

УДК 577.212:632.4

Л.О. Иващенко, асп., мл. науч. сотр. (БГТУ, г. Минск,
Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель);

О.Ю. Баранов, академик-секретарь, д-р биол. наук
отделения биологических наук (НАН Беларуси, г. Минск);

С.В. Пантелеев, зав. лабораторией, канд. биол. наук
(Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель);

П.В. Кирьянов, мл. науч. сотр. (Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель)

ПЦР-ДИАГНОСТИКА INA-МАРКЕРА В ПАТОСИСТЕМЕ *FUSARIUM SPP.–PINUS SYLVESTRIS L.*

Все растения по устойчивости к низким температурам можно разделить на две большие группы: холодостойкие – теплолюбивые растения и растения умеренной зоны, способные выживать в условиях низких положительных температур; морозоустойчивые – растения, способные переносить температуру ниже 0 °С, т.е. способны выживать при заморозках. Когда температура падает до точки замерзания, из жидкой воды в растительных клетках образуются кристаллы льда, и в результате расширения ткани растения разрываются, делая их более восприимчивыми к проникновению различных патогенных организмов [1].

Было доказано, что в процессах образования льда на поверхности и внутри клеток растений участвуют льдонуклеирующие, или INA-бактерии, представляющие собой группу бактерий, способных катализировать образование льда при низкоположительных температурах [2]. Эту способность они приобрели благодаря наличию активного гена льдонуклеации (*ina*), который кодирует белок зародышеобразования льда [3]. Образующиеся внутри или на поверхности растений, чувствительных к морозу, кристаллы льда быстро распространяются как межклеточно, так и внутриклеточно, вызывая механическое разрушение клеточных мембран. Такие разрушения обычно приводят к увяданию и повышают риск проникновения патогенных организмов внутрь растения [4]. На сегодняшний день идентифицировано около десятка видов INA-бактерий, выделенных преимущественно с поверхности растений. Они распространены среди трех отрядов гамма-протеобактерий и включают такие виды как *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens*, *Pantoea agglomerans* и *Xanthomonas campestris* [5].

Целью данной работы являлась выявление генетического материала INA-бактерий в образцах инфицированных растительных тканей семян сосны обыкновенной, характеризующихся признаками инфекционного полегания, путем проведения ПЦР-амплификации гена *ina*. В рамках проведенных исследований нами был произведен по-

сев семян сосны обыкновенной в почву, собранную на лесных питомниках Чечерского и Дисненского лесхозов в местах протекания инфекционного полегания сеянцев в мае–июне 2023 г. Семена проращивались в контролируемых условиях при температуре 22 °С и относительной влажности воздуха 60%. После прорастания семян с целью инициации появления симптомов инфекционного полегания сеянцев сосны обыкновенной нами были искусственно созданы условия околоулевых температур – проростки сосны обыкновенной несколько дней хранились в холодильнике при температуре 4 °С. После появления симптомов полегания (истончение и побурение стебелька, у большинства сеянцев верхинки остались в семенных колпачках из-за ослабления тургора в растениях), сеянцы изымали из почвы для дальнейшей экстракции ДНК.

С целью выявления последовательности гена *ina* полученные препараты суммарной ДНК амплифицировали с использованием пары праймеров 3308f/3463r [6] при следующих условиях ПЦР: начальная стадия денатурации при 95 °С в течение 4 мин с последующими 35 циклами – денатурация при 94 °С 30 с, отжиг праймеров 58 °С 30 с и элонгация при 72 °С 1 мин с финальной элонгацией при температуре 72 °С в течение 5 мин. При этом размер получаемых продуктов амплификации должен соответствовать значению 194 п.н. [6].

Положительный контрольный образец был представлен INA+ штамм *P. syringae*, отрицательный контроль – амплифицируемой смесью с деионизированной водой. Также для наглядности получаемых данных дополнительно были амплифицированы образцы сеянцев сосны, характеризующиеся признаками инфекционного полегания, собранные в июне 2023 г. Результаты ПЦР-анализа представлены на рис.

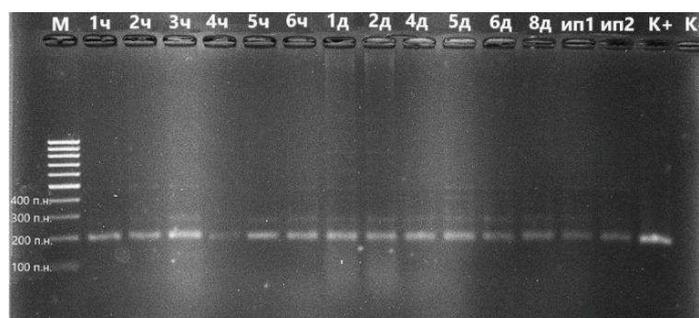


Рисунок – Результаты амплифицирования проростков сосны, характеризующихся симптомами инфекционного полегания: М – маркер молекулярного веса; 1ч–6ч – образцы проростков сосны на почве из Чечерского лесхоза; 1д–2д, 4д–6д, 8д – образцы проростков сосны на почве из Дисненского лесхоза; ип1, ип2 – образцы инфекционного полегания из Хойникского лесхоза; K+ – положительный контроль (бактерия *P. syringae*); K– – отрицательный контроль

Исходя из рис. 1 видно, что во всех образцах, за исключением образца № 4ч, наблюдается наличие специфических продуктов ПЦР-амплификации размером примерно 200 п. н. — это свидетельствует о наличии бактерий с геном *ina* в экспериментальном материале.

Таким образом, в результате проведенных тестов *in vitro* по выявлению INA-бактерий в образцах сосны обыкновенной, характеризующихся признаками инфекционного полегания в 11 из 12 экспериментальных проб, нами был выявлен генетический материал бактерий, обладающих льдонуклеирующей способностью.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что на начальной стадии протекания инфекционного полегания в ослаблении молодых растений сосны могут принимать участие INA-бактерии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nejad P. et al. Biochemical characterization and identification of ice-nucleation-active (INA) willow pathogens by means of BIOLOG® MicroPlate, INA gene primers and PCR-based 16S rRNA-gene analyses/ Biochemische Charakterisierung und Identifizierung Eiskristalle bildender (INA) Weidenpathogene mittels BIOLOG® MicroPlate, INA-Gen-Primern und PCR-basierter 16S rRNA-Analysen // Journal of Plant Diseases and Protection. — 2006. — P. 97–106.

2. Waturangi D. E., Tjhen A. Isolation, characterization, and genetic diversity of ice nucleation active bacteria on various plants // HAYATI Journal of Biosciences. — 2009. — Vol. 16 (2). — P. 54–58.

3. Oktiningtyas L. Y., Susilowati A., Setyaningsih R. Molecular identification of ice nucleation active (INA) bacteria causes of frost injury on potatoes crops (*Solanum tuberosum* L) in Wonosobo, Dieng plateau // AIP Conference Proceedings. — 2018. — Vol. 2014 (1). — 7 p.

4. Lindow S. E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants // Annual review of phytopathology. — 1983. — Vol. 21 (1). — P. 363–384.

5. Hill T. C. J. et al. Measurement of ice nucleation-active bacteria on plants and in precipitation by quantitative PCR // Applied and environmental microbiology. — 2014. — Vol. 80 (4). — P. 1256–1267.

6. Nejad P., Ramstedt M. Presence of quorum-sensing-mediated gene regulation in pathogenic ice-nucleation-active (INA) bacteria // World Journal of Microbiology and Biotechnology. — 2006. — Vol. 22. — P. 1373–1375.