УДК 57.015.3+579.25

Р.В. Грицай[1,2], Л.Д. Варбанець[1], О.С. Броварська[1], Н.В. Житкевич[1], Т.М. Олійник[2]

[1]Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академ. Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua
[2]Інститут картоплярства НААН України, вул. Чкалова, 22, смт. Немішаєве, Київська обл., 07853, Україна, тел.: +38 (045) 774 15 42

ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОЇ ГЕТЕРОГЕННОСТІ ШТАМІВ *RALSTONIA SOLANACEARUM* НА ОСНОВІ RAPD-ПЛР АНАЛІЗУ

Проаналізовано 9 штамів Ralstonia solanacearum Міжнародної колекції фітопатогенних бактерій та колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного з використанням RAPD-ПЛР аналізу. Згідно отриманих результатів показано високий рівень генетичної гетерогенності об'єктів дослідження та побудовано дендрограму, що відображає генетичні дистанції між штамами. Розподіл штамів за кластерами дендрограми виявив певну закономірність для представників першого біовару. Серед ампліфікованих послідовностей не виявлено таких, що корелюють із детермінацією хемотипу ліпополісахариду.

Ключові слова: RAPD-ПЛР, Ralstonia solanacearum, генетичні дистанції, ліпополісахарид.

Ralstonia solanacearum — складний комплексний вид, який об'єднує грамнегативні бактерії, здатні викликати бактеріальне в'янення у більш ніж 200 видів вищих рослин. Це один із найбільш деструктивних рослинних патогенів, що зустрічається майже на всіх континентах. Ендемічними для *R. solanacearum* є регіон тропіків, звідки інтродукція його в інші країни відбулася протягом останнього століття. Все це свідчить про значну внутрішньовидову гетерогенність та високі темпи мінливості патогену.

З моменту свого відкриття таксономічне положення виду змінювалося і продовжує уточнюватися. Так, початкова фенотипова система класифікації на біотипи і серовари поступово витісняється системою, основаною на рестрикційному аналізі геному. Згідно останньої в межах

© Р.В. Грицай, Л.Д. Варбанець, О.С. Броварська, Н.В. Житкевич, Т.М. Олійник, 2011

виду *R. solanacearum* виділяють чотири філотипи, кожен з яких відповідно поділяється на секвевари. На побудованому таким чином філогенетичному дереві, генетичні дистанції між окремими гілками сягають більше 25%, що підштовхує дослідників до необхідності дроблення таксону на декілька окремих видів [1].

Кластеризація штамів та ізолятів бактерій на основі молекулярно-генетичного аналізу дає змогу розділити їх на групи із подібними біологічними властивостями. Встановлення генетичного поліморфізму фітопатогенних бактерій методами, що базуються на полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР), використовується при вивченні екологічного поширення, пластичності геному та особливостей еволюції. Так, на гілках дендрограми, побудованої за результатами RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) аналізу *R. solanacearum*, спостерігалося чітке розділення біоварів 1 і 2, а також кластеру, що містив біовари 3 і 4 [2]. Відповідна кореляція мала місце при вивченні північноамериканських ізолятів патогену, де за допомогою ПЛР повторюваних елементів геному вдалося диференціювати штами за регіоном походження, біотипом і частково спектром рослин-живителів [3].

На основі вивчення особливостей хімічної будови ліпополісахаридів (ЛПС) ряду штамів *R. solanacearum*, було встановлено існування 7 можливих типів структур О-специфічного полісахариду (ОПС). За допомогою перехресних імунохімічних реакцій між досліджуваними штамами їх вдалося об'єднати в п'ять серогруп. При цьому хімічна структура ЛПС декількох штамів радикально відрізнялася від більшості [4]. Кореляції між структурою ОПС і належністю штаму до певного біовару чи рослини-хазяїна або географічної зони, з якої цей штам походить, не виявлено [5]. Встановлення генетичних дистанцій між серотипами *R. solanacearum* раніше не проводилося.

Тому метою даної роботи було вивчення генетичної спорідненості між штамами — представниками різних серогруп *R. solanacearum*, на основі ПЛР довільно ампліфікованих послідовностей (RAPD).

RAPD-аналіз — універсальний, чутливий і простий метод, що може бути застосований для широкого кола організмів. RAPD-маркери використовувалися для ідентифікації та диференціації штамів різних родів бактерій, в тому числі для виду *R. solanacearum* [6]. Для ентеротоксикогенних штамів *Escherichia coli* розподіл на кластери згідно результатів RAPD практично повністю збігався із розподілом на серогрупи за антигенними властивостями ОПС ЛПС [7], тоді як для *Vibrio cholerae* такої кореляції не спостерігалося [8]. Недоліком даного методу є імовірність впливу на результати деяких умов проведення ПЛР, і відповідна невідтворюваність в межах різних лабораторій. Результати RAPD та BOX-ПЛР аналізу для диференціації 46 ізолятів *R. solanacearum* із Тайваню, виявилися подібними і продемонстрували значний поліморфізм в даній популяції [9].

Матеріали і методи дослідження

В роботі використовували 9 штамів *R. solanacearum*, перелік яких подано в таблиці 1. Бактерії вирощували на картопляному агарі при 28 °С протягом 48 годин.

Таблиця 1

Характеристика штамів *R. solanacearum*

Table 1

Characteristic of *R. solanacearum* strains

Номер штаму	Біовар	Рослина хазяїн	Географічна зона виділення	Тип структури ОПС
ICMP 5712 (типовий)	I	томати	США	3
35”	-	картопля	Україна	-
4”	-	картопля	Україна	-
ICMP 7954	II	-	Кенія	-
ICMP 7944	I	подорожник	Перу	6
ICMP 8089	III	солодкий перець	Філіппіни	7
ICMP 8202	IV	картопля	Шрі Ланка	1
ICMP 7859	I	картопля	Перу	1
ICMP 7864	I	банани	Коста-Ріка	2

Примітка: «—» не визначено, ICMP – International collection of phytopathogenic bacteria (New Zealand), 35” і 4” — штами з колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України

Виділення тотальної ДНК із клітин бактерій проводили водно-фенольним методом з використанням CTAB-буферу [10]. Суспензію клітин у 500 мкл фізрозчину осаджували центрифугуванням. Осад ресуспендували в 600 мкл лізуючого буферу (1 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 0,25 М ЕДТА, 0,1% Sarcosyl (Sigma), 0,2 М NaCl), після додавання 2 од. активності протеїнази на зразок та 100 мкл 10%-го розчину CTAB, пробірки інкубували 30 хв при 60 °С. Білки осаджували центрифугуванням (10 хв, 16 000 g) з рівним об’ємом фенолу і двічі — сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), за кімнатної температури. Нуклеїнові кислоти із водної фази осаджували 2,5 об’ємами етанолу, після чого розчиняли у 150 мкл води, вільної від нуклеаз. Отримані препарати ДНК зберігали при -20 °С.

RAPD-ПЛР проводили окремо з кожним із 5 декамерних праймерів, послідовності яких подані в таблиці 2. ПЛР-суміш, об’ємом 25 мкл, містила 1X Taq-полімеразний буфер, 3,5 мМ $MgCl_2$, 0,25 мМ dNTP, 0,2 мкМ

праймера, 2 од. Taq-полімерази, 50 нг бактеріальної ДНК. ПЛР проводили на ампліфікаторі "Eppendorf" у такому температурному режимі: початкова денатурація — 5 хв за температури 95 °С; 35 циклів: 30 с за 94 °С, 40 с за 39 °С, 45 с за 72 °С; термінальна елонгація — 7 хв за 72 °С. Ампліфікація з кожним із праймерів була здійснена щонайменше в двох повторностях.

Таблиця 2

Нуклеотидні послідовності праймерів

Table 2

Nucleatide sequences of primers

OPJ	CCACACTACC
BL26	GTAGCTGACG
OPD01	ACCGCGAAGG
OPD04	TCACGTCCAC
OPG08	TCTGGTGAGG

Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР проводили в 1,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мкл), протягом 2 годин, при напрузі 3 В/см довжини гелю.

Визначення довжин ампліконів в гелі здійснювали за допомогою програми Gel-Pro Analyzer 4,5, порівнюючи їх із маркером молекулярної маси O'GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). При обчисленні результатів гель-електрофорезу враховували лише ті смуги, інтенсивність яких сягала не менше 2,5% від максимальної. Спорідненість зразків ДНК визначали за часткою ампліконів однакової довжини, користуючись коефіцієнтом Джакарда. Кластерний аналіз, використовуючи незважений парногруповий метод із арифметичним усередненням (UPGMA), і побудову дендрограми проводили за допомогою програми DendroUPGMA (http://genomes.urv.cat/UPGMA/) [12].

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження проводили на 9 штамах *R. solanacearum*, представників різних біоварів (табл. 1), з різних географічних зон. З Міжнародної колекції фітопатогенних бактерій (ICMP) одержані 7 з досліджуваних штамів, а 2 — з колекції мікроорганізмів відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України. Раніше [13] була вивчена структура О-специфічних полісахаридів ЛПС ряду штамів *R. solanacearum*. Встановлено, що за моносахаридним складом вони можуть бути віднесені до 4-х груп, причому 5 штамів є представниками 1-ої і 2-ої групи, а 3-я і 4-а представлені

тільки по одному штаму. Разом з тим, було встановлено 6 різних типів структур. Показано:

1) ОПС ряду штамів характеризуються лінійними структурами з тетрасахаридними ланцюгами, які включають три залишки L-Rha і один залишок GlcNAc (структури 1 і 2, штами 7859, 8202, 7864). Різниці в структурах обумовлені конфігурацією (α- або β-) (структури 1 і 2) GlcNAc або типом його зв'язку (1—2) (структура 1) або (1—3) (структура 2) з сусіднім залишком рамнози.

2) ОПС штаму 5712 (структура 3) характеризується розгалуженим пентасахаридним ланцюгом, який представляє ксилозильовану форму структури 2, а ОПС штаму 7944 — рамнозильовану форму структури 1 (структура 6).

3) Структури ОПС ЛПС двох штамів принципово відрізняються від всіх досліджених штамів: вони представлені трисахаридними ланцюгами — лінійними (шт. 8089, структура 7), які містять два залишки D-Rha, в той час як у ОПС інших штамів присутня L-Rha, а також один залишок GalNAc, або розгалуженим трисахаридом (шт. 4157, структура 8), який включає залишки GlcNAc, GalNAc, а також D-Ara як латеральний замісник.

Своєрідність жирнокислотного складу є одним з додаткових хемотаксономічних критеріїв при диференціації видів. Дослідження ліпідів А ЛПС *R. solanacearum* 8089 і 4157 свідчать, що, на відміну від інших досліджених штамів [14], в їх складі присутні 3-гідроксидеканова і 3-гідроскидодеканова кислоти.

Одним із методів, який на сьогодні широко використовується для диференціації штамів та встановлення рівня генетичної спорідненості між ними, є фінгерпринтинг на основі полімеразної ланцюгової реакції. Ампліфікація довільних ділянок ДНК прокаріот з декамерними праймерами (RAPD-аналіз), як один із найдавніших методів ПЛР, довів свою ефективність та прикладну значимість в широкій області популяційних досліджень.

В результаті ПЛР із п'ятьма декамерними праймерами, два з яких — OPD01 та OPJ, характеризувалися низькою інформативністю, були вибракувані і в подальшій роботі не використовувалися.

Сумарним продуктом ПЛР ДНК 9-ти штамів *R. solanacearum* із праймерами BL26, OPD04, OPG08 стали 52 фрагменти, молекулярна маса яких знаходилася в діапазоні 55—2700 нуклеотидних пар (п.н.). Спільні для двох і більше зразків продукти реакції становили трохи більше 55% від загальної кількості смуг. Жоден із ампліконів не був мономорфним, що свідчить про значну генетичну гетерогенність в межах досліджуваної групи штамів (рис. 1).

Отримані кількісні значення подібності між штамами, розраховані згідно коефіцієнту Джакарда, не перевищували 35%. Розрив із теоретичним пороговим, для організмів одного виду, значенням 70% пояснюється

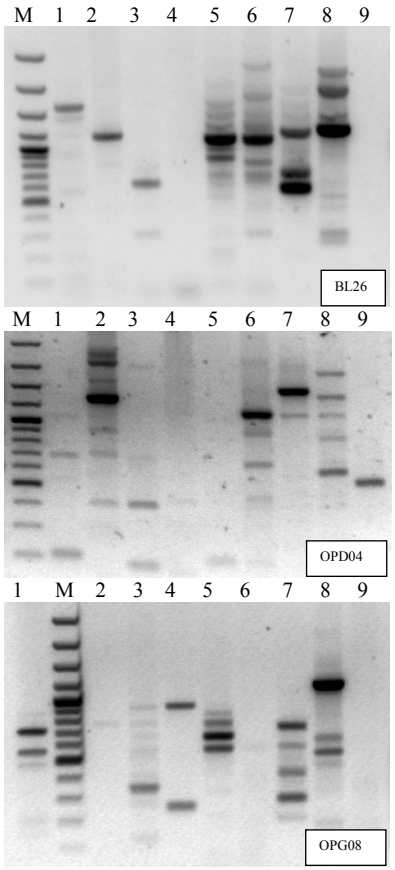

Рис.1. Електрофореграми RAPD-ПЛР штамів *R. solanacearum*:
5712 (1), 8202 (2), 8089 (3), 35 (4), 7954 (5), 4 (6), 7944 (7), 7864 (8), 7859 (9),
M-маркер молекулярної маси

Fig 1. RAPD-PCR electrophoretic patterns of *R. solanacearum* strains:
5712 (1), 8202 (2), 8089 (3), 35 (4), 7954 (5), 4 (6), 7944 (7), 7864 (8), 7859 (9),
M-DNA ladder

обмеженим числом об'єктів дослідження (згідно стандартів Європейської дослідної комісії епідеміологічних маркерів (ESGEM) їх повинно бути не менше 100) [15]. Однак, часто на практиці, репрезентативні результати можуть бути отримані і для невеликої популяції бактерій, зокрема в клінічних дослідженнях близькоспоріднених ізолятів. Так, RAPD-профілі 14 ізолятів *Salmonella enterica* різних серотипів, виділених протягом 15 років, характеризувалися наявністю мономорфних смуг [16]. В той же час, за результатами фінгерпринтингу 46 штамів *R. solanacearum,* середнє значення генетичної спорідненості між ними становило 56% [9].

Іншим фактором, що впливає на репрезентативність електрофоретичних профілів RAPD-ПЛР генотипу дослідного штаму, є генетична стабільність ампліфікованих ділянок ДНК. Проблема полягає в тому, що

неможливо встановити: належали сайти гібридизації праймерів до робочих генів чи некодуючих мобільних генетичних елементів. Ампліфікація останніх може бути причиною завищення реальних філогенетичних дистанцій між об'єктами дослідження [17]. Проблема вирішується збільшенням числа RAPD-праймерів, що використовуються для дослідження певної групи мікроорганізмів. Однак, використання навіть 30 довільних декамерних праймерів при вивчені локальної популяції *R. solanacearum* в межах одного агроценозу, виявило середнє значення генетичної спорідненості між ізолятами – 60%. У цій же роботі, генетичні дистанції клонової лінії, між вихідною культурою і бактеріями дев'ятої генерації на штучних поживних середовищах, сягала 30% [18]. Всі ці дані вказують на виражену генетичну нестабільність та високі темпи еволюції, характерні для виду. Той факт, що для штамів *R. solanacearum* фенотиповий прояв мінливості виражений меншою мірою [19], свідчить про участь некодуючих ділянок ДНК в пластичності геному.

Побудована за результатами RAPD-аналізу дендрограма представлена двома основними кластерами (рис. 2). В першому кластері виділяється дві підгрупи: одна з них утворена штамами 7859, 7944 і 7864 — представниками біовару 1, до якого належить і 5712, що виділяється окремою гілкою в кластері. Друга підгрупа об'єднує шт. 8202 (біовар 4) і шт. 4 (біовар не встановлений). Другий кластер містив штами 8089, 7954 (біовари 3 і 2, відповідно) і 35 (біовар не встановлений).

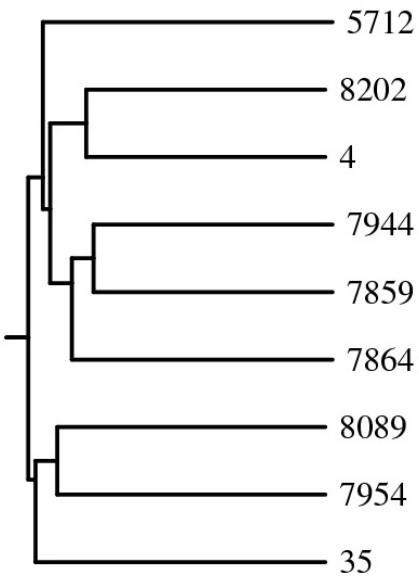

Рис. 2. Дендрограма, побудована на основі аналізу генетичних дистанцій між 9 штамами *R. solanacearum* з використанням методу UPGMA

Fig. 2. Dendrogram constructed by using of UPGMA method, showing correlation between RAPD-PCR profiles of 9 *R. solanacearum* strains

Те, що штами із першим типом структури ОПС — 7859 і 8202, чи його варіації (шт.7944), знаходяться в одному кластері RAPD дендрограми, не дає підстав говорити про кореляцію між вказаними класифікаційними схемами. Це підтверджується тим, що серед отриманих, відсутні унікальні амплікони для носіїв першої структури ЛПС, а праймер OPD04 для ДНК штамів 7859 і 8202 взагалі не утворив однакових за довжиною продуктів реакції (рис. 3). Поряд з цим, шт. 8089, який вирізняється серед більшості унікальністю жирнокислотного складу та структурою ОПС, виявився генетично тотожним дослідним штамам *R. solanacearum*.

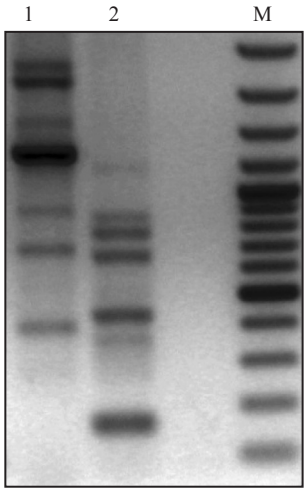

Рис. 3. RAPD-профілі *R. solanacearum*, утворені праймером BL26 штамів: 7859 (1), 8202 (2), М — маркер молекулярної маси

Fig. 3. RAPD-PCR profiles generated with primer BL26 of *R. solanacearum* strains: 7859 (1), 8202 (2), M — DNA ladder

Таким чином проведена RAPD-ПЛР дала змогу здійснити кластеризацію 9 штамів *R. solanacearum*. Згідно отриманих результатів, штами першого біовару проявили генетичну спорідненість. Розкриття глибшої кореляції між фенотиповими властивостями бактерій та генетичними дистанціями між ними обмежується кількістю об'єктів дослідження за високих значень їхньої внутрішньовидової гетерогенності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Remenant B., Coupat-Goutaland B., Guidot A., Cellier G., Wicker E., Allen C., Fegan M., Pruvost O., Elbaz M., Calteau A., Salvignol G., Mornico D., Mangenot, Remenant B., Barbe V., Mŭdigue C., Prior P. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence // BMC Genomics. — 2010. — V. 11. — P. 379–395.

2. Poussier S., Vandewalle P., Luisetti P. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hrp gene region // Appl. Environ. Microbiology. — 1999. — Vol. 65. — P. 2184—2194.

3. Norman D.J., Zapata M., Gabriel D.W., Duan Y.P., Yuen J.M., Mangravita-Novo A., Donahoo R.S. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America // Phytopathology. — 2009. — V. 99. — P. 1070—1077.

4. Винарская Н.В., Варбанец Л.Д. Химическая характеристика и серологическая активность липополисахаридов *Pseudomonas solanacearum* // Микробиологический журнал. — 2002 — № 1. — С. 37—47.

5. Москаленко Н.В. Структурно-функціональні дослідження ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* : Автореф. дис. ... канд. біол. наук, К., 1999. — 21 с.

6. He Z.F., Yu H. and Luo F.F. Differentiation of pathogenicity and RAPD analysis of *Ralstonia solanacearum* in Guangdong // Acta Phytopathol. Sin. — 2003. — V. 33. — P. 415—420.

7. Pacheco A.B., Guth B.E., Soares K.C., Nishimura L., de Almeida D.F., Ferreira L.C. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans // J. Clin. Microbiol. — 1997. — V. 35. — P. 1521—1525.

8. Theophilo G.N. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. o Paulo. — 2006. — V. 48. — P. 65—70.

9. Jaunet T.X., Ddos R.P., Leal N.C., Hofer E., Jaunet T.X., Wang J.F. // Rev. Inst. Med. Trop. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan // Phytopathology. — 1999. — V. 89. — P. 320—327.

10. Rapley R. The nucleic acid protocols handbook // Totowa: Humana Press Inc. — 2000. — 1002 p.

11. Seal S.E., Jackson L.A., Young J.P., Daniels M.J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction // J. Gen. Microbiol. — 1993. — V. 139. — P. 1587—1594.

12. Garcia-Vallve S., Palau J., Romeu A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // Molecular Biology and Evololution. — 1999. — V. 9. — P. 1125—1134.

13. Kocharova N.A., Knirel Yu.A., Varbanets L.D., Moscalenko N.V., Brovarskaya O.S., Muras V.A., Young J.M. Studies of O-specific polysaccharide chains of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharides consisting

of structurally different repeating units//Carbohydr. Res. — 1993. — V. 250, N 1. — P. 277—285.

14. Вінарська Н.В. Залежність біологічної активності ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) від їх складу і струкутрних особливостей//Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2002. — 21 с.

15. Dijkshoorn L., Towner K.J. and *Struelens M.* New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. — Amsterdam: ELSEVIER, 2001. — 371 p.

16. *Tikoo A., Tripathi S., Verma C., Agrawal N., Gopal Nath A.K.* Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of Salmonella isolates // Curr Sci. — 2001. — V. 80. — P. 1049—1053.

17. Gürtler V., Mayall B.C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates // Int. J. Syst Evol. Microbiol. — 2001. — V. 51. — P. 3—16.

*18. Grover A., Azmi W., Gadewar A.V., Pattanayak D., Naik P.S., Shekhawat G.S., Chakrabarti S.K.*Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers // J. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 101. — P. 798—806.

19. Stevens P., van Elsas J.D. Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains obtained from Dutch waterways // Antonie Van Leeuwenhoek. — 2010 — V. 97. — P. 171—188.

Р.В. Грицай[1,2], Л.Д. Варбанец[1], О.С. Броварская[1], Н.В. Житкевич[1], Т.Н. Олейник[2]

[1]Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП Д03680, Украина, тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

[2]Институт картофелеводства НААН Украины, ул. Чкалова, 22, пгт. Немишаево, Киевская обл., 07853, Украина, тел. 0457741542.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ШТАММОВ *RALSTONIA SOLANACEARUM* НА ОСНОВЕ RAPD-ПЦР АНАЛИЗА

Реферат

Проанализировано 9 штаммов *Ralstonia solanacearum* Международной коллекции фитопатогенных бактерий, а также коллекции отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного с использованием RAPD-ПЦР анализа. Согласно

полученным результатам показан высокий уровень генетической гетерогенности объектов исследования и построена дендрограмма, которая отображает генетические дистанции между штаммами. Распределение штаммов по кластерам дендрограммы выявило определенную закономерность для представителей первого биовара. Среди амплифицированных последовательностей не выявлено таких, которые коррелируют с детерминацией хемотипа липополисахарида.

Ключевые слова: RAPD-ПЦР, *Ralstonia solanacearum*, генетические дистанции, липополисахарид.

R.V. Grytsay[1,2], L.D. Varbanets[1], O.S. Brovarska[1], N.V. Zhytkevytch[1], T.N. Oliynyk[2]

[1] Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academician Zabolotny str., Kyiv, D03680, Ukraine
[2]Institute for potato Research, NAAS of Ukraine, 22,Chkalova str., Nemishaeve, Kyiv region, 07853, Ukraine

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF *RALSTONIA SOLANACEARUM* STRAINS USING RAPD-PCR

Summary

There were analysed 9 strains of *Ralstonia solanacearum*, obtained from New Zealand collection and collection of the Department of phytopathogenic bacteria of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology on the basis of RAPD-PCR. According to the obtained results high level of genetic diversity was established and phylogenic tree was constructed. The distribution of the strains into genetic clusters shown similarity between the strains of biovar 1. No association was found between amplified sequences and determination of lipopolysaccharide chemotypes.

Key words: RAPD-PCR, *Ralstonia solanacearum,* genetic distances, lipopolysaccharide.