

Разработка прототипа тест-системы для выявления бактерий *Dickeya* spp. (возбудителя черной ножки)

Выполнил:
Бурцев Богдан Семенович

Научные руководители:
Попова Александра Семеновна
Кутукова Анастасия Сергеевна

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших причин потерь урожая по всему миру являются различного рода инфекционные заболевания, некоторые из которых сложно выявлять и лечить из-за их природы. К таким заболеваниям относится «черная ножка» пасленовых, вызываемая грамотрицательной бактерией *Dickeya* spp., распространенной по всему миру. Это заболевание поражает сельскохозяйственные растения семейства Solanaceae, к которым относятся такие культуры как картофель, томаты, перец и баклажаны. В борьбе с таким заболеванием могут помочь тест-системы для их выявления на ранних стадиях заражения, как ключевой компонент системы защиты растений.

ЦЕЛЬ

Создать прототип тест-системы для выявления *Dickeya* spp. в сельскохозяйственных растениях семейства Solanaceae, с наименьшими затратами времени и точностью диагностики, с использованием генетических методов.

АКТУАЛЬНОСТЬ

- Повсеместная распространённость патогена, вызывающая заболевание «черная ножка»;
- Экономическая важность представителей семейства Solanaceae;
- Потери урожая могут составлять до 45%;
- Экономические потери, вызванные заражением растений;
- Простота ПЦР-анализа для диагностики скрытых заболеваний;
- Точность и скорость обнаружения тест-системы ПЦР.

ЗАДАЧИ

1. Ознакомиться с технологией ПЦР тест-системы;
2. Создать теоретическую модель прототипа тест-системы;
3. Протестировать теоретическую модель тест-системы в лабораторных условиях.

Ключевые слова: *DICKEYA* spp., семейство *SOLANACEAE*, ПЦР, ПРАЙМЕРЫ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, *IN SILICO*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ



МАТЕРИАЛ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ

Материалом для выделения бактериальной ДНК послужили клубни картофеля, имевшие явные признаки бактериальных инфекций

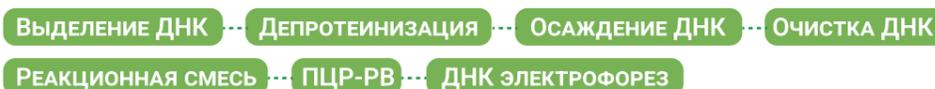
ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ

Данные о геномных последовательностях и аннотациях были получены из базы данных NCBI GenBank. Специфический ген найден в PubMed – NCBI (ген – *mgIA*); праймеры разработаны с помощью Primer designing tool – NCBI; праймеры проверены на OligoAnalyzer – Integrated DNA Technologies. Из полученных праймеров были отобраны три пары, которые были наиболее близки к стандартным критериям для праймеров. Последовательности нуклеотидов для праймеров синтезированы компанией Евроген (Москва, Россия) по нашему заказу.

ВАЛИДАЦИЯ

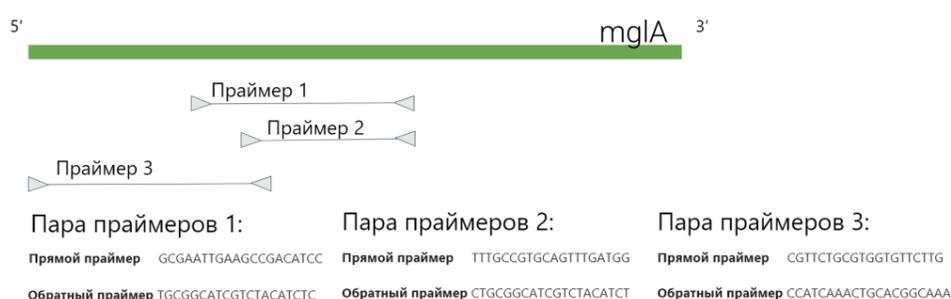
Для сравнения нами был использован коммерчески доступный набор для диагностики и выявления черной ножки «*Dickeya* spp.-PB» («Синтол», Россия, кат № PH-012)

ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТИРОВАНИЯ

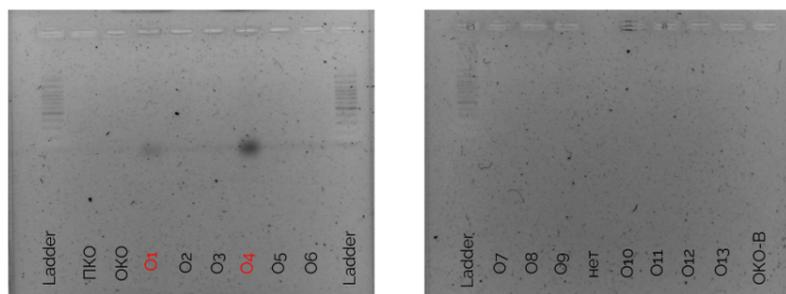


РЕЗУЛЬТАТЫ

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ *IN SILICO* ДЛЯ *DICKEYA* spp.



ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ



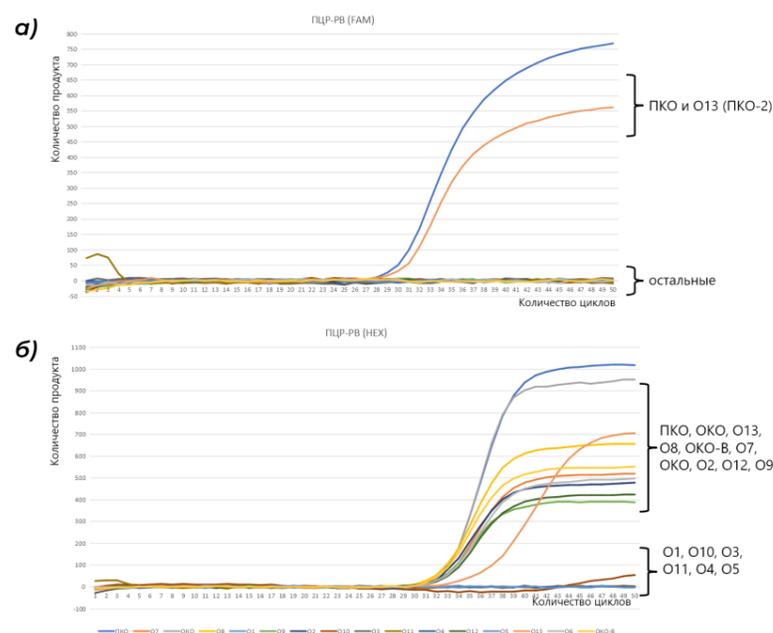
*ON – образец N; ПКО – положительный контроль образцов; ОКО – отрицательный контроль образцов; ОКО-В – внутренний отрицательный контроль образцов.

Электрофорез после ПЦР с парами праймеров для *Dickeya* spp.: у образцов 1 и 4 обнаружен генетический материал *Dickeya* spp.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучен метод ПЦР и способы создания прототипа тест-системы на его основе.
2. Создана теоретическая модель тест-системы
3. Теоретическая модель была протестирована
4. Прототип тест-системы требует дальнейшей работы.

ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ



Результаты ПЦР в реальном времени для *Dickeya* spp.: а) по каналу флуоресценции FAM/Green; б) по каналу флуоресценции HEX/Yellow.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Евроген: <https://evrogen.ru/>
2. Boluk G, Dobhal S, Crockford AB, Melzer M, Alvarez AM, Arif M. Genome-Informed Recombinase Polymerase Amplification Assay Coupled with a Lateral Flow Device for In-Field Detection of *Dickeya* Species. *Plant Dis.* 2020 Aug;104(8):2217-2224. doi: 10.1094/PDIS-09-19-1988-RE. Epub 2020 Jun 12. PMID: 32530731.
3. Czajkowski R, Grabe G.J. & van der Wolf, J.M. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Eur J Plant Pathol* 125, 263–275 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9480-9>
4. Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 1991 Mar 25;19(6):1349. doi: 10.1093/nar/19.6.1349. PMID: 2030957; PMCID: PMC333874.
5. NCBI GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
6. OligoAnalyzer – Integrated DNA Technologies: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
7. Primer designing tool – NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
8. PubMed – NCBI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
9. Standard Nucleotide BLAST: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch