

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ „*PSEUDOMONAS XANTHOCHLORA*” – ВОЗБУДИТЕЛЯ МОКРОЙ ВОДЯНИСТОЙ ГНИЛИ ЛЮПИНА

Проведено определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК 12 штаммов „*P. xanthochlora*”, коллекционного штамма *Pseudomonas marginalis* 8572 и типовых штаммов *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T, *P. fluorescens* B-17^T. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК выявил высокий уровень гомологии (98-99 %) исследуемых штаммов „*P. xanthochlora*” как с представителями вида *P. fluorescens*, так и *P. marginalis*.

Ключевые слова: филогенетический анализ, нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК, „*P. xanthochlora*”, *P. marginalis*, *P. fluorescens*.

Стремительное развитие молекулярной биологии во второй половине XX века привело к разнообразию и удешевлению методов анализа нуклеиновых кислот, что позволило широко использовать их для непосредственной характеристики микроорганизмов и создания принципиально новой системы классификации прокариот, отражающей их генетическую родственность и эволюцию [6,7]. В соответствии с решением Международного комитета по согласованию подходов в бактериальной систематике, основными генотипическими критериями вида являются: молярный процент ГЦ пар в геномной ДНК, а также сродство, определенное в результате ДНК-ДНК гибридизации и анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Порогом для отнесения штаммов к одному виду служит не менее чем 60-70 % уровень сродства, определенный по данным ДНК-ДНК гибридизации, 97,5–99,9 % гомология нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и разница содержания ГЦ пар в ДНК не более чем 1 мол. % [4,6,8]. Поскольку определение степени сродства бактерий на основе ДНК-ДНК гибридизации и по содержанию ГЦ пар в геномной ДНК довольно трудоемко, дорого и требует наличия обширной коллекции типовых штаммов, чаще всего данные приемы используются при описании новых видов [1,9]. Последнее время большую популярность приобрела филогенетическая систематика прокариот, основанная на анализе последовательности гена 16S рРНК [1,9,11]. В частности, создана обширная и общедоступная интернет база последовательностей гена 16S рРНК, включая последовательности типовых штаммов, что позволяет проводить быструю и надежную идентификацию микроорганизмов на любом таксономическом уровне [1,4].

Впервые объединить в отдельный вид „*P. xanthochlora*” штаммы, вызывающие мокрое водянистое гниение люпина и поражающие отдельные бобовые культуры, предложила И.Б. Корольова [2]. Позднее, J.M. Young провел рекласификацию данного возбудителя и отнес его к виду *Pseudomonas marginalis*, объединяющего в своем составе три фенотипически разнородных патогена – pv. *alfalfae*, pv. *marginalis*, pv. *pastinacae*, которые в свою очередь являются полифагами и способны поражать более чем 50 видов растений [13]. Но, ни в вышедших гораздо позднее одобренных списках [20], предшествующих очередному изданию определителя Берджи [11], ни в самом определителе, ссылка на подобную рекласификацию отсутствует.

Поэтому, целью наших исследований был сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК коллекционных и выделенных нами штаммов „*P. xanthochlora*” с наиболее сродненными типовыми представителями рода *Pseudomonas* для корректной их таксономии.

Материалы и методы. Объектами исследования были 7 изолированных нами в 2006-2007 годах на территории России и Украины и 5 коллекционных, выделенных И.Б. Корольовой в 1963 году (Украина), штаммов „*P. xanthochlora*”. В работе также использовали коллекционный штамм *Pseudomonas marginalis* 8572, типовой штамм *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T, а также условно патогенный для растений типовой штамм *P. fluorescens* B-17^T.

Для выделения ДНК применяли Silica Spin колонки фирмы Qiagen и набор реактивов «ДНК-сорб-В». ДНК копию гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универ-

сальных праймеров рА – 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (8-27, нумерация по *E. coli*) и рН – 3'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5'(1542-1523, нумерация по *E. coli*) [14] при следующих условиях: денатурация ДНК – 94°C/15с, отжиг праймеров – 65°C/15с, элонгация ДНК – 72°C/5мин. Продукты амплификации клонировали с учетом наличия дополнительного аденозина на 3' конце фрагмента за счет терминальной трансферазной активности Tag ДНК – полимеразы в Т-вектор на основе плазмиды *pBLuescript SK(+)* по сайту рестрикции *Eco RV* [16]. Рекомбинатные векторы, несущие в себе вставку продукта амплификации, выделяли из трансформированных клеток *E. coli* XL 1-blue методом щелочного лизиса [12, 18]. Амплификаты 16S рРНК сиквенировали с 5'- и 3' концов на автоматическом сиквенаторе Genetic Analyzer. Начало и конец гена 16S рРНК исследуемых штаммов определяли сравнительным анализом с аналогичными фрагментами референтных штаммов *P. fluorescens* PC37 (DQ 178234) и *Pseudomonas marginalis* ATCC 10844T (AB 021401.1), предоставленных GenBank. Построение обратного комплимента, редактирование, выравнивание и элаймент последовательностей осуществляли с помощью программ Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) и Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>), доступных в сети Internet. Поиск гомологичных, задепонированных в GenBank, нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, проводили, используя программу BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Для построения деревьев применяли программу GeneBee, доступную на сайте Института им. Белозерского (<http://www.genebee.msu.su/genebee.html>).

Результаты и их обсуждение. По результатам анализа данных сиквенирования последовательностей гена 16S рРНК все исследованные штаммы „*P. xanthochlora*” сроднены как с типовым-референтным штаммом *P. fluorescens* PC37, так и – *P. marginalis* ATCC 10844T (98-99 % гомологии) (табл. 1). Такой высокий уровень гомологии (не ниже 97 %) коллекционных и изолированных нами штаммов с типовыми штаммами упомянутых выше известных видов подтверждает отсутствие отдельного вида „*P. xanthochlora*”. Одинаково высокая степень гомологии типовых штаммов *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T и *P. fluorescens* B-17^T, а также коллекционного штамма *P. marginalis* 8572, с предоставленными Gen Bank референтными штаммами *P. fluorescens* PC37 и *P. marginalis* ATCC 10844T свидетельствует о филогенетической близкородственности видов *P. marginalis* и *P. fluorescens*. Данный факт значительно затрудняет корректную идентификацию на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, возбудителя мокрой водянистой гнили люпина „*P. xanthochlora*” как на видовом, так и на внутривидовом уровне.

Полученные нами результаты коррелируют с данными литературы [9,19]. Так, рядом исследователей показано, что четко идентифицировать представителей рода *Pseudomonas* на основе гомологии гена 16S рРНК на уровне вида (в том числе *P. fluorescens* и *P. marginalis*), особенно в случае близкородственных бактерий, крайне затруднительно [9, 11]. В частности филогенетическое древо рода *Pseudomonas*, построенное по данным сиквенса последовательности гена 16S рРНК размером 1400 п.н., представлено двумя главными кластерами, причем достоверность такого ветвления, установленная с помощью bootstrap анализа, является стопроцентной (достоверными признаются значения выше 70 %). Первый кластер объединяет в себе шесть групп видов: «*P. syringae group*», «*P. chlororaphis group*», «*P. fluorescens group*», «*P. putida group*», «*P. stutzeri group*», и «*P. aeruginosa group*». Второй кластер содержит одну группу «*P. pertucinogena*» [9, 11].

Следует отметить, что сродство видов *P. fluorescens* и *P. marginalis* в середине «*Pseudomonas fluorescens group*» также составляет 100 % [11]. Не очень корректным и малоинформативным является еще один обязательный критерий вида – определение содержания ГЦ пар в ДНК [19]. По литературным данным, для представителей вида *P. marginalis* процент ГЦ пар в ДНК составляет 60, а для представителей рода *P. fluorescens* эта характеристика генотипа колеблется в интервале от 59,4–61,3 мол. % [11]. Согласно с упомянутым выше правилом (не более чем 1 мол. %), деление данных видов исключительно на основе содержания ГЦ пар в ДНК на два отдельных было бы неуместно. Далеко не точной оказалась идентификация близкородственных фитопатогенных представителей рода *Pseudomonas* исключительно на основе данных ДНК-ДНК гибридизации [15,17]. В подтверждение этого факта свидетельствуют результаты, приведенные в работе L. Gardan, H. Shafik, S. Belouin, et al. [15], согласно которым патовары *lachrymans*, *tabaci*, *morsprunorum* более родственны с видом *P. savastanoi* (72-82 %), чем с видом *P. syringae* (47-53 %), но по современным систематическим данным являются

патоварами в составе вида *P. syringae*. Рядом исследователей также отмечено значительное сродство видов *P. fluorescens* и *P. marginalis* по данным ДНК-ДНК гибридизации [17].

Таблица 1

Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штаммов «*P. xanthochlora*», коллекционного *P. marginalis* 8572 и типовых штаммов *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T, *P. fluorescens* B-17^T.

Штамм	Вид, номер и код доступа референс-штамма в базе данных GenBank	Количество нуклеотидов в фрагментах гена 16S рРНК	Идентичность последовательностей, (%)
1	2	3	4
« <i>P. xanthochlora</i> » 1л, 3л, 7л, 8л, 8536, 8538, 8539, 8540, <i>P. marginalis</i> 8572	<i>Pseudomonas marginalis</i> ATCC 10844T (AB 021401.1)	1504	99
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PC37 (DQ178234)		
« <i>P. xanthochlora</i> » 2л, 4л, 5л, 8537, <i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> 9175 ^T , <i>P. fluorescens</i> B-17 ^T	<i>Pseudomonas marginalis</i> ATCC 10844T (AB 021401.1)	1504	98
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PC37 (DQ178234)		99

Среди исследованных штаммов наблюдается незначительная гетерогенность. По уровню гомологии часть штаммов «*P. xanthochlora*» и коллекционный штамм *P. marginalis* 8572 одинаково сроднены как с типовым референтным-штаммом *Pseudomonas marginalis* ATCC 10844T, так и с *Pseudomonas fluorescens* PC37 (99 % уровень гомологии). Остальные штаммы «*P. xanthochlora*», типовые штаммы *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T, *P. fluorescens* B-17^T несколько больше сроднены с предоставленным GenBank референтным штаммом *P. fluorescens* PC37 (99 % гомологии), чем с *P. marginalis* ATCC 10844T (98 % гомологии). Такое группирование нашло свое отображение и при постройке филогенетических деревьев (рис. 1). Согласно рис. 1, все исследуемые штаммы образовали два четко дифференцированных кластера. Первый кластер составили часть штаммов «*P. xanthochlora*» (1л, 3л, 7л, 8л, 8536, 8538, 8539, 8540), коллекционный штамм *P. marginalis* 8572 и типовой референтный-штамм *Pseudomonas marginalis* ATCC 10844T. Во второй кластер вошли остальные штаммы «*P. xanthochlora*» (4л, 5л, 8537, 2л), типовые штаммы *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^T, *P. fluorescens* B-17^T и референтный штамм *P. fluorescens* PC37.

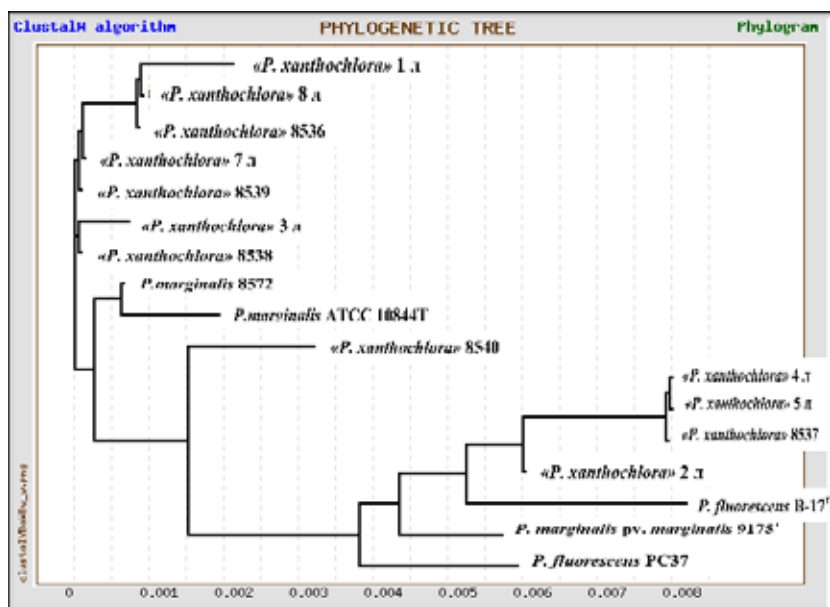


Рис. 1. Филогенетическое дерево (кластерный алгоритм), основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых штаммов. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 1 нуклеотидной замене на каждые 1000 нуклеотидов.

Конфигурация филогенетического дерева коррелирует с элайментом нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов. Среди точечных изменений, обнаруженных в результате выравнивания нуклеотидных последовательностей, встречаются общие для целой группы видов и свойственные отдельным штаммам (рис. 2). В частности, больше половины всех общих для различных исследуемых видов и штаммов точечных замен свойственны точно таким группам, которые вошли в первый и второй кластер (рис. 1). Согласно проведенному элайменту, наибольшая индивидуальная вариабельность нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК наблюдается у типового штамма *P. fluorescens* В-17^Т (четыре индивидуальные точечные замены), что подтверждается и его значительной уособленностью на филогенетическом дереве (рис. 1). Также высокая индивидуальная вариабельность свойственна штаммам «*P. xanthochlora*» 1л, 3 л, 8540, 8538 (от двух до трех индивидуальных точечных замен).

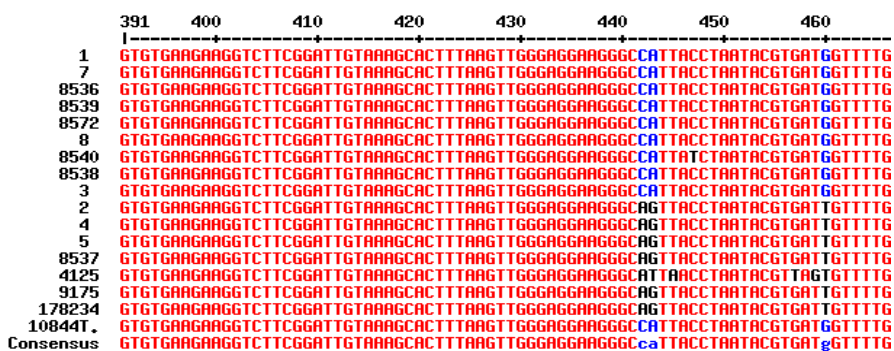


Рис. 2. Фрагмент выравнивания последовательностей гена 16S рРНК 12 штаммов «*P. xanthochlora*», коллекционного *P. marginalis* 8572 и типовых штаммов *P. marginalis* pv. *marginalis* 9175^Т (9175), *P. fluorescens* В-17^Т (4125).

В виду значительной близкородственности видов *P. fluorescens* и *P. marginalis*, на основе анализа гена 16S рРНК корректно идентифицировать исследуемые штаммы «*P. xanthochlora*» на уровне вида не удалось. На наш взгляд корректная таксономия данных фитопатогенов возможна только при комбинации как можно большего количества фенотипических и генотипических признаков. Ранее нами был детально изучен комплекс фенотипических свойств 13 штаммов «*P. xanthochlora*» [3]. Анализ патогенных, морфолого-культуральных, физиолого-биохимических свойств, а также антигенного и жирнокислотного состава клеток хотя и не дал конечного ответа на вопрос видового статуса возбудителя мокрой водянистой гнили люпина, но подтвердил его сродство с представителями вида *P. marginalis* и *P. fluorescens*. Поэтому, для конечной корректной видовой и внутренне видовой идентификации данного фитопатогена необходимо применить ряд других генотипических методов [5,7]. В частности, в данном случае может быть полезным «фингепритирование» геномной ДНК исследованных и типовых штаммов, что позволит оценить степень гомологии геномов без проведения трудоемкой и дорогой ДНК-ДНК гибридизации.

Л.А. Данкевич

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМІВ „*PSEUDOMONAS XANTHOCHLORA*” – ЗБУДНИКА МОКРОГО ВОДЯНИСТОГО ГНИТТЯ ЛЮПИНУ

Резюме

Здійснено визначення нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК 12 штамів «*P. xanthochlora*», колекційного штаму *Pseudomonas marginalis* 8572 і типових штамів *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^Т, *P. fluorescens* В-17^Т. Аналіз нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК виявив високий рівень гомології (98-99 %) досліджуваних штамів «*P. xanthochlora*» як з представниками виду *P. fluorescens*, так і *P. marginalis*.

Ключові слова: філогенетичний аналіз, нуклеотидна послідовність гену 16S рРНК, «*P. xanthochlora*», *P. marginalis*, *P. fluorescens*.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF LUPINE'S BACTERIAL WET ROT –
“*PSEUDOMONAS XANTHOCHLORA*”

S u m m a r y

The sequencing of 16S rRNA gene nucleotide chain of the 12 “*P. xanthochlora*” strains, collection *Pseudomonas marginalis* 8572 strain and *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 9175^T *P. fluorescens* B-17^T typical strains has been determined. The analysis of the 16S rRNA gene nucleotide chain showed high level of homology (98-99%) of “*P. xanthochlora*” investigated strains with the same of representatives of both *P. fluorescens* and *P. marginalis* species.

The paper is presented in Russian.

Key words: phylogenetic analysis, the nucleotide chain of 16S rRNA gene, “*P. xanthochlora*”, *P. marginalis*, *P. fluorescens*

The author address: L.A. Dankevych, Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv MSP, D03680, Ukraine.

1. Бажанов Д.П., Яцкевич К.К., Стриенок Н.С., Бажанова А.А. Схема генотипической идентификации, применимая в условиях «малых» коллекций, и ее использование для проведения таксономических ревизий бактерий различных групп // Международная конференция «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, Беларусь 2–6 июня 2008 г.): Тез. докл. – Минск, 2008. – С. 4–6.
2. Бельтюкова К.И., Королева И.Б., Мурас В.А. Бактериальные болезни зернобобовых культур. – Киев: Наук. думка, 1974. – 339 с.
3. Данкевич Л.А. Фенотипова ідентифікація збудника мокрого водянистого гниття люпину // Мікробіол. журн. – 2010. – 72, № 2 – С. 46–66.
4. Данкевич Л.А. Фенотипові і генотипові властивості бактерій роду *Pseudomonas* – збудників бурі бактеріальної плямистості люпину: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: – Київ, 2006. – 21 с.
5. Коцюфляк О. І. Дослідження бактерій роду *Pseudomonas* методами поліфазного таксономічного аналізу: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.07/ Ін-т мікробіолог. і вірусолог. ім. Д.К. Заболотного. – К., 2004. – 21 с.
6. Леегер Й., Древе Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты. Т. 2. – Москва: Мир, 2005. – 493 с.
7. Овчаренко Л.П., Козировська Н.О. Метагеномний аналіз мікроорганізмів довкілля – Київ: Спринт Принт, 2008. – 256 с.
8. Романовская В.А., Рокитко П. В., Шилин С.О. и др. Актуальные проблемы филогенетической классификации бактерий // Микробиол. журн. – 2003. – 65, №5. – С. 46–66.
9. Anzai Yojiro, Kim Hongik, Park Ju-Young et al. Phylogenetic affiliation of pseudomonas based on 16S rRNA sequence // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – 50, №4 – P. 1563–1589
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J. T., Garrity G.M. – New York; USA: Springer Science+ Business Media – 2005. – 2. – 1108 p.
12. Birnboim H.C. A rapid alkaline extraction method for isolation of plasmid DNA // Methods Enzymol. – 1983. – 100, N 1. – P. 243–255.
13. Bradbury J.F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. – Ferry Zane; Kew; Surrey, England: CAB Int. mycolog. Institute, 1986. – 332 p.
14. Edwards Ulrike, Rogal Till, Blocker Helmut et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of gene coding for 16S ribosomal RNA. // Nucl. Acids Res. – 1989. – 17, N 19. – P. 7843–7853.
15. Gardan L., Bollet C., Ghorrah M. ABU., et al. DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1992. – 42, N4. – P. 606–612.
16. Marchuk D., Drumm M., Saulino A., S et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR product // Nucl. Acid Res. – 1990. – 19, N 5. – P. 1154–1155.
17. Pecknold P. C., Grogan R. G. Deoxyribonucleic acid homology groups among phytopathogenic *Pseudomonas* species. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1973. – 23, N2 – P. 111–123.
18. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. – Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 300 p.
19. Yamamoto Satoshi, Kasai Hiroaki, Arnold Dawn L. et al. Phylogeny of genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes // Microbiology. – 2000. – 146, N 10. – P. 2385–2394.
20. Young J. M., Saddler G.S., Takikawa Y., De Boer S. H., Vauterin L., Gardan L., Gvozdyak R.I., Stead D.E. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995 // Review of Plant Pathology. – 1996. – 75, N 9. – P. 721–763.

Отримано 10.12.2010