

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

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКА БУРОЇ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ПЛЯМИСТОСТІ ЛЮПИНУ ЗА НАЯВНІСТЮ ГЕНА СЕКРЕЦІЇ СИРИНГОМІЦИН (*syrD*)

**Мета.** З метою коректної видової і внутрішньої ідентифікації ізольованих і колекційних штамів збудника бурої бактеріальної плямистості люпину проведено детектування генів секреції фітотоксину сириноміцину (*syrD*). **Методи.** У ході досліджень було використано мікробіологічні і молекулярно-генетичні (ПЛР) методи. **Результати.** Встановлено наявність генів секреції фітотоксину сириноміцину (*syrD*) у колекційних та ізольованих штамів збудника бурої бактеріальної плямистості і типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027<sup>T</sup>. Виявлено, що кількість продукту ПЛР у колекційних штамів «*Pseudomonas lupini*» різниться та корелює з їх патогенними властивостями. **Висновки.** Спираючись на результати попередніх і представлених у цій роботі досліджень, завершено рекласифікацію виду «*Pseudomonas lupini*» і штамів, що раніше належали до цього виду, віднесено до *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

**Ключові слова:** ідентифікація, гени секреції сириноміцину (*syrD*), збудник бурої бактеріальної плямистості люпину.

Відомо, що фітопатогенні бактерії видів *Pseudomonas syringae* і *Pseudomonas savastanoi* завдають значних втрат аграрному сектору багатьох країн, у тому числі і України. Значна шкодочинність цих видів зумовлюється тим, що вони здатні уражувати широке коло рослин, зокрема і бобові культури. Загальноприйнято, що представники родини *Fabaceae* складають значну частину посівів рослинництва багатьох країн, оскільки є цінними продовольчими і кормовими культурами. Тому вчасна і коректна ідентифікація збудників бактеріальних хвороб названих культур є запорукою їх високої врожайності [1, 2].

Види *Pseudomonas syringae* і *Pseudomonas savastanoi* мають складну внутрішньовидову структуру. Так, відомо, що представники різних патоварів у складі виду *Pseudomonas syringae*

здатні уражувати до 50 видів рослин, викликаючи у них різноманітні симптоми захворювання [1–3]. Ділення в середині окресленого виду є проблемним, оскільки у багатьох випадках існує перехресне зараження представниками окремих патоварів ряду рослин. Слід також зазначити, що на основі даних молекулярно-генетичних досліджень pv. *phaseolicola* і pv. *glycinea*, що викликають хвороби бобових культур, були віднесені до виду *Pseudomonas savastanoi*, хоча симптоми, які вони викликають за ураження рослин, є ближчими до симптомів представників виду *Pseudomonas syringae*, до якого раніше вони і належали [3, 4]. Зважаючи на зазначене вище, для коректної внутрішньовидової ідентифікації представників цих видів використовують детектування специфічних факторів патогенності [3, 5]. Зокрема, визначають здатність продукувати токсини, ферменти, фітогормони тощо. Найбільшого розповсюдження набуло вивчення продукції фітогормонів або ж виявлення генів, що відповідають за їх синтез. Відомо, що pv. *atropurpurea*, *glycinea*, *maculicola*, *morsprunorum*, *tomato* у складі видів *Pseudomonas syringae* та *Pseudomonas savastanoi* подують коранатин, а віднесені до цих же видів pv. *actinidiae*, *phaseolicola* – фазеолотоксин. Сириноміцин (сириготоксин, сириностатин і псевдоміцин) здатні продукувати pv. *syringae*, *aptata*, *atrofaciens*, що входять до виду *Pseudomonas syringae*, а табтоксин – pv. *tabaci*, *coronafaciens*, *garcae*, віднесені до цього ж виду. Інші патогенні для рослин види бактерій роду *Pseudomonas* також здатні продукувати специфічні токсини, зокрема: *P. tolaasii* – толазин, *P. marginalis* (*P. fluorescens*) – віскозин, *P. fuscovaginae* – фузопептин, *P. corrugata* – корпептин [6].

Як відомо, легітимність виду «*Pseudomonas lupini*», що викликає бурю бактеріальну плямистість люпину, не підтверджено [3, 4]. Попередньо нами було проведено його поліфазну таксономію та встановлено, що за

комплексом ознак фенотипу і генотипу (спорідненість нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК) досліджувана група штамів належить до видів *P. syringae* і *P. savastanoi* [7]. Також проведено фінгепринтування геному цього збудника за допомогою REP-ПЛР. За результатами BOX, ERIC і REP-профілювання збудника бурої бактеріальної плямистості люпину встановлена його спорідненість із представниками виду *Pseudomonas syringae*. Але значна генетична гетерогенність (від 20 до 50 %) не дозволила провести остаточну внутрішньовидову ідентифікацію збудника бурої бактеріальної плямистості люпину [8].

Зважаючи на це, метою наших досліджень було детектування генів (*syfD*) секреції ліподепсинапептидів для коректної ідентифікації збудника бурої бактеріальної плямистості люпину на рівні виду та патовару.

### 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<sup>T</sup> (NCPBV 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<sup>T</sup> (ICMP 2452, NCPBV 2585), *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 9174<sup>T</sup> (NCPBV 639, ICMP 4352), *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123<sup>T</sup> (NCPBV 52, ICMP 2740), *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571 (NCPBV 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 праймери для виявлення гену *syfD*: syD<sub>1</sub> 5'-CAGCGGCG-TTGGCTCCATTGC-3' (21 п. н.) і syD<sub>2</sub> 5'-TGC-CGCCGACGATGTAGACCAG C-3' (23 п. н.). Ці праймери ампліфікують продукт масою 1040 п. н., розташований у кодуєчій послідовності гену *syfD* у положеннях 566–1606 відкритої рамки читування. Ампліфікування проводи-

ли з використанням термоциклера Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902 фірми Applied Biosystems (США) за експериментально підібраних умов. Так, для досліджуваних штамів роду *Pseudomonas*: додаткова денатурація ДНК – 93°C/3 хв. та основна денатурація ДНК – 93°C/1 хв.; відпалювання праймерів – 64°C/1 хв.; елонгація ДНК – 72°C/1 хв. і завершальний синтез ДНК – 72°C/6 хв. Реакційна суміш загальним об'ємом 50 мкл містила (у кінцевій концентрації): 25 пмоль кожного праймера (syD<sub>1</sub> і syD<sub>2</sub>), 0,5 од. рекомбінантної термостабільної Taq ДНК-полімерази, 0,2 мМ кожного з нуклеотидів (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), 1 нг очищеної ДНК, 1xПЛР буфер і деіонізовану стерильну воду.

Продукти реакції фарбували бромідом етидію, розподіляли в 1,0 % агарозному гелі і візуалізували під УФ світлом.

### Результати та обговорення

Найбільш відомим представником класу циклічних ліподепсинапептидів є сириноміцин. Сириноміцин є представником циклічного ліподепсинапептидного класу фітотоксинів. За хімічною будовою цей токсин складається з полярної білкової головки і гідрофобного хвоста, що містить 3-гідрокси жирні кислоти. Як правило, утворюється три форми сириноміцину, що відрізняються між собою лише довжиною 3-гідрокси жирної кислоти, яка може бути: 3-гідрокси декановою, 3-гідрокси додекановою або 3-гідрокси тетрадекановою. Амідний зв'язок приєднує 3-гідрокси жирну кислоту до N-кінцевого залишку серину, який, у свою чергу, пов'язаний із 4-хлортреоніном на C-кінці за допомогою ефірного зв'язку з утворенням макроциклічного лактонового кільця. Хлорування молекули сириноміцину важливе для біологічної активності. Сириноміцин утворюється більшістю штамів *P. syringae* pv. *syringae*, що уражують широке коло рослин-господарів. Сириногоксин і сириностатин є спорідненими з сириноміцином ліподепсинапептидами, що продукуються штамми, виділеними з рослин родів Цитрусові і Бузкові. Відомо, що окремі штами *P. syringae* pv. *atropfaciens* здатні продукувати псевдоміцин. Усі ліподепсинапептиди відрізняються за амінокислотною послідовністю між положеннями 2 і 6. Незважаючи на зазначені вище структурні відмінності, різні типи ліподепсинапептидів виявляють схожі ступені біологічної активності. Кластер генів, відпові-

дальних за синтез сириноміцину (*syg*), має розмір приблизно 37 т. п. н. у ДНК нуклеоїду *P. syringae* pv. *syringae*. Вважається, що тут наявні гени, відповідальні за синтез (*sygB1*, *sygB2*, *sygC*, і *sygE*), секрецію (*sygD*) і регулювання синтезу (*sygP*) сириноміцину. Найбільш вражаючою особливістю гена *syg*, відповідального за синтез сириноміцину, є наявність величезної (28,4 – т. п. н.) ділянка, позначеної, як *sygE*. Аналіз цієї послідовності показав, що вона кодує 1,039-кДа синтетазу, що містить вісім модулів активації амінокислот. Таким чином, цей білок є одним із найбільших білків, відомих для прокариот до сьогодні [6, 5].

Як зазначалося вище, здатність синтезувати сириноміцин (сириготоксин, сиригостатин і псевдоміцин) виявлена у представників pv. *syringae*, *aptata*, *atrofaciens*, що входять до виду *Pseudomonas syringae*. Попередньо нами було з'ясовано, що як ізольовані нами, так і колекційні штами збудника бурої бактеріальної плямистості люпину за штучного інфікування рослин цукрового буряку та пшениці не викликають симптомів, характерних для базального бактеріозу пшениці (pv. *atrofaciens*) та смугастості жилки цукрового буряку (pv. *aptata*). Натомість вони здатні характерно уражувати рослини бузку та жасмину, що значно наближує їх до представників pv. *syringae*.

За результатами наших досліджень, специфічний продукт ПЛР розміром 1040 п. н. детектовано у колекційних та ізольованих нами штаммах (рис.). Також аналогічний продукт реакції виявлено у типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027<sup>T</sup>. Натомість типові і колекційні штами *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 9174<sup>T</sup>, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177<sup>T</sup>, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123<sup>T</sup>, що здатні уражувати бобові культури, не утворюють згаданого специфічного фрагмента у реакції ампліфікації з праймерами *Syr D<sub>1</sub>*, і *Syr D<sub>2</sub>*. Слід також відзначити, що кількість продукту ПЛР у колекційних штаммах «*Pseudomonas lupini*» різниться та корелює з їх патогенними властивостями. Такий факт потребує більш глибокого подальшого аналізу та дослідження.

Отже, детектування генів, відповідальних за секрецію фітотоксину сириноміцину (*sygD*), дозволило нам остаточно внести ясність у питання видового і внутрішньовидового статусу збудника бурої бактеріальної плямистості люпину. Так, у наслідок проведених досліджень нами проведено заключну рекласифікацію виду «*Pseudomonas lupini*», а штами, що належали до цього виду, віднесено до *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

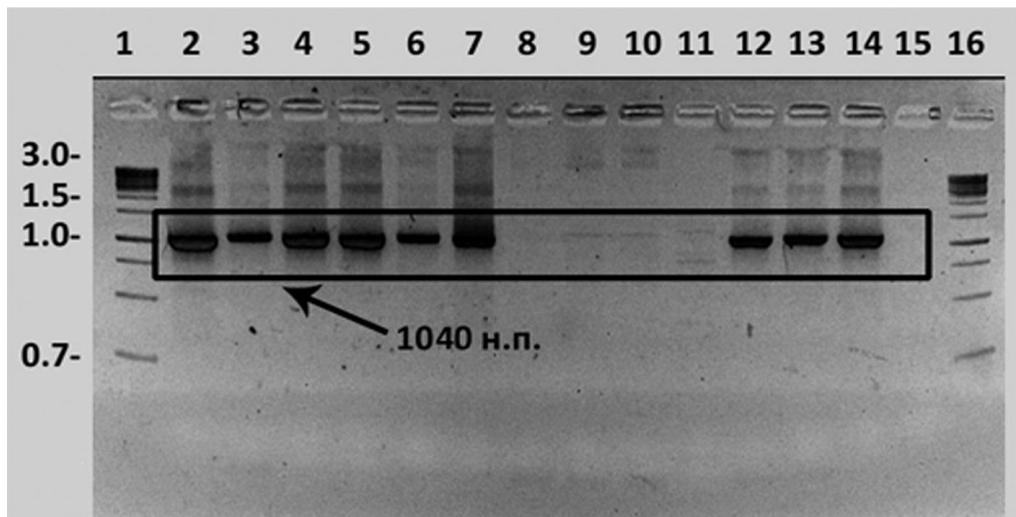


Рис. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР з праймерами *Syr D<sub>1</sub>*, *Syr D<sub>2</sub>*: 1, 16 – маркери молекулярних мас; 2, 3, 4, 5, 6 – «*Pseudomonas lupini*» 8531, 8532, 8533, 8534, 8535; 7 – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027<sup>T</sup>; 8 – *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 9174<sup>T</sup>; 9 – *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* 9177<sup>T</sup>; 10 – *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571; 11 – *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1123<sup>T</sup>; 12, 13, 14 – «*Pseudomonas lupini*» 17, 6, 5; 15 – негативний контроль.

## Висновки

Отже, нами виявлено присутність у ДНК нуклеоїду колекційних та ізольованих нами штамів збудника бурої бактеріальної плямистості люпину генів, відповідальних за секрецію фітотоксину сирінгоміцину (*syrD*). Аналогічний фрагмент ПЛР розміром 1040 п. н. виявлено у типового штамів *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027<sup>T</sup>. Спираючись як на результати попередніх, так і представлених у цій

роботі досліджень, завершено рекласифікацію виду «*Pseudomonas lupini*», а штамів, що раніше належали до цього виду, віднесено до *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Необхідно також зазначити, що отримані дані можуть бути корисними у разі швидкої експрес-діагностики збудника бурої бактеріальної плямистості люпину, а значить, і для запобігання виникнення епіфітопій.

## References

1. Belyukova K.I., Koroleva I.B., Muras V.A. Bacterial diseases of grain – legumes. K.: Naukova Dumka, 1974. 39 p. [in Ukrainian] / Бельюкова К.И., Королева И.Б. Мурас В.А. Бактериальные болезни зерно – бобовых культур. К.: Наукова думка, 1974. 39 с.
2. 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.
3. 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.
4. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. URL: [www.bacterio.net/pseudomonas.html](http://www.bacterio.net/pseudomonas.html).
5. Bultreys A., Gheysen I. Biological and Molecular Detection of Toxic Lipodepsipeptide Producing *Pseudomonas syringae* Strains and PCR Identification in Plants. *Applied and environmental microbiology*. 1999. Vol. 65, No. 5. P. 1904–1909.
6. Bender C.L., Alarcon-Chaidez F., Gross D.C. *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1999. Vol. 63, No. 2. P. 266–292.
7. Dankevych L.A. Phenotypic and genotypic properties of the agent of the agent of lupine's brown spottiness. *Microbiolog. Journal*. 2006. Vol. 8, № 6. P. 20–27. [in Ukrainian] / Данкевич Л.А. Фенотипні та генотипні властивості збудника бурої бактеріальної плямистості люпину. *Мікробиол. журн.* 2006. Т. 68, № 6. С. 20–27.
8. Dankevych L.A. Genetic profiling of bacteria of the genus *Pseudomonas* affecting legumes. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2018. Vol. 22. P. 120–125 [in Ukrainian] / Данкевич Л.А. Генетичне профілювання бактерій роду *Pseudomonas*, що уражують бобові культури. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. Т. 22. С. 120–125.

## 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](mailto:ldankevich@ukr.net)

## IDENTIFICATION OF AGENT OF LEAF SPOT DISEASE OF LUPINE BASED ON THE THE SYRINGOMICIN GENE (*syrD*)

**Aim.** The detection of the phytotoxin syringomycin's secretion genes of (*syrD*) has been performed for the purpose of correct species and pathovar identification of isolated and collection strains of the agent of lupine's brown spottiness.

**Methods.** It has been used microbiological and molecular genetic (PCR) methods. **Results.** The presence of phytotoxin syringomycin's secretion (*syrD*) genes in collection and isolated strains of the agent of lupine's brown spottiness and the typical strain *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UCM В-1027<sup>T</sup> has been established. It has been shown that the amount of PCR product produced by collection strains "*Pseudomonas lupini*" varies and correlates with their pathogenic properties. **Conclusions.** Based on the results of the previous investigation and presented in this paper, the reclassification of the species "*Pseudomonas lupini*" finished and the strains previously belonging to this species were attributed to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

**Keywords:** identification, syringomycin's secretion genes (*syrD*), agent of lupine's brown spottiness.