

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

ПЛР-ІДЕНТИФІКАЦІЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *PECTOBACTERIUM* ЗБУДНИКІВ М'ЯКОГО ГНИТТЯ І В'ЯНЕННЯ ОГІРКІВ (*CUCUMIS SATIVUS*) В УКРАЇНІ

Мета. З метою коректної видової ідентифікації ізолюваних нами *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» штамів і типових представників окремих видів родів *Pectobacterium* і *Dickeya* було проведено ПЛР детектування окремих видоспецифічних ділянок їхнього геному. **Методи.** У ході досліджень було використано мікробіологічні і молекулярно-генетичні (ПЛР) методи. **Результати.** Ампліфіковано специфічний продукт ПЛР розміром 434 н.п. у геномі ізолюваних нами *Pectobacterium* sp., колекційних «*E. toxica*» та типових *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В1075^Т і *P. atrosepticum* УКМ В-1084^Т штамів. Натомість ДНК-фрагмент розміром 690 н.п. був детектований виключно у геномі типового *P. atrosepticum* УКМ В-1084^Т штаму і відсутній як у штамів збудників судинного бактеріозу огірків так і типового штаму *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В1075^Т. **Висновки.** ПЛР детектування специфічних ДНК-фрагментів дозволило нам остаточно з'ясувати питання видового статусу збудника судинного бактеріозу огірків і віднести його до виду *P. carotovorum*.

Ключові слова: ідентифікація, збудник судинного бактеріозу огірків.

Загальновідомо, що ключовою запорукою високої врожайності сільськогосподарських культур є запобігання їх ураження збудниками різної етіології. Рослини у закритому ґрунті не складають виключення. Ситуація ускладнюється тим, що інтенсивне пестицидне навантаження, відсутність коректної сівозміни, використання обмеженої кількості сортів і видів рослин, виснаження ґрунту та збільшення його фітотоксичності призводять до стрімкого розповсюдження хвороб. Серед бактерій, що завдають шкоди овочівництву у закритому ґрунті, зокрема представникам родини *Cucurbitaceae*, ключове місце займають бактерії родів *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Dickeya* [1]. Пектолітичні бактерії до

яких відносять окремих представників родів *Pectobacterium* і *Dickeya* спричиняють найбільш масові ураження рослин в тепличних господарствах. Патогенність даних бактерій значною мірою пов'язана зі здатністю продукувати пектолітичні ферменти, що спричиняють мацерацію рослинних тканин викликаючи симптоми м'якого гниття [1, 2]. Крім того, на початку 70-років у чисту культуру було виділено збудника судинного бактеріозу огірків і ідентифіковано його як новий вид «*Erwinia toxica*» [1]. Згодом нами проведено рекласифікацію даного виду і показано високу спорідненість (97-99%) нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК з представниками видів *P. carotovorum* (subsp. *carotovorum*, *odoriferum*, *brasiliensis*), *P. atrosepticum*, *P. betavascularum*, *P. wasabiae*, *P. aroidearum* [3]. Також проведено REP-ПЛР профілювання геному ізолюваних *Pectobacterium* sp. та колекційних «*Erwinia toxica*» штамів і встановлено значну їх спорідненість із типовим штамом *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075^Т за BOX, REP та ERIC профілями [4]. Зважаючи на згадані вище умови закритого ґрунту та стрімке розповсюдження патогенів вчасна і коректна видова діагностика найбільш шкочинних збудників бактеріальних хвороб огірків є вкрай важливою.

Традиційно для ідентифікації ізолюваних пектобактерій використовуються біохімічні, фізіологічні та серологічні тести. Однак, штамова варіабельність і наявність перехресних реакцій у імунологічних дослідженнях не завжди дозволяє чітко ідентифікувати збудника. Тому, останнім часом для швидкої і коректної діагностики збудників використовується підходи, що базуються на полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР). Порівняно з іншими ці методи значно спрощують і підвищують чутливість виявлення збудника та базуються на ампліфікації конкретної цільової нуклеотидної послідовності, яка є унікальною для даного виду бактерій [2, 5]. Так Darrasse A et al., сконстру-

йовано специфічні праймери (Y1, Y2) для детектування *pel*-гену відповідального за синтез пектатліази у наступних видів пектолітичних бактерій *P. carotovorum* (subsp. *carotovorum* і *odoriferum*) і *Pectobacterium atrosepticum*. Але даний набір праймерів не дозволяв детектувати *pel*-ген у таких видів пектолітичних бактерій як: *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium betavasculorum* [6]. Крім того, S.H. de Boer з колегами розроблено видоспецифічні для *Pectobacterium atrosepticum* праймери (ECA1f і ECA2r), що дозволяють ідентифікувати різні штами даного виду та діагностувати збудника м'якого гниття і чорної ніжки картоплі у рослинній тканині з симптомами і без симптомів ураження [7]. Поєднання розроблених Darrasse A et та S.H. de Boer з колегами методик застосовується для ідентифікації представників видів *P. carotovorum* і *P. atrosepticum* [5].

Зважаючи на це, метою наших досліджень була видова ідентифікація ізолюваних нами *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» штамів і типових представників окремих видів родів *Pectobacterium* і *Dickeya* за допомогою ПЛР.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були ізолювані нами з уражених тканин огірків штами фітопатогенних бактерій *Pectobacterium* sp. 1ог, 2ог, 3ог, 4ог, 5ог та колекційні штами «*Erwinia toxica*» 8692, 8693, 8694, 8695, 8415, 8416, 8417, 8418, 8419. Для порівняльного аналізу у дослідженнях також використовували наступні типові штами пектолітичних бактерій: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В-1075^T (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^T (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^T (International collection of microorganisms from plant (ICMP) 5703, National collection of Plant Pathogenic bacteria (NCPBB) 402, American type culture collection (ATCC) 11663). Штами культивували на картопляному агарі протягом 24 годин, за 28^oC. Виділення та очищення бактеріальної ДНК проводили з використанням набору реактивів «ДНК-сорб-В». Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометра BioPhotometer. У роботі використали праймери, наведені у таблиці.

Ампліфікування *pel*-гену відповідального за синтез пектатліази пектолітичних бактерій проводили за допомогою термоциклеру Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902, фірми Applied Biosystems (США) за експериментально підібраних умов. Реакційна суміш загальним об'ємом 50 мкл містила (у кінцевій концентрації): 0,2 мкмоль кожного праймера (Y1 і Y2), 4 мкл 0,1 мМ кожного з нуклеотидів (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), 0,2 од. рекомбінантної термо-стабільної Taq ДНК-полімерази, 5 мкл очищеної ДНК, 5 мкл 10хПЛР буфер, 3 мкл MgCl₂ і деіонізовану стерильну воду. Для досліджуваних штамів роду *Pectobacterium* і *Dickeya* умови проведення ПЛР були наступними (30 циклів): додаткова денатурація ДНК – 94^oC/5 хв. та основна денатурація ДНК – 94^oC/1хв.; відпалювання праймерів – 65^oC/1хв.; елонгація ДНК – 72^oC/30 сек. і заключний синтез ДНК – 72^oC/7хв.

Таблиця. Характеристика ДНК фрагментів, використаних у ПЛР-ідентифікації досліджуваних штамів роду *Pectobacterium*

Назва і послідовність праймеру	Цільовий ген	Розмір ПЛР-продукту, н.п
Y1-5' -TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3'; Y2-5' -CAGGAAGATGTCGTTATC GCG AGT-3';	<i>pel</i> -ген відповідальний за синтез пектатліази (належить до родини <i>pelY</i>) специфічний для представників видів <i>P. carotovorum</i> і <i>P. atrosepticum</i>	434
ECA1f -5' -CGGCATCATAAAAACACG-3'; ECA2r-5' -GCACACTTCATCCAGCGA-3'	ДНК-фрагмент специфічний для <i>P. atrosepticum</i>	690

Для ампліфікування ДНК-фрагменту специфічного для представників виду *Pectobacterium atrosepticum*, також використовували лабораторне обладнання наведене вище. Реакційна суміш (загальний об'єм 20 мкл.) складалася з: 100 мкМ кожного з нуклеотидів (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), 0,5 од. рекомбінантної термостабільної Taq ДНК-полімерази, 2 мкл 10X ПЛР буферу, 0,5 мкМ кожного з праймерів (ЕСА1f, ЕСА2r), 1 мкл ДНК і деіонізованої стерильної води. ПЛР проводили за наступних умов (40 циклів): додаткова денатурація – 95/5 хв. і основна денатурація – 94 °С/30с.; відпалювання праймерів – 62°С/45с; елонгація ДНК – 72 °С/45с; заключний синтез – 72°С/8 хв.

Продукти реакцій розподіляли у 1,0% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію і візуалізували під УФ світлом.

Результати та обговорення

Три види пектолітичних бактерій, а саме: *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* та *Dickeya chrysanthemi* найбільш розповсюджені у світі і завдають серйозних втрат широкому колу рослин [1, 2]. Ензими, що руйнують клітинну стінку, а саме: пектатліаза, полігалактуроназа, целюлаза і протеаза вважаються одними із основних факторів, що обумовлюють їх патогенність. Гени відповідальні за синтез пектатліаз у пектолітичних бактерій були відсеквеновані і на основі аналізу нуклеотидних послідовностей було виділено три групи. Перша група містить гени відповідальні за синтез пектатліаз спільні для видів *Dickeya chrysanthemi* і *Pectobacterium carotovorum*. Друга група детектована лише у представників виду *Dickeya chrysanthemi* (ADE), а третя знайдена у представників видів *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pectobacterium carotovorum* (subsp. *carotovorum* і *odoriferum*) і *Pectobacterium atrosepticum* (Y) [8]. Роботи багатьох дослідників показали, що сконструйовані Dargasse A et al., специфічні для детектування *pel*-гену праймери (Y1, Y2) дозволяють ампліфікувати специфічний фрагмент розміром 434 н.п. у штамів видів *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* (susp. *carotovorum* і *odoriferum*), *Pectobacterium wasabiae*. Натомість даний фрагмент

не виявлений у представників видів *P. beta-vasculorum* і *D. chrysanthemi* [5, 8, 9]. Деякі науковці, спираючись на результати власних досліджень, позиціонують даний підхід як спосіб ідентифікації виключно представників виду *Pectobacterium carotovorum*. Окремі дослідники комбінують ампліфікування *pel*-гену з праймерами Y1, Y2 з іншими молекулярно-генетичними методами, зокрема рестрикційним аналізом [10].

У результаті проведених нами досліджень специфічний фрагмент розміром 434 н.п. було детектовано у ізольованих нами *Pectobacterium* sp. колекційних «*Erwinia toxica*» та типових *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075^T і *P. atrosepticum* УКМ В-1084^T штамів. Натомість нами не отримано продукту реакції в результаті ампліфікації з праймерами Y1 і Y2 у типового штаму *Dickeya chrysanthemi* УКМ В-1087^T (рис. 1). Тобто отримані нами результати не суперечать даним літератури [5, 8–10].

Як вже зазначалося вище, ЕСА1f і ЕСА2r праймери розроблені для специфічного детектування представників виду *Pectobacterium atrosepticum* [7]. Подальше секвенування нуклеотидної послідовності розміром 690 н.п. та пошук споріднених послідовностей у нуклеотидній базі GenBank виявив високу гомологію даної послідовності з геном детектованим у *E. coli*, що кодує синтез форміат С-ацетилтрансферази (піруват форміат ліази) (ЕС 2.3.1.54). Цей фермент відповідає за метаболізм глюкози у анаеробних умовах. Зокрема він каталізує зворотне перетворення пірувату і коферменту-А в форміат і ацетил-КоА. Багато дослідників констатують ефективність ампліфікування даного фрагмента для специфічної ідентифікації *P. atrosepticum* у чистій культурі і у рослинних тканинах [11, 12].

Як видно з рисунку 2 в наслідок ПЛР з ЕСА1f і ЕСА2r праймерами специфічний ДНК – фрагмент розміром 690 н.п. виявлено виключно у типового штаму *Pectobacterium atrosepticum* УКМ В-1084^T. Натомість у ізольованих нами *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» та типових *P. carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В1075^T і *Dickeya chrysanthemi* УКМ В-1087^T штамів жодного продукту у результаті ампліфікації з ЕСА1f і ЕСА2r праймерами виявлено не було.

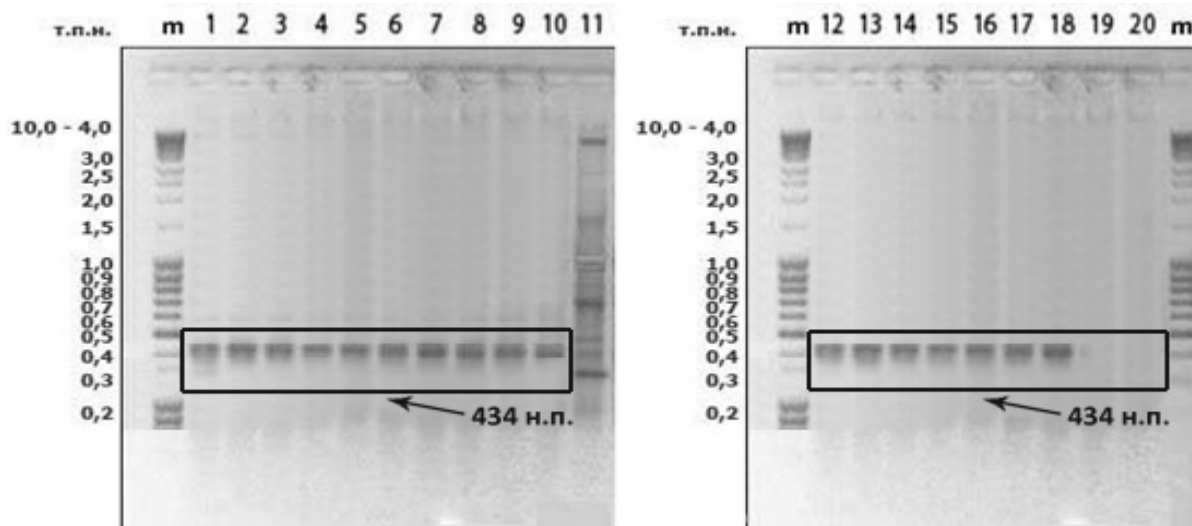


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР з праймерами Y1 і Y2: 11 – маркери молекулярних мас; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – «*Erwinia toxica*» 8692, 8693, 8694, 8695, 8415, 8416, 8417, 8418, 8419, *Pectobacterium* sp. 1or; 12, 13, 14, 15, 16 – *Pectobacterium* sp. 1or, 2or, 3or, 4or, 5or; 17 – *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В-1075^T; 18 – *Pectobacterium atrosepticum* УКМ В-1084^T; 19 – *Dickeya chrysanthemi* УКМ В-1087^T, 20 – негативний контроль.

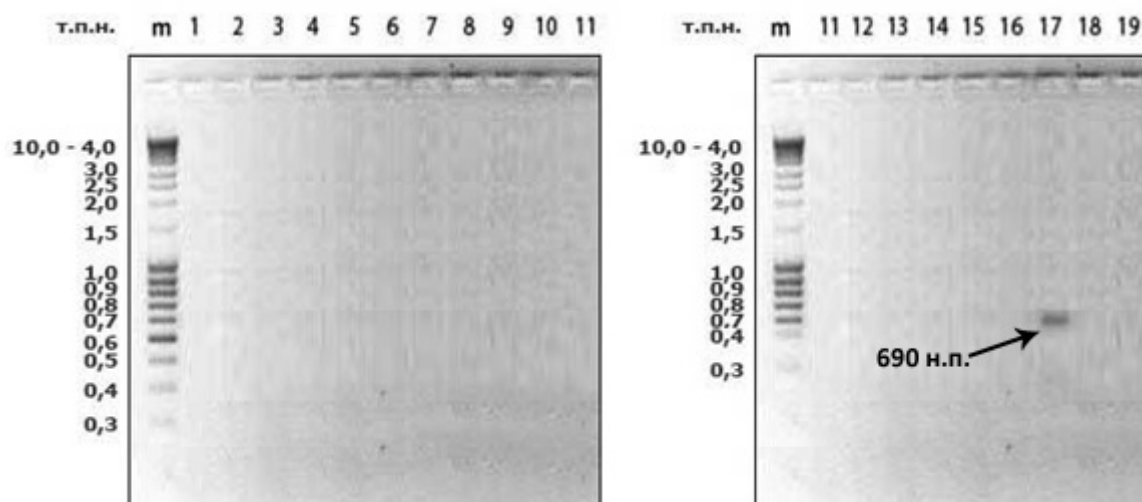


Рис. 2. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР з праймерами ECA1f і ECA2r: m – маркери молекулярних мас; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – «*Erwinia toxica*» 8692, 8693, 8694, 8695, 8415, 8416, 8417, 8418, 8419, *Pectobacterium* sp. 1or; 11, 12, 13, 14, 15 – *Pectobacterium* sp. 1or, 2or, 3or, 4or, 5or; 16 – *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В-1075^T; 17 – *Pectobacterium atrosepticum* УКМ В-1084^T; 18 – *Dickeya chrysanthemi* УКМ В-1087^T, 19 – негативний контроль.

Як видно з наведених вище результатів досліджень та попереднього вивчення комплексу генотипових і фенотипових властивостей ізолюваних нами *Pectobacterium* sp. колекційних «*E. toxica*» споріднені з типовим штамом *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В1075^T та уособлені від типових штамів *P. atrosepticum* УКМ В-1084^T і *D. chrysanthemi* УКМ В-1087^T. Тобто ПЛР детектування специфічних ДНК-фрагментів дозволило нам остаточно з'ясувати

питання видового статусу збудника судинного бактеріозу огірків «*Erwinia toxica*».

Висновки

Отже, проведені нами дослідження дозволили детектувати специфічний продукт ПЛР розміром 434 н. п. у геномі ізолюваних нами *Pectobacterium* sp. і колекційних «*E. toxica*» штамів. Натомість ДНК-фрагмент розміром 690 н.п. був відсутній у геномі як

штамів збудників судинного бактеріозу огірків так і типового штаму *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* UKM B1075^T. Отримані нами результати можуть бути корисними для експрес-діагностики збудника судинного бактеріозу

огірків з метою попередження розвитку епіфітотій. Зважаючи на отримані нами результати рекласифіковано збудника судинного бактеріозу огірків і віднесено його до виду *P. carotovorum*.

References

- Gvozdiak R.I., Pasichnik L.A., Yakovleva L.M., Moroz S.M., Litvinchuk O.O., Zhytkovich N.V., Hodos S.F., Butsenko L.M., Dankevich L.A., Grinnik I.V., Patty V.P. Phytopathogenic bacteria. *Bacterial diseases of plants*. K.: LLC "NVP" Interservis", 2011. 444 p. [in Ukrainian] / 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., Патики В.П. Фітопатогенні бактерії. *Бактеріальні хвороби рослин*. К.: ТОВ «НВП Інтерсервіс», 2011. 444 с.
- Czajkowski R., Pijrombelon 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*. 2015. No. 166. P. 18–38. doi: 10.1111/aab.12166.
- Dankevych L.A. The identification of cucumber soft rot and wilting in Ukraine based on 16S rRNA gene sequencing analysis. *Mikrobiologichnyi zhurnal*. 2018. T. 80, № 2. P. 89–100. [in Ukrainian] / Данкевич Л.А. Ідентифікація збудників м'якого гниття та в'янення огірків в Україні на основі аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. *Мікробіологічний журнал*. 2018. Т. 80, № 2. С. 89–100.
- Dankevych L.A. Rep-PCR analysis of single agent of cucumber bacterial diseases. The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine. 2017. T. 15, № 1. P. 25–31. [in Ukrainian] / Данкевич Л.А. Реп-ПЛР аналіз окремих збудників бактеріальних хвороб огірків. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2017. Т. 15, № 1. С. 25–31.
- Azadmanesh S., Marefat A., Azadmanesh K. Detection of *Pectobacteria* Causal Agents of Potato Soft Rot in North Western Provinces of Iran. *J Plant Pathol Microb*. 2013 Vol. 4, No.1. P. 1–6. doi: 10.4172/2157-7471.1000154.
- Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y. PCR and restriction fragment length polymorphism of a pel gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation of potato diseases. *Applied and environmental microbiology*. 1994. Vol. 60, No. 5. P. 1437–1444.
- De Boer S.H., Ward L.J. PCR Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*. 1995. Vol. 85. P. 854–858.
- Phokum C., Jitareerat P., Phochanachai S., Cheevadhanarak S. Detection and classification of soft rot *Erwinia* of vegetables in Thailand by DNA polymerase chain reaction. *Acta horticultrae*. 2006. Vol. 2. P. 917–925.
- Yahiaoui-Zaidi R., Jouan B., Andrivon D. Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology*. 2003. Vol. 52, No. 1. P. 2319–7706. doi: 10.1046/j.1365-3059.2003.00791.x.
- Hrelias V., Le Roux A.-C., Bertheau Y., Andrivon D., Gauthier J.-P., Jouan B. Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology*. 1998. No. 104. P. 685–699.
- Prajapat R., Marwal A., Nath Jha P. *Erwinia carotovora* associated with potato: a critical appraisal with respect to Indian perspective. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2013. Vol. 2, No. 10. P. 83–89.
- Hyman L.J., Birch P.R.J., Dellagi A., Avrova A.O., Toth I.K. A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Letters in Applied Microbiology*. 2000. Vol. 30. P. 330–335. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00736.x.

DANKEVYCH 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

PCR-IDENTIFICATION OF BACTERIA BELONGING TO THE GENUS PECTOBACTERIUM – AGENTS OF CUCUMBER SOFT ROT AND WILTING IN UKRAINE

Aim. Correct species identification of isolated *Pectobacterium* sp., collection «*E. toxica*» strains and typical representatives of some species of the genus *Pectobacterium* and *Dickeya* via PCR for individual species-specific regions of their genome. **Methods.** Microbiological and molecular genetic (PCR) methods **Results.** A specific PCR product of size 434 bp was amplified in the genome of isolated *Pectobacterium* sp., collection «*E. toxica*» and typical *P. carotovorum* susp. *carotovorum* UKM B1075^T and *P. atrosepticum* UKM B-1084^T strains. The 690 bp DNA fragment was detected solely in the genome of the typical *P. atrosepticum* UKM B-1084^T strain and absent in strains which are agents of cucumber soft rot and wilting and a typical *P. carotovorum* susp. *carotovorum* UKM B1075^T strain. **Conclusions.** PCR detection of specific DNA fragments allowed us to finally clarify the species status of the causative agent of cucumber soft rot and wilting and attribute it to *P. carotovorum*.

Keywords: identification, causative agent of cucumber soft rot and wilting.