

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕСТОВАCTЕРИUM BRASILIENSE, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ОБРАЗЦОВ РАСТЕНИЙ В БЕЛАРУСИ

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF PECTOBACTERIUM BRASILIENSE ISOLATED FROM PLANT SAMPLES IN BELARUS

*Shao Chengyue
A. Yevtushenkov*

Summary. Potato samples with blackleg disease were collected in the Belarus region, and bacteria were extracted. Biochemical and molecular genetic analyses revealed that the characteristics of seven bacterial strains were consistent with those of *Pectobacterium brasiliense*. Bacterial genomes were extracted and amplified using *Pectobacterium brasiliense*-specific primers BR1f and L1r. One sample was selected for gene extraction and whole genome sequencing, and its genome showed similarity to *Pectobacterium brasiliense*. Pathogen identification was confirmed by phylogenetic analysis using 16S RNA genes. After plant inoculation, the same symptoms were observed on potato stems, potato tubers and carrot tubers, satisfying Koch's hypothesis. *Pectobacterium brasiliense* infection has been reported in Brazil, the USA, Russia, and China.

Keywords: potato, blackleg disease, potato soft rot, *Pectobacterium brasiliense*.

Шао Чэньюэ

*Аспирант, Белорусский государственный университет
520095424@qq.com*

Евтушенко Анатолий Николаевич

*Доктор биологических наук, профессор,
Белорусский государственный университет
Evtushenkov@bsu.by*

Аннотация. В Белорусской области были собраны образцы картофеля, пораженного черной ножкой, и выделены бактерии. Биохимический и молекулярно-генетический анализы показали, что характеристики семи штаммов бактерий соответствуют характеристикам *Pectobacterium brasiliense*. Бактериальные геномы были выделены и амплифицированы с использованием праймеров R1 и L1r, специфичных для *Pectobacterium brasiliense*. Для выделения генов и секвенирования всего генома был отобран один образец, и его геном показал сходство с *Pectobacterium brasiliense*. Идентификация патогена была подтверждена филогенетическим анализом с использованием генов 16S РРНК. После инокуляции растений те же симптомы наблюдались на стеблях, клубнях картофеля и моркови, что подтверждает гипотезу Коха. Заражение *Pectobacterium brasiliense* было зарегистрировано в Бразилии, США, России и Китае.

Ключевые слова: картофель, черная ножка, мягкая гниль картофеля, *Pectobacterium brasiliense*.

Введение

Бактериальная мягкая гниль растений является одной из наиболее острых проблем в мире. Большинство возбудителей, вызывающих так называемое «скрытое загрязнение», относятся к семейству Soft-rot Enterobacteriaceae (SRE), среди которых ключевыми родами являются *Pectobacterium* и *Dickeya* [19, с. 426]. Эти два рода включают многочисленные фитопатогенные бактерии, зарегистрированные в различных странах по всему миру. Они способны вызывать серьезную мягкую гниль у растений-хозяев. Спектр растений-хозяев весьма широк, включая культурные растения, фрукты, овощи, декоративные растения и т.д. Основные симптомы заболевания включают гниение, увядание, почернение стебля и другие проявления, что приводит к значительному ущербу для сельского хозяйства [18, с. 20].

Pectobacterium brasiliense впервые был классифицирован в 2004 году Дуарте и соавторами как новый подвид *Pectobacterium carotovora*, вызывающий черную ножку и мягкую гниль картофеля [4, с. 536]. Хотя *P. brasiliense* был

обнаружен относительно недавно, за последние годы он был выявлен на различных растениях-хозяевах в разных странах, где вызвал значительный ущерб сельскохозяйственному производству, став важным патогеном, который нельзя игнорировать. Бактерии вызывают склеивание листьев, стеблей и клубней картофеля. В тяжелых случаях наблюдаются перфорация листьев, гниение плодов и увядание растений, что приводит к значительному снижению урожайности картофеля или даже к полному уничтожению урожая [4, с. 540; 12, с. 9]. Возбудитель был зарегистрирован в Бразилии, Канаде, США, Южной Африке, Новой Зеландии и других странах [5, с. 2042; 7; 17, с. 235; 6, с. 684; 10, с. 177; 10, с. 180]. В июне 2020 года в Беларуси были собраны образцы растений картофеля с симптомами черной ножки, а проведенные биохимические и генетические тесты патогенных бактерий подтвердили их принадлежность к *Pectobacterium brasiliense*.

Данная работа посвящена изучению физиологии и биохимии растений, пораженных *Pectobacterium brasiliense* в Беларуси, где наблюдаются симптомы бактериальной инфекции в тканях растений.

Материалы и методы

Бактерии *P. brasiliense* были выделены из образцов поражённых растений и культивированы на картофельном агаре. Штаммы с патогенностью к растениям, способностью разрушать пектины, целлюлолитической активностью и патогенностью при инокуляции клубней картофеля были отобраны из общего числа выделений для дальнейшего изучения.

В соответствии со стандартными протоколами идентификации бактерий были проведены физиологические и биохимические тесты (тест на активность лецитиназы, дегидрогеназная активность, использование органических кислот, образование углеводов в кислотной среде при 28°C, рост при 37°C, образование сахарозы, восстановление сахара и т.д.) на отобранных штаммах [4, с. 537].

Геномы бактерий были выделены и амплифицированы с использованием специфичных праймеров для *P. brasiliense*: BR1f (5'-gcgtgccgggttatgacct-3') и L1r (5'-carggcatccaccgt-3') [4, с. 538]. Затем геномы штаммов были секвенированы, и нуклеотидные последовательности определены с помощью секвенатора Illumina MiSeq. Сборка генома была выполнена с использованием онлайн-программы Proksee. Использовалось программное обеспечение Prodigal для предсказания кодирующих последовательностей белков (CDS) и функциональной аннотации генов [13].

Для филогенетического анализа была получена последовательность гена 16S рПНК целевых бактерий с фрагментом размером 1437 пар оснований. На основе опубликованных в генбанке последовательностей гена 16S рПНК 5 штаммов *Pectobacterium*: *P. brasiliense* штамм 212 (NR_115173.1), *P. parmentieri* штамм RNS 08-42-1A (NR_153752.1), *P. wasabiae* штамм CFBP 3304 (NR_118293.1), *P. carotovorum* штамм ICMP 5702 (NR_116047.10), *P. atrosepticum* штамм LMG 2386 (NR_044980.1) и *Dickeya oryzae* штамм ZYY5 (NR_174300.1) был построен филогенетический древо с использованием метода ближайшего соседа (Neighbor-Joining) и программного обеспечения MEGA v. 10.2.6.

Для проведения инфекции картофельные клубни сорта «Винета» были стерилизованы снаружи 70 % этанолом. Бактерии выращивались в жидкой среде LB в течение ночи, центрифугировались, промывались раствором NaCl (0,85 %) и ресуспендировались в том же растворе до оптической плотности OD₆₀₀, соответствующей плотности клеток (3×10^8 клеток/мл). В 20 мкл суспензии бактерий вводились инъекционно с помощью шприца, и ранки изолировались парафильмом. Инфицированные клубни картофеля помещались при температуре 28°C и относительной влажности 70 %–80 %. Через 48 часов измерялась масса мацерированных тканей, кото-

рые затем хранились при температуре –20°C до момента измерения ферментативной активности. Стебли картофеля (сорт Винета) и клубни моркови подвергались тем же условиям.

Активность пектин-лиазы определялась по методу, описанному в работах [15, с. 179; 14, с. 569; 15, с. 190]. Активность целлюлазы определялась колориметрическим методом с использованием диниртосалициловой кислоты (DNS) [1, с. 177]. Измерение активности ферментов проводилось с использованием УФ-спектрофотометра «Cary 50 BIO» (США).

Результаты

Бактерии были выделены из заражённых картофеля, моркови и пекинской капусты, собранных в Беларуси. Из 102 исследованных образцов было предварительно выделено 7 штаммов бактерий. Изоляты были культивированы для описания их колоний на картофельном агаре и определения их рода и морфологии. Использовались следующие критерии: способность патогенов вызывать гниение клубней картофеля, гидролитическая активность по отношению к карбоксиметилцеллюлозе и предварительная идентификация пектиновой кислоты.

Пектинлиазы и целлюлазы являются ферментами, широко присутствующими как у сапрофитных, так и у фитопатогенных микроорганизмов, и играют ключевую роль в патогенности последних. Основным патогенным фактором является пектиназа. Выделение пектиназы во время инфицирования патогеном способствует деградаци и использованию пектина в межклеточном слое и клеточной стенке, что приводит к разрушению клеточной стенки, повреждению клеток и некрозу тканей [2, с. 180]. Целлюлазы в основном разрушают целлюлозу в первичной или вторичной клеточной стенке растительных клеток [16, с. 1525]. Основные целлюлазы, встречающиеся у патогенов черной ножки, включают гликозидные гидролазы, такие как эндо-β-1,4-глюканаза и эндо-β-1,3-глюканаза [8].

На основании вышеприведённых критериев были отобраны 7 штаммов, которым условно присвоены названия 98–1, 98–2, 101–2, 126, 127, 129 и 130. Согласно результатам физиологических и биохимических свойств (Таблица 1), штаммы 98–1, 98–2, 101–2, 126, 127, 129 и 130 были классифицированы как бактерии рода *Pectobacterium*.

Затем для амплификации ДНК штаммов 98–1, 98–2, 101–2, 126, 127, 129 и 130 были использованы специфичные праймеры BR1f и L1r, и все штаммы были подтверждены как *P. brasiliense* (Рисунок 1). Штамм 130 был выбран для секвенирования полного генома (GenBank: CP092039.1), и его геном был составлен с помощью программного

Таблица 1.

Физиологические и биохимические свойства изученных штаммов

Штамм	98-1	98-2	101-2	126	127	129	130
Грамм–отрицательность	–	–	–	–	–	–	–
Форма клеток	палочки						
Подвижность	+	+	+	+	+	+	+
O/F тест	F	F	F	F	F	F	F
Рост при 37°C	+	–	+	–	+	+	+
Рост при 28°C	+	+	+	+	+	+	+
Лецитиназа	–	–	–	–	–	–	–
Целлюлаза	+	+	+	+	+	+	+
Дегидрогеназа	+	+	+	+	+	+	+
Восстановление сахарозы	B	B	B	G	G	G	G
Ассимиляция алколей и углеводов							
Метил- α -D-глюкопираноза	–	–	–	–	–	–	–
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	–	–	–	–	–	–	–
Арабиноза	+	+	+	+	+	+	+
Раффиноза	+	+	+	+	+	+	+
Кислота	+	+	+	+	+	+	+
Сорбит	–	–	–	–	–	–	–
Дульцит	–	–	–	–	–	–	–
Маннитол	+	+	+	+	+	+	+
Манноза	+	+	+	+	+	+	+
Рамноза	+	+	+	+	+	+	+
Органические кислоты							
Альфа-кетоглутаровая кислота	+	+	+	+	+	+	+
Натрий цитрат	+	+	+	+	+	+	+
Натрий тартрат	+	+	+	–	–	–	–

Примечание: «+» для признака/положительной реакции, «–» для отсутствия признака/отрицательной реакции, «R» для красного, «G» для зеленого, «B» для синего.

Штаммы *P. brasiliense*: 1–98-1; 2 — 98-2; 3 — 101-2; 4 — 126; 5 — 127; 6 — 129; 7 — 130; M — маркер ДНК (ДНК Ladder Mix Fermentas).

обеспечения Proksee (Рисунок 2). Филогенетический анализ на основе последовательности гена 16S рНК был проведён между штаммом 130 и пятью штаммами рода *Pectobacterium*: *P. brasiliense* штамм 212 (NR_115173.1), *P. parmentieri* штамм RNS 08-42-1A (NR_153752.1), *P. wasabiae* штамм CFBP 3304 (NR_118293.1), *P. carotovorum* штамм ICMP 5702 (NR_116047.10), *P. atrosepticum* штамм LMG 2386 (NR_044980.1) и *Dickeya oryzae* штамм ZYY5 (NR_174300.1), опубликованными в базе данных GenBank. Штамм 130 был уверенно отнесён к *P. brasiliense*, как показано на Рисунке 3.

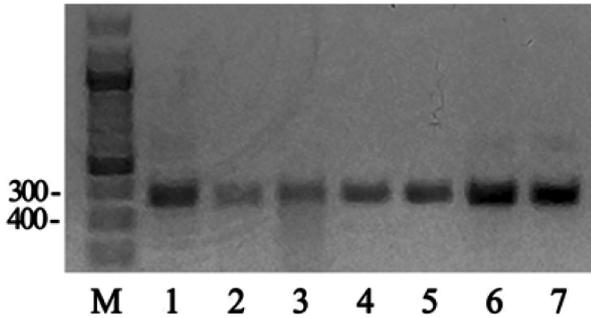


Рис. 1. Электроферограмма продуктов ПЦР с использованием праймеров BR1f и L1r

Секвенированные чтения были собраны в полный геном, который был затем оценен на наличие спец-

ифических для *P. brasiliense* признаков у штамма 130 (CP092039.1) с круговой хромосомой размером 5 034 872 п.н. и средней GC-составляющей 52.05 % (Таблица 2). В ходе сборки генома не были обнаружены плазмиды. Программное обеспечение Prodigal предсказало, что геном включает 4391 предполагаемую кодирующую последовательность (CDS), охватывающую в общей сложности 4 375 797 пар оснований (п.н.), со средней длиной гена 997 п.н. Также было предсказано, что геном содержит 184 тандемных повтора, общая длина которых составляет 22 683 п.н., что составляет 0.45 % от всего генома. В геноме было обнаружено 22 рНК-оперона, включающих 8 5S рНК, 7 16S рНК и 7 23S рНК.

Таблица 2.

Геномные характеристики штамма *P. brasiliense* 130

Характеристика	Значение
Размер генома (п.н.)	5,034,872
Содержание GC (%)	52.05
Количество предполагаемых генов CDS	4391
Длина гена (п.н.)	4,375,797
Средняя длина гена (п.н.)	997
Доля генов к размеру генома (%)	86.91

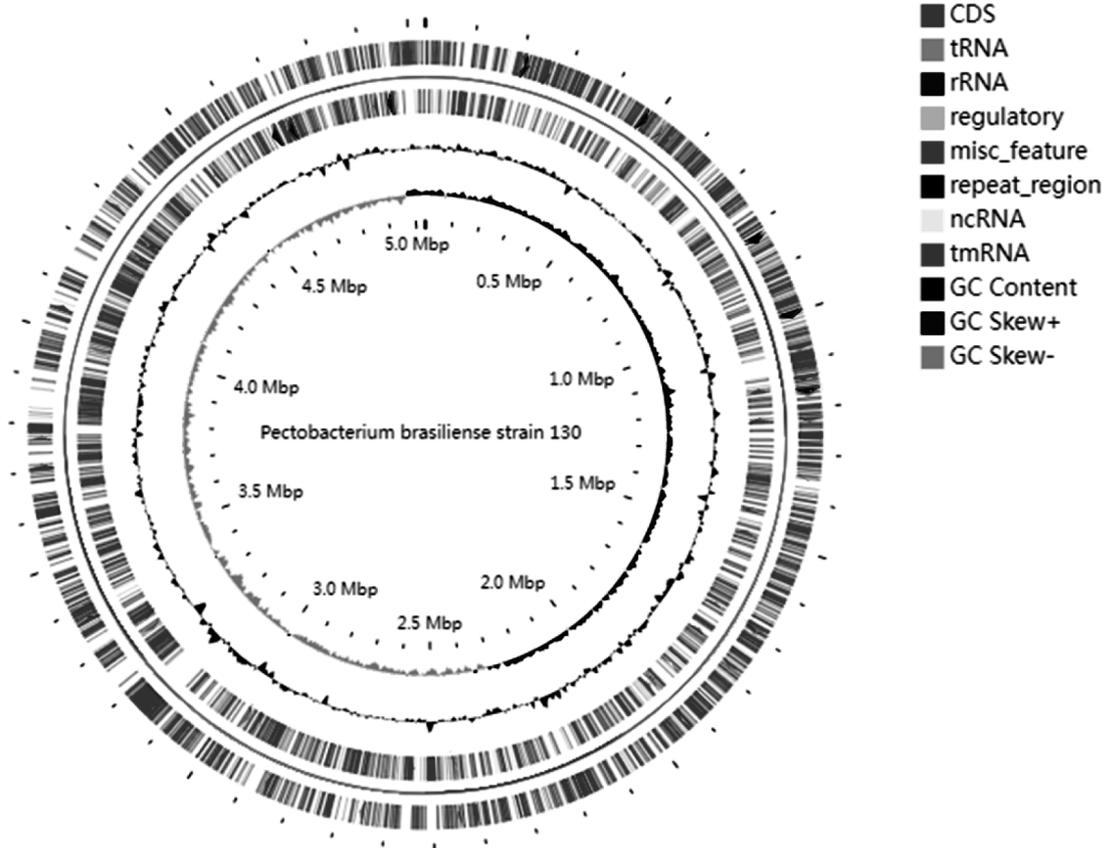


Рис. 2. Геномная карта *P. brasiliense* 130

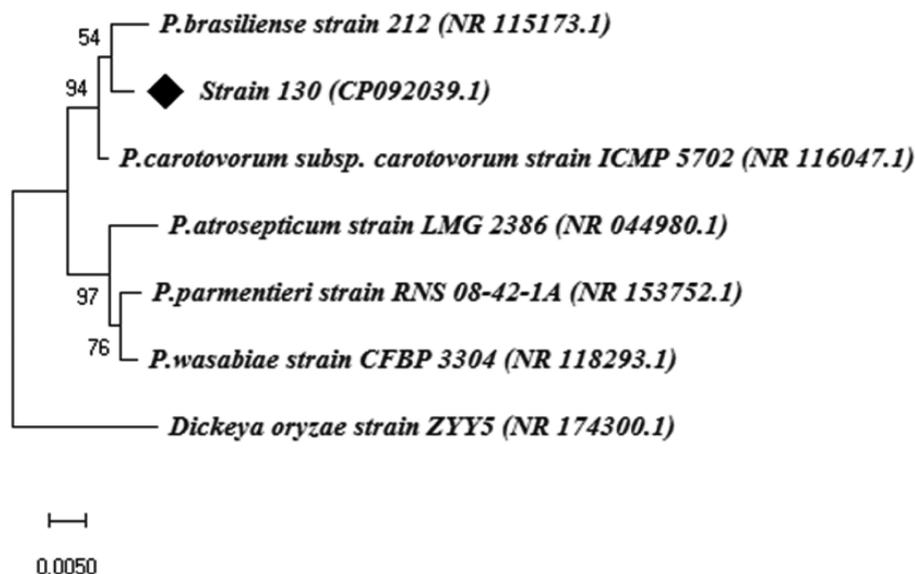


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное путём сравнения фрагментов последовательностей гена 16S рРНК различных штаммов рода *P. brasiliense* с использованием метода ближайших соседей. Числа указывают процент бутстреп-значений (1000 повторений)

Характеристика	Значение
Длина межгенного региона (п.н.)	659,075
Доля межгенного региона к геному (%)	13.09
Количество тандемных повторов	184
Длина тандемных повторов (п.н.)	22,683
Доля тандемных повторов к геному (%)	0.4505
Количество минисателлитных ДНК	199
Количество микросателлитных ДНК	10
Количество рРНК	22
Количество тРНК	79
Количество сРНК	40

Бактерии были инокулированы в картофельные клубни, морковь, пекинскую капусту и лук, при этом симптомы заболевания появлялись в течение 2–7 дней. Результаты показали, что штамм 98–2 не вызывал заболевания у лука, тогда как штамм 101–2 не вызывал заболевания у моркови, пекинской капусты или лука. Другие растительные образцы продемонстрировали явные симптомы заболевания, включая некроз, почернение и водянистость клубней и листьев. Из заражённых тканей растений были выделены бактерии. Далее в инфицированных тканях были измерены активности пектатлиазы и целлюлазы (Таблица 3 и Таблица 4). Пектатлиаза считается основным фактором вирулентности видов рода *Pectobacterium*.

Таблица 3.

Активность пектатлиазы у бактерий *P. brasiliense* в поражённых тканях растений (Е/мл).

Штамм	Картофель	Морковь	Пекинская капуста	Лук
98-1	0.113±0.013	0.106±0.009	0.378±0.098	0.005±0.002
98-2	0.151±0.021	0.087±0.023	0.411±0.056	—
101-2	0.152±0.031	—	—	—
126	0.543±0.02	0.021±0.01	0.594±0.14	0.005±0.002
127	0.222±0.013	0.035±0.002	0.227±0.037	0.017±0.003
129	0.23±0.117	0.106±0.044	0.334±0.072	0.052±0.023
130	0.26±0.022	0.121±0.022	0.359±0.076	0.014±0.005

Примечание: «—» для отсутствия данных о заражении.

Таблица 4.

Активность целлюлазы у бактерий *P. brasiliense* в поражённых тканях растений (мг/1ч/1мл)

Штамм	Картофель	Морковь	Пекинская капуста	Лук
98-1	0.359±0.055	13.588±0.316	1.648±0.449	9.934±0.483
98-2	0.319±0.002	8.776±0.614	2.489±0.319	—
101-2	0.572±0.046	—	—	—
126	0.607±0.04	16.016±0.982	1.824±0.387	5.601±0.289
127	0.898±0.046	14.8±0.111	1.434±0.275	13±0.485
129	0.385±0.037	3.525±0.087	2.036±0.065	12.236±0.762
130	0.4±0.009	3.728±0.118	2.024±0.236	10.816±0.007

Примечание: «—» для отсутствия данных о заражении.

Обсуждение и выводы

Бактериальная мягкая гниль растений представляет собой заболевание, наносящее серьёзный ущерб сельскому хозяйству, и для его контроля на сегодняшний день отсутствуют эффективные биологические меры. *Pectobacterium*, как основной возбудитель данного заболевания, вызывает большой интерес ввиду широкого распространения и многообразия видов. За последние 20 лет, благодаря развитию аналитических технологий, многие виды и роды бактерий из семейства *Pectobacteriaceae* подверглись пересмотру и были заново классифицированы [Li 2018; Huang 2018; Duarte 2004].

Классификация рода *Pectobacterium* долгое время оставалась спорной, поскольку этот род бактерий демонстрирует высокую степень фенотипической и генетической изменчивости, а также патогенности, что позволяет им вызывать тяжёлую мягкую гниль у множества различных растений-хозяев. Наши исследования показали, что семь штаммов *P. brasiliense* были впервые идентифицированы в Беларуси с помощью молекулярно-генетического анализа. Ранее этот патоген не был зарегистрирован в данном регионе. Эти результаты закладывают основу для дальнейшего понимания генети-

ческой информации *P. brasiliense* и предоставляют важные данные для будущих исследований.

В ходе наших экспериментов этот патоген успешно инфицировал картофельные клубни, морковь, пекинскую капусту и лук, быстро распространяясь в поражённых тканях. Известные данные указывают на то, что *P. brasiliense* может поражать широкий спектр культурных растений, причём наибольшую опасность он представляет для паслёновых культур [9]. Учитывая его способность заражать множество сельскохозяйственных культур и высокую вирулентность, можно предположить, что *P. brasiliense* представляет потенциальную угрозу для сельского хозяйства Беларуси, особенно для выращивания паслёновых культур.

Наши данные подтверждают, что *P. brasiliense* является значимым патогеном, представляющим серьёзную опасность для сельскохозяйственных культур, и дальнейшие исследования его генома и патогенности позволят разработать меры по его эффективному контролю. Кроме того, полученные результаты подтверждают, что *P. brasiliense* демонстрирует высокую степень изменчивости как на уровне генома, так и на уровне фенотипических проявлений, что усложняет его идентификацию и контроль.

ЛИТЕРАТУРА

- Lindsay H.A. colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3,5-dinitrosalicylic acid. *Potato Res.* 1973;16(3):176-179. doi:10.1007/BF02356048
- McMillan G.p., Barrett A.m., Pérombelon M.c.m. An isoelectric focusing study of the effect of methyl-esterified pectic substances on the production of extracellular pectin isoenzymes by soft rot *Erwinia* spp. *Journal of Applied Bacteriology.* 1994;77(2):175-184. doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb03062.x
- An C.L., Lim W.J., Hong S.Y., et al. Analysis of bgl operon structure and characterization of beta-glucosidase from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68(11):2270-2278. doi:10.1271/bbb.68.2270
- Duarte V., De Boer S.H., Ward L.J., de Oliveira A.M.R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology.* 2004;96(3):535-545. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x
- Panda P., Fiers M., Armstrong K., Pitman A.R. First report of blackleg and soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in New Zealand. *New Dis Rep.* 2012;26(15):2044-0588. doi: https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2012.026.015
- Onkendi E.M., Maluleke L.N., Moleleki L.N. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot and blackleg of potatoes in Kenya. *Plant Disease.* 2014;98(5):684-684. doi: https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0988-PDN
- de Werra P., Bussereau F., Keiser A., Ziegler D. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Switzerland. *Plant Dis.* 2015;99(4):551. doi: https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0742-PDN
- Arizala D., Arif M. Genome-wide analyses revealed remarkable heterogeneity in pathogenicity determinants, antimicrobial compounds, and CRISPR-cas systems of complex phytopathogenic genus *Pectobacterium*. *Pathogens.* 2019;8(4):247. doi: https://doi.org/10.3390/pathogens8040247
- Oulghazi S., Sarfraz S., Zaczek-Moczydlowska M.A., et al. *Pectobacterium brasiliense*: Genomics, host range and disease management. *Microorganisms.* 2021;9(1):106. doi: https://doi.org/10.3390/microorganisms9010106
- van der Merwe J.J., Coutinho T.A., Korsten L., van der Waals J.E. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology.* 2010;126(2):175-185. doi: https://doi.org/10.1007/s10658-009-9531-2
- Hauben L., Moore E.R., Vauterin L., et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and applied microbiology.* 1998;21(3):384-397. doi: https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9
- Pérombelon M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology.* 2002;51(1):1-12. doi: 10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x
- Hyatt D., Chen G.L., LoCascio P.F., Land M.L., Larimer F.W., Hauser L.J. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(1):119. doi:10.1186/1471-2105-11-119
- Macmillan J.D., Vaughn R.H. Purification and Properties of a Polygalacturonic Acid-trans-eliminase Produced by *Clostridium multifementans**. *Biochemistry.* 1964;3(4):564-572. doi:10.1021/bi00892a016

15. Evtushenkov A.N., Shevchik V.E., Popova L.B., et al. Purification and properties of two extracellular endopectate lyases from *Erwinia chrysanthemi* ena 49. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologija*. 1986;22(2):187–192. Accessed March 1, 2024. <https://eurekamag.com/research/006/230/006230632.php>
16. Boccara M., Jean-Luc Aymeric, Christel Camus. Role of endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*. *Journal of bacteriology*. 1994;176(5):1524–1526. doi: [https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1524–1526.1994](https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1524-1526.1994)
17. Marquez-Villavicencio M. del P., Groves R.L., Charkowski A.O. Soft rot disease severity is affected by potato physiology and *Pectobacterium* taxa. *Plant Disease*. 2011;95(3):232–241. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0526>
18. Toth I.K., Bell K.S., Holeva M.C., Birch P.R. Soft rot *Erwinia*: from genes to genomes. *Mol Plant Pathol*. 2003;4(1):17–30. doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x
19. Charkowski A., Blanco C., Condemine G., et al. The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot Enterobacteriaceae Pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*. 2012;50(1):425–449. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-173013
20. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Пектатлиазная активность бактерий рода *Erwinia*. *Вестник Белорусского Государственного Университета Имени Ви Ленина Серия 2: Химия Биология География*. 1978;(2):187–192. Accessed December 14, 2022. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=38097272>

© Шао Чэньюе (520095424@qq.com); Евтушенков Анатолий Николаевич (Evtushenkov@bsu.by)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»