

ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА РИСА НА ОСНОВЕ ПЦР

М.С. Егорова¹, А.Н. Игнатов²,
Е.С. Мазурин¹

¹ФГБУ Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ ВНИИКР)
ул. Пограничная, 32, п. Быково, Раменский район, Московская область, 140150

²Кафедра ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

На основе анализа оригинальных и ранее опубликованных последовательностей ДНК *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* были разработаны праймеры для ПЦР «в реальном времени», позволяющие достоверно идентифицировать возбудителя бактериального ожога риса, без перекрестных реакций с близкородственными видами. Была оптимизирована среда для БИО-ПЦР YPGA, содержащая в качестве селективирующих факторов антибиотики циклогексимид 50 мг/л + цефазолин 30 мг/л + гентамицин 2 мг/л. Показано, что чувствительность праймеров при БИО-ПЦР с использованием оригинальной селективной питательной среды в 100 раз эффективнее прямого ПЦР анализа. Оптимизированная БИО-ПЦР диагностика возбудителя бактериального ожога риса позволяла обнаружить 50 КОЕ/мл семенного экстракта.

Ключевые слова: бактериальный ожог риса, ПЦР «в реальном времени», БИО-ПЦР.

Бактериальный ожог риса (возбудитель *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [4]) относится к числу наиболее вредоносных заболеваний во всем мире [7]. Вызывает заболевания многих растений: культурного риса, некоторых видов дикого риса, проса куриного и рисового, злаковых сорняков, сныти круглой и др. В странах тропической Азии потери урожая составляют от 22 до 81%, в странах с умеренным климатом — несколько ниже [2].

Бактериальный ожог риса внесен в Список А1 Перечня ЕОКЗР (Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений) [3].

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* на данный момент входит в перечень карантинных организмов, не зарегистрированных на территории Российской Федерации.

Заболевание переносится в свободные от заражения районы с семенным материалом. В связи с расширением торговых отношений и импортом в Российскую

Федерацию семян из стран распространения данного бактериоза увеличивается опасность его завоза в нашу страну.

Тестирование зараженности семян является достаточно сложной задачей, так как возбудитель находится в семенах под оболочкой и в небольших количествах, в связи с чем разработка чувствительных и достоверных методов диагностики имеют большое значение.

Целью нашей работы было создание надежной тест-системы для диагностики возбудителя бактериального ожога в семенах риса. Для достижения поставленной цели планировалось решение следующих задач:

- 1) подбор и проверка ПЦР праймеров, специфичных для *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*;
- 2) разработка протокола БИО-ПЦР анализа для диагностики бактериального ожога риса;
- 3) сравнение чувствительности БИО-ПЦР и прямого ПЦР анализа.

Объекты и методы исследования. В работе использовали коллекцию бактерий (47 штаммов), предоставленную лабораторией бактериальных болезней ГНУ-ВНИИ фитопатологии РАСХН, а также типовые штаммы *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*.

Выделение ДНК из бактерий проводили набором «Проба ГС» кат. № Р-003/1 («ДНК-Технология», Москва), основанным на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента — гуанидина тиоцината (GuSCN), и с последующей сорбцией ДНК на носителе.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 для количественного определения НК и белка. Оценку качества экстрагированной ДНК проводили на основании измерения оптической плотности раствора ДНК при 280 и 260 и 230 нм. Для чистых образцов ДНК соотношение оптических плотностей, полученных при 260/280 нм, должно быть около 1,8, при 260/230 нм 1,8—2,2.

Амплификацию и детекцию в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США). Для проведения ПЦР «в реальном времени» были разработаны праймеры и специфичный зонд. Подбор праймеров и зондов осуществлялся на основе гена *gyr B* [1]. Праймерные системы на основе последовательностей гена *gyrB* позволяют диагностировать бактерии рода *Xanthomonas* до вида [5; 6]. Синтез праймеров и зондов проводили в ЗАО «Синтол», Москва.

Из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) были выбраны нуклеотидные последовательности гена *gyr B* возбудителей бактериального ожога риса. Также при анализе использовали данные секвенирования чистых культур *Xanthomonas spp.* из коллекции ГНУ-ВНИИ фитопатологии РАСХН. Всего было проанализировано около 48 нуклеотидных последовательностей. Анализ последовательностей и выбор праймеров проводили с помощью программ «BioEdit» и «Primer 3».

Объем реакционной смеси составлял 25 мкл и включал 2,5 мкл 10хПЦР буфера, 2,5 мкМ $MgCl_2$, 200 мкМ dNTP по 7,5 пкМ праймеров, 5 пкМ зонда, 1 ед. термостабильной полимеразы («Диалат», Москва) и 5 мкл ДНК. Реакцию проводили

при следующих температурно-временных условиях: 1 цикл 95 °С — 5 мин; 40 циклов 95 °С — 15 сек, 61 °С — 40 сек.

Для разработки БИО-ПЦР анализа использовали партию риса сорта «Луговой», который искусственно заражали типовым штаммом *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* NCCPB 3002T в условиях вакуума.

Партию искусственно зараженных семян стерилизовали в 10% гипохлорите натрия 2 мин, промывали 3 раза в стерильной воде, помещали в PBS с добавлением Твин 20 (на 500 г семян 750 мл PBS 1x + 0,01% Tween 20). Охлаждали при +4 °С 24 часа. Помещали на шейкер на 30 минут, 210 об./мин. Далее гомогенизировали 2 мин, со скоростью 8, пропускали через бактериологический фильтр и высевали на селективную питательную среду YPGA с разными антибиотиками и наблюдали за ростом целевой бактерии, а также сапротрофной микробиоты. Возможность выделения патогена наблюдали визуально и для подтверждения ставили ПЦР «в реальном времени» с подозрительными колониями.

Сравнение чувствительности прямого и БИО-ПЦР анализа проводили путем внесения известного числа клеток возбудителя в семенной экстракт с последующей постановкой ПЦР. Готовили суспензию клеток *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Определение концентрации бактериальной суспензии проводили методом серийных разведений. Подсчет колоний проводили через сутки и рассчитывали концентрацию бактерий (КОЕ/мл).

Из каждого разведения бактериальной суспензии вносили по 100 мкл к 1 мл семенного экстракта. Таким образом, формировали различные варианты семенных экстрактов с известным количеством клеток возбудителя.

Для сравнения чувствительности прямого и био-ПЦР анализа использовали ПЦР «в реальном времени» с разработанными праймерами X.o.F и X.o.R и пробой X.o.P. В первом случае ставили прямую ПЦР, при котором исследовали полученный семенной экстракт. Во втором случае проводили Био-ПЦР, т.е. семенной экстракт высевали на питательные среды. Смыв с поверхности чашек проводили через 18 часов после посева, добавляя в чашку 500 мкл стерильного физраствора. Пробы до проведения ПЦР-анализа хранили при — 18 °С.

Результаты и обсуждения. На начальном этапе исследований нами была проанализирована литература, характеризующая различия в пределах рода *Xanthomonas* на уровне нуклеотидных последовательностей определенных участков генома. Наиболее подходящим геном — мишенью для разработки видоспецифичных праймеров и зондов — является ген субъединицы Б фермента ДНК-гиразы (*gyrB*).

На основании выровненных последовательностей нами были разработаны праймеры X.o.F — GGC AAY CAG CAT CCG GC и X.o.R — CTT CGC CCA TAT GAC GGC, а также меченный флуоресцентным красителем HEX зонд, специфичные для *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*.

После подбора зонда проверяли его специфичность. Было установлено, что флуоресценция по красителю HEX регистрировались только при исследовании ДНК данного возбудителя. При тестировании других видов рода *Xanthomonas*, а также других фитопатогенных бактерий, выделенных с риса, зафиксирован отрицательный результат. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Специфичность ПЦР «в реальном времени» с зондом X.OR.-P

ДНК возбудителя	Зонд X.OR.-P
<i>X. oryzae</i>	23,96
<i>X. campestris</i>	NA
<i>X. axonopodis</i>	NA
<i>X. arboricola</i>	NA
<i>X. hortorum</i>	NA
<i>X. cynarae</i>	NA
<i>X. pisi</i>	NA
<i>X. gardeneri</i>	NA
<i>Erwinia amylovora</i>	NA
<i>Dickeya dianthicola</i>	NA
<i>Pantoea agglomerans</i>	NA
<i>Pseudomonas sp.</i>	NA

Примечание: NA — отсутствие сигнала флуоресценции.

На первоначальном этапе разработки БИО-ПЦР диагностики была выбрана оптимальная среда, для роста и размножения целевой бактерии. При использовании среды YPGA, содержащей дрожжевой экстракт (5,0 г/л), пептон (5,0 г/л), глюкоза (10,0 г/л), агар (12,0 г/л), рост бактерий был обнаружен через 17 часов. Далее семенной экстракт высевали на чашки со средой YPGA с разными антибиотиками в качестве селективирующего фактора и наблюдали за ростом целевой бактерии, а также сапротрофной микробиоты. Только в варианте с использованием комбинации антибиотиков Циклогексимид 50 мг/л + цефазолин 30 мг/л + гентамицин 2 мг/л был виден рост целевой бактерии через сутки.

Было проведено сравнение чувствительности диагностики прямой и БИО-ПЦР, при этом последняя модификация показала более высокую чувствительность. Использование БИО-ПЦР в 100 раз повышает чувствительность диагностики в сравнении с прямой ПЦР. Оптимизированная БИО-ПЦР диагностика возбудителя бактериального ожога риса позволяла обнаружить 50 КОЕ/мл семенного экстракта. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Чувствительность прямой ПЦР и оптимизированной БИО-ПЦР для диагностики семян риса, зараженных *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Праймеры X. or F_X. or. R, зонд X.OR.-P

Среда	Концентрация <i>Xanthomonas oryzae</i> в семенном экстракте, клеток/мл							
	$5,2 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$	$5,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$	$5,2 \times 10^3$	$5,2 \times 10^2$	$5,2 \times 10^1$
Прямая ПЦР	29,92*	30,92	31,54	33,21	34,28	35,61	N/A	N/A
БИО-ПЦР	26,06	28,65	29,47	30,05	30,99	32,15	33,87	34,61
K+(ДНК возбудителя)	21,86	25,03	26,39	28,06	30,18	31,14	32,14	33,40
K- (здоровые семена)	—	—	—	—	—	—	—	—

*числовые значения — пороговые значения цикла (C_t).

Выводы

1. Разработаны праймеры, позволяющие достоверно идентифицировать возбудителя бактериального ожога риса и не дающие перекрестных реакций с близкородственными видами.

2. Разработана селективная питательная среда YPGA, содержащая в качестве селектирующих факторов антибиотики циклогексимид 50 мг/л + цефазолин 30 мг/л + гентамицин 2 мг/л для проведения БИО-ПЦР.

3. Показано, что чувствительность метода БИО-ПЦР с использованием разработанной селективной питательной среды составила около 50 КОЕ патогена в 1 мл семенного экстракта.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Пунина Н.В., Зотов В.С., Кузнецов Б.Б., Игнатов А.Н. Оценка генетического разнообразия межгенного транскрибируемого региона 16S-23S рРНК, гена *gyrB* и разработка ПЦР диагностики фитопатогенных ксантомонад // Вестник Московского государственного областного университета. — 2008. — № 2. — С. 3—17.
- [2] OEPP/EPPO. Data sheets on quarantine organisms, *Xanthomonas oryzae* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 1990. — V. 16. — P. 1—8.
- [3] OEPP/EPPO. Diagnostics, *Xanthomonas oryzae* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 2007. — V. 37. — P. 543—553.
- [4] Swings J.G., Van Den Mooter M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T.W. and Kersters K. Reclassification of the causal agents of bacterial blight *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzae* and bacterial leaf streak *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzicola* of rice as pathogens of *Xanthomonas oryzae* new species Ex Ishiyama // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1990. — V. 40. — P. 309—311.
- [5] Yamamoto S., Bouvet P.J. and Harayama S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA–DNA hybridization // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1999. — V. 49. — P. 87—95.
- [6] Yamamoto S. and Harayama S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1996. — V. 46. — P. 506—511.
- [7] Zhao W.J., Zhu S.F., Liao X.L., Tan T.W. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in seeds using a specific TaqMan probe // Molecular Biotechnology. — 2007. — V. 35. — P. 119—127.

DEVELOPMENT DIAGNOSTIC METHODS OF BACTERIAL BLIGHT OF RICE ON BASED PCR

M.S. Egorova¹, A.N. Ignatov², E.S. Mazurin¹

¹All-Russian Plant Quarantine Center

Pogranichnaya str., 32, Bykovo, Ramenskoe, Moscow region, Russia, 140150

²Department of botany, plant physiology and agrobiotechnology

Peoples' Friendship University of Russia

Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

Primers identifying bacterial blight pathogen, without cross-reactions with closely related species were designed based on the analysis of the original and GeneBank DNA sequences of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Media YPGA containing cycloheximide 50 mg / l + cefazolin 30 mg / l + gentamicin 2 mg / l has been optimized for BIO-PCR. Sensitivity of the BIO-PCR analysis using original selective media up to 100 times more effective than direct PCR analysis. The sensitivity of the primers in BIO-PCR analysis with original selective media has achieved 50 CFU/ml.

Key words: Bacterial leaf blight of rice, Real-time PCR, BIO-PCR.

REFERENCES

- [1] *Punina N.V., Zotov V.S., Kuznecov B.B., Ignatov A.N.* Ocenka geneticheskogo raznoobrazija mezhhennogo transkribiruемого региона 16S-23S rRNK, gena GYRB i razrabotka PCR diagnostiki fitopatogennyh ksantomonad // Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta. — 2008. — № 2. — S. 3—17.
- [2] OEPP/EPPO. Data sheets on quarantine organisms, *Xanthomonas oryzae* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 1990. — V. 16. — P. 1—8.
- [3] OEPP/EPPO. Diagnostics, *Xanthomonas oryzae* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 2007. — V. 37. — P. 543—553.
- [4] *Swings J.G., Van Den Mooter M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T.W. and Kersters K.* Reclassification of the causal agents of bacterial blight *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzae* and bacterial leaf streak *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzicola* of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* new species Ex Ishiyama // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1990. — V. 40. — P. 309—311.
- [5] *Yamamoto S., Bouwet P.J. and Harayama S.* Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA–DNA hybridization // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1999. — V. 49. — P. 87—95.
- [6] *Yamamoto S. and Harayama S.* Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1996. — V. 46. — P. 506—511.
- [7] *Zhao W.J., Zhu S.F., Liao X.L., Tan T.W.* Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in seeds using a specific TaqMan probe // Molecular Biotechnology. — 2007. — V. 35. — P. 119—127.