



УДК 635.21:632.4:581.19

Применение метода ПЦР в диагностике возбудителя кольцевой гнили картофеля

С. В. Бояркина, Ю. В. Омеличкина, Т. Н. Шафикова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
E-mail: klyuevskaya@ya.ru

Аннотация. Бактериальная кольцевая гниль, вызываемая *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), – широко распространенное заболевание картофеля. Для заболевания характерен длительный латентный период, во время которого визуально определить бактериоз невозможно. Цель работы – определить наличие патогена *Cms* в клубнях картофеля методом полимеразной цепной реакции, в том числе и на латентной стадии инфекции. При амплификации ДНК, выделенных из искусственно зараженного картофеля и ДНК из клубней, взятых с поля, были выявлены ПЦР-продукты того же размера, что и при амплификации ДНК бактерий *Cms*.

Ключевые слова: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), кольцевая гниль картофеля, латентная стадия инфекции, полимеразная цепная реакция.

Введение

Картофель – уникальная сельскохозяйственная культура, используемая для продовольственных и кормовых целей. Расчетная потенциальная продуктивность картофеля в оптимальных условиях может достигать 60–100 т/га. Однако картофель восприимчив к возбудителям вирусных, грибных и бактериальных болезней, что связано, прежде всего, с его вегетативным размножением клубнями. Поэтому важным резервом увеличения производства этой культуры является планомерная борьба с болезнями, потери от которых в последние годы составляют более четверти полученного урожая.

Бактериальная кольцевая гниль картофеля – широко распространенное заболевание, наносящее серьезный экономический ущерб семеноводству и сельскому хозяйству многих стран мира [1]. Оно распространено во всех странах северного полушария, но особенно вредоносно в странах Балтии, Белоруссии, европейской части России, Полесских и лесостепных районах Украины, на Востоке и Дальнем Востоке. Возбудитель данного заболевания *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) является объектом международного карантинного контроля и включен в список А2 Европейской организации по защите растений.

Основными симптомами заболевания является wilt (увядание) надземной части растения и кольцевая гниль клубней (рис. 1; рис. 2).



Рис. 1. Хлороз и некроз листьев, wilt надземной части картофеля



Рис. 2. Гниль по сосудистому кольцу клубней

Диагноз кольцевой гнили обычно ставится при обнаружении этих признаков болезни и биотестом на баклажане, альтернативном растении-хозяине *Sms*. Однако эти методы не позволяют обнаружить латентный период течения болезни, во время которого визуально определить заболевание невозможно.

Наличие латентной (скрытой) формы инфекции, в течение которой растения не имеют явно выраженных симптомов, а инфицированные клубни визуально не отличаются от здоровых, способствует быстрому и незаметному распространению патогена и наносит экономический ущерб.

Эффективный контроль заболевания с использованием молекулярно-генетических методов диагностики позволит определить наличие возбудителя кольцевой гнили картофеля независимо от формы заболевания. На сегодняшний день одним из ключевых методов идентификации патогенов и диагностики инфекционных заболеваний у растительных и животных организмов является полимеразная цепная реакция.

Цель нашей работы – определить наличие патогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* в клубнях картофеля методом полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы

Для работы использовали культуру бактерий возбудителя кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (штамм 5369, вирулентный, мукоидный), которую выращивали в течение двух суток, при температуре 25 °С на жидкой или агаризованной среде С [2]. Экстракцию ДНК бактерий осуществляли по методу быстрого выделения геномной ДНК из грам-положительных бактерий [5].

Стерильные клубни были получены из пробирочных растений картофеля (сорта – «луговской», «лукьяновский»). Часть клубней была инокулирована суспензией бактерий *Sms* (штамм 5369, титр инокулюма 1×10^8 , период инкубации 3,5 месяца). Также в работе использовали клубни картофеля, выращенные в условиях фитотрона и в поле. ДНК из клубней картофеля выделяли по методу быстрой экстракции ДНК бактерий из зараженных клубней [3].

Диагностику *Sms* в клубнях картофеля осуществляли по методу определения *Sms* в зараженных клубнях с помощью ПЦР [4], с не-

которыми модификациями. Для проведения амплификации использовали праймеры к нуклеотидной последовательности межгенного спейсера 16S-23S рРНК, синтезированные СИНТОЛ: PSA-F (5'-ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa-3') и PSA-R (5'-tac tga gat gtt tca ctt ccc c-3').

Реакционную смесь объемом 50 мкл, состоящую из двух фаз и воска (15 мкл) для их разделения, готовили в микропробирках для ПЦР, поочередно добавляя реактивы. Нижняя фаза содержала 3 мкл H₂O, 5 мкл дНТП и по 1 мкл каждого праймера; верхняя – 10 мкл ПЦР-буфера (5×), 7 мкл H₂O, 2,5 мкл MgSO₄, 0,5 мкл Taq-полимеразы. На поверхность ПЦР-смеси наносили 15 мкл H₂O и 5 мкл исследуемой ДНК, после чего пробирки помещали в амплификатор (БИС, модель-109).

Протокол амплификации включал: 1 цикл продолжительностью 3 мин при температуре 95 °С; 10 циклов при 95 °С в течение 1 мин, 64 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин; 25 циклов при 95 °С – 30 с, 62 °С – 30 с, 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.

Для разделения ПЦР-продуктов проводили электрофорез в 1,5 % агарозном геле. Для визуализации ДНК гель в течение 25 мин инкубировали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и просматривали в ультрафиолете на приборе Gel Doc XR («Bio Rad»).

Полученные результаты согласуются с литературными данными о наличии у бактериальной кольцевой гнили латентной (скрытой) формы инфекции, во время которой стебли и клубни растения не имеют выраженных признаков болезни. Однако при благоприятных для инфекции условиях, латентная форма может развиваться в заболевание со всеми характерными для него симптомами: вилт надземной части растений и гниение клубней картофеля.

Результаты и обсуждение

Согласно нашим наблюдениям, инфицированные клубни картофеля спустя 3,5 месяца после инокуляции суспензией бактерий *Sms* штамм 5369 визуально не отличались от здоровых клубней (рис. 3).

Поэтому молекулярно-генетические подходы в диагностике латентных инфекций, с помощью которых идентифицируют ДНК патогена в клубнях, должны иметь явные преимущества по сравнению с методами, которые

основываются на визуальном осмотре клубней при отборе посадочного материала.

В настоящей работе для выделения ДНК использовали бактериальную культуру *Cms* штамм 5369, стерильные клубни пробирочных растений картофеля, клубни, искусственно зараженные суспензией бактерий *Cms* штамм 5369, а также клубни, взятые с поля.

ПЦР анализ ДНК бактерий штамма 5369 с праймерами PSA-F и PSA-R выявил у бактерий фрагмент ДНК ожидаемого размера – 502 п.о. (рис. 4).

Полученные результаты подтвердили видовую принадлежность бактерий штамма 5369 как *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*). При амплификации ДНК, выделенных из искусственно зараженного картофеля и ДНК из клубней, взятых с поля, были выявлены ПЦР-продукты того же размера (502 п. о.), что и при амплификации ДНК бактерий *Cms*. Таким образом, было установлено наличие инфекции в искусственно зараженных клубнях и в клубнях с поля и определена их идентичность бактериям *Cms* штамма 5369.

В настоящее время полимеразная цепная реакция является наиболее точным и чувствительным диагностическим методом, позволяющим быстро выявлять латентную инфекцию различных фитопатогенов, в том числе бактерий *Cms*, вызывающих кольцевую гниль картофеля.

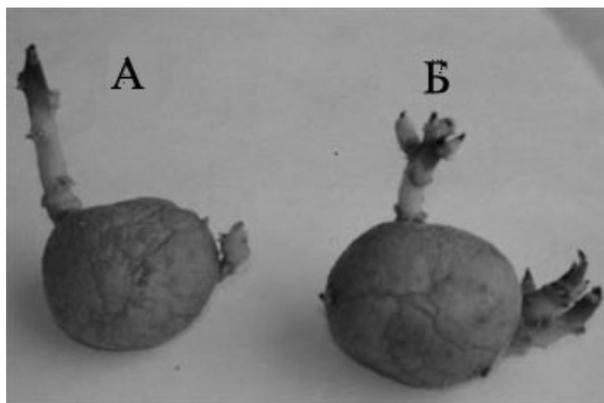


Рис. 3. Клубни картофеля сорта «луговской»: А – неинфицированный клубень, Б – клубень, инфицированный бактерией *Cms* (штамм 5369). Период инкубации 3,5 месяца

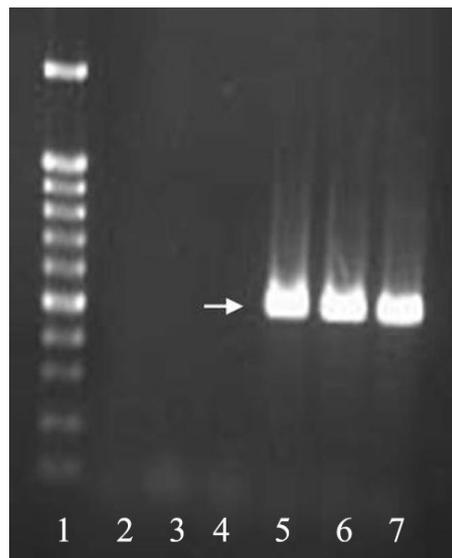


Рис. 4. Результаты ПЦР анализа ДНК из клубней картофеля сорта «лукьяновский». Стрелкой отмечены фрагменты ДНК размером 502 п.о. 1 – маркер молекулярного веса ДНК (100-1000 и 1500 п.о.); 2-4 – отрицательный контроль (стерильные клубни *in vitro*); 5 – положительный контроль (бактерии *Cms* штамм 5369); 6 – клубни, искусственно инфицированные *Cms* штамм 5369; 7 – клубни, выращенные в полевых условиях

Литература

1. Easton G. D. The biology and epidemiology of potato ring rot / G. D. Easton // American Potato J. – 1979. – № 56. – P. 459–460.
2. Meletzus D., Transformation of the Phytopathogenic Bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by Electroporation and Development of a Cloning Vector / D. Meletzus, R. Eichenlaub // J. of Bacteriology. – 1991. – № 173(1). – P. 184–190.
3. Niepold F. A simple and fast extraction procedure to obtain amplifiable DNA from *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* inoculated potato tuber extracts and naturally infected tubers to conduct a polymerase chain reaction / F. Niepold // J. Phytopathology. – 1999. – № 147. – P. 249–256.
4. Pastrik K. H. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA / K. H. Pastrik // European J. of Plant Pathology. – 2000. – № 106. – P. 155–165.
5. Pospiech A. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria / A. Pospiech, B. Neumann // Trends Genet. – 1995. – № 11. – P. 217–218.

Application method PCR in diagnostics potato ring rot pathogen

S. V. Boyarkina, J. V. Omelichkina, T. N. Shafikova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk

Abstract. Bacterial ring rot caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* is a widespread disease of potato resulting in significant economic lost in agriculture and seed growing. A latent form of this infection makes difficulties for diagnostics and facilitates the quick disease propagation. Polymerase chain reaction is the best method for the disease control.

Key words: potato, ring rot, tuber, pathogen, polymerase chain reaction method, Russia.

*Бояркина Светлана Владимировна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, а/я 1243, ул. Лермонтова, 132
тел. (395 2) 42-50-09, факс (395 2) 51-07-54
E-mail: klyuevskaya@ya.ru*

*Boyarkina Svetlana Vladimirovna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
phone: (395 2) 42-50-09, fax: (395 2) 51-07-54
E-mail: klyuevskaya@ya.ru*

*Омеличкина Юлия Викторовна
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, г. Иркутск, а/я 1243, ул. Лермонтова, 132
аспирант лаборатории фитоиммунологии
тел. (395 2) 42-50-09, факс (395 2) 51-07-54
E-mail: micrologus@gmail.com*

*Omelichkina Yuliya Viktorovna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
doctoral student
phone: (395 2) 42-50-09, fax: (395 2) 51-07-54
E-mail: micrologus@gmail.com*

*Шафикова Татьяна Николаевна
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН
664033, г. Иркутск, а/я 1243, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник лаборатории фито-
иммунологии
тел. (395 2) 42-50-09, факс (395 2) 51-07-54*

*Shafikova Tatiana Nikolaevna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
SB RAS
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.
Ph. D. in Biology, senior research scientist, Laboratory
of Phytoimmunology
phone: (395 2) 42-50-09, fax: (395 2) 51-07-54*