

ЛЕСОЗАЩИТА И САДОВО-ПАРКОВОЕ СТРОИТЕЛЬСТВО FOREST PROTECTION AND LANDSCAPING

УДК 577.212:632.4

Л. О. Иващенко^{1,2}, О. Ю. Баранов^{1,3}

¹Белорусский государственный технологический университет

²Институт леса Национальной академии наук Беларуси

³Национальная академия наук Республики Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА INA-БАКТЕРИЙ В СЕЯНЦАХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ПОЛЕГАНИИ

Бактерии, активно образующие ледяное ядро, или льдонуклеирующие (INA), являются как эпифитными, так и эндофитными обитателями, вызывающими морозные повреждения многих растений при низкоположительных температурах. На сегодняшний день информация об их участии в формировании патофизиологических процессов в растениях является разрозненной и неполной. Одним из важных этапов в определении вредоносности INA-бактерий является их идентификация в растительных образцах. В данной статье изложены результаты определения информативности специфических праймеров, позволяющих осуществлять диагностику льдонуклеирующих бактерий как в образцах окружающей среды, так и на поверхности, и внутри сельскохозяйственных и лесных растений на основании амплификации гена *ina*, кодирующего белок образования льда (INP). Проведенные исследования с использованием растительных образцов в виде проростков сосны обыкновенной, характеризующихся признаками инфекционного полегания, показали наличие гена *ina* в экспериментальном материале.

Ключевые слова: льдонуклеирующая бактерия, инфекционное полегание, ген *ina*, образование льда, *Pseudomonas syringae*.

Для цитирования: Иващенко Л. О., Баранов О. Ю. Молекулярно-генетическая диагностика INA-бактерий в сеянцах сосны обыкновенной при инфекционном полегании // Труды БГТУ. Сер. 1, Лесное хоз-во, природопользование и перераб. возобновляемых ресурсов. 2024. № 1 (276). С. 82–86. DOI: 10.52065/2519-402X-2024-276-10.

L. O. Ivashchenko^{1,2}, O. Yu. Baranov^{1,3}

¹Belarusian State Technological University

²Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus

³National Academy of Sciences of the Republic of Belarus

MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTICS OF INA BACTERIA IN SCOTS PINE SEEDLINGS WITH INFECTIOUS LODGING

Bacteria that actively form ice nuclei, or ice nucleating bacteria (INA), are both epiphytic and endophytic inhabitants, causing frost damage to many plants at low positive temperatures. To date, information about their participation in the development of pathophysiological processes in plants is scattered and incomplete. One of the important stages in determining the competitiveness of INA bacteria is their identification in plant samples. This article presents the results of determining the information content of typical primers capable of diagnosing ice-nucleating bacteria both in generations of the current environment and on the surface and inside agricultural and forest plants based on amplification of the gene *ina* encoding the ice formation protein (INP). Conducted studies using plant samples in the form of Scots pine seedlings, features of the components of the infectious lodging, the presence of the gene *ina* the experimental material.

Keywords: ice nucleation bacteria, infectious lodging, *ina* gene, ice formation, *Pseudomonas syringae*.

For citation: Ivashchenko L. O., Baranov O. Yu. Molecular genetic diagnostics of INA bacteria in Scots pine seedlings with infectious lodging. *Proceedings of BSTU, issue 1, Forestry. Nature Management. Processing of Renewable Resources*, 2024, no. 1 (276), pp. 82–86 (In Russian). DOI: 10.52065/2519-402X-2024-276-10.

Введение. Льдонуклеирующие активные (INA) бактерии представляют собой группу бактерий, способных катализировать образование льда при низкотемпературных температурах [1]. Такую способность обеспечивают специализированные белки, закрепленные на внешней клеточной мембране бактерий [2]. INA-бактерии обычно являются грамотрицательными, эпифитными или фитопатогенными и в зависимости от уровня активности льдообразования подразделяются на три класса: А (активны при температуре до $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$), В (от -5 до $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$) и С (ниже $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$) [2, 3].

Большое количество INA-бактерий присутствует на растениях и сельскохозяйственных культурах, но они также были выделены из объектов окружающей среды, в том числе облаков, дождя, снега и воздуха [3]. Из-за повсеместного распространения INA-бактерий на растениях и высокой активности образования кристаллов льда данная группа микроорганизмов может выступать значимым биотическим фактором повреждения растений [4].

Также INA-бактерии, в частности *Pseudomonas syringae* Van Hall, приобрели научный интерес из-за широкого спектра способов применения – создание снега, приготовление замороженных продуктов, разработка систем отогревания поверхности бактерий (экспрессия чужеродного белка на поверхности клеток в биотехнологических целях), а также криоконсервации клеток и тканей [5].

В свою очередь, распространяясь как межклеточно, так и внутриклеточно в чувствительных к холоду растениях, лед вызывает механическое разрушение клеточных мембран. Такие повреждения могут быть существенными для некоторых растений, вызывая угнетение процессов роста и развития. Следует отметить, что некоторым INA-бактериям нужна определенная плотность популяции или особые условия, чтобы нанести ущерб растению или проявить свою патогенность [6].

Известно, что генетической основой нуклеации льда у бактерий является ген *ina*, который одновременно необходим и достаточен для фенотипа образования льда INA⁺ [1]. На сегодняшний день идентифицировано около 12 видов льдонуклеирующих бактерий, выделенных в основном с поверхности растений. Они распространены среди трех отрядов Gammaproteobacteria и включают *P. syringae*, *P. fluorescens* Migula, *Pantoea agglomerans* Ewing & Fife и *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. Все эти бактерии экспрессируют изоформы одного и того же белка INP, которые при связывании во внешней мембране могут запускать нуклеацию при температуре около 0°C . Обычно верхний предел составляет от -2 до -4°C [5]. К настоящему моменту

были клонированы и секвенированы следующие гены *ina*: *inaZ*, *inaK*, *inaV* и *inaQ* у *P. syringae*, *inaW* – у *P. fluorescens*, *inaE* – у *Erwinia herbicola* Ewing & Fife, *inaA* – у *E. ananas* Serrano и *inaX* – у *X. campestris* pv. *translucens* [1].

Наиболее изученной в настоящий момент является бактерия *P. syringae*, которая, как и другие льдообразующие бактерии, была обнаружена во льду, граде и снеге, что свидетельствует о ее способности к содействию процессам кристаллизации паров воды в атмосфере [2]. Как фитопатоген, *P. syringae* усиливает повреждение тканей растений низкими температурами за счет повышения температуры инициации образования льда [2].

Так, Маки Л. Р. с соавторами обнаружили, что по мере увеличения концентрации клеток *P. syringae* температура, при которой происходило замерзание растения, становилась выше [7]. Арни Д. с соавторами показали, что восприимчивость кукурузы к заморозкам повышалась после обработки листьев *P. syringae* [8]. Согласно Линдоу С. Е. и соавторам было обнаружено, что *P. syringae* и другие эпифитные бактерии вызывают повреждение от заморозков у многих видов растений и сельскохозяйственных культур [9].

Если говорить о древесных растениях, то в работе Рамштед М. с соавторами выяснили, что *P. syringae* также является одной из важных INA-бактерий на ивах (*Salix*), вызывающей некротическую инфекцию и отмирание при температуре окружающей среды около 0°C . В более поздних работах было показано, что различные комбинации (консорциумы) INA-бактерий, включая виды рода *Erwinia*, *P. fluorescens* и другие виды *Pseudomonas*, *Sphingomonas* и *Xanthomonas*, также связаны с такими повреждениями у ив [6].

Как было представлено ранее, в некоторых случаях присутствие льдообразующих бактерий в растениях приводит к открытию пути для атаки других болезнетворных организмов, в частности фитопатогенных грибов [10]. Так, рядом авторов было высказано предположение, что первопричиной инфекционного полегания сеянцев сосны обыкновенной в лесных питомниках, возбудителями которого в настоящее время признаны микромицеты *Fusarium* spp. и *Rhizoctonia* spp., являются INA-бактерии, приводящие к увяданию молодых растений путем повреждения клеточных мембран.

Следует отметить, что льдонуклеирующая активность также была выявлена у грибов – впервые в штаммах рода *Fusarium* [11]. На сегодняшний день известно еще несколько видов грибов с различной начальной температурой замерзания – *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. (примерно -4°C), *Mortierella alpina* Peyronel (около -5°C), виды рода *Puccinia* (от -4 до -8°C) и

Sarocladium implicatum (Gilman & Abbott) Giraldo, Gen & Guarro (приблизительно -9°C) [11].

Молекулярно-генетическая диагностика культивируемых и некультивируемых INA-бактерий основана на выявлении гена *ina*. Однако обнаружение маркерного гена не означает, что эти микроорганизмы являются эффективными льдообразователями, поскольку формирование фенотипа INA+ зависит от сложных и взаимодействующих факторов, таких как генотип, окружающая среда и виды растений-хозяев [5].

Эффективность ПЦР-амплификации фрагментов гена *ina* в первую очередь зависит от дизайна праймеров – они должны амплифицировать как можно больше аллелей гена с высокой специфичностью и чувствительностью [1]. Так, в работе Хилла Т. С. с соавторами были впервые разработаны универсальные праймеры для генов широкого спектра действия, которые были использованы при проведении ПЦР с целью количественного определения INA-бактерий на растениях, в снегу и граде (таблица). В результате проведения исследований *in vitro* авторы выявили наиболее эффективные пары праймеров – 3308f/3463r и 3341fb/3462rl, размер продукта которых составил 194 и 162 п. н. соответственно [5].

Праймеры, используемые для амплификации гена *ina* у бактерий (по Хиллу Т. С. и др.)

Праймер	Последовательность праймера (5'–3')
3076f	AGYTCGCTGATTGCGGGNC
3463r	STGTAVCKTTTTNCCGTCCCA
3308f	GGCGATMGVAGCAAactsac
3341fb	AHTGTRYBYTSATGGCBGGVGA
3462rl	TGTAVCKTTTTSCCGTCCCAG

Основная часть. Целью данной работы являлась ПЦР-амплификация гена *ina* в образцах растительных тканей проростков сосны обыкновенной, характеризующихся признаками инфекционного полегания, для последующего установления роли этих бактерий в возникновении и протекании данного патологического процесса.

На первом этапе исследований с использованием праймеров, представленных в таблице, были амплифицированы два INA+-штамма бактерий *Xanthomonas campestris* и *P. syringae* с целью установления диагностической пригодности синтезированных олигонуклеотидных последовательностей. На рис. 1 представлена электрофореграмма, отражающая результаты амплификации этих бактерий с 3 парами праймеров.

Как видно из рис. 1, в образцах 2, 3, 5, 6 были получены продукты амплификации размером примерно 194 и 162 п. н., что указывает на пригодность пар праймеров 3308f/3463r и 3341fb/3462rl для проведения ПЦР-амплификации. Для целей

диагностики *in planta* нами была выбрана пара 3308f/3463r, позволяющая получать наиболее четкие продукты амплификации.

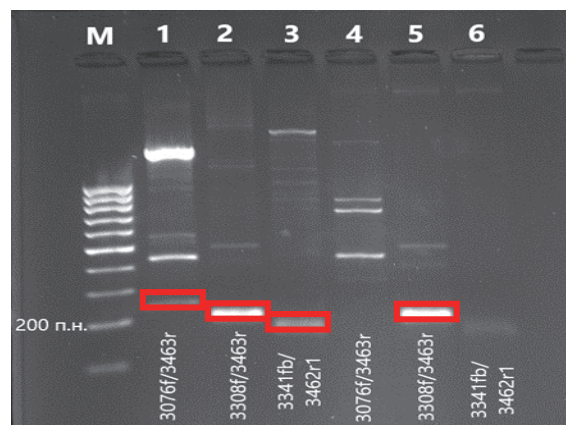


Рис. 1. Электрофореграмма амплификации бактерий *P. syringae* (1–3) и *X. campestris* (4–6):
М – маркер молекулярного веса

В ходе исследований были амплифицированы образцы ДНК инфицированных растительных тканей, искусственно зараженных фитопатогенными грибами *Fusarium oxysporum* Schldl. и *Rhizoctonia solani* Kuhn (возбудители инфекционного полегания) сеянцев сосны обыкновенной и сеянцев, собранных в очаге инфекционного полегания на территории лесного питомника Хойникского лесхоза (время сбора: июнь 2023 г.). На рис. 2 представлены результаты ПЦР данных образцов.

Как видно из рис. 2, в образцах растений были диагностированы продукты амплификации гена *ina*.

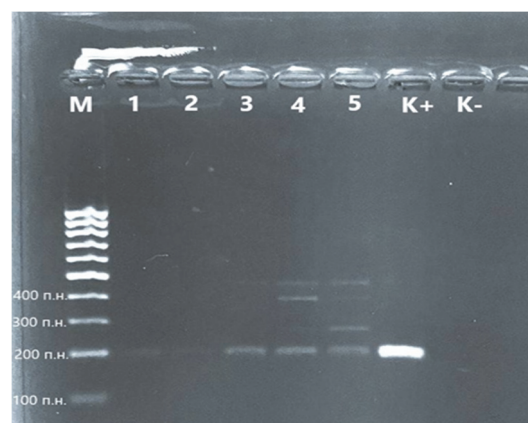


Рис. 2. Электрофореграмма амплификации инфицированных растительных тканей:
М – маркер молекулярного веса; 1–2 – образцы сеянцев, собранные на лесном питомнике;
3–5 – искусственно зараженные сеянцы;
K+ – положительный контроль; K- – отрицательный контроль

На втором этапе нами был произведен посев семян сосны обыкновенной в почву, собранную

на лесных питомниках Чечерского и Дисненского лесхозов в местах протекания инфекционного полегания семян в мае–июне 2023 г. Семена проращивались в контролируемых условиях при температуре 22°C и относительной влажности воздуха 60%. После прорастания семян для них искусственно были созданы условия околонулевых температур – контейнеры с проростками помещались на несколько дней в холодильник и содержались при температуре 4°C [12]. После появления симптомов полегания (истончение и побурение стебелька, у большинства семян верхинки остались в семенных колпачках из-за ослабления тургора в растениях) сеянцы изымали из почвы для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

Для выявления последовательности гена *ina* образцы амплифицировали с помощью праймеров 3308f и 3463r [6] с использованием следующей программы ПЦР: начальная стадия денатурации при 95°C в течение 4 мин с последующими 35 циклами – денатурация при 94°C 30 с, отжиг праймеров при 58°C 30 с и элонгация при 72°C 1 мин с финальной элонгацией при температуре 72°C в течение 5 мин.

В качестве положительного контроля нами был использован INA+–штамм *P. syringae*, отрицательный контроль представлял собой амплифицируемую смесь с деионизированной водой. Также для наглядности получаемых данных дополнительно были амплифицированы образцы семян сосны, характеризующиеся признаками инфекционного полегания, собранные в июне 2023 г. (на рис. 2 образцы № 1 и 2). Результаты ПЦР представлены на рис. 3.

Исходя из рис. 3 можно сделать вывод, что во всех образцах, за исключением образца № 4ч,

наблюдается наличие специфических продуктов ПЦР-амплификации размером примерно 200 п. н. Это свидетельствует о наличии бактерий с геном *ina* в экспериментальном материале.

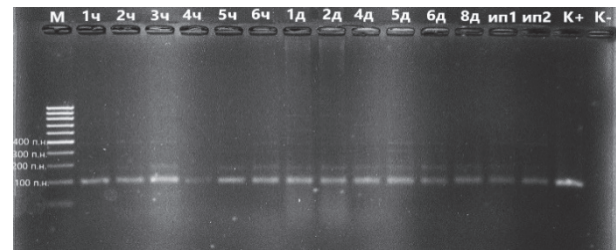


Рис. 3. Результаты амплифицирования проростков сосны, характеризующихся симптомами инфекционного полегания:

М – маркер молекулярного веса; 1ч–6ч – образцы проростков сосны на почве из Чечерского лесхоза; 1д–2д, 4д–6д, 8д – образцы проростков сосны на почве из Дисненского лесхоза; ип1, ип2 – образцы инфекционного полегания из Хойникского лесхоза; K+ – положительный контроль (бактерия *P. syringae*); K– – отрицательный контроль

Заклучение. Таким образом, в результате исследований нами проведены тесты *in vitro* по выявлению INA-бактерий в образцах сосны обыкновенной, характеризующихся признаками инфекционного полегания. Как видно на рис. 3, в 11 из 12 экспериментальных проб было выявлено наличие бактерий, которые обладают льдонуклеирующей способностью. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что на начальной стадии протекания инфекционного полегания в ослаблении молодых растений сосны могут принимать участие INA-бактерии.

Список литературы

1. Waturangi D. E., Tjhen A. Isolation, characterization, and genetic diversity of ice nucleation active bacteria on various plants // HAYATI Journal of Biosciences, 2009. Vol. 16 (2). P. 54–58.
2. Toward understanding bacterial ice nucleation / M. Lukas [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. 2022. Vol. 126 (9). P. 1861–1867.
3. Prevalence and characterization of Ice Nucleation Active (INA) bacteria from rainwater in Indonesia / V. Khosasih [et al.] // BMC microbiology. 2022. Vol. 22 (1). P. 116–127.
4. Biochemical characterization and identification of ice-nucleation-active (INA) willow pathogens by means of BIOLOG® MicroPlate, INA gene primers and PCR-based 16S rRNA-gene analyses / P. Nejad [et al.] // Journal of Plant Diseases and Protection. 2006. Vol. 113 (3). P. 97–106.
5. Measurement of ice nucleation-active bacteria on plants and in precipitation by quantitative PCR / T. C. J. Hill [et al.] // Applied and environmental microbiology. 2014. Vol. 80 (4). P. 1256–1267.
6. Nejad P., Ramstedt M. Presence of quorum-sensing-mediated gene regulation in pathogenic ice-nucleation-active (INA) bacteria // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006. Vol. 22. P. 1373–1375.
7. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae* / L. R. Maki [et al.] // Appl. Microbiol. 1974. Vol. 28. P. 456–459.
8. Army D. C., Lindow S. E., Upper C. D. Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae* // Nature. 1976. Vol. 262. P. 282–284.
9. Molecular characterization of an ice nucleation protein variant (*inaQ*) from *Pseudomonas syringae* and the analysis of its transmembrane transport activity in *Escherichia coli* / Q. Li [et al.] // International journal of biological sciences. 2012. Vol. 8 (8). P. 1097–1108.
10. Evaluation of Ice Nucleation Activity (INA) and INA Gene Detection in the Bacteria Isolated from Pistachio Trees in Kerman Province, Iran / M. Rostami [et al.] // Journal of Nuts. 2018. Vol. 9 (2). P. 147–157.

11. Highly active and stable fungal ice nuclei are widespread among *Fusarium* species / A. T. Kunert [et al.] // *Biogeosciences*. 2019. Vol. 16 (23). P. 4647–4659.
12. Идентификация и функциональная аннотация патоген-индуцированных генов проростков сосны обыкновенной / Л. В. Можаровская [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. 2019. № 27. С. 70–79.

References

1. Waturangi D. E., Tjhen A. Isolation, characterization, and genetic diversity of ice nucleation active bacteria on various plants. *HAYATI Journal of Biosciences*, 2009, vol. 16 (2), pp. 54–58.
2. Lukas M., Schwidetzky R., Eufemio R. J., Bonn M., Meister K. Toward understanding bacterial ice nucleation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2022, vol. 126 (9), pp. 1861–1867.
3. Khosasih V., Prasetyo N., Sudianto E., Waturangi D. E. Prevalence and characterization of Ice Nucleation Active (INA) bacteria from rainwater in Indonesia. *BMC microbiology*, 2022, vol. 22 (1), pp. 116–127.
4. Nejad P., Ramstedt M., Granhall U., Roos S., McIvor I. Biochemical characterization and identification of ice-nucleation-active (INA) willow pathogens by means of BIOLOG® MicroPlate, INA gene primers and PCR-based 16S rRNA-gene analyses. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2006, vol. 113 (3), pp. 97–106.
5. Hill T. C. J., Moffett B. F., DeMott P. J., Georgakopoulos D. G., Stump W. L., Franc G. D. Measurement of ice nucleation-active bacteria on plants and in precipitation by quantitative PCR. *Applied and environmental microbiology*, 2014, vol. 80 (4), pp. 1256–1267.
6. Nejad P., Ramstedt M. Presence of quorum-sensing-mediated gene regulation in pathogenic ice-nucleation-active (INA) bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 22, pp. 1373–1375.
7. Maki L. R., Galyon E. L., Chang C. M., Galdwell D. R. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol.*, 1974, vol. 28, pp. 456–459.
8. Arny D. C., Lindow S. E., Upper C. D. Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature*, 1976, vol. 262, pp. 282–284.
9. Li Q., Yan Q., Chen J., He Y., Wang J., Zhang H., Li L. Molecular characterization of an ice nucleation protein variant (*inaQ*) from *Pseudomonas syringae* and the analysis of its transmembrane transport activity in *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences*, 2012, vol. 8 (8), pp. 1097–1108.
10. Rostami M., Hasanzadeh N., Khodaygan P., Riahi Madvar A. Evaluation of Ice Nucleation Activity (INA) and INA Gene Detection in the Bacteria Isolated from Pistachio Trees in Kerman Province, Iran. *Journal of Nuts*, 2018, vol. 9 (2), pp. 147–157.
11. Kunert A. T., Pohlker M. L., Krevert C. S., Wieder C., Speth K. R., Hanson L. E., Frohlich-Nowoisky J. Highly active and stable fungal ice nuclei are widespread among *Fusarium* species. *Biogeosciences*, 2019, vol. 16 (23), pp. 4647–4659.
12. Mozharovskaya L. V., Panteleev S. V., Baranov O. Yu., Padutov V. E. Identification and functional annotation of pathogen-induced genes in Scots pine seedlings. *Molekularnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and Applied Genetics], 2019, no. 27, pp. 70–79 (In Russian).

Информация об авторах

Иващенко Любовь Олеговна – младший научный сотрудник кафедры лесозащиты и древесиноведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь); соискатель по специальности «Лесные культуры, селекция и семеноводство» Институт леса НАН Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: lyba281997@mail.ru

Баранов Олег Юрьевич – доктор биологических наук, доцент, академик-секретарь отделения биологических наук. Национальная академия наук Беларуси (220072, г. Минск, пр-т Независимости, 66, Республика Беларусь); профессор кафедры лесозащиты и древесиноведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru

Information about the authors

Ivashchenko Lyubov Olegovna – Junior Researcher, the Department of Forest Protection and Wood Science. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus); external doctorate student in the specialty “Forest crops, selection and seed production”. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: lyba281997@mail.ru

Baranov Oleg Yurievich – DSc (Biological), Associate Professor, Academician-Secretary, the Department of Biological Sciences. National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus); Professor, the Department of Forest Protection and Wood Science. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru

Поступила 10.10.2023