

Л.А. Данкевич¹, О.М. Захарова², М.Д. Мельничук²,
С.К. Воцелко¹, В.П. Патица¹

¹Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д 03608, Україна,

²Національний університет біоресурсів і природокористування України,
Київ, вул. Героїв Оборони, 15, 03041, Україна

REP-ПЛР АНАЛІЗ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ РІПАКУ

Проаналізовано BOX, ERIC та REP – профілі 12 ізолюваних та 10 типових штамів бактерій родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas* та *Pectobacterium*, патогенних для ріпаку. Встановлено спорідненість ізолюваних нами штамів із представниками *P. marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas fluorescens* та *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Ключові слова: бактеріальні хвороби ріпаку, бактерії родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas* та *Pectobacterium*, REP – ПЛР аналіз, REP, ERIC та BOX-профілі.

Стрімкий розвиток методів досліджень молекулярної біології наприкінці ХХ початку ХХІ століття відкрив нові можливості для всебічного вивчення генотипових властивостей мікроорганізмів від їх швидкої ідентифікації на будь-якому таксономічному рівні до оцінки генетичного різноманіття окремих популяцій [2, 5, 7, 9]. На думку багатьох дослідників, найбільш вдалим для оцінки генетичної структури як окремих таксонів, так і цілих популяцій є група методів так званого «фінгепринтування геному», до яких належить метод довільно ампліфікованої поліморфної ДНК (AP/RAPD–ПЛР) та метод ампліфікування генетичних елементів, що повторюються (REP–ПЛР), а також метод ампліфікування фрагментів поліморфної ДНК різної довжини (AFLP–ПЛР) [5, 9]. Найбільш вживаними є AP/RAPD–ПЛР або REP–ПЛР, оскільки вони встановлюють генетичну варіабельність цілого геному, ефективні при ідентифікації бактерій на рівні виду, підвиду або штаму, та не потребують, додатково, проведення рестрикційного аналізу, як у випадку AFLP–ПЛР [8, 10, 12, 14]. Крім того, REP–ПЛР є більш ефективним саме у випадку точних таксономічних досліджень, оскільки, на відміну від інших методів фінгепринтування геному, зокрема AP/RAPD–ПЛР, дозволяє отримати три (REP, ERIC, BOX) незалежні генетичні профілі одночасно [2, 5, 8, 9, 12]. Саме тому даний метод часто використовується для досліджень у галузі систематики мікроорганізмів [5, 9].

Незважаючи на стратегічне значення ріпаку для народного господарства, дані щодо оцінки генетичної варіабельності популяції збудників бактеріальних хвороб даної культури у літературі вкрай обмежені [1]. Попередньо нами були вивчені фенотипові властивості популяції збудників бактеріальних хвороб ріпаку, ізолюваної у 2010–2012 роках, та показано, що 60 % виділених штамів належить до роду *Pseudomonas*, а 40 % – до роду *Xanthomonas*. Зокрема, виявлено, що за комплексом ознак фенотипу штами, віднесені до роду *Xanthomonas*, найбільш споріднені з представниками виду *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [3, 4]. Натомість, із-за близької фенотипової спорідненості видів *Pseudomonas fluorescens* та *Pseudomonas marginalis* остаточно провести ідентифікацію ізолюваних нами штамів, віднесених роду *Pseudomonas*, на рівні виду нам не вдалося [4]. Зважаючи на це, метою наших досліджень було генетичне профілювання популяції збудників бактеріальних хвороб ріпаку за допомогою REP–ПЛР аналізу.

Матеріали і методи досліджень. Об'єктами досліджень були 12 виділених нами з уражених рослин ріпаку штамів родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*. У роботі також використали наступні колекційні та типові штами фітопатогенних бактерій, що здатні уражувати ріпак: *Pseudomonas fluorescens* B-17^T (біовар I), *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Pseudomonas fluorescens* B-28 (біовар II), *Pseudomonas fluorescens* B-36 (біовар III), *Pseudomonas fluorescens* B-41 (біовар IV), *Pseudomonas fluorescens* B-52 (біовар V), *Pseudomonas fluorescens* B-53 (біовар V), *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B-1027^T, *Pectobacterium carotovorum* subs. *carotovorum* B-1075^T, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B-1049^T та *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 820. Виділення та очищення хромосомної

© Л.А. Данкевич, О.М. Захарова, М.Д. Мельничук, С.К. Воцелко, В.П. Патица, 2014

ДНК проводили з використанням набору реактивів «ДНК-сорб-В». Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометра BioPhotometr. У роботі використали наступні універсальні праймери: REP 1R -5'-IIIICGICGICATCIGGC-3', REP21 -5'-JCGICTTATCIGGCCTAC-3'; ERIC 1R -5'-ATGTAAGCTCCTGGATTAC-3', ERIC 2 -5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3; BOX A1R -5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'. Ампліфікування проводили з використанням термоциклера Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902, фірми Applied Biosystem (США) за експериментально підібраних умов. Зокрема для штамів *Pseudomonas* sp.: додаткова денатурація ДНК – 96 °C/6 хв та основна денатурація ДНК – 94 °C/1 хв (однакова для всіх видів REP–ПЛІР); відпалювання праймерів – 44°C/1 хв (REP–ПЛІР з REP праймерами), 52°C/1 хв (REP–ПЛІР з ERIC праймерами) та 53°C/1 хв (REP–ПЛІР з BOX праймерами); елонгація ДНК – 72°C/2 хв (однакова для всіх видів ПЛІР реакції) і заключний синтез ДНК – 65°C/8 хв (однаковий для всіх видів REP–ПЛІР). Для представників роду *Xanthomonas* умови ампліфікування були наступними: додаткова денатурація ДНК – 95°C/7 хв та основна денатурація ДНК – 94°C/1 хв (однакова для всіх видів REP–ПЛІР); відпалювання праймерів – 44°C/1 хв (REP–ПЛІР з REP праймерами), 52°C/1 хв (REP–ПЛІР з ERIC праймерами) та 53°C/1 хв (REP–ПЛІР з BOX праймерами); елонгація ДНК – 72°C/8 хв (однакова для всіх видів ПЛІР реакції) і заключний синтез ДНК – 65°C/15 хв (однаковий для всіх видів REP–ПЛІР). Продукти реакції розподіляли у 1,5 % агарозному гелі протягом 4 годин за напруженості електричного поля 1,5 В/см. Для візуалізації одержаних генетичних профілів використовували гель-док Universal Hood II фірми Applied Biosystem (США). Спорідненість одержаних REP, ERIC та BOX профілів оцінювали за допомогою комп'ютерної програми DENDRO UPGMA, яка базується на використанні не вагового попарно-групового методу з використанням середніх значень (unweighted pair group method with averages, UPGMA).

Результати та їх обговорення. Як видно з рис. 1 за BOX–профілями сім із одинадцяти виділених нами штамів, а саме штами – *Pseudomonas* sp. 4а, 6а, 7а, 5*, 7*, 8*, 9*, 14 близько споріднені з типовим штамом *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T (рис. 1).

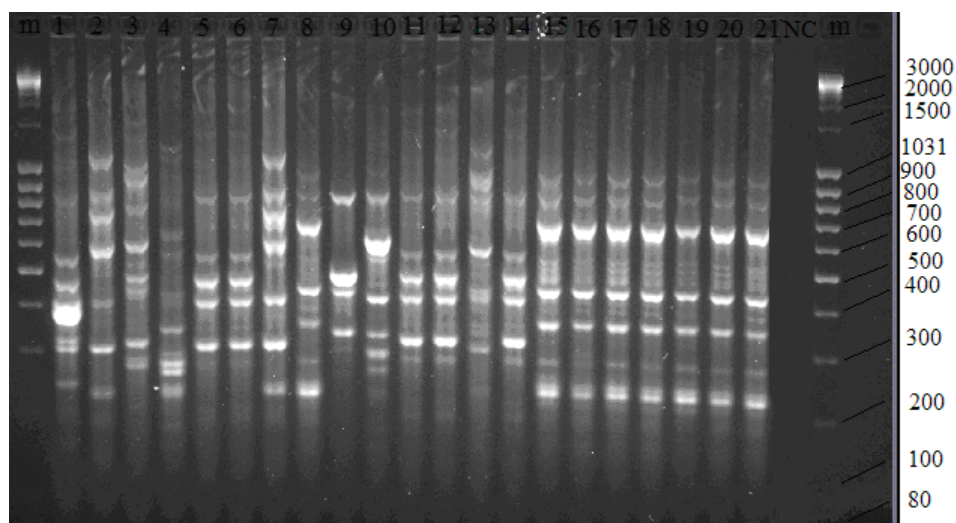


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛІР реакції з використанням BOX-праймерів у 1,5 % агарозному гелі: m – маркери молекулярних мас; 1. – *P. fluorescens* 8573; 2. – *P. fluorescens* B-28; 3. – *P. fluorescens* B-36; 4. – *P. fluorescens* B-41; 5. – *P. fluorescens* B-52; 6. – *P. fluorescens* B-53; 7. – *P. fluorescens* B-17^T; 8. – *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T; 9. – *P. syringae* pv. *syringae* B-1027^T; 10. – *P. carotovorum* sp. *carotovorum* B-1075^T; 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21. – виділені штами *Pseudomonas* sp. 2О, 3А, 2а, 4а, 6а, 7а, 5*, 7*, 8*, 9*, 14*, NC – негативний контроль.

Зокрема, дані штами за сімома спільними продуктами реакції подібні з типовим представником згаданого вище виду *Pseudomonas marginalis*. Слід також зазначити, що виділені нами штами *Pseudomonas* sp. 6а, 7а, 5*, 7*, 8*, 9* та 14* також мають три спільних продукти ПЛІР реакції з типовим штамом *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B-1027^T та два спільних продукти з

типовими штамми *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Pseudomonas fluorescens* B-52, *Pseudomonas fluorescens* B-53, що вказує на їх філогенетичну віддаленість. Одержані нами результати узгоджуються з даними кластерного аналізу. Так штамми *Pseudomonas* sp. 6a, 7a, 5*, 7*, 8*, 9* та 14* (рис. 2) утворили два подібні між собою кластери, що найбільш споріднені з типовим штамом *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T (рис. 2). Решта виділених нами штамів *Pseudomonas* sp. 20, 3A, 2a та 4a на етапі попереднього REP, ERIC та BOX-профілювання геному не виявили суттєвої спорідненості із жодним типовим або колекційним штамом.

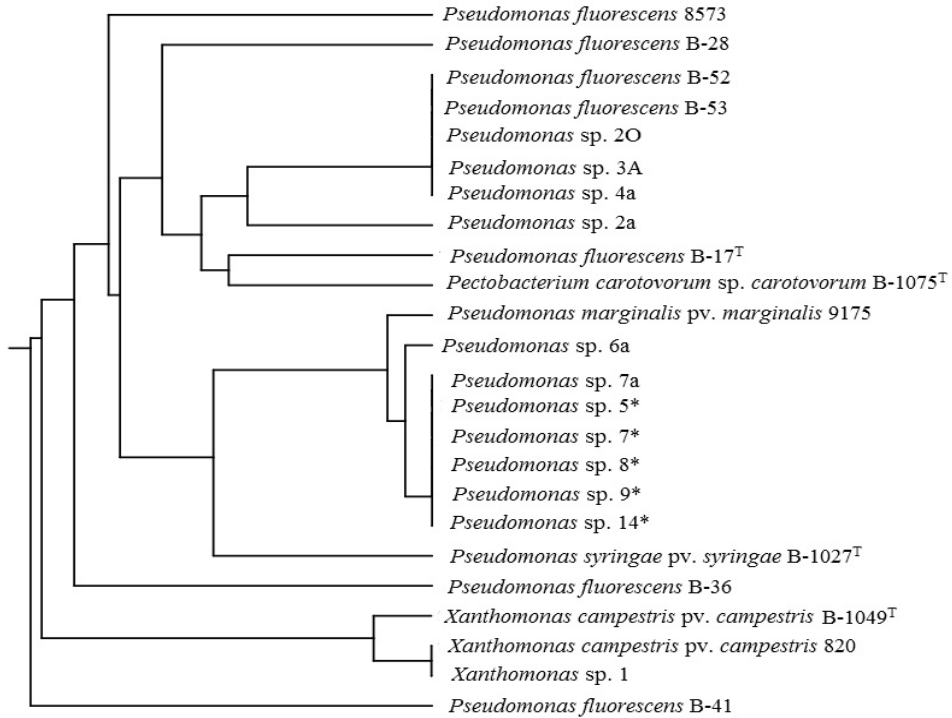


Рис. 2. Дендрограма спорідненості патогенних для ріпаку бактерій роду *Pseudomonas*, побудована за результатами BOX-профілювання.

Слід також зазначити, що дані штамми фенотипово є близькоспорідненими як з представниками виду *Pseudomonas fluorescens*, так і з представниками виду *P. marginalis*. На наш погляд, генетична віддаленість штамів *Pseudomonas* sp. 20, 3A, 2a та 4a від типового штамму *P. fluorescens* B-17^T, напевно, пояснюється значною гетерогенністю виду *Pseudomonas fluorescens*, що об'єднує у своєму складі п'ять біоварів, частина з яких є умовно-патогенними для рослин [7]. Тому, для коректної видової ідентифікації даних штамів, у дослідження, окрім типового штамму *P. fluorescens* B-17^T, також були включені типові представники усіх п'яти біоварів, що входять до складу даного виду.

У результаті ПЛР реакції з використанням BOX-праймерів, у генетичних профілях виділених штамів *Pseudomonas* sp. 20, 3A, 4a та типових штамів *Pseudomonas fluorescens* B-52, B-53, що належать до п'ятого біовару у складі виду *Pseudomonas fluorescens*, виявлено п'ять спільних продуктів реакції молекулярною масою від 310 до 800 н.п. Крім того, виділені нами штамми *Pseudomonas* sp. 20, 3A, 4a мають три спільних продукти реакції із типовим штамом *P. fluorescens* B-17^T, два спільних ДНК-фрагменти зі штамми *Pseudomonas fluorescens* 8573 і *P. carotovorum* sp. *carotovorum* B-1075^T та один – зі штамми *P. fluorescens* B-28, *P. fluorescens* B-36, *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T (рис. 1). Натомість, виділений нами штам *Pseudomonas* sp. 2a за результатами ПЛР реакції з використанням BOX-праймерів дещо меншою мірою споріднений як представниками видів *Pseudomonas marginalis*, так і *Pseudomonas fluorescens*. Зокрема, у даного штамму виявлено лише три спільних ДНК-фрагменти із типовим штамом *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T. Крім того, штам *Pseudomonas* sp. 2a за результата-

ми фінгерпринтування геному з BOX–праймерами також має два спільних продукти реакції з наступними типовими та колекційними штамми: *Pseudomonas fluorescens* B-28, *Pseudomonas fluorescens* B-52, *Pseudomonas fluorescens* B-53, *P. fluorescens* B-17^T, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B-1027^T. У BOX–профілях даного штаму виявлено один спільний зі штамми *Pseudomonas fluorescens* B-36 та *Pseudomonas fluorescens* 8573 продукт ПЛР реакції (рис. 1). І дійсно, за результатами кластерного аналізу, штам *Pseudomonas* sp. 2a утворив окремий кластер, який філогенетично є найбільш спорідненим з кластером, до складу якого входять типові представники п'ятого біовару виду *Pseudomonas fluorescens* та виділені нами штамми *Pseudomonas* sp. 2O, 3A, 4a (рис. 2).

Аналіз ERIC – профілів також виявив спорідненість семи виділених нами штамів *Pseudomonas* sp. 6a, 7a, 5*, 7*, 8*, 9*, 14* з типовим штамом *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T. Як видно з рисунку 3 у даних штамів детектовано чотирнадцять спільних з типовим представником виду *Pseudomonas marginalis* продуктів ПЛР реакції, що свідчить про їх близьку філогенетичну спорідненість. Крім того, у згаданих вище штамів *Pseudomonas* sp. також виявлено два спільні зі штамми *P. fluorescens* B-28 та *P. fluorescens* B-36 ДНК – фрагменти.

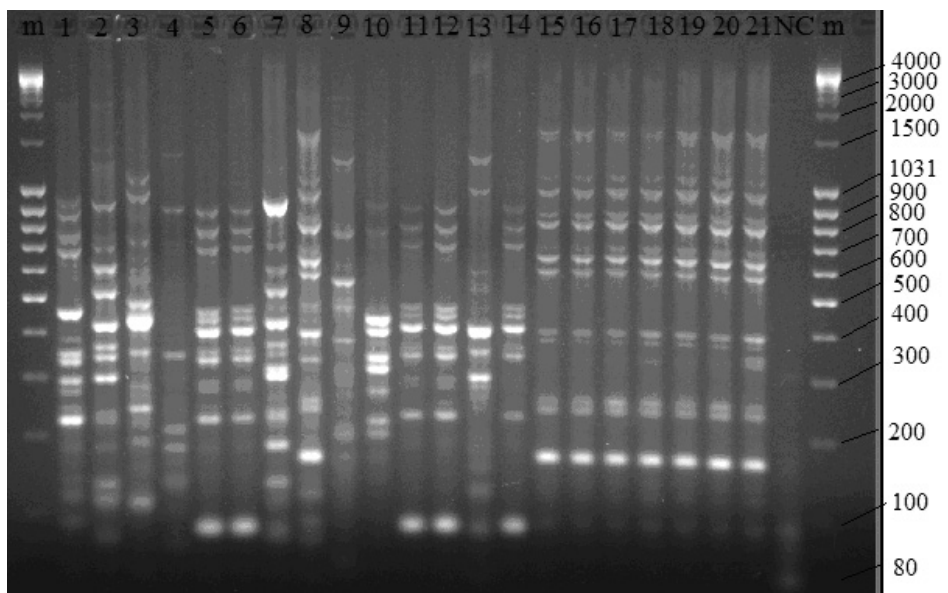


Рис. 3. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР реакції з використанням ERIC-праймерів у 1,5 % агарозному гелі: m – маркери молекулярних мас; 1. – *P. fluorescens* 8573; 2. – *P. fluorescens* B-28; 3. – *P. fluorescens* B-36; 4. – *P. fluorescens* B-41; 5. – *P. fluorescens* B-52; 6. – *P. fluorescens* B-53; 7. – *P. fluorescens* B-17^T; 8. – *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T; 9. – *P. syringae* pv. *syringae* B-1027^T; 10. – *P. carotovorum* sp. *carotovorum* B-1075^T; 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21. – виділені штамми *Pseudomonas* sp. 2O, 3A, 2a, 4a, 6a, 7a, 5*, 7*, 8*, 9*, 14*, NC – негативний контроль.

За результатами кластерного аналізу дані штамми утворили один однорідний кластер, що найбільш тісно пов'язаний з кластером до складу якого входить типовий штам *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T (рис. 4).

Встановлено також, що виділені нами штамми *Pseudomonas* sp. 2O, 3A та 4a високо споріднені з типовими штамми *Pseudomonas fluorescens* B-52 та *Pseudomonas fluorescens* B-53. Зокрема, дані штамми споріднені з типовим представниками п'ятого біовару виду *Pseudomonas fluorescens* за дев'ятьма спільними продуктами реакції молекулярною масою від 200 до 840 н.п (рис. 3). Натомість, виділений нами штам *Pseudomonas* sp. 2a також виявив спорідненість з типовими колекційними штамми, вказаними вище, лише за 3 спільними продуктами ПЛР реакції. Крім того, даний штам має по одному спільному ДНК-фрагменту з наступними штамми: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B-1027^T, *P. fluorescens* B-17^T та *P. marginalis* pv. *marginalis*

9175^T (рис. 3). Філогенетична спорідненість штаму *Pseudomonas* sp. 2a з типовими представниками п'ятого біовару виду *Pseudomonas fluorescens* підтверджується і результатами кластерного аналізу. Як видно з рис. 4, даний штам найбільш тісно пов'язаний з двома кластерами, що утворені відповідно штамми *Pseudomonas fluorescens* B-52 та *Pseudomonas fluorescens* B-53, а також виділеними нами штамми *Pseudomonas* sp. 2O, 3A та 4a.

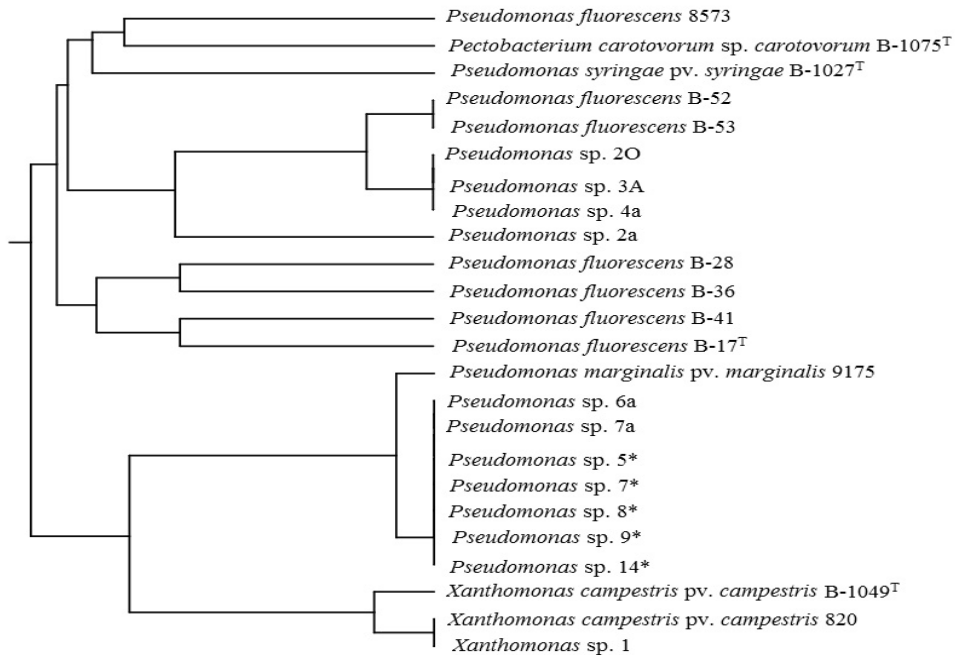


Рис. 4. Дендрограма спорідненості патогенних для ріпаку бактерій роду *Pseudomonas*, побудована за результатами ERIC-профілювання.

Результати REP-профілювання геному штамів *Pseudomonas* sp. 6a, 7a, 5*, 7*, 8*, 9*, 14* та типового штаму *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T також підтверджують високий ступінь їх філогенетичної спорідненості. Зокрема, у REP-профілях виділених нами штамів виявлено шість спільних із типовим штамом *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T ДНК-фрагментів (рис. 5). Як видно з рис. 5 штами *Pseudomonas* sp. 2O, 3A та 4a мають дев'ять спільних із типовими штамми *Pseudomonas fluorescens* B-52 та *Pseudomonas fluorescens* B-53 ДНК-фрагментів, що також підтверджує їх близьку філогенетичну спорідненість.

Крім того, у даних штамів виявлено також два спільних зі штамом *Pseudomonas fluorescens* 8573 та один – зі штамом *Pseudomonas fluorescens* B-28, *Pseudomonas fluorescens* B-41 продукти ПЛР реакції. Кластерний аналіз підтвердив отримані результати REP-ПЛР профілювання. Зокрема, як видно з рисунку 6, ізолювані нами штами *Pseudomonas* sp. 2O, 3A та 4a утворили єдиний філогенетичний кластер з типовими представниками п'ятого біовару у складі виду *Pseudomonas fluorescens*. Натомість, аналіз у REP-профілів виділеного нами штаму *Pseudomonas* sp. 2a встановив лише два унікальні ДНК-драгменти (рис. 5). Кластерний аналіз не іде в розріз з отриманими результатами (рис. 6).

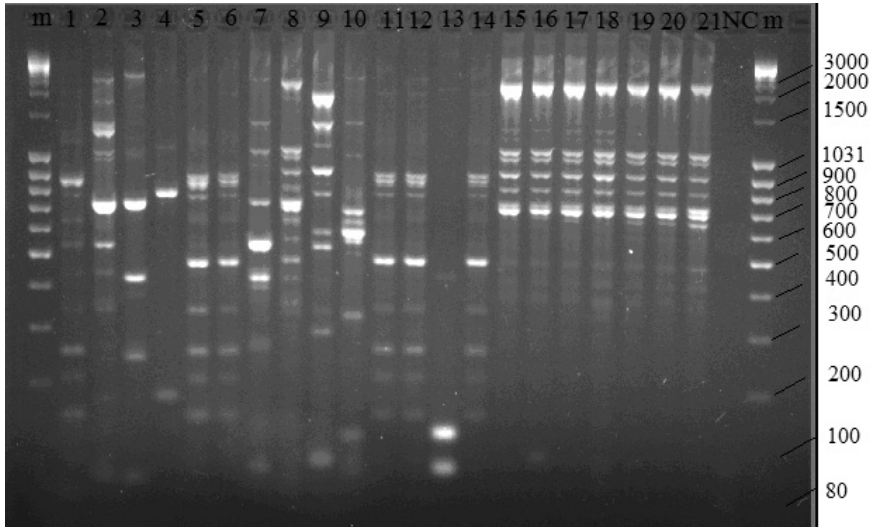


Рис. 5. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР реакції з використанням REP-праймерів у 1,5 % агарозному гелі: m – маркери молекулярних мас; 1. – *P. fluorescens* 8573; 2. – *P. fluorescens* B-28; 3. – *P. fluorescens* B-36; 4. – *P. fluorescens* B-41; 5. – *P. fluorescens* B-52; 6. – *P. fluorescens* B-53; 7. – *P. fluorescens* B-17^T; 8. – *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T; 9. – *P. syringae* pv. *syringae* B-1027^T; 10. – *P. carotovorum* sp. *carotovorum* B-1075^T; 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21. – виділені штами *Pseudomonas* sp. 2O, 3A, 2a, 4a, 6a, 7a, 5*, 7*, 8*, 9*, 14*, NC – негативний контроль.

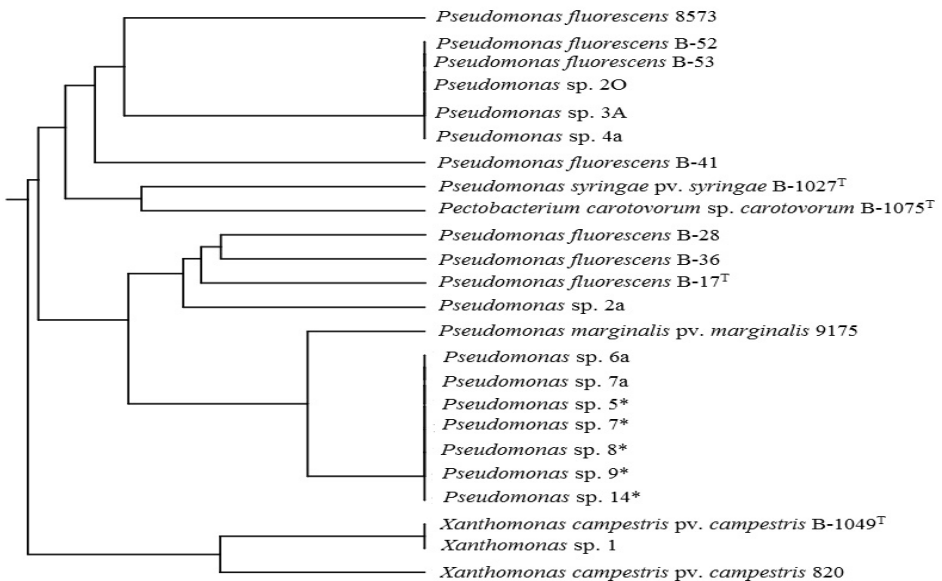


Рис. 6. Дендрограма спорідненості патогенних для ріпаку бактерій роду *Pseudomonas*, побудована за результатами REP-профілювання.

Даний факт ще раз підтверджує відому думку про необхідність комплексного аналізу як REP, ERIC, так і BOX-профілів у разі коректної таксономії мікроорганізмів на видовому та внутрішньовидовому рівнях [5, 9] (рис. 6). Відмічена нами у ході досліджень генетична варіабельність окремих штамів у складі роду *Pseudomonas* узгоджується з даними літератури [11, 13], і наводить на думку про необхідність застосування для коректної таксономії представників даного роду поліфазної таксономії [7]. Слід також зазначити, що виділений нами штам *Pseudomonas* sp. 2a за сумарною кількістю подібних ДНК-фрагментів у BOX, ERIC та

REP-профілях найбільш споріднений саме з типовими штамми *Pseudomonas fluorescens* B-52 та *Pseudomonas fluorescens* B-52, що належать до п'ятого біовару у складі виду *Pseudomonas fluorescens*. Крім того, одержані нами результати корелюють з попереднім аналізом комплексу ознак фенотипу, що також вказував на значну спорідненість даного штаму з представниками виду *Pseudomonas fluorescens* [3, 4]. Отже, за результатами фінгепринтування геному близько 64 % патогенних для ріпаку бактерій роду *Pseudomonas fluorescens* віднесено до виду *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, а решта 36 % до виду *Pseudomonas fluorescens*. Необхідно також зазначити, що ізольовані нами з уражених рослин ріпаку штами *Pseudomonas* sp. 20, 3A, 4a та 2a є гетерогенні за рівнем агресивності [4] та за результатами даного дослідження найбільш філогенетично споріднені саме зі сапрофітними штамми типовими представниками п'ятого біовару виду *Pseudomonas fluorescens*, що ізольовані з ризосфери пшениці та люпину багаторічного. З літератури відома здатність окремих штамів у складі даного виду викликати, за певних умов, захворювання зерно-бобових культур [1, 7]. Отже, даний факт ще раз підтверджує відому закономірність щодо високої біохімічної та екологічної пластичності представників виду *Pseudomonas fluorescens* та їх здатності за певних обставин переходити від сапрофітного способу існування до патогенного [7].

Як зазначалося раніше, попередньо проведеного аналізу ознак фенотипу виділених нами з уражених рослин ріпаку штамів *Xanthomonas* sp. виявилось достатньо для їх коректної ідентифікації на рівні виду та патовару. Але, для розробки у перспективі бази даних генетичних REP, ERIC та BOX-профілів збудників бактеріальних хвороб ріпаку, та з метою подальшої їх експрес-діагностики, нами було проведено фінгепринтування геному найбільш агресивних з них. Так, у REP-профілях виділеного нами штаму *Xanthomonas* sp. 1 виявлено два спільних колекційним штамом *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B-1049^T ДНК-фрагменту, що свідчить про їх спорідненість (рис. 7).

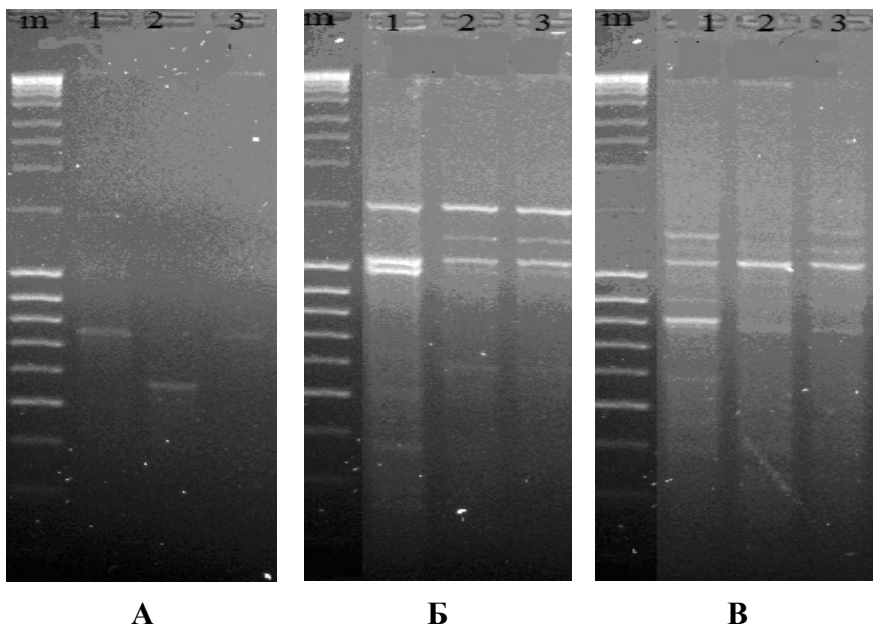


Рис. 7. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР реакції з використанням REP (А); ERIC (Б); BOX (В) праймерів у 1,5 % агарозному гелі: m – маркери молекулярних мас; 1. – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B-1049^T; 2. – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 820; 3. – виділений штам *Xanthomonas* sp. 1.

За результатами ERIC-профілювання штам *Xanthomonas* sp. 1 є більш спорідненим із типовим штамом *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 820 ніж із типовим штамом *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B-1049^T. Зокрема, у ERIC-профілях згаданого вище виділеного нами штаму виявлено чотири спільних із колекційним штамом *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 820, а також три спільних із типовим штамом *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

B-1049^T ДНК-фрагменти, що, безумовно, підтверджує належність *Xanthomonas* sp. 1 до виду *Xanthomonas campestris* та одноіменного патовару у його складі. Одержані нами результати REP та ERIC-профілювання підтвердилися також даними ПЛР реакції з BOX-праймерами. Зокрема, у BOX-профілях геному виділеного нами штаму *Xanthomonas* sp. 1 виявлено п'ять спільних із типовим штамом *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B-1049^T продуктів реакції. Результати полімеразно ланцюгової реакції узгоджуються з даними кластерного аналізу (рис.2, рис.4, рис.5). Слід також зазначити, що встановлена нами генетична гетерогенність штамів *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, виявлена в наслідок REP, ERIC та BOX-профілювання геному, підтверджується літературними даними для представників даного роду, та спонукає для дослідження більш широкого спектра штамів з метою розробки коректної бази даних ДНК «фінгепринтів» [6, 8, 12, 15].

Отже, аналіз REP, ERIC та BOX-профілів геному виділених нами штамів показав, що популяція збудників бактеріальні хвороби ріпаку є таксономічно гетерогенною. Зокрема, 37,5 % виділених нами штамів за комплексом ознак генотипу та фенотипу віднесено до *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, 25 % – *Pseudomonas fluorescens* біовару V та 37,5 % до – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Тобто, більш чисельною у природі є патогенні для ріпаку бактерії, що належать до роду *Pseudomonas* (62,5 % ізольованих штамів), ніж представники роду *Xanthomonas* (37,5 % ізольованих штамів). На наш погляд це може пояснюватися значною екологічною пластичністю саме представників роду *Pseudomonas*. Крім того, серед ідентифікованого спектра штамів не виявлено вузькоспеціалізованих збудників. Усі ідентифіковані фітопатогенні бактерії є або класичними поліфагами, що здатні уражувати широке коло рослин, або умовнопатогенними видами, що здатні лише за певних умов викликати захворювання широкого спектра рослин. Даний факт наводить на думку про потенційну небезпечність некоректної інтродукції ріпаку як можливого джерела бактеріальних збудників поліфагової природи та умовно патогенних для рослин видів. Необхідна також ретельна розробка аграріями коректних сівозмін. Слід також зазначити, що у випадку патогенних для ріпаку представників роду *Pseudomonas* найбільш дієвим таксономічним підходом виявилися генотипові методи, зокрема методи «фінгепринтування» геномної ДНК.

**Л.А. Данкевич¹, О.М. Захарова², М.Д. Мельничук²,
С.К. Воцелко¹, В.Ф. Патица¹**

¹Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ,

²Національний університет біоресурсів і природопольовання України, Київ

REP-ПЦР АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РАПСА

Проанализированы BOX, ERIC та REP – профили 12 изолированных и 10 типовых штаммов бактерий родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Pectobacterium*, патогенных для рапса. Установлено сходство изолированных нами штаммов с представителями *P. marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas fluorescens* и *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

К л ю ч е в ы е с л о в а: бактериальные болезни рапса, бактерии родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Pectobacterium*, REP–ПЦР анализ, REP, ERIC и BOX-профили.

**L.A. Dankevich¹, O. M. Zakharova², M.D. Melnichuk²,
S.K. Votselko¹, V.P. Patyka¹**

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

REP-PCR ANALYSIS OF RAPE'S BACTERIAL DISEASES AGENTS

S u m m a r y

BOX, ERIC and REP – genomic fingerprints of 12 isolated and 10 typical pathogenic for rape bacterial strains *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Pectobacterium* genera have been analyzed. The affinity of isolated

strains with representatives of *P. marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* species has been determined.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у о р д с: rape's bacterial diseases, bacteria *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Pectobacterium* genera, REP-PCR analysis, BOX, ERIC and REP – genomic fingerprints.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Dankevich I.A., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03689, Ukraine.

1. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гринник І.В., Патица В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / За ред. В.П. Патики – Київ: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
2. Глик Б., Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Глик Б., Пастернак Дж. Пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 589 с.
3. Данкевич Л.А., Воцелко С.К., Захарова О.М., Мельничук М.Д., Патица В.П. Ідентифікація збудників бактеріальних хвороб ріпаку за жирнокислотним складом клітинних ліпідів // Мікробиол. журн. – 2013. – **75**, №4. – С. 47–52.
4. Захарова О.М., Мельничук М.Д., Данкевич Л.А., Патица В.П. Бактеріальні хвороби ріпаку // Мікробиол. журн. – 2012. – **74**, №6. – С. 46–52.
5. Овчаренко Л.П., Козировська Н.О. Метагеномний аналіз мікроорганізмів довкілля. – Київ: «Спринт-Принт», 2008. – 256 с.
6. Barak J.D., Gibertson R.L. Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce // Phytopathology. – 2003. – **93**, N 5–P. 596–603.
7. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J. T., Garrity G.M. – New York; USA: Springer Science+ Business Media – 2005. –Vol.1. 2nd ed. – 1108 p.
8. Louws F.J., Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR.// Applied and Environmental Microbiology. –1994. –**60**, N 7. – P. 2286–2295.
9. Louws F.J., Rademaker J. L.W, de Bruijn F.J. The three DS of PCR-based genomic analysis of phytopathogenic bacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis.// Annual Reviews Phytopathology. –1999. –**37**. – P. 81–125.
10. Martin-Sans A., de la Vega M.P, Murillo J., Caminero C. Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from pea are phylogenetically and pathogenically diverse // Phytopathology – 2013. – 103, N 7 – P. 673–681.
11. Neemegam R., Ayyadurai N., Kayalvizhi N., Gunasekaran P. Genotypic and phenotypic diversity of PGCR fluorescens *Pseudomonads* isolated from rhizosphere of sugarcane // J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – **22**, N 1 – P.13–24.
12. Rademaker J.L., Hoste B., Louws F.J., Kersters K., Swings J., Vauterin L., Vauterin P., de Bruijn F.J. 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**, – P. 665–677.
13. Sarris F., Panagiotis, Trantas A., Emmanouil, Mpalantinaki Evaggelia, Ververidis Filippos, Goumas E., Dimitrios, Zhang Zhengguang. *Pseudomonas viridiflava*, a multi host plant pathogen with significant genetic variation at molecular level // PLoS One – 2012. – 7, N 4 – P.360–382.
14. Sikorski J., Rossello-Mora R., Lorens M. G. Analysis of genotypic diversity and relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains by PCR-based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis.// Syst Applied Microbiology. –1999. – **22**, N 3 –P. 393–402.
15. Singh D., Dhar S, Yadava DK. Genetic and pathogenic variability of Indian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* causing black rot disease in crucifers. // Curr Microbiol. – 2011. – **63**, N 6 – P. 551–560.

Отримано 24.09.2013