

УДК 632.35:634.1

**РЕР-ПЛР АНАЛІЗ ОКРЕМИХ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ ОГІРКІВ**

Л. А. ДАНКЕВИЧ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154  
e-mail: ldankevich@ukr.net

**Мета.** З метою коректної видової ідентифікації та оцінки гетерогенності популяції було проведено фінгепринтування геномів, ізольованих нами *Pectobacterium* sp., колекційних штамів «*Erwinia toxica*» і типових представників окремих видів родів *Pectobacterium* і *Dickeya*. **Методи.** В ході досліджень було використано мікробіологічні, молекулярно-генетичні (РЕР-ПЛР), математично-статистичні методи досліджень. **Результати.** Встановлено значну спорідненість ізольованих *Pectobacterium* sp. та колекційних штамів «*Erwinia toxica*» із типовим штамом *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075Т за BOX, REP та ERIC профілями. Оцінена генетична гетерогенність ізольованих *Pectobacterium* sp. та колекційних «*Erwinia toxica*» штамів. **Висновки.** Виявлена значна спорідненість за BOX, REP та ERIC профілями ізольованих *Pectobacterium* sp. та колекційних «*Erwinia toxica*» штамів із з типовим штамом *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075Т найбільш вірогідно, свідчить про їх належність до даного виду. Показана генетична однорідність ізольованих штамів *Pectobacterium* sp. та гетерогенність колекційних штамів «*Erwinia toxica*», що, напевно, обумовлено відбором рослин із однієї або різних кліматично-географічних зон.

**Ключові слова:** ідентифікація, генетична гетерогенність, РЕР-ПЛР, «*Erwinia toxica*», *Pectobacterium* sp.

**Вступ.** Відомо, що останнім часом овочівництво набуває все більшої популярності за рентабельністю вирощування у виробників аграрної продукції. Це, певною мірою, обумовлюється можливістю вирощування даних культур як в умовах закритого, так і відкритого ґрунту. Але фітопатологи констатують, що умови, які створюються в закритому ґрунті при вирощуванні овочевих рослин, а саме — тривале використання ґрунту, обмежений набір культур, штучний мікроклімат сприяють масовому розвитку хвороб [1, 2, 3]. Останній чинник значно впливає на їх врожайність. Крім того, інтенсивне пестицидне навантаження, відсутність коректної сівозміни та використання обмеженої кількості сортів призводить як до спалаху епіфітотій, так і до перерозподілу видового складу збудників різної етіології та появи нових фітопатогенів [4]. В Україні традиційно однією з найбільш популярних овочевих культур закритого ґрунту є огірки. Але одним із головних факторів, що перешкоджають ефективному вирощуванню даної культури як в умовах закритого, так і відкритого ґрунту є незадовільний моніторинг та обмежене застосування ефективних методів попередження та запобігання розповсюдженню збудників найбільш шкочинних захворювань, зокрема і бактеріальних [3, 4]. Як відомо, основними збудниками бактеріальних хвороб огірок є: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* — мокра гниль та в'янення, *Pectobacterium carotovorum* susp. *carotovorum* — м'яка гниль плодів, *Erwinia tracheiphila* — бактеріальне в'янення, *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* — бактеріальна плямистість листа [4]. На початку 70-х років минулого століття українськими дослідниками вперше в світі виділено в чисту культуру і охарактеризовано за низкою ознак фенотипу новий вид «*Erwinia toxica*» — збудника судинного бактеріозу огірок, переважно, у закритому ґрунті [3]. Та, не зважаючи на детальне вивчення фенотипових властивостей, значну шкочинність і подібність окремих симптомів до деяких видів роду *Erwinia* та *Pectobacterium*, таксономічний статус даного збудника до сих пір є невизначеним [5].

Слід також відмітити, що ураження ряду овочевих рослин за типом м'якого гниття або чорної ніжки, окрім *Pectobacterium carotovorum*, також можуть спричиняти і *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium wasabiae*, *Pectobacterium atrosepticum*, декілька флуоресцентних видів бактерій роду *Pseudomonas* тощо [6, 7, 8, 9, 10]. Відомо, що ключовим аспектом боротьби із будь-яким збудником є його вчасна та коректна діагностика та ідентифікація [9].

Зазвичай, при ідентифікації фітопатогенних бактерій використовують поліфазний підхід, що передбачає характеристику як фенотипових так і генотипових властивостей [9, 11]. Як правило, при аналізі генетичних ознак фітопатогенних бактерій використовують молекулярно-генетичні методи, що дозволяють не тільки коректно ідентифікувати збудника, а оцінити гетерогенність його популяції [12, 13, 14]. До групи таких методів належать так звані методи «фінгепринтування геному», зокрема: REP-ПЛР (Repetitive element PCR fingerprinting), RAPD-ПЛР (Random amplification of polymorphic DNA), AFLP-ПЛР (Amplified fragment length polymorphism). На думку багатьох дослідників, ключові переваги REP-ПЛР аналізу порівняно з аналогічними методами наступні: використання універсальних праймерів, що обмежують у прокаріотичному геномі три класи коротких послідовностей, які повторюються — REP (repetitive extragenic palindromic), ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), BOX (repetitive BOX sequences); можливість отримання в результаті аналізу трьох незалежних REP, BOX та ERIC профілів. Недоліками даного методу є: необхідність одночасного використання типових і патотипових штамів з досліджуваними штамми для коректної їх ідентифікації; висока чутливість даного методу, що може призвести до хибно позитивних та хибно негативних результатів [13, 15, 16].

Протягом зимово-весняного періоду декількох років нами було проведено моніторинг насаджень огірків у закритому ґрунті в одному із найбільших тепличних господарств Київської області. В ході фітопатологічного аналізу було діагностовано ураження рослин, що характеризувалося поступовим хлорозом з подальшим в'яненням рослин та гниттям плодів. З уражених рослин та плодів було виділено близько 50 ізолятів з яких за ключовими фенотиповими властивостями у подальші дослідження відібрано 5 найбільш агресивних штамів. За результатами аналізу комплексу ознак фенотипу та гомології нуклеотидної послідовності гену 16рРНК як ізольовані нами

штами *Pectobacterium* sp. так і колекційні «*Erwinia toxica*» виявили значну спорідненість з типовими представниками роду *Pectobacterium* зокрема і з близькоспорідненими з *Pectobacterium carotovorum* видами (не опубліковані дані). Саме тому, метою наших досліджень було фінгепринтування геному, за допомогою REP-ПЛР, ізольованих нами *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» штамів і типових представників окремих видів родів *Pectobacterium* і *Dickeya* для коректної таксономії перших на рівні виду.

### Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були ізольовані нами з уражених тканин огірків штамми фітопатогенних бактерій *Pectobacterium* sp. 1ог, 2ог, 3ог, 4ог, 5ог та колекційні штамми «*Erwinia toxica*» 8692, 8693, 8694, 8695, 8415, 8416, 8417, 8418, 8419. Для порівняльного аналізу у дослідженнях також використовували наступні типові штамми пектолітичних бактерій: *Pectobacterium carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В-1075<sup>T</sup> (International collection of microorganisms from plant (ICMP) 5702, National collection of Plant Pathogenic bacteria (NCPBB) 312, American type culture collection (ATCC) 15713), *Pectobacterium atrosepticum* УКМ В-1084<sup>T</sup> (International collection of microorganisms from plant (ICMP) 1526, National collection of Plant Pathogenic bacteria (NCPBB) 549, American type culture collection (ATCC) 33260), *Dickeya chrysanthemi* УКМ В-1087<sup>T</sup> (International collection of microorganisms from plant (ICMP) 5703, National collection of Plant Pathogenic bacteria (NCPBB) 402, American type culture collection (ATCC) 11663).

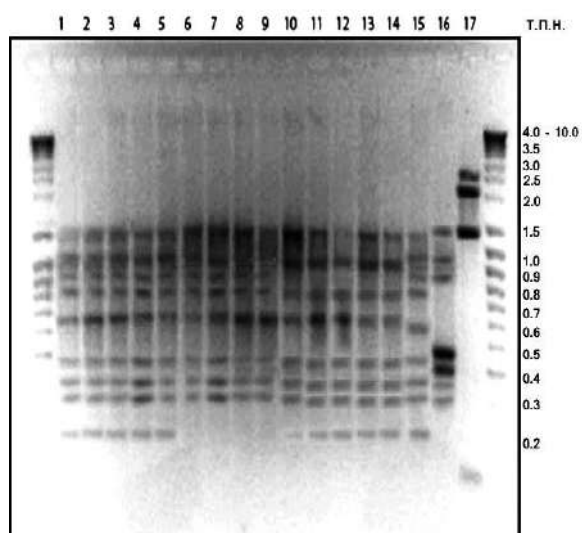
Виділення та очищення геномної ДНК досліджуваних штамів проводили із використанням набору реактивів «ДНК-сорб-В» згідно рекомендації виробника. Концентрацію ДНК визначали спектрофотометрично за допомогою спектрофотометру BioPhotometr фірми Eppendorf. Для проведення ПЛР використали наступні універсальні праймери: REP 1R -5'-IIIICGICGICATCIGGC-3', REP 21 -5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'; ERIC 1R -5'-ATGTAAGCTCCTGGATTAC-3', ERIC 2 -5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3; BOX A1R -5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'. Реакційна суміш (об'єм 20 мкл) для проведення ПЛР містила: TrisHCl — 50 мМ, KCl — 50 мМ, MgCl<sub>2</sub> — 2,5 мМ, Tween 20 — 0,1 %, dNTP — 200 мМ кожного, праймери — 100 нМ кожного, Таq-ДНК полімераза — 1U, геномна ДНК — 3 мкл (загальна кількість — 50–150 нг ДНК). Реакція проводилася

у пробірці об'ємом 0,5 мл, реакційна суміш знаходилась під захисним шаром мінеральної олії. Умови проведення ампліфікування були наступними: початкова денатурація ДНК — 94 °С/5 хв і основна денатурація ДНК — 94 °С/1 хв (однакова для всіх видів ПЛР); відпалювання — 44 °С/1 хв (REP-ПЛР з REP праймерами), 52 °С/1 хв (REP-ПЛР з ERIC праймерами) та 52 °С/1,5 хв. (REP-ПЛР з BOX праймерами); елонгація — 72 °С/2 хв (REP-ПЛР з BOX праймерами) та 72 °С/4 хв (REP-ПЛР з REP та ERIC праймерами); заключний синтез — 72 °С/10 хв (однакова для всіх видів REP-ПЛР). Кількість циклів ПЛР — 35. Ампліфікування проводили з використанням термоциклера «Терцик» фірми ДНК-Технологія. Продукти реакції розподіляли електрофоретично з використанням камери для горизонтального електрофорезу SE-1 фірми Хеликон ООО у 1,5 % агарозному гелі, ТБЕ буфері протягом 4 годин за напруженості електричного поля 1,5 В/см. Електрофоретичний розподіл продуктів реакції візуалізували за допомогою УФ-транслюмінатора UVSTRA WLI 312 NM фірми Biometra. Для визначення розмірів ДНК фрагментів використовували маркер молекулярної маси MassRulerDNA Ladder Mix SM040 фірми ThermoFisher Scientific. Спорідненість одержаних REP, ERIC та BOX профілів порівнювали візуально та аналізували за допомо-

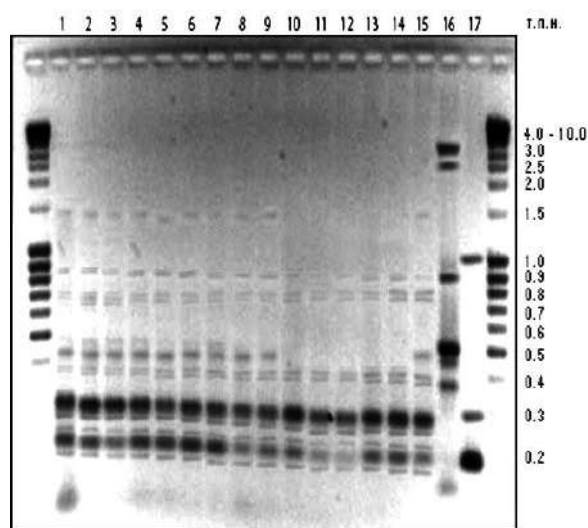
гою комп'ютерної програми DENDRO UPGMA (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>). Дана програма базується на використанні UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) методу, що дозволяє створювати дерева які графічно відображають матриці подібності (Similarity matrix) та відстаней (Distance matrix) розраховані на основі коефіцієнту Жакарда.

### Результати та їх обговорення

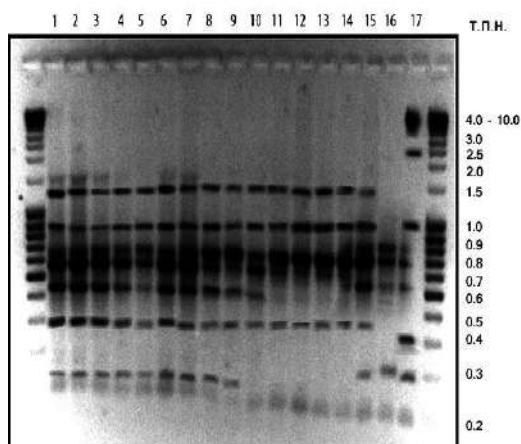
В результаті проведених досліджень отримано BOX, REP та ERIC профілі ізолюваних нами *Pectobacterium* sp. і колекційних «*Erwinia toxica*» штамів а також типових штамів *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>Т</sup>, *P. atrosepticum* УКМ В-1084<sup>Т</sup>, *D. chrysanthemi* УКМ В-1087<sup>Т</sup>. Зокрема у BOX профілях (рис. 1а) ізолюваних *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» штамів та типового штаму *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>Т</sup> виявлено 8 спільних ДНК фрагментів молекулярною вагою близько 250, 300, 370, 450, 600, 800, 1500 н. п. Слід відмітити, що близько 80 % детектованих нами у ізолюваних і колекційних штамів, а також типового штаму *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>Т</sup> продуктів ПЛР є спільними із типовим штамом *P. atrosepticum* УКМ В-1084<sup>Т</sup>.



а



б



В

**Рисунок 1.** Електрофоретичний розподіл продуктів REP-ПЛР з: BOX A1R праймером (а), ERIC 1R та ERIC 2 праймерами (б), REP 1R і REP 21 праймерами (в). 1, 2, 3, 4, 5 — *Pectobacterium* sp. 1ог., 2 ог., 3ог., 4ог., 5ог., 6,7,8,9,10, 11,12,13,14 — «*Erwinia toxica*» 8692, 8693, 8694, 8695, 8415, 8416, 8417, 8418, 8419, 15 — *P. carotovorum* susp. *carotovorum* 1075<sup>T</sup>, 16 — *P. atrosepticum* B-1084<sup>T</sup>, 17 — *Dickeya chrysanthemi* B-1087<sup>T</sup>

Натомість лише 10 % ідентифікованих у типового штаму *D. chrysanthemi* УКМ В-1087<sup>T</sup> ДНК фрагментів є подібними до продуктів ПЛР виявлених у зазначених вище колекційних і ізолюваних штамів а також типового штаму *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup>. Зокрема спільними для представників роду *Pectobacterium* виявилися продукти ПЛР з BOX A1R праймером молекулярною вагою 300, 370, 400, 900, 1000 та 1500 н. п. Натомість, фрагменти розміром 250, 450, 600, 800 виявилися спільними лише для ізолюваних *Pectobacterium* sp., частини колекційних «*Erwinia toxica*» штамів та типового штаму *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup>. Штам *D. chrysanthemi* УКМ В-1087<sup>T</sup> утворив в наслідок реакції 3 унікальних ДНК фрагменти розміром 100, 2000, 2500 н. п. Як видно з дендрограми у досліджуваній групі штамів присутня гетерогенність BOX профілів (рис. 2а).

Зокрема, ізолювані нами штами *Pectobacterium* sp. сформували окремий кластер високоспоріднений з двома кластерами до яких увійшли колекційні штами «*Erwinia toxica*» та типовий штам *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup>. Виявлена нами гетерогенність BOX профілів колекційних штамів «*Erwinia toxica*» не суперечить даним літератури. Так, рядом авторів виявлений зв'язок між регіоном з якого був ізолюваний той чи інший штам та групою BOX профілів до якої він належить [15, 17, 18, 19, 20].

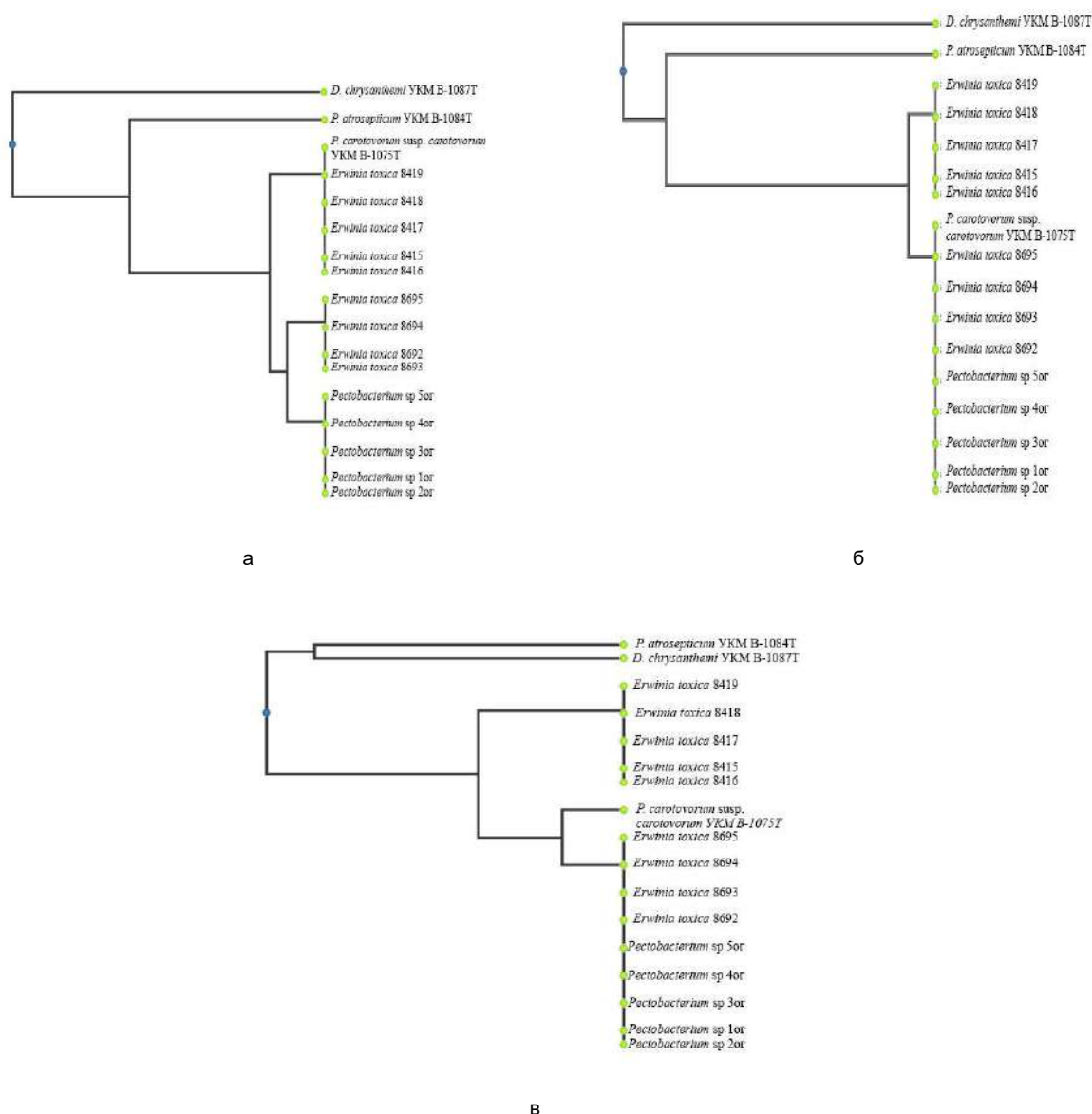
Слід відмітити, що штами *Pectobacterium* sp. були ізолювані нами із одного тепличного господарства Київської області. Натомість, колекційні штами «*Erwinia toxica*» були ізолювані при моніторингу захворювань огірків у тепличних господарствах 9 областей України, що, на наш погляд, певною мірою, обумовлює гетерогенність BOX профілів даних штамів. У ERIC профілях ізолюваних *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» штамів та типового штаму *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup> виявлено 13 спільних ДНК фрагментів молекулярною вагою 180, 200, 220, 290, 300, 400, 420, 480, 500, 790, 800, 900, 1500 н. п. (рис. 1б). Близько 40 % ідентифікованих у ізолюваних *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» штамів та типового штаму *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup> продуктів ПЛР є спільними зі штамом *P. atrosepticum* УКМ В-1084<sup>T</sup>. Натомість типовий штам *D. chrysanthemi* УКМ В-1087<sup>T</sup> має лише близько 15 % спільних з ізолюваними *Pectobacterium* sp., колекційними «*Erwinia toxica*» штамми та типовим штамом *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup> ДНК фрагментів.

Так, спільними для представників роду *Pectobacterium* виявилися продукти ПЛР з ERIC 1R та ERIC 2 праймерами молекулярною вагою 400, 480, 500, 900 н. п. Штам *D. chrysanthemi* УКМ В-1087<sup>T</sup> споріднений з рештою штамів за двома ДНК фрагментів молекулярною вагою 200, 300

REP-ПЛР аналіз окремих збудників бактеріальних хвороб огірків

н.п. За дендрограмою спорідненості (рис. 2б) штамми *Pectobacterium* sp. 1ог, 2ог, 3ог, 4ог, 5ог та «*Erwinia toxica*» 8692, 8693, 8694, 8695 утворили спільну групу до якої також входить типовий штам *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup>. Натомість штамми «*Erwinia toxica*» 8415, 8416, 8417, 8418, 8419 сформували окремий кластер близькоспоріднений із зазначеною вище групою видів. Отримані нами результати ще раз

підтверджують помічену нами раніше генетичну гетерогенність групи колекційних штамів «*Erwinia toxica*». Крім того, результати аналізу ERIC профілів досліджуваних штамів також свідчать на користь значної генетичної спорідненості, відміченої нами раніше при аналізі результатів BOX-ПЛР, групи досліджуваних штамів та типового штамів *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup>.



**Рисунок 2.** Дендрограма спорідненості (кластерний алгоритм) побудована за результатами BOX (а), ERIC (б) та REP (в) профілювання геному ізольованих *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» штамів та типових штамів родів *Pectobacterium* і *Dickeya* та з використанням UPGMA аналізу. Кофіцієнт когенетичної кореляції ( $r$ ) = 0,98 – 0,99

У REP профілях (рис. 1в) ізольованих нами *Pectobacterium* sp., «*Erwinia toxica*» штамів та типового штаму *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup> виявлено 7 спільних ДНК фрагментів молекулярною вагою близько 200, 300, 500, 600, 700, 1000, 1500 н. п. Приблизно 50 % ідентифікованих у ізольованих *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» штамів та типового штаму *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup> продуктів ПЛР є спільними зі штамом *P. atrosepticum* УКМ В-1084<sup>T</sup>. Штам *D. chrysanthemi* УКМ В-1087<sup>T</sup> має близько 50 % спільних із зазначеною вище групою штамів продуктів ПЛР. Так, спільними для представників роду *Pectobacterium* виявилися продукти ПЛР з REP 1R і REP 21 праймерами розміром 200, 300, 600 н. п. Штам *D. chrysanthemi* УКМ В-1087<sup>T</sup> споріднений з рештою штамів за трьома ДНК фрагментами молекулярною вагою 200, 300 та 1000 н. п. Цікаво, що усі включені у дослідження штами мають спільний продукт REP-ПЛР розміром 800 н. п., відсутній у решти штамів. За результатами UPGMA аналізу штами *Pectobacterium* sp. 1ог, 2ог, 3ог, 4ог, 5ог та «*Erwinia toxica*» 8692, 8693, 8694, 8695 утворили спільний кластер близькоспоріднений з типовим штамом *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup>. Натомість штами «*Erwinia toxica*» 8415, 8416, 8417, 8418, 8419 сформували окрему групу близькоспоріднену із зазначеним вище кластером (рис. 2в). Отже згідно отриманих результатів група штамів *Pectobacterium* sp., «*Erwinia toxica*» є значно споріднена з типовими представниками роду *Pectobacterium*, що здатні викликати м'яке гниття ряду рослин, і зокрема з типовим штамом *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup>. Необхідно також зазначити кореляцію результатів «фінгепринтування геному» за допомогою REP-ПЛР із даними філогенетичного аналізу отриманими нами раніше. Так, ізольовані *Pectobacterium* sp. та колекційні «*Erwinia toxica*» штами виявили найвищий рівень спорідненості нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК (97–99 % гомології) із представниками підвидів subsp. *carotovorum*, *odoriferum*, *brasiliensis*, у складі виду *P. carotovorum* та видами *P. wasabiae* і *P. atrosepticum* (неопубліковані дані). Крім того, попередньо нами також виявлено значну подібність комплексу ознак фенотипу (патогенні, фізіолого-біохімічні, морфолого-культуральні властивості та жирнокислотний склад клітинних ліпідів) даної групи штамів із типовими штамами *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup> і *P. atrosepticum* УКМ В-1084<sup>T</sup>. Даний факт

вказує на кореляцію між фенотиповими і генотиповими властивостями ізольованих *Pectobacterium* sp. та колекційних «*Erwinia toxica*» штамів. Необхідно зазначити, що отримані нами результати BOX, REP та ERIC профілювання геному ізольованих штамів *Pectobacterium* sp. підтверджують високу їх генетичну однорідність. Натомість колекційні штами «*Erwinia toxica*» є генетично гетерогенні за даною ознакою, що не суперечить даним літератури [15]. Зокрема, низкою дослідників виявлено як гетерогенність так гомогенність популяції *P. carotovorum* susp. *carotovorum* у природі. Так, варіабельність BOX, REP та ERIC профілів спостерігається у випадках ізолювання штамів із різних видів уражених рослин або ж рослин відібраних у географічно віддалених регіонах. Натомість, у ряді досліджень констатовано, що у BOX, REP та ERIC профілях штамів споріднених за рослиною-господарем та місцевістю ізолювання майже відсутня варіабельність [17, 18, 19, 20]. На думку деяких дослідників [15, 17], однією з важливих причин цього явища є те, що вибір рослин з однієї кліматично-географічної зони може мати вплив на генетичну карту бактерії, а також дисперсію коротких послідовностей, які повторюються (BOX, REP та ERIC) у геномі бактерії, що певною мірою пояснює отримані нами результати. Безсумнівно, даний факт ще раз підтверджує думку про те що REP-ПЛР аналіз є надійним інструментом у випадку масштабних епіфітотій, а базу даних BOX, REP та ERIC профілів фітопатогенних бактерій можна використовувати для ефективного, швидкого моніторингу збудників.

### Висновки

Виявлено генетичну однорідність ізольованих штамів *Pectobacterium* sp. та генетичну гетерогенність колекційних штамів «*Erwinia toxica*», що викликають гниття плодів та в'янення рослин огірків у закритому ґрунті. Отримані нами результати можуть бути основою для ефективного моніторингу ти швидкої коректної діагностики даного збудника у випадку масового захворювання рослин. Також встановлено значну спорідненість за BOX, REP та ERIC профілями даної групи штамів із з типовим штамом *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075<sup>T</sup>, що найбільш вірогідно свідчить про їх належність до даного виду.

### Перелік літератури

1. Болезни и вредители овощных культур и картофеля / А. К. Ахатов, Ф. Б. Ганнибал, Ю. И. Мешков и др. — М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2013. — 465 с.

2. Бублик Л. І., Васечко Г. І., Васильєв В. П. та ін. Довідник із захисту рослин / За ред. М. Плісового. — К.: Урожай, 1999. — 744 с.
3. Коробко А. П. Биология возбудителей бактериозов огурцов в УССР. Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Ин-т. микробиолог. и вирусолог. им. Д. К. Заболотного. — К., 1973. — 21 с.
4. Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Яковлева Л. М., Мороз С. М., Литвинчук О. О., Житкевич Н. В., Ходос С. Ф., Буценко Л. М., Данкевич Л. А., Гринник І. В., Патица В. П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / За ред. В. П. Патики. — К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. — 444 с.
5. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T., Garrity G. M. — New York; USA: Springer Science + Business Media. — 2005. — Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. — 1108 p.
6. Ozturk M., Aksoy H. M., Ozturk S., Potrykus M., Lojkowska E. First report of potato blackleg and soft rot caused by *Pectobacterium wasabiae* in Turkey // *New Disease Reports*. — 2016. — 34. — P. 17.
7. Rosenzweig N., Steere L., Kirk W. W., Mambetova S., Long C., Schafer R., Dangi S., Byrne J. First report of *Dickeya dianthicola* and *Pectobacterium wasabiae* causing aerial stem rot of potato in Michigan, USA // *New Disease Reports* — 2016. — 33. — P. 10.
8. Mikicinski A., Sobiczewski P., Sulikowska M., Pulawska J., Treder J. Pectolytic Bacteria Associated with Soft Rot of Calla Lily (*Zantedeschia* spp.) tubers // *J Phytopathol.* — 2016. — 158. — P. 201–209.
9. Czajkowski R., Pérocmbelon M. C. M., Jafra S., Lojkowska E., Potrykus M., van der Wolf J. M., Sledz W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review // *Annals of Applied Biology*. — 2014. — 166, № 11. — P. 1–21.
10. Aremu B. R., Babalola O. O. Classification and taxonomy of vegetable macergens // *Front. Microbiol.* — 2016. — 6. — P. 1361–1372.
11. Захарова О. М. Моніторинг і ідентифікація збудників бактеріальних хвороб ріпаку: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.07 / Ін-т. микробиолог. і вирусолог. ім. Д. К. Заболотного — К., 2015. — 24 с.
12. Tavasoli E., Marefat A. R., Hassanzadeh N. Identity and genetic diversity of *Pectobacterium* spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran // *African Journal of Plant Science*. — 2011. — 5, № 6. — P. 329–336.
13. Louws F. J., Rademaker J. L. W., de Bruijn F. J. The three DS of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis // *Annual Reviews Phytopathology*. — 1999. — 37. — P. 81–125.
14. Faquih H., Terta M., Amdan M., Achbani El H., Ennaji M. M., Mhand R. A. Phenotypic and genotypic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* causing soft rot disease of potatoes in Morocco // *Eur J Plant Pathol.* — 2015. — 143, № 4. — P. 801–811.
15. Louws F. J., Fulbright D. W., Stephens C. T. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1994. — 60, № 7. — P. 2286–2295.
16. Rademaker J. LW, de Bruijn F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis // *DNA markers: protocols, applications and overviews*. — 1997. — 1. — P. 151–171.
17. Buonaurio R., Caglioti C., Marques Pires M., Moretti Ch., Innocenti M. Occurrence of a soft rot of calla (*Zantedeschia aethiopica*) caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in central Italy // *Phytopathol. Mediterr.* — 2002. — 41, № 2. — P. 152–156.
18. Kazemi F., Khodakaramian Gh., Bagheri A and Ghasemi A. Rep-PCR Pattern of the Strains of *Pectobacterium* Isolated From Potato Soft Rot and Black Leg Diseases in Hamedan Province // *Agricultural biotechnology*. — 2011. — 10, № 1. — P. 47–53.
19. Dadaşoğlu F., Kotan R. Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum* // *The Journal of Animal and Plant Sciences*. — 2017. — 27, № 2. — P. 647–654.
20. Rafiei S., Khodakaramian Gh., Baghaee-Ravari S. Characterization of *Pectobacterium* species isolated from vegetable crops in north-west of Iran // *African Journal of Agricultural Research*. — 2015. — 10, № 46. — P. 4258–4267.

Представлено Б. П. Мацелюхом  
Надійшла 15.05.2017

## REP-PCR ANALYSIS OF SINGLE AGENT OF CUCUMBER BACTERIAL DISEASES

L. A. Dankevych

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology  
National Academy of Sciences of Ukraine  
Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnogo str., 154  
e-mail: ldankevich@ukr.net

**Aim.** For the purpose of correct species identification and estimation of population's heterogeneity, the fingerprinting of the genome of isolated by us *Pectobacterium* sp., collection «*Erwinia toxica*» strains and typical representatives of certain species of *Pectobacterium* and *Diskeya* genera has been carried out. **Methods.** In the course of research, microbiological, molecular genetic (REP-PCR), mathematical-statistical methods of research were used. **Results.** On the basis of BOX, REP and ERIC profiles the significant affinity between isolated *Pectobacterium* sp. and collections «*Erwinia toxica*» strains with the typical *P. carotovorum* susp. *carotovorum* UCM B1075<sup>T</sup> has been established. Genetic heterogeneity of isolated *Pectobacterium* sp. and collections «*Erwinia toxica*» strains has been estimated. **Conclusions.** It has been found the significant relationship between isolates *Pectobacterium* sp. and the collection «*Erwinia toxica*» strains with the typical strain *P. carotovorum* susp. *carotovorum* UCM B1075<sup>T</sup> on the basis of their BOX, REP and ERIC profiles. Most likely, its indicates that they belong to this species. The genetic homogeneity of isolated *Pectobacterium* sp. strains of and the genetic heterogeneity of the collection «*Erwinia toxica*» strains is probably due to the plant's selection from similar or different region.

**Keywords:** identification, genetic heterogeneity, REP-PCR, «*Erwinia toxica*», *Pectobacterium* sp.