

ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ РОДІВ *ERWINIA*, *RALSTONIA*, *AGROBACTERIUM*, ВИЗНАЧЕНІ РІЗНИМИ МЕТОДАМИ

Метою дослідження було вивчення плазмідних профілів та ефективності виділення плазмід грамнегативних фітопатогенних бактерій різними методами. **Методи.** Використано штами фітопатогенних бактерій *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum*. Виділення плазмідних ДНК з клітин бактерій здійснювали лужним методом Кадо і Ліу, модифікованим лужним методом Кадо і Ліу, модифікованим методом Дженсена та методом Кроса. Плазмідну ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. **Результати.** Показано, що в середньому від 13% до 30% вивчених штамів фітопатогенних бактерій утримують позахромосомні генетичні елементи. Встановлено, що з клітин бактерій, які вирости на рідкому селективному середовищі (пектин або картопляне середовище), позахромосомні ДНК виділяються набагато ефективніше і бактеріальна хромосома краще елінується. **Висновок.** Для виділення плазмідної ДНК з клітин штамів грамнегативних фітопатогенних бактерій *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* найбільш універсальним є модифікований для фітопатогенних бактерій лужний метод Кадо і Ліу.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, фітопатогени, плазміди.

Для більшості бактеріальних фітопатогенів встановлено наявність кільцевих плазмідних ДНК, але для значної кількості виявлених плазмід не встановлено їх функції [3]. Здебільшого плазміди складають від 2% до третини бактеріального геному. Бактерії *Rhizobium meliloti* та *Ralstonia solanacearum* мають мегаплазміди, розмір деяких з них складає більше 1000 т.п.н.. Усі вірулентні штами *Erwinia stewartii* мають щонайменше вісім плазмід, а в більшості випадків 11–13 плазмід розміром від 4,1 до 320 т.п.н. [3, 10].

Мегаплазміди бактерій роду *Agrobacterium* відомі перш за все своєю причетністю до трансформації рослинних клітин. Вірулентність *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes* є наслідком наявності у них Ti і Ri плазмід. Розмір більшості Ti та Ri плазмід складає приблизно від 200 до 800 т.п.н. Ri плазміди завжди утворюють коінтеграції з іншими плазмідами [4, 7, 10].

Бактерії роду *Erwinia* населяють поверхню рослин, ґрунт і воду як симбіотичні мікроорганізми, та можуть бути збудниками хвороб рослин-хазяїв. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) та близькоспоріднена *E. carotovora*



subsp. *atroseptica* (*Eca*) є агентами, які спричиняють м'яку гниль коренів рослин, в тому числі картоплі та моркви. Інші види ервіній (*E. amylovora*, *E. herbicola*, *E. toxica*) також є фітопатогенами, наприклад, *E. amylovora* викликає некротичне захворювання — бактеріальний опік яблунь, груш та споріднених видів рослин [1, 2].

Дослідження плазмідного складу штамів *E. carotovora* показало, що 30% відсотків з них мають позахромосомні ДНК різного розміру — від 2,5 до 129 т.п.н. Серед цих штамів також виявлено множинне утримання плазмід, деякі з них несуть від 2 до 5 плазмід різного розміру. Вивчення кореляції між наявністю позахромосомних ДНК та стійкістю до антибіотиків показало, що криптичні плазмідні *E. carotovora* не є R-плазмідами [1, 2].

У бактерій виду *Ralstonia solanacearum* можуть зустрічатися невеликі за розміром плазмідні <50 т.п.н., а також мегаплазмідні, які можуть утримувати генетичні детермінанти патогенності. Однак, наявність невеликих плазмід у *R. solanacearum* не є поширеним явищем, крім того вони присутні у клітині у невеликій кількості копій, і через це їх досить важко виділити [8].

Плазмідні профілі це практично важлива характеристика, представлена специфічним набором плазмід. Штами можуть втрачати деякі плазмідні, але характерний для певного виду базовий набір залишається незмінним. Існують різні методи виділення позахромосомних генетичних елементів бактерій, але добір адекватного методу для отримання відтворюваних та достовірних результатів для окремих груп бактерій досі залишається актуальним.

Тому метою нашого дослідження було вивчення плазмідних профілів та ефективності виділення плазмід грамнегативних фітопатогенних бактерій різними методами.

Матеріали і методи

В дослідженнях використовувалися штами *Agrobacterium tumefaciens* ОНУ 310, ОНУ 424, *Erwinia carotovora* ОНУ 317, ОНУ 318, ОНУ 319, ОНУ 320, ОНУ 321, ОНУ 322, ОНУ 323, ОНУ 324, ОНУ 325, ОНУ 326, *Ralstonia solanacearum* ОНУ 366, ОНУ 369, ОНУ 374, ОНУ 375, ОНУ 376, ОНУ 377, ОНУ 378, ОНУ 379, ОНУ 380, ОНУ 381, ОНУ 382, ОНУ 383, ОНУ 384, ОНУ 386, ОНУ 387 з колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Усі бактерії вирощували за температури 25–30 °С впродовж 16–18 год у 2 мл рідкого середовища LB, картопляного середовища, та на відповідних агаризованих середовищах. *E. carotovora* культивували також в рідкому та на агаризованому середовищі з пектином [1, 2].

Виділення плазмідної ДНК проводили оригінальним та модифікованими для фітопатогенних бактерій лужним методом Кадо і Ліу, методом Кроса та модифікованим методом Дженсена.

Лужний метод Кадо і Ліу [6]. Біомасу бактерій, отриману осадженням клітин 16–18 годинної культури, ресуспендували в 100 мкл буфера Е (40мМ



трис-НСІ, 2мМ ЕДТА рН 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера Кадо (трис-НСІ – 609 мг, додецилсульфат натрію (SDS) – 3 г, Н₂О – 100 мл, 2М NaOH – 2,2 мл). Зразки інкубували при 60–68 °С впродовж 30–45 хв. Після цього до лізату додавали подвійний об'єм (300 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували 15 хв за 8000g. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем, переносили у чисту пластикову пробірку, додавали один об'єм хлороформу, перемішували і знов центрифугували 15 хв за 8000g.

Модифікований лужний метод Кадо і Ліу [2]. Біомасу бактерій ресуспендували в 100 мкл буфера Е. До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера Кадо. Зразки інкубували при 58–60 °С впродовж 60 хв. Після цього до лізату додавали подвійний об'єм (300 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували 5 хв за 8800g. **За необхідності центрифугування проводили двічі або тричі.**

Модифікований метод Дженсена [5]. Стандартні лужні методи з кип'ятінням більш ефективні для виділення малих плазмід, але майже або зовсім не підходять для виділення великих плазмід. Цей протокол є добре відтворюваним і дає повноцінну картину плазмідних профілів мегаплазмід.

Біомасу бактерій ресуспендували в 100 мкл буфера Е з сахарозою (15% сахарози, 40мМ трис-НСІ, 2мМ ЕДТА рН 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера (3% SDS, 50мМ трис-НСІ рН 12,5). Зразки інкубували при 60 °С впродовж 30 хв. Після цього до лізату додавали 5 U протеїнази К і перемішували 20 раз. Далі інкубували 90 хв за температури 37 °С. Після цього додавали один мілілітр суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували 40 разів до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі 15 хв за 8800g.

Метод Кроса [9]. Біомасу бактерій ресуспендували в 2 мкл буфера ТЕ (0,05М трис-НСІ рН 8,0, 0,01М ЕДТА), центрифугували і знов ресуспендували в 40 мкл буфера ТЕ. До суспензії додавали 600 мкл буфера ТЕ з 4% SDS (рН 12,5). Зразки інкубували при 37 °С впродовж 20 хв. Після цього до лізату додавали 30 мкл 2М трис-НСІ буфера рН 7,0, а після цього 240 мкл 5М NaCl, інкубували 4 год на льоду. Зразки центрифугували 10 хв за 8800g. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем і додавали подвійний об'єм (800 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували за 8000g 15 хв.

У всіх методах верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем. Верхню фазу зі зразками отриманої плазмідної ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в агарозних гелях. Препарати плазмідних ДНК зберігали за 4 °С.



Результати та їх обговорення

Вивчення складу плазмід штамів *E. carotovora*, *A. tumefaciens* та *R. solanacearum* різного походження за допомогою модифікованого лужного методу Кадо і Ліу показало, що частина штамів ервінії має позахромосомні генетичні елементи. (рис. 1 і 2). Розміри виділених плазмід ервінії знаходяться у діапазоні від 1,8 до 20 т.п.н. Штами *E. carotovora* ОНУ 320, ОНУ 323 і ОНУ 324 утримують декілька позахромосомних генетичних елементів. У штаму *A. tumefaciens* ОНУ 310 виявлена мегаплазміда Ті розміром 188 т.п.н. (рис. 1).

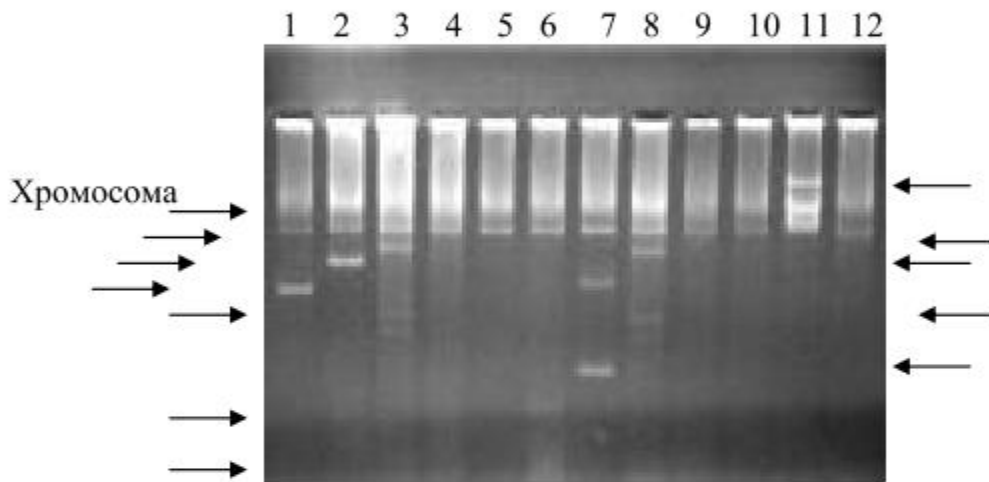


Рис. 1. Плазмідні профілі *E. carotovora*:

ОНУ 317 (pCA25 9,8 т.п.н.) (1), ОНУ 318 (pCA25::Tn9 12,5 т.п.н.) (2), ОНУ 320 (3), ОНУ 319 (4), ОНУ 321 (5), ОНУ 322 (6), ОНУ 323 (7), ОНУ 324 (8) ОНУ 325 (9), ОНУ 326 (10); *A. tumefaciens* ОНУ 310 (11), ОНУ 424 (12). Агароза — 0,75 %, 60В, 3,5 години. Тут і надалі стрілками вказані позахромосомні ДНК.

Fig. 1. Plasmid profiles of *E. carotovora*:

ONU 317 (pCA25 9.8 t.p.n.) (1), ONU 318 (pCA25::Tn9 12.5 t.p.n.) (2), ONU 320 (3), ONU 319 (4), ONU 321 (5), ONU 322 (6), ONU 323 (7), ONU 324 (8) ONU 325 (9), ONU 326 (10); *A. tumefaciens* ONU 310 (11), ONU 424 (12). Agarose — 0.75%, 60V, 3.5 hours. Here and further extrachromosomal DNAs are indicated by the arrows.

Мегаплазміда розміром 180 т.п.н. виявлена у штаму *R. solanacearum* ОНУ 381. Дві плазміди: одна – мегаплазміда, розміром 100 т.п.н., а інша невелика плазміда розміром 7 т.п.н. у штаму *R. solanacearum* ОНУ 382 (рис. 2).

Серед фітопатогенних бактерій *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* для подальших досліджень були відібрані штами, які утримували плазміди, а саме *E. carotovora*: ОНУ 317, ОНУ 318, ОНУ 320, ОНУ 323, ОНУ 324; *R. solanacearum*: ОНУ 381, ОНУ 382; *A. tumefaciens* ОНУ 310.

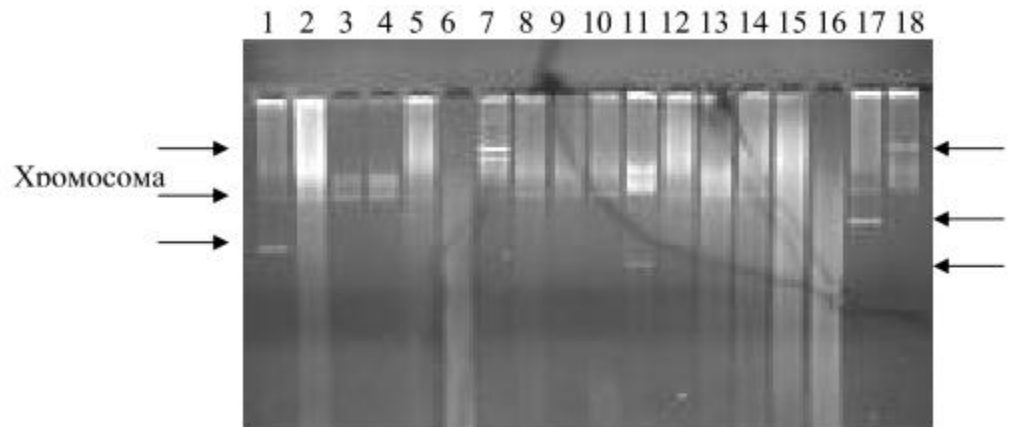


Рис. 2. Плазмідні профілі *R. solanacearum* ONU 387 (2), ONU 376 (3), ONU 377 (4), ONU 378 (5), ONU 386 (6), ONU 381 (7), ONU 384 (8), ONU 383 (9), ONU 380 (10), ONU 382 (11) ONU 379 (12), ONU 366 (13) ONU 369 (14), ONU 374 (15), ONU 375 (16); *E. carotovora* ONU 317 (рСА25 9,8 т.п.н.) (1), ONU 318 (рСА25::Тn9 12,5 т.п.н.) (17) і *A. tumefaciens* ONU 310 (188 т.п.н.) (18). Агароза — 0,75 %, 60В, 3,5 години.

Fig. 2. Plasmid profiles of *R. solanacearum* ONU 387 (2), ONU 376 (3), ONU 377 (4), ONU 378 (5), ONU 386 (6), ONU 381 (7), ONU 384 (8), ONU 383 (9), ONU 380 (10), ONU 382 (11) ONU 379 (12), ONU 366 (13) ONU 369 (14), ONU 374 (15), ONU 375 (16); *E. carotovora* ONU 317 (рСА25 9,8 kb) (1), ONU 318 (рСА25::Тn9 12,5 kb) (17); *A. tumefaciens* ONU 310 (188 kb) (18). Agarose — 0.75%, 60V, 3.5 hours.

Для порівняльного аналізу різних методів для якісного виділення плазмід різного розміру та вивчення складу плазмід досліджуваних фітопатогенних бактерій використали оригінальний лужний метод Кадо і Ліу, метод Кроса і модифікований метод Дженсена (рис. 3).

Як показали наші дослідження найефективнішими виявилися методи Кадо і Ліу (без модифікацій) і Дженсена (з модифікаціями). Хоча метод Кроса є універсальним і щодо вибору бактерій, і щодо розмірів позахромосомних генетичних елементів, однак він включає невиправдано довгі експозиції та є малоінформативним через збільшений об'єм дослідного зразка порівняно з іншими методами. Тобто плазмідні присутні у виділених зразках, але у значно меншій кількості на одиницю об'єму, тому цей метод можна використовувати лише з метою подальшої концентрації плазмідних ДНК у зразках. Метод Дженсена взагалі більше підходить для роботи з великими плазмідами, а оригінальний метод Кадо і Ліу з плазмідами невеликого розміру.

Саме тому можна зробити висновок, що для виділення плазмідних ДНК з клітин штамів *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* найбільш універсальним є модифікований для фітопатогенних бактерій лужний метод Кадо і Ліу.

До особливостей виділення позахромосомних ДНК також можна віднести вплив різних поживних середовищ для культивування бактерій на якість плазмідних зразків. Після порівняння результатів виділення плазмідних ДНК з бактеріальних клітин, які росли на повноцінних агаризованих і рідких поживних

середовищах відзначено, що зразки виділені з рідкого поживного середовища утримують більше плазмідного матеріалу, порівняно із зразками позахромосомних ДНК, отриманих з агаризованих поживних середовищ. Однак, слід зазначити той факт, що вихід плазмідного матеріалу збільшується тільки у випадку виділення невеликих плазмід. Що стосується виділення мегаплазмід з клітин, що виростили на пектині або на картопляному середовищі, то має місце лише менша кількість домішок хромосомної ДНК у зразках, порівняно з такими, виділеними з культур, що росли на чашках.

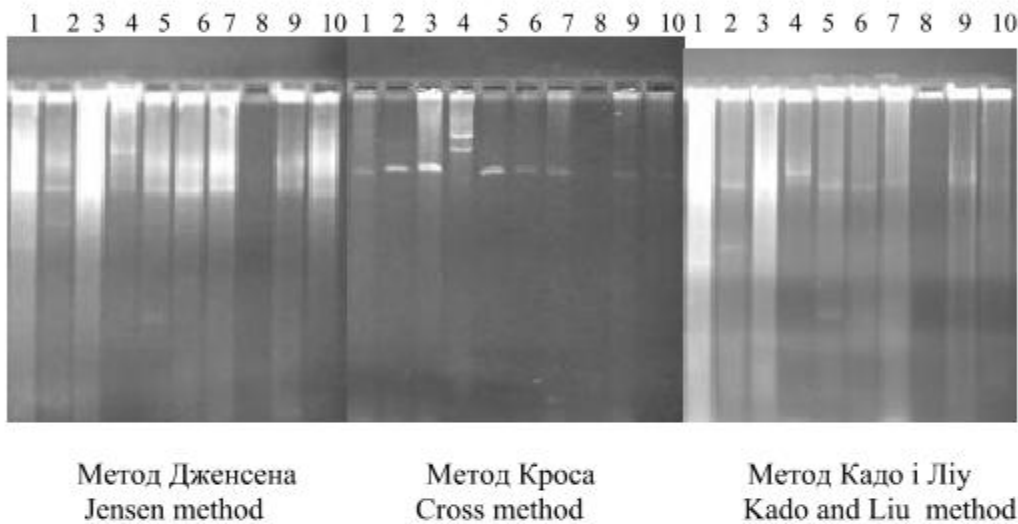


Рис. 3. Плазмідні профілі *E. carotovora* ONU 317 (pCA25 9,8 т.п.н.) (1), ONU 318 (pCA25::Tn9 12,5 т.п.н.) (2), ONU 320 (3), ONU 323 (5), ONU 324 (6) ONU 325 (7); *R. solanacearum* ONU 381 (4 і 8), ONU 382 (9); *A. tumefaciens* ONU 310 (10). Агароза — 0,75%, 60В, 4,5 години.

Fig. 3. Plasmid profiles of *E. carotovora* ONU 317 (pCA25 9,8 kb) (1), ONU 318 (pCA25::Tn9 12,5 kb) (2), ONU 320 (3), ONU 323 (5), ONU 324 (6) ONU 325 (7); *R. solanacearum* ONU 381 (4 і 8), ONU 382 (9); *A. tumefaciens* ONU 310 (188 kb) (10). Agarose — 0.75%, 60V, 4.5 hours.

При подальшому використанні для виділення плазмідних ДНК клітин, які виростили на рідкому селективному середовищі (пектин або картопляне середовище), було встановлено, що набагато краще виділяються позахромосомні ДНК, а бактеріальна хромосома краще елімінується. На рисунках 1, 2 і 3 представлені результати, отримані при виділенні плазмідних ДНК з бактеріальних клітин після культивування на відповідних рідких селективних середовищах.

Таким чином, показано, що в середньому від 13% до 30% вивчених штамів фітопатогенів утримують позахромосомні генетичні елементи. Встановлено, що для виділення плазмідних ДНК з клітин досліджуваних штамів фітопатогенних бактерій *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* найбільш універсальним є модифікований лужний метод Кадо і Ліу.

Zh. Sergieieva, V. Ivanytsia

Odesa Mechnykov National University, 2, Dvoryanska str.,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: sergeeva.zh@onu.edu.ua

**PHYTOPATHOGENIC BACTERIA OF GENERA *ERWINIA*,
RALSTONIA, *AGROBACTERIUM* PLASMID PROFILES STUDIED BY
DIFFERENT METHODS**

Summary

The **aim** of the study was to compare the results of the Gram-negative phytopathogenic bacteria plasmid isolation efficiency by various methods. **Methods.** The strains of phytopathogenic bacteria *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* were used. Plasmids isolation from the cells was carried out using alkaline Kado and Liu method, modified alkaline Kado and Liu method, modified Jensen method and Cross method. Plasmid DNA was analysed using electrophoresis in agarose gel. **Results.** On average, between 13% and 30% of the studied phytopathogenic strains contained extrachromosomal genetic elements. It was found that the extrachromosomal DNAs were isolated much better and bacterial chromosome was better eliminated using bacterial cells, grown on liquid selective medium (pectin or potato medium). **Conclusion.** The modified for phytopathogenic bacteria alkaline Kado and Liu method was the most suitable for plasmid DNA isolation from Gram-negative phytopathogenic bacteria *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* strains cells.

Key words: *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, phytopathogens, plasmids, plasmid profiles.

Ж.Ю. Сергеева, В.А. Иваныця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: sergeeva.zh@onu.edu.ua

**ПЛАЗМИДНЫЕ ПРОФИЛИ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ
РОДОВ *ERWINIA*, *RALSTONIA*, *AGROBACTERIUM*, ВЫЯВЛЕННЫЕ
РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ**

Реферат

Целью исследования было сравнение результатов эффективности выделения плазмид грамотрицательных фитопатогенных бактерий различными методами. **Методы.** Использовались штаммы фитопатогенных бактерий *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum*. Выделение плазмид из клеток осуществлялось щелочным методом Кадо и Лиу, модифицированным щелочным методом Кадо и Лиу, модифицированным методом Дженсена и методом Кросса. Плазмидную ДНК анализировали при помощи электрофореза в агарозных гелях. **Результаты.** В среднем, от 13% до 30% изученных нами штаммов фитопатогенов содержат внехромосомные генетические элементы. Установлено, что из клеток бактерий, которые выросли в жидкой питательной среде (пектин или картофельная сре-



да), *внехромосомные ДНК выделяются намного лучше, и также бактериальная хромосома лучше элиминируется. Вывод.* Для выделения плазмидных ДНК из клеток штаммов грамотрицательных фитопатогенных бактерий *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* наиболее универсальным является модифицированный для фитопатогенных бактерий щелочной метод Кадо и Луу.

Ключевые слова: *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, фитопатогены, плазмиды, плазмидные профили.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Сергеева Ж.Ю.* Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* / Ж.Ю. Сергеева, Ф.И. Товкач // Доп. НАН України. – 2008. – № 12. – С. 149–153.
2. *Товкач Ф.И.* Выделение и предварительная характеристика крипточеских плазмид *Erwinia carotovora* / Ф.И. Товкач // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 6. – С. 804–810.
3. *Coplin D.L.* Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria / D.L. Coplin // Ann. Rev. Phytopathol. – 1989. – V. 27. – P. 187–212.
4. *Couturier M.* Identification and classification of bacterial plasmids / M. Couturier, F. Vex, P. L. Bergquist [et al.] // Microbiol. Rev. – 1988. – V. 52, № 3. – P. 375–395.
5. *Jensen G.B.* The genetic basis of aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pXO16. / G. B. Jensen et al. // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177. – P. 2914–2917.
6. *Kado C.J.* Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids / C. J. Kado, S.-T. Liu // J. Bacteriol. – 1981. – V. 145, № 3. – P. 1365–1373.
7. *Kado C.I.* Origin and evolution of plasmids / C.I. Kado // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – V. 73, № 1. – P. 117–126.
8. *Reyes-Ramirez A.* Plasmid Patterns of *Bacillus thuringiensis* Type Strains. / A. Reyes-Ramirez, J. E. Ibarra // Applied And Environmental Microbiology. – 2008. – V. 74, № 1. – P. 125–129.
9. *Rohde C.* Plasmid isolation from bacteria: some fast procedures / C. Rohde // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1995. – V. 11, Issue 3. – P. 367–369.
10. *Vivian A.* The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? / A. Vivian, J. Murillo, R.W. Jackson // Microbiology. – 2001. – V. 147, № 4. – P. 763–780.

Стаття надійшла до редакції 09.09.2014 р.

