Molecular diagnostics of bacterial and fungal plant diseases

Sidarenka A.V., Bareika H.A., Valentovich L.N., Paturemski D.S., Kuptsou V.N., Titok M.A., Kalamiyets E.I.

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E-mail: a_sidarenka@mbio.bas-net.by

Key message. Taxon-specific primers were developed and PCR conditions were optimized for diagnostics of bacterial and fungal plant pathogens. Methods for phytopathogens DNA isolation from plant material, soil and water were selected.

Keywords: phytopathogenic microorganisms, plant diseases, PCR diagnostics

Diseases of agricultural crops caused by phytopathogenic bacteria and fungi lead to significant crop losses, reduced commodity and food quality of the products, and pose a serious threat to food security in any country. A key aspect of the fight against plant diseases of bacterial and fungal etiology is an early and accurate diagnosis of the pathogen, which allows targeted selection and timely application of protectants, and effective measures to prevent mass infection. In recent years, molecular diagnostics of plant pathogens based on PCR has been gaining popularity. Its advantages include high specificity, sensitivity and quickness of analysis.

Objective: to develop a system for PCR diagnostics of bacterial and fungal pathogens of agricultural crops.

Methods: isolation and cultivation of phytopathogenic microorganisms was carried out according to standard methods; commercial kits and protocols described in the literature were used to isolate DNA; designing primers and checking their specificity was performed using *on-line* programs; optimal PCR conditions were selected experimentally.

Results: collection of phytopathogenic bacteria and fungi isolated on the territory of the Republic of Belarus was created. Genus- and species-specific primers were developed and conditions of standard and multiplex PCR, real-time PCR were optimized for the diagnosis of bacterial and fungal pathogens of agricultural crops. It was shown that PCR with developed primers is characterized by high specificity for target pathogens, sensitivity and performance. Effective protocols for isolating of pathogens DNA from plant material, seeds, soil (root substrate), and water were selected. Methods for genotyping phytopathogenic bacteria to reveal strain differences were optimized. The developed system for PCR diagnostics of agricultural crops pathogens was successfully tested to detect and identify pathogenic microorganisms in seeds and plants of tomato, cucumber, pepper, carrot, garlic, samples of soil and water, provided by greenhouse complexes and farms of the Republic of Belarus.

Молекулярная диагностика болезней растений бактериальной и грибной этиологии

Сидоренко А.В., Барейко А.А., Валентович Л.Н., Потуремский Д.С., Купцов В.Н., Титок М.А., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Аннотация. Разработаны таксонспецифичные праймеры и оптимизированы условия ПЦР для диагностики бактериальных и грибных патогенов растений. Подобраны методы выделения ДНК фитопатогенов из растительного материала, почвы, воды.

Ключевые слова: фитопатогенные микроорганизмы, болезни растений, ПЦР-диагностика

Болезни сельскохозяйственных культур, вызываемые фитопатогенными бактериями и грибами, приводят к существенным потерям урожая, снижению товарных и пищевых качеств получаемой продукции, и представляют серьезную угрозу продовольственной безопасности любой страны. Ключевым аспектом борьбы с болезнями растений бактериальной и грибной этиологии является ранняя и точная диагностика патогена, позволяющая целенаправленно подбирать и своевременно применять средства защиты, предпринимать эффективные меры для предотвращения массового заражения. В последние годы популярность приобретает молекулярная диагностика возбудителей болезней растений, основанная на ПЦР, к преимуществам которой относятся высокая специфичность, чувствительность и быстрота анализа.

Цель работы: разработка системы ПЦР-диагностики бактериальных и грибных патогенов сельскохозяйственных культур.

Методы: выделение и культивирование фитопатогенных микроорганизмов осуществляли по общепринятым методикам; для выделения ДНК использовали коммерческие наборы и описанные в литературе методы; конструирование праймеров и проверку их специфичности проводили с помощью *on-line* программ; оптимальные условия ПЦР подбирали экспериментально.

Результаты: создана коллекция фитопатогенных бактерий и грибов, выделенных на территории Республики Беларусь. Разработаны родо- и видоспецифичные праймеры, оптимизированы условия стандартной и мультиплексной ПЦР, ПЦР в реальном времени для диагностики бактериальных и грибных возбудителей болезней сельскохозяйственных культур. Показано, что ПЦР с разработанными праймерами характеризуется высокой специфичностью к целевым патогенам, чувствительностью и производительностью. Подобраны эффективные методы выделения ДНК патогенов из растительного материала, семян, почвы (корневого субстрата), воды. Оптимизированы методы генотипирования фитопатогенных бактерий для выявления штаммовых различий. Разработанная система ПЦР-диагностики возбудителей болезней сельскохозяйственных культур успешно апробирована для выявления и идентификации патогенных микроорганизмов в семенах и растениях томата, огурца, перца, моркови, чеснока, образцах почвы и воды, предоставленных тепличными комбинатами и фермерскими хозяйствами Республики Беларусь.