

Л.А. Данкевич

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

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *ERWINIA* – ЗБУДНИКІВ ХВОРОБ ЯБЛУНІ В УКРАЇНІ

Мета. Встановити спорідненість нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК 10 ізолюваних штамів *Erwinia* sp. та 9 колекційних штамів «*Erwinia horticola*» з типовими представниками роду *Erwinia* для їх коректної ідентифікації на рівні виду. **Матеріали і методи.** Об'єкти – 10 ізолюваних з уражених тканин яблуні штамів *Erwinia* sp. та 9 колекційних штамів «*Erwinia horticola*». ДНК-копію гену 16S рРНК ампліфікували з використанням універсальних праймерів рА та рН. Побудову зворотнього компліменту, редагування, вирівнювання і елаймент послідовностей здійснювали за допомогою програм Multalin і Sequence Manipulation Suite. Пошук гомологічних, задепонованих в GenBank, нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК проводили, використовуючи програму BLASTN. Для побудови дендрограми філогенетичних зв'язків застосовували програму MEGA 5. **Результати.** Аналіз нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК встановив високий рівень гомології (99-98%) досліджуваних штамів з типовими штамми видів *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigrans*, *E. uzenensis*, *E. billingiae*, *E. persicina*, *E. aphidicola*. **Висновки.** Зважаючи на досліджений нами раніше комплекс ознак фенотипу та встановлену гомологію нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК, можна стверджувати, що найбільш вірогідною є спорідненість ізолюваних нами штамів *Erwinia* sp. та колекційних штамів «*Erwinia horticola*» саме з типовими штамми видів *E. amylovora* та *E. pyrifoliae*. Оскільки, згідно даних літератури, ці види близькоспоріднені та погано диференціюються за гомологією нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК, для остаточної видової ідентифікації досліджуваних нами штамів роду *Erwinia* необхідно залучення інших генотипових ознак.

Ключові слова: *Erwinia* sp., «*Erwinia horticola*», *Erwinia amylovora*, нуклеотидні послідовності гену 16S рРНК, філогенетичний аналіз

Рід *Erwinia* – один із найстаріших родів бактерій, названий на честь видатного американського фітопатолога Ервіна Франка Сміта (1854—1927), що об'єднує асоційовані з рослиною епіфітні, сапрофітні і фітопатогенні види бактерії [3, 6]. Зокрема типовим представником даного роду є карантинний для більшості країн світу, у тому числі України, вид *Erwinia amylovora* – збудник бактеріального опіку плодівих, що здатен уражувати близько 170 видів рослин [1, 3, 6, 9]. Всебічне дослідження біологічних властивостей представників даного роду повсякчас привертає увагу науковців усього світу. Останнім часом завдяки значному поштовху у розвитку та застосуванні у мікробіології сучасних молекулярно-генетичних методів, в тому числі і філогенетичного аналізу, систематика даного роду зазнала значних змін [3, 10]. Так, цілі групи видів, що раніше належали до роду *Erwinia*, були віднесені до шести родів – *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Dickeya*, *Brenneria* і *Lonsdalea* [3, 7, 10, 18]. Крім того, наприкінці 90-х років минулого сторіччя до складу даного роду було віднесено

ряд новостворених видів: *Erwinia billingae*, *Erwinia persicina*, *Erwinia psidii* тощо [3, 10, 15]. Завдяки всебічному застосуванню у таксономії бактерій великого арсеналу генетичних методів досліджень, що постійно збільшується та удосконалюється, процес віднесення нових видів до складу роду *Erwinia* триває і досі. Зокрема останнім часом до складу даного роду також включено види *Erwinia uzenensis*, *Erwinia piriflorinigrans*, *Erwinia oleae*, *Erwinia toletana* тощо [7, 8, 11, 13]. Як відомо, у 1963–1974 роках К.Г. Бельтюковою, Р.І. Гвоздяком із колегами на території України було виділено та ідентифіковано за комплексом ознак фенотипу новий вид – «*Erwinia horticola*», що викликає чорний бактеріоз яблуні, груші і буку. Та, не зважаючи на детальне вивчення фенотипових властивостей, значну шкодочинність і подібність окремих симптомів до деяких видів роду *Erwinia*, таксономічний статус даного збудника до сих пір є невизначеним [3, 6, 10]. Раніше за допомогою набору сучасних методів досліджень нами було проаналізовано комплекс фенотипових ознак ізольованих *Erwinia* sp. та колекційних «*Erwinia horticola*» штамів. В ході досліджень виявлено штамову варіабельність даних властивостей та їх подібність до представників виду *Erwinia amylovora*. Тобто, одержані нами результати ставлять під сумнів існування окремого виду «*Erwinia horticola*» [4].

Зважаючи на зазначене вище, метою наших досліджень було вивчення спорідненості нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК 10 ізольованих штамів *Erwinia* sp. та 9 колекційних штамів «*Erwinia horticola*» з типовими представниками роду *Erwinia* для їх коректної ідентифікації на рівні виду.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були ізольовані нами з уражених тканин яблуні штами фітопатогенних бактерій *Erwinia* sp. 1я, 2я, 3я, 4я, 5я, 6я, 7я, 8я, 9я, 10я та колекційні штами «*Erwinia horticola*» 8559, 8558, 8560, 8561, 8398, виділені К.Г. Бельтюковою і Л.Т. Пастушенко із хворих дерев яблуні. У роботі також використовували колекційні штами «*Erwinia horticola*» 8793, 8794, 8795 і 8557, ізольовані Р.І. Гвоздяком із буку. Для порівняльного аналізу в дослідження також включили типовий штам *Erwinia amylovora* УКМ В 9057[†]. Штами люб'язно надані з колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України та Української колекції мікроорганізмів (УКМ). Для філогенетичного аналізу також використовували нуклеотидні послідовності гену 16S рРНК типових штамів видів роду *Erwinia*: *E. amylovora* ATCC (American Type Culture Collection) 15580, *E. pyrifoliae* Ep1/96, *E. piriflorinigrans* CFBP (International center of Microbial Ressources – French Collection of Plant-associated Bacteria) 5882, *E. uzenensis* YPPS951, LGM 25843 (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms), *E. billingae* Eb661, *E. mallotivora* LMG 2708, *E. persicina* LMG 11254, *E. tracheiphila* LMG 2906, *E. psidii* LMG 7034, *E. aphidicola* IAM 14479 (Culture collection at Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Japan), що розміщуються у GenBank.

Для виділення ДНК застосовували Silica Spin колонки фірми Qiagen і набір реактивів «ДНК-сорб-В». Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометру BioPhotometr. ДНК копію гена 16S рРНК ампліфікували з використанням універсальних праймерів рА-5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (8-27, нумерація за *E.coli*) і рН-3'-

AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5' (1542-1523, нумерація за *E. coli*) [5]. Ампліфікування проводили з використанням термоциклеру Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902, фірми Applied Biosystem (США) за експериментально підібраних умов: додаткова денатурація ДНК – 96°C/6 хв та основна денатурація ДНК – 94°C/15с; відпалювання праймерів – 65°C/15с, елонгація ДНК – 72°C/5хв. Продукти ампліфікації клонували з урахуванням наявності додаткового аденозину на 3' кінці фрагменту за рахунок термінальної трансферазної активності Taq ДНК-полімерази в Т-вектор на основі плазмиди *pBLuescript SK(+)*, за сайтом рестрикції Eco RV [12]. Рекомбінантні вектори, що несуть вставку продукту ампліфікації, виділяли з трансформованих клітин *E. coli* XL 1-blue методом лужного лізису [2, 17]. Ампліфікати 16S рДНК сиквенували з 5'- і 3'-кінців на автоматичному сиквенаторі 3130 Genetic Analyzer. Початок і кінець гену 16S рРНК досліджуваних штамів визначали порівняльним аналізом з аналогічними фрагментами типового штаму *E. coli* ATCC 11775^T (X80725) та типових штамів видів, що належать до роду *Erwinia*. Побудову зворотного компліменту здійснювали з використанням програми Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>). Редагування, вирівнювання і елаймент послідовностей проводили за допомогою програми Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Встановлення спорідненості нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК досліджуваних штамів із аналогічними нуклеотидними послідовностями типових штамів роду *Erwinia*, що розміщені у GenBank, здійснювали, використовуючи програму BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Для побудови дендрограми філогенетичних зв'язків застосовували програму MEGA 5 [19]. Дендрограму будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двопараметричної моделі Кімури за 100 репліками «bootstrap» аналізу.

Результати та їх обговорення. Як вже зазначалося, протягом останніх десятиліть структура роду *Erwinia* зазнала значних змін. Певним чином це пов'язано з прийняттям Міжнародним Комітетом з узгодження підходів у бактеріальній систематиці рішення про включення філогенетичного аналізу, що базується на встановленні рівня спорідненості нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК до обов'язкових критеріїв виду [3]. Так, переважно на основі даного аналізу, частину видів, що раніше належали до роду *Erwinia*, віднесено до родів: *Pantoea* (*E. ananatis*, *E. cypripedi*, *E. herbicola*, *E. milletiae*, *E. stewartii*, *E. uredovora*), *Enterobacter* (*E. cancerogena*, *E. dissolvens*, *E. nimipressuralis*), *Pectobacterium* (*E. carnegieana*; *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, subsp. *betavasculorum*, subsp. *carotovora*, subsp. *odorifera*, subsp. *wasabiae*; *E. rhapontici*), *Brenneria* (*E. alni*, *E. nigrifluens*, *E. rubrifaciens*, *E. salicis*), *Lonsdalea* (*E. quercina*), *Dickeya* (*E. paradisiaca*, *E. chrysanthemi*) тощо [3, 10]. За даними сучасної таксономії до роду *Erwinia* належать наступні види, що здатні викликати захворювання рослин: *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigra*, *E. uzenensis*, *E. mallotivora*, *E. psidii*, *E. papaya* [3, 10]. Більшість інших видів, що включені до даного роду, хоча і асоційовані з рослинами, але не здатні викликати їх хвороби. Філогенетичні зв'язки між ключовими видами роду *Erwinia* наведені на рисунку 1. Слід також відмітити, що незважаючи на суттєву зміну

у структурі роду *Erwinia*, окремі приклади рекласифікації дискутуються до сих пір [10].

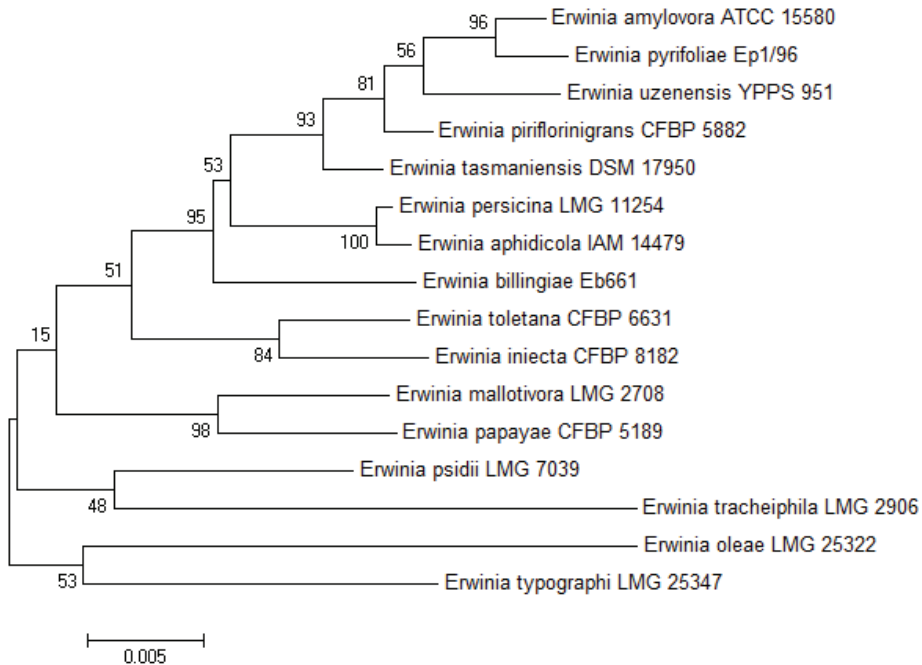


Рис.1. Дендрограма філогенетичних зв'язків між ключовими видами роду *Erwinia*.

У результаті проведених досліджень отримано нуклеотидні послідовності гену 16S рРНК 10 штамів *Erwinia sp.* та 9 штамів «*Erwinia horticola*» загальною довжиною від 1430 до 1468 н.п. та від 1435 до 1473 н.п. відповідно. Також як контроль просиквеновано ген 16S рРНК типового штаму *Erwinia amylovora* В 1095[†] і отримано фрагмент розміром 1466 н.п. Філогенетичний аналіз спорідненості нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК колекційних штамів «*Erwinia horticola*» та основних видів даного роду виявив значну спорідненість (98-99% гомології) з наступними типовими штамми *E. amylovora* ATCC 15580, *E. billingiae* Eb661, *E. persicina* LMG 11254, *E. aphidicola* IAM 14479. Також у 77,7% колекційних штамів виявлено високий ступінь гомології даного гену (98%) з типовими штамми *E. pyrifoliae* Ep1/96, а у 22,2% колекційних штамів також і з *E. piriflorinigrans* CFBP 5882 та *E. uzenensis* YPPS951 (табл.1).

Як відомо, види *E. billingiae*, *E. persicina*, *E. aphidicola*, хоча і асоційовані з рослиною, але не здатні викликати хвороби дерев з симптомами, подібними до бактеріального опіку плодівих [3, 10]. Зокрема до виду *E. billingiae* включено «*Erwinia*-подібні» ізоляти, що виділялися при рутинній діагностиці збудника бактеріального опіку плодівих з пухлин гілок, уражень квіту та нестиглих плодів багатьох видів дерев. Представники даного виду є умовно патогенними для рослин [15]. Вид *E. persicina* об'єднує штами, що продукують пігмент персикового кольору та уражують стручки та насіння бобів з характерними ознаками [3]. Представники виду *E. aphidicola* були ізольовані із горохової попелиці. Дані про їх здатність викликати хвороби рослин відсутні [10]. Зважаючи на це, найбільш ймовірною є спорідненість штамів «*Erwinia horticola*» з представниками

Таблиця 1

Ідентичність нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК
колекційних штамів «*Erwinia horticola*» та типового штаму *Erwinia amylovora* В 1095^Т з нуклеотидними послідовностями гену 16S рРНК
типових штамів, що зберігаються у базі GenBank

Штам	Вид, штамп і коди доступу до нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК типових штамів у базі GenBank	Кількість нуклеотидів у фрагментах гену 16S рРНК досліджуваних штамів	Ідентичність послідовностей, (%)
« <i>Erwinia horticola</i> » 8559, 8558, 8557, 8560, 8561, 8398, 8795, 8794, 8793, <i>Erwinia amylovora</i> В 1095 ^Т	<i>E. amylovora</i> ATCC 15580, (NR 118854)	1439, 1435, 1459, 1459, 1460, 1465,	98 – 99
	<i>E. pyrifoliae</i> Ep1/96, (AJ009930, FP236842.1)	1438, 1460, 1473, 1466	97 – 99
	<i>E. piriflorinigrans</i> CFBP 5882, (GQ405203, NF117353.1)		97 – 98
	<i>E. uzenensis</i> YPPS951, (AB546198, NR113061.1)		97 – 99
	<i>E. billingiae</i> Eb661, (AM055711)		98 – 99
	<i>E. mallozivora</i> LMG 2708, (Z96084, NR119363.1)		96 – 97
	<i>E. persicina</i> LMG 11254, (Z96086, NR119364.1)		98
	<i>E. aphidicola</i> IAM 14479, (AB907777.1)		98
	<i>E. tracheiphila</i> LMG 2906, (Y13250, NR044924)		94 – 95
	<i>E. psidii</i> LMG 7034, (Z96085, NR104569)		96 – 97

видів *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigrans* та *E. uzenensis*. Відомо, що вказані види здатні викликати захворювання насаджень різних видів груші, що за більшістю симптомів нагадують бактеріальний опік плодівих [8, 11, 13]. Зокрема, види *E. piriflorinigrans* та *E. uzenensis*, які були ідентифіковані та описані у 2011-2012 роках на території Європи та Японії, не внесені до останнього видання визначника бактерій Берджі [3], а лише – до Списку діючих назв таксонів прокариот, що передує черговому визначнику бактерій Берджі [10]. Тобто їх існування як окремої таксономічної одиниці остаточно не легімітизовано. Оскільки попередньо Р.І. Гвоздяком з колегами встановлена значна фенотипова подібність окремих штамів «*Erwinia horticola*» з представниками виду *Erwinia quercina* (згідно даних сучасної таксономії *Lonsdalea quercina*) [6], нами також проаналізовано філогенетичну спорідненість колекційних штамів з типовими представниками даного виду. У ході проведених досліджень встановлено, що рівень гомології нуклеотидних послідовностей усіх штамів «*Erwinia horticola*» та штамів виду *Lonsdalea quercina* є занадто низьким (94-96%) для віднесення перших до даного виду.

Філогенетичний аналіз спорідненості нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК усіх ізольованих штамів *Erwinia* sp. та основних видів даного роду встановив найвищий рівень гомології (99%) з типовими штамми *E. amylovora* ATCC 15580 та *E. pyrifoliae* Ep1/96 (табл.2).

Таблиця 2

Ідентичність нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК ізолюваних штамів *Erwinia* sp. з нуклеотидними послідовностями гену 16S рРНК типових штамів, що зберігаються у базі GenBank

Штам	Вид, штамп і коди доступу до нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК типових штамів у базі GenBank	Кількість нуклеотидів у фрагментах гену 16S рРНК досліджуваних штамів	Ідентичність послідовностей, (%)
<i>Erwinia</i> sp. 1я, 2я, 3я, 4я, 5я, 6я, 7я, 8я, 9я, 10я	<i>E. amylovora</i> ATCC 15580, (NR 118854)	1468, 1461, 1436,	99
	<i>E. pyrifoliae</i> Ep1/96, (AJ009930, FP236842.1)	1446, 1430, 1446,	99
	<i>E. piriflorinigrans</i> CFBP 5882, (GQ405203, NF117353.1)	1430, 1430, 1455, 1428	98
	<i>E. uzenensis</i> YPPS951, (AB546198, NR113061.1)		98
	<i>E. billingiae</i> Eb661, (AM055711)		98
	<i>E. mallotivora</i> LMG 2708, (Z96084, NR119363.1)		97
	<i>E. persicina</i> LMG 11254, (Z96086, NR119364.1)		98
	<i>E. aphidicola</i> IAM 14479, (AB907777.1)		98
	<i>E. tracheiphila</i> LMG 2906, (Y13250, NR044924)		94-95
	<i>E. psidii</i> LMG 7034, (Z96085, NR104569)		96-97

Також достатньо високий рівень подібності ці штами виявили з типовими представниками *E. piriflorinigrans*, *E. uzenensis*, *E. billingiae*, *E. persicina*, *E. aphidicola*. Зважаючи на зазначене вище, як і у випадку з колекційними штамми «*Erwinia horticola*», найбільш ймовірною є спорідненість ізолюваних нами штамів з видами *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigrans* та *E. uzenensis*. Слід також зазначити, що, згідно даних літератури, види *E. amylovora* та *E. pyrifoliae* важко ідентифікувати виключно за спорідненістю нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК [3, 14]. Зокрема, згідно останнього видання визначника бактерій Берджі, для диференціації представників виду *E. amylovora* від інших близькоспоріднених видів використовуються наступні методичні підходи: ПЛР детектування *ams* регіону або інших ділянок кластеру генів, відповідальних за синтез складного, високомолекулярного, видоспецифічного полісахариду аміловорану; встановлення за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції наявності у клітинах високо консервативної плазмиди рEA29; встановлення гомології ITS регіону між 16S рРНК та 23S рРНК; фінгепринтування геному за допомогою REP- або RAPD-ПЛР тощо [3, 15, 16]. Крім того, саме у даному визначнику бактерій Берджі зазначено, що диференціювати близькоспоріднені види *E. amylovora* та *E. pyrifoliae*, як правило, можна за наявністю плазмиди рEA29 та рівнем гомології ITS регіону [3].

Нами також був проведений елаймент одержаних нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК колекційних штамів «*Erwinia horticola*» та ізолюваних штамів *Erwinia* sp. з ключовими видами роду *Erwinia* (табл.3, табл.4).

Таблиця 3.

Варіабельність нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК штамів ізольованих штамів *Erwinia* sp. з нуклеотидними послідовностями гену 16S рРНК типових штамів, що зберігаються у базі GenBank

Положення сайтів варіабельності у нуклеотидній послідовності гену 16S рРНК, н.п	Вид, штам			
	<i>Erwinia</i> sp. 1я, 2я, 3я, 5я, 6я, 8я, 9я і <i>E. amylovora</i> В 1095 ^Т	<i>Erwinia</i> sp. 4я, 7я, 10я	<i>E. amylovora</i> ATCC 15580	<i>E. pyrifoliae</i> Ep1/96,
85, 117, 125	T, G, *	н.в.**	T, C, T	C, C, -
252, 257	G, C	G, C	A, T	G, C
380	C	C	C	-
449-454	CGATAG	CGATAG	GGAAGA	GGGAAA
467-469	CTG	CTG	TTT	TTT
471-472	CG	CG	CC	TC
595	A	A	G	G
633, 654	T	T	C	C
741	A	A	G	G
804	-	-	C	C
830	T	T	C	C
838	C	C	T	C
848, 853	Y	Y	C	C
880	C	C	-	-
1005, 1026, 1445	C, C, C	C, C, C	C, C,	T, -, -

Примітка: * «-» – точкова мутація з випадінням нуклеотиду; **«н.в.» – не визначали.

Таблиця 4.

Варіабельність нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК колекційних штамів «*Erwinia horticola*» та типового штаму *Erwinia amylovora* В 1095^Т з нуклеотидними послідовностями гену 16S рРНК типових штамів, що зберігаються у базі GenBank

Положення сайтів варіабельності у нуклеотидній послідовності гену 16S рРНК, н.п	Вид, штам		
	10 штамів « <i>E. horticola</i> »	<i>E. amylovora</i> ATCC 15580	<i>E. pyrifoliae</i> Ep1/96,
85-89, 125, 130	CGGGT, -, T	TGGGT, T, C	CGGGT, -, C
181, 243, 252, 257	T, G, G, T	A, G, A, T	A, G, G, C
380	C	C	-
449-454	CGACAG	GGAAGA	GGGAAA
467-469	CTG	TTT	TTT
471-472	CG	CC	TC
595	A	G	G
615, 620	T	T	T
633, 645, 648, 654	T, G, A, T	C, G, A, C	C, G, A, C
741, 767	A, T	G, T	G, T
830, 838	T, T	C, T	C, C
848, 853	Y	C	C
114-116	CTTA	GGAA	GGAA
1005, 1026, 1032	T, C, A	C, C, A	T, -, A
1131, 1133-135	G, AAT,	T, CG-,	T, CG-
1162, 1258,	T, C, C	T, C, T	T, C, T
1445	C	C	-

Примітка: див. табл. 3.

Встановлено, що гіперваріабельні ділянки розташовуються по всій довжині гену 16S рРНК, але більш ніж половина усіх сайтів варіабельності міститься на початку даного гену (табл. 3, 4).

Серед них є ті, що притаманні окремим видам і штамам, а є такі, що виявлені у групи видів. Аналіз виявлених нами точкових змін у нуклеотидних послідовностях підтверджує результати їх аналізу у GenBank.

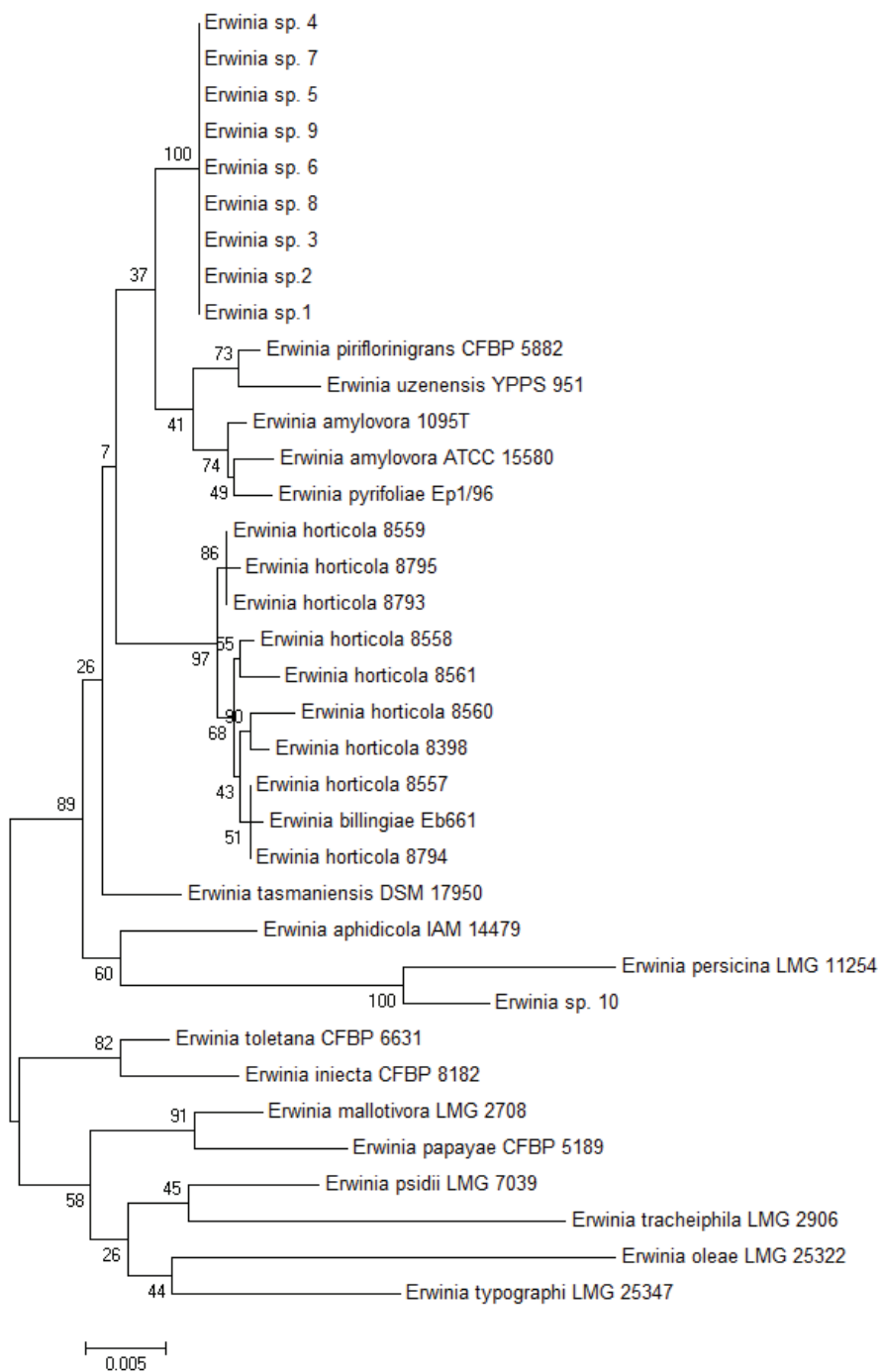


Рис. 2. Дендрограма філогенетичних зв'язків між ізольованими *Erwinia* sp., колекційними «*Erwinia horticola*» штамами та типовими представниками видів роду *Erwinia*.

На підставі аналізу нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК колекційних штамів «*Erwinia horticola*» та ізольованих штамів *Erwinia* sp. з типовими видами роду *Erwinia* було побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків (рис.2). Як видно з рис. 2., ізольовані нами штами утворили окремий кластер, що близькоспоріднений з кластером, який об'єднує 2 групи видів *E. piriflorinigrans*/*E. uzenensis* та *E. amylovora*/*E. pyrifoliae*. Натомість колекційні штами «*Erwinia horticola*» утворили декілька груп; до складу однієї з них входить типовий штам *E. billingiae* Eb661. Слід також відмітити, що типовий штам *Erwinia amylovora* В 1095^T належить до кластеру, утвореному штамми *E. amylovora* ATCC 15580 та *E. pyrifoliae* Ep1/96, що підтверджує достовірність отриманих нами результатів.

Отже, за результатами філогенетичного аналізу встановлена значна спорідненість (99-98%) ізольованих нами штамів *Erwinia* sp. та колекційних штамів «*Erwinia horticola*» з представниками видів *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigrans*, *E. uzenensis*, *E. billingiae*, *E. persicina*, *E. aphidicola*. Зважаючи на досліджений нами раніше комплекс ознак фенотипу та встановлену гомологію нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК, можна стверджувати, що найбільш достовірною є спорідненість ізольованих штамів *Erwinia* sp. та колекційних штамів «*Erwinia horticola*» саме з типовими штамми видів *E. amylovora* та *E. pyrifoliae*. Оскільки, згідно з даними літератури, ці види близькоспоріднені та погано диференціюються за гомологією нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК, то для остаточної видової ідентифікації досліджуваних нами штамів роду *Erwinia* необхідно залучення інших генотипових ознак. Зокрема, на думку багатьох дослідників [3, 8, 14], найбільш дієвими при диференціації видів *E. amylovora* та *E. pyrifoliae* є встановлення гомології ITS регіону між генами 16S рРНК та 23S рРНК, виявлення наявності у клітинах високо консервативної плазмиди рЕА29 або *ams* регіону, що кодує синтез видоспецифічного полісахариду аміловорану.

Л.А. Данкевич

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *ERWINIA* – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ЯБЛОНИ В УКРАИНЕ

Резюме

Цель. Установить сродство нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК 10 изолированных штаммов *Erwinia* sp. и 9 коллекционных штаммов «*Erwinia horticola*» с типичными представителями рода *Erwinia* для их корректной идентификации на уровне вида. **Материалы и методы.** Объекты – 10 изолированных из пораженных тканей яблони штаммов *Erwinia* sp. и 9 коллекционных штаммов «*Erwinia horticola*». ДНК-копию гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров рА и рН. Построение обратного комплимента, редактирование, выравнивание и слаймент последовательностей осуществляли с помощью программ Multalin и Sequence Manipulation Suite. Поиск гомологичных, депонированных в GenBank, нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК

осуществляли, используя программу BLASTN. Для построения дендрограммы филогенетических связей применяли программу MEGA 5. **Результаты.** Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рPHK установил высокий уровень гомологии (99-98%) исследуемых штаммов с типовыми штаммами видов *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigrans*, *E. uzenensis*, *E. billingiae*, *E. persicina*, *E. aphidicola*. **Выводы.** Учитывая исследованный нами ранее комплекс признаков фенотипа и установленную гомологию нуклеотидных последовательностей гена 16S рPHK, можно утверждать, что наиболее вероятно родство изолированных нами штаммов *Erwinia* sp. и коллекционных штаммов «*Erwinia horticola*» именно с типовыми штаммами видов *E. amylovora* и *E. pyrifoliae*. Поскольку по данным литературы эти виды близкородственные и плохо дифференцируются по гомологии нуклеотидных последовательностей гена 16S рPHK, для окончательной видовой идентификации исследуемых нами штаммов рода *Erwinia* необходимо привлечение других генотипических признаков.

Ключевые слова: *Erwinia* sp., «*Erwinia horticola*», *Erwinia amylovora*, нуклеотидные последовательности гена 16S рPHK, филогенетический анализ

L.A. Dankevich

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

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF PATHOGENIC BACTERIA BELONGS TO THE ERWINIA GENUS – AGENT OF APPLE’S DISEASES IN UKRAINE

Summary

Aim. To determine the similarity of 16S рPHK gene nucleotide sequences of 10 isolated *Erwinia* sp. and 9 collection «*Erwinia horticola*» strains with typical representatives of the genus *Erwinia* for their correct identification at the species level. **Methods.** Objects – 10 isolated from diseased tissue of apple *Erwinia* sp. and 9 collection «*Erwinia horticola*» strains. DNA copy of the gene 16S рPHK amplified using universal primers рА and рН. Building a reverse compliment, editing, alignment and matching sequences was performed using Multalin and Sequence Manipulation Suite software. The nucleotide similar sequences of 16S rRNA gene, that placed and for deposited in GenBank, searching was performed using the BLASTN program. The phylogenetic trees constructing was performed using MEGA 5 program. **Results.** Nucleotide sequence analysis of 16S rRNA gene found a high level of homology (99-98%) of the test strains with typical strains of *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigrans*, *E. uzenensis*, *E. billingiae*, *E. persicina*, *E. aphidicola* species. **Conclusions.** Considering examined previously the complex of phenotypic properties and determined homology of 16S рPHK gene nucleotide sequences can be argued that most likely similarity have isolated *Erwinia* sp. and collection «*Erwinia horticola*» strains with typical *E. amylovora* and *E. pyrifoliae* strains. According to the literature, these species are closely related and poorly differentiated based on the homology of the 16S рPHK gene nucleotide sequences. Probably for the final identification at the species level the strains, studied by us, and belongs to the *Erwinia* genus it is necessary to involvement other genotypic properties.

Keywords: *Erwinia* sp., «*Erwinia horticola*», *Erwinia amylovora*, the nucleotide sequence of the gene 16S рPHK, phylogenetic analysis

1. Ashmawy NA, Zaghoul TI, El-Sabagh AM. Isolation and Molecular characterization of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, isolation from apple and pear orchards in Egypt. *Plant Pathology Journal*. 2015; 14(3): 142-147
2. Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*. 1983; 100 (1): 243-255
3. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. 2nd ed. New York; USA: Springer Science+ Business Media; 2005.
4. Dankevich LA, Votselko SK, Scherbina TM, Patyka VP. [Phenotypic heterogeneity of phytopathogenic bacteria belongs to *Erwinia* genus – agent of apples bacterial diseases in Ukraine]. *Mikrobiol Z*. 2016; 78(5):30-41. Ukrainian
5. Edwards U, Rogal T, Blocker H. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl. Acids Res*. 1989; 17(19): 7843-7853
6. Gvozdyak RI, Pasichnyk LA, Yakovleva LM, Moroz SM, Lytvynchuk OO, Zhytkievych NV, Hodos SF, Butsenko LN, L Dankevich LA, Hrynyk IV, Patyka VP. Phytopathogenic bacteria. *Bacterial diseases of plants*. Ed. V.P Patyka. Kyiv: “ Interservice”; 2011. Ukrainian
7. Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenacker M, Mergaert J, Verdonck L, Swing J. Phylogenetic position of phytopathogens within *Enterobacteriaceae*. *Systematic Applied Microbiology*. 1998; 21(3): 384-397
8. Kim WS, Gardan L, Rhim SL, Geider K. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999; 49(2): 899-906
9. Kudina IV, Lagonenko AL, Evtushenkov AN. [Characterisation of Belarusian isolates of phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*]. *Treatise of the BSU*. 2008; (3): 26-34. Russian
10. List of prokaryotic names with standing in nomenclature/ www.bacterio.net/erwinia.html
11. Lopes MM, Rosello M, Liop P, Ferrer S, Christen R, Gardan L. *Erwinia piriflorinigrans* sp.nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 2011; 61: 561-567
12. Marchuk D, Drumm M, Saulino AS et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR product. *Nucl. Acid Res*. 1990; 19(5): 1154-1155
13. Matsuura T, Mizuno A, Tsukamoto T, Shimizu Y, Saito N, Sato S, Kikuchi S, Uzuki T, Azegami K, Sawada H. *Erwinia uzenensis* sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 2012; 62(8): 1799-1803.
14. McGhee GC, Schnabel EL, Maxson-Stein K, Jones B, Stromberg VK, Lacy GH, Jones AL. Relatedness of chromosomal and plasmid DNAs of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Applied and environmental microbiology*. 2002; 68 (12): 6182-6192.
15. Mergaert J, Hauben L, C Cnockaert M, Swings J. Reclassification of non-pigmented *Erwinia herbicola* strains from trees as *Erwinia billingae* sp.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999; 49: 377-383
16. Pique N, Minana-Galbis D., Merino S., Tomas J. Virulence factor of *Erwinia amylovora*: a review. *Int. J. Mol. Sci*. 2015; 16(6): 12836-12854.

17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989
18. Soon-Wo Kwong, Seung-Joo Go, Hee-Wan Kang, Jin-Chang Ryu, Jin-Ki Jo. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology. 1997; 47(4): 1061-1067
19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. 2011; 28(10): 2731-2739

Отримано 28.09.2016