

# КЛАССИФИКАЦИЯ фитопатогенных бактерий при помощи ДНК-маркера ФИР

Кевин Л. Шнейдер<sup>1</sup>, Глоримар Марреро<sup>1</sup>,

Энн М. Алварез<sup>2</sup>, Гернот Г. Престинг<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Молекулярные биологические науки и биоинженерия,  
Гавайский университет Маноа, Гонолулу, Гавайи, Соединенные Штаты Америки

<sup>2</sup> Защита растений и окружающей среды,  
Гавайский университет Маноа, Гонолулу, Гавайи, Соединенные Штаты Америки

ДНК-маркер, который позволяет различать бактерии, поражающие растения, на видовом уровне и ниже, был получен путем сравнения шести секвенированных геномов рода *Xanthomonas*, которому принадлежит множество важных фитопатогенов. Этот ДНК-маркер содержит часть фактора инициации репликации *dnaA* (ФИР). В отличие от рРНК-генов, *dnaA* — однокопийный ген в подавляющем большинстве секвенированных бактериальных геномов, и для амплификации ФИР требуются родоспецифичные праймеры. Компьютерное моделирование биологического эксперимента показало, что ФИР имеет равную или большую способность различать близкородственные виды *Xanthomonas*, чем широко используемая область рибосомного межгенного спейсера (МГС). Кроме того, в наборе из 263 штаммов *Xanthomonas*, *Ralstonia* и *Clavibacter* ФИР-маркер был напрямую секвенирован в обоих направлениях с коэффициентом результативности примерно на 16% выше, чем при секвенировании МГС. ФИР-структуры для *Xanthomonas*, *Ralstonia* и *Clavibacter* были построены при помощи 682 эталонных штаммов, представляющих различные виды, подвиды, патовары, расы, растения, являющиеся хозяевами, и географические регионы. Эти структуры содержали в общей сложности 109 различных ФИР-последовательностей.

ФИР-последовательности выявили подвидовые группировки, но не подтвердили принадлежность штаммов *X. campestris* или *X. axonopodis*

к патоварам, к которым их в настоящее время относят; штаммы *R. solanacearum* также не были отнесены к соответствующим расам, что подтверждает предыдущие выводы о том, что распределение по расам и патоварам не всегда отражает генетические связи. ФИР-маркер также был секвенирован для 24 эталонных штаммов из трех родов энтеробактерий: *Pantoea*, *Pectobacterium* и *Dickeya*.

ФИР-последовательности семидесяти ранее неклассифицированных штаммов *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* и *Dickeya* совпали или оказались схожими с ФИР-последовательностями известных эталонных штаммов, что наглядно демонстрирует полезность генетических структур для классификации бактерий ниже видового уровня и быстрого сопоставления неизвестных изолятов с эталонными штаммами.

Структуры ФИР-последовательностей даны в электронной базе данных «RIFdb». Данные могут быть запрошены как в формате хроматограммы, так и в формате FASTA (текстовый формат для нуклеотидных или полипептидных последовательностей), и могут быть использованы в целях проведения диагностики при помощи ФИР-последовательностей, полученных из неизвестных штаммов.

Ежегодный ущерб от потерь урожая ввиду заражения бактериальными фитопатогенами составляет миллиарды долларов США (по данным Baker et al., 1997). Быстрая и точная идентификация бактериальных фитопатогенов — насущная необ-

ходимость для современного сельскохозяйственного производства. Быстрая и точная идентификация позволяет принимать обоснованные решения о проведении необходимых, но дорогостоящих мер борьбы, включающих как карантинные меры, так и уничтожение зараженного растительного материала на поле (Gottwald et al., 2001; Hawks, 2005). В род *Xanthomonas* входят одни из наиболее важных бактериальных патогенов растений, которые в общей сложности поражают 392 растения-хозяина (Hayward, 1993).

К родам *Clavibacter*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Dickeya*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pectobacterium* и *Xylella* также относятся важные виды фитопатогенных бактерий (Denny, 2006; Eichenlaub et al., 2006; Simpson et al., 2000; Bakker et al., 2007; Samson et al., 2005; Hauben et al., 1998; Gavini et al., 1989; Garrity et al., 2005). Фитопатогены *X. oryzae* pv. *oryzae* и *R. solanacearum* (Rs) раса 3 биофарм 2 считаются наиболее опасными вредителями сельскохозяйственных культур в США (Hawks, 2005). Таксономическая категоризация бактерий основывается на множестве различных методов классификации. С развитием диагностических методов бактериальные штаммы были повторно классифицированы и отнесены к другим подвидам, видам и даже родам (Eichenlaub et al., 2006; Hauben et al., 1998; Gavini et al., 1989; Garrity et al., 2005; Vauterin et al., 1995; Buddenhagen et al., 1964; Jones et al., 2004; Schaad et al., 2006; Young et al., 2001; Fegan et al., 1998; Fegan et

## Быстрая и точная идентификация бактериальных фитопатогенов — насущная необходимость для современного сельскохозяйственного производства.

al., 2005; Normand et al., 1996; Ma et al., 2007; Young et al., 2007; Prior et al., 2005; Castillo et al., 2007; Young et al., 2008; Parkinson et al., 2007; Parkinson et al., 2009).

Например, расовая принадлежность *Xanthomonas pathovars* и *Ralstonia solanacearum* была основана на методе учета растения-хозяина и продуцируемых симптомов. Но этот метод определения принадлежности замещают современные методы, основанные на ДНК (Young et al., 2001). Эти методы применяли для проведения повторной классификации некоторых патоваров *X. axonopodis* по различным видам и подвидам (Jones et al., 2004; Schaad et al., 2006) (например, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* тип С был переклассифицирован как *X. perforans* по результатам проведения ДНК-ДНК-гибридизации).

Также такие методы, как секвенирование 16S рДНК, ДНК-ДНК-гибридизация и другие методы, основанные на генетических и фенотипических свойствах, уже применяют для переклассификации некоторых видов *Pseudomonas*, *X. maltophilia*, *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* и *E. herbicola* в виды *Ralstonia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Dickeya*, *Pectobacterium* и *Pantoea agglomerans* соответственно (Samson et al., 2005; Hauben et al., 1998; Gavini et al., 1989; Garrity et al., 2005; Yabuuchi et al., 1995). Методы идентификации видов на основе ДНК надежны и эффективны, о чем свидетельствует большое количество проводимых на данный момент работ по баркодированию ДНК (Frézal et al., 2008).

При баркодировании ДНК последовательности одного участка, представляющего собой генетический маркер, соотносят с эталонными штаммами, которые были ранее идентифицированы таксономистами. Используемый маркер специфичен для ряда организмов-мишеней. Для животных генетическим штрихкодом является участок быстро развивающегося митохондриального гена цитохромоксидазы (CO1) (Hebert et al., 2003). Для идентификации водорослей в качестве ДНК-штрихкода

предложен универсальный пластидный ампликон — участок хлоропластного генома, вычисленный при помощи ЭВМ (Presting, 2006), который может быть амплифицирован в фотосинтезирующих организмах, будь то цианобактерии, красные, бурые, золотистые и зеленые водоросли или высшие растения (Sherwood et al., 2007). Этот штрихкод показал свою практическую применимость как для исследования биоразнообразия, так и для отбора проб из окружающей среды (Wang et al., 2009; Sherwood et al., 2008).

Ввиду оперативности ПЦР и низкой стоимости секвенирования полученных ампликонов идентификация бактерии на основе ДНК-маркеров стала практичным методом, который замещает традиционные методы классификации, основанные на проведении трудоемких биохимических и биологических анализов. Наиболее широко используемые маркеры получены из рибосомных генов, отчасти потому, что эти гены могут быть амплифицированы в большинстве видов при помощи универсальных праймеров (Normand et al., 1996). Последовательности 16S рДНК были определены для более одного миллиона отдельных штаммов и экологических проб на веб-ресурсе <http://rdp.cme.msu.edu> (Cole et al., 2009).

Также более 18 000 последовательностей внутреннего тринскрибированного спейсера (ITS), который расположен между 16S и 23S рДНК, доступны в базе данных «GenBank» (Benson et al., 1999). Последовательности этих двух маркеров используют для идентификации фитопатогенов и исследования популяционного разнообразия (García-Martínez et al., 1999; Gurtler et al., 1996; Kang et al., 2010). Тем не менее, последовательности 16S ДНК не всегда могут быть эффективны для различения видов внутри рода, и даже более переменные последовательности внутреннего тринскрибированного спейсера не эффективны для различения многих родов ниже видового уровня (García-Martínez et al., 1999). Kang et al. (2010) доказано, что в более чем 80% исследованных грамотрицатель-

ных и грамположительных бактерий (639 из 782 штаммов) присутствуют многочисленные копии генов 16S и 23S рДНК.

Прямое секвенирование ампликонов рДНК из генома, содержащего различные аллели (как было выявлено Kang et al. (2010) в 415 из 782 штаммов), приводит к ухудшению качества полученных последовательностей. Этот недостаток на сегодняшний день устраняется применением двух трудоемких процедур — выделением отдельных ампликонов из агарозного геля (Wilton et al., 1997) и клонированием ампликонов. ДНК-маркеры, полученные из облигатных генов, используют по отдельности или совместно для установления филогенетических связей между бактериями (Ma et al., 2007; Young et al., 2007; Prior et al., 2005; Castillo et al., 2007; Young et al., 2008; Parkinson et al., 2007; Parkinson et al., 2009). Для амплификации этих генов обычно необходимы родоспецифичные праймеры. Облигатные гены проходят стабилизирующий отбор и поэтому более точно отражают генетические взаимосвязи между штаммами, чем гены, проходящие позитивный отбор (Urwin et al., 2003). Гены, проходящие стабилизирующий отбор, также менее подвержены горизонтальному переносу, чем другие гены, например, связанные с патогенностью. Тем не менее, даже облигатные гены могут подвергнуться горизонтальному переносу, о чем свидетельствуют явления рекомбинации внутри гена *gyrB* у видов бактерий из рода вибрионов (Pascual et al., 2010).

Идеальный ДНК-маркер для классификации и идентификации бактерий более вариабельный, чем участки рДНК, присутствующие во всех организмах-мишенях как единичная копия гена на геном, мало подвержен горизонтальному переносу и амплифицируется при помощи универсальных праймеров. Попытки получить универсальные праймеры из участков, не принадлежащих рДНК, оказались безуспешными (Santos et al., 2004), вероятно, ввиду значительного разнообразия и быстро развивающейся природы бактериальных геномов. Мы использовали шесть полностью секвенированных геномов четырех видов рода *Xanthomonas* (da Silva et al., 2002; Qian et al., 2005;

Lee et al., 2005; Thieme et al., 2005) для выявления при помощи ЭВМ маркера, который будет применяться для классификации близкородственных штаммов бактерий.

Маркер фактора инициации репликации (ФИР) участка однокопийного гена *dnaA* оказался наилучшим маркером для различения близкородственных штаммов рода *Xanthomonas*. Мы секвенировали ФИР для 706 штаммов шести фитопатогенных родов из различных коллекций. Эти структуры ФИР доступны в базе данных: <http://genomics.hawaii.edu/RIFdb>.

Полученные результаты указывают на то, что ФИР — подходящий маркер для классификации штаммов, принадлежащих шести родам, использованным в данном исследовании; он дополняет другие ДНК-маркеры, применяемые в мультилокусных анализах последовательностей (MLSA) рода *Xanthomonas*, и может применяться для классификации других бактерий, большинство из которых содержат единичные копии гена *dnaA*.

#### Литература

1. Baker B., Zambryski P., Staskawicz B., Dinesh-Kumar S.P. (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726–723.
2. Gottwald T., Hughes G., Graham J.H., Sun X., Riley T. (2001) The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. *Phytopathol.* 91: 30–34.
3. Hawks B. (2005) Agricultural Bio-terrorism Protection Act of 2002: Possession, use, and transfer of biological agents and toxins; final rule. *Fed. Regist.* 70: 13241–13292.
4. Hayward A.C. (1993) The hosts of *Xanthomonas*. In: Swings J.G., Civerolo E.L., eds. *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall. Pp. 1–18.
5. Denny T.P. (2006) Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam S.S., ed. *Plant-associated Bacteria*. The Netherlands: Springer. Pp. 573–644.
6. Eichenlaub R., Gartemann K.H., Burger A. (2006) *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria; In: Gnanamanickam S.S., ed. *Plant-associated Bacteria*. The Netherlands: Springer. Pp. 131–155; 195–351.
7. Simpson A.J.G., Reinach F.C., Aruda P., Abreu F.A., Acencio M. (2000) The genome sequence of the plant

pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406: 151–159.

8. Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., van Loon L.C. (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol.* 97: 239–243.

9. Samson R., Legendre J.B., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W., et al. (2005) Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al., 1953) Brenner et al., 1973 and *Brenneria paradisiacata* the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiacal* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1415–1427.

10. Hauben L., Moore E.R., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., et al. (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 384–97.

11. Gavini F., Mergaert J., Beji A., Mielcarek C., Izard D., et al. (1989) Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck, 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoeagen. nov.* as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 39: 337–345.

12. Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. (2005) Phylum XIV. Proteobacteria phyl. nov. In: Brenner D.J., Krieger-Huber S., Stanley J.T., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer. Pp. 1–912.

13. Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472–489.

14. Buddenhagen I., Kelman A. (1964) Biological and Physiological Aspects of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2: 203–230.

15. Jones J.B., Lacy G.H., Bouzar H., Stall R.E., Schaad N.W. (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 755–762.

16. Schaad N.W., Postnikova E., Lacy G., Sechler A., Agarkova I., et al. (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 690–695.

17. Young J.M., Bull C.T., De Boer S.H., Dirrao G., Gardan L., et al. (2001) Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria. International

Standards for Naming Pathovars of Phytopathogenic Bacteria. [http://www.isppweb.org/about\\_tpbb\\_naming.asp](http://www.isppweb.org/about_tpbb_naming.asp).

18. Fegan M., Taghavi M., Sly L.I., Hayward A.C. (1998) Phylogeny, diversity, and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In: Prior P., Allen C., Elphinstone J.G., eds. *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Berlin: Springer-Verlag. Pp. 19–33.

19. Fegan M., Prior P. (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In: Allen C., Prior P., Hayward A.C., eds. *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. St. Paul MN: APS Press. Pp. 449–461.

20. Normand P., Ponsonnet C., Nesme X., Neyra M., Simonet P. (1996) ITS analysis of prokaryotes; In: Akkermans D.L., van Elsas J.D., de Bruijn E.I., eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Pp. 1–12.

21. Ma B., Hibbing M.E., Kim H., Reedy R.M., Yedidia I., et al. (2007) Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathol.* 97: 1150–1163.

22. Young J.M., Park D.C. (2007) Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial *atpD*, *carA*, and *recA* as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 343–354.

23. Prior P., Fegan M. (2005) Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Hort.* 695: 127–136.

24. Castillo J.A., Greenberg J.T. (2007) Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1225–1238.

25. Young J.M., Park D.C., Shearman H.M., Fargier E. (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 366–77.

26. Parkinson N., Aritua V., Heeney J., Cowie C., Bew J., et al. (2007) Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2881–2887.

27. Parkinson N., Cowie C., Heeney J., Stead D. (2009) Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2881–2887.

28. Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta H., Nishiuchi Y. (1995) Transfer

- of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis, 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 39: 897–904.
29. Frézal L., Leblois R. (2008) Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infect. Genet. and Evol.* 8: 727–736.
30. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., DeWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. London Ser.* 270: 313–321.
31. Presting G.G. (2006) Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. *Can. J. Bot.* 84: 434–443.
32. Sherwood A.R., Presting G.G. (2007) Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *J. Phycol.* 43: 605–608.
33. Wang N., Sherwood A., Kurihara A., Conklin K., Sauvage T., et al. (2009) The Hawaiian Algal Database: a laboratory LIMS and online resource for biodiversity data. *BMC Plant Biol.* 9: 117.
34. Sherwood A.R., Chan Y.L., Presting G.G. (2008) Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream phyton community. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 1011–1014.
35. Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., et al. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37: D141–D145.
36. Benson D.A., Boguski M.S., Lipman D.J., Ostell J., Ouellette B.F., et al. (1999) GenBank. *Nucleic Acids Res* 27: 12–17.
37. García-Martínez J., Acinas S.G., Antón A.I., Rodríguez-Valera F. (1999) Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods* 36: 55–64.
38. Gurtler V., Stanisich V.A. (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 142: 3–16.
39. Kang Y.J., Cheng J., Mai L.J., Hu J., Piao. Z (2010) Multiple copies of 16S rRNA gene affect the restriction patterns and DGGE profile revealed by analysis of genome database. *Microbiol.* 79: 655–662.
40. Wilton S.D., Lim L., Dye D., Laing N. (1997) Bandstab: a PCR-based alternative to cloning PCR products. *BioTechniques* 22: 642–645.
41. Urwin R., Maiden M.C.J. (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11: 479–487.
42. Pascual J., Macián M.C., Arahal D.R., Garay E., Pujalte M.J. (2010) Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibriosis* using the 16S rRNA, recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB and toxR genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 154–165.
43. Santos S., Ochman H. (2004) Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ. Microbiol.* 6: 754–759.
44. da Silva A.C.R., Ferro J.A., Reinach F.C., Farah C.S., Furlan L.R., et al. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459–463.
45. Qian W., Jia Y., Ren S.X., He Y.Q., Feng J.X., et al. (2005) Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* 15: 757–767.
46. Lee B.M., Park Y.J., Park D.S., Kang H.W., Kim J.G., et al. (2005) The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* 33: 577–86.
47. Thieme F., Koebnik R., Bekel T., Berger C., Boch J., et al. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* 187: 7254–7266.

# CLASSIFICATION

## of Plant Associated Bacteria Using RIF DNA Marker

Kevin L. Schneider<sup>1</sup>, Glorimar Marrero<sup>1</sup>,

Anne M. Alvarez<sup>2</sup>, Gernot G. Presting<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Molecular Biosciences and Bioengineering, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, United States of America

<sup>2</sup> Plant and Environmental Protection Sciences, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, United States of America

PLoS ONE 6(4) e18496 doi: 10.1371/journal.pone.0018496

A DNA marker that distinguishes plant associated bacteria at the species level and below was derived by comparing six sequenced genomes of *Xanthomonas*, a genus that contains

many important phytopathogens. This DNA marker comprises a portion of the dnaA replication initiation factor (RIF). Unlike the rRNA genes, dnaA is a single copy gene in the vast ma-

jority of sequenced bacterial genomes, and amplification of RIF requires genus-specific primers. In silico analysis revealed that RIF has equal or greater ability to differentiate closely related