

## РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЛЕСНЫХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД БЕЛАРУСИ МЕТОДОМ ПЦР

<sup>1,2</sup>Ивашченко Л.О., <sup>2</sup>Пантелеев С.В., <sup>4</sup>Гродецкая Т.А., <sup>3</sup>Анисова Ж.М., <sup>1,3</sup>Баранов О.Ю.

<sup>1</sup>БГТУ (г. Минск, Республика Беларусь)

<sup>2</sup>Институт леса НАН Беларуси (г. Гомель, Республика Беларусь)

<sup>3</sup>Национальная академия наук Беларуси (г. Минск, Республика Беларусь)

<sup>4</sup>ВГЛТУ им. Г. Ф. Морозова (г. Воронеж, Российская Федерация)

*В ходе проведенного исследования были разработаны специфические праймеры для идентификации 20 видов из 12 родов фитопатогенных бактерий, ассоциированных с инфекционными заболеваниями семи лесообразующих пород Беларуси (сосна, ель, дуб, береза, ольха, ясень, осина). Проведены исследования *in vitro* по изучению эффективности диагностики маркерных локусов *rpoB*, *tuf* и *coI* с использованием чистых культур бактерий, инфицированных и здоровых растительных тканей древесных пород. Результаты показали, что из трех пар разработанных олигонуклеотидов (*bacRPOb*, *bacCOI*, *bacTUF*) одна пара (*bacTUF*) оказалась подходящей для выявления фитобактерий в растительных образцах. В ходе ПЦР с праймерами *bacTUF* отмечалась положительная амплификация бактериальной ДНК в образцах чистых культур и инфицированных растительных тканях. При этом кросс-амплификация с растительной ДНК не наблюдалась.*

**Ключевые слова:** ДНК-маркеры, ПЦР, праймеры, полиморфизм, лесные древесные растения, бактерии

## DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF PRIMERS FOR DIAGNOSTICS OF BACTERIAL INFECTIONS OF FOREST TREE SPECIES OF BELARUS BY PCR METHOD

Ivashchenko L.O., Panteleev S.V., Grodetskaia, T.A., Anisova Zh.M., Baranov O.Yu.

*In the course of the study, specific primers were developed to identify 20 species of phytopathogenic bacteria from 12 genera associated with infectious diseases of seven forest-forming species of Belarus (pine, spruce, oak, birch, alder, ash, aspen). In vitro studies were carried out to study the effectiveness of diagnosing marker loci *rpoB*, *tuf* and *coI* using pure cultures of bacteria, infected and healthy plant tissues of tree species. The results showed that of the three pairs of oligonucleotides developed (*bacRPOb*, *bacCOI*, *bacTUF*), one pair (*bacTUF*) was suitable for the detection of phytobacteria in plant samples. During PCR with *bacTUF* primers, positive amplification of bacterial DNA was noted in samples of pure cultures and infected plant tissues. However, cross-amplification with plant DNA was not observed.*

**Keywords:** *DNA markers, PCR, primers, polymorphism, forest tree species, bacteria*

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из значимых биотических факторов, оказывающих негативное влияние на продуктивность и устойчивость лесных насаждений, являются инфекционные заболевания, вызываемые как отдельными видами фитопатогенных организмов, так и их комплексами. За последние десятилетия, на фоне глобальных климатических изменений, особую актуальность приобрели бактериальные инфекции растений, обусловившие ухудшение фитосанитарного состояния лесных насаждений в различных странах.

Так, например, в Великобритании с 2006 года в дубовых насаждениях наблюдаются патологические процессы, обозначаемые как «резкое усыхание дуба», или Acute Oak Decline (AOD). Среди основных биотических факторов, ассоциированных с AOD, в настоящее время наибольшую значимость отводят бактериальному комплексу с доминированием четырех патогенных видов микроорганизмов: *Brenneria goodwinii* Denman et al., *Gibbsiella quercinecans* Brady et al., *Rahnella victoriana* Brady et al. и *Lonsdalea quercina* (Hildebrand and Schroth) Brady et al. emend. Li et al. Биологическим вектором распространения возбудителей заболевания является узкобрюх (*Agilus biguttatus* Fabricius) – вид жуков-фитофагов из семейства златок [1]. За последнее десятилетие симптомы данного заболевания также отмечены в дубовых насаждениях Австрии, Бельгии, Германии, Испании, Италии, Нидерландов, Польши и Франции.

В настоящее время молекулярно-генетическая идентификация бактериальных видов проводится на основании анализа результатов секвенирования ряда генов первичного метаболизма, которые диагностированы у всех известных таксономических групп микроорганизмов. Среди наиболее используемых диагностических ДНК-маркеров можно выделить фрагменты генов, кодирующих 16S рРНК, 23S рРНК,  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы (RPOB),  $\beta$ -субъединицу ДНК-гиразы (GYRB), белок-шаперон GROEL, репарационный белок RECA, и межгенного спейсера 16S-23S рРНК [2]. При этом, в протоколах анализа, как правило, применяются универсальные олигонуклеотидные последовательности, комплементарные консервативным областям, фланкирующих маркерные локусы. Альтернативным направлением диагностики бактерий является использование специфичных праймеров и зондов, позволяющих диагностировать определенные таксономические группы патогенных микроорганизмов.

Несмотря на широкую применимость универсальных праймеров для диагностики и идентификации бактериальных патогенов человека и животных, их приложение к анализу фитопатогенов в условиях *in planta* является ограниченным, что обусловлено высокой степенью сходства ортологических

локусов бактерий и растений. Так, коммерческие наборы праймеров, разработанные на основе консервативных регионов гена 16S рРНК, в ходе молекулярно-фитопатологической диагностики бактериозов *in planta* способны амплифицировать не только целевой генетический материал микроорганизмов, но и гомологичные локусы, представленные в хлоропластном и митохондриальном геномах растений. В следствии реакции кросс-амплификации, получаемые ПЦР-продукты являются гетерогенными и содержат одновременно генетический материал патогена и растения-хозяина, что затрудняет дальнейшую идентификацию микроорганизмов. Кроме того, данные праймеры способны амплифицировать митохондриальные последовательности грибных организмов и ряда насекомых-фитофагов, что делает диагностику болезней еще более трудоемкой в случае присутствия в инфицированных растениях биологического материала указанных групп эукариотических организмов.

Одним из предлагаемых решений для диагностики генетического материала бактерий в инфицированных образцах растений с использованием универсальных праймеров, является применение дополнительных методов разделения или элиминации ампликонов небактериального происхождения – например, с использованием технологии электрофоретического фракционирования. Однако, эффективная реализация данного подхода возможна лишь в случае наличия разницы в длине амплифицируемых локусов бактериальных и растительных организмов.

Следует также отметить, что одновременная амплификация ортологичных локусов бактерий и растений может приводить к снижению чувствительности метода молекулярно-генетической диагностики, и как следствие делать невозможным выявление патогенов при их невысоком титре, например, на ранних этапах развития инфекции [4].

Использование специфических праймеров позволяет проводить диагностику бактериальных фитопатогенов во всех указанных ранее случаях, однако данный метод имеет также ряд ограничений [5]. Несмотря на то, что применение специфических праймеров является эффективным способом диагностики и характеризуется высокой степенью чувствительности и специфичности, тем не менее в случае отсутствия целевого ПЦР-продукта, невозможным является утверждение о наличии или отсутствии сторонних видов бактерий в тестируемом образце, что в свою очередь ограничивает возможности выявления и определения фитозаболеваний [3]. Таким образом, поиск новых ДНК-маркеров, отсутствующих у растительных организмов, или уникальных по структуре для фитопатогенных бактерий является актуальной задачей. При этом, ограничение таксономического разнообразия бактерий в пределах группы фитопатогенов определенного перечня лесобразующих пород, позволяет увеличить число регионов в геноме, которые могут быть использованы в качестве ДНК-маркеров для проведения молекулярно-фитопатологической диагностики.

Исходя из всего вышесказанного, целью данной работы являлись подбор маркерных локусов и разработка специфических праймеров, предназна-

ченных для идентификации доминирующих групп фитопатогенных бактерий, ассоциированных с формированием инфекционных заболеваний у основных лесообразующих пород Беларуси.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исходного материала для проведения биоинформатических исследований из международной базы данных NCBI GenBank были отобраны 264 последовательности, относящиеся к трем генам (*rpoB* –  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы, *tuf* – фактора элонгации Tu, *coI* – субъединицы 1 цитохромоксидазы) 20 видов фитопатогенных бактерий из родов *Brenneria*, *Erwinia*, *Gibsiella*, *Lelliota*, *Lonsdalea*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Xylella*, ассоциированных с формированием инфекционных заболеваний у семи лесообразующих пород Беларуси: сосны, ели, дуба, березы, ольхи, ясеня, осины. Дополнительно, были проанализированы депозиты ортологичных локусов мтДНК и хпДНК указанных пород.

Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей выполнялся с помощью программного пакета Sequence Viewer 6.3 (Qiagen, США), разработка структуры праймеров – онлайн-сервиса NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Для лабораторной проверки пригодности разработанных праймеров проводилась ПЦР-амплификация препаратов суммарной ДНК, полученных из бактериальных культур, инфицированных растений и растительных образцов без визуальных признаков инфекции. Препараты суммарной ДНК были получены с использованием модифицированного СТАВ-протокола [6].

Полимеразная цепная реакция осуществлялась с применением набора 2×DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США) согласно инструкции фирмы-производителя [7, 8].

ПЦР проводили по следующей программе: 1 этап (1 цикл): денатурация –  $t = 3$  мин.,  $T = 95$  °C; 2 этап (35 циклов): денатурация –  $t = 20$  сек.,  $T = 95$  °C; отжиг.  $t = 20$  сек.,  $T = 55$  °C (для праймеров *bacRPOb* и *bacCOI*), 50 °C (для праймеров *bacTUF*); элонгация:  $t = 45$  сек.,  $T = 72$  °C; 3 этап (1 цикл): охлаждение реакционной смеси –  $t = 5$  мин.,  $T = 4$  °C.

Первичный анализ продуктов амплификации был выполнен с помощью электрофоретического фракционирования в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием. Видовую принадлежность ПЦР-продуктов устанавливали на основе анализа результатов их секвенирования в международной базе данных NCBI GenBank. Секвенирующая реакция была выполнена с использованием набора BigDye Terminator Sequence Kit v.1.1 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу компании-изготовителя. Разделение и детекцию продуктов секвенирующей реакции проводили в генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, США), интерпретация результатов производилась на базе

программного обеспечения Sequence Analysis 5.1.1 (Thermo Fisher Scientific, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение нуклеотидных последовательностей бактериального гена *rpoB* показало, что его размер существенно изменялся у различных систематических групп и составлял от 3582 н.о. (*Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil (Approved Lists)) до 4167 н.о. (*Xylella fastidiosa* Wells et al.). В то же время, следует отметить, что среди изученных представителей порядка Enterobacterales его размер был сходным и составил 4029 н.о.

В ходе анализа результатов выравнивания изученных видов бактерий из различных отделов полинуклеотидные консервативные регионы выявлены не были. Максимальный размер данных участков не превысил 8 н.о. В нескольких случаях были диагностированы 4- и 5-членные фрагменты, а основную долю составляли ди- и мононуклеотидные позиции.

Следует отметить, что распределение консервативных позиций в пределах гена *rpoB* не было дисперсным и носило преимущественно кластерный характер (рисунок 1). Структура кластера, как правило, являлась гетерогенной, и включала в себя поочередно расположенные моно/олигонуклеотидные консервативные и вариабельные позиции.

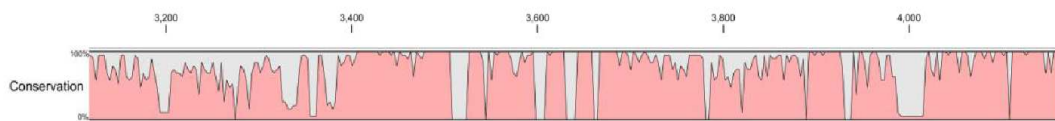


Рисунок 1 – Распределение значения показателя уровня сходства последовательностей в гене *rpoB* изученных видов бактерий (фрагмент)

При сравнении таксонов более низкого ранга – на уровне родов и семейств, были диагностированы общие по структуре нуклеотидные последовательности (рисунок 2).

При этом, как и ожидалось, увеличение числа общих консервативных регионов происходило по мере уменьшения таксономического статуса между сравниваемыми генотипами бактерий.

Изучение гена *tuf* у различных видов бактерий показало, что его размеры варьировали в незначительной степени – от 1176 до 1194 н.о. При этом, для изученных групп микроорганизмов было выявлено четыре варианта размеров, которые были сходными между родственными таксонами в пределах класса: 1176, 1185, 1191 и 1194 н.о. Анализ различий между вариантами размеров в целом, а также между последовательностями показал, что они кратны трем, тем самым указывая на наличие аминокислотных вставок или делеций в молекуле кодируемого полипептида (рисунок 3).

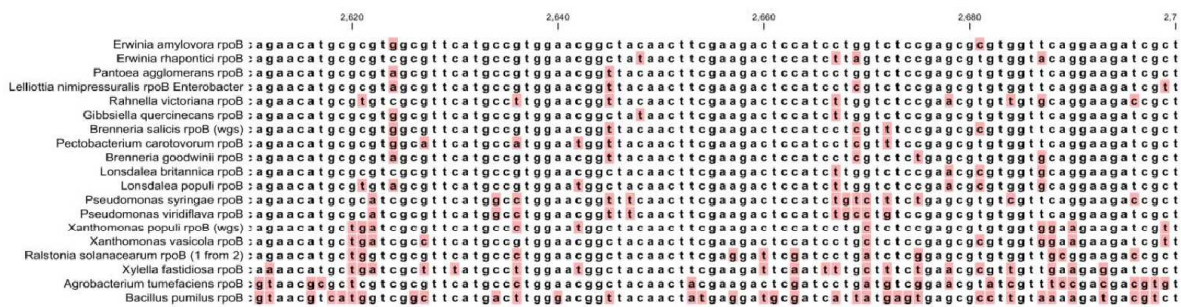


Рисунок 2 – Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *rpoB* изученных видов бактерий (SNP выделены цветом)

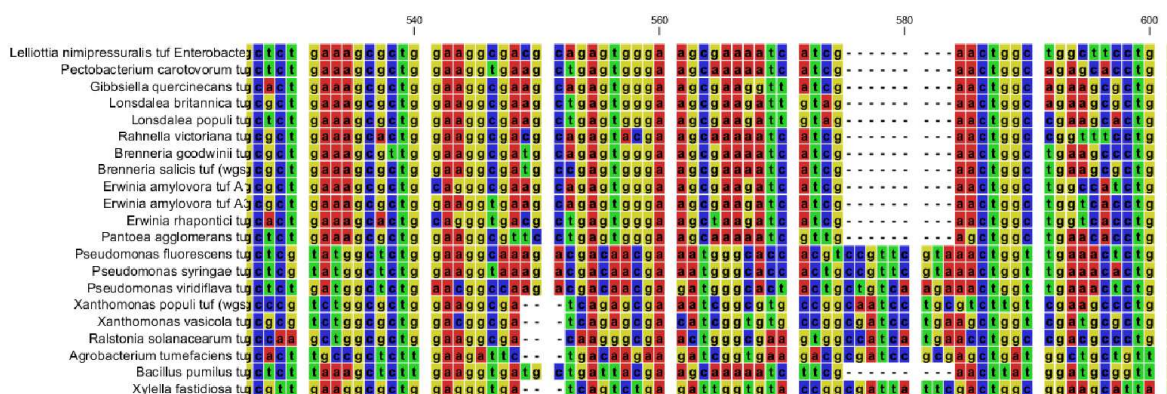


Рисунок 3 – Олигонуклеотидные делеции/инсерции в гене *tuf* различных видов бактерий

В целом анализ результатов выравнивания изученных видов бактерий, как и в случае с *rpoB*, показал отсутствие полинуклеотидных консервативных регионов (рисунок 4). В то же время для систематически родственных групп (на уровне родов и семейств) отмечались сходные по структуре нуклеотидные последовательности.

Отличительными особенностями от *rpoB* являлось отсутствие выраженной кластерной структуры распределения моно/олигонуклеотидных консервативных позиций. В пределах гена *tuf* был диагностирован только один полинуклеотидный (43 н.о.) вариабельный регион. В остальных случаях распределение консервативных и полиморфных моно/олигонуклеотидных позиций было относительно равномерным.

Изучение гена *coI* среди изученных видов бактерий показало, что его размер изменялся у различных систематических групп и составлял от 1959 н.о. (*B. pumilus*) до 2031 н.о. (*P. syringae* van Hall (Approved Lists)). Следует также добавить, что изменения длины гена отмечались не только среди представителей таксономических рангов высокого уровня, но и между видами, относящихся к одному роду – например, *P. syringae* (2031 н.о.) и *P. viridiflava* (Burkholder) Dowson (Approved Lists) (2013 н.о.).

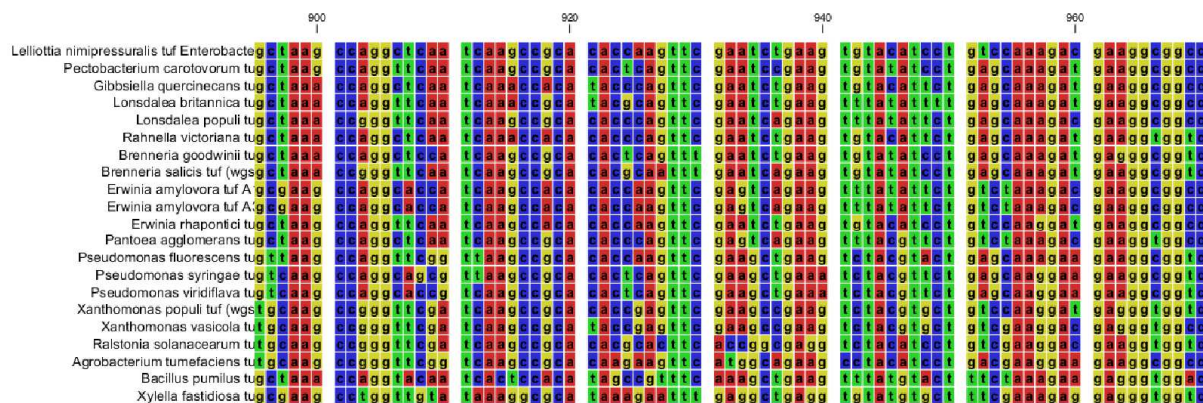


Рисунок 4 – Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *tuf* изученных видов бактерий

В ходе анализа результатов выравнивания изученных видов бактерий выраженные консервативные регионы выявлены не были (рисунок 5).

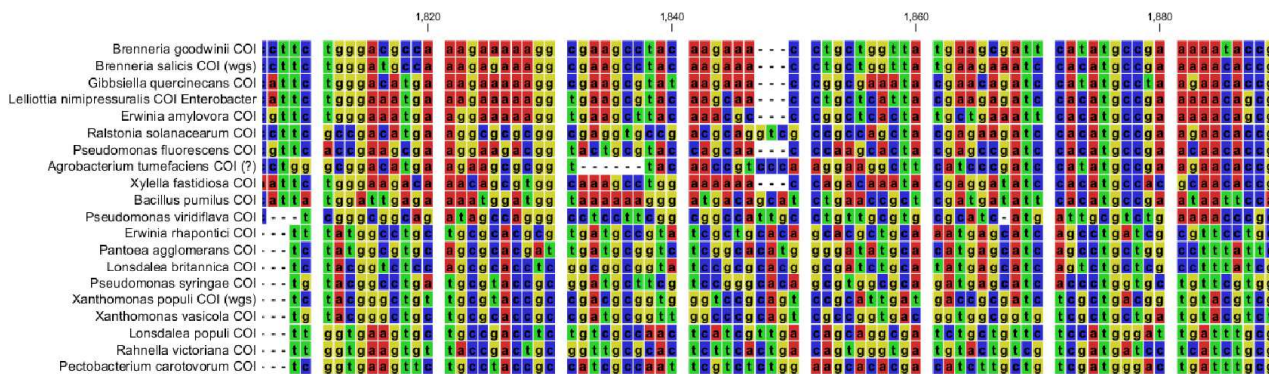


Рисунок 5 – Результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *col* изученных видов бактерий (фрагмент)

На основании анализа особенностей структуры нуклеотидных последовательностей генов *rpoB*, *tuf*, *col* было разработано 60 различных вариантов олигонуклеотидных праймеров, предназначенных для диагностики в инфицированных тканях лесных древесных растений генетического материала бактерий. После проведенного тестирования праймеров *in silico*, были отобраны три пары, представленные в таблице 1.

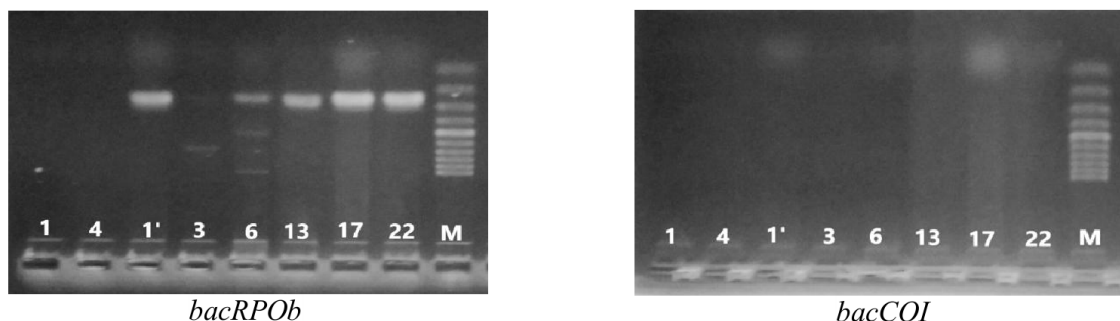
Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности разработанных праймеров

Диагностический локус	Размер продукта, п.н.	Праймер	Последовательность праймера (5'–3')
<i>rpoB</i>	235	bacRPOb-F	CTBGTTAYTCAGCAGCCGCT
		bacPROb-R	GGATTTCTTTCAMCARYACGT
<i>tuf</i>	358	bacTUF-F	RRTCGAAGACGTRTTTCTCSAT
		bacTUF-R	GAAGTAGAACTGYGGACGRTA
<i>col</i>	699	bacCOI-F	ACGGCGTTATCATGATTWT
		bacCOI-R	CCATGGTAAAGAAGTGGTG

В качестве исходных матриц для лабораторной проверки праймеров использовались препараты суммарной ДНК, полученные из чистых культур бактерий *Acinetobacter* sp., *Aurantimonas* sp., *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *Bacillus* sp., *Pantoea agglomerans* (Ewing and Fife) Gavini et al., *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Waldee, *P. wasabiae* Gardan et al., *Pseudoamonas* sp., *Rahnella aquatilis* Izard et al., *Rothia* sp., *Serratia plymuthica* (Lehmann and Neumann) Breed et al., *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, а также вегетативных тканей осины, клена, липы, ели европейской, сосны обыкновенной, ясеня обыкновенного, дуба черешчатого, березы.

На рисунке 6 представлены результаты электрофоретического фракционирования продуктов амплификации с использованием пар праймеров *bacRPOb*-F/*bacRPOb*-R и *bacCOI*-F/*bacCOI*-R.

Как видно из рисунка 6, использование праймеров *bacRPOb* позволило диагностировать большинство исследуемых видов бактерий, в то время как при применении *bacCOI*-F/*bacCOI*-R амплификация не была отмечена ни в одном из изученных образцов. В то же время, при использовании праймеров *bacRPOb* была установлена положительная амплификация для образцов ДНК неинфицированных образцов березы (данные не представлены), что указывает на невозможность применения данных вариантов олигонуклеотидов для идентификации фитопатогенных бактерий в растительных тканях, так как получаемые результаты будут содержать генетических материал растения-хозяина и паразита одновременно.



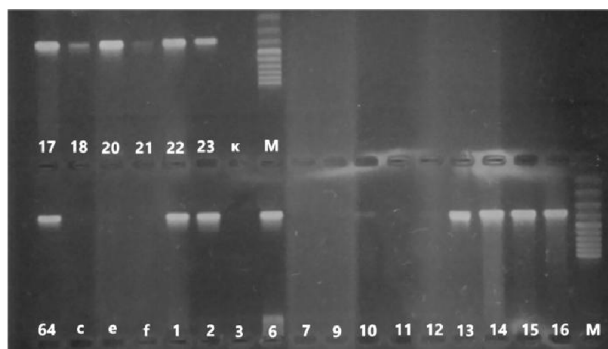
*1* – *Pseudomonas* sp.; *4* – *Pseudomonas* sp.1; *1'* – *Pectobacterium carotovorum*;  
*3* – *Rothia* sp.; *6* – *Pseudomonas* sp.2; *13* – *Xanthomonas campestris*;

*17* – *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *22* – *Pantoea agglomerans*; *M* – маркер молекулярного веса

Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов амплификации с использованием разработанных специфических олигонуклеотидов

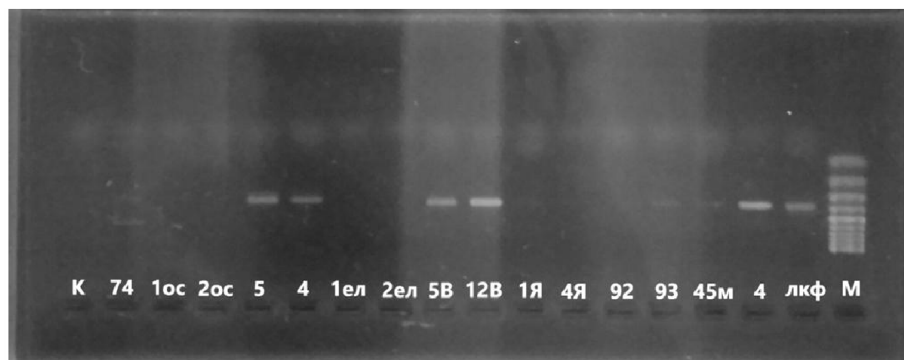
Результаты амплификации образцов чистых культур и ДНК растений с праймерами *bacTUF* представлены на рисунках 7 и 8.





64 – *Pseudomonas* sp.; c,e,f – *Bacillus subtilis*; 1 – *Pectobacterium carotovorum*; 2 – *Serratia plymuthica*; 3 – *Rothia* sp.; 6 – *Pseudomonas* sp.;  
 7 – *Bacillus* sp.; 9 – *Bacillus* sp.1; 10 – *Bacillus* sp.2; 12 – *Bacillus* sp.3;  
 13 – *Xanthomonas campestris*; 14, 15 – *Erwinia carotovora*;  
 16 – *Pseudomonas* sp.; 17 – *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; 18 – *Acinetobacter* sp.; 20 – *Pectobacterium wasabiae*; 21 – *Bacillus* sp.4; 22 – *Pantoea agglomerans*; 23 – *Aurantimonas* sp.; κ – контроль; M – маркер 100–1000 bp

Рисунок 7 – Электрофореграмма чистых культур фитопатогенных бактерий с праймерами *bacTUF*



К, 74 – микроклоны березы карельской; 1ос, 2ос – осина; 5, 4 – липа (бактерия *V. paradoxus*); 1ел, 2ел – ель европейская; 5В, 12В – клен (бактерии *Salmonella* sp., *P. agglomerans*); 1Я, 4Я – ясень; 92, 93 – сосна обыкновенная (бактерия *Sphingomonas* sp.); 45м – дуб (смешанная бактериальная инфекция); 4 – *Rahnella aquatilis*; лфк – *Paenibacillus taichungensis* (эндофит растений *in vitro*); M – маркер 100–1000 bp

Рисунок 8 – Электрофореграмма разделения продуктов амплификации образцов растительной ДНК и бактерий с использованием праймеров *bacTUF*

Как видно из рисунков 7 и 8, праймеры *bacTUF* позволили избирательно диагностировать бактериальную ДНК в растительных тканях. В то же время, их использование требует применение дополнительного олигонуклеотида *bacTUFB-F DRTYGAGGAYGTATTCTCWAT* для диагностики *Bacillus* spp.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные праймеры *bacTUF* можно использовать в качестве инструмента для быстрого и производительного обнаружения в растительных тканях фитопатогенных видов бактерий из родов *Brenneria*, *Erwinia*,

*Gibsiella, Lelliota, Lonsdalea, Pantoea, Pectobacterium, Pseudomonas, Rahnella, Ralstonia, Xanthomonas, Xylella*, а при сочетании с *bacTUFB-F* – не болезнетворных для растений видов рода *Bacillus*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Microbiome and infectivity studies reveal complex polyspecies tree disease in Acute Oak Decline / S. Denman et al. // ISME J. – 2018. – V. 12(2). – P. 386-399.
2. James G. Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene // PCR for clinical microbiology: an Australian and international perspective. – 2010. – С. 209-214.
3. Barghouthi S. A. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers // Indian journal of microbiology. – 2011. – Т. 51. – С. 430-444.
4. Dorn-In, S., Bassitta, R., Schwaiger, K., Bauer, J., & Hölzel, C. S. (2015). Specific amplification of bacterial DNA by optimized so-called universal bacterial primers in samples rich of plant DNA. Journal of Microbiological Methods, 113, 50–56.
5. Beran P., Mráz I. Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria* // Crop protection. – 2013. – Т. 43. – С. 213-215.
6. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
7. Folmer, O. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1994. – Vol. 5. – P. 294–299.
8. White, T. J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // PCR Protocols: A guide to methods and applications / ed.: M. A. Innis [et al.]. – New York, 1990. – P. 315–322.

Статья поступила в редколлегию 30.03.2023 г.

