



№ 4 2019 «3: intellect, idea, innovation – интеллект, идея, инновация»



Ахмет Байтұрсынов атындағы
Қостанай мемлекеттік университеті

Костанайский государственный университет
имени Ахмета Байтурсынова



КӨПСАЛАЛЫ
ҒЫЛЫМИ ЖУРНАЛЫ
МНОГОПРОФИЛЬНЫЙ
НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

№ 4 2019

Throughout lactation, all groups had significant fluctuations in milk yields. Lactation curves of cows of experimental groups are presented in figure 2.



Figure 2. Lactation curves of cows of the studied groups for 305 days of lactation

Analysis of lactation curves shows that the best way to increase productivity is in the third and fourth months of lactation. After that, there is a decrease in milk yields, this is due to the fertilization of animals and changes in the physiological state of the transition to pregnant animals during which there is a decrease in milk yields.

The higher coefficient of milk content was found in cows of group III over peers of groups I and II and amounted to 125.5-89.9 kg or 10.5-7.5 %, and the difference between group I and II was 35.6 kg (3.2 %).

Conclusion

To balance the rations on the content of macro -, microelements, to increase the digestibility of nutrients, it is recommended to introduce enzyme-probiotic additive "Bitatsel" into the rations of lactating cows, which will increase milk productivity and reproductive qualities of animals.

Thus, the use of enzyme-probiotic additive "Bitatsel" in the diet contributes to the increase in milk productivity, fat and protein content in the milk of Holstein cows. At the same time, the highest productivity was obtained from cows of group II and III, who received with a diet at a dose of 1.0 -1.5 % or 30-60 g in concentrated feed.

REFERENCES:

1. Khvostova L. P. Methods of increasing the energy nutritional value of rations of highly productive cows / L. P. Khvostova, E. N. Sokolovsky // Vestnik Michurinsk SAU. -2011. – №1. - Part 2. P. 50-52.
2. Proshkina T. V. Effect of protein feed additives on the composition of the blood as an indicator of the productivity of the animals/ T. V. Proshkin //Bulletin of Michurinskiy SAU. - 2011. - № 1. - Part 2. P. 44-47.
3. Naimanov D.K, Papusha N.V., Michinsky Ya., Bermagambetova N.N. Linear estimation of first aiders of different genotypes in the conditions of LLP «Victorovskoe» [Text] / Naimanov D.K. // Multidisciplinary scientific journal «3i: intellect, idea, innovation – intellect, idea, innovation» ». №2, Kostanay, 2015, - P. 74-78.
4. Tegza I. M. Identification of desirable type of holstinized black-and-white cattle in "OH Zarechnoe" LLP of Kostanay region/ I. M. Tegza/ / Bulletin of science Kaz ATU University S. Seifullina. Astana, 2009. № 4. P. 8-10.
5. Selionova M. I., Tyagilev V. V. Influence of mineral and vitamin premixes "Kaufit Komplit", "Kalvofit-N" and probiotics "Bacell" on dairy productivity of cows // Increase of productive and breeding qualities of agricultural animals: SB. nauchn. tr. at the mater. 74th scientific. - pract. Conf. - Stavropol SAU, Stavropol: Agrus, 2010. - P. 120-124.
6. Kalashnikov A. P., etc. "Norms and ration of feeding farm animals." - M.: 2003, C.456.
7. Naimanov D.K, Musaeva G.K., Aytzhanova I.N. Analysis of external indicators of milking households of «BEK+ LLP» Multidisciplinary scientific journal «3i: intellect, idea, innovation – intellect, idea, innovation» ». №3, Kostanay, 2018, - P. 47-51.

8. Shaikamal G.I., Papusha N.V., Kazhiakbarova A.T. Selectional performance of cows of Holstein and Black-motley breeds in the conditions of Rostanay region. Multidisciplinary scientific journal «3i: intellect, idea, innovation – intellect, idea, innovation» №2. Kostanay. 2019. - P. 90-97.

Information about authors

Tegza Ivan Mikloshevich - Candidate of Agricultural Sciences, Professor of the Department of Technology of production of animal products Kostanay state University. A. Baitursynov, Kostanay, street of Mayakovskii 99/1,

e-mail: tegza4@mail.ru

Tegza Alexandra Alekseevna - Doctor of Veterinary Sciences, Professor of Kostanay State University A. Baitursynov, Kostanay, street of Mayakovskii 99/1, e-mail: tegza4@mail.ru

Akhmetchina Tolkyunay Akangalievna - PhD student of Kostanay State University A. Baitursynov, Kostanay, street of Mayakovskii 99/1, tolkyunsun_15@mail.ru

Тегза Иван Миклошевич — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры технологии производства продуктов животноводства, Костанайского государственного университета им. А. Байтурсынова, г. Костанай, ул. Маяковского 99/1, e-mail: tegza4@mail.ru.

Тегза Александра Алексеевна – доктор ветеринарных наук, профессор, Костанайского государственного университета им. А. Байтурсынова, г. Костанай, ул. Маяковского 99/1, e-mail: tegza4@mail.ru.

Ахметчина Толкын Акангалиевна – докторант PhD кафедры технологии производства продуктов животноводства Костанайского государственного университета имени А.Байтурсынова, г.Костанай, ул.Маяковского 99/1, com: 87755307020, tolkyunsun_15@mail.ru.

Тегза Иван Миклошевич — ауыл шаруашылығы ғылымдарының кандидаты, А.Байтурсынов атындағы Костанай мемлекеттік университетінің мал шаруашылығы өнімдерін өндіру технологиясы кафедрасының доценті, Костанай қ, Маяковский көшесі 99/1, e-mail: tegza4@mail.ru.

Тегза Александра Алексеевна – ветеринария ғылымдарының докторы, профессор, А.Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті, Қостанай қ, Маяковский көшесі 99/1, e-mail: tegza4@mail.ru.

Ахметчина Толкын Акангалиевна – А.Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университетінің мал шаруашылығы өнімдерін өндіру технологиясы кафедрасының PhD докторанты, Қостанай қ, Маяковский көшесі 99/1, tolkyunsun_15@mail.ru.

УДК 68.37.13

PSEUDOMONAS ТҰҚЫМДАСЫНА ЖАТАТЫН ФИТОПАТОГЕНДІ БАКТЕРИЯЛАРДЫ ДНК-МАРКЕРЛЕРДІҢ НЕГІЗІНДЕ МОЛЕКУЛЯРЛЫ – ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТӘСІЛМЕН ДИАГНОСТИКАЛАУ ҮШІН ЭКСПРЕСС-ТЕСТТІ ӨЗІРЛЕУ

Бейшова И.С. - ауыл шаруашылығы ғылымдарының кандидаты, биология және химия кафедрасының профессоры, А.Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті.

Ковальчук А.М. - ветеринария ғылымдарының магистры, молекулярлы-генетикалық зерттеу зертханасының қызметкері, Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті, Орал қ.

Кожмухаметова А.С. - жаратылыстану ғылымдар магистры, жаратылыстану ғылымдар кафедрасының аға оқытушысы, Ө. Сұлтанғазин атындағы Қостанай мемлекеттік педагогикалық университеті.

Бұл зерттеуде Қазақстан аумағында таралған Pseudomonas туысының Pseudomonas syringae pv. syringae, Pseudomonas syringae pv. pisi (Sackett), Pseudomonas syringae pv. holci (Kendrick) бұршақ және дәнді дақылдардың фитопатогенді бактерияларын анықтау тәсілін өзірлеу схемасы қарастырылады. Мақалада Pseudomonas тегі, бұршақ және дәнді дақылдардың фитопатогенді бактерияларын сәйкестендіру үшін генді таңдау әдістемесі сипатталады. Сондай-ақ зерттелетін бактерияларды сәйкестендіруге мүмкіндік беретін ерекше учаскелер (праймерлер және флуоресцентті зонд) сипатталған, зерттелетін бактериялар үшін ПТР жүргізу шарттарын оңтайландыруды жүргізу нәтижелері (ПТР қоспасының құрамы мен көлемі, ПТР жүргізуге арналған бағдарлама) және таңдалған олигонуклеотидтердің ерекшелігін анықтау (ПТР-ді жақын туыс организмдермен жүргізу) қарастырылды.

Бактерияларды идентификациялау ДНҚ-фрагменттердің ПЦР-амплификациясына негізделген, арнайы праймерлерді пайдалана отырып, олар В ДНҚ-гираза (*gyrB*) суббірлігінің гені негізінде әзірленген. *GyrB* генінің амплифицирленген бөлігінің мөлшері 197 жұп олигонуклеотид (ж.о.) құрайды. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett), *Pseudomonas syringae* pv. *holci* (Kendrick) анықтаудың сипатталған тәсілі ПТР өткізу үшін "нақты уақыт" форматында да, "форез" форматында да қолайлы және биологиялық материалда зерттелетін бактерияларды анықтауға мүмкіндік береді.

Түйінді сөздер: *Pseudomonas syringae*, өсімдіктер бактериозы, ПТР, идентификациялау, ген *gyrB*.

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-ТЕСТА НА ОСНОВЕ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Бейшова И.С. - кандидат сельскохозяйственных наук, профессор кафедры биологии и химии, Костанайский государственный университет имени А. Байтурсынова.

Ковальчук А.М. - магистр ветеринарных наук, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований, Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана, г. Уральск.

Кожмухаметова А.С. - магистр естественных наук, старший преподаватель кафедры естественных наук, Костанайский государственный педагогический университет имени У. Султангазина.

В данном исследовании рассматривается схема разработки способа для обнаружения фитопатогенных бактерий бобовых и злаковых культур, рода *Pseudomonas* распространенных на территории Казахстана: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett), *Pseudomonas syringae* pv. *holci* (Kendrick). В статье описывается методика подбора гена для идентификации фитопатогенных бактерий бобовых и злаковых культур, рода *Pseudomonas*. Так же описаны специфические участки (праймеры и флуоресцентный зонд), позволяющие идентифицировать исследуемых бактерий, рассмотрены результаты проведения оптимизации условий проведения ПЦР для исследуемых бактерий (состав и объем ПЦР смеси, программа для проведения ПЦР) и определение специфичности подобранных олигонуклеотидов (проведение ПЦР с близкородственными организмами).

Идентификация бактерий основана на ПЦР-амплификации ДНК-фрагментов, с использованием специфических праймеров, которые были разработаны на основе гена субъединицы В ДНК-гиразы (*gyrB*). Размер амплифицированного участка гена *gyrB* составляет 197 пар олигонуклеотидов (п.о.). Описанный способ обнаружения *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett), *Pseudomonas syringae* pv. *holci* (Kendrick) подходит как для проведения ПЦР в формате «реального времени», так и в формате «форез» и позволяет обнаруживать исследуемые бактерии в биологическом материале.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, бактериоз растений, ПЦР, идентификация, ген *gyrB*.

DEVELOPMENT OF EXPRESS TEST ON THE BASIS OF DNA MARKERS FOR DIAGNOSTICS OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *PSEUDOMONAS* MOLECULAR AND GENETIC METHODS

Beishova I.S. - candidate of agricultural sciences, associate professor of the department of biology and chemistry, Kostanai State University named after A. Baitursynov.

Kovalchuk A.M. - master of veterinary sciences, researcher, laboratory of molecular genetic studies, Zhangir Khan West Kazakhstan Agrarian Technical University, Uralsk.

Kozhmukhametova A.S. - master of science, senior lecturer, department of natural sciences, Kostanai State Pedagogical University named after O. Sultangazin.

This study discusses the development scheme of a method for detecting phytopathogenic bacteria of legumes and cereals, of the genus *Pseudomonas* common in Kazakhstan: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett), *Pseudomonas syringae* pv. *holci* (Kendrick). The article describes the method of gene selection for the identification of phytopathogenic bacteria in legumes and cereals, of the genus *Pseudomonas*. Specific sites (primers and fluorescent probe) that allow the identification of the studied bacteria are described, the results of optimizing the PCR conditions for the studied bacteria (composition and volume of the PCR mixture, program for PCR) and determining the specificity of the selected oligonucleotides (conducting PCR with closely related organisms) are considered.

The identification of bacteria is based on PCR amplification of DNA fragments using specific primers that were developed based on the DNA gyrase subunit B gene (gyrB). The size of the amplified region of the gyrB gene is 197 pairs of oligonucleotides (bp). The described method for the detection of Pseudomonas syringae pv. syringae, Pseudomonas syringae pv. pisi (Sackett), Pseudomonas syringae pv. holci (Kendrick) is suitable for both real-time PCR and phoresis format PCR and allows detection of test bacteria in biological material.

Keywords: Pseudomonas syringae, plant bacteriosis, PCR, identification, gyrB gene.

Кіріспе. Әлемдегі азық-түлік және биологиялық қауіпсіздік, ауылшаруашылық өнімдерінің және қоршаған ортаның, сонымен қатар олардың қайта өңдеу өнімдері мен жемдерінің фитосанитарлы қадағалауының нақты және уақытылы болуына байланысты. Қадағалаудың осы түрін жүзеге асырудың негізгі жолы тиімді диагностика және фитопатогендердің идентификациясы болып табылады. Патогендерді диагностикалауға, ішкі және сыртқы карантиннің нысаны болып табылатын өте қауіпті патогендерге ерекше назар аударылуы тиіс.

Өсімдіктердің бактериальді ауруларын болжау өте қиын, ал кейбір жылдары өрістердегі өсімдіктердің қолдан улануы, аурудың айтарлықтай таралуына алып келмейді. Барлық әлемде бактериальді аурулардың таралуы тиімді тежеліп келген, біріншіден, төзімді сұрыптарды енгізу, егін тұқымдарының улануын диагностикалау, дұрыс агротехникамен, антибиотиктерді кең қолдану, құрамында мыс, фосфатил, алюминий және олардың бактерицидтілігін арттыратын басқа да компоненттері бар фунгицидтерді комбинациялау қолданылып келді. [1,7 б.].

Соңғы он жылдықтың ішінде болған климаттық өзгерістер нәтижесінде орташа жылдық температураның орташа әлемдік температурамен салыстырғанда 2-3 есе тезірек жоғарылауы бұл тенденцияның жақын жылдары өсуін болжамдауға негіз болып отыр. Жаз мезгіліндегі орташа тәуліктік температураның 3–4°C жоғарылауы кезінде бактериоздың таралуы 2 есеге, ал өсімдіктердің зақымдалуы 30–50% артады. Көптеген бактериоздардың симптомдары зақымдалудың латенттілігіне қарамастан 24–25°C температурада ғана байқалады.

Қазақстандағы өсімдіктердің бактериальді зақымдалуының таралуы негізінен саналы түрде болмаса да, жасанды жасалған, ең алдымен бұл аурудың бар екендігін елемеу және өсімдіктерді қорғау мамандары жағынан күресудің қажеттілігін мойындамау. Өрістегі және егін дөңдеріндегі фитопатогенді бактерияларды уақытылы және нақты диагностикасының болмауы, қорғау шараларының және дұрыс емес жүйелердің қолданылуы, өсімдіктердегі бактерияларды елемеу (тіпті теориялық), заманауи және тиімділігі жоғары саңырауқұлаққа қарсы улағыштарды қолдану, бірақ бактерияларға қарсы улағыштарды қоса қолданбау, өрісте дөңдерде, жабайы өсетін арамшөптерде, тасымалдаушы-жөндіктер популяциясында инфекциялық материалдың бірте-бірте жиналуына алып келді.

Бактериоздардың таралуына қолданысқа енгізіліп жатқан агротехнологиялар да жиі алып келеді. Мысалға, зақымданған картоптың 60 - 90%, өнімдерді жинау, сұрыптау кезінде, картопты егу ден алдын фунгицидтармен және инсектицидтармен улау барысында зақымдалады. Дөңді-дақыл орталарын егу алдында топырақты өңдемеу, тиімді дақылдар ортасын дәл сол өріске бір жылдан соң немесе келесі маусымда қайтару, тіпті бактериозбен зақымдалмайтын дақыл түрлері - қант қызылшасының, күнбағыстың, майлы рапстың, бидайдың зақымдалуына алып келді.

Кез келген патогенді организмдердің, соның ішінде фитопатогендерді идентификациялау және тиімді жүйелі диагностикалаудың жасалуының критикалды кезеңі, праймерлерді құрастыру және ДНК-маркерлерді таңдау болып табылады. ДНК-маркерлерді таңдау және қолдану негізіне әртүрлі таксономиялық деңгейдегі генетикалық полиморфизм жатады. [2, 127 б.].

Қажетті таксономиялық спецификалық деңгейге жауап беретін локусты таңдау, зерттеліп жатқан фитопатогенді организмнің типіне байланысты. Бактерияларға әдетте хромосомаларда шоғырланған рРНК гендері немесе плазмидаларда да орналасқан, патогенділікке/вируленттілікке жауап беретін гендерді қолданады. Сонымен қатар олар әртүрлі бактериялар тұқымдастығының (гены *hrp*, *pth*, *vir* және т.б.) вируленттілік жүйесінде, кластерларда орналасуы мүмкін. Рибосомальді оперондарды қолданудың артықшылықтары олардың көп жинауы, әмбебтылығы және кіші көлемділігі. Жүйелер праймерлердің плазмидаларға негізделген, басқа штамдарды анықтауға қажет, себебі бір түрге жататын бактериялардың барлығында бірдей плазмидалар болмауы мүмкін. [3, 236 б.].

Дөңді және бұршақ тұқымдастарын зақымдайтын фитопатогенді бактериялардың диагностикасы, ауыл шаруашылығының және заманауи ғылымдардың өзекті және маңызды мәселесі болып табылады. нуклеин қышқылдарының секвенирленуі және толық геномды анализдің деңгейіне шығуы әдістерінің интенсивті дамуы соңғы жылдары көптеген бактериоздардың қоздырғыштарының генетикалық полиморфизмі туралы мағлұматтарды арттырды. Осылайша мәліметтер базасында *Pseudomonas syringae* [4, 6494 б. 5, 1 б.; 6, 1 б.] толық геномдарының структурасы жайлы мәліметтер сақталған.

Жоғары полиморфты ДНК маркерлерін іздеу маңызды және перспективті мақсат болып табылады, себебі, бұл сұрақтың шешімі тиімділігі жоғары диагностикалау жүйесін жасауға ғана емес және жалпы өсімдіктердің генетикалық ауруларының түрлерін зерттеуге жол ашады. [7, 86 б.].

Бұл жұмыстың мақсаты *Ps. syringae*, *Ps. pisi*, *Ps. holci* дәнді және бұршақты дақылдардың фитопатогенді бактерияларын анықтау үшін ПТР негізінде тест-жүйені әзірлеу.

Мақсатқа сүйене отырып, келесі **міндеттер** қойылды:

- *Ps. syringae*, *Ps. pisi*, *Ps. holci* анықтау үшін генді таңдау;
- зерттелетін бактерияларды сәйкестендіру үшін арнайы праймерлерді таңдау;
- зерттелетін бактериялар үшін ПТР жүргізу шарттарын оңтайландыру;
- таңдалған олигонуклеотидтердің ерекшелігін анықтау.

Зерттеу тәсілдері және материалдар

Зерттеу А.Байтұрсынов атындағы ҚМУ қолданбалы биотехнология ғылыми-зерттеу институтының молекулалы-генетикалық зерттеулер бөлімінің негізінде жүргізілді.

Зерттеу материалы ретінде біз *Pseudomonas* бактериялары зақымдалған тұқым мен бұршақ алынған бактериялардың жеке өсімдік штаммдарын пайдаландық, ДНК-ларын өсімдіктер.

Спецификалық праймерлердің дизайнын жасау барысында, праймерлерді таңдау ең басты кезеңдердің бірі болып табылады. Праймерлердің дизайны үшін 2 locus таңдалды: 16S рибосомальді РНК генінің кезектілігі және ДНК-гиразадағы суббірлік.

Нәтижесінде бірнеше праймер, зерттеліп жатқан *gyrB* генінің үш түрлі бактерияларының идентификациясына арналған зонд ұзындығы 197 ж.н болатын ДНК-ң флакирлік кезектілігі. Нуклеотидті кезектіліктің түзеулуін Vector NTI Advance программалық комплексінің көмегімен жасалды.

Зерттелетін бактериялардың үш түрі үшін праймерлер мен зонд бірізділігінің мынадай реттілігі бар:

PsgBF (тура праймер)5'- atgaaratcgctcggtgaaagt -3' (мөлшері 21 ж.н.);

PsgBR (кері праймер)5'- tcttatttgaacarytcttctta -3' (мөлшері 24 ж.н.);

PsgBT (зонд) 5'- actcaagccttccgc(FAMdT)gaaacgttcaa -3' (мөлшері 27 ж.н.).

Праймерлер мен зондардың физикалық-химиялық қасиеттері Oligo 6.71 бағдарламасын пайдалана отырып тексерілді. Праймерлердің ерекшелігі, сондай-ақ онлайн BLAST бағдарламасы арқылы бағаланды (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Амплификация 20 мкл жалпы көлемде жүргізілді. Реакциялық қоспаның құрамына келесі компоненттер кірді: әрбір праймердің 10 pmol және флуоресцентті зонд, ПТР реакцияны жүргізуге арналған буфер, 1,5 Мм MgCl₂, 10 Мм dNTP және 5 U Taq-полимераза қоспасы.

Сонымен қатар, эксперименттер барысында таңдалған амплификацияның барлық сатылары үшін уақыт пен температураның оңтайлы параметрлерінің негізінде real-time форматында ПТР өткізу үшін келесі режим жасалды: пре-денатурация - 1 мин 94°C; денатурация - 10 с 94°C, жасыту - 20 с 60°C, синтез - 20 с 72°C × 45 айналым; сақтау 10°C.

Тәуліктік дақылдардан алынған олигонуклеотидтердің іріктелген тізбектеріндегі сезімталдықты анықтау үшін суспензия дайындап, 10 есе өсірулер сериясы өткізілді. Бактериялардың концентрациясын КТБ анықтау үшін қоректік ортаға әрбір сұйылудан 100 мкл суспензия бойынша себу жолымен анықталды.

Бастапқы пробиркада OD₆₀₀ оптикалық тығыздығы 1,0 құрады, ал КОЕ саны 2x10⁸ кл/мл тең болды, соңғы пробиркада КОЕ саны 2x10⁻¹ кл/мл құрады. "Агродиагностика" фирмасының "Проба-ГС" реагенттер жиынтығымен ДНҚ-ны бөліп, нақты уақыттағы форматта полимеразды тізбекті реакция жүргізілді. ДНҚ бөлу рәсімі өндірушінің нұсқаулығына сәйкес жүзеге асырылды.

Зерттеу және талқылау нәтижелері

Ps. syringae, *Ps. pisi* және *Ps. holci* сәйкестендіруге қажетті тізбекті табу үшін NCBI базасы талданды. Праймерлерді таңдау үшін 16s рибосомальды РНК гендері және В ДНК-гираза суббірлігінің гендері таңдалды. *GyrB* гені (Genbank тіркеу нөмірі: MG642444.1) *Ps. syringae* патоварлары арасында өзінің ерекшелігі мен таралуының арқасында бактериялық патоварларды сәйкестендіру үшін таңдалды.

Ps. syringae, *Ps. pisi* және *Ps. holci* диагностикасы үшін ПТР "нақты уақытта" әдісін әзірлеу үшін аталған қоздырғыштардың *gyrB* генінің нуклеотидті бірізділігіне, сондай-ақ *Pseudomonas* тектес басқа да түрлеріне талдау жасалды.

Біз барлық зерттелетін бактерияларды анықтау үшін PsgBF (тура праймер) және PsgBR (кері праймер), PsgBT зондын таңдадық. Зондта FAM флуоресцентті белгісі бар.

Праймерлерді жасытудың оңтайлы температурасын тәжірибелік таңдау жасыту температурасының градиентін (56°C – 66°C) пайдалана отырып жүргізілді. 1-кестеде *Ps. syringae*, *Ps. pisi* және *Ps. holci* үшін праймерлер мен зондпен ПТР "нақты уақыттағы" нәтижелері берілген. Кестеден көрініп тұрғандай, флуоресценция детекциясының шекті циклінің мәні зонд жасытудың түрлі температураларын қолдану кезінде ерекшеленді.

Кесте 1 – *Ps. syringae*, *Ps. pisi* және *Ps. holci* үшін ПТР "нақты уақытта" қою кезінде праймерлерді күйдіру температурасын анықтау

Ағза	Жасыту температурасы, С°	Ct мәні
<i>Ps. syringae</i>	56	N/A
	58	25,56
	60	24,21
	62	26,98
	64	28,57
	66	N/A
<i>Ps. pisi</i>	56	N/A
	58	24,99
	60	24,57
	62	25,17
	64	29,08
	66	30,19
<i>Ps. holci</i>	56	N/A
	58	26,07
	60	24,09
	62	27,98
	64	29,14
	66	31,17

Ескерту: N/A* - флуоресценция сигналының болмауы

Барлық зерттелетін бактериялар үшін жасытудың оңтайлы температурасы 60°C болып табылатыны анықталды, себебі осы температурада шекті циклдің (Ct) ең төменгі мәні тіркелді.

Зонд пен праймерлердің оңтайлы шоғырлануын анықтау үшін 5пм-нен 10 пМ-ге дейінгі зондтың әртүрлі санымен реакциялық қоспалар және 5 пМ-ден 15 пМ-ге дейінгі праймерлер дайындалды (Кесте 2).

Кесте 2 – ПТР нақты уақытта қою кезінде зонд пен праймерлердің оңтайлы шоғырлануын анықтау»

Бір реакцияға праймер мен зонд концентрациясы, пмоль	5+5	5+7,5	5+10	10+5	10+7,5	10+10	15+5	15+7,5	15+10
<i>Ps. syringae</i> үшін Ct мәні	N/A	27,55	24,15	23,12	28,11	N/A	30,05	N/A	N/A
<i>Ps. pisi</i> үшін Ct мәні	N/A	N/A	25,19	23,97	28,56	N/A	N/A	30,87	31,14
<i>Ps. holci</i> үшін Ct мәні	N/A	26,14	25,15	24,15	26,59	N/A	29,93	N/A	31,75

2-кестеде реакциялық қоспаның құрамындағы зонд пен праймерлердің концентрациясы Ct мәніне қатты әсер етті. Ең жақсы нәтижелер зондтың 5 пМ және әрбір зерттелетін бактерия үшін бір реакцияға есептегендегі әрбір праймердің 10 пМ концентрациясын пайдалану кезінде алынды.

Бұдан әрі праймерлердің ерекшелігі тексерілді. FAM бояғыш флуоресценциясы зерттелетін *Ps. syringae*, *Ps. pisi* және *Ps. holci* бактерияларының ДНҚ болғанда ғана тіркелгендігі анықталды. Таңдалған праймерлер *Pseudomonas* spp тегінің басқа түрлерімен, сондай-ақ фитопатогенді бактериялардың басқа түрлерімен жалған оң реакциялар берген жоқ (Кесте 3).

Кесте 3 – зерттелетін бактерияларға арналған праймерлермен ПТР "нақты уақыттағы" ерекшелігі

ДНҚ қоздырғыштар	<i>Ps. syringae</i> үшін праймерлер	<i>Ps. pisi</i> үшін праймерлер	<i>Ps. holci</i> үшін праймерлер
<i>Ps. syringae</i>	24,42	N/A	N/A
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	N/A	N/A	N/A
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	N/A	N/A	N/A
<i>Xanthomonas alfalfae</i>	N/A	N/A	N/A
Бидай дәнінің ДНҚ-сы	N/A	N/A	N/A
Асбұршақ бұршағының ДНҚ-сы	N/A	N/A	N/A
<i>Ps. pisi</i>	N/A	23,61	N/A
<i>Ps. holci</i>	N/A	N/A	24,17

ПТР-ны "нақты уақытта" қою кезінде праймерлердің сезімталдығы *Ps. syringae*, *Ps. pisi* және *Ps. holci* тәуліктік дақылдардың 10-еселі көбейтіндісінің көмегімен анықталды. Арнайы праймерлердің сезімталдығы КОЕ/мл ең аз детектелетін мөлшері ретінде анықталды.

Әзірленген зондтың сезімталдығы ПТР көмегімен "нақты уақытта", қоздырғыштың жасушаларының белгілі саны бар суспензияның біртіндеп өсуінің үлгілерімен тексерілді. Зерттеу нәтижелері 4-кестеде көрсетілген.

Кесте 4 – ПТР «нақты уақытта» қою кезінде *P. syringae*, *P. pisi* және *P. holci* (жасушалар/мл) әртүрлі концентрацияларындағы Ct мәндері

Бір реакцияға праймер мен зонд концентрациясы, пмоль	3×10^8	3×10^7	3×10^6	3×10^5	3×10^4	3×10^3	3×10^2	3×10^1	3×10^0	3×10^{-1}
<i>Ps. syringae</i> үшін Ct мәні	17,53	20,56	23,85	30,1	34,78	36,96	37,4	38,02	N/A	N/A
<i>Ps. pisi</i> үшін Ct мәні	16,74	19,25	22,8	29,85	33,65	35,34	36,41	37,54	N/A	N/A
<i>Ps. holci</i> үшін Ct мәні	16,98	19,96	22,69	29,74	33,87	35,65	36,91	37,81	N/A	N/A

4-кестеден қоздырғыш жасушаларының шоғырлануы СТ шекті циклінің мәніне әсер еткенін көруге болады. Концентрацияның азаюымен, шекті циклдің мәні артты, бұл үлгідегі ДНҚ құрамының төмендеуін көрсетті. Осылайша, қоздырғышты анықтау шегі төмен болған сайын, 30 КОЕ /мл-ден кем емес құраған іріктелген праймерлердің сезімталдығы соғұрлым жоғары болды.

Қорытынды

Ps. syringae, *Ps. pisi* және *Ps. holci* анықтау және сәйкестендіру үшін FAM флуоресцентті бояғышымен таңбаланған іріктелген праймерлер мен зонд ПТР "нақты уақытта" жүргізуге мүмкіндік береді. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде *Ps. syringae*, *Ps. pisi* және *Ps. holci* түрлері үшін нақты уақыт режимінде ПТР жүргізу үшін оңтайлы жағдайлар анықталды, олар әдісті дөңді және бұршақты дақылдардың бактериоздарының осы қоздырғыштарын анықтау үшін аса сезімтал және ерекше етеді.

Әзірленген ПТР әдісінің "нақты уақытта" сезімталдығы кемінде 30 КОЕ/мл құрады.

Бұл жұмыс Қазақстан Республикасы Тұңғыш Президенті Қорының "Қазақстан Республикасының аумағында кең таралған ауыл шаруашылығы дақылдарының бактериоздарын диагностикалау үшін полимеразды тізбекті реакция (ПТР) негізінде тест-жүйелерді әзірлеу" ғылыми зерттеулеріне арналған гранттардың ғылыми конкурсы шеңберінде орындалды.

ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ:

1. Игнатов, А.Н. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России [Текст] / А.Н. Игнатов, М.С. Егорова, М.В. Ходыкина // Защита и карантин растений. - 2015. - № 5. С. 6-9.
2. Spooner, D. Molecular markers for genbank management [Текст] / D. Spooner, R. van Treuren, M.C. de Vicente. - IPGRI technical bulletin, 2005. - No. 10. - 126 p.
3. Lopez, M.M. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria [Текст] / M.M. Lopez, E. Bertolini, A. Olmos, P. Caruso, M.T. Gorris, P. Llop, R. Penyalver, M. Cambra // Int. Microbiol. - 2003. - № 6. – P. 233-243.
4. Joardar, V. Whole-Genome Sequence Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A Reveals Divergence among Pathovars in Genes Involved in Virulence and Transposition [Текст] / V. Joardar, M. Lindeberg, R.W. Jackson, J. Selengut, R. Dodson et al. // J. Bacteriol. - 2005. – № 187. – P. 6488-6498.
5. Bartoli, C. Whole-Genome Sequencing of 10 *Pseudomonas syringae* Strains Representing Different Host Range Spectra [Текст] / C. Bartoli, S. Carrere, J.R. Lamichhane, L. Varvaro, C.E. Morris // Genome announcements. - 2015. - № 3(2). – (e00379-15. doi:10.1128/genomeA.00379-15).
6. Kong, J. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas syringae* pv. *lapsa* Strain ATCC 10859, Isolated from Infected Wheat [Текст] / J. Kong, H. Jiang, B. Li W. Zhao, Z. Li, S. Zhu // Genome Announc. – 2016. - № 4(2). - Published 2016 Mar 3. – (e00024-16. doi:10.1128/genomeA.00024-16).
7. Бейшова, И.С. Разработка высокоспецифичных и чувствительных экспресс тестов на основе ДНК-маркеров для диагностики грибов-патогенов рода *Puccinia* и *Pyrenophora*, вызывающих заболевания зерновых культур [Текст] / И.С. Бейшова, Г.Д. Чужебаева, В.А. Ульянов // Многопрофильный журнал «3i: intellect, idea, innovation - интеллект, идея, инновация», КГУ им. А.Байтурсынова. - 2017. - № 2(1). – С. 85-94.

REFERENCES:

1. Ignatov, A.N. Rasprostraneniye bakterial'nykh i fitoplazmennyykh bolezney rasteniy v Rossii [Tekst] / A.N. Ignatov, M.S. Yegorova, M.V. Khodykina // Zashchita i karantin rasteniy. - 2015. - № 5. str. 6-9.