

первого приема рубки, либо не изменилась (равномерно-постепенные рубки), либо несколько возросла (полосно-постепенные рубки).

Существенных различий по показателям ожидаемой ( $H_e$ ) и наблюдаемой ( $H_o$ ) гетерозиготности в древостоях сосны обыкновенной до и после проведения первого приема полосно-постепенных рубок выявлено не было. При проведении равномерно-постепенной рубки происходит снижение показателя  $H_o$  на 0,8%, но в то же время возрастает величина  $H_e$  на 1,1%. Это свидетельствует о том, что избирательное изъятие деревьев в древостоях сосны обыкновенной при проведении равномерно-постепенных рубок в большей степени оказывает влияние на величину параметра средней гетерозиготности.

Подводя итог результатам анализа генетической изменчивости, генетической структуры и подразделенности насаждений сосны обыкновенной до и после проведения первого приема постепенных рубок, следует отметить, что наиболее оптимальными для сохранения генофонда и генетической структуры исходных древостоев являются полосно-постепенные рубки главного пользования, так как при их проведении не происходит снижения генетического разнообразия и изменения генетической структуры. Кроме того, по утверждению некоторых исследователей и практиков, полосно-постепенные рубки имеют упрощенную технологию лесосечных работ, на 15–20% повышают производительность труда, упрощают проведение содействия естественному возобновлению и в меньшей степени повреждают подрост на последнем этапе рубки, по сравнению с равномерно-постепенными рубками.

**Иващенко Л.О.<sup>1,2</sup>, Пантелеев С.В.<sup>2</sup>, Баранов О.Ю.<sup>1,3</sup>**

### **РАЗРАБОТКА ДИЗАЙНА ПРАЙМЕРОВ НА ОСНОВЕ 16S рРНК ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ПОРОД БЕЛАРУСИ**

<sup>1</sup> УО «Белорусский государственный технологический университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь, lyba281997@mail.ru,

<sup>2</sup> ГНУ «Институт леса Национальной академии наук Беларуси»,  
г. Гомель, Республика Беларусь, stasikdesu@mail.ru,

<sup>3</sup> Национальная академия наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь, betula-belarus@mail.ru

*In the course of the study, oligonucleotide primers were developed for the diagnosis and identification of phytopathogenic bacteria from 12 genera associated with infectious diseases of forest-forming species in Belarus. In silico studies have been conducted to study the effectiveness of the designed primers using the Primer Blast module. The results showed that the developed pairs of oligonucleotides were suitable for the detection of phyto-bacteria in plant samples, while cross-amplification with plant DNA was not observed.*

В настоящее время повышенное внимание ученых и практиков во всем мире уделяется проблеме широкого распространения болезней лесных древесных растений бактериальной этиологии. Так, в мире описано несколько сотен бактериозов с различной симптоматикой и степенью вредоносности на лесных древесных растениях. Их вызывают бактерии из родов *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Brenneria*, *Xanthomonas*, *Xylella*. При этом, видовой состав бактериальных структур и их количественное соотношение постоянно меняются. Бактериальные инфекции в равной степени поражают лесные древесные растения в естественных

насаждениях, лесных культурах, лесозащитных полосах, а также в городских, парковых и лесопарковых насаждениях. Все это обусловило возникновение острой необходимости в ранней диагностике и видовой идентификации бактериальных патогенов древесных растений с целью своевременного проведения лесозащитных и санитарно-профилактических мероприятий [1].

В настоящее время молекулярно-генетическая идентификация бактериальных видов в основном проводится на основании анализа результатов секвенирования генов первичного метаболизма, которые диагностированы у всех известных таксономических групп микроорганизмов. Среди наиболее используемых ДНК-маркеров можно выделить фрагменты генов кодирующих 16S рРНК, 23S рРНК,  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы (RPOB),  $\beta$ -субъединицу ДНК-гиразы (GYRB), белок-шаперон GROEL, репарационный белок RECA, а также межгенный спейсер 16S-23S рРНК [2]. При этом, в протоколах анализа, как правило, применяются универсальные олигонуклеотидные последовательности, комплементарные консервативным регионам, фланкирующим маркерные локусы. Альтернативным направлением является использование специфичных праймеров и зондов, позволяющих диагностировать определенные таксономические группы патогенных микроорганизмов.

Использование праймеров на основе высококонсервативного (на видовом уровне) гена 16S рРНК является самым распространенным методом диагностики и позволяет идентифицировать широкий спектр бактериальных патогенов, находящихся в образце. Однако, степень комплементарности универсальных праймеров 16S рРНК может быть неодинаковой для разных видов бактерий, что приводит к невозможности диагностики некоторых таксонов, а относительное сходство между видами длин регионов данного гена обуславливает низкую разрешающую способность при дифференциации близкородственных таксонов методами электрофоретического анализа. Еще одним недостатком использования существующих универсальных праймеров при работе с инфицированными растительными тканями является кросс-амплификация гомологичных регионов хпДНК и мтДНК растений.

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы явилась разработка дизайна праймеров (на основе гена 16S рРНК) для диагностики и видовой идентификации бактериальных патогенов лесообразующих пород Беларуси в инфицированных растительных тканях с исключением кросс-амплификации с растительной ДНК.

В ходе работы, на основании анализа особенностей структуры нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК мтДНК и хпДНК растений нами был разработан дизайн олигонуклеотидных праймеров, позволяющий избирательно диагностировать генетический материал фито-патогенных бактерий в инфицированных тканях хвойных (сосна обыкновенная и ель европейская) и лиственных (дуб черешчатый, береза повислая, ольха черная, ясень обыкновенный, осина) видов древесных растений: *cpF* – AGATACCCTGGTAGTCCAC и *cpR* – ATTACTAGCGATTCCRRCTT (размер амплифицируемого фрагмента  $\approx$  560 п.н.), применительно к препаратам нуклеиновых кислот, содержащих хпДНК растений; *mtF* – TGARATGTTGGGTAAAGTCCCG и *mtR* – TACAAGGCCCGGAACG (размер амплифицируемого фрагмента  $\approx$  320 п.н.), применительно к препаратам нуклеиновых кислот, содержащих мтДНК растений, *16S-BacSpF* – GAGTTTGATCATGGCTCAGAKT и *16S-BacSpR* – GTGGCTGRTCATCCTCTCA (размер амплифицируемого фрагмента  $\approx$  306 п.н.), применительно к препаратам нуклеиновых кислот, содержащих хпДНК и мтДНК растений.

— Detailed primer reports

**Primer pair 1**

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	TGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG	23	65.75	56.52	8.00
Reverse primer	TACAAGGCCCGGAACG	17	58.93	64.71	6.00

**Products on target templates**

>CP125300.1 **Pseudomonas syringae pv. syringae** strain B48 chromosome, complete genome

product length = 80

Forward primer 1 TGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG 23  
 Template 946820 ..... 946842

Reverse primer 1 TACAAGGCCCGGAACG 17  
 Template 946899 ..... 946883

>OP9901 **Brenneria sp. strain MBWS3.1** 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 80

Forward primer 1 TGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG 23  
 Template 973 .....C.A..... 995

Reverse primer 1 TACAAGGCCCGGAACG 17  
 Template 1052 ..... 1036

>CP10185 **Xanthomonas oryzae pv. oryzae** strain YNCX plasmid pYNCX4, complete sequence

product length = 80

Forward primer 1 TGCAACTCGACTGCGTGAAGTCG 23  
 Template 3878 .....C..... 3856

Reverse primer 1 TACAAGGCCCGGAACG 17  
 Template 3799 ..... 3815

Рисунок – Результаты тестирования пары праймеров mtF и mtR в NCBI Primer Blast

Функциональность разработанных праймеров была протестирована *in silico* при помощи модуля Primer Blast в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI GenBank [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Полученные результаты показали, что пары праймеров являются специфичными по отношению к гену 16S рРНК представителей родов *Bacillus*, *Brenneria*, *Erwinia*, *Gibsiella*, *Lelliota*, *Lonsdalea*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Xylella*. На рисунке представлены результаты для пары олигонуклеотидов mtF и mtR.

Как видно из рисунка, праймеры являются специфичными для представителей упомянутых выше родов и не позволяют амплифицировать гомологичные локусы у растений, что делает возможным их использование для идентификации бактерий в образцах пораженных тканей древесных растений. Аналогичные результаты были получены при тестировании пар праймеров cpF и cpR, 16S-BacSpF и 16S-BacSpR.

Таким образом, разработанные праймеры на основе генов 16S рРНК мтДНК и хлДНК растений можно использовать в качестве инструмента для диагностики в растительных тканях генетического материала фитопатогенных видов бактерий из родов *Bacillus*, *Brenneria*, *Erwinia*, *Gibsiella*, *Lelliota*, *Lonsdalea*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Xylella*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Goychuk A. et al. Bacterial Diseases of Bioenergy Woody Plants in Ukraine // Sustainability. – 2023. – Vol. 15 (5). – P. 4189.
2. James G. Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene // PCR for clinical microbiology: an Australian and international perspective. – 2010. – P. 209–214.