

REP-ПЛР АНАЛІЗ БАКТЕРІЙ РОДУ *ERWINIA* – ЗБУДНИКІВ ХВОРОБ ЯБЛУНІ В УКРАЇНІ

Л.А. Данкевич, Ф.В. Мучник, 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 фінгерпринтування геномів ізольованих нами *Erwinia* sp., колекційних *Erwinia horticola* штамів та типового штаму *Erwinia amylovora* УКМ В-9057^T. **Методи.** В ході досліджень було використано мікробіологічні, молекулярно-генетичні (REP-ПЛР) та статистичні (UPGMA) методи. **Результати.** Оцінена генетична гетерогенність ізольованих *Erwinia* sp., колекційних *E. horticola* штамів. Встановлено значну спорідненість ізольованих *Erwinia* sp. штамів із типовим штамом *E. amylovora* УКМ В-9057^T за BOX, REP та ERIC профілями. Виявлено гетерогенність колекційних штамів *E. horticola* за даною ознакою. **Висновки.** Вперше в Україні проведено BOX, REP та ERIC профілювання бактерій роду *Erwinia*, що викликають хвороби яблуні. Встановлена відсутність гетерогенності геномних фінгерпринтів (100% ідентичності) ізольованих нами штамів *Erwinia* sp. і їх спорідненість з аналогічними, отриманими для типового штаму *E. amylovora* УКМ В-9057^T. Аналогічні профілі колекційних штамів *E. horticola* споріднені з профілями *E. amylovora* УКМ В-1095^T на 85–92% (BOX-ПЛР), 78–89% (REP-ПЛР) та 64–100% (ERIC-ПЛР) відповідно. Отримані нами результати можуть бути використані для моніторингу розповсюдження даних збудників та ідентифікації окремих штамів у дослідженнях з популяційної генетики, філогенетики та біогеографії.

Ключові слова: ідентифікація, генетична гетерогенність, REP-ПЛР, *Erwinia* sp., *Erwinia horticola*, *Erwinia amylovora*.

Відомо, що успішному інтродукуванню багаторічних плодкових культур, зокрема – яблуні, в Україні перешкоджає відсутність системного моніторингу та контролю розповсюдження найбільш шкочинних збудників як грибною, так і бактеріальною етіологією. Серед бактеріальних хвороб найбільших втрат при вирощуванні плодкових культур (зерняткових, кісточкових, декоративних) завдає ураження дерев збудником бактеріального опіку. Дане захворювання викликається видом *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al., 1920, що є карантинним об'єктом в Україні і багатьох країнах світу [1–4]. З тих пір, як Деннінгом у 1794 році у верхній долині річки Гудзон поблизу Нью-Йорка було виявлено спалах даного захворювання, його збудника зареєстровано у близько 100 країнах світу. У Європі *E. amylovora* з'явилася в Англії у 1957 році та відносно швидко поширилася майже по всій території континенту впритул до кордонів України [4, 5]. У зв'язку з ізольованістю аграрного сектора країн колишнього Радянського Союзу існувала думка, що бактеріальний опік плодкових в Україні відсутній [1, 6]. Але у 1997 році масове ураження дерев груші даним збудником зареєстровано на території Закарпатської і Чернівецької областей України [1, 7–9]. З того часу періодично з'являються повідомлення про

спалахи даної хвороби у всіх без виключення регіонах України [1, 7–9]. Слід також відмітити, що на території України Бельтюковою К.Г. з колегами при масовому обстеженні садів у 1963–1966 роках вперше було виявлено збудника чорного бактеріозу яблуні та описано як окремий вид *Erwinia horticola*. Згодом Гвоздяком Р.І. було ізольовано даного збудника з дерев буку [3]. Але, не зважаючи на значну шкодочинність та подібність багатьох ознак фенотипу до збудника бактеріального опіку плодів, видовий статус збудника чорного бактеріозу яблуні, груші та буку залишається остаточно не з'ясованим [10]. Попередньо нами було вивчено ряд ознак фенотипу та проведено аналіз нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК ізольованих нами *Erwinia* sp. і колекційних штамів *E. "horticola"*. Виявлено гетерогенність цієї групи штамів за даними ознаками та їх близькість до типових представників видів *Erwinia amylovora*, *Erwinia pirifoliae*, *Erwinia piriflorinigrans* [11, 12].

Зважаючи на значну шкодочинність *E. amylovora*, увагу багатьох наукових центрів прикуто до вивчення гетерогенності природної популяції збудника бактеріального опіку плодів [5]. Зокрема, деякі дослідники вважають, що *E. amylovora* є достатньо гомогенним видом за рядом фенотипових та генотипових ознак [5]. Але чим більше досліджують природню популяцію даного збудника, тим більше штамових особливостей виявляють [5, 13]. Так, різними науковцями виявлена гетерогенність штамів *E. amylovora*, ізольованих з різних культур за біохімічними властивостями, жирнокислотним та антигенним складом клітин, плазмідним профілем тощо [5]. Всебічне вивчення біології виду *E. amylovora* призвело і до відкриття нових видів. Зокрема, у 1996 році дослідниками з Японії ізольовано з дерев груші та досліджено за рядом ознак штами бактерій роду *Erwinia*, які відрізнялися від типових представників виду *E. amylovora* за низкою патогенних, біохімічних і генетичних ознак. Дані штами стали основою виду *Erwinia pirifoliae* [14]. У 2008 році дослідники при вивченні некротичних уражень квіток груші у автономній області Валенсія (Іспанія) виділили ряд штамів, що за низкою ознак відрізнялися від типових представників видів *E. amylovora* і *E. pirifoliae* та сформуvalи окремий вид *Erwinia piriflorinigrans* [15]. Сьогодні для дослідження штамової гетерогенності *E. amylovora* та близькоспоріднених видів використовують цілий арсенал методик, зокрема, оцінюють: біохімічні та серологічні властивості; чутливість до фагів та антибіотиків; жирнокислотні, білкові і плазмідні профілі [5, 9]. Аналізують також геномні фінгерпринти, зокрема, ампліфікують: ендегенні консенсусні повтори в геномі (REP-ПЛР), довільну поліморфну ДНК (RAPD-ПЛР), термінально мічені рестрикційні фрагменти (T-RFLP-ПЛР). Також ампліфікують і секвенують гени загальної і специфічної патогенності та спейсерну ділянку між рибосомальними генами (ITS-ПЛР) [5, 10, 16]. Наш вибір припав на REP-ПЛР, оскільки саме цей метод першим був застосований McManus і Jones у 1995 році для оцінки генетичного різноманіття штамів виду *E. amylovora*, ізольованих з плодів культур на території США [17]. Крім того, цей метод є одним із найбільш вживаних у вивченні штамової гетерогенності представників даного виду і до сих пір [18–21]. На наш погляд це обумовлюється тим, що в результаті REP-ПЛР утворюються три незалежних типи профілів. Крім того, за даними багатьох дослідників

REP-ПЛР профілі штамів *E. amylovora* мають відносно низький рівень гетерогенності, що дозволяє використовувати даний аналіз не тільки для діагностики та ідентифікації даного збудника, а і з метою моніторингу його розповсюдження.

Саме тому **метою** наших досліджень був аналіз BOX, REP та ERIC профілів ізольованих нами штамів *Erwinia sp.* і колекційних штамів «*Erwinia horticola*» для визначення їх гетерогенності за даною ознакою та можливої коректної ідентифікації на рівні виду.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були 10 ізольованих нами з уражених тканин яблуні (рід *Malus*) у 2006–2007 роках на території України штамів фітопатогенних бактерій *Erwinia sp.*: 1я, 2я, 3я, 4я, 5я, 6я, 7я, 8я, 9я, 10я та 5 колекційних штамів *E. horticola*: 8559, 8558, 8560, 8561, 8398, виділених Бельтюковою К.Г. і Пастушенко Л.Т. із яблуні у 1963–1966 роках. У роботі також використовували 3 колекційні штами *E. horticola* 8793, 8794 і 8557, ізольовані Гвоздяком Р.І. з буку (рід *Fagus*) у 1971 році [4]. Для порівняльного аналізу в дослідження також включили типовий штам *E. amylovora* УКМ В-9057^Т (=Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) 30165, International collection of microorganisms from plant (ICMP) 1540).

Штами культивували на картопляному агарі протягом 24 годин за 28°C. Виділення та очищення бактеріальної ДНК проводили з використанням набору реактивів «ДНК-сорб-В» згідно з інструкціями виробника («АмпліСенс», Російська Федерація). Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометра BioPhotometer. У роботі використали такі універсальні праймери: REP-1R-5'-IIIICGICGICATCIGGC-3', REP-21-5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'; ERIC-1R-5'-ATGTAAGCTCCTGGATTAC-3', ERIC-2-5'-AAGTAAGTGA CTGGGGTGAGCG-3; BOX-A1R-5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'. Ампліфікування проводили з використанням термоциклера Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902, фірми Applied Biosystems (США) за експериментально підібраних умов. Реакційна суміш (об'єм 25 мкл) для проведення ПЛР з REP і ERIC праймерами містила: 1,3 мкл деіонізованої H₂O; 12,5 мкл 2хPCR Master Mix (Fermentas, Литва); 0,2 мкл БСА (бичачий сироватковий альбумін) (20 мкг/мл); 2,5 мкл ДМСО (диметилсульфоксид); 3,75 мкл праймерів REP-1R і REP-21 (20 мМ) або ERIC-1R і ERIC-2 (20 мМ). Реакційна суміш (об'єм аналогічний попередній реакції) для проведення ПЛР з BOX праймером складалася з: 5,05 мкл деіонізованої H₂O; 12,5 мкл 2хPCR Master Mix (Fermentas, Литва); 0,2 мкл БСА (20 мкг/мл); 2,5 мкл ДМСО; 3,75 мкл праймера BOX-A1R (20 мМ). Кожна ПЛР суміш також містила геномну ДНК – 1 мкл (загальна кількість – 50нг ДНК). Реакція проводилася у пробірці об'ємом 0,5 мл, реакційна суміш знаходилася під захисним шаром мінеральної олії. Умови проведення – 35 циклів ампліфікування були наступними: початкова денатурація ДНК – 95°C/2хв і основна денатурація ДНК – 94°C/3с і 92°C/30с (однакова для всіх видів ПЛР); відпалювання – 50°C/1хв (з BOX і ERIC праймерами) або 40°C/1хв (REP праймерами); елонгація – 65°C/8хв та заключний синтез – 65°C/15хв (однакова для всіх видів 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.

Результати. В результаті проведених досліджень отримано BOX, REP та ERIC профілі ізольованих *Erwinia* sp., колекційних штамів *E. horticola* та типового штаму *E. amylovora* УКМ В-9057^T. У BOX профілях (рис. 1а), включених у дослідження ізольованих і колекційних штамів, а також типового штаму *E. amylovora* УКМ В 9057^T виявлено 12 продуктів реакції розміром 200, 250, 350, 420, 500, 570, 700, 750, 800, 900, 1000, 1500, 2500 та високомолекулярний фрагмент – від 4000 до 10000 п.н. З них спільними виключно для груп штамів виявилися фрагменти ДНК довжиною 200 та 570 п.н. Так, продукт ПЛР розміром 200 п.н. був детектований тільки у колекційних штамів *E. horticola* 8793, 8794 і 8557, виділених із буку (рис. 1а, доріжки 17–19), а продукт реакції розміром 570 п.н. – у колекційних штамів *E. horticola* 8793, 8794, 8557, 8398, 8560, 8559, ізольованих як із буку, так і з яблуні (рис. 1а, доріжки 12, 14–19). Отримані нами результати свідчать про відсутність генетичної гетерогенності у ізольованих нами штамів *Erwinia* sp. Рівень спорідненості їх BOX профілів з типовим штамом *E. amylovora* УКМ В-9057^T становив 100%. Натомість доволі гетерогенною виявилася група колекційних штамів *E. horticola*. Зокрема, BOX профілі колекційних штамів *E. horticola*, ізольованих з буку, відмінні від виділених штамів *Erwinia* sp. та типового штаму *E. amylovora* УКМ В-9057^T на 15%, а більшість колекційних штамів *E. horticola* ізольованих із яблуні – на 8%.

Як видно з дендрограми (рис. 2а), досліджувана група штамів є гетерогенною за BOX профілями. Так, ізольовані нами штами *Erwinia* sp. утворили спільний кластер з типовим штамом *E. amylovora* УКМ В-9057^T. До цього ж кластеру віднесено і штами *E. horticola* 8558 і 8561, ізольовані з яблуні. Натомість, решта штамів *E. horticola*, ізольовані з яблуні і буку, утворили два окремі кластери.

У ERIC профілях ізольованих штамів *Erwinia* sp., колекційних *E. horticola* штамів та типового штаму *E. amylovora* УКМ В-9057^T виявлено 14 ДНК фрагментів молекулярною вагою 100, 200, 250, 290, 320, 360, 400, 420, 520, 600, 700, 800, 900, 1500, 2500 п.н. (рис. 1б). Спільними для всіх досліджених штамів, включаючи типовий *E. amylovora* УКМ В-9057^T, виявилися продукти реакції розміром 100, 200, 250, 400, 700, 800, 900, 1500, 2500 п.н. Натомість, у ERIC профілях ізольованих із буку колекційних штамів *E. horticola* детектовано два унікальні ДНК фрагменти розміром 360 і 600 п.н. (рис. 1б, доріжки 17–19). Група колекційних штамів *E. horticola* виявилася варіабельною за вмістом наступних продуктів

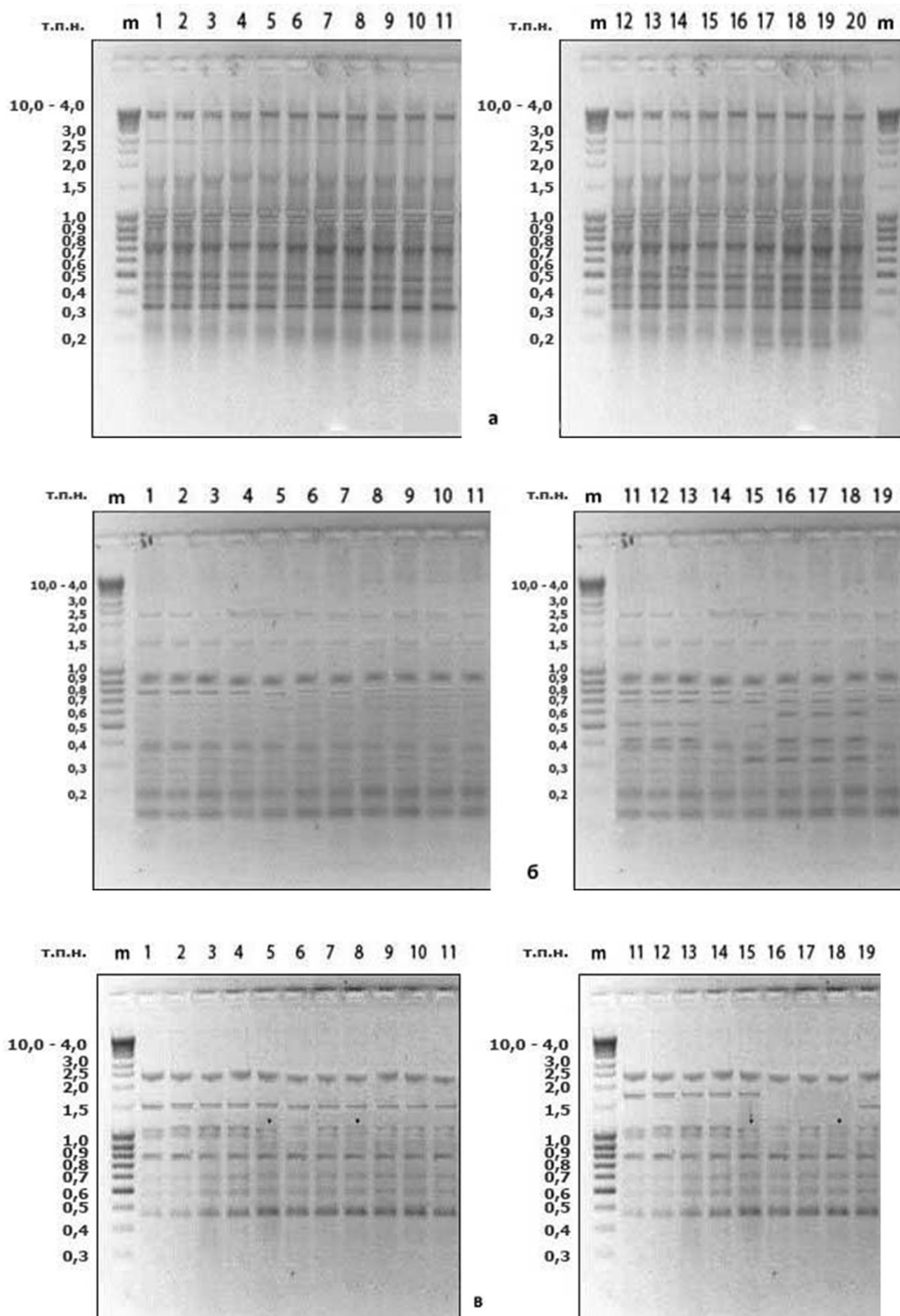
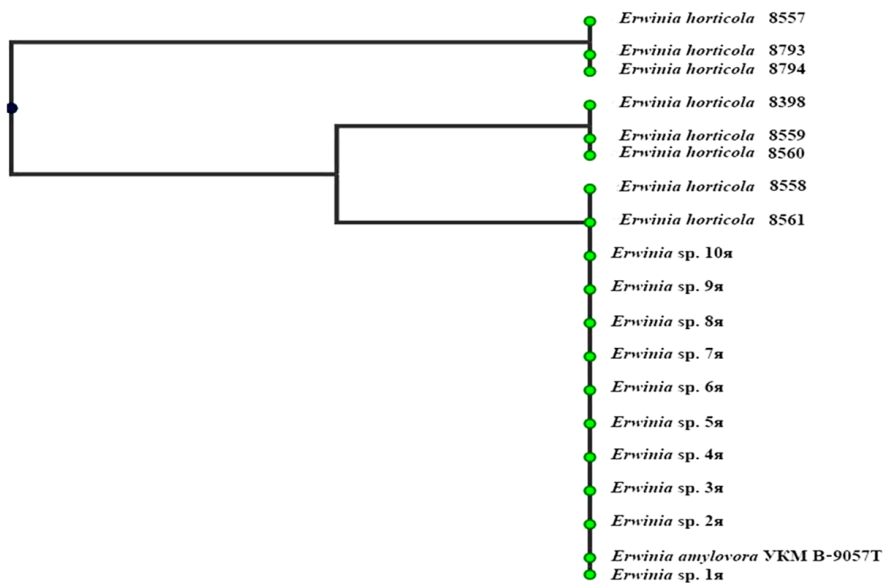


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів REP-ПЛР з: BOX-A1R праймером (а), ERIC-1R та ERIC-2 праймерами (б), REP-1R і REP-21 праймерами (в).
 м – маркери молекулярних мас; 1– *Erwinia* sp. 1я, 2– *Erwinia* sp. 2я, 3 – *Erwinia* sp. 3я, 4 – *Erwinia* sp. 4я, 5 – *Erwinia* sp. 5я, 6 – *Erwinia* sp. 6я, 7 – *Erwinia* sp. 7я, 8 – *Erwinia* sp. 8я, 9 – *Erwinia* sp. 9я, 10– *Erwinia* sp. 10я, 11 – *E. amylovora* УКМ В-1095^Т, 12 – *E. horticola* 8559, 13 – *E. horticola* 8558, 14 – *E. horticola* 8560, 15 – *E. horticola* 8561, 16 – *E. horticola* 8398, 17 – *E. horticola* 8794, 18 – *E. horticola* 8557, 19 – *E. horticola* 8793, 20 – *E. amylovora* УКМ В-1095^Т

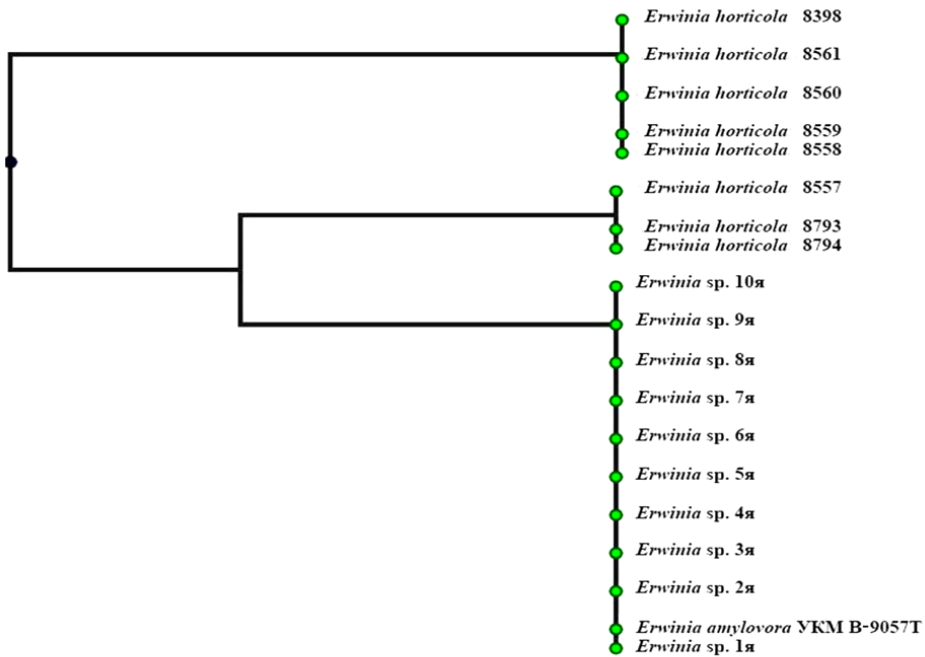
реакції – 290, 320, 420, 520 п.н (рис.1б., доріжки 12–19). Отримані нами результати свідчать про значну генетичну гомогенність і спорідненість ізольованих нами штамів *Erwinia* sp. та типового штаму *E. amylovora* УКМ В-9057^T (100% подібність профілів). В той же час колекційні штамми *E. horticola* є більш гетерогенною групою. Так, ERIC профілі штамів *E. horticola*, ізольованих із буку, відрізняються від аналогічних у ізольованих штамів *Erwinia* sp. та типового штаму *E. amylovora* УКМ В-9057^T на понад 36%. Натомість, штамми *E. horticola*, ізольовані з яблуні, або мають подібні (100 % спорідненості) до ізольованих та типового штамів профілі, або такі, що відрізняються на близько 14%.



а



б



В

Рис.2. Дендрограма спорідненості (кластерний алгоритм) побудована за результатами BOX (а), ERIC (б) та REP (в) профілювання геному ізольованих *Erwinia* sp., колекційних штамів *E. horticola*, типового *E. amylovora* УКМ В-1095^Т штаму з використанням UPGMA аналізу. Коефіцієнт кофенетичної кореляції (r) = 0,93–0,99

Як видно з рисунку 2б, групування включених у дослідження штамів за ERIC профілями є подібним до такого за BOX профілями. Зокрема, найбільший кластер утворений ізольованими штамми *Erwinia* sp. та типовим штамом *E. amylovora* УКМ В-9057^Т. До цього ж кластеру увійшли штами *E. horticola* 8558 і 8561, ізольовані з яблуні. Решта штамів *E. horticola*, ізольованих із яблуні і буку, утворили два незалежних кластери.

Натомість, у REP-профілях досліджуваних штамів спостерігається дещо менший, порівняно з ERIC та BOX профілями, рівень гетерогенності. У REP профілях ізольованих *Erwinia* sp., колекційних *E. horticola* штамів та типового штаму *E. amylovora* УКМ В-9057^Т виявлено 9 ДНК фрагментів молекулярною вагою 450, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 1700, 2500 п.н. (рис.1в). Спільними для всієї групи досліджених штамів виявилися наступні продукти ПЛР: 450, 600, 700, 800, 900, 1000, 2500 п.н. Фрагмент молекулярною вагою 1500 п.н детектовано тільки у ізольованих штамів *Erwinia* sp. та типового штаму *E. amylovora* УКМ В-9057^Т (рис 1в, доріжки 1–11). Натомість, продукт реакції розміром 1700 п.н виявлено виключно у колекційних штамів *E. horticola*, ізольованих з яблуні (рис 1в, доріжки 12–16). Як і у випадку ERIC та BOX профілювання, отримані нами результати REP-профілювання підтверджують значну генетичну гомогенність і спорідненість ізольованих нами штамів *Erwinia* sp. та типового штаму *E. amylovora* УКМ В-9057^Т (100% подібність профілів).

Відмінність REP-профілів штамів *E. horticola*, ізольованих Бельтюковою К.Г з колегами з яблуні, від ізольованих нами і типового штаму складає 11%, а ізольованих Гвоздяком Р.І. з буку – 22%. Як видно з рисунку 2в, характер кластеризації даної групи штамів в результаті UPGMA аналізу REP-профілів є дещо відмінним від аналогічного за результатами ERIC та BOX профілювання. Так, ізольовані нами штами *Erwinia* sp. та типовий штам *E. amylovora* УКМ В-9057^Т утворили окремий кластер, зв'язаний з двома кластерами, утвореними відповідно колекційними штамми *E. horticola*, ізольованими з яблуні і буку.

Отже, в результаті BOX, ERIC і REP-профілювання оцінена гетерогенність дослідженої групи штамів бактерій роду *Erwinia* та їх спорідненість з типовим штамом *E. amylovora* УКМ В-9057^Т. Виявлена відсутність варіабельності геномних фінгерпринтів ізольованих нами штамів *Erwinia* sp. і їх значна спорідненість з утвореними типовим штамом *E. amylovora* УКМ В-9057^Т. Зважаючи на встановлену нами раніше значну подібність фенотипових [11] та генотипових (99% гомології нуклеотидних послідовностей гену 16S рНК з аналогічними послідовностями у типових штамів *E. amylovora* ATCC 15580, (NR 118854) та *E. pyrifoliae* Ep1/96, (AJ009930, FP236842.1)) [13] властивостей ізольованих штамів *Erwinia* sp., найбільш ймовірною є їх належність саме до виду *E. amylovora*. Натомість, колекційні штами *E. horticola*, ізольовані з яблуні і буку, в результаті BOX, ERIC і REP-профілювання виявилися значно більш гетерогенною групою. Високий рівень гетерогенності даної групи спостерігався і при дослідженні комплексу їх фенотипових і генотипових властивостей [11, 12]. Зважаючи на це, остаточне визначення їх видового статусу на даному етапі досліджень не є коректним.

Обговорення. Як відомо, REP-ПЛР був одним із перших молекулярно-генетичних методів, що був використаний McManus і Jones у 1995 році для оцінки генетичної гетерогенності популяції збудника опіку плодів культур *E. amylovora* на території США [17]. З тих пір і до сьогодні цей метод не втратив своєї популярності і використовується не тільки для ідентифікації і діагностики даного збудника, а й з метою моніторингу його розповсюдження та запобігання виникнення епіфітотій [13–21]. Зокрема, вже згаданою групою американських дослідників показано [17], що серед 140 штамів, включаючи 57 штамів, зібраних з різних видів уражених плодів дерев протягом 3-х річного періоду в штаті Мічиган, 87% мали ідентичні BOX, ERIC і REP-профілі. До того ж, 9,3 та 2,2% ізольованих на Сході США штамів відрізнялися від головної групи наявністю додаткового продукту реакції з BOX праймерами розміром 570 п.н. або відсутністю продукту реакції з ERIC праймерами розміром 360 п.н. Приблизно у 1,4% штамів були відсутні фрагменти розміром 1600 (REP-ПЛР) та 360 (ERIC-ПЛР) п.н., які зазвичай детектувалися у доміантної групи штамів. Натомість, у даної групи штамів спостерігалася поява додаткового ДНК фрагменту розміром 600 п.н. внаслідок реакції з ERIC праймерами. Авторами вперше встановлені чіткі відмінності у BOX, ERIC і REP-профілях штамів *E. amylovora*, ізольованих із рослин роду *Rubus*, порівняно із аналогічними у штамів, ізольованих з плодів дерев родини *Roseaceae* (роди *Malus*, *Pyrus*, *Prunus*). Але чіткого зв'язку

між регіоном ізолювання та типом BOX, ERIC і REP-профілів даною групою дослідників встановлено не було. McManus і Jones [17] також вперше було виявлено відносно низький рівень гетерогенності штамів збудника опіку плодових культур за результатами BOX, ERIC і REP-профілювання. Так, максимальний рівень гетерогенності становив 13%. Ці висновки підтверджуються і рядом інших дослідників. Зокрема, низьку варіабельність BOX, ERIC і REP-профілів штамів *E. amylovora* підтверджують ряд дослідників із Марокко [19], Сербії [13], Італії [16], Білорусі [20], Польщі [21]. Так, дослідниками із Польщі J. Puławska і P. Sobiczewski [5] була проведена ампліфікація геномної ДНК більш, ніж 170 ізолятів переважно з північноамериканського континенту. В результаті цих досліджень, залежно від використаних праймерів (найбільша варіація була отримана з використанням ERIC праймерів), було отримано тільки 2–3 типи профілів. Для більшості ізолюваних з рослин роду *Rubus* штамів *E. amylovora* були отримані відмінні від аналогічних штамів, ізолюваних з плодових дерев BOX, ERIC і REP-профілі. Аналогічна залежність між архітектонікою генетичних профілів, отриманих в результаті REP-ПЛР та рослиною-господарем, отримана і дослідниками з Сербії [18] при дослідженні гетерогенності збудника бактеріального опіку плодових. Зокрема, штами *E. amylovora*, ізолювані з рослин родів *Cydonia* (айва), *Crataegus* (глоду) та *Malus* (яблуні), згрупувалися в один тип профілю з усіма типами праймерів, а штами *E. amylovora*, ізолювані з рослин роду *Pyrus* (груша) – в інший. Інша група дослідників із Сербії [13] також відмічає високу консервативність REP, ERIC і BOX профілів, ізолюваних з айви, груші та яблуні штамів *E. amylovora*. Зокрема, у результаті ПЛР з REP праймерами були отримані ДНК фрагменти розміром від 600 до 4000 п.н., з ERIC праймерами – від 150 до 2500 п.н., а з BOX праймерами – від 200 до 3000 п.н. Автори, натомість, не побачили відмінностей у профілюванні штамів, ізолюваних із різних рослин-господарів. Цікавою виявилася спроба дослідників з Марокко [19] провести аналіз генетичної гетерогенності штамів *E. amylovora* з різними місцями ізолювання за результатами ампліфікування BOX та ERIC послідовностей в геномі. Зокрема, аналізувалися штами, ізолювані з різних регіонів Марокко і референс-штами з Канади, Єгипту, Нової Зеландії, Великобританії, Італії, Данії та США. Автори констатували низьку варіабельність ERIC та BOX профілів даної групи штамів та наголосили, що не помітили жодних кореляцій між місцем ізолювання штаму та архітектонікою його ERIC та BOX фінгерпринтів.

Отримані нами результати корелюють з даними літератури. За результатами BOX, REP та ERIC профілювання встановлено низьку генетичну гетерогенність ізолюваних штамів *Erwinia* sp. та значну їх спорідненість із типовим *E. amylovora* УКМ В-1095^T штамом. Зокрема, BOX, REP та ERIC профілі ізолюваних *Erwinia* sp. штамів споріднені на 100% з аналогічними профілями *E. amylovora* УКМ В-1095^T. Натомість, згідно з BOX-, REP- та ERIC-профілюванням колекційні штами *E. horticola* є значно більш гетерогенною групою. BOX профілі колекційних штамів *E. horticola* споріднені з аналогічними профілями *E. amylovora* УКМ В-1095^T на 85–92%, REP профілі – 78–89% та ERIC профілі – 64–100% відповідно. Слід також зазначити, що простежується зв'язок між BOX,

REP та ERIC профілями та клімато-географічними умовами і рослиною-господарем, з якої був ізольований даний штам. Так, штами *Erwinia* sp., ізольовані нами під час епіфітотії насаджень яблуні у Київській області, є гомогенною групою, значно спорідненою з типовим штамом *E. amylovora* УКМ В-1095^T. Група колекційних штамів *E. horticola*, ізольованих з яблуні Бельтюковою К.Г. і Пастушенко Л.Т. у різних регіонах України, є більш гетерогенною порівняно з *Erwinia* sp., але все ж високо спорідненою з *E. amylovora* УКМ В-1095^T (подібність BOX профілів –92%, REP – 89%, ERIC – 86– 100% відповідно). Натомість, колекційні штами *E. horticola*, ізольовані Гвоздяком Р.І. з буку споріднені з типовим штамом *E. amylovora* УКМ В-1095^T за BOX профілями – на 85%, REP – 78%, ERIC – 64% відповідно. Отримані нами результати цілком узгоджуються з даними літератури, згідно з якими варіабельність BOX, REP та ERIC профілів спостерігається у випадках ізолювання штамів з різних видів уражених рослин або ж рослин, відібраних у географічно віддалених регіонах [13, 17, 18, 21]. На думку деяких дослідників однією з важливих причин цього явища є те, що вибір одного виду рослин з однієї кліматично-географічної зони може мати вплив на генетичну карту бактерії, а також дисперсію коротких послідовностей, які повторюються (BOX, REP та ERIC) у геномі бактерії, що певною мірою пояснює отримані нами результати. Натомість, у ряді досліджень констатовано, що у BOX, REP та ERIC профілях штамів, споріднених за рослиною-господарем та місцевістю ізолювання, майже відсутня варіабельність. Крім того, нами відмічено кореляцію між архітектонікою BOX, REP та ERIC профілів ізолюваних нами штамів та даними літератури [13, 17]. Так, відмічено співпадіння проведених нами досліджень у частині розміру варіабельних ДНК фрагментів та аналогічними дослідженнями, проведеними McManus і Jones [17]. Крім того, також простежується подібність між нашими результатами (діапазон молекулярних мас та кількість фрагментів реакції) та аналогічними, отриманими колегами із Сербії [13]. Встановлена нами подібність архітектоніки BOX, REP та ERIC профілів досліджених нами штамів та даних літератури свідчить не тільки про низьку генетичну гетерогенність збудника бактеріального опіку плодових, а й про можливе множинне ввезення даного патогена на територію України. Звичайно, підтвердження даного припущення потребує проведення більш широкомасштабних досліджень.

Отже, вперше в Україні проведено BOX, REP та ERIC профілювання бактерій роду *Erwinia*, що викликають хвороби яблуні. Встановлена відсутність гетерогенності геномних фінгерпринтів ізолюваних штамів *Erwinia* sp. і їх спорідненість з аналогічними, утвореними типовим штамом *E. amylovora* УКМ В-9057^T. Даний факт свідчить на користь віднесення їх до даного виду. Натомість, колекційні штами *E. horticola*, ізолювані з яблуні і буку, за результатами BOX, ERIC і REP-профілювання є значно більш гетерогенною групою. Зважаючи на даний факт та відсутність у дослідженнях інших типових штамів, окрім *E. amylovora* УКМ В-9057^T, наразі визначення їх видового статусу є неможливим. Для проведення коректної ідентифікації збудника чорного бактеріозу яблуні, груші і буку *E. horticola* на рівні виду необхідне вивчення інших властивостей, наприклад, здатності до синтезу амілоторану. Проведені нами дослідження генетичної гетерогенності штамів бактерій роду *Erwinia*, що уражують

яблуню, можуть бути використані для моніторингу розповсюдження даних збудників, виявлення та ідентифікації можливих джерел первинної інфекції, а також ідентифікації окремих штамів та у дослідженнях з популяційної генетики, філогенетики та біогеографії.

РЕР-ПЦР АНАЛІЗ БАКТЕРІЙ РОДА *ERWINIA* – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ЯБЛОНИ В УКРАЇНІ

Л.А. Данкевич, Ф.В. Мучник, 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 *Erwinia* sp., коллекционных *Erwinia horticola* штаммов и типового штамма *Erwinia amylovora* УКМ В-9057^T. **Методы.** В ходе исследований были использованы микробиологические, молекулярно-генетические (РЕР-ПЦР) и статистические (UPGMA) методы. **Результаты.** Оценена генетическая гетерогенность изолированных *Erwinia* sp., коллекционных *E. horticola* штаммов. Установлено значительное родство изолированных *Erwinia* sp. штаммов с типовым штаммом *E. amylovora* УКМ В-9057^T по BOX, REP и ERIC профилям. Выявлена гетерогенность коллекционных *E. horticola* штаммов по данному признаку. **Выводы.** Впервые в Украине проведено BOX, REP и ERIC профилирование бактерий рода *Erwinia*, вызывающих болезни яблони. Установлено отсутствие гетерогенности геномных фингепринтов (100% идентичности) изолированных нами штаммов *Erwinia* sp. и их родство с аналогичными, образованными типовым штаммом *E. amylovora* УКМ В-9057^T. Аналогичные профили коллекционных штаммов *E. horticola* сходны с профилями *E. amylovora* УКМ В-1095^T на 85–92% (BOX-ПЦР), 78–89% (РЕР-ПЦР) и 64–100% (ERIC-ПЦР) соответственно. Полученные нами результаты могут быть использованы для мониторинга распространения данных возбудителей и идентификации отдельных штаммов, а также в исследованиях популяционной генетики, филогенетики и биогеографии.

Ключевые слова: идентификация, генетическая гетерогенность, РЕР-ПЦР, *Erwinia* sp., *Erwinia horticola*, *Erwinia amylovora*.

REP-PCR ANALYSIS OF *ERWINIA* GENUS BACTERIA – INFECTIOUS AGENTS OF APPLE TREES DISEASES IN UKRAINE

L.A. Dankevych, F.V. Muchnyk, V.P. Patyka

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

Summary

Aim. Genomes fingerprinting of isolated *Erwinia* sp., collection *Erwinia horticola* strains and the typical strain *Erwinia amylovora* UCM B-9057^T was carried out for the correct species identification and evaluation of group heterogeneity. **Methods.** Microbiological, molecular genetic (REP-PCR) and statistical (UPGMA) methods were

used in this research. **Results.** The genetic heterogeneity of isolated *Erwinia* sp., collection *E. horticola* strains has been estimated. A significant relationship between isolated *Erwinia* sp. with typical *E. amylovora* UCM B-9057^T strains for BOX, REP and ERIC profiles has been found. The heterogeneity of collection *E. horticola* strains by the given features has been determined. **Conclusions.** BOX, REP and ERIC profiling of bacteria of the *Erwinia* genus, infectious agents of apple tree diseases have been performed for the first time in Ukraine. The absence of genomic heterogeneity of fingerprints (100% of similarity) of isolated *Erwinia* sp. strains and their high similarity with fingerprint of typical *E. amylovora* UCM B-9057^T strain have been determined. Similar profiles of the collection strains *E. horticola* are related to the profiles of *E. amylovora* UCM B-1095^T by 85–92% (BOX-PCR), 78–89% (REP-PCR) and 64–100% (ERIC-PCR). Our results may be used for monitoring of distribution of these pathogens and identification of some strains as well as in population genetics, phylogenetics and biogeography research.

Keywords: identification, genetic heterogeneity, REP-PCR, *Erwinia* sp., *Erwinia horticola*, *Erwinia amylovora*.

1. Yakovleva LM, Moroz SM, Scherbina TM, Ogorodnik LE, Gvozdyak RI, Patyka VP. [*Erwinia amylovora* – the pathogen of arbors in Ukraine]. Mikrobiol Z. 2014; 76(4):26–33. Ukrainian.
2. List of regulated pests. Ministry of Agrarian Policy of Ukraine. 2010.
3. Dankevych L, Leonova N, Dragovoz I, Patyka V, Kalinichenko A, Włodarczyk P, Włodarczyk B. The synthesis of plant growth stimulators by phytopathogenic bacteria as factor of pathogenesis. Appl Ecol and Environ Res. 2018; 16(2):1581–1593.
4. Gvozdyak RI, Pasichnyk LA, Yakovleva LM, Moroz SM, Lytvynchuk OO, Zhytkevych NV, Hodos SF, Butsenko LN, Dankevich LA, Hrynnik IV, Patyka VP. Phytopathogenic bacteria. Bacterial diseases of plants. V.P Patyka, editor. Kyiv: «Interservice»; 2011.
5. Puławska J, Sobiczewski P. Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia amylovora*: the causal agent of fire blight. Trees. 2012; 26:3–12.
6. Lukach MI Fire blight and necrosis of pears and apple trees, ecological niches of their pathogens: Author's abstract. dis ... Candidate biology sciences - Kyiv, 2001. 19 p.
7. Kalinichenko A, Havrysh V, Perebyynis V. Evaluation of biogas production and usage potential. Ecological Chemistry and Engineering. 2016; 23(3):387–400.
8. Kalinichenko A, Pasichnyk L, Osypenko S, Patyka V, Usmanova H, Bacterial diseases of bioenergy plants. Ecological Chemistry and Engineering A. 2017; 2(24):169–191.
9. Boiko A, Tsvigun V. [Distribution of bacteriosis induced by *Erwinia amylovora* in various types of plants of Polissya biocenosis under condition of pathogen contamination by bacteriophage]. Agroecological journal 2018; 2: 93–96. Ukrainian.
10. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York; USA; 2005.
11. Dankevich LA, Votselko SK, Scherbina TM, Patyka VP. [Phenotypic heterogeneity phytopathogenic bacteria belongs to the *Erwinia* genus – agents of apple's bacterial disease in Ukraine]. Mikrobiol Z. 2016; 78(5):30–41. Ukrainian.
12. Dankevich LA. [Phylogenetic analysis of pathogenic bacteria belongs to the *Erwinia* genus – agents of apple's disease in Ukraine]. Mikrobiol Z. 2017; 79(3):48–59. Ukrainian.

13. Krivokapić M, Gavrilović V, Ivanović M, Kuzmanović N, Fira Đ, Obradović A, Gašić K. Characterization and population diversity of *Erwinia amylovora* strains originating from pome fruits in Serbia. *Pestic Phytomed.* 2018; 33(3–4):175–184.
14. Kim WS, Gardan L, Rhim SL, Geider K. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *International J System Bacteriol.* 1999; 49(2):899–906.
15. 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 J System Bacteriol.* 2011; 61:561–56.
16. Barionovi D, Giorgi S, Stoeger AR, Ruppitsch W, Scortichini M. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. *J Applied Microbiol.* 2006; (100):1084–1094.
17. McManus PS, Jones A. Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. *Phytopathol.* 1995; 85(12):1547–1553.
18. Radunovic D, Gavrilovic V, Gašić K, Paunovic' M, Stojšin V, Grahovac M. Molecular characterization of *Erwinia amylovora* strains originated from pome fruits and indigenous plant in Montenegro. *J Plant Pathol.* 2017; 99(1):197–203.
19. Yaich M, Fatmi M, Bougsiba M, Valentini F, Scuderi G, D'onghia AM, Cirvilleri G. Fire blight (*Erwinia amylovora* [Burrill] Winslow) in Morocco: importance, geographical distribution and characterization *Phytopathol Mediterr.* 2011; (50):212–227.
20. Lagonenko AL, Kudzina IV, Evtushenkov AN. Genetic Characterization of Belarusian *Erwinia amylovora* strains. *Acta Horticult.* 2011; 896:141–146.
21. Gavrilović V, Ivanović Z, Popović T, Zivković S. Characterization of *Erwinia amylovora* strains isolated from Quince trees in Serbia using REP-PCR method. *Acta Horticult.* 2014; 1056:169–172.

Отримано 26.07.2019