17:37-47.
21. Momol MT, Momol EA, Lamboy WF, Norelli JL, Beer SV, Aldwinekle HS. Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). J Appl Microbiol. 1997; 82(3);389-398.
22. Khoodoo MHR, Jaufeerally-Fakim Y. RAPD-PCR fingerprinting and southern analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains isolated from different aroid hosts and locations. Plant Diseases. 2004; 88:980-988.
23. Young JM. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. J Plant Pathology. 2010; 92 (1, Supplement):S1.5-S1.14.

Отримано 17.05.2018