

О.А. Савенко, Л.М. Буценко, Л.А. Пасічник, В.П. Патика

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д 03608, Україна,
тел.: + 38 (044) 526 55 78, e-mail: s.helen@ukr.net

RAPD-АНАЛІЗ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ВИДІЛЕНИХ З БУР'ЯНИВ В АГРОФІТОЦЕНОЗІ ПШЕНИЦІ

Мета роботи. Дослідження генетичної різноманітності штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з різних видів бур'янів: хвощу польового, березки польової, плоскоухи звичайної, осоту польового, підмаренника чіпкого, редьки дикої та лободи білої, що мали ознаки бактеріального ураження. **Методи.** RAPD–ПЛР аналіз. **Результати.** Проаналізовано штами *Pseudomonas syringae*, ізольовані з різних видів бур'янів в агрофітоценозі пшениці. Встановлено спорідненість ізольованих нами штамів з неопатотиповим штамом *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394 і типовим штамом *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281. Більшість виділених штамів мали високий ступінь спорідненості зі збудником базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що є найпоширенішим на зернових культурах. Менш поширеним на пшениці є збудник бактеріального опіку *P. syringae* pv. *syringae* і лише три штами бактерій, виділених з бур'янів, мали з ним спільні продукти реакції. **Висновки.** Штами *P. syringae*, виділені з різних видів бур'янів, і штами *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, збудники бактеріальних хвороб пшениці, є генетично однорідною групою. Це підтверджує гіпотезу про те, що бур'яни є однією з екологічних ніш збереження і виживання збудників бактеріозів та за сприятливих умов можуть бути джерелом інфекції.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae*, генетична різноманітність, RAPD-ПЛР аналіз.

В останні роки велика увага приділяється вивченню бактеріальних хвороб цінних зернових культур [4]. Для того щоб отримати найбільш повну інформацію, необхідну для розуміння джерел інфекції та можливих шляхів її розповсюдження потрібно досліджувати всі компоненти агрофітоценозу, у тому числі і бур'яни. Твердження про те, що бур'яни можуть бути однією з екологічних ніш виживання збудників бактеріозів неодноразово висувалося науковцями [3]. Та для остаточних висновків необхідне вивчення генетичної спорідненості між фітопатогенами виділеними із зернових культур та бур'янів.

Зважаючи на схожість патоварів *Pseudomonas syringae* за фізіологічними і біохімічними властивостями, науковці намагаються отримати додаткову інформацію шляхом вивчення геному. Для цього досить успішно застосовується рестрикційний аналіз ДНК [16], аналіз повторюваних елементів ДНК, що отримані в результаті ампліфікації з REP-, ERIC-, BOX- праймерами (rep-ПЛР) [1,



9, 10]. Але результати отримані при дослідженні спорідненості мікроорганізмів за допомогою REP-, ERIC-, та BOX- ПЛР можуть бути менш інформативними для близько споріднених штамів [9]. В таких випадках AP-PCR/RAPD аналіз є більш ефективним, так як дає точніші оцінки між близькими популяціями, хоча і потребує оптимізації для кожної конкретної мети [10, 13].

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – довільно ампліфікована поліморфна ДНК – продукт ПЛР з довільними праймерами, метод запропонований [15]. Праймери, що використовують для RAPD-ПЛР, мають відносно невеликі розміри (8–12 нуклеотидів), довільну нуклеотидну послідовність і [G+C] – склад не нижче 50% [15]. RAPD-ПЛР аналіз успішно використовується для генетично-популяційного аналізу широкого кола мікроорганізмів. Переваги RAPD-ПЛР аналізу полягають і у тому, що він дозволяє встановити генетичну варіабельність цілого геному, порівняно з методами гібридизації рибосомальної РНК [7].

Враховуючи те, що нам не відома нуклеотидна послідовність ДНК аналізованих штамів, застосування техніки RAPD-ПЛР є найбільш оптимальним для досягнення поставлених завдань.

Метою роботи було дослідження генетичної різноманітності штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з уражених бур'янів.

Матеріали і методи

Досліджували 10 штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з уражених рослин бур'янів, відібраних в посівах пшениці в період 2012–2013 рр. в Київській, Чернігівській та Полтавській областях (штами *P. syringae*: 515в і 516а – хвощ польовий, 560а і 562 – березка польова, 650в і 650б – плоскуха звичайна, 662г – осот польовий, 684б – підмаренник чіпкий, 536а – редька дика, 566б – лобода біла) та типовий штам *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 (УКМ В-1027) і неопатотиповий штам *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* PDDCC 4394 (УКМ В-1011) із колекції культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Аналіз поліморфізму ДНК фітопатогенних штамів *P. syringae* проводили, використовуючи метод RAPD ПЛР [15].

Для виділення ДНК використовували 18–20-годинну культуру фітопатогенних бактерій, вирощену на МПБ при 28 °С в умовах гойдання (160 об/хв). Після культивування клітини осаджували центрифугуванням при 800g 10 хв, ресуспендували у фізіологічному розчині і знову центрифугували в тому самому режимі. ДНК виділяли, використовуючи набір реактивів «ДНК-сорб Б» («AmpliSens», Росія) за інструкцією виробника. Виділену ДНК зберігали в морозильній камері при температурі -20 °С.

Здійснення класичної RAPD-ампліфікації вимагає наявності в реакційній суміші одного короткого (до 10 нуклеотидів) праймеру, але для отримання достовірних результатів необхідно поєднувати декілька праймерів (від чотирьох до 10 і більше) [13]. Тому для отримання найбільш точних результатів щодо



спорідненості штамів *P. syringae* використали чотири праймери. Два з них, ОРА-13 (5'-CAGCACCCAC-3') і ОРД-13 (5'-GGGGTGACGA-3') добре зарекомендували себе в роботі з бактеріями роду *Pseudomonas* [14].

Інші два праймери С 4 (5'-CCGCATCTAC-3') та С 13 (5'-AAGCCTCGTC-3') було вибрано доволіно враховуючи лише те, що послідовність праймера має містити більш, ніж 60% [G+C] і мати довжину близько десяти нуклеотидів [6].

Для ампліфікації з RAPD-праймерами готували суміш (25 мкл), що містила: 200 нг геномної ДНК; 25 пмоль праймеру; 2,5 Units SynTaq полімерази; 0,2 мМ кожного дезоксинуклеотиду трифосфату; 2,5 мкл 10-кратного ПЛР буферу. Кожна реакційна суміш була ампліфікована на термоциклері MasterCycle Personal (Eppendorf, Німеччина) за таким режимом: початкова денатурація 95 °С 5 хв, 45 циклів: 94 °С – 1 хв, 38 °С – 1 хв, 74 °С – 1 хв [14].

Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом в 1,5% агарозному гелі з додаванням етідиуму броміду (0,5 мкг/мл); в ТВЕ буфері 40 хв за напруги 90 В. Як маркер використано 2000 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas).

Результати та їх обговорення

Всі досліджені штами бактерій *Pseudomonas syringae* при штучному зараженні були патогенними для рослини-хазяїна, інших видів бур'янів, а також викликали симптоми ураження на зернових культурах (пшениця, ячмінь, жито). Бактерії не відрізнялися за морфологічними і фізіолого-біохімічними властивостями, але належали до різних серогруп і різнилися за агресивністю до рослини-хазяїна. Більшість штамів були високо агресивними [5].

В результаті RAPD-ПЛР продукти ампліфікації утворювалися за використання всіх чотирьох праймерів (ОРА-13, ОРД-13, С 4, С 13). Лише за використання праймеру ОРА-13 (5'-CAGCACCCAC-3') вдалося отримати ДНК-фрагменти за результатами аналізу яких, штами *Pseudomonas syringae*, виділені з бур'янів, розподілилися на дві групи.

Штами *P. syringae* 515в, 536а, 560а, 562, 566б, 650в, 684б мали високий ступінь спорідненості з неопатотиповим штамом *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394, що є збудником базального бактеріозу пшениці. У цієї групи був спільний панівний фрагмент 900 т.п.н. і фрагмент 1500 т.п.н. (рис. 1). У раніше досліджених штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих з уражених рослин пшениці в Україні, також виявлено високий ступінь спорідненості із неопатотиповим штамом *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 і переважальні фрагменти такого ж розміру [2].

Штами *P. syringae* 516а, 622г, 650б виявилися високо спорідненими з типовим штамом *P. syringae* pv. *syringae* 281, збудником бактеріальної плямистості, та мали спільні фрагменти довжиною 400 т.п.н., 800 т.п.н. та 1031 т.п.н.

У більшості досліджень генетичного поліморфізму фітопатогенних бактерій, ізольованих з різних рослин, штами об'єднувалися у групи зі спільною рослиною хазяїном [7, 12].



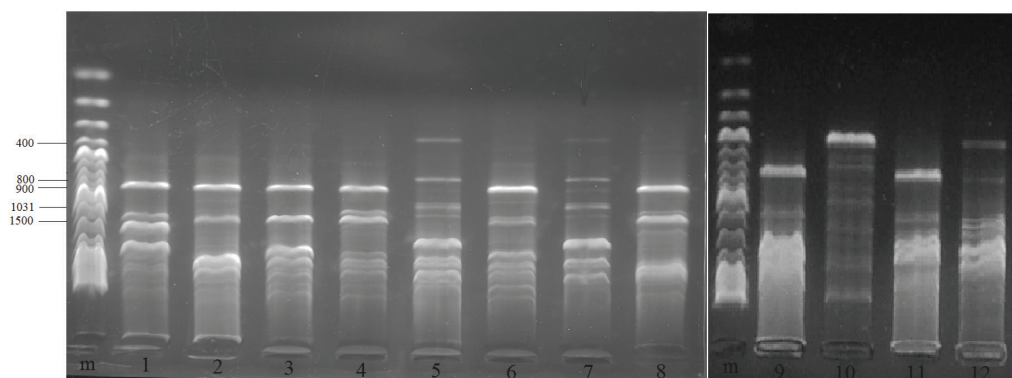


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР з використанням праймеру ОРА-13 у 1,5% агарозному гелі

m – маркери довжини фрагментів; 1. – *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394; 2. – *P. syringae* pv. *syringae* 281; 3. – *P. syringae* 515в; 4. – *P. syringae* 516а; 5 – *P. syringae* 536а; 6. – *P. syringae* 560а; 7. – *P. syringae* 562; 8. – *P. syringae* 566б; 9. – *P. syringae* 684б; 10. – *P. syringae* 662г; 11. – *P. syringae* 650в, 12. – *P. syringae* 650б.

Fig. 1. Distribution of PCR products amplified with ORA- 13 primer on 1.5% agarose gel after electrophoresis

m – DNA length marker; 1. – *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394; 2. – *P. syringae* pv. *syringae* 281; 3. – *P. syringae* 515в; 4. – *P. syringae* 516а; 5 – *P. syringae* 536а; 6. – *P. syringae* 560а; 7. – *P. syringae* 562; 8. – *P. syringae* 566б; 9. – *P. syringae* 684б; 10. – *P. syringae* 662г; 11. – *P. syringae* 650в, 12. – *P. syringae* 650б.

Дослідженням штамів *Xylella fastidiosa* встановлено, що відсоток генетичної різноманітності за рахунок географічного походження є меншим, ніж відсоток відмінностей, пов'язаний з різними рослинами, з яких виділений збудник [11]. У ході наших досліджень подібності між штамми *P. syringae*, що мають спільну рослину-хазяїна не виявлено. Але вдалося встановити спорідненість між штамми *P. syringae*, виділеними з бур'янів в посівах пшениці, та збудниками бактеріозів зернових культур. Більшість штамів мали високий ступінь спорідненості зі збудником базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що є найпоширенішим на зернових культурах. Менш поширеним на пшениці є збудник бактеріального опіку *P. syringae* pv. *syringae* і лише три штами бактерій із бур'янів мали з ним спільні продукти реакції (рис. 2).

Проте, дослідниками [1] встановлено високий ступінь генетичної варіабельності штамів роду *Pseudomonas*, ізольованих з уражених тканин зернових культур з симптомами базального бактеріозу.

Отримані нами результати дозволяють зробити висновок, що штами *P. syringae*, виділені з різних видів бур'янів, і штами *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, збудники бактеріальних хвороб пшениці є генетично однорідною групою. Генетично

однорідною групою за даними RAPD-аналізу з використанням праймера OPA-13 є штами *P. syringae* pv. *atropaciens* ізольовані з пшениці [2]. Це підтверджує гіпотезу про те, що бур'яни можуть бути резервуарами збудників бактеріозів і, за сприятливих умов, являтися джерелом бактеріальної інфекції для сільськогосподарських рослин. В той же час, науковцям, які досліджували генетичну мінливість штамів *P. syringae* pv. *syringae*, ізольованих з бур'янів у фруктових садах, за допомогою RFLP- і ERIC – ПЛР аналізу не вдалося підтвердити припущення, що бур'яни забезпечують перезимівлю штамів *P. syringae* і слугують джерелом поширення інфекції [8].

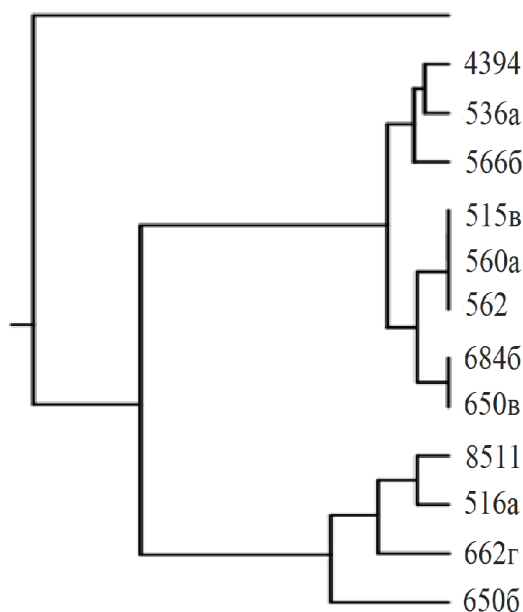


Рис. 2. Дендрограма спорідненості патогенних для бур'янів штамів бактерій роду *Pseudomonas*, побудована за результатами RAPD-профілювання з праймером OPA-13

Fig. 2. Dendrogram of relationship between weed-pathogenic strains of *Pseudomonas* species compiled on the results of RAPD-profiling with OPA-13 primer

Результати наших досліджень мають важливе значення для розуміння генетичної структури та динаміки популяції патогена *P. syringae* в агрофітоценозі пшениці і ґрунтах для розробки практичної стратегії профілактики та управління захворюваннями рослин сільськогосподарських культур [10].

О.А. Савенко, Л.М. Буценко, Л.А. Пасичник, В.Ф. Патыка

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 164, Киев ГСП, Д 03680, Украина

RAPD-АНАЛИЗ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СОРНЯКОВ В АГРОФИТОЦЕНОЗЕ ПШЕНИЦЫ

Реферат

Цель. Исследование генетического разнообразия штаммов *Pseudomonas syringae*, выделенных из различных видов сорняков: хвоща полевого, вьюнка полевого, ежовника обыкновенного, осота полевого, подмаренника цепкого, редьки дикой и мари белой, с признаками бактериального поражения. **Методы.** RAPD-ПЦР анализ. **Результаты.** Проанализированы штаммы *Pseudomonas syringae*, изолированные из разных видов сорняков в агрофитоценозе пшеницы. Установлено родство исследованных штаммов с неопатотиповым штаммом *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, и типовым штаммом *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281. Большинство выделенных штаммов имели высокую степень родства с возбудителем базального бактериоза пшеницы *P. syringae* pv. *atrofaciens*, который является самым распространенным на зерновых культурах. Менее распространенным на пшенице является возбудитель бактериального ожога *P. syringae* pv. *syringae* и только три штамма бактерий, выделенных из сорняков, имели с ним общие продукты реакции. **Выводы.** Штаммы *P. syringae*, выделенные из различных видов сорняков, и штаммы *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 и *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, возбудители бактериальных болезней пшеницы являются генетически однородной группой. Это подтверждает гипотезу о том, что сорняки – это одна из экологических ниш сохранения и выживания возбудителей бактериозов и при благоприятных условиях они могут быть источником инфекции.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, генетическое разнообразие, RAPD-ПЦР анализ.

O.A. Savenko, L.M. Butsenko, L.A. Pasichnyk, V.P. Patyka

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU,
154, Zabolotny Str., Kyiv, D 03680, Ukraine

RAPD-ANALYSIS OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ISOLATED FROM WEEDS IN AGROPHYTOCENOSIS OF WHEAT

Summary

Aim. Investigation of the genetic diversity of *Pseudomonas syringae* strains, isolated from various weeds: horsetail, field bindweed, barnyard grass, sow-thistle,



bedstraw, wild radish, orache white which had the signs of bacterial affection. **Methods.** RAPD-PGR analysis. **Results.** *Pseudomonas syringae* strains, isolated from various species of weeds in wheat agrophytocenosis, were analyzed. We have established the relationship of studied strains with neopatotype strain *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, and the type strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281. Most isolated strains had a high level of affinity with basal bacteriosis pathogen of wheat *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* which is the most common among the crops. Bacterial blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is less widespread and only three bacteria stains isolated from weeds had common reaction. **Conclusion.** *P. syringae* strains isolated from different types of weeds and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB and *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC4394 strains, pathogens of bacterial diseases of wheat are genetically homogeneous group. Our data support the hypothesis that weeds are one of the ecological niches of conservation and survival of bacterial pathogens and under favorable conditions can be a source of infection.

Key words: *Pseudomonas syringae*, genetic diversity, RAPD-PGR analysis.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Боброва В.К., Милютин И.А., Троицкий А.В. Генетическое разнообразие псевдомонад, ассоциированных с зерновыми культурами, пораженными базальным бактериозом // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 4. – С. 537–544.
2. Буценко Л.Н., Пасичник Л.А., Коломиец Ю.В. RAPD-анализ популяции *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* в Украине // Материалы VII Межд. конф. “Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии” (Минск, 31 мая – 4 июня 2010 г.) – Минск, Беларусь, 2010. – С. 12–13.
3. Гвоздяк Р.И., Яковлева Л.М., Пасичник Л.А., Щербина Т.Н., Огородник Л.Е. Бактерии рода *Pseudomonas* на сорняках // Микробиол. журн. – 2005. 67, № 2. – С. 63–69.
4. Пасичник Л.А., Патыка В.Ф., Ходос С.Ф., Винничук Т.С. Базальный бактериоз пшеницы и влияние агротехнических приемов на его распространение // Микробиол. журн. – 2012. – Т. 74, № 4. – С. 37–44.
5. Пасичник Л.А., Савенко Е.А., Буценко Л.Н., Щербина Т.Н., Патыка В.Ф. *Pseudomonas syringae* – возбудитель бактериальных болезней сорняков // Микробиол. журн. – 2013. – Т. 75, № 4. – С. 41–46.
6. Clerc A., Manceau C., Nesme X. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae* // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64, N 4. – P. 1180–1187.
7. Khoodoo M.H.R., Jaufeerally-Fakim Y. RAPD-PCR fingerprinting and southern analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains isolated from different aroid hosts and locations // Plant Dis. – 2004. – Vol. 88, N 9. – P. 980–988.



8. Little E. L., Bostock R. M., Kirkpatrick B. C. Genetic Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Strains from Stone Fruits in California // *App. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64, N 10. – P. 3818–3823.
9. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., de Bruijn F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – Vol. 60, N 7. – P. 2286–2295.
10. Louws F.J., Rademaker I.L.W., de Bruijn F.J. The three DS of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and diseases diagnosis // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 81–125.
11. Montero-Astúa M., Hartung J. S., Aguilar E., Chacón C., Li W., Albertazzi F. J., Rivera C. Genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from Costa Rica, São Paulo, Brazil, and United States // *Phytopathology.* – 2007. – Vol. 97, N 10. – P. 1338–1347.
12. Momol M.T., Momol E.A., Lamboy W.F., Norelli J.L., Beer S.V., Aldwinckle H.S. Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs) // *J. Appl. Microbiol.* – 1997. – Vol. 82, N 3. – P. 389–398.
13. Osborn M., Smith C. (eds). *Molecular microbial ecology* Published/Created: New York, NY: Taylor & Francis, c 2005. ISBN: 1859962831
14. Sazakli E., Leotsinidis M., Vantarakis A., Papapetropoulou M. Comparative typing of *Pseudomonas* species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol. 99. – P. 1191–1203.
15. Williams J.G., Kubelik A.R., Livar K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids. Res.* – 1990. – 18, N 22. – P. 6531–6535.

Стаття надійшла до редакції 23.07.2014 р.

