

чення вказаних показників виявлені у II дослідній групі, що дає підстави припустити інтенсивніший розвиток і підвищений рівень імунітету у даних тварин. Рівень сечовини в крові телят дослідної групи виявився нижчим порівняно з контрольною групою; це можна пояснити нормалізацією білкового обміну в організмі тварин, які споживали функціональну добавку.

Інтегральним показником успішного вирощування телят є приріст біомаси. Дослідженнями встанов-

лено, що середньодобові прирости телят контрольної групи становили 637 г. Збагачення корму контрольної групи функціональною добавкою забезпечило підвищення середньодобових приростів маси тварин до 691 г, або на 8,6 % вище, ніж у контрольній групі (табл. 3).

Як свідчать дані табл. 3 телята обох груп важили майже однаково, але подальший їх розвиток різнився. Маса телят контрольної групи була більшою ніж дослідної на 20 добу

досліді на 0,8 кг. На 40 добу досліді телята дослідної групи почали інтенсивніше набирати масу і на 60 добу досліді перевищували контрольну групу на 2,4 кг.

Висновки

Встановлено, що збагачення основного раціону телят новою функціональною добавкою БК-Т на основі молочнокислих та біфідобактерій істотно сприяє підвищенню середньодобових приростів живої маси телят.

Література

1. *Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных : справочное пособие / под ред. А. П. Калашникова В. И. Фисинина, В. В. Щеглова и др. – 3-е изд., перераб. и доп. – М., 2003. – 456 с.*

2. *Данилевская Н. В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков // Ветеринария. – 2005. - № 11. – С. 6-9.*

3. *Parker R.S. Probiotics the other half of the antibiotics story // Anim. Nutrition and Health. – 1974. - V. 29. P. 4 – 8.*

4. *Горская Е.М., Лизько Н.Н., Ленцнер А.А., Бондаренко В.М., Соколова К.Я., Лихачева А.Ю. Биологическая характеристика штаммов лактобацилл,*

перспективных в качестве зубиотиков // Журн. микробиол. - 1992. - №3. - С. 17-20.

5. *Храмцов А. Г. Технология кормовых добавок нового поколения из вторичного молочного сырья – М. : ДеЛи принт, 2006. – 328 с.*

6. *Якимов А.В., Нуртдинов М.Г., Абузьяров Р.Х. и др. Влияние пробиотической кормовой добавки на обмен веществ и продуктивность крупного рогатого скота // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана – Казань – 2008 – Т 191 – С 147-152.*

7. *Кігель Н.Ф. Новий бактеріальний препарат "Біфідин" для тварин та його біологічні властивості. // Ветеринарна медицина 1999. – № 10. – С. 8-9.*

УДК 601.4:577.21:632.35:635.64

Молекулярна діагностика бактеріальних хвороб рослин томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.)



Анотація. Проведено ідентифікацію збудників бактеріальних хвороб томата – *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* і *Xanthomonas vesicatoria* з використанням полімеразної ланцюгової реакції та праймерів CMM5/CMM6, P1/P2 та RST2/RST3. Перевірено специфічність обраних праймерів на українських ізолятах фітопатогенних бактерій. Рекомендовано використовувати праймери CMM5/CMM6, P1/P2 і RST2/RST3 в моноспецифічній тест-системі та в мультиплексному ПЛП аналізі біоматеріалу на присутність трьох видів збудників одночасно.

Ключові слова. Томати, бактеріальні хвороби, ідентифікація, полімеразна ланцюгова реакція, праймери, продукти ампліфікації, бактеріальна ДНК

Molecular diagnostic methods of bacterial diseases of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) JULIA F. AVETYSIAN (Post-graduate student. National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine.) JULIA V. KOLOMIETS (Ph.D in biotechnology, Associate Professor. National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine). IVAN P. GRYGORYUK (Doctor in Biology, Professor, corresponding member of the Academy of Sciences of Ukraine, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, specialty).

Abstract. Determination of bacterial diseases of tomato – *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* performed using specific primers CMM5/CMM6, R1/R2 and RST2/RST3. Specificity of the primers tested using DNA Ukrainian isolates phytopathogenic bacteria.

Key words. Tomatoes, bacterial diseases, detection, polymerase chain reaction, primers, the PCR products, genomic DNA.

Ю. АВЕТИСЯН, аспірант

Ю. КОЛОМІЄЦЬ, канд. біол. наук

І. ГРИГОРЮК, докт. біол. наук

Національний університет біоресурсів та природокористування України

За даними продовольчої і сільськогосподарської комісії ООН (FAO), бактеріальні хвороби спричиняють втрату 30 % урожаю сільськогосподарських культур [16]. Зараз в господарствах України, що вирощують томати, поширені збудники бактеріального раку (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), бактеріальної крапчастості (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) та бактеріальної плямистості (*Xanthomonas vesicatoria*) [2, 5].

Вибір ефективних методів захисту проти бактеріальних хвороб ускладнюється подібністю симптомів хвороб і ураженням рослин томатів протягом вегетації не одним видом, а комплексом патогена.[1, 3, 4, 10]. За таких умов, рання лабораторна діагностика стає інструментом, за допомогою якого аграрні підприємства зможуть використовувати здоровий посадковий матеріал та своєчасно попередити поширення шкочинних фітопатогенів.

Існують мікробіологічний, серологічний і молекулярний наукові підходи та напрями в сучасній діагностиці бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур.

Мікробіологічні методи ґрунтуються на вивченні особливостей морфології та метаболізму бактерій, але він тривалий. [9].

Серологічним методом лабора-

Рецензенти: докт. с.-г.

наук **Ретьман С. В.** (ІЗР)

докт. біол. наук Драговоз І. В (ІМВ НАНУ)

торної діагностики можна визначити збудника інфекції томатів [6].

В середині 60-х років розроблено метод імуноферментного аналізу (ІФА), заснований на специфічному зв'язуванні антигену з антитілом. Водночас утворюється забарвлений продукт, кількість якого можна оцінювати спектрофотометрично [9]. ІФА є досить швидким і точним методом діагностики. Але висока вартість діагностичних наборів і потреба

бактеріальних хвороб рослин томата не розроблено, а причини ураження рослин оцінюють переважно за набором стандартних фенотипових властивостей, що потребує тривалого часу та залучення нових ознак для їх ідентифікації [11].

З огляду на це, метою наших досліджень було визначити можливість використання праймерів CMM5/CMM6, P1/P2 і RST2/RST3 для ідентифікації українських ізолятів різних

Метою наших досліджень було визначити можливість використання праймерів CMM5/CMM6, P1/P2 і RST2/RST3 для ідентифікації українських ізолятів різних за походженням штамів збудників бактеріального раку *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, бактеріальної крапчастості *P. syringae* pv. *tomato* та бактеріальної плямистості *X. vesicatoria*.

у використанні вивчених систем, які містять очищені антигени та високочутливі антитіла, обмежує їх використання [6, 8].

Методи молекулярної діагностики завдяки ряду переваг широко використовують в різних галузях сільськогосподарства, біотехнології та практичній діяльності [16].

Останнім часом все більшої популярності набуває ДНК-діагностика з використанням різних видів ПЛП: nested-ПЛП, PRIMIS-ПЛП, real-time ПЛП та мультиплексні ПЛП-тест-системи, що дають змогу ідентифікувати кілька збудників одночасно.

В Україні молекулярно-діагностичних методів для ідентифікації

за походженням штамів збудників бактеріального раку *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, бактеріальної крапчастості *P. syringae* pv. *tomato* та бактеріальної плямистості *X. vesicatoria*.

Об'єктами дослідження слугували штами збудників бактеріозів томата – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P-8, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P-12, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P-73, *P. syringae* pv. *tomato* 4213, *P. syringae* pv. *tomato* BB-9 і *P. syringae* pv. *tomato* 120, які отримано з Інституту пестицидів та захисту рослин, Сербія, *X. vesicatoria* 9098, *X. vesicatoria* 7862, *P. syringae* pv.

Таблиця 1

Характеристика використаних праймерів

Вид	Праймери	Послідовність	Мішень
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CMM-5/CMM-6 [14, 15, 16, 20, 22]	CMM-5: GCGAATAAGCCCATATCAA CMM-6: CGTCAGGAGGTCGCTAATA	<i>Pat-1</i> ділянка гена
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	P1/P2 [11, 20, 22]	P1: GGCGCTCCCTCGCACTT P2: GGTATTGGCGGGGGTGC	<i>Cfl</i> -ділянка гена
<i>X. vesicatoria</i>	RST2/RST3 [17, 20, 22]	RST2: AGGCCCTGGAAGGTGCCCTGGA RST3: ATCGCACTGCGTACCGCGCGCG	<i>hrpB</i> ділянка гена

Таблиця 2

Характеристика отриманих продуктів ампліфікації, п. н.

Збудники	Праймери		
	CMM-5/CMM-6	RST2/RST3	P1/P2
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> P-8	614	-	-
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> P-12	614	-	-
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> P-73	614	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 4213	-	-	650
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> BB-9	-	-	650
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 120	-	-	650
<i>X. vesicatoria</i> 9098	-	840	-
<i>X. vesicatoria</i> 7862	-	840	-

Примітки: п.н. – пар нуклеотидів, «-» – продукти ампліфікації відсутні.

syringae УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011 – колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (ІМВ НАНУ). (Висловлюємо подяку за допомогу у проведенні досліджень співробітникам відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАНУ ст.н.с., д.б.н. Пасічник Л. А. і доц., к.б.н. Буценко Л.М.)

Для виділення ДНК бактерії культивували на середовищі МПБ 20 год. за температури 28°C. Клітини осаджували центрифугуванням (6000 об/хв.). ДНК *P. syringae* pv. *tomato*, *X. vesicatoria*, *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atofaciens* виділяли



ПЛР аналіз бактеріальних ДНК різного походження з використанням праймерів CMM5/CMM6, P1/P2 та RST2/RST3

Праймери	Утворення та розмір продуктів ампліфікації, п.н.				
	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> P-8	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 120	<i>X. vesicatoria</i> 9098	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027	<i>P. syringae</i> pv. <i>atofaciens</i> УКМ В-1011
CMM5/CMM6	614	-	-	-	-
P1/P2	-	650	-	1200, 2000, 3000	-
RST2/RST3	-	-	840	1500	-

Примітки: п.н – пар нуклеотидів, «-» – продукти ампліфікації відсутні

за допомогою реактивів ДНК-сорб-Б («Ампли Сенс», ФГУН ЦНИИЭ, Роспотребнадзор, Россия) згідно з інструкцією. ДНК *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* отримували гідролізом клітин в 1н NaOH 7 хв за температури 100°C. Осад, одержаний шляхом центрифугування (11000 об./хв., 5 хв.), розчиняли в 100 мкл ТЕ-буфера [13].

Для діагностики бактеріального раку (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*), бактеріальної крапчастості (*P. syringae* pv. *tomato*) та бактеріальної плямистості (*X. vesicatoria*) нами використано специфічні праймери (табл.1).

ПЛР здійснювали на ампліфікаторі Gene Amp PCR System 2400 в об'ємі 25 мкл.

Продукти ПЛР аналізували в 1,7 % агарозному гелі, який містив бромистий етидій (0,5 мкг/мл). Електрофорез проводили 30 хв. за напруги 100 В. Розміри продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркерів молекулярної маси GeneRuler 100 bp DNA Ladder та GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті ампліфікації ДНК різних за походженням штамів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* одержані специфічні для кожного виду ДНК-фрагменти (табл. 2).

Розмір одержаних ампліконів узгоджується з результатами інших

авторів, які використовували специфічні праймери CMM5/CMM6, P1/P2 і RST2/RST3 й довели доцільність ідентифікації *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* та *X. vesicatoria* за наявності маркерних генів, *pat*, *cfI* і *hrpB*.

Описано варіанти послідовностей праймерів з метою ідентифікації бактерій роду *Xanthomonas*, але їх специфічність для визначення *X. vesicatoria* необхідно перевіряти, оскільки патоген має 9 рас, 3 з яких небезпечні для рослин томата [7]. Розміри ампліконів ДНК українських ізолятів збудника бактеріальної плямистості (табл.2) не відрізнялися від теоретично прогнозованих і описаних раніше. Це підтверджує можливість діагностики українських ізолятів *X. vesicatoria* тест-системою з праймерами RST2/RST3 (рис. 1 (А, Б, В)). Різні розміри амплікованих фрагментів дають змогу з легкістю розрізнити ДНК збудників у зразку. Перевагою використання описаних праймерів у мультиплексних тест-системах є те, що за відсутності ДНК-мішені (патогена в біоматеріалі) специфічний продукт ампліфікації з ДНК інших збудників бактеріальних хвороб томата не утворюється.

Праймери CMM5/CMM6, P1/P2 і RST2/RST3 можна використовувати в моноспецифічній тест-системі для виявлення *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria*, та в мультиплексно-му ПЛР аналізі біоматеріалу на при-

сутність трьох видів збудників одночасно. За таких умов ідентифікація можлива навіть за умов комплексного ураження томатів двома-трьома хворобами, що часто є причиною виникнення епіфітотій: первинна інфекція ослаблює рослину, а вторинна – зумовлює загибель [1, 3].

Використання мультиплексних тест-систем є трудомісткішим, оскільки потрібно передбачити можливість утворення гетеродуплексів між різними ампліконами та взаємодію між праймерами. Крім того, впровадження діагностики бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та бактеріальної плямистості вітчизняними аграрними підприємствами потребує додаткових досліджень специфічності праймерів.

Встановлено, що праймери CMM5/CMM6 не дають перехресної реакції з близькоспорідненим видом – збудником кільцевої гнилі картоплі *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* [1], а праймери P1/P2 та RST2/RST3 специфічні, як доводять інші дослідники.

Для розробки вітчизняних тест-систем перевіряли специфічність пропонованих праймерів за умов проведення ПЛР з ДНК українських ізолятів фітопатогенних бактерій. У нашій роботі, використано ДНК *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та ДНК *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011. Доведено, що праймери CMM5/CMM6 не мають зони комплементарності в ДНК обох видів, а P1/

P2 та RST2/RST3 не взаємодіють з ДНК *P. syringae* pv. *atropaciens* УКМ В-1011 (табл. 3).

Нами встановлено невідповідність між теоретично прогнозованими розмірами ампліконів і результатами ПЛР з ДНК українських ізолятів *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 (табл. 3): праймери Р1/Р2 (1200 п.н, 2000 п.н., 3000 п.н) та RST2/RST3 (1500 п.н). На-

явність такого розміру фрагментів ДНК в біопробі не впливала на виявлення ДНК *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria*, оскільки значно відрізняється від зазначених для описаних пар праймерів.

Таким чином, використання праймерів СММ5/СММ6, Р1/Р2 та RST2/RST3 уможливує ідентифікацію збудників бактеріальних хвороб то-

мата на території України. Водночас, розробка вітчизняних мультиплексних діагностичних систем для ідентифікації *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria* потребує подальших випробувань з метою встановлення їх чутливості, виключення можливості взаємодії праймерів між собою та появи гетеродуплексів.

Література

1. Аветисян Ю. Ф., Коломиец Ю. В. Возбудители бактериальных болезней томата в хозяйствах Днепропетровской области. // Глобализация науки: проблемы и перспективы: сборник статей Международной научно-практической конференции (7 февраля 2014 г.). – Уфа : РИЦ Баш ГУ, 2014. – Т. 3. – С. 186–189.

2. Ахатов А. К. Мир томата глазами фитопатолога. – М. : КМК, 2010. – 288 с.

3. Вітанов О. Д., Тимчук В. М., Сало О. С. Технологічне забезпечення вирощування томата. // Вісник ЦНЗ АПВ Харківської області. – 2011. - № 10. – С. 78–85.

4. Гвоздяк Р.І., Мороз С.М., Яковлева Л.М., Черненко Є.П. Гвоздяк Р.І. Етіологія масового захворювання томатів у господарствах України. // Мікробіол. журн. – 2009. – Т. 71, № 5. – С. 33–40.

5. Черненко Є. П. Бактеріальні хвороби томату і біологічне обґрунтування заходів обмеження їхнього розвитку : автореф. дис. на здобуття наук. ст. канд. біол. наук : спец. 06.01.11 «Фітопатологія». – К., 2009. – 18 с.

6. Burokiene D. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedling. // *Agronomy Research*. – 2006. – № 4. – P. 151–154.

7. Food and Agriculture Organization of United Nations, Agriculture data (FAO), 2005 <http://faostat.fao.org/>

8. Hadas R., Kritzman G., Klietman F. [et al.] Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds // *Plant Pathology*. – 2005. – № 54. – P. 643–649.

9. Milijasevic S., Balaz J. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, bacterial canker of tomato: Conventional and molecular identification. // *Pesticides and Phytomedicine*. – 2006. – № 2. – P. 185 – 192.

10. Ozdemir Z. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures. // *Plant Pathology*. – 2009. – № 91. – P. 495–497.

11. Schaad N. W., Frederick D. R. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics // *Plant Pathol.* – 2002. – № 24. – P. 250–258.

12. Palacio-Bielsa A. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria updated review of protocols (1989-2007). // *Journal of Plant Pathology*. – 2009. – № 91. – P. 249–297.

