

ДАНКЕВИЧ Л.А.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: ldankevich@ukr.net, (066) 100-88-62,
(044) 526-23-89

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*, ЩО УРАЖУЮТЬ БОБОВІ КУЛЬТУРИ

Мета. З метою коректної внутрішньовидової ідентифікації та оцінки групової гетерогенності було проведено фінгепринтування геномів ізольованих нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*», а також типових представників роду *Pseudomonas*, що уражують бобові культури. **Методи.** В ході досліджень було використано мікробіологічні, молекулярно-генетичні (REP-ПЛР) методи та методи молекулярної філогенетики (UPGMA). **Результати.** Оцінена генетична гетерогенність ізольованих нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*» штамів. Встановлено спорідненість ізольованих нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*» з типовими представниками виду *Pseudomonas syringae*, патогенними для бобових культур за BOX, REP та ERIC профілями. **Висновки.** BOX, ERIC і REP-профілювання геному збудника бурої бактеріальної плямистості люпину виявило значну його генетичну гетерогенність (від 20 до 50 %) та спорідненість із представниками виду *Pseudomonas syringae*.

Ключові слова: ідентифікація, генетична гетерогенність, REP-ПЛР, збудник бурої бактеріальної плямистості люпину.

Як відомо, до групи зернових бобових культур належать горох, сочевиця, квасоля, чина, соя, нут, кормові боби, люпин, маш, арахіс, вігна. Ці рослини є представниками родини *Fabaceae* і цінними продовольчими, кормовими культурами. В Україні зернобобові культури вирощують на всій території з переважанням у Лісостепу та на Поліссі холодостійких і вологолюбних (горох, кормові боби, сочевиця, люпин), у Степу – посухостійких (нут, чина, соя), в усіх зонах – квасолі. Зернобобові відіграють важливу роль у поліпшенні родючості ґрунтів, особливо бідних дерново-підзолистих, піщаних і супіщаних ґрунтів Полісся України. Вони характеризуються цінною здатністю зв'язувати вільний азот повітря за допомогою бульбочкових бактерій і збагачують ґрунт на азотні сполуки.

Крім того, серед зернобобових є група рослин (люпин, кормові боби, горох), коренева система яких добре засвоює поживні речовини (особливо фосфор) з важкорозчинних сполук ґрунту, що дає змогу економити частину фосфорних добрив без зниження їх урожайності. Крім того, кормові люпини, кормові боби і соя є важливими сидератними культурами, які часто висівають у багатокомпонентних сумішах із кукурудзою, бобами, суданською травою.

Останнім часом зміна екологічних умов існування мікроорганізмів призводить до зміни їх властивостей, що дозволяє останнім займати не характерні для них раніше екологічні ніші. Ця тенденція не оминула і патогенні для рослин бактерії. Зокрема, фітопатологи констатують розширення патогенними бактеріями, які мають як поліфагову, так і монофагову природу, спектра уражуваних рослин та підвищення рівня агресивності тих бактерій, що раніше вважалися умовно патогенними [1]. Наприклад, відомо, що в Україні основними збудниками бактеріальних хвороб сої є: *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (кутаста плямистість), *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (пустульний бактеріоз). Крім того, сою також здатні уражувати *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (дикій опік), *Ralstonia solanacearum* (бактеріальне в'янення). Але в останні десятиліття українські дослідники виявили ураження сої *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (іржаво-бура плямистість) та *Pantoea agglomerans* (бактеріальна смугастість стебла) [2, 3]. Крім того, попередньо нами відзначено збільшення ураження збудниками бактеріальної етіології люпину – другої після сої зернобобової культури, що відзначається найвищим вмістом білка в насінні. Відомо, що останнім часом сидератні культури «гіркі» люпини (високий вміст алкалоїдів) втратили своє значення і замінені кормовими люпинами (відсутність або низький вміст алкалоїдів), які водночас є високобілковим кормом для худоби (дозріле зерно або зелена маса) і поліпшують

родючість ґрунту. Разом із цим нами виявлено залежність ураження різних сортів люпину окремими збудниками бактеріальних хвороб від вмісту у них алкалоїдів, а саме: безалкалоїдні – чутливі, мало- та високоалкалоїдні – відносно резистентні [4]. Слід також зазначити, що збудники бактеріальних хвороб люпину є мало дослідженими. Так, І.Б. Корольовою виявлено, що серед збудників бактеріозів найбільшої шкоди люпину у 1963–1965 рр. завдавали бактерії родів *Pseudomonas* та *Erwinia*. На думку І.Б. Корольової та К.І. Бельтюкової [5, 6], до найбільш шкідливих захворювань люпину належить бура бактеріальна плямистість, яка спричиняється «*Pseudomonas lupini*» та знижує врожайність цієї культури на 25–30 %. Оскільки відповідно до вимог сучасної таксономії, легітимність такого виду не підтверджена [7], нами попередньо було проведено його поліфазну таксономію та встановлено, що за комплексом ознак фенотипу і генотипу (спорідненість нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК) досліджувана група штамів належить до видів *P. syringae* і *P. savastanoi* [4]. Відомо, що окреслені види мають розгалужену внутрішньовидову структуру, оскільки об'єднують у своєму складі велику кількість патоварів, що здатні уражувати широке коло рослин [7]. Зважаючи на популярність люпину як сидератної культури коректна ідентифікація збудників основних його хвороб є ключовим фактором запобігання їх розповсюдження. Наш вибір припав на REP-ПЛР (Repetitive element PCR fingerprinting), оскільки цей метод, згідно з даними літератури, часто використовується не тільки для оцінки генетичної гетерогенності патогенних для рослин видів роду *Pseudomonas*, а й у поліфазній таксономії окремих таксонів досліджуваної групи бактерій [8, 9].

Саме тому метою наших досліджень було фінгепринтування геному за допомогою REP-ПЛР ізольованих нами штамів і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*», а також типових представників роду *Pseudomonas*, що уражують бобові культури, для оцінки гетерогенності цієї групи та можливої їх експрес-ідентифікації.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були 3 ізольовані нами з уражених тканин люпину у 2004–2006 роках на території України і Росії штами *Pseudomonas* sp., а також 5 колекційних, ізольованих І.Б. Корольовою у 1963 р. на території України штамів «*Pseudomonas lupini*». У роботі також

використали: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T (NCPPB 281 – National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland), ICMP 3023 (International Collection of Microorganisms From Plant, New Zealand), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177^T (ICMP 2452, NCPPB 2585), *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^T (NCPPB 639, ICMP 4352), *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123^T (NCPPB 52, ICMP 2740), *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571 (NCPPB 1139). Штами культивували на картопляному агарі протягом 24 годин за 28°C.

Виділення та очищення бактеріальної ДНК проводили з використанням набору реактивів «ДНК-сорб-В». Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометра Bio-Photometer. У роботі використали такі універсальні праймери:

REP 1R -5'-*IIIICGICGICATCIGGC*-3';
 REP 21 -5'-*ICGICTTATCIGGCCTAC*-3';
 ERIC 1R -5'-*ATGTAAGCTCCTGGATTAC*-3';
 ERIC 2 -5'-*AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG*-3';
 BOX A1R -5'-*CTACGGCAAGGCGACGCTGACG*-3'.

Ампліфікування проводили з використанням термоциклера Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902 фірми Applied Biosystems (США) за експериментально підібраних умов. Зокрема, для досліджуваних штамів роду *Pseudomonas*: додаткова денатурація ДНК – 96°C/6 хв. та основна денатурація ДНК – 94°C/1 хв. (однакова для всіх видів REP-ПЛР); відпалювання праймерів – 44°C/1 хв. (REP– ПЛР з REP праймерами), 52°C/1 хв. (REP– ПЛР з ERIC праймерами) та 53°C/1 хв. (REP– ПЛР з BOX праймерами); елонгація ДНК – 72°C/2 хв. (однакова для всіх видів ПЛР реакції) і завершальний синтез ДНК – 65°C/8 хв. (однаковий для всіх видів REP– ПЛР). Продукти реакції розподіляли у 1,5 % агарозному гелі протягом 4 годин за напруженості електричного поля 1,5 В/см. Для візуалізації одержаних генетичних профілів використовували гель-док Universal Hood II фірми Applied Biosystems (США). Спорідненість одержаних REP, ERIC та BOX профілів оцінювали візуально та аналізували за допомогою програмного забезпечення GeneTools 1.6.1 фірми SynGene (США). Дослідження проводилися на базі Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК. Побудову дендрограм спорідненості (кластерних алгоритмів) проводили з використанням комп'ютерної програми DENDRO UPGMA (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>). Ця

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 відстані (Distance matrix), розраховані на основі коефіцієнта Жакарда.

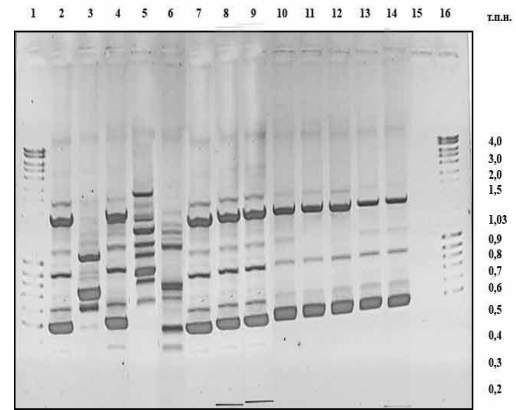
Результати та обговорення

У результаті проведених досліджень отримано BOX, REP та ERIC профілі ізольованих нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*» а також типових представників роду *Pseudomonas*, що уражують бобові культури (рис. 1).

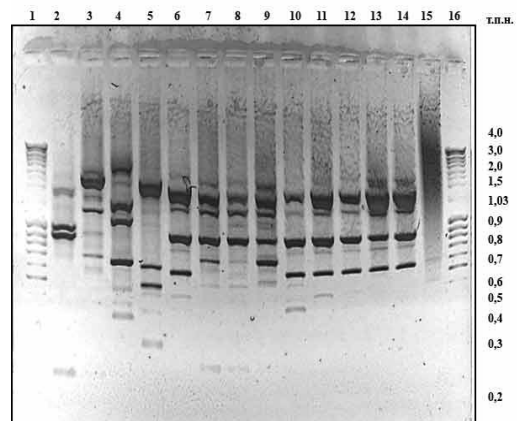
Зокрема, у BOX профілях (рис. 1 а) ізольованих нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*», а також типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T виявлено 9 спільних ДНК фрагментів молекулярною вагою 350, 400, 500, 600, 700, 900, 1000, 1300, 1500 і 2000 н.п. Слід зазначити, що фрагменти розміром 600, 700, 1300, 1500 і 2000 н.п. виявлені у всіх досліджуваних штамів та типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T. Решта детектованих у BOX профілях фрагментів ДНК характерна для окремих груп штамів.

Виявлений нами факт не суперечить даним літератури, згідно з якими у профілях групи штамів *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* присутні як спільні, так і штам-специфічні фрагменти [9]. Аналіз результатів BOX профілювання виявив достатньо високий рівень гетерогенності (близько 33,4 %) збудника мокрого водянистого гниття люпину.

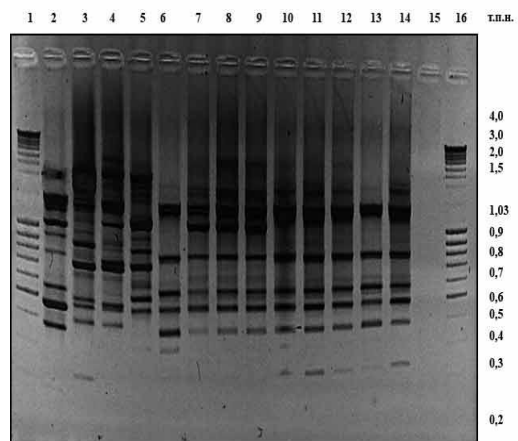
Як видно з дендрограми (рис. 2 а) у досліджуваній групі штамів, що викликають бурю бактеріальну плямистість люпину присутня значна гетерогенність BOX профілів. Зокрема, штамми, досліджувані «*Pseudomonas lupini*», утворили дві групи, що водять до складу одного кластеру. Також до складу цього кластеру увійшли такі типові штамми: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177^T, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^T. Натомість, штамми *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123^T та *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571 генетично уособлені від штамів, що викликають бурю бактеріальну плямистість люпину.



а



б



в

Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР з BOX(а), REP(б) і ERIC (в) праймерами: 1, 16 – маркери молекулярних мас; 2 – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T (а, в) та *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177^T(б); 3 – *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123^T та *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177^T (а); 4 – *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^T; 5 – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T (б), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177^T (в), *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571 (а); 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 – «*Pseudomonas lupini*» 8531, 8532, 8533, 8534, 8535, 17, 6, 5; 11 – негативний контроль.

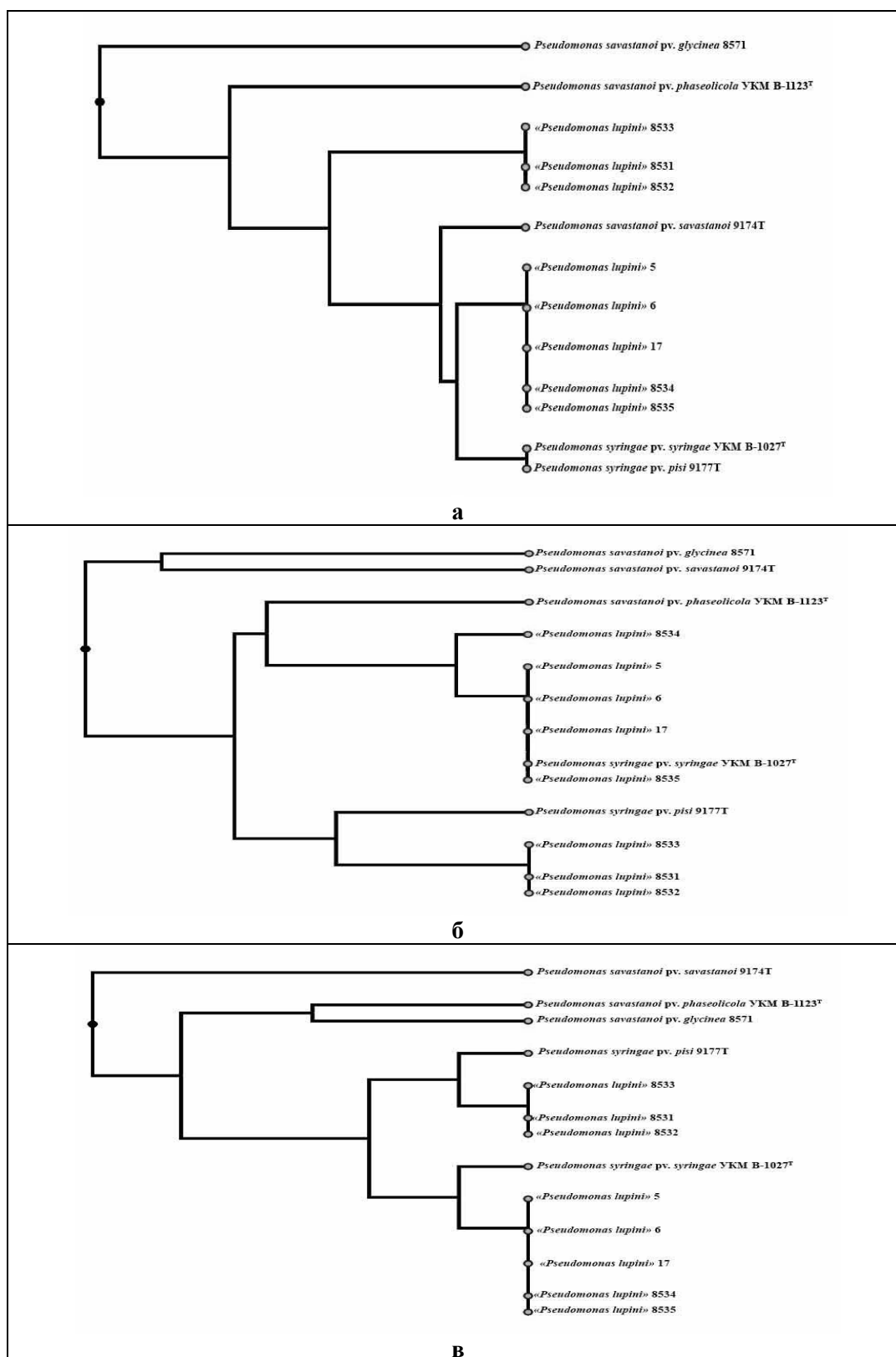


Рис. 2. Дендрограма спорідненості (кластерний алгоритм), побудована за результатами BOX (а), REP (б) та ERIC (в) профілювання ізолюваних нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*» і типових штамів видів *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*. Когенетичний кореляційний коефіцієнт (СР)=0,96-0,98.

У REP профілях (рис. 1 б) ізольованих нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*», а також типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T виявлено 10 спільних ДНК фрагментів молекулярною вагою 100, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1500, 1800 та 2000 н.п. Як і у випадку з BOX профілюванням частина детектованих продуктів ПЛР з REP праймерами є спільною для досліджуваних штамів «*Pseudomonas lupini*» та типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T. Так, спільними для цієї групи штамів виявилися 5 ДНК фрагментів молекулярною вагою 800, 900, 1500, 1800 та 2000 н.п. Аналіз результатів досліджень встановив ще більший відсоток гетерогенності REP профілів (близько 50 %) порівняно з аналогічним аналізом BOX профілів.

Відмічені нами закономірності REP профілів ізольованих нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*» узгоджуються з результатами UPGMA аналізу. Як видно з дендрограми (рис. 2 б), досліджувані штами утворили дві групи, близькоспоріднені з типовими штамми *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177^T. Також до складу цього кластеру увійшов штам *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123^T. Натомість штами *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^T та *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571 утворили окремий кластер, що свідчить про їх генетичну дистантність.

У ERIC профілях (рис. 1 в) ізольованих нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*», а також типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T виявлено 10 спільних ДНК фрагментів молекулярною вагою 200, 400, 500, 600, 800, 1000, 1300, 1500, 1800, 2000 н.п. Необхідно зазначити, що 400, 500, 800, 1300, 1500, 1800, 2000 н.п. виявилися спільними для аналізованої групи штамів. Аналіз ERIC виявив найнижчий рівень гетерогенності порівняно з результатами профілів BOX і REP профілювання (близько 20 %) збудника бурої бактеріальної плямистості люпину.

Встановлені нами особливості ERIC-профілів досліджуваних штамів цілком узгоджуються з результатами UPGMA аналізу, в результаті якого досліджувані штами збудника бурої бактеріальної плямистості люпину сформували дві групи, близькоспоріднені з типовими штамми: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177^T. Як видно з дендрограми (рис. 2 в), штами *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123^T, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571 та *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 9174^T є значно генетично уособленими від досліджуваної групи штамів.

Висновки

Отже, в результаті BOX, ERIC і REP-профілювання збудника бурої бактеріальної плямистості люпину встановлена його значна генетична гетерогенність (від 20 до 50 %) та спорідненість із представниками виду *Pseudomonas syringae*. Одержані нами результати корелюють із попередніми нашими дослідженнями спорідненості нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК, згідно з якими більшість із досліджуваної групи штамів належить до виду *P. syringae*. Але окремі штами виявили дещо вищий ступінь спорідненості нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК з окремими представниками виду *P. savastanoi* [4]. Зважаючи на відому з літератури значну філогенетичну спорідненість цих видів [7] встановлення внутрішньовидового статусу збудника бурої бактеріальної плямистості люпину за цією ознакою є проблемним. Необхідно також зазначити, що значна гетерогенність BOX, ERIC і REP профілів ізольованих нами і колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*» також робить це питання вкрай заплутаним. Отже, для остаточної внутрішньовидової ідентифікації збудника бурої бактеріальної плямистості люпину необхідне вивчення окремих, специфічних для патогену, факторів патогенності.

Література

1. Patyka V.P. Phytopathogenic Bacteria in Contemporary Agriculture. *Microbiologichny zhurnal*. 2016. Т. 78, № 6. С. 71–83.
2. Patyka W., Gnatiuk T., Zhytkevych N., Kalinichenko A. Occurrence of the pathogenic bacteria *Pantoea agglomerans* in soybean cultivation. *Progress in Plant Protection*. 2015. Vol. 55, No. 3. P. 280–285.
3. Житкевич Н.В., Новошацький Л.М., Данкевич Л.А., Гнатюк Т.Т. *Curtobacterium flaccumfaciens* – новий збудник захворювання сої в Україні. XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Винограцького: тези доповідей (Ужгород, 25–30 трав. 2009 р.). Ужгород: Ужгородський національний університет, 2009. С. 303.
4. Данкевич Л.А. Фенотипні та генотипні властивості збудника бурої бактеріальної плямистості люпину. *Микробиол. журн.* 2006. Т. 68, № 6. С. 20–27.

5. Бельтюкова К.И., Королева И.Б., Мурас В.А. Бактериальные болезни зерно – бобовых культур. К.: Наукова думка, 1974. 39 с.
6. Гвоздяк р.І., Пасичник 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. К.: ТОВ "НВП "Інтерсервіс", 2011. 444 с.
7. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York USA: Springer Science+ Business Media, 2005. 689 p.
8. 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. Vol. 37. P. 81–125.
9. 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. Vol. 60, No. 7. P. 2286–2295.

References

1. Patyka V.P. Phytopathogenic Bacteria in Contemporary Agriculture. *Microbiologichny zhurnal*. 2016. Т. 78, № 6. С. 71–83.
2. Patyka W., Gnatiuk T., Zhytkevych N., Kalinichenko A. Occurrence of the pathogenic bacteria *Pantoea agglomerans* in soybean cultivation. *Progress in Plant Protection*. 2015. Vol. 55, N. 3. P. 280–285.
3. Zhytkevych N.V., Novoxaczky L.M., Dankevych L.A., Gnatiuk T.T. *Curtobacterium flaccumfaciens* – novy j zbudny k zavvoryuvannya soyi v Ukraini. XII z'yizd Tovarystva mikrobiologiv Ukrainy im. S.M. Vy nogradz kogo: tezy dopovidej (Uzhgorod, 25–30 trav. 2009 r.). Uzhgorod: Uzhgorods'kyj nacional'nyj universytet, 2009. S. 303.
4. Dankevych L.A. Fenoty pni ta genoty pni vlasty vosti zbudny ka buroyi bakterial'noyi plyamy stosti lyupy nu. *Mykrobyol. zhurn.* 2006. Т. 68, # 6. S. 20–27.
5. Bel'tyukova K.Y., Koroleva Y.B., Muras V.A. Baktery al'nye bolezny zerno – bobovy x kul'tur. K.: Naukova dumka, 1974. 39 s.
6. Gvozdyak R.I., Pasichnyk L.A., Yakovleva L.M., Moroz S.M., Ly'tvy'nychuk O.O., Zhytkevych N.V., Xodos S.F., Bucenko L.M., Dankevych L.A., Gry'nyy'k I.V., Paty'ka V.P. Fitopatogenni bakteriyi. Bakterial'ni xvoroby rosly'n. K.: TOV "NVP "Interservis", 2011. 444 s.
7. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York USA: Springer Science+ Business Media, 2005. 689 p.
8. 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. Vol. 37. P. 81–125.
9. 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. Vol. 60, N. 7. P. 2286–2295.

DANKEVICH L.A.

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

GENETIC PROFILING OF BACTERIA BELONGS TO GENUS PSEUDOMONAS, WHAT AFFECTS LEGUMES

Aim. For the purpose of correct inter species identification and estimation of group's heterogeneity, the genome fingerprinting of isolated by us and collection "*Pseudomonas lupini*" strains as well as typical representative of genus, affecting legumes, has been carried out. **Methods.** In the course of research, microbiological, molecular genetic (REP-PCR) methods and method of molecular phylogenetics (UPGMA) were used. **Results.** The genetic heterogeneity of isolated and collections "*Pseudomonas lupini*" strains has been estimated. A relationship between isolated and collections "*Pseudomonas lupini*" strains with the typical *Pseudomonas syringae* strains, affecting legumes, for BOX, REP and ERIC profiles has been determined. **Conclusions.** BOX, ERIC and REP-profiling of the genome of the agent of lupines' brown spottiness revealed significant genetic heterogeneity of its population (from 20 to 50 % of heterogeneity) and close similarity of this pathogen to representatives of the species *Pseudomonas syringae*.

Keywords: identification, genetic heterogeneity, REP-PCR, causative agent of lupines' brown spottiness.