

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКІВ М'ЯКОГО ГНИТТЯ ТА В'ЯНЕННЯ ОГІРКІВ В УКРАЇНІ НА ОСНОВІ АНАЛІЗУ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ГЕНА 16S рРНК

Л.А. Данкевич

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

Мета. Дослідити спорідненість нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК 5 ізольованих штамів *Pectobacterium* sp. та 9 колекційних штамів «*Erwinia toxica*», а також окремих типових представників родів *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Dickeya* для коректної ідентифікації даної групи штамів на рівні виду. **Матеріали і методи.** Об'єкти – 5 штамів *Pectobacterium* sp., ізольованих з уражених рослин огірків, та 9 колекційних штамів «*Erwinia toxica*». Ген 16S рРНК ампліфікували з використанням універсальних праймерів рА та рН. Побудову компліментарної послідовності, редагування і вирівнювання послідовностей здійснювали за допомогою програм Multalin і Sequence Manipulation Suite. Пошук нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК, споріднених із досліджуваними, в GenBank проводили, використовуючи програму BLASTN. Для побудови дендрограми філогенетичних зв'язків застосовували програму MEGA5. **Результати.** Аналіз нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК встановив високий рівень ідентичності (98-99%) досліджуваних штамів з наступними типовими штамами *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ICMP 5702, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* LMG 17566, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* NZEC1. Досліджувані штами також мають значну генетичну спорідненість (97-98% ідентичності нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК) із представниками видів *P. atrosepticum*, *P. betavascularum*, *P. wasabiae*, *P. aroidearum*. **Висновки.** Значний відсоток ідентичності нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК (98-99%) колекційних штамів «*Erwinia toxica*» та ізольованих нами штамів *Pectobacterium* sp. з окремими типовими представниками видів роду *Pectobacterium* наводить на думку про неправомірність виділення «*Erwinia toxica*» у окрему таксономічну одиницю та можливу приналежність даної групи штамів до вже відомих видів. Оскільки, згідно даних літератури, зазначені вище підвиди є близькоспорідненими та погано диференціюються за гомологією нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК, для остаточної видової ідентифікації досліджуваних нами штамів необхідно вивчити інші генотипові ознаки.

Ключові слова: *Pectobacterium* sp., «*Erwinia toxica*», рід *Pectobacterium*, ген 16S рРНК.

Останнім часом фітопатологи констатують, що умови, які створюються при вирощуванні овочевих культур в польових та в умовах закритого ґрунту, а саме: інтенсивне пестицидне навантаження, відсутність коректної сівозміни, використання обмеженої кількості сортів і видів рослин, виснаження ґрунту та збільшення його фітотоксичності призводять як до спалаху епіфітотій, так і до перерозподілу видового складу та появи нових видів збудників, зокрема бактеріальних хвороб [1, 2, 3]. В Україні

огірки (*Cucumis sativus*) є традиційно популярною культурою овочівництва. Як відомо, основними збудниками бактеріальних хвороб огірків є: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* – мокра гниль та в'янення, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* – м'яка гниль плодів, *Erwinia tracheiphila* – бактеріальне в'янення, *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* – бактеріальна плямистість листа [3]. На початку 70-х років минулого століття О.П. Коробко вперше виділив в чисту культуру і охарактеризував за низкою ознак фенотипу новий вид «*Erwinia toxica*» – збудника судинного бактеріозу огірків в Україні, переважно у закритому ґрунті. Автор зауважував значну шкодочинність даного збудника, особливо в умовах закритого ґрунту, і його подібність за рядом фенотипових ознак до окремих представників роду *Erwinia* [4]. Але, незважаючи на зазначене вище, таксономічний статус даного збудника до сих пір є невизначеним. Відомо, що за сучасними даними літератури симптоми гниття та в'янення ряду овочевих культур викликають окремі види фітопатогенних бактерій родів *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Dickeya* [3, 5, 6]. Завдяки широкому використанню філогенетичного аналізу у таксономії бактерій систематика даних родів зазнала значних змін. Як відомо, наприкінці 80-х років минулого сторіччя Комітет із узгодження підходів у бактеріальній систематиці визначив, що вид повинен об'єднувати штами з 70% або більше спорідненості молекул ДНК, встановлених за даними ДНК-ДНК гібридизації, та різницею температури плавлення (T_m) рівною або меншою за 5°C. Пізніше було показано, що штами одного виду повинні мати спорідненість нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК не нижче 97% [7, 8, 9]. Так, на основі аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК рід *Erwinia* був розділений на декілька кластерів, що, в свою чергу, дало підставу до включення частини видів даного роду до інших родів. Так, частина видів (*E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *odorifera*, *E. carotovora* subsp. *wasabiae*, *E. cacticida*, *E. chrysanthemi* і *E. cypripedii*) була віднесена до роду *Pectobacterium* [10]. При більш детальному аналізі згодом частина видів була включена до родів *Dickeya* (*D. chrysanthemi*) та *Pantoea* (*P. cypripedii*), а деякі були виділені в окремі види в середині роду *Pectobacterium* (*P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. wasabiae*). Процес рекласифікації видів фітопатогенних бактерій в середині даного роду та створення нових видів триває і до сьогодні [11, 12, 13, 14].

Попередньо з метою виявлення збудників гниття та в'янення огірків у закритому ґрунті було проведено багаторічне обстеження насаджень огірків в одному із найбільших тепличних господарств Київської області. В ході фітопатологічного аналізу було діагностовано ураження рослин, що характеризувалося поступовим хлорозом з подальшим в'яненням рослин та гниттям плодів. З уражених рослин та плодів було виділено близько 50 ізолятів. Аналіз комплексу фенотипових ознак виявив значну їх спорідненість з типовими представниками роду *Pectobacterium* (дані подано до друку). Для подальших досліджень було відібрано 5 найбільш агресивних штамів. Також за допомогою REP-ПЛР було проведено фінгепринтування геному ізольованих нами *Pectobacterium* sp., колекційних «*Erwinia toxica*» штамів і типових представників окремих видів родів *Pectobacterium* і *Dickeya*. В результаті проведених досліджень встановлено значну спо-

рідненість даної групи штамів із типовим штамом *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В1075^T [15].

Зважаючи на зазначене вище, метою наших досліджень було вивчення спорідненості нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК 5 ізольованих штамів *Pectobacterium* sp. та 9 колекційних штамів «*Erwinia toxica*» з типовими представниками родів *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Dickeya* для їх подальшої видової ідентифікації.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були штами фітопатогенних бактерій *Pectobacterium* sp. 1ог, 2ог, 3ог, 4ог, 5ог, ізольовані нами з уражених тканин огірків, та колекційні штами «*Erwinia toxica*» 8692, 8693, 8694, 8695, 8415, 8416, 8417, 8418, 8419, виділені О.П. Коробко із хворих рослин огірків. Для порівняльного аналізу в дослідження також включили наступні типові штами: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В-1075^T (Українська Колекція Мікроорганізмів) = ICMP 5702 (International collection of microorganisms from plant) = NCPPB 312 (National collection of Plant Pathogenic bacteria) = ATCC 15713 (American type culture collection), *Pectobacterium atrosepticum* УКМВ-1084^T = ICMP 1526 = NCPPB 549 = ATCC 33260, *Dickeya chrysanthemi* УКМВ-1087^T = ICMP 5703, = NCPPB 402 = ATCC 11663. Штами люб'язно надані з колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України та УКМ. Для філогенетичного аналізу також використовували нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК типових штамів видів, що належать до родів *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Dickeya*: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ICMP 5702, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* LMG (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms) 17566, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* ICMP 19477, *P. atrosepticum* LMG 2386, *P. betavasculorum* ATCC 43762, *P. wasabiae* CFBP (International center of Microbial Ressources–French Collection of Plant-associated Bacteria) 3304, *P. cacticidum* LMG 17936-T, *P. rhapontici* DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) 4484, *P. aroidearum* ICMP 1522, *Dickeya chysanthemi* DSM 4610, *Erwinia tracheiphila* ATCC 33245 і розміщуються у GenBank.

Для виділення ДНК застосовували колонки Silica Spin фірми Qiagen і набір реактивів «ДНК-сорб-В». Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометру BioPhotometer (Eppendorf, Федеративна Республіка Німеччина). Ген 16S рРНК ампліфікували з використанням універсальних бактеріальних праймерів рА-5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (8-27, нумерація за *E. coli*) і рН-3'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5' (1542-1523, нумерація за *E. coli*) [16]. Ампліфікування проводили з використанням термоциклеру Veriti 96 Well Thermal Cycler 9902 (фірми Applied Biosystems, Сполучені Штати Америки) за експериментально підібраних умов: додаткова денатурація ДНК – 96°C/6хв та основна денатурація ДНК – 94°C/15с; відпалювання праймерів – 65°C/15с, синтез гена – 72°C/1хв; заключний синтез ДНК – 72°C/5хв. Стандартна ПЛР суміш об'ємом 20 мкл містила: 1хПЛР буфер – 4 мкл; суміш дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ – 1,6 мкл; ДНК – 1мкл; рА праймер – 0,5 мкл; рН праймер – 1 мкл; рекомбінантну термостабільну Таq-полімеразу активністю 5 од/мкл – 0,5 мкл; деіонізовану стерильну воду – 11,4 мкл. Наявність ампліфікатів визначали шляхом електрофорезу у 1,5% агарозному гелі з додаванням

1% розчину бромистого етидію. Продукти ампліфікації клонували в Т-вектор на основі плазмиди *pBLuescript SK(+)* за сайтом рестрикції EcoRV [13]. Рекомбінантні вектори, що несуть вставку продукту ампліфікації, виділяли з трансформованих клітин *E.coli* XL 1-blue методом лужного лізису [17, 18]. Послідовності 16S рРНК секвенували з 5'- і 3'-кінців на автоматичному секвенаторі Genetic Analyzer 3130 (фірми Applied Biosystems, Сполучені Штати Америки). Секвенування гена 16S рРНК проводили на базі відділу молекулярно-біологічних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК.

Побудову компліментарної послідовності здійснювали з використанням програми Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>). Редагування і вирівнювання послідовностей проводили за допомогою програми Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Встановлення спорідненості нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК досліджуваних штамів із гомологічними нуклеотидними послідовностями типових штамів родів *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Dickeya*, що розміщені у GenBank, здійснювали, використовуючи програму BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Для побудови дендрограми філогенетичних зв'язків застосовували програму MEGA 5 [19]. Дендрограму будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двопараметричної моделі Кімури за 100 репліками «bootstrap» аналізу.

Результати. У результаті проведених досліджень отримано нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК 9 штамів «*Erwinia toxica*» та 5 штамів *Pectobacterium* sp. загальною довжиною від 1525 до 1529 н.п. та від 1390 до 1462 н.п. відповідно. Також було просеквеновано ген 16S рРНК типових штамів *P.carotovorum* subsp. *carotovorum* УКМ В-1075^T, *P. atrosepticum* УКМВ-1084^T, *D. chrysanthemi* УКМВ-1087^T і отримано фрагменти розміром 1526, 1520, 1581 н.п. Філогенетичний аналіз спорідненості нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК колекційних штамів «*Erwinia toxica*» та основних видів даного роду виявив значну спорідненість (98-99% ідентичності) з типовими штамми *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ICMP 5702, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* LMG 17566, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* NZEC1, які згідно сучасної таксономії вважають підвидами *P. carotovorum*. Також достатньо високий рівень ідентичності (97-98%) нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК колекційні штами «*Erwinia toxica*» виявляли із типовими представниками наступних видів: *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. wasabiae*, *P. aroidearum* (табл.1). Зокрема, колекційні штами «*Erwinia toxica*» мали значний рівень спорідненості (98%) нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК з наступними штамми: *P. wasabiae* CFBP 3304 (100 % штамів); *P. betavasculorum* ATCC 43762 (77,7% штамів); *P. atrosepticum* LMG 2386 (66,6% штамів) та *P. aroidearum* SCRI 109 (23,3% штамів). Слід відмітити, що О.П. Коробко з колегами зазначав подібність ряду ознак фенотипу збудника судинного бактеріозу огірків «*Erwinia toxica*» із представниками виду *Erwinia tracheiphila* [4]. Проведений нами аналіз спорідненості нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК свідчить про низький рівень ідентичності (94%) цього гена як у колекційних «*Erwinia toxica*» (табл.1), так і у ізольо-

ваних *Pectobacterium* sp. (табл.2) штамів з нуклеотидною послідовністю цього гена типового штаму *Erwinia tracheiphila* LMG 2906. Даний факт підтверджує генетичну віддаленість збудника судинного бактеріозу огірків «*Erwinia toxica*» від збудника бактеріального в'янення огірків *Erwinia tracheiphila*.

Таблиця 1

Спорідненість нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК колекційних штамів «*Erwinia toxica*», типового штаму *P. carotovorum* susp. *carotovorum* 1075^T та нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК типових штамів, що зберігаються у базі GenBank

Штам	Вид, штам і коди доступу до нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК типових штамів у базі GenBank	Ідентичність послідовностей, (%)*
« <i>Erwinia toxica</i> »8692, 8693, 8694, 8695, 8415, 8416, 8417, 8418, 8419, <i>P. carotovorum</i> susp. <i>carotovorum</i> 1075 ^T	<i>P. carotovorum</i> susp. <i>carotovorum</i> ICMP 5702, (NR 116047.1)	99
	<i>P. carotovorum</i> susp. <i>odoriferum</i> LMG 17566, (AJ223407)	98–99
	<i>P. carotovorum</i> susp. <i>brasiliensis</i> NZEC1(JQ771053.1)	98–99
	<i>P. atrosepticum</i> LMG 2386, (Z96090)	97–98
	<i>P. betavasculorum</i> ATCC 43762,(ECU80198)	97–98
	<i>P. wasabiae</i> CFBP 3304, (CU80199)	98
	<i>P. cacticida</i> LMG 17936-T, (AJ223409)	96–97
	<i>P. rhapontici</i> DSM 4484, (AJ233417)	96–97
	<i>P. aroidearum</i> SCRI 109, (JN600323)	97–98
	<i>Dickeya chysanthemi</i> DSM 4610, (AJ233412)	96–97
	<i>Pantoea cypripedii</i> DSM 3873, (AJ233413)	96
	<i>Erwinia tracheiphila</i> LMG 2906, (Y13250)	94

Примітка: *Тут і у табл.2 вказано діапазон ідентичності послідовностей гену 16S рРНК штамів при попарному їх порівнянні

Філогенетичний аналіз спорідненості нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК ізольованих штамів *Pectobacterium* sp. виявив аналогічну закономірність, відмічену нами раніше і у випадку колекційних штамів «*Erwinia toxica*» (табл.2).

Так, ізольовані нами штами *Pectobacterium* sp. мають високий рівень ідентичності (98-99%) даного гену з типовими штамми *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ICMP 5702, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* LMG 17566, *P. carotovorum* susp. *brasiliensis* NZEC1. Ізольовані нами штами *Pectobacterium* sp. також мають значний рівень генетичної спорідненості (97-98% ідентичності) із представниками видів *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. wasabiae*, *P. aroidearum* (табл.2). Зокрема, усі ізольовані штами *Pectobacterium* sp. мають значний рівень (98%) гомології нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК із типовим представником виду *P. wasabiae*, а 80% ізольованих штамів – аналогічний рівень гомології із типовими представниками видів *P. aroidearum* і *P. betavasculorum*. Натомість рівень спорідненості ізольованих штамів із типовими представниками видів *P. atrosepticum* і *P. cacticida* є лише 97%.

Спорідненість нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК ізольованих штамів *Pectobacterium* sp. та нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК типових штамів, що зберігаються у базі GenBank

Штам	Вид, штам і коди доступу до нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК типових штамів у базі GenBank	Ідентичність послідовностей, (%)*
<i>Pectobacterium</i> sp. 1ог., 2 ог., 3ог., 4ог., 5ог.	<i>P. carotovorum</i> susp. <i>carotovorum</i> ICMP 5702, (NR 116047.1)	99
	<i>P. carotovorum</i> susp. <i>odoriferum</i> LMG 17566, (AJ223407)	98–99
	<i>P. carotovorum</i> susp. <i>brasiliensis</i>	99
	<i>P. atrosepticum</i> LMG 2386, (Z96090)	97
	<i>P. betavasculorum</i> ATCC 43762, (ECU80198)	97–98
	<i>P. wasabiae</i> CFBP 3304, (CU80199)	98
	<i>P. cacticida</i> LMG 17936-T, (AJ223409)	97
	<i>P. rhapontici</i> DSM 4484, (AJ233417)	96
	<i>P. aroidearum</i> SCRI 109, (JN600323)	97–98
	<i>Dickeya chrysanthemi</i> DSM 4610, (AJ233412)	96–97
	<i>Pantoea cyripedii</i> DSM 3873, (AJ233413).	96
<i>Erwinia tracheiphila</i> LMG 2906, (Y13250)	94	

На підставі аналізу нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК колекційних штамів «*Erwinia toxica*» та ізольованих штамів *Pectobacterium* sp. з типовими видами роду *Pectobacterium* було побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків (рис.1).

Як видно з рис. 1., як колекційні, так і ізольовані штами утворили декілька кластерів, які містять у своєму складі типових представників *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Також до складу кластерів, утворених колекційними «*Erwinia toxica*» і ізольованими штамми *Pectobacterium* sp., увійшов включений нами у дослідження типовий штам *P. atrosepticum* УКМ В-1084^Т. Як видно з дендрограми (рис.1), група кластерів, утворена колекційними «*Erwinia toxica*» і ізольованими штамми *Pectobacterium* sp., значно споріднена із підвидами *odoriferum* і *brasiliensis* у складі виду *P. carotovorum* та видами *P. aroidearum*, *P. cacticida*. Натомість типові представники видів *P. wasabiae*, *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum* дещо дистанціюються від колекційних «*Erwinia toxica*» і ізольованих штамів *Pectobacterium* sp., що цілком підтверджує описані нами вище результати досліджень (табл.1, 2). Слід також відмітити, що обидві включені у дослідження нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК типового штаму *D. chrysanthemi* утворили окремий кластер, дистанційований від представників роду *Pectobacterium*. Також віддалено від колекційних «*Erwinia toxica*», ізольованих *Pectobacterium* sp. штамів та решти типових представників роду *Pectobacterium*, розташувалися на дендрограмі представники роду *Erwinia* та *Pantoea*.

Нуклеотидні послідовності штамів були задепоновані у GenBank під наступними номерами: *P. carotovorum* 1OG (MG890351); *P. carotovorum* 2OG (MG890352); *P. carotovorum* 3OG (MG890353); *P. carotovorum* 4OG (MG890354); *P. carotovorum* 5OG (MG890355); *P. carotovorum* 8415 (MG890356); *P. carotovorum* 8416 (MG890357); *P. carotovorum* 8417

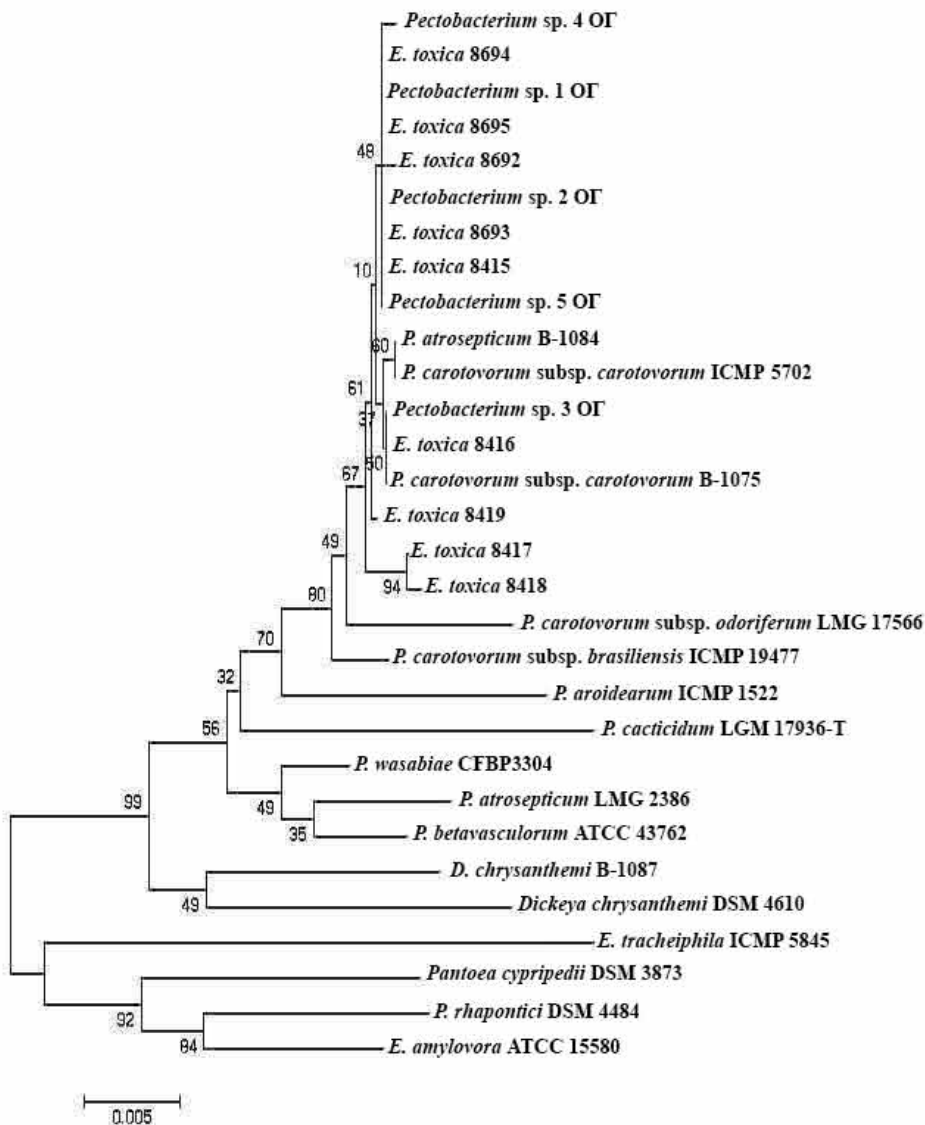


Рис.1. Дендрограма філогенетичних зв'язків між ізольованими штамами *Pectobacterium* sp., колекційними штамами «*Erwinia toxica*» та типовими представниками видів родів *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Dickeya* і *Pantoea*

(MG890358); *P. carotovorum* 8418 (MG890359); *P. carotovorum* 8419 (MG890363); *P. carotovorum* 8692 (MG890364); *P. carotovorum* 8693 (MG890365); *P. carotovorum* 8694 (MG890366); *P. carotovorum* 8695 (MG890367); *P. atrosepticum* UCM B-1084 (MG890362); *P. carotovorum* UCM B-1075 (MG890361), *D. chrysanthemi* UCM B-1087 (MG890360).

Обговорення. Як зазначалося раніше, наприкінці минулого століття на основі аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК рід *Erwinia* був розділений на декілька груп, що в свою чергу стало основою для включення частини видів даного роду до родів *Pectobacterium* і *Brenneria* [10]. Так, частина видів (*E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* sub-

sp. *odorifera*, *E. carotovora* subsp. *wasabiae*, *E. cacticida*, *E. chrysanthemi* і *E. cypripedii*) була віднесена до роду *Pectobacterium* [10]. В подальшому використання філогенетичного аналізу дало змогу провести рекласифікацію в середині даного роду. Зокрема, види *P. chrysanthemi* і *P. cypripedii* були віднесені до родів *Dickeya* і *Pantoea*, а підвиди *betavasculatorum*, *wasabiae* і *atroseptica*, що належали до виду *P. carotovorum*, виділені у окремі види [10, 11, 20, 21]. Процес рекласифікації триває постійно. Так, частина штамів, що викликають м'яке гниття та чорну ніжку картоплі (подібність симптомів із *P. atrosepticum*) сформували окремий підвид *brasiliensis* у складі виду *P. carotovorum* [20]. Крім того, нещодавно був описаний новий вид *P. aroidearum*, що викликає м'яке гниття однодольних рослин [21]. Також пропонується ввести новий підвид *actinidiae* до складу виду *P. carotovorum* [22]. Так, колектив авторів зазначає, що штами підвиду *actinidiae* споріднені за нуклеотидною послідовністю гена 16S рРНК із типовими представниками підвидів та видів роду *Pectobacterium* на 97,7–98,7% [22]. Слід відмітити, що ряд дослідників відмічають значну філогенетичну спорідненість типових представників як підвидів (*odorifera*, *brasiliensis*, *carotovorum*), що входять до складу виду *P. carotovorum*, так і окремих видів (*P. atrosepticum*, *P. betavasculatorum*, *P. wasabiae*), що раніше були підвидами у складі даного виду [20, 23]. Зокрема, колектив науковців при описі нового виду *P. aroidearum* відмітив значну спорідненість нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК штамів як з представниками підвидів виду *P. carotovorum*, так і з видами *P. atrosepticum*, *P. betavasculatorum*, *P. wasabiae* [20, 23]. Зазначені вище факти цілком узгоджуються з отриманими нами результатами і підтверджують думку про необхідність поліфазного аналізу для коректної таксономії досліджуваних штамів збудників гниття та в'янення огірків. Крім того, попередньо нами було перевірено комплекс ознак фенотипу колекційних «*Erwinia toxica*» і ізольованих *Pectobacterium* sp. штамів із типовими представниками виду *P. carotovorum*. Зокрема, за патогенними, морфолого-культуральними, фізіологічними, біохімічними властивостями та жирнокислотним складом клітинних ліпідів дана група штамів споріднена зі штамами *Pectobacterium carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В-1075^T і *Pectobacterium atrosepticum* УКМВ-1084^T та віддалена від *Dickeya chrysanthemi* УКМВ-1087^T (неопубліковані дані). Також нами був проведений аналіз REP, BOX та ERIC профілів колекційних «*Erwinia toxica*» і ізольованих *Pectobacterium* sp. штамів, що одночасно виявив значну їх віддаленість від аналогічних профілів *Pectobacterium atrosepticum* УКМВ-1084^T і *Dickeya chrysanthemi* УКМВ-1087^T та спорідненість з аналогічними профілями типового штаму *Pectobacterium carotovorum* susp. *carotovorum* УКМ В-1075^T [15].

Отже, за результатами філогенетичного аналізу встановлено значну спорідненість (98-99% ідентичності) як колекційних «*Erwinia toxica*», так і ізольованих *Pectobacterium* sp. штамів із типовими штамами *P. carotovorum* susp. *carotovorum* ICMP 5702, *P. carotovorum* susp. *odoriferum* LMG 17566, *P. carotovorum* susp. *brasiliensis* NZEC1. Значний рівень гомології нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК колекційних штамів «*Erwinia toxica*» з типовими представниками роду *Pectobacterium* наводить на думку про неправомірність існування даного виду.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЯГКОГО ГНИЕНИЯ И УВЯДАНИЯ ОГУРЦОВ В УКРАИНЕ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА 16S рРНК

Л.А. Данкевич

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

Резюме

Цель. Проанализировать родство нуклеотидных последовательностей гена 16SpРНК 5 изолированных штаммов *Pectobacterium* sp. и 9 коллекционных штаммов «*Erwinia toxica*», а также типовых представителей родов *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Dickeya* для корректной идентификации данных штаммов на уровне вида. **Материалы и методы.** Объекты – 5 штаммов *Pectobacterium* sp., изолированных из пораженных растений огурцов, и 9 коллекционных штаммов «*Erwinia toxica*». Ген 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров рА и рН. Построение комплементарной последовательности, редактирование и выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программ Multalin и Sequence Manipulation Suite. Поиск нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, родственных с исследуемыми, в GenBank проводили с помощью программы BLASTN. Для построения дендрограммы филогенетических связей применяли программу MEGA5. **Результаты.** Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК установил высокий уровень идентичности (98-99%) исследуемых штаммов со следующими типовыми штаммами *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ICMP 5702, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* LMG 17566, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* NZEC1. Исследуемые штаммы также имеют значительный уровень филогенетического родства (97-98% идентичности нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК) с представителями видов *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. wasabiae*, *P. aroidearum*. **Выводы.** Значительный уровень идентичности нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (98-99%) коллекционных штаммов «*Erwinia toxica*» и изолированных нами штаммов *Pectobacterium* sp. с отдельными типовыми представителями рода *Pectobacterium* наводит на мысль о неправомерности выделения «*Erwinia toxica*» в отдельную таксономическую единицу и возможную принадлежность данной группы штаммов к уже известным видам. Поскольку по данным литературы указанные выше подвиды и виды близкородственны и плохо дифференцируются по гомологии нуклеотидных последовательностей гена 16SpРНК, то для окончательной видовой идентификации исследуемых нами штаммов необходимо изучить другие генотипические признаки.

Ключевые слова: *Pectobacterium* sp., «*Erwinia toxica*», род *Pectobacterium*, ген 16SpРНК.

THE IDENTIFICATION OF AGENTS OF CUCUMBER SOFT ROT AND WILTING IN UKRAINE BASED ON 16S rRNA GENE SEQUENCING ANALYSIS

L.A. Dankevych

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

Summary

Aim. To determine the 16SrRNA gene nucleotide sequences of 5 isolated *Pectobacterium* sp. and 9 collection «*Erwinia toxica*» strains with typical members of genera *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Dickeya* to be identified correctly at the species level. **Materials and methods.** Objects – 5 isolated from diseased cucumbers plants *Pectobacterium* sp. strains and 9 “*Erwinia toxica*” collection strains. The 16S rRNA gene was amplified using universal pA and pH primers. Building a complementary sequence and alignment sequence was performed using the Multalin and Sequence Manipulation Suite software. The search of 16S rRNA nucleotide similar sequences of gene, that were placed and deposited in GenBank, was performed using the BLASTN program. The phylogenetic trees constructing was performed using MEGA5 program. **Results.** Nucleotide sequence analysis of the 16S rRNA gene revealed a high level of identity (99-98%) of the researched strains with the following typical strains *P. carotovorum* susp. *carotovorum* ICMP 5702, *P. carotovorum* susp. *odoriferum* LMG 17566, *P. carotovorum* susp. *brasiliensis* NZEC1. Also a significant level of strains phylogenetic similarity (97-98% of 16S rRNA gene sequences identity) with members of the species *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. wasabiae*, *P. aroidearum* has researched. **Conclusion.** A significant level identity of 16S rRNA gene nucleotide sequences (98-99%) of collection “*Erwinia toxica*” and isolated by our team the *Pectobacterium* sp. strains with typical representatives of the *Pectobacterium* genus can suggest that the existence of a separate “*Erwinia toxica*” species is inappropriate, and also the possible belonging of this group to existing species. Since, according to the literature, the subspecies mentioned above are closely related species and poorly differentiated by homology of the 16SpPHK gene nucleotide sequences. Probably, for the final identification at the species level of the strains, studied by us, there is necessary to research other genotypic properties.

Keywords: *Pectobacterium* sp., «*Erwinia toxica*», genus *Pectobacterium*, 16SpPHK gene.

1. Ahatov AK, Hannibal F B, Meshkov Yu I et al. [Diseases and pests of vegetable crops and potatoes]. In: Sci. KMK publications. Moscow; 2013. Russian.
2. Bublik LI, Vasechko GI, Vasiliev VP et al. [Plant protection guide; Ed. M. Plisovy]. In: Harvest. Kyiv; 1999. Ukrainian.
3. Gvozdnyak RI, Pasichnik LA, Yakovleva LM, Moroz SM, Litvinchuk OO, Zhytkovich NV, Hodos SF, Butsenko LM, Dankevich LA, Grinick IV, Patyka VP. [Phytopathogenic bacteria. Bacterial diseases of plants]. In: LLC «NVP» Interservice. Kiev; 2011. Ukrainian.

4. Korobko AP. [Biology of pathogens of bacterial cucumbers in the USSR]. Author's abstract. Dis. Kand. biol. sciens: 03.00.07 / Zabolotny Int. Microbiology and virology. Kiev: 1973. Russian.
5. Rosenzweig N, Steere L, Kirk WW, Mambetova S, Long C, Schafer R, Dangi S, Byrne J. First report of *Dickeya dianthicola* and *Pectobacterium wasabiae* causing aerial stem rot of potato in Michigan, USA. New Dis. Rep. 2016; 33: 10.
6. Mikicinski A, Sobiczewski P, Sulikowska M, Pulawska J, Treder J. Pectolytic Bacteria Associated with Soft Rot of Calla Lily (*Zantedeschia* spp.) tubers. J. Phytopathol. 2016; 158: 201-209.
7. Wayne LC, Brennez DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Murray GE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 1987; 37(4): 463-464.
8. Romanovskaya VA, Rokitko PV, Shilin SO. [Actual problems of the phylogenetic classification of bacteria]. Mikrobiol Z. 2003; 65(5): 46-66. Russian.
9. Skrypal IG. [Descriptions of prokaryotic species: problem, requirements, solutions]. Mikrobiol Z. 2005; 67(6): 3-11. Ukrainian.
10. Hauben L, Moore ERB, Vautering L, Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., Swings J. Phylogenetic position of Phytopathogens within the Enterobacteriaceae. J Syst Appl Microbiol. 1998; 21(3):384-397.
11. Brady CL, Cleenwerck I, Venter SN, Engelbeen K, De Vos Pand Coutinho T A. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60: 2430-2440.
12. Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wassabiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53:381-391.
13. List of prokaryotic names with standing in nomenclature /www.bacterio.net/ pectobacterium.html
14. Bull CT, De Boer SH, Denny TP, Firrao G, Fischer-Le SM, Saddler GS, Scortichini M, Stead DE, Takikawa Y. Letter to the editor. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria. J Plant Pathol. 2010; 92(3):551-592.
15. Dankevych LA. [REP-PCR analysis of single agent of cucumber bacterial diseases]. Bulletin of Vavilov Society of Genetics and Breeders of Ukraine. 2017; 15(1): 25-31. Ukrainian.
16. Ulrike E, Till R, Blocker H, et all. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucl. Acids Res. 1989; 17(19): 7843-7853.
17. Marchuk D, Drumm M, Saulino A, et all. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR product. Nucl. Acid Res. 1990; 19(5): 1154-1155.

18. Sambrook J, Fritch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. In: Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28: 2731-2739.
20. Nahan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. *J Appl Environ Microbiol.* 2012;113:904-913.
21. Nabhan Sh., De Boer Solke H., Maiss E., Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; 63: 2520-2525.
22. Koh YJ, Kim GH, Lee YS, Sohn SH, Koh HS, Kwong S., Heu S, Jung JS *Pectobacterium carotovorum* subsp. nov., a new bacterial pathogen causing canker-like symptoms in yellow kiwifruit, *Actinidia chinensis*. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 2012;40(4):269-279.
23. Dadaşoğlu F, Kotan R. Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum*. *J Anim Plant Sci.* 2017; 27(2):647-654.

Отримано 3.07.2017