

ДАНКЕВИЧ Л.А.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 154, e-mail: ldankevich@ukr.net, (066) 100-88-62,
(044) 526-23-89

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ ПАТОГЕННИХ ДЛЯ ЯБЛУНІ ШТАМІВ *ERWINIA SP.*

Україна має значні переваги перед європейськими державами за природно-економічним потенціалом для влаштування промислового садівництва. За умов найповнішого використання такого чинника, як висока економічна ефективність садівництва, в нашій державі можна успішно інтродукувати всі без винятку плодови і ягідні культури помірного клімату. Традиційно найбільш популярним є вирощування зерняткових плодкових культур – яблуні і груші. Але одним із ключових чинників, що перешкоджають значному поступу садівництва в Україні, є незадовільний моніторинг та обмежене застосування ефективних методів запобігання розповсюдженню збудників найбільш шкодочинних захворювань [1]. Слід також відмітити, що багаторічне некоректне використання пестицидів, зокрема фунгіцидів, для захисту дерев від збудників грибної етіології призвело як до зниження ефективності цих препаратів, так і до суттєвих змін у видовій структурі популяції фітопатогенів. Крім того, відбувається перерозподіл видового складу збудників різної етіології. Зокрема, останнім часом дослідники констатують поступове збільшення ураженості рослин збудниками вірусної та бактеріальної етіології [1]. Так, основними бактеріальними хворобами яблуні і груші в Україні є: бактеріальний опік плодкових (збудник *Erwinia amylovora*), некроз кори (*Pseudomonas syringae* рв. *syringae*), бактеріальний рак коренів (*Agrobacterium tumefaciens*), чорний бактеріоз («*Erwinia horticola*») [1]. Відомо, що найбільшої шкоди садівництву завдає збудник бактеріального опіку плодкових – *Erwinia amylovora*, що віднесений до списку карантинних об'єктів багатьох країн, зокрема й України [2]. Небезпечність цього збудника полягає у його здатності викликати хвороби понад 170 видів рослин із 28 родин [1]. Протягом 1999–2001 років у Кореї

діагностували захворювання дерев груші, що за симптомами нагадує бактеріальний опік плодкових та викликається бактеріями виду *Erwinia pyrifoliae* [3]. Крім того, іспанські дослідники зареєстрували спалах некрозу цвіту насаджень груші у Валенсії, збудник якого у 2011 р. був ідентифікований, як *Erwinia piriflorinigrans* [4]. Пізніше також було встановлено здатність викликати почорніння пагонів груші в Японії представниками виду *Erwinia uzenensis* [5]. Відомо, що названі види здатні викликати захворювання насаджень різних видів груші, що за деякими симптомами нагадують бактеріальний опік плодкових. Крім того, дослідники констатують поступове поширення цих видів фітопатогенних бактерій за межі країн, де їх вперше було діагностовано [3–5]. Слід також відзначити, що представники видів *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigrans*, *E. uzenensis* філогенетично близькоспоріднені [3–5], тому для їх коректної ідентифікації, зазвичай, використовують поліфазну таксономію [6]. Як правило, до таксономічної схеми залучають молекулярно-генетичні методи, що дозволяють не тільки коректно ідентифікувати збудника, а й оцінити гетерогенність його популяції [6]. До таких методів належить REP-ПЛР (Repetitive element PCR fingerprinting), що базується на наявності у прокаріотичному геномі трьох класів коротких послідовностей, які повторюються: REP (repetitive extragenic palindromic) – високо консервативні інвертовані повтори в кількості від 500 до 11000 копій, які розташовані у міжгенних ділянках і не транскрибуються; ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) – внутрішньогенні інвертовані повтори, вперше виявлені у ентеробактерій, і так звані BOX (repetitive BOX sequences) елементи. Висока консервативність цих повторів дозволила створити до них комплементарні праймери, що амплі-

ліфікують ділянки бактеріального геному розташовані між двома REP та двома ERIC елементами. Внаслідок цієї реакції утворюється специфічний для конкретного мікроорганізму набір фрагментів розміром від 200 до 6 тис. п. н. [7].

Протягом 2012–2015 рр. до відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України надійшло ряд звернень від приватних підприємств, що займаються вирощуванням яблуневих садів на території шести областей півночі та півдня України. У ході фітопатологічного аналізу було діагностовано два типи уражень. Збудник першого типу (90 % усього відібраного ураженого рослинного матеріалу) хвороби за комплексом ознак генотипу і фенотипу був ідентифікований, як *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Другий тип захворювання (10 % усього відібраного ураженого рослинного матеріалу) був зареєстрований у Київській області на площі насаджень близько 200 га [8]. Аналіз комплексу ознак фенотипу виявив значну спорідненість ізольованих штамів із представниками виду *Erwinia amylovora* [8], а визначення гомології нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК – з представниками видів *E. amylovora*, *E. piriflorinigrans*, *E. uzenensis* та *E. pyrifoliae* (неопубліковані дані). Саме тому метою наших досліджень було фінгепринтування геному (за допомогою REP-ПЛР) ізольованих нами штамів і типового штаму *Erwinia amylovora* УКМ (Українська колекція мікрорганізмів) В 1095^T для їх коректної таксономії 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. Для порівняльного аналізу у дослідженнях також використовували типовий штам *Erwinia amylovora* УКМ В 1095^T (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) 30165, International collection of microorganisms from plant (ICMP) 1540).

Виділення та очищення геномної ДНК досліджуваних штамів проводили із використанням набору реактивів «ДНК-сорб-В» згідно рекомендацій виробника. Концентрацію ДНК визначали спектрофотометрично за допомогою спектрофотометра BioPhotometr фірми Eppendorf. Для проведення ПЛР використали такі універсальні праймери: REP 1R -5'-IIIIC GICGICATCIGGC-3', REP 21 -5'-ICGICCTATCIG GCCTAC-3'; ERIC 1R -5'-ATGTAAGCTCCTGGA

TTCAC-3', ERIC 2 -5'-AAGTAAGTGAAGTGGGG TGAGCG-3'; BOX A1R -5'-CTACGGCAAG GCGACGCTGACG-3'. Реакційна суміш (об'єм 20 мкл) для проведення ПЛР містила: TrisHCl – 50 мМ, KCl – 50 мМ, MgCl₂ – 2,5 мМ, Tween 20 – 0,1 %, dNTP – 200 мМ кожного, праймери – 100 нМ кожного, Таq-ДНК полімераза – 1U, геномна ДНК – 3 мкл (загальна кількість – 50–150 нг ДНК). Реакція проводилася у пробірці об'ємом 0,5 мл, реакційна суміш знаходилася під захисним шаром мінеральної олії. Умови проведення ампліфікування були такими: початкова денатурація ДНК – 96°C/6 хв і основна денатурація ДНК – 94°C/ 1хв (однакова для всіх видів ПЛР); відпалювання – 44°C/1хв (REP-ПЛР з REP праймерами), 52°C/1хв (REP- ПЛР з ERIC праймерами) та 53°C/1 хв (REP- ПЛР з BOX праймерами); елонгація – 72°C/2хв, кількість циклів – 35 та заключний синтез –65°C/8хв (однакова для всіх видів REP- ПЛР). Ампліфікування проводили з використанням термоциклера «Терцик» фірми ДНК-технологія. Продукти реакції розподіляли електрофоретично з використанням 1,5 % агарозного гелю, ТБЕ буфера протягом 4 годин за напруженості електричного поля 1,5 В/см. У якості ДНК маркера молекулярних мас використовували маркер молекулярної маси MassRulerDNA Ladder Mix SM040 фірми ThermoFisher Scientific.

Результати та обговорення

У результаті проведених досліджень отримано BOX, REP та ERIC профілі ізольованих нами штамів *Erwinia* sp. та типового штаму *Erwinia amylovora* УКМ В 1095^T. Як видно з рисунка, ізольовані нами штами значно споріднені з типовим штамом *Erwinia amylovora* УКМ В 1095^T за BOX, REP та ERIC профілями.

Зокрема, у BOX профілях (рис. а) ізольованих штамів *Erwinia* sp. та типового штаму *Erwinia amylovora* УКМ В 1095^T виявлено 10 спільних ДНК фрагментів молекулярною масою близько 200, 400, 500, 600, 800–900, 1500, 2500 та 1 високомолекулярний фрагмент (3000–10000 н.п). У REP профілях (рис. б) досліджуваних штамів діагностовано 6 спільних ДНК фрагментів молекулярною масою близько 600, 900–1031, 1500, 2000–2500 н. п. У ERIC профілях (рис. в) детектовано 8 гомологічних ДНК фрагментів молекулярною масою лизько 200–300, 600–700, 800–900, 1031, 1500, 2000–2500 н. п. Отримані нами результати, ймовірно, свідчать про високу генетичну гомогенність популяції

збудника бактеріального опіку плодових в Україні. Слід також відмітити, що результати наших досліджень не суперечать даним літератури. Зокрема, низка дослідників підтверджує низьку генетичну гетерогенність представників виду *Erwinia amylovora*, встановлену в результаті їх BOX, REP та ERIC профілювання [7, 9, 10]. Так, McManus та L. Jones в результаті фінгепринтування геному 154 штамів *Erwinia amylovora*, ізольованих з уражених плодових дерев на території Північної Америки та Нової

Зеландії, встановлено спорідненість BOX, REP та ERIC профілів цих штамів на рівні 96–99 %. Крім того, цією групою дослідників також виявлена достатньо висока гомологія (89–97 %) BOX, REP та ERIC профілів штамів *Erwinia amylovora*, ізольованих із рослин роду *Rubus* [7]. Колектив дослідників із Косово також підтвердив значну подібність BOX, REP та ERIC профілів штамів *Erwinia amylovora*, ізольованих із уражених тканин зерняткових плодових культур [11].

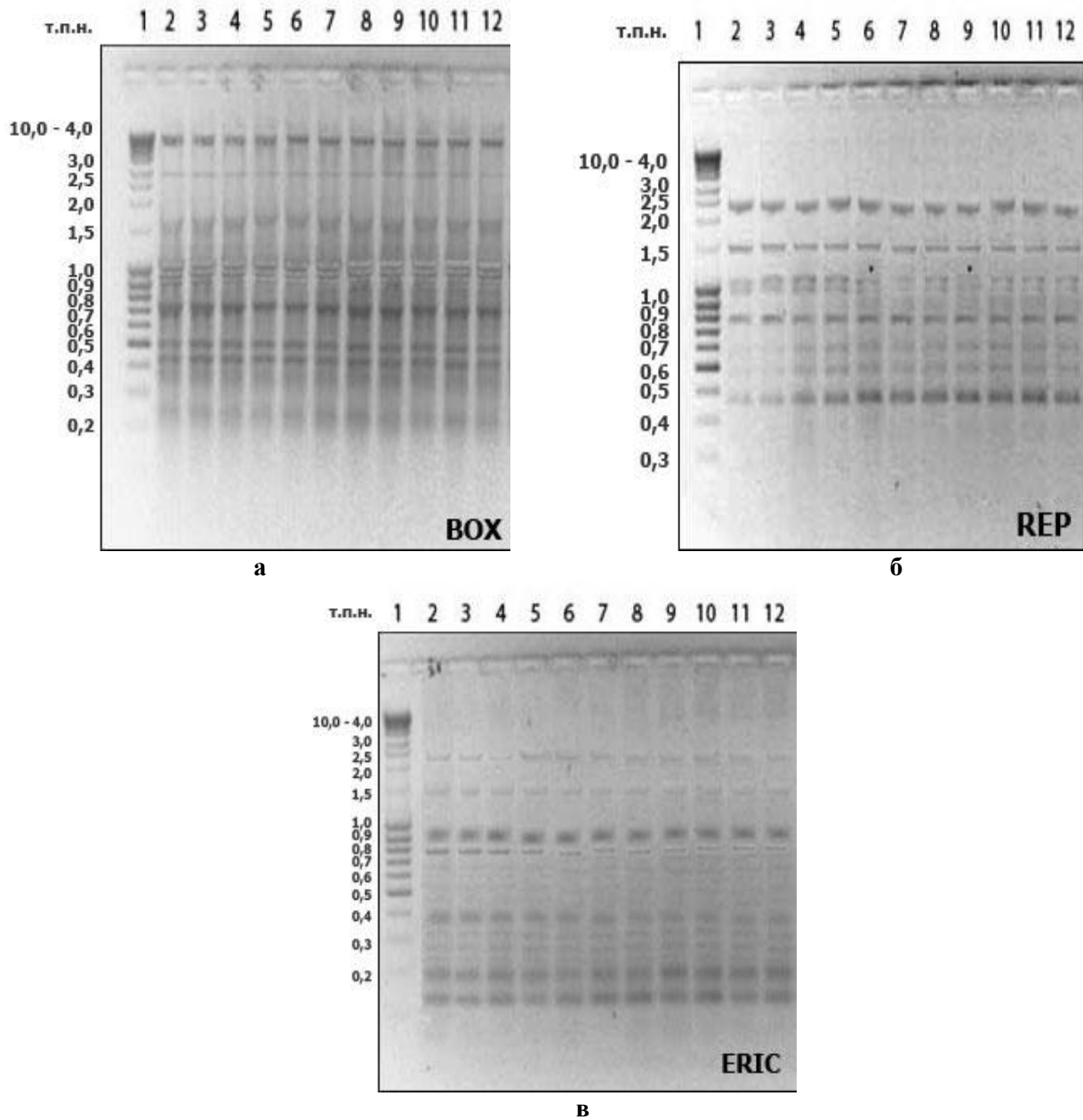


Рис. Електрофоретичний розподіл продуктів REP-ПЛР з BOX (а), REP (б) і ERIC (в) праймерами: 1 – маркери молекулярних мас; 2 – *Erwinia* sp. 1я; 3 – *Erwinia* sp. 2я; 4 – *Erwinia* sp. 3я; 5 – *Erwinia* sp. 4я; 6 – *Erwinia* sp. 5я; 7 – *Erwinia* sp. 6я; 8 – *Erwinia* sp. 7я; 9 – *Erwinia* sp. 8я; 10 – *Erwinia* sp. 9я; 11 – *Erwinia* sp. 10я; 12 – *Erwinia amylovora* УКМ В 1095^Т.

Висновки

Отже, за результатами BOX, REP та ERIC профілювання встановлено низьку генетичну гетерогенність ізольованих штамів *Erwinia* sp. та значну їх спорідненість із типовим штамом *Erwinia amylovora* УКМ В 1095^T. Отримані нами результати корелюють із проведеними раніше дослідженнями фенотипу ізольованих штамів *Erwinia* sp. Але відома значна філогенетична

спорідненість представників видів *E. amylovora*, *E. piriflorinigrans*, *E. uzenensis* та *E. pyrifoliae*, що здатні уражувати зерняткові плодови культури, деколи (з побідними симптомами) ускладнює коректну видову ідентифікацію ізольованих штамів *Erwinia* sp. На наш погляд, для видової ідентифікації цих штамів необхідне залучення інших молекулярно-генетичних методів досліджень.

Література

1. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гринник І.В., Патики В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / За ред. В.П. Патики. – К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
2. Перелік регульованих шкідливих організмів [Електронний ресурс] // Міністерство аграрної політики України. Наказ № 467 від 4 серпня 2010 р. – 2010. – Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0720-10>.
3. Kim W.S., Gardan L., Rhim S.L., Geider K. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) // International Journal of Systematic Bacteriology – 1999. – 49. – P. 899–906.
4. Lopez Maria M., Rosello M., Llop 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. – P. 561–567. doi: 10.1099/ijs.0.020479-0.
5. 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. – P. 1799–1803. doi: 10.1099/ijs.0.032011-0.
6. Barionovi D., Giorgi S., Stoeger A.R., Ruppitschand 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 // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – 100. – P. 1084–1094. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02813.x.
7. McManus P.S., Jones A. Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. [Electronic resource] // The American phytopathological society. – 1995. – Mode of access: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Articles/Phyto85n12_1547.PDF.
8. Данкевич Л.А., Воцелко С.К., Щербина Т.М., Патики В.П. Фенотипова гетерогенність фітопатогенних бактерій роду *Erwinia* – збудників хвороб яблуни в Україні // Мікробіол. журн. – 2016. – Т. 78, № 5. – С. 30–41.
9. Teixeira A.C.O., Marques A.S.A., Ferreira M.A.S.V. Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia amylovora* from Brazil // Braz. J. Microbiol. – 2009 – 40. – P. 678–684. doi.org/10.1590/S1517-83822009000300033.
10. Rico A., Fuhrer E., Ortiz-Barredo A., Murillo J. Polymerase chain reaction fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a limited phylogenetic value but allows the design of highly specific molecular markers // Phytopathology. – 2008. – 98. – P. 260–269. doi: 10.1094/PHYTO-98-3-0260.
11. Krasniqi N., Muslui A., Lepaja K., Lepaja L. Assessment of the sanitary status of pome fruit crops in Kosovo, with particular emphasis to the bacterial disease the Fire Blight [Electronic resource] // Proceedings. 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture. Opatija. Croatia. – 2015. – Mode of access: http://sa.agr.hr/pdf/2015/sa2015_p0911.pdf.

DANKEVICH L.A.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 154, e-mail: ldankevich@ukr.net

GENETIC PROFILING OF PATHOGENIC FOR APPLE TREE *ERWINIA* SP. STRAINS

Aim. It is known, that significant damage to pome fruit causing representatives of phylogenetically closely related species *Erwinia amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. piriflorinigrans*, *E. uzenensis*. That is why, for their correct identification using molecular genetic techniques, including REP-PCR, which can not only correctly identify the pathogen, and evaluate the heterogeneity of its population. In this regard, the aim of our research was genome fingerprinting of isolated strains and typical *Erwinia amylovora* UCM B 1095^T strain, using REP-PCR, for their correct taxonomy at the species level.

Methods. Genetic profiling of isolated *Erwinia* sp. strains and the typical *Erwinia amylovora* B 1095^T strain carried out by REP-PCR. **Results.** As a result of REP-PCR analysis revealed a significant relationship of isolated *Erwinia* sp. strains and the typical *Erwinia amylovora* UCM B 1095^T strain. **Conclusions.** As a result, BOX, REP and ERIC profiling set low genetic heterogeneity of isolated *Erwinia* sp. strains and their great affinity with the typical *Erwinia amylovora* UCM B 1095^T strain.

Keywords: REP-PCR, isolated *Erwinia* sp. strains, *Erwinia amylovora*, pome fruit culture.