

ДАНКЕВИЧ Л. А.[✉], ЗАРУДНЯК М. І.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154, ORCID: 0000-0003-1972-8694

[✉] ldankevich@ukr.net, (066) 100-88-62, (044) 526-23-89

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКА ПЛЯМИСТОСТІ ЛИСТЯ ГОРІХА ВОЛОСЬКОГО (*JUGLANS REGIA*) ЗА ПРОДУКЦІЄЮ ВИДОСПЕЦИФІЧНОГО ТОКСИНУ

Мета. З метою коректної видової і внутрішньо ідентифікації ізольованих штамів бактерій, які викликають плямистість листя горіху волоського проведено молекулярно-біологічне і генетичне детектування їх здатності синтезувати фітотоксин сирінгоміцин. **Методи.** У ході досліджень було використано мікробіологічні і молекулярно-генетичні (ПЛР) методи. **Результати.** Встановлено наявність генів секреції фітотоксину сирінгоміцину (*sygD*) у ізольованих штамів збудника плямистості листя горіху волоського та типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T. Біотестування здатності синтезувати сирінгоміцин даними штамми виявлено подібність антагоністичної дії ізольованих з горіху волоського штамів та типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T, що свідчить про їхню здатність синтезувати фітотоксин ліпидепсинопептидної природи – сирінгоміцин. **Висновки.** Спираючись на результати попередніх і представлених у цій роботі досліджень ідентифіковано ізольовані з горіху волоського штами і віднесено їх до виду *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Ключові слова: ідентифікація, гени секреції сирінгоміцину (*sygD*), біотестування, збудник плямистості листя горіху волоського.

Волоський горіх або горіх грецький (*Juglans regia*) є економічно важливою культурою, що використовується у харчовій, деревопереробній промисловостях та медицині і поширена від тропічного до помірного клімату на Азійському, Європейському та Американському континентах. Це один з найбільш вирощуваних горіхів у світі на рівні з мигдалем, фундуком, фісташками, кеш'ю. Волоські горіхи є чудовим джерелом рослинного білку, клітковини, магнію, поліфенолів, α -ліноленової кислоти та інших омега-жирних кислот. Введення до раціону волоських горіхів покращує когнітивні функції, знижує ризики виникнення раку, діабету та

ожиріння і позитивно впливає на діяльність травної, серцево-судинної і репродуктивної функцій організму. Недарма волоський горіх є частиною «середземноморської дієти» і попит на його споживання неухильно зростає. В Департаменті сільського господарства США (United States Department of Agriculture) зафіксували у 2020–2021 роках рекордне виробництво волоських горіхів на рівні 2,3 млн тонн [1]. За даними цього департаменту Україна входить до топ 5 світових виробників волоських горіхів (близько 126 тисяч тонн на рік) [1]. Звичайно врожайність цієї культури значним чином залежить від відсутності ураження збудниками захворювань [2]. Одними із найбільш шкодочинних збудників захворювань волоського горіху є фітопатогенні бактерії. Зокрема збудник бактеріального опіку, коричневого апікального некрозу та вертикального виразкового раку волоського горіху *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* може спричиняти врожайність цієї культури на 40–60 %. Окрім *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* захворювання горіха волоського можуть спричиняти фітопатогенні бактерії роду *Brenneria*, зокрема: збудник глибокого раку кори *Brenneria rubifaciens* і збудник дрібного раку кори *Brenneria nigrifluens* [3, 4]. Ряд дослідників відзначають що волоський горіх також можуть уражувати такі поліфаги як *Agrobacterium tumefaciens* (рак коренів) і *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (плямистість листя) [5, 6]. Так епіфітотія, спричинена *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, зареєстрована у 2016 році у одній із провінцій Ірану [6]. Ситуація ускладнюється тим, що вид *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* здатен викликати різні види захворювань у приблизно 50 видів рослин [2, 6]. Окрім того, цей вид має складну внутрішньовидову структуру, що значно ускладнює ідентифікацію бактерій, які мають спорідненні з представниками виду *Pseudomonas syringae* властивості. Наявні молекулярно-генетичні підходи (секвенування рибосомальних генів, фінгерпринтування геному й

© ДАНКЕВИЧ Л. А., ЗАРУДНЯК М. І.

ін.) до видової і внутрішньовидової ідентифікації бактерій не завжди є дієвими у випадку представників виду *Pseudomonas syringae* [2]. Згідно літературних даних представники цього виду здатні синтезувати специфічні фактори патогенності фітотоксини ліподепсипептидної природи – сирінгоміцин (сирінготоксин, сирінгостатин і псевдоміцин) і сирінгопептин. Так здатність синтезувати токсин сирінгоміцин (сирінготоксин, сирінгостатин і псевдоміцин) відмічена у представників рв. *syringae*, *aptata*, *atrofaciens*, які входять до виду *Pseudomonas syringae*. Сирінгопептин синтезують представники патоварів рв. *syringae*, *atrofaciens* [7, 8]. Дослідниками було показано, що саме декретування здатності представниками цього виду синтезувати специфічні токсини як молекулярними, так і біологічними методами, є дієвим таксономічним підходом для ідентифікації представників виду *Pseudomonas syringae* та однойменного патовару у його складі [7–10].

Тому метою наших досліджень було ампліфікування генів (*sygD*) секреції ліподепсинапептидів та біотестування здатності синтезувати ці сполуки шляхом визначенням кола мікроорганізмів що є чутливими до сирінгоміцину для коректної ідентифікації збудника плямистості листя горіха волоського.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були 6 штамів *P. syringae* рв. *syringae* ізольовані з горіха волоського на території України протягом останніх років [11]. У роботі також використали колекційні і типові штами фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas syringae* рв. *syringae* УКМ В-1027^T (NCPBB 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 amygdali* рв. *morsprunorum* 8765, *Pseudomonas syringae* рв. *persicae* 8596. Для проведення біотестування у роботі також використали наступні штами дріжджів: *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-2519 (ATCC 18824), *Saccharomyces pastorianus* УКМ Y-2522 (ATCC 12752), *Candida albicans* УКМ Y-1918 (ATCC 885-653), *Candida albicans* УКМ Y-2681 (ATCC 10231), *Candida tropicalis* УКМ Y-2502 (ATCC 750 IGC), *Filobasidium capsuligenum* УКМ Y-27 (ATCC 14437), *Rhodotorula bogoriensis* УКМ Y-50 (ATCC 18809), *Rhodotorula mucilaginosa* УКМ Y-1394,

Rhodotorula mucilaginosa УКМ Y-1406, *Rhodotorula mucilaginosa* УКМ Y-1803, *Cryptococcus albidus* УКМ Y-1033, *Cryptococcus laurentii* УКМ Y-1091.

Для дослідження антагоністичних відносин усі штами мікроорганізмів культивували на модифікованому поживному середовищі наступного складу: 2 г екстракту дріжджів, 5 г пептону, 5 г NaCl, 0,45 г K₂HPO₄, 0,96 г Na₂HPO₄ і 8 г агар-агару (на літр); рН доводили до 7 за допомогою NaOH. Мікроорганізми культивували 24 години за 28°C [10]. Вивчення антагоністичних відносин між штамми фітопатогенних бактерій, які забезпечуються їх продукцією антибіотиків ліподепсипептидної природи і дріжджами вивчали наступним методом. Чашки Петрі наповнювали 30 мл або картопляно декстрозним агаром (картопляний відвар 200 г, декстроза 20 г, агар-агар 15 г, дистильованою водою довести до 1000 мл), або пептон-глюкозо-NaCl агаром (в одному літрі: 5 г пептону, 10 г глюкози, 5 г NaCl і 8 г агар-агару). Перед використанням чашки Петрі, які містили 30 мл середовища, інкубували протягом 48 годин при 37°C. У центр кожної чашки Петрі поміщали частину прекультури (лінія довжиною 3 см і шириною 0,8 см). Культури інкубували протягом 24 або 48 годин при 28°C, обприскували суспензією клітин дріжджів титром 1x10⁹ КУО/мл і поміщали у термостат за 20 або 25°C протягом 48 год [7, 9]. Виміряли максимальні зони інгібування між двома організмами [2].

Виділення та очищення бактеріальної ДНК проводили з використанням набору реактивів «ДНК-сорб-В». Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометру BioPhotometer. У роботі використали наступні праймери для виявлення гена *sygD*: syD₁ 5'-CAGCGGCGTTGCGTCCATTGC-3' (21 п. н.) і syD₂ 5'-TGCCGCCGACGATGTAGACCAG C-3' (23 п. н.). Ці праймери ампліфікують продукт масою 1040 п. н., розташований у кодуєчій послідовності гена *sygD*, у положеннях 566–1606 відкритої рамки зчитування. Ампліфікування проводили з використанням термоциклеру Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902 виробника Applied Biosystems (США) за експериментально підібраних умов. Для досліджуваних штамів роду *Pseudomonas*: додаткова денатурація ДНК – 93°C / 3 хв і основна денатурація ДНК – 93°C / 1 хв; відпалювання праймерів – 64°C / 1 хв; елонгація ДНК – 72°C / 1 хв і заключний синтез ДНК – 72°C / 6 хв. Реакційна суміш загальним

об'ємом 50 мкл містила (у кінцевій концентрації): 25 пмоль кожного праймера (*syD*₁ і *syD*₂), 0,5 од. рекомбінантної термостабільної Taq ДНК-полімерази, 0,2 мМ кожного з нуклеотидів (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), 1 нг очищеної ДНК, 1хПЛР буфера і деіонізовану стерильну воду. Продукти реакції фарбували етидій бромідом, розподіляли у 1,0 % агарозному гелі і візуалізували під УФ світлом.

Результати та обговорення

Як зазначалося раніше, здатність синтезувати сирінгоміцин (сирінготоксин, сирінгостатин і псевдоміцин) відмічена у представників *pv. syringae*, *aptata*, *atrofaciens*, які входять до виду *Pseudomonas syringae*. Попередньо нами показано, що як ізольовані нами, так і колекційні штами збудника плямистості листа горіха волоського при штучному інфікуванні 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 до представників *pv. syringae* [11].

У результаті ампліфікування з праймерами *Syr D*₁, *Syr D*₂ як штами *Pseudomonas syringae* ізольованих з горіха волоського, так і типовий штам *Pseudomonas syringae pv. syringae* УКМ В-1027^T, утворили специфічний ПЛР-продукт розміром 1040 п. н., що підтверджує наявність в їх геномі генів відповідальних за синтез сирінгоміцину (рис. 1).

Оскільки попередні наші дослідження показали, що за комплексом фенотипових дослі-

джень ізольовані з горіха волоського близькородичні з представниками виду *Pseudomonas syringae*, то їх належність до цього виду і однойменного патовару у його складі не викликає сумніву.

Натомість *Pseudomonas amygdali pv. morsprunorum* 8765 і *Pseudomonas syringae pv. persicae* 8596 у аналогічній реакції не утворюють специфічного продукту ПЛР. Даний факт є логічним, оскільки вони хоча і уражують деревні культури і раніше належали, або належать до виду *Pseudomonas syringae*, проте не синтезують сирінгоміцину. Згідно даних літератури *Pseudomonas amygdali pv. morsprunorum* синтезують токсин полікетидої природи коронатин, а *Pseudomonas syringae pv. persicae* синтезує токсин ліпідної природи персикоміцин [7, 8].

Отже, в результаті ПЛР нами детектовано у ДНК нуклеоїду ізольованих з горіха волоського штамів специфічний фрагмент гену (*syrd*) відповідального за секрецію сирінгоміцину, що підтверджує їх належність до виду *Pseudomonas syringae* та однойменного патовару у його складі.

Як ізольовані нами штами *Pseudomonas syringae pv. syringae*, так і типовий штам *Pseudomonas syringae pv. syringae* УКМ В-1027^T є низько активним за відношенням до *Candida albicans* УКМ Y-2681 (АТСС 10231). Ці ж штами є не активними за відношенням до *Filobasidium capsuligenum* УКМ Y-27 (АТСС 14437), *Rhodotorula bogoriensis* УКМ Y-50 (АТСС 18809), *Cryptococcus albidus* УКМ Y-1033, *Cryptococcus laurentii* УКМ Y-1091.

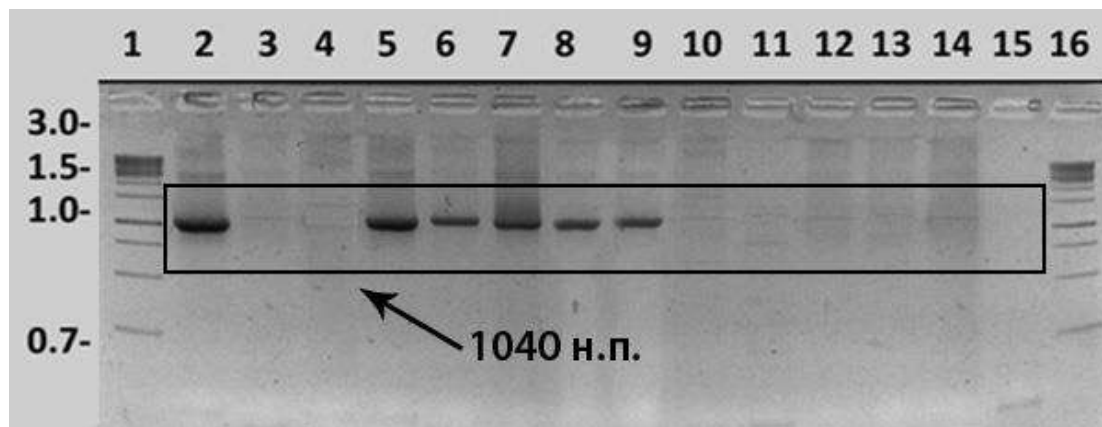


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР з праймерами *Syr D*₁, *Syr D*₂: 1, 16 – маркери молекулярних мас; 2 – *Pseudomonas syringae pv. syringae* УКМ В-1027^T; 3 – *Pseudomonas amygdali pv. morsprunorum* 8765; 4 – *Pseudomonas syringae pv. persicae* 8596; 5, 6, 7, 8, 9 – *Pseudomonas syringae* ізольовані з горіха волоського 1 гв, 2 гв, 3 гв, 4 гв, 5 гв; 10, 11, 12, 13, 14 – пусті лунки; 15 – негативний контроль.

За результатами біотестування здатності синтезувати сирінгоміцин усі досліджувані штами проявили подібність спектру дії (рис. 2). Штами *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* виділені з горіха волоського та типовий штам *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^Т мають високу антагоністичну активність (зона затримки росту 25–23 мм) до *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-2519 (АТСС 18824). Ці ж штами демонструють середній рівень активності до 3 штамів *Rhodotorula mucilaginosa* (зона затримки росту 17–20 мм) та 2 штамів *Candida albicans* (зона затримки росту 14–17 мм). Штам *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^Т має середню антагоністичну активність (зона затримки росту 12 мм) до штаму *Saccharomyces pastorianus* УКМ Y-2522, натомість штами

Pseudomonas syringae pv. *syringae*, виділені з горіха волоського – лише низький рівень антагоністичної активності до цього штаму. За результатами біотестування нами виявлено подібність антагоністичної дії ізолюваних нами з горіха волоського штамів *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* та типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^Т. Ці штами найбільш активно пригнічували ріст і розвиток дріжджів наступних видів: *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida albicans*, що згідно даних літератури свідчить про їх здатність синтезувати сирінгоміцин і близькоспоріднені ліпидепсипептиди, а значить і підтверджує їх належність до виду *Pseudomonas syringae* та одноіменного патовару у його складі [8].

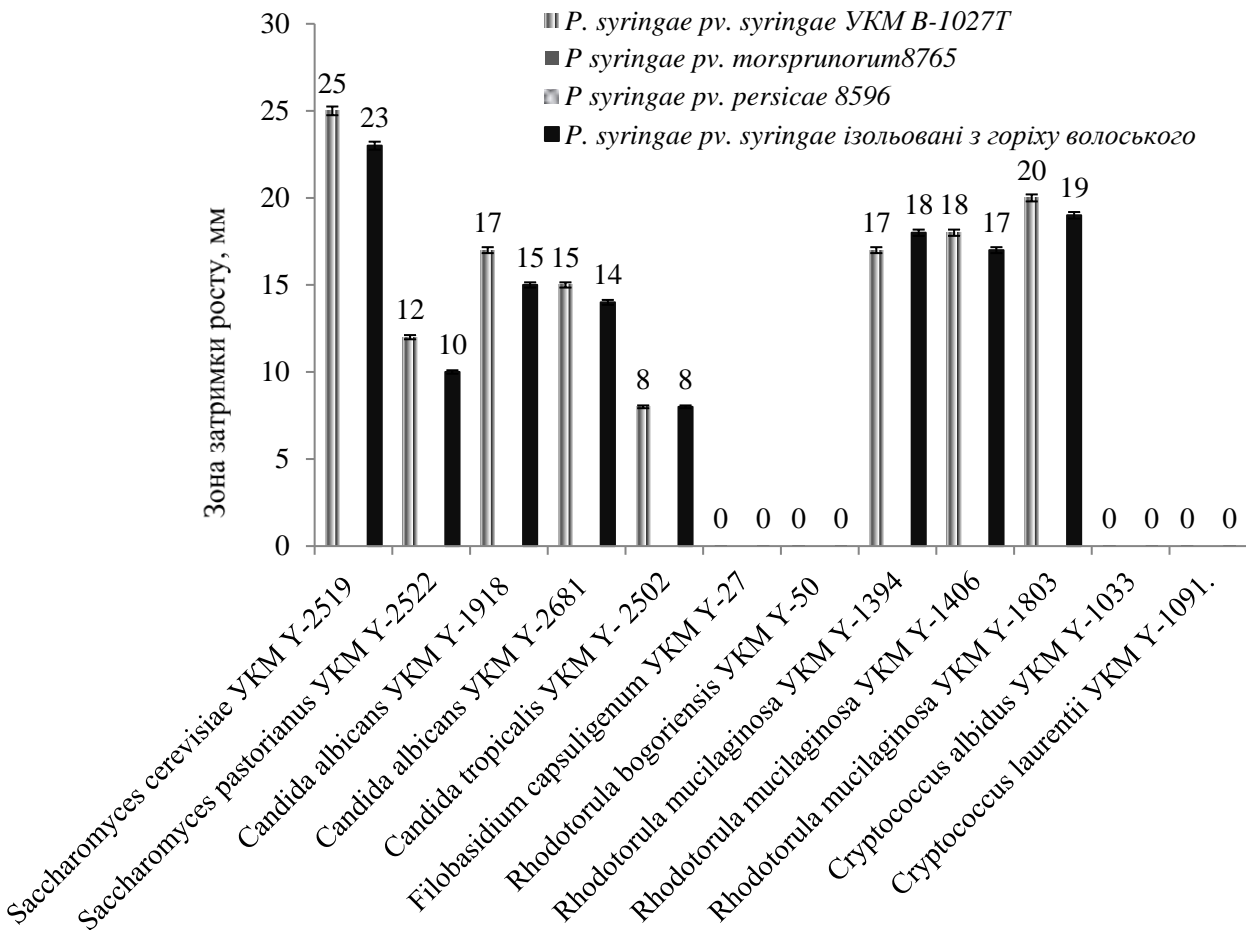


Рис. 2. Антагоністична активність штамів видів *Pseudomonas syringae* та *Pseudomonas amygdali*, які уражують деревні культури до штамів дріжджів.

Висновки

За результатами ПЛР ампліфіковано ДНК-фрагмент розміром 1040 п. н., який присутній у нуклеїді як типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027^T, так і штамів, ізольованих з горіха волоського. Біотестування здатності синтезувати сирінгоміцин цими штамми виявлено подібність антагоністичної дії ізольованих з горіха волоського штамів *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* та типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ

В-1027^T. Ізольовані штами і типовий штам найбільш активно пригнічували ріст і розвиток дріжджів наступних видів: *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida albicans*, що згідно даних літератури свідчить про їхню здатність синтезувати фітоксин ліпидепсипептидної природи – сирінгоміцин. Отримані дані можуть бути корисними у разі швидкої експрес-діагностики збудника плямистості листя горіха волоського, а значить і для запобігання виникнення епіфітотій.

References

- Galushko V. P., Berehovy V. K. Economics of world agriculture. Kyiv : "Nichlava", LLC СТІ "Energy and Electrification", 2011. 1000 p. [in Ukrainian]
- Patyka V. P., Pasichnik L. A., Gvozdiak R. I., Petrychenko V. F., Korniyuchuk. O. V., Kalinichenko A. V., Butsenko L. M., Zhytkovich N. V., Dankevich L. A., Litvinchuk O. O., Kyrylenko L. V., Gulyaeva G. B., Hnatyuk T. T., Kharkhota M. A. Tomashuk O. V. Phytopathogenic bacteria. Methods. Vinnytsia : Vindruk LLC, 2017. 432 p. [in Ukrainian]
- Frutos D. Minireview. Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. *Journal of Plant Pathology*. 2010. Vol. 92 (1, Supplement). P. 79–85.
- Sagawa C. H. D., Assis R. de A. B., Zaini P. A., Wilmarth Ph., Phinney B. S., Moreira L. M., Dandekar A. M. Proteome Analysis of Walnut Bacterial Blight. *Int. J. Mol. Sci*. 2020. Vol. 21 (20). 7453. doi: 10.3390/ijms21207453.
- Rouhrazi K., Rahimian H. Biochemical and genetic characterization of *Agrobacterium tumefaciens* the causal agent of walnut crown gall disease in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2014. Vol. 47 (20). P. 2493–2500 doi: 10.1080/03235408.2014.880575.
- Keshtkar A. R., Khodakaramian Ch., Rouhrazi K. Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* which induce leaf sport on walnut. *Eur J Plant Pathol*. 2016. Vol. 146. P. 837–846. doi: 10.1007/s10658-016-0962-2.
- Bender C. L., Alarco F., Chaidarz N., Gross D. C. Reviews. *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and molecular reviews*. 1999. Vol. 63 (2). P. 266–292. doi: 10.1128/MMBR.63.2.266-292.1999.
- 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 (5). P. 1904–1909. doi: 10.1128/AEM.65.5.1904-1909.1999.
- Dankevych L. A. Identification of causative agents of brown bacterial spotting of lupine by the presence of the syringomycin secretion gene (*syrD*). *Factors of experimental evolution of organisms*. 2019. Vol. 25. P. 122–125. [in Ukrainian]
- Gašić K., Prokić A., Ivanović M., Kuzmanović N., Obradović A. Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pestic. Phytomed*. 2012. 27 (3). P. 219–229. doi: 10.2298/PIF1203219G.
- Dankevych L. A., Patyka V. P. Polyphasic taxonomy of pathogens of bacterial diseases of walnut based on phenotype. Abstracts of reports of the XII Congress of the Society of Microbiologists of Ukraine named after S. M. Vinogradskyi (Yalta, October 1–6). Yalta, 2013. 156 p. [in Ukrainian]

DANKEVYCH L. A., ZARUDNIAK M. I.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnogo str., 154

IDENTIFICATION OF WALNUT (*JUGLANS REGIA*) LEAF SPOT AGENT BY ITS PRODUCTION OF SPECIES-SPECIFIC PHYTOTOXIN

Aim. For the purpose of correct species and internal identification of isolated strains of bacteria that cause walnut leaf spotting, molecular biological and genetic detection of their ability to synthesize the phytotoxin syringomycin have been carried out. **Methods.** It has been used microbiological and molecular genetic (PCR) methods. **Results.** The presence of syringomycin (*syrD*) phytotoxin secretion genes was established in isolated strains of walnut leaf spot pathogen and the typical strain of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UCM B-1027^T. Biotesting of the ability to synthesize syringomycin by these strains revealed the similarity of the antagonistic action of the strains isolated from walnut and the typical strain of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UCM B-1027^T, which indicates their ability to synthesize lipodepsinopeptide phytotoxin – syringomycin. **Conclusions.** Based on the results of the previous researches and presented in this work, strains isolated from walnut were identified as a members of species *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Keywords: identification, syringomycin (*syrD*) secretion genes, bioassay, walnut leaf spot pathogen.