

Разработка тест-системы для идентификации бактерий рода *Paenibacillus* методом мультиплексной ПЦР

Научный руководитель – Зайцева Юлия Владимировна

Филлипова М.М.¹, Бычкова А.А.², Злобин И.В.³

1 - Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия, *E-mail: milanee.nee@yandex.ru*; 2 - Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия, *E-mail: anasanby98@mail.ru*; 3 - Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия, *E-mail: ily.zlobin21@yandex.ru*

В последние годы появляется больше сведений о том, что бактерии рода *Paenibacillus* могут являться возбудителями бактериозов сельскохозяйственных и декоративных растений, а также вызывать порчу урожая при хранении. Ранняя идентификация данных микроорганизмов в посадочном материале и грунте позволит принять своевременные профилактические меры и предотвратить распространение инфекции. В настоящее время бактерии рода *Paenibacillus* в анализируемом материале выявляются в основном микробиологическими методами, которые не дают информации о патогенности бактерий. В условиях производства наиболее целесообразно применение молекулярных методов диагностики, в том числе, на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). На сегодняшний момент на рынке отсутствуют тест-системы ПЦР для обнаружения *Paenibacillus* в растительном материале.

Целью настоящего исследования была разработка и апробация специфической тест-системы для детекции пектолитических бактерий рода *Paenibacillus* на основе мультиплексной ПЦР.

Штаммы бактерий рода *Paenibacillus* были выделены из листьев и корней 2-3 летних растений *Phalaenopsis* Blume (Orchidaceae) с признаками бактериальной инфекции. Выделенные штаммы оценивали на наличие пектолитической и целлюлазной активностей. Отобранные пектолитические штаммы были оценены на фитотоксичность на растениях фаленопсиса в условиях *in planta*. Для наиболее фитотоксичного штамма *Paenibacillus hunanensis* PL23 было проведено секвенирование генома и поиск генетических детерминант патогенности. В геноме данного штамма выявлены гены пектиназы (пектатлиаза и рамногалактуронанлиаза) и целлюлазы (эндоглюконаза Б), которые были выбраны в качестве биомаркеров для разработки диагностической тест-системы на основе мультиплексной ПЦР. Праймеры подбирались с помощью ПО GeneRapper, условия реакции подбирались эмпирически с использованием градиентной ПЦР.

Оценка специфичности разработанных праймеров проводилась на 10 пектолитических штаммах рода *Paenibacillus* и 10 пектолитических бактерий следующих родов: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Microbacterium*, *Paracidovorax*, *Paracoccus*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacillus*. Чувствительность оценивали для штамма *P. hunanensis* PL23 по стандартной методике в диапазоне 4-0,0000004 нг/мкл. Апробация тест-системы проводилась на горшечных растениях рода *Phalaenopsis*, инокулированных суспензией штамма *P. hunanensis* PL23.

Результаты исследования показали, что разработанная тест-система для идентификации бактерий рода *Paenibacillus* является высокоспецифичной и высокочувствительной. Она пригодна для идентификации заявленной группы пектолитических пенибацилл в растительном материале и может быть в дальнейшем апробирована в условиях коммерческого производства орхидей.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-16-20136.