

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS* – ЗБУДНИКІВ МОКРОГО ВОДЯНИСТОГО ГНИТТЯ ЛЮПИНУ

Л.А. Данкевич, В.П. Патица

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: ldankevich@ukr.net

Мета. Для коректної видової ідентифікації та оцінки групової гетерогенності було проведено фінгепринтування геномів ізольованих нами *Pseudomonas* sp., колекційних штамів «*Pseudomonas xanthochlora*», а також типових представників виду *Pseudomonas marginalis* та п'яти біоварів виду *Pseudomonas fluorescens*. **Методи.** В ході досліджень було використано мікробіологічні, молекулярно-генетичні (REP-ПЛР) методи та методи молекулярної філогенетики (UPGMA). **Результати.** Оцінена генетична гетерогенність ізольованих *Pseudomonas* sp. та колекційних «*Pseudomonas xanthochlora*» штамів. Встановлено значну спорідненість ізольованих *Pseudomonas* sp. і колекційних «*Pseudomonas xanthochlora*» штамів із типовим штамом *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T за BOX, REP та ERIC-профілями. **Висновки.** BOX, ERIC і REP-профілювання геному збудника мокрого водянистого гниття люпину виявило незначну генетичну гетерогенність даної групи штамів (від 6 до 9% гетерогенності) та близьку їх спорідненість з представниками виду *Pseudomonas marginalis* (94–91% гомології BOX, ERIC і REP-профілів). Подібність результатів BOX і ERIC-профілювання геному збудника мокрого водянистого гниття люпину може бути корисною для швидкої коректної діагностики даного збудника, особливо, у випадку масового ураження рослин.

Ключові слова: ідентифікація, генетична гетерогенність, REP-ПЛР, «*Pseudomonas xanthochlora*», *Pseudomonas* sp.

Загальноприйнято, що ряд видів фітопатогенних бактерій здатні викликати різні типи гниття рослин. Переважно такий тип хвороб рослин індукується представниками родів *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Xanthomonas* [1]. Останнім часом у зв'язку зі значним антропогенним навантаженням на довкілля фітопатологи констатують розширення патогенними бактеріями, які мають як поліфагову, так і монофагову природу, спектру уражуваних рослин та підвищення рівня агресивності тих бактерій, що раніше вважалися умовно патогенними [2]. Так, згідно даних літератури, почастишали випадки хвороб рослин, що індукуються умовно патогенним для рослин видом *Pseudomonas fluorescens* [3, 4, 5]. Крім того, фітопатологи реєструють епіфітотії, спричинені поліфагом *Pseudomonas marginalis*, що, як вважалося раніше, порівняно з іншими видами фітопатогенних бактерій має дещо слабкіші патогенні властивості [6, 7, 8, 9]. Зокрема, у 2008–2014 роках дослідники з Чехії, Польщі і Італії констатували масове ураження рослин калли (*Zantedeschia* sp.) саме *Pseudomonas marginalis* [7, 10]. Крім того, у 2007 році на території Китаю вперше зареєстровано м'яке гниття картоплі (*Solanum tuberosum*), спричинене представ-

никами даного виду [8], а у 1992 – 2014 роках на території Нової Зеландії і Марокко – гниття цибулі (*Allium cepa*), що індукується саме *Pseudomonas marginalis* [11, 12]. У 2003 році масовий опік цвіту полуниці (*Fragaria vesca*) з наступним погіршенням якості плодів у США [13], а у 2006 році некроз 90% насаджень томатів (*Solanum lycopersicum*) у тепличних господарствах Італії спричинений саме представниками даного виду [14]. У 2013 році масове знебарвлення зерна посівів злакових культур на півночі Ірану також було спричинено змішаною бактеріальною інфекцією, одними із збудників якої є представники виду *Pseudomonas marginalis* [4]. Крім того, у 2014 році методами поліфазної таксономії нами було виявлено, що окремі бактеріальні хвороби ріпаку частково індукуються представниками даного виду [9].

Відомо, що вперше збудника мокрого водянистого гниття люпину та окремих бобових культур було ідентифіковано І. Б. Корольовою як «*Pseudomonas xanthochlora*» [2, 15]. Пізніше J. M. Joung здійснив спробу рекласифікації даного виду і включив його до складу виду *Pseudomonas marginalis*, що об'єднує у своєму складі три різнорідні патовари: *alfalfa*, *marginalis*, *pastinaceae* [6]. Але і у надрукованих пізніше узгоджених списках [16], що передують черговому виданню визначника бактерій Берджі, і у самому визначнику [17] згадка про подібну рекласифікацію відсутня. Саме тому попередньо нами було досліджено комплекс генотипових і фенотипових властивостей колекційних «*Pseudomonas xanthochlora*» та ізольованих із хворих рослин люпину штамів *Pseudomonas* sp. [18, 19]. В ході досліджень нами показано, що за патогенними, морфолого-культуральними, фізіолого-біохімічними властивостями, антигенним і жирнокислотним складом клітин, а також рівнем гомології нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК дана група штамів споріднена із типовими представниками видів *Pseudomonas fluorescens* і *Pseudomonas marginalis* [18, 19]. Тобто через значну філогенетичну спорідненість видів *Pseudomonas fluorescens* і *Pseudomonas marginalis* для остаточної видової ідентифікації збудника мокрого водянистого гниття люпину необхідно залучення інших генотипових ознак, що дозволяють не тільки коректно ідентифікувати збудника, а й оцінити його генетичну гетерогенність.

Відомо, що геном прокариот має декілька категорій послідовностей, що повторюються, зокрема такі, як гени рРНК, тРНК, IS елементи, а також прямі послідовності довжиною 20-50 п.н. Одним із різновидів таких повторів є повтори, локалізовані в некодуючих регіонах, або REP-ділянках (repetitive extragenic palindromic sequences). Праймери, комплементарні до подібних повторів, вперше відкритих у *Escherichia coli*, успішно використовують для аналізу між- і внутрішньовидових відмінностей бактеріальних геномів. Генетичні перебудови призводять до того, що в ході REP-ПЛР можуть утворюватися профілі ампліконів, які відрізняються не тільки у різних видів мікроорганізмів, але й у представників одного виду, тим самим дозволяючи оцінювати його гетерогенність. Крім того, наш вибір припав на REP-ПЛР (Repetitive element PCR fingerprinting), оскільки цей метод, згідно даних літератури, часто використовується не тільки для оцінки генетичної гетерогенності певних кластерів, асоційованих з рослиною флуоресцентних видів роду *Pseudomonas*, а й у поліфазній таксономії окремих таксонів даної групи бактерій [20, 21, 22, 23, 24, 25]. На думку

багатьох дослідників ключові переваги REP-ПЛР аналізу порівняно з аналогічними методами (RAPD-ПЛР (Random amplification of polymorphic DNA), AFLP-ПЛР (Amplified fragment length polymorphism)) наступні: використання універсальних праймерів, що обмежують у прокариотичному геномі три класи коротких послідовностей, які повторюються – REP (repetitive extragenic palindromic), ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), BOX (repetitive BOX sequences); можливість отримання в результаті аналізу трьох незалежних REP, BOX та ERIC-профілів. Крім того, у разі застосування даного аналізу не потрібно подальше проведення рестрикційного аналізу або ж секвенування, наприклад, як при використанні AFLP-ПЛР, ITS-ПЛР. [23, 24].

Зважаючи на зазначене вище, метою наших досліджень було фінгеprinтування геному за допомогою REP-ПЛР ізольованих *Pseudomonas* sp, колекційних «*Pseudomonas xanthochlora*» штамів і типових представників окремих видів роду *Pseudomonas* для коректної таксономії перших на рівні виду та оцінки генетичної гетерогенності групи штамів, що викликають мокре водянисте гниття люпину.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були 8 ізольованих нами з уражених тканин люпину у 2006-2007 роках на території України і Росії штамів *Pseudomonas* sp., а також 5 колекційних, ізольованих І.Б. Корольовою у 1963 р. на території України, штамів «*Pseudomonas xanthochlora*». У роботі також використали: колекційний штам *Pseudomonas marginalis* 8572, типовий штам *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T= ICMP 3553 (International collection of microorganisms from plant) = NCPPB 667 (National collection of Plant Pathogenic bacteria) = ATCC 10844 (American type culture collection). У порівняльному аналізі також були присутні колекційні штами, що є типовими представниками різних біоварів виду *Pseudomonas fluorescens*: *P. fluorescens* УКМ В-17^T (біовар I), *P. fluorescens* 8573, *P. fluorescens* УКМ В-28 (біовар II), *P. fluorescens* УКМ В-36 (біовар III), *P. fluorescens* УКМ В-41 (біовар IV), *P. fluorescens* УКМ В-52, *P. fluorescens* УКМ В-53 (біовар V). Штами виду *Pseudomonas fluorescens*, що входять до УКМ (Української колекції мікроорганізмів), люб'язно надані співробітниками відділу антибіотиків ІМВ НАН України. 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 спектрофотометру BioPhotometer. У роботі використали наступні універсальні праймери: REP 1R -5'-IIIICGICGICATCIGGC-3', REP 21 -5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'; ERIC 1R -5'-ATGTAAGCTCCTGGATTAC-3', ERIC 2 -5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3; BOX A1R-5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' [23, 24]. Ампліфікування проводили з використанням термоциклера Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902 фірми Applied Biosystems (США) за експериментально підібраних умов. Зокрема, для досліджуваних штамів роду *Pseudomonas*: додаткова денатурація ДНК – 96°C/6 хв та основна денатурація ДНК – 94°C/1 хв (однакова для всіх видів REP– ПЛР); відпалювання праймерів – 44°C/1 хв (REP– ПЛР з REP праймерами), 52°C/1 хв (REP– ПЛР з ERIC праймерами) та 53°C/1 хв (REP– ПЛР з BOX праймерами); елонгація ДНК – 72°C/2 хв

(однакова для всіх видів ПЛР реакції) і заключний синтез ДНК – 65°C/8 хв (однаковий для всіх видів REP– ПЛР). Продукти реакції розподіляли у 1,5% агарозному гелі протягом 4 годин за напруженості електричного поля 1,5 В/см. Для візуалізації одержаних генетичних профілів використовували гель-док Universal Hood II фірми Applied Biosystems (США). Спорідненість одержаних REP, ERIC та BOX-профілів оцінювали візуально та аналізували за допомогою програмного забезпечення GeneTools 1.6.1 фірми Syngene (США). Дослідження проводилися на базі Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК.

Побудову дендрограм спорідненості (кластерних алгоритмів) проводили з використанням комп'ютерної програми DENDRO UPGMA (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>). Дана програма базується на використанні UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) методу, що дозволяє створювати дерева, які графічно відображають матриці подібності (Similarity matrix) та відстаней (Distance matrix), розраховані на основі коефіцієнту Жакарда.

Результати. В результаті проведених досліджень отримано BOX, REP та ERIC-профілі ізолюваних нами *Pseudomonas* sp. і колекційних штамів «*Pseudomonas xanthochlora*», а також колекційних і типових штамів *Pseudomonas marginalis* 8572, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T та п'яти біоварів виду *Pseudomonas fluorescens*. Зокрема, у BOX профілях (рис.1а) ізолюваних *Pseudomonas* sp., колекційних «*Pseudomonas xanthochlora*» штамів, типового штаму *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T та колекційного штаму *Pseudomonas marginalis* 8572 виявлено 16 спільних ДНК фрагментів молекулярною вагою 210, 250, 350, 390, 400, 450, 490, 500, 550, 590, 600, 650, 700, 750, 800, 900 н.п. Унікальним для штамів *Pseudomonas* sp. 3л, 6л та колекційного штаму *Pseudomonas marginalis* 8572 виявився фрагмент розміром 290 н.п.

Отримані нами результати свідчать про низький рівень генетичної гетерогенності збудника мокрого водянистого гниття люпину (близько 6% гетерогенності). Проте доволі гетерогенною виявилися структура виду *Pseudomonas fluorescens*. У BOX-профілях представників даного виду виявлено фрагменти довжиною від 200 до 1000 н.п. Причому жоден із детектованих ДНК фрагментів не є спільним для представників усіх п'яти біоварів, а лише для групи штамів, що належать до того чи іншого біовару. Стовідсоткова спорідненість BOX-профілів спостерігалася у штамів *P. fluorescens* В-52, *P. fluorescens* В-53, що належать до V біовару. Натомість штами *P. fluorescens* УКМ В-17^T та *P. fluorescens* УКМ 8573, що належать до II біовару у складі *P. fluorescens*, мають лише 58% гомологічних ампліфіконів ПЛР з BOX праймерами. Штам *P. fluorescens* УКМ В-36 (III біовар) за BOX-профілями споріднений з обома представниками II біовару виду *P. fluorescens* лише на 50%. А штам *P. fluorescens* В-41, що належить до IV біовару, має лише 22% спільних з представниками II і III біовару виду *P. fluorescens* продуктів ПЛР.

Як видно з дендрограми (рис.2а), у досліджуваної групи штамів, що викликають мокре водянисте гниття люпину, присутня незначна гетерогенність BOX-профілів (близько 6%). Так, штами *Pseudomonas* sp. 3л, 6л, ізолювані нами з рослин люпину на території дослідних посівів Пушкін-

ського району Санкт-Петербурзької області (Росія), утворили спільний з колекційним штамом *Pseudomonas marginalis* 8572 кластер (100% гомології). Натомість решта штамів *Pseudomonas* sp. та колекційні штами «*Pseudomonas xanthochlora*», ізолювані в різні роки з насаджень люпину

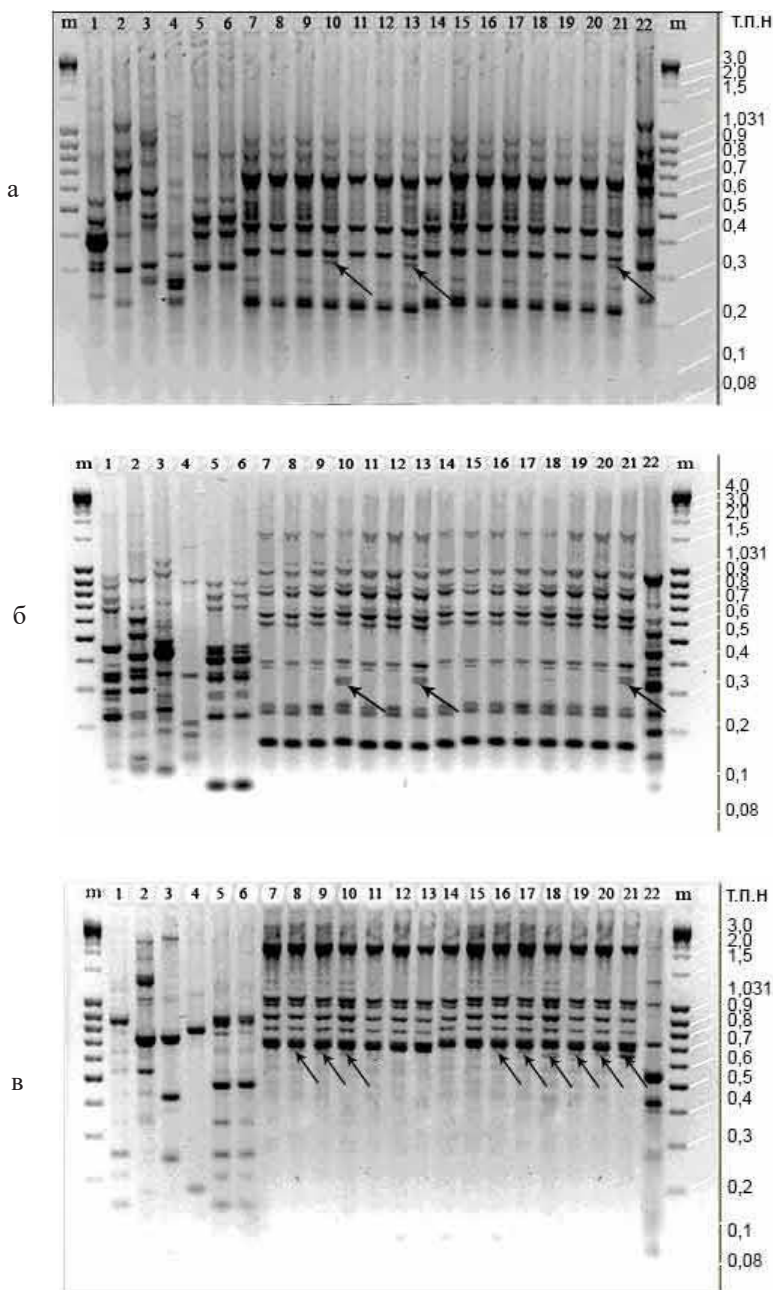


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів РЕР-ПЛР з: BOX A1R праймером (а), ERIC 1R та ERIC 2 праймерами (б), REP 1R і REP 21 праймерами (в).
 m – маркери молекулярних мас; 1.- *P. fluorescens* 8573; 2.- *P. fluorescens* B-28; 3.- *P. fluorescens* B-36; 4.- *P. fluorescens* B-41; 5.- *P. fluorescens* B-52; 6.- *P. fluorescens* B-53; 7.- *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T; 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 – ізолювані штами *Pseudomonas* sp. 1л, 2л, 3л, 4л, 5л, 6л, 7л, 8л, «*P. xanthochlora*» 8536, 8537, 8538, 8539, 8540, *P. marginalis* 8572 та *P. fluorescens* B-17^T

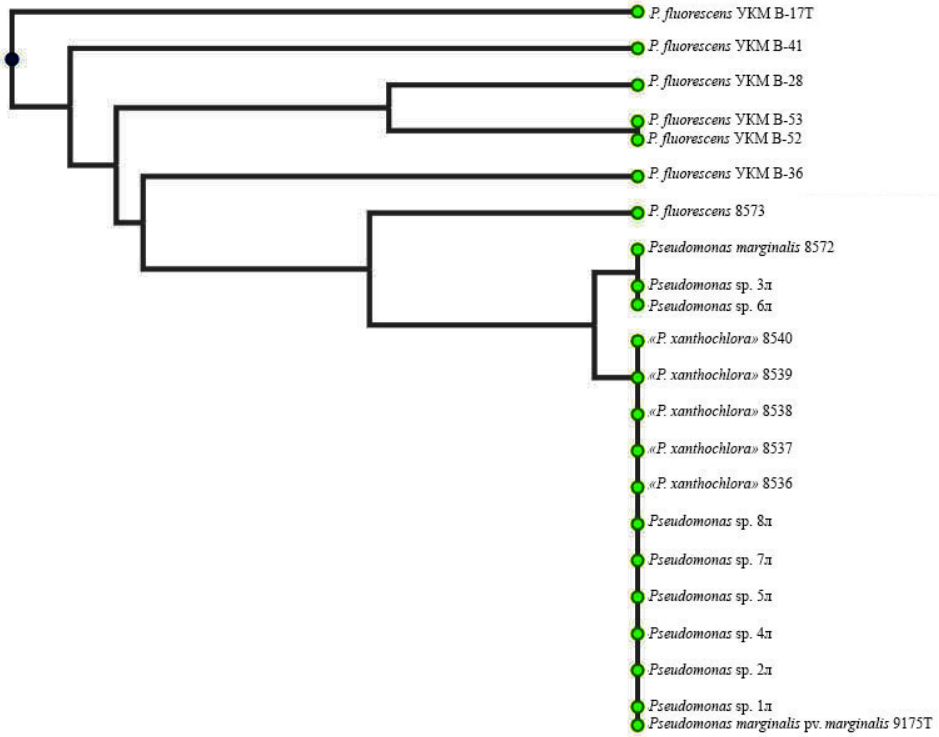
у зоні Українського Полісся (Київська, Житомирська області України), значно споріднена з типовим штамом *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T, про що свідчать результати UPGMA аналізу, згідно яких дана група штамів належить до одного кластеру (100% гомології). Зазначені вище кластери значно споріднені між собою та в меншій мірі з типовими представниками виду *Pseudomonas fluorescens*. Відмічена нами раніше гетерогенність ВОХ-профілів штамів, що належать до різних біоварів даного виду, підтвердилася і результатами UPGMA аналізу. Зокрема, виключно штам *P. fluorescens* В-52, *P. fluorescens* В-53, що належать до одного біовару, утворили спільний кластер, а решта штамів є дещо генетично уособленими.

У ERIC-профілях ізольованих *Pseudomonas* sp. (рис.16), колекційних «*Pseudomonas xanthochlora*» штамів, типового штаму *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T та колекційного штаму *Pseudomonas marginalis* 8572 виявлено 12 спільних ДНК-фрагментів молекулярною вагою 150, 230, 250, 390, 400, 550, 600, 650, 800, 900, 1000, 1500 н.п. Як і у випадку з ВОХ-профілюванням унікальним для ERIC-профілів штамів *Pseudomonas* sp. 3л, 6л та колекційного штаму *Pseudomonas marginalis* 8572 виявився фрагмент розміром 350 н.п., що не суперечить даним літератури і свідчить про низьку генетичну гетерогенність даної групи штамів (близько 8% гетерогенності).

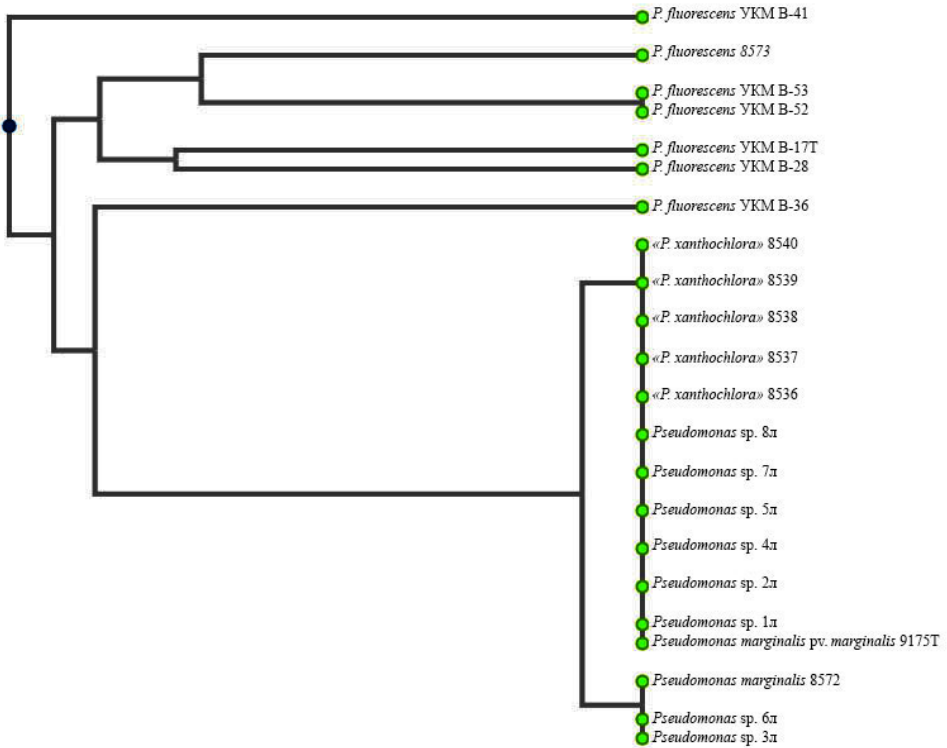
Однак, як і в попередньому випадку, представники виду *Pseudomonas fluorescens* мають різні ERIC-профілі, що не завжди узгоджуються з внутрішньою структурою даного виду. Значна спорідненість ERIC-профілів, як і у випадку з ВОХ-профілюванням, виявлена лише для представників V біовару (100% гомології). Відмічені нами закономірності ERIC-профілів *Pseudomonas* sp., колекційних «*Pseudomonas xanthochlora*» штамів, типового штаму *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 8572 узгоджуються з результатами UPGMA аналізу. Як видно з дендрограми (рис.26), досліджувані штам утворили два близькоспоріднені кластери. Перший кластер утворений ізольованими штамми *Pseudomonas* sp. 3л, 6л та колекційним штамом *Pseudomonas marginalis* 8572. Натомість решта ізольованих штамів *Pseudomonas* sp., колекційні штам «*Pseudomonas xanthochlora*» та типовий штам *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T утворили інший кластер. Тобто спостерігається подібність групової структури штамів, що викликають мокре водянисте гниття за результатами ERIC та ВОХ-профілювання

Проте за результатами REP-профілювання геному нами встановлений дещо інший характер гетерогенності штамів, що викликають мокре водянисте гниття люпину. Зокрема, у REP-профілях ізольованих *Pseudomonas* sp. (рис.1в), колекційних «*Pseudomonas xanthochlora*» штамів, типового штаму *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T та колекційного штаму *Pseudomonas marginalis* 8572 виявлено 10 спільних ДНК-фрагментів молекулярною вагою 400, 500, 600, 800, 900, 990, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000 н.п. Досліджувана група штамів розділилася на дві групи залежно від наявності чи відсутності фрагменту розміром 650 н.п. Так, цей ДНК-фрагмент відсутній у REP-профілях ізольованих штамів *Pseudomonas* sp. 8л, 7л, 6л, 5л, 4л та типового штаму *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T. Натомість решта штамів мають даний продукт ПЛР-реакції. Вста-

a



б



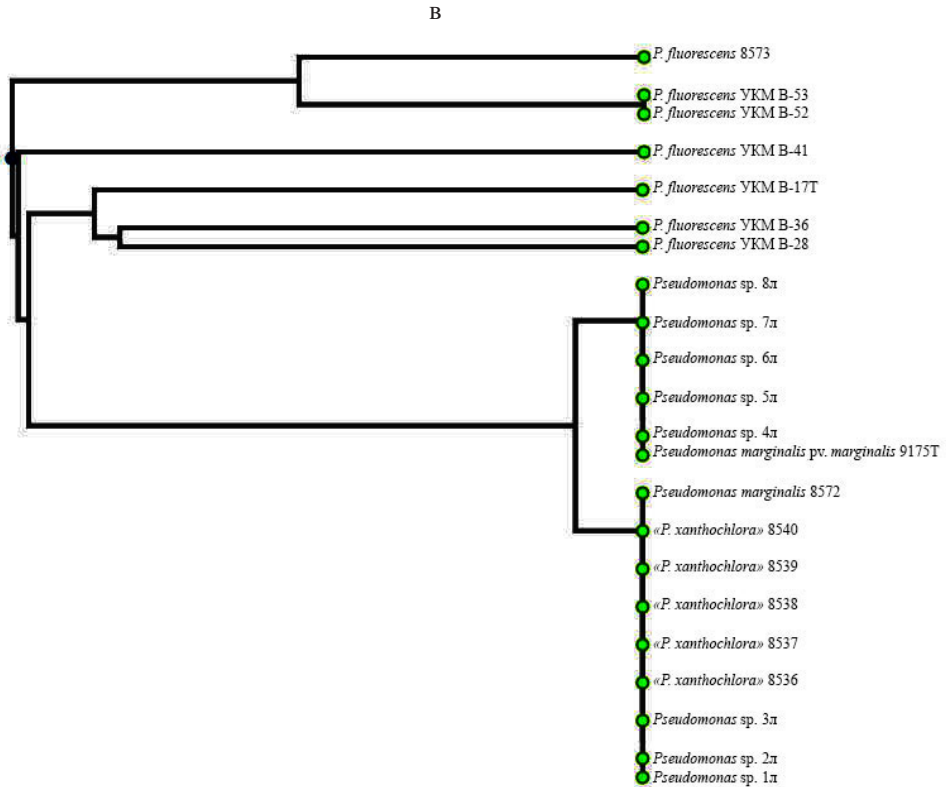


Рис.2. Дендрограма спорідненості (кластерний алгоритм), побудована за результатами BOX (а), ERIC (б) та REP-профілювання (в) геному ізольованих *Pseudomonas* sp., колекційних штамів «*Pseudomonas xanthochlora*», типових і колекційних штамів видів *Pseudomonas marginalis* і *Pseudomonas fluorescens* з використанням UPGMA аналізу. Когенетичний кореляційний коефіцієнт (СР)=0,993-0,997

новлений в результаті ПЛР реакції з REP-праймерами загальний рівень гетерогенності ізольованих *Pseudomonas* sp., колекційних «*Pseudomonas xanthochlora*» штамів, типового штаму *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T та колекційного штаму *Pseudomonas marginalis* 8572 складає 9%. Слід також зазначити, що у REP-профілях нами відмічена гетерогенність виду *Pseudomonas fluorescens*, що спостерігалася раніше і за даними ERIC і BOX-профілювання. Встановлені нами особливості REP-профілів досліджуваних штамів цілком узгоджуються з результатами UPGMA аналізу, в результаті якого сформовано два близькоспоріднені кластери, до складу яких входять штами, вказані вище (рис.2в).

Отже, в результаті BOX, ERIC і REP-профілювання збудника мокрого водянистого гниття люпину встановлена незначна гетерогенність штамів, що викликають дане захворювання, та спорідненість з представниками виду *Pseudomonas marginalis*. Зважаючи на встановлену нами раніше значну подібність фенотипових та генотипових (99-98 % гомології нуклеотидних послідовностей гена 16SрРНК) властивостей досліджуваних штамів з представниками *Pseudomonas marginalis*, існування окремого виду «*Pseudomonas xanthochlora*» є вкрай сумнівним [18, 19].

Обговорення. Як відомо, REP-ПЛР аналіз широко застосовується одночасно як для дослідження гетерогенності популяцій фітопатогенних бактерій, так і для їх коректної ідентифікації [23, 24]. Зокрема, Louws FJ et al. була здійснена успішна спроба визначення дієвості REP-ПЛР аналізу при ідентифікації на рівні патовару представників видів *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Pseudomonas syringae* [24]. І дійсно, окремі дослідники підкреслюють достатньо високу роздільну здатність даного методу у випадку ідентифікації фітопатогенних бактерій родів *Xanthomonas* і *Pseudomonas* [3, 24]. Поряд із тим, низка науковців [20, 21, 25] констатує значну генетичну гетерогенність окремих видів патогенних для рослин бактерій, зокрема і виду *Pseudomonas fluorescens*, що узгоджується з отриманими нами результатами. Згідно даних літератури, для флуоресцентних псевдомонад в цілому і представників виду *Pseudomonas fluorescens* зокрема, що асоційовані з рослиною та можуть викликати або ні її захворювання, гетерогенність BOX, ERIC і REP-профілів може бути пов'язана з рослиною-господарем, клімато-географічним регіоном, типом ґрунту та навіть особливостями агротехніки вирощування даної культури [20, 22]. Відмічений факт цілком узгоджується з отриманими нами результатами. Так, встановлена в результаті BOX і ERIC-профілювання певна генетична уособленість групи штамів, ізольованих нами на території Російської Федерації, від решти штамів, виділених із хворих рослин на території України (Київська, Житомирська області), певною мірою може бути пов'язана із окремими із зазначених вище факторів (кліматом, ґрунтом, агротехнікою вирощування). На думку деяких дослідників, однією з важливих причин цього явища є те, що вибір уражених рослин з однієї кліматично-географічної зони може мати вплив на дисперсію коротких послідовностей, які повторюються (BOX, REP та ERIC) у геномі ізольованих бактерій [20]. Слід також відмітити, що згідно результатів наших досліджень у REP-профілях збудника мокрого водянистого гниття люпину хоча і присутня гетерогенність, але вона жодним чином не пов'язана із кліматом, ґрунтом, агротехнікою вирощування. Даний факт, на наш погляд, пояснюється описаною в літературі різною мірою поліморфізму BOX, REP та ERIC-профілів флуоресцентних псевдомонад [20]. Так, окремі дослідники констатують, що для даної групи бактерій рівень гомології генетичних профілів, отриманий в результаті ПЛР з REP і BOX праймерами, є 100%, а ERIC лише – 86% [20], що певною мірою пояснює отримані нами результати REP профілювання збудника мокрого водянистого гниття люпину. Але незважаючи на зазначене вище, ступінь гетерогенності даної групи штамів, визначений за допомогою REP-ПЛР, є достатньо низьким (відсутність або наявність одного фрагменту), що узгоджується з даними літератури. Так, Cottyn B et al. при комплексному дослідженні популяції бактерій, асоційованої з насінням рису у тропічних умовах, встановлено, що BOX профілі представників *pv. alfalfa* і *pv. marginalis* виду *Pseudomonas marginalis* відрізняються лише за двома продуктами ПЛР [20], що свідчить про їх генотипову однорідність. Необхідно наголосити, що значна генетична однорідність представників виду *Pseudomonas marginalis*, ізольованих із хворих рослин ріпаку, також попередньо встановлена нами в результаті їх BOX, ERIC і REP-профілювання [9].

Отже, BOX, ERIC і REP-профілювання збудника мокрої водянистої гниття люпину виявило незначну генетичну гетерогенність даної групи штамів та близьку спорідненість даного збудника з представниками виду *Pseudomonas marginalis*. Зважаючи на попередні результати поліфазного аналізу ознак фено- і генотипу [18, 19], на нашу думку, окремого виду «*Pseudomonas xanthochlora*» не існує, а мокре водянисте гниття люпину викликається представниками виду *Pseudomonas marginalis*. Подібність результатів BOX, ERIC-профілювання геному збудника мокрої водянистої гниття люпину може бути корисною при швидкій коректній діагностиці даного збудника у випадку масового захворювання рослин. Крім того, виявлений в результаті REP-ПЛР аналізу зв'язок між ґрунтово-кліматичними умовами, агротехнікою вирощування уражених рослин та BOX і ERIC-профілями штамів фітопатогенних бактерій, що викликають мокре водянисте гниття люпину, потребує більш детального і масштабного дослідження та може бути корисним при вивченні динаміки популяції даного збудника і у випадку епіфітотій.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МОКРОЙ ВОДЯНИСТОЙ ГНИЛИ ЛЮПИНА

Л.А. Данкевич, В.Ф. Патыка

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

Резюме

Цель. Для корректной видовой идентификации и оценки групповой гетерогенности было проведено фингепринтирование геномов, изолированных нами *Pseudomonas* sp., коллекционных штаммов «*Pseudomonas xanthochlora*», а также типичных представителей вида *Pseudomonas marginalis* и пяти биоваров вида *Pseudomonas fluorescens*. **Методы.** В ходе исследований были использованы микробиологические, молекулярно-генетические (REP-ПЦР) и методы молекулярной филогенетики. **Результаты.** Проведена оценка генетической гетерогенности изолированных *Pseudomonas* sp. и коллекционных «*Pseudomonas xanthochlora*» штаммов. Установлено значительное сродство изолированных *Pseudomonas* sp. и коллекционных «*Pseudomonas xanthochlora*» штаммов с типовым штаммом *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T по BOX, REP и ERIC-профилям. **Выводы.** BOX, ERIC и REP-профилерование возбудителя мокрой водянистой гнили люпина выявило незначительную генетическую гетерогенность данной группы штаммов (от 6 до 9% гетерогенности) и близкое их сродство с представителями вида *Pseudomonas marginalis* (94–91% гомологии BOX, ERIC и REP-профилей). Сходство результатов BOX, ERIC-профилерования генома возбудителя мокрої водянистої гниття люпина может быть полезным в случае быстрой, корректной диагностики данного возбудителя, особенно при массовом заболевании растений.

Ключевые слова: идентификация, генетическая гетерогенность, REP-ПЦР, «*Pseudomonas xanthochlora*», *Pseudomonas* sp.

GENETIC PROFILING OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA OF THE *PSEUDOMONAS* GENUS – AGENT OF LUPINES WET WATERY ROT

L.A. Dankevych, V.Ph. Patyka

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary

Aim. For correct species identification and estimation of group's heterogeneity, the genome fingerprinting of isolated by us *Pseudomonas* sp. and collection “*Pseudomonas xanthochlora*” strains as well as typical representative of *Pseudomonas marginalis* species and five representative of *Pseudomonas fluorescens* species biovars has been carried out. **Methods.** In the course of research, microbiological, molecular genetic (REP-PCR) methods and method of molecular phylogenetics (UPGMA) were used. **Results.** Genetic heterogeneity of isolated *Pseudomonas* sp. and collections “*Pseudomonas xanthochlora*” strains has been established. A significant relationship between isolated *Pseudomonas* sp. and collections “*Pseudomonas xanthochlora*” strains with the typical *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T strain for BOX, REP and ERIC-profiles has been determined. **Conclusions.** BOX, ERIC and REP-profiling of the genome of the agent of lupines' wet watery rot revealed no significant genetic heterogeneity of this group of strains (from 6 to 9% of heterogeneity) and close its similarity to representatives of the species *Pseudomonas marginalis* (94-91% of the homology of BOX, ERIC and REP-profiles) has been determined. The similarity of the results of genomes BOX, ERIC-profiling of the agent of lupines' wet watery rot may be useful in the rapid correct diagnosis of this pathogen, especially, in case of pathogens spreading.

Keywords: identification, genetic heterogeneity, REP-PCR, *Pseudomonas xanthochlora*, *Pseudomonas* sp.

1. Bukola R. Aremu, Olubukola O. Babalola. Classification and taxonomy of vegetable macerogens. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6:1361-1372
2. Gvozdyak RI, Pasichnik LA, Yakovleva LM, Moroz SM, Litvinchuk OO, Zhytkevich NV, Hodos SF, Butsenko LM, Dankevich LA, Grinick IV, Patyka VP. Phytopathogenic bacteria. Bacterial diseases of plants. In: LLC “NVP” Interservice. Kiev; 2011
3. Cottyn B, Regalado E, Lannot B, De Cleene M, Mew TW, Swings J. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Bacteriology*. 2001; 91 (3):282-292
4. Saberi E, Safaie N, Rahimian H. Characterization of bacterial strains associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in North of Iran (Mazandaran province). *Jornal of Bacteriology Research*. 2013; 5(5): 51-61
5. Singh BP. Genetic fingerprinting of antimicrobial fluorescent *Pseudomonads* associated with banana rhizosphere. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*. 2014; 1(2): 1-6
6. Bradbury JF. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Ferry Zane; Kew; Surrey, England: CAB Int. mycolog. Institute, 1986. –332 p

7. Mikinski A, Sobiczewski P, Sulikowska M, Pulawska J, Treder J. Pectolytic bacteria associated with soft rot of calla lily (*Zantedeschia* spp.) tubers. *Journal of Phytopathology*. 2010; 158:201-209
8. Li J, Chai Z, Yang H, Li G, Wang D. First report of *Pseudomonas* pv. *marginalis* as a cause of soft rot of potato in China. *Australasian Plant Disease Note*. 2007;(2): 71-73.
9. Dankevich LA, Zakharova OM, Melnichuk MD, Votselko SK, Patyka VPh. REP-PCR Analysis of Rape's bacterial diseases agent. *Microbiol. Z.* 2014; 76(4):17-25
10. Kreizar V, Mertelik J, Pankova I, Kloudova K, Kudela V. *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp. *Plant Protect. Sci.* 2008; 44 (3): 85–90
11. Achbani EH, Sadik S, Kahkahi REI, Benbouazza A, Mazouz H. First report on *Pseudomonas marginalis* bacterium causing soft rot of onion in Morocco. 2014; 3(2):218-223
12. Wright PJ, Hale CN. A field and storage rot onion caused by *Pseudomonas marginalis*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 1992; 20:435-438
13. Bull CT, Huerta AI, Koike ST. First report of blossom blight of strawberry (*Fragaria ananassa*) caused by *Pseudomonas marginalis*. *Disease Note*. 2009; 93(12):1350
14. Bella P, Catara V. Occurrence of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas* pv. *marginalis* in Italy. *New Disease Reports*. 2009; 19: 58.
15. Beltyukova KI, Korolova IB, Muras VA. Bacterial diseases of legumes crops. In: *Nauk. dumka*. Kiev;1974
16. Young JM, Saddler GS, Takikawa Y, De Boer SH, Vauterin L, Gardan L, Gvozdyak RI, Stead DE. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Review of Plant Pathology*. 1996; 75(9):721-763.
17. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York USA: Springer Science+ Business Media; 2005.
18. Dankevich LA. Phenotypical identification of agent of lupin's bacterial wet rot. *Microbiol. Z.* 2010; 72(2):43-48
19. Dankevich LA. Phylogenetic analysis of lupin's bacterial wet rot – «*Pseudomonas xanthochlora*». *Microbiol. Z.* 2011; 73(6):20-24
20. Charan AR, Reddy VP, Reddy PN, Reddy SS, Sivaramakrishnan S. Assessment of genetic diversity in *Pseudomonas fluorescens* using PCR-based methods. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*. 2011; 5 (1):10-16
21. Chen Q, Qi P, Xu R, Tambong JT, Djama ZR, Li W. Comparison of three typing methods for evaluating the diversity of *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere. *Journal of Plant Sciences*. 2011; 6 (2):52-65
22. Latour X, Corberand Th, Laguerre G, Allard F, Lemanceau Ph. The composition of fluorescent Pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62 (7):2449-2456
23. Louws FJ, Rademaker JLW, de Bruijn FJ. The three DS of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Annual Reviews Phytopathology*. 1999; 37: 81-125
24. Louws FJ., Fulbright D.W., Stephens C.T. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994; 60 (7):2286-2295

25. Mehri I, Turki Y, Daly I, Ben Rjab A., Hassen A, Gtari M. Molecular identification and assessment of genetic diversity of fluorescent pseudomonas based on different polymerase chain reaction (PCR) methods. African Journal of Microbiology Research. 2013; 7 (19):2103-2113

Отримано 02.08.2017