ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2006. Т. 22. № 2

Генотипові властивості збудника бурої бактеріальної плямистості люпину *Pseudomonas lupini*

Л. А. Данкевич, Р. І. Гвоздяк

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

phytopath@ukr.net

Визначено молярний відсоток GC-пар у геномній ДНК і нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК штамів P. lupini Beltjukova, Koroljova. На основі цих і отриманих раніше фенотипових ознак більшість досліджених штамів P. lupini віднесено до Pseudomonas syringae. Виняток склав штам P. lupini 8531, який через спорідненість GC-складу геномної ДНК і нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК віднесений нами до Pseudomonas savastanoi pv. glycinea.

Ключові слова: Pseudomonas lupini, Pseudomonas syringae, Pseudomonas savastanoi, GC-склад ДНК, нуклеотидна послідовність гена 16S рРНК.

Вступ. Збудником бурої бактеріальної плямистості люпину вважається *P. lupini* Beltjukova, Koroljova. Видову назву патогену запропоновано на основі деяких фенотипових ознак [1—3]. У сучасних визначниках бактерій окремого виду *P. lupini* не зазначено. Більшість фітопатогенних псевдомонасів представлено 45 патоварами, що входять до складу двох фенотиповоподібних видів *Pseudomonas syringae* і *P. savastanoi* [4, 5]. Молекулярно-генетичні методи досліджень, зокрема, секвенування гена 16S рРНК, молярний вміст гуаніну і цитозину в тотальній геномній ДНК та ДНК-ДНК гібридизація в останні роки широко використовують у систематиці бактерій [6—10]. Разом з тим у спірних питаннях систематики актуальним є поліфазний підхід, який полягає у всебічному дослідженні бактерій, тобто у поєднанні даних аналізу фенотипових ознак з результатами молекулярно-генетичних досліджень [9, 11, 12]. Раніше нами проаналізовано широкий комплекс фенотипових ознак *P. lupini* [13—16]. За патогенністю стосовно 10 видів рослин, морфолого-культуральними, фізіологічними і 49 біохімічними ознаками, антигенним і жирнокислотним складом загальних клітинних ліпідів 22 штами *P. lupini* спорідненні між собою та з типовим штамом *P. syringae pv. syringae* 8511, а також з типовим штамом *P. savastanoi pv. phaseolicola* 9066 [14].

Оскільки аналіз комплексу фенотипових ознак не дав остаточної відповіді щодо видової приналежності збудника бурої бактеріальної плямистості люпину, метою нашої роботи було дослідження генотипових властивостей колекційних і нових штамів *P. lupini*, а саме: молярного % GC-пар у геномній ДНК, а також встановлення нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК цих штамів.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були п'ять колекційних і два нових штами *P. lupini*, а також типовий штам *P. syringae pv. syringae* 8511 (табл. 1).

Для визначення GC-складу виділення і очищення геномної ДНК проводили за загальноприйнятими методиками [17, 18]. Молярний вміст суми

© Л. А. ДАНКЕВИЧ, Р. І. ГВОЗДЯК, 2006

Таблиця 1
Штами, використані в роботі

Штам	Джерело виділення	Джерело одержання штаму
P. lupini колекційні № 8531—8535	Люпин	Колекція відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України
P. lupini 6, 17	Люпин	Виділені нами
P. syringae pv. syringae 8511 (УКМ* — B1027^T, NCPPB** — 281)	Бузок	УКМ*

Примітка: *УКМ — Українська колекція мікроорганізмів; **NCPPB — Національна колекція рослинних патогенних бактерій (Велика Британія).

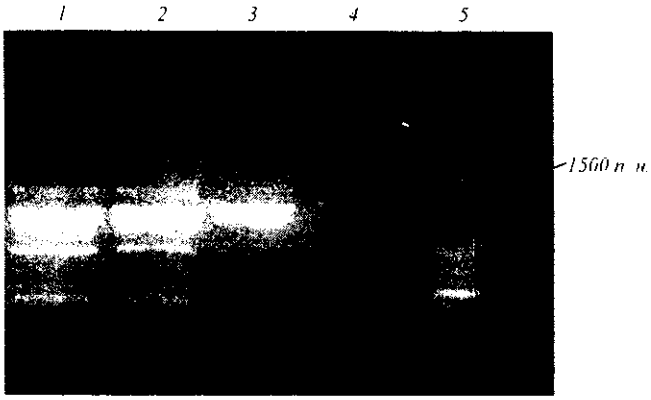

Рис. 1. Підбір оптимальної температури (°С) денатурації праймерів у ПЛР: *1* — 50; *2* — 55; *3* — 60; *4* — 65; *5* — маркерна ДНК

гуаніну і цитозину у відсотках визначали за кривою денатурації ДНК, побудованою за даними, одержаними на спектрофотометрі DU-8 фірми «Beckman» (Велика Британія). Температуру плавлення ДНК знаходили графічно як середню точку кривої залежності відносного поглинання від температури. Вміст GC-пар у ДНК розраховували за формулою

$$\% \text{ GC} = (T_{пл} - 53{,}9\ ^\circ\text{C}) : 0{,}41 + \Delta\ \%\ \text{GC},$$

де $T_{пл}$ — температура плавлення досліджуваної ДНК; Δ % GC — поправка, яка вираховується з використанням ДНК *Escherichia coli* ATCC 11775^T [17, 19].

При виділенні ДНК для полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) використовували колонки Silica Spin фірми «Qiagen» (США) та набір реактивів «ДНК-сорб-В» (Росія). ДНК копію гена 16S рРНК ампліфікували з використанням універсальних праймерів pA — 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ (8—27, нумерація за *E. coli*) та pH — 3′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5′ (1542—1523, нумерація за *E. coli*) [21] за експериментально підібраних умов: денатурація ДНК — 94 °С/15 с, денатурація — 65 °С/15 с, елонгація — 72 °С/5 хв (рис. 1).

Продукти ампліфікації клонували за рахунок термінальної трансферазної активності Taq-ДНК-полімерази у Т-вектор на основі *pBluescript* SK(+) за сайтом рестрикції *EcoRV* [21]. Ампліфікат 16S рДНК секвенували на автоматичному секвенаторі 3130 Genetic Analyzer («Hitachi», Японія). Одержані нуклеотидні послідовності гена 16S рДНК депоновано у GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Пошук гомологічних нуклеотидних послідовностей 16S рДНК, депонованих у GenBank, проведено за допомогою програми BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Гомологічні ділянки послідовностей з відповідністю відбирали за допомогою програми AliBee (http://www.genebee.msu.su/genebee.html). Топологію реконструйованого філогенетичного дерева було відтворено бутстреп-вибірковим методом. Філогенетичне дерево побудовано на основі матриці подібності за допомогою програми TreeTop-Phylogenetic Tree Prediction (http://www.genebee.msu.su/services/phtree).

Результати і обговорення. Відомо, що вміст GC-пар у геномній ДНК є однією з важливих характеристик виду. За Ямамото [10], GC-склад геномної ДНК для II кластеру всередині роду *Pseudomonas*, до якого віднесено Г$^-$ рухливі паличковидні мікроорганізми, здатні продукувати флуоресцентний пігмент та рости при температурі 4 °С і не спроможні рости при 41 °С, коливається в межах 59,0—63,6 молярних %. До цього кластеру автор включив і представників «*syringae* complex», до якого входять *P. amygdali*, *P. caripapayae*, *P. ficuserctae*, патовари видів *P. syringae* і *P. savastanoi*. Встановлено, що для більшості досліджених штамів *P. lupini* молярний % GC-пар коливається від 58,5 до 60,8 мол. % (рис. 2), що, за даними літератури, відповідає значенням для *P. syringae* і *P. savastanoi* [7, 10].

Аналогічно в наших дослідженнях молярний % GC-пар у молекулі геномної ДНК типового штаму 8511 дорівнює 58,8 мол. %, що збігається з літературними даними [7]. Виняток становив штам *P. lupini* 8531, для якого молярний % GC у геномній ДНК склав 62,5. Тобто вміст GC-пар у молекулі

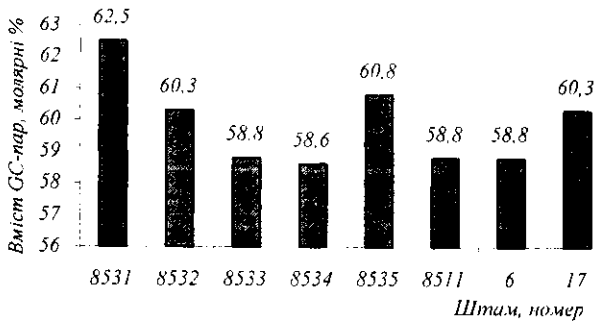

Рис. 2. Молярний % GC-пар у ДНК штамів *P. lupini* та типового штаму *P. syringae pv. syringae* 8511

Таблиця 2
Рівень генотипової спорідненості бактеріальних таксонів при використанні різних методів [22]

Порівнювані таксони	Різниця вмісту GC-пар у ДНК, мол. %	Рівень ДНК-ДНК гібридизації, %	Рівень спорідненості генів 16S рРНК, %
Родини (або роди однієї родини)	*	*Менше 15	*Менше 90
Види одного роду	Більше 10	Не менше, ніж 20	91—98
Штами, які належать до різних видів	Від 1 до 10	Менше 60—70	Менше 97
Штами одного виду	Від 0 до 1	60—70	97,5—99,9

Примітка. *Для великих таксономічних рангів (рід, родина) результати можуть потрапляти в межі похибки експерименту.

ДНК *P. lupini* 8531 на 2,5 мол. % вище, ніж у інших штамів *P. lupini* та типового штаму, що, згідно з даними літератури [22], свідчить про його приналежність до іншого виду (табл. 2).

Виявлено, що тільки штам *P. lupini* 8531 має 100 %-ву гомологію послідовності гена 16S рРНК з референт-штамом *P. savastanoi pv. glycinea* в нуклеотидній базі GenBank (табл. 3).

Як видно з рис. 3, штам 8531 є найуособленішим генетично порівняно з іншими дослідженими штамами та типовим штамом *P. syringae pv. syringae* 8511.

Слід відмітити, що вищий у порівнянні з іншими штамами на 2 мол. % вміст GC-пар у молекулі ДНК також має штам *P. lupini* 8535, а на 1,5 мол. % — штами 8532 і 17. Але як штами *P. lupini* 8535, 8532 і 17, так і решта штамів мають високу спорідненість послідовностей гена 16S рРНК із задепонованими у GenBank нуклеотидними послідовностями цього гена деяких патоварів, які, згідно із сучасними даними, входять до видів і *P. syringae*, і *P. savastanoi.*

Нуклеотидні послідовності генів 16S рРНК штамів *P. lupini* та типового штаму *P. syringae pv. syringae* 8511 задепоновано в GenBank під такими номерами: 8531 — DQ318862, 8532 — DQ318861, 8533 — DQ318863, 8534 — DQ318864, 8535 — DQ318865, 8511 — DQ318866, 6 — DQ318867, 17 — Q318868.

Наші результати цілком підтверджують літературні відомості про високий відсоток ідентичності нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК у близькоспоріднених видів *P. syringae* і *P. savastanoi*

Таблиця 3
Ідентичність нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК штамів P. lupini з такими гена 16S рРНК бактерій, які зберігаються у нуклеотидній базі GenBank

Номер досліджуваного штаму	Назва виду, патовару і номер референс-штаму у нуклеотидній базі GenBank	Кількість нуклеотидів у фрагменті 16S рРНК	Ідентичність послідовностей, %
8531	*P. savastanoi pv. glycinea*	1478	100
	P. syringae pv. syringae B 728a		
	P. savastanoi pv. phaseolicola		
	P. savastanoi pv. savastanoi ATCC 13522T		
	P. syringae pv. pisi		
8532, 8533, 8534, 8535, 6, 17	*P. syringae pv. syringae* B 728a	1476—1491	99
	P. savastanoi pv. phaseolicola		
	P. savastanoi pv. glycinea		
	P. savastanoi pv. savastanoi ATCC 13522T		
	P. syringae pv. pisi		

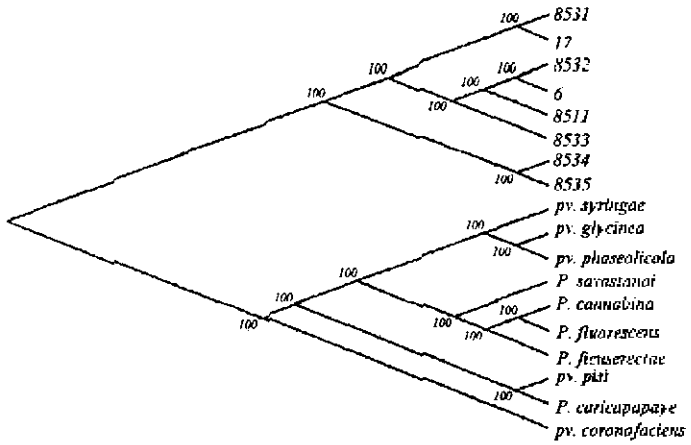

Рис. 3. Філогенетичне дерево, побудоване на основі нуклеотидних послідовностей генів 16S рРНК штамів *P. lupini* та типового штаму *P. syringae pv. syringae* 8511, яке відображає їхню генетичну спорідненість

[10]. За даними [7], патовари фітопатогенних псевдомонад *glycinea* і *phaseolicola*, які викликають кутасту плямистість сої і квасолі, перенесено з виду *P. syringae* до виду *P. savastanoi* виключно на основі результатів ДНК-ДНК гібридизації [5, 7, 10]. Так, рівень подібності молекули ДНК, встановлений в результаті ДНК-ДНК гібридизації, між типовим штамом *P. savastanoi savastanoi* 1392^T і типовими штамами патоварів *phaseolicola* і *glycinea* складає 72—83 %, а між цими ж штамами і типовим штамом *P. syringae pv. syringae* 1670^T— 50—56 %, що, на думку автора, свідчить про приналежність патоварів *phaseolicola* і *glycinea* до виду *P. savastanoi* [10]. Ця рекласифікація до сьогодні є спірним питанням у систематиці фітопатогенних псевдомонад [8, 9].

Таким чином, попередньо одержані нами результати аналізу комплексу фенотипових ознак [13—16] та наведені в цій роботі дані аналізу генотипових властивостей свідчать про відсутність окремого виду *P. lupini*. Більшість досліджених штамів завдяки недавно встановленій фенотиповій спорідненості та вивченому GC-складу геномної ДНК нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК з типовим штамом *P. syringae pv. syringae* 8511 належать до виду *P. syringae*. Виняток складає штам 8531, який на основі GC-кладу геномної ДНК та нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК віднесено нами до *P. savastanoi pv. glycinea*.

L. A. Dankevich, R. I. Gvozdyak

The genotypic properties of *Pseudomonas lupini* — bacterial agent of lupin spottiness

Summary

The bacterial chromosomes G+C content and nucleotides chain of 16S RNA of Pseudomonas lupini Beltyukova, Korolyova strains have been determined for the first time. On the basis of these results and earlier obtained genotypic properties of Pseudomonas lupini the strains majority belongs to Pseudomonas syringae. In our opinion the only exception is strain 8531, which on the basis of its genotype belongs to Pseudomonas savastanoi pv. glycinea.

Key words: Pseudomonas lupini, Pseudomonas syringae, Pseudomonas savastanoi, G+C content, nucleotides chain of 16S RNA.

Л. А. Данкевич, Р. И. Гвоздяк

Генотипические свойства возбудителя бурой бактериальной пятнистости люпина *Pseudomonas lupini*

Резюме

Определено содержание GC-пар в геномной ДНК и нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штаммов P. lupini Beltjukova, Koroljova. На основе этих и полученных ранее фенотипических признаков большинство штаммов P. lupini отнесено к Pseudomonas syringae. Исключение составил штамм P. lupini 8531, который из-за сродства GC-состава геномной ДНК и нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК отнесен нами к Pseudomonas savastanoi pv. glycinea.

Ключевые слова: Pseudomonas lupini, Pseudomonas syringae, Pseudomonas savastanoi GC-состав ДНК, нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бельтюкова К. И., Королева И. Б.* Бактериальные болезни зерно-бобовых культур.—Киев: Наукова думка, 1974.—339 с.
2. *Королева И. Б.* Биология возбудителей бактериальных болезней люпина в УССР: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1963.—16 с.
3. *Микроорганизми*-возбудители болезней растений / Под ред. В. И. Билай.—К.: Наук. думка, 1988.—547 с.
4. *Определитель* бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. (пер. с англ.).—М.: Мир, 1997.—Т. 1.—432 с.
5. *Young J. M., Saddler G. S., Takikawa Y., De Boer S. H., Vautering L., Gardan L., Gvozdyak R. I., Stead D. E.* Names of plant pathogenic bacteria // Rev. Plant Pathol.—1996.—75.—P. 721—763.
6. *Anzai Y., Kim H., Park J.-Y., Wakabayashi H., Oyaizu H.* Phylogenetic affiliation of *Pseudomonas* based on 16S rRNA sequence // Int. J. System. and Evol. Microbiol.—2000.—50.—P. 1563—1589.

7. *Gardan L., Bollet C., Ghorrah M. A. B. U., Grimont F., Grimont P. A. D.* DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae subsp. savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. // Int. J. System. Bacteriol.—1992.—**42**.—P. 606—612.
8. *Louws F. J., Rademaker J. L. W., de Bruijn F. J.* The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis // Annu. Rev. Phytopathol.—1999.—37.—P. 81—125.
9. *Stead D. E., Henessey J., Elphinstone J. G., Wilson J. K.* Modern methods for classification of plant pathogenic bacteria including *Pseudomonas syringae* // Develop. Plant Pathol.—1998.—9. · P. 427—434.
10. *Yamamoto S., Kasai H., Arnold D. L., Jakekson R. W., Vivian A., Harayama S.* Phylogeny of genus *Pseudomonas:* intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes // Microbiology.—2000.—146.—P. 2385—2394.
11. *Коцофляк О. И., Киприянова Е. А., Леванова Г. Ф.* Таксономический анализ штаммов бактерий рода *Pseudomonas* с неопределенной видовой принадлежностью // Микробиол. журн.—2004.—**66**, № 3.—С. 5—13.
12. *Коцофляк О. І.* Дослідження бактерій роду *Pseudomonas* методами поліфазного таксономічного аналізу: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.—Київ, 2004.—21 с.
13. *Данкевич Л. А.* Специализация *Pseudomonas lupini* на люпині, горосі, квасолі та сої // Наук. вісн. Чернівецького ун-ту: Зб. наук. праць.—2004.—Вип. 194.—С. 47—52.
14. *Данкевич Л. А.* Хактеристика клеточных липидов *Pseudomonas lupini* по жирнокислотному составу // 9-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология — наука XXI века» (Пущино, 17—21 мая, 2004): Сб. тез. — Пущино, 2005.—С. 147.
15. *Данкевич Л. А., Гвоздяк Р. І.* Патогенні та біохімічні властивості збудника бурої бактеріальної плямистості люпину *Pseudomonas lupini* // Агроекол. журн.—2005.—№ 1.—С. 63—68.
16. *Данкевич Л. А., Яковлева Л. М.* Антигенная гетерогенность *Pseudomonas lupini* // Материалы междунар. конф.: Тез. докл.—Минск, 2004.—С. 16.
17. *Леванова Г. Ф., Парфенова О. В, Кашников С. Ю.* Молекулярно-биологические способы идентификации и дифференциации бактерий. Методические рекомендации.—Москва, 1995.—С. 19.
18. *Федоров Н. А., Суханов Ю. С., Асади Мобархан А. Х., Артемьев М. И.* Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Методическое пособие для начинающих. Принципы и практические рекомендации для ее постановки с целью детекции микроорганизмов.—Москва, 1996.—С. 31.
19. *Xu Hua-Xi, Kawamura Yoshtaki, Licher Zhao Na Li* A rapid method for determining the G+C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in capillary tube // Int. J. System. and Evol. Microbiol.—2000.—50.—P. 1463—1469.
20. *Edwars U., Rogal T., Blocker H., Emde M., Bottger E. C.* Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of gene coding for 16S ribocomal RNA // Nucl. Asids Res.—1989.—17.—P. 7843—7853.
21. *Marchuk D., Drumm M., Saulino A. S., Collins F.* Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR product // Nucl. Acids Res.—1990.—19.—P. 1154—1155.
22. *Романовская В. А., Рокитко П. В., Шилин С. О.* и др. Актуальные проблемы филогенетической классификации бактерий // Микробиол. журн.—2003.—65, № 5.—С. 46—66.

УДК 579.252.841.1
Надійшла до редакції 03.10.05