

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ ФИТОТОКСИНОВ КОРОНАТИНА И СИРИНГОПЕПТИНА В ГЕНОМАХ БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

**Феоктистова Наталья Александровна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Мастиленко Андрей Владимирович**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Сулдына Екатерина Владимировна**, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Богданов Ильгизар Исмаилович**, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47; e-mail: feokna@yandex.ru

**Ключевые слова:** коронатин, сирингопептин, *Pseudomonas syringae*, бактериофаг, генетическая детекция, геном, система

В статье представлены результаты исследований по разработке систем генетической детекции фитотоксинов коронатина и сирингопептина в геномах бактериофагов *Pseudomonas syringae*. Коллективом авторов с использованием электронных ресурсов NCBI: BLAST nucleotide и PRIMER BLAST были сконструированы системы детекции фрагментов детерминант факторов патогенности (фитотоксинов) – коронатина и сирингопептина. Были определены нуклеотидные последовательности, исследованы гомологии, характерные для иных фитопатогенов. Система олигонуклеотидов (праймеров и зонда) для детекции фрагмента генов фитотоксинов *Pseudomonas syringae* коронатина (ген ста А) включает праймеры: прямой - СААТТGCATCTCGTCGGCTG, обратный - АТТАСАAGCGGCTAACGCCT, зонд - ВНQ1-ACCACACGACGGCTTTCAGCC-Fam и сирингопептина (ген суп С): прямой праймер - СТТGCAGTTCGTGATCCAGC, обратный - ТТGCATCGGTTCTGTCAGTC, зонд - ВНQ1-TGCGCACTGCACTGGTCTGG-Fam. Проведен ряд экспериментов по оптимизации протокола проведения амплификации: денатурация ДНК при температуре 95 °С 300 секунд однократно; отжиг праймеров - при температуре 95 °С 10 секунд, при температуре 60 °С 30 секунд - 5 циклов; элонгация - при температуре 95 °С 5 секунд, при температуре 60 °С 10 секунд флуоресценция – 40 циклов. По данным амплификации данные детерминанты коронатина и сирингопептина не были идентифицированы в геномах бактериофагов *Ps.s.7* УлГАУ и *Ps.s.27* УлГАУ, входящих в состав биопрепарата. При изучении генома бактериального штамма *Pseudomonas syringae* № 3, использованного в качестве маточной культуры при наработке биомассы бактериофагов, детерминанты коронатина и сирингопептина были выявлены.

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области РФ в рамках научного проекта № 19-44-730014.**

### Введение

Согласно данным научной литературы, бактерии *Pseudomonas syringae* поражают широкий спектр растений, симптомы вызываемых бактериозов проявляются в виде гнилей, различного вида пятнистостей листьев, образованием галлов [1-2]. Разнообразие признаков инфекции и видов чувствительных растений позволило дифференцировать вид бактерии *Pseudomonas syringae* на патоварианты в зависимости от поражаемого растения, что было оптимально для агрономии, но утрачивает актуальность из-за выявляемых случаев контаминации патоварами разных растений-хозяев. Также есть данные, что штаммы *Pseudomonas syringae* одного патовара могут не иметь близкого филогенетического родства [3-4]. В настоящее время *Pseudomonas*

*syringae* включает более чем 60 патоваров, выделено девять геномовидов [2, 5]. Однако эксперименты показывают, что вышеназванные бактерии выделяются с растений, не имеющих каких-либо симптомов поражения, Это свидетельствует о его способности к комменсализму. По литературным данным некоторые фитопатогенные бактерии определенное время существуют как эпифиты или эндофиты, не вызывая патологического процесса у растения-хозяина. Но при определенных обстоятельствах происходит переход бактерии из резидента в фитопатогенную форму [1, 6-7]. Эволюционная динамика фитопатогенных псевдомонад позволяет обходить системы защиты сельскохозяйственных культур, быстро адаптироваться к новым растениям-хозяевам, обеспечивает устойчивость к антибактериальным агентам [8], поэтому важно

иметь надежные методы идентификации, которые позволят быстро и качественно выявлять бактерии *Pseudomonas syringae* в различных субстратах [9-11].

Авторами исследований разработан фаговый биопрепарат на основе выделенных и селекционированных бактериофагов Ps.s.7 и Ps.s.27 серии УлГАУ для индикации, идентификации *Pseudomonas syringae* и в качестве инструмента биопроцессинга. При исследовании возможности переноса факторов патогенности бактериофагами, активными в отношении *Pseudomonas syringae*, важно понимание, что фаговая ДНК может нести в своем составе гены (или их фрагменты), определяющие видовую патогенность для растений [12-13]. Учитывая возможность горизонтального переноса генов, цель данного исследования – разработка системы для молекулярно-генетической детекции генов, кодирующих экспрессию коронатина и сирингопептина, которые частично определяют факторы патогенности бактерий *Pseudomonas syringae* в отношении сельскохозяйственных культур.

#### Материалы и методы исследований

В исследовании был использован штамм бактерии *Pseudomonas syringae* № 3, полученный из микробиологического музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ; бактериофаги Ps.s.7 и Ps.s.27 серии УлГАУ, выделенные коллективом авторов.

Для подбора и оптимизации праймеров, специфичных в отношении изучаемых бактерий и бактериофагов, были использованы ресурсы NCBI: BLAST nucleotide и PRIMER BLAST. Систем праймеров и зондов осуществлялся методом химического концентрирования на приборе ASM-800 (фирма «Биоссет», г. Новосибирск) с

#### Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000, complete sequence

NCBI Reference Sequence: NC\_004578.1

FASTA Graphics

Go to: [ ]

```
1..297
/contig="cmaL"
/locus_tag="PSPTO_RS24420"
/old_locus_tag="PSPTO4723"
/old_locus_tag="PSPTO_4723"
/inference="COORDINATES: similar to AA
sequence:RefSeqIMP_90580835.1"
/notes="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: Protein Homology."
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="coronamic acid biosynthesis protein cmaL"
/protein_id="WP_089588835.1"
/db_xref="GeneID:1185486"
/translation="MSAVYLGKMSITDQARYDNYKRLTPDIVKAHGRFRISGGQKFL
LEGEAESRRVIVIEFVSEAAQKFYIYSEYTKARHLREGAADENQLFIVEGVDM"
ORIGIN
1 atgagcgctt atcttattgg taaatgagt atccaccacc aagctcgta tgataattc
61 aagcgcctaa cgtctgacat tggaaagct catgagacc gctctatct papgagggc
121 cagaagttc ttttggagg agagctgaa agcctcgtg tggatggtt agatctcct
181 tcagttgag cagcacaga gtttacaat tctgaagat atacaagcc tagacacctt
241 cgcgaagtg cagccagca gatcaattg ttcattgtg agggagtag taactag
//
```

Рис. 1 - Нуклеотидная последовательность гена *cmaA Pseudomonas syringae*

использованием реагентов: мономеров (dA-CE фосфорамидид, dC(Bz) CE фосфорамидид, dG-CE фосфорамидид, dT-CE фосфорамидид), активатора 5- Ethylthio-1H-Tetrazole, полимеров CPG, колонки 100nmol/ 12 ul (dA, dC, dG, T). Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов EX 511 «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол», г. Москва), для постановки ПЦР применяли набор реагентов R-412 «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ», имеющий состав: дезоксирибонуклеотидтрифосфаты - 2,5 мМ, 10-кратный ПЦР буфер, MgCl<sub>2</sub> – 25 мМ, Taq ДНК-полимераза с ингибирующей активностью фермента антителами-5 Е/мкл (ООО «Синтол», г. Москва).

Лабораторная посуда и оборудование: центрифуга Микроспин FV-2400 (BioSan, Латвия), центрифуга Eppendorf 5804, Центрифуга/вортекс для пробирок (BioSan, Польша), ламинарный бокс БМБ-II-«Ламинар-С»-1 2 (ЛамСистем, Россия), твердотельный термостат TDB120 (BioSan, Польша), центрифуга-встряхиватель медицинская серии CM-50M (ELMI, Польша), амплификатор, детектирующий «ДТ прайм» (ДНК

select all 13 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. maculicola str. ES4326 chromosome, complete genome	Pseudomonas...	549	549	100%	7e-152	100.00%	6115755	CP047260.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. tomato strain delta VI chromosome	Pseudomonas...	549	549	100%	7e-152	100.00%	6397110	CP047071.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. tomato strain delta X chromosome, complete genome	Pseudomonas...	549	549	100%	7e-152	100.00%	6397114	CP047073.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas coronafaciens pv. oryzae str. 1_6 chromosome, complete genome	Pseudomonas...	549	549	100%	7e-152	100.00%	5862937	CP046035.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas cannabina pv. alisalensis strain ES4326 chromosome	Pseudomonas...	549	549	100%	7e-152	100.00%	6115622	CP084323.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas cannabina pv. alisalensis strain MAFF 301419 chromosome, complete genome	Pseudomonas...	549	549	100%	7e-152	100.00%	6103677	CP067022.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. tomato AvrPphD1 (avrPphD1) gene, partial cds; putative transposase, AvrPp...	Pseudomonas...	549	549	100%	7e-152	100.00%	11937	AF469470.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000, complete genome	Pseudomonas...	549	549	100%	7e-152	100.00%	6397126	AE016853.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas amygdali pv. aesculi strain JBJ5 plasmid pGYL1, complete sequence	Pseudomonas...	521	521	100%	2e-143	98.32%	114962	CP093432.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas syringae strain Ps25 plasmid pPs252	Pseudomonas...	516	1543	100%	7e-142	97.98%	121060	CP034559.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. tomato strain B13-200 plasmid pB13-200A, complete sequence	Pseudomonas...	516	516	100%	7e-142	97.98%	125801	CP019872.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas amygdali pv. morsprunorum strain R15244 plasmid p2_tig3, complete sequence	Pseudomonas...	516	516	100%	7e-142	97.98%	168854	CP026559.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas syringae isolate CFBP3840 genome assembly, plasmid: PP3	Pseudomonas...	516	516	100%	7e-142	97.98%	86369	LT963412.1

Рис. 2 - Анализ специфичности гена *cmaA Pseudomonas syringae*

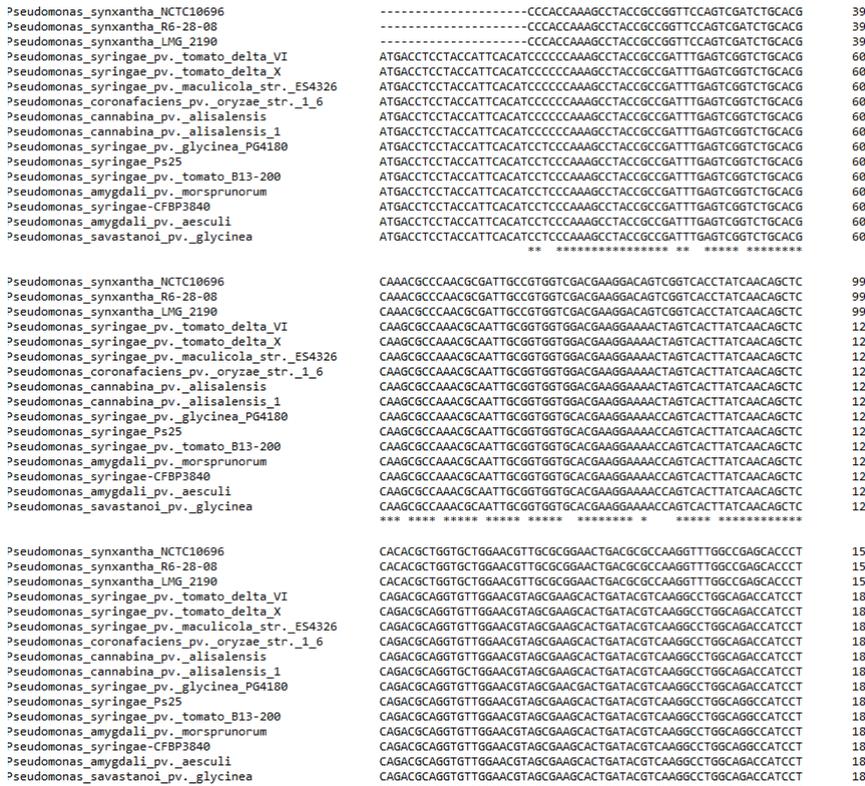


Рис. 3 - Выравнивание гена *stmA* (фрагмент) *Pseudomonas syringae*.

**Pseudomonas syringae strain BIM B-268 chromosome, complete genome**

NCBI Reference Sequence: NZ\_CP088034.2

FASTA Graphics

Go to: [icon]

LOCUS NZ\_CP088034 40650 bp DNA linear CON 14-APR-2022  
 DEFINITION Pseudomonas syringae strain BIM B-268 chromosome, complete genome.  
 ACCESSION NZ\_CP088034 REGION: complement(2935334..2974183)  
 VERSION NZ\_CP088034.2  
 DBLINK BioProject: PRJNA224116  
 BioSample: SAMN1727857  
 Assembly: GCF\_016694755.2  
 KEYWORDS RefSeq.  
 SOURCE Pseudomonas syringae  
 ORGANISM Pseudomonas syringae  
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;  
 Pseudomonadaceae; Pseudomonas.  
 CDS  
 1..40650  
 /gene="sypC"  
 /locus\_tag="J1Q97\_RS12690"  
 /old\_locus\_tag="J1Q97\_12335"  
 /inference="COORDINATES: similar to AA  
 sequence:RefSeq:WP\_046722596.1"  
 /note="Derived by automated computational analysis using  
 gene prediction method: Protein Homology."  
 /codon\_start=1  
 /transl\_table=11  
 /product="syringopeptin non-ribosomal peptide synthetase  
 SypC"  
 /protein\_id="WP\_201420210.1"

ORIGIN  
 1 atgcattca gcaattgat ggcattttt tccacgacc cpatccttt tcaacgaaa  
 61 gaagatgat tctgattct tggacacac gaaggccgtt acatgccc acatgaagc  
 121 ctgacgctg acaagcaga actgtgacg ctgtgactg gaattggcc gtagctgctc  
 181 agtccgggt ttgcattac cagccatgt ctgcccgtg caactcga tcagaaagc  
 241 attgaccga tctgacgac ggtaccgga gggctggtg atgtcagga tattaccaca  
 301 ctgcccacc tgcagaaag gattctctc catcacctg cggcaggca ggtgatccc  
 361 tatgtattg aggcctgtt cgggcccag agtccgaac cctcctgta ctctgccc  
 421 gactcagc cgtgatgca accatgac atctcggca cgggatgat ctgggaaggt  
 481 ctgacagca ccatcgaag ggtgtactg gaggcagc gctcgtgga tggatgaca  
 541 ctgacgccc cgcagctga catcgaacc cggctgccc agcatttga taccggcc  
 601 tactcttgg acctgcgca cggcccgct atgcatagg ttgcttga agataccgc  
 661 aatgctcgt ggtgctcat cctgctgat caccattct caattgaca cggcgaatg  
 721 gactctgga aacacagat cagggcctt ctgctcgtg agggccatc ctctgccc  
 781 acagtccct atgcaacta cgtggcaat cggcactgg gttcggggc taatgctat  
 841 gaagttttt ttccggatg tctgcccag atcgtgagc caactctgc gttcgggat  
 901 gttggaaga cggcagaga ctatgctga gaagctgc gctcgaatg cgtgatcca  
 961 gttgagccc gttcgggac cctgcccga cagctgggg cagtgcgac gactcctat  
 1021 cactcgcac gggcctggt ggtgggtgg ctgtcagga agtggagct ggttttgg  
 1081 agctgctga tggccggat gcaaggccc gacggccgc atcagctgt ggtatgttc  
 1141 atcaaacct tgccttggc ggtcagcctt gaaggcagc cggtcgca agggctcga  
 1201 accaccacg cagcgtgac cgcattgct ggtcagaac accgctcct gggccagcc  
 1261 cagcttga gttggctgc cgcacggca cgtttgtca atctgctc caattatgc  
 1321 caagtgca cggcagcga agctgctga gaggcttc agtcgca aggttgcg  
 1381 agatgggca cgaatgct cagcttacc cgtatcagc tttgatgca cagctggc  
 1441 caggcttca actgacat caagcctg gctcagatg gtcacagc catcggcac  
 1501 tatattgta cggcactgg cagctggtt gatgctcgt agcagacc caaacccc

Рис. 4 - Нуклеотидная последовательность гена *surC* *Pseudomonas syringae*

технология, Россия).

**Результаты исследования**

Для изучаемых фитотоксинов были определены нуклеотидные последовательности в системе NCBI, исследованы гомологии, характерные для других фитопатогенов. Так для коронатины *Pseudomonas syringae* определена последовательность гена *stmA*, представленная на рисунке 1.

Данные по специфичности данного гена для *Pseudomonas syringae* отражены на рисунке 2.

Проведено выравнивание гена *stmA* (рис. 3). Установлено, что на 97% имеются гомологии с другими представителями рода *Pseudomonas*. Поскольку не исключен горизонтальный перенос гена между видами одного рода (включен в состав плазмиды), нами была выбрана область, соответствующая всем представленным геномам.

Последовательности праймеров и олигонуклеотидного зонда представлены в таблице 1.

Сирингопептин является фитотоксином, состоящим из 22 аминокислот, он индуцирует некроз растительной ткани. Генетический кластер фитотоксина включает в себя гены *surA*, *surV* и *surC*. Последний содержит два С-концевых домена тиоэстеразы, которые катализируют высвобождение сирингопептина из синтетазы и циклизацию пептида с образованием лактонового кольца и включает 40, 6 тыс. пар нуклеотидов [14].

На основании базы данных NCBI определен нуклеотидный состав гена *surC* (рис. 4).

Специфичность гена *surC* представлена на рисунке 5. Проведено выравнивание гена (рис. 6).

Последовательности подобранных праймеров и олигонуклеотидного зонда указаны в таблице 1.

При последовательном сравнительном анализе всех представленных праймерных систем было исключено образование возможных

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓ Pseudomonas syringae strain BIM B-268 chromosome, complete genome	Pseudomonas syringae	75067	2.326e+05	100%	0.0	100.00%	6018586	CP0688034.2
✓ Pseudomonas syringae CC1557, complete sequence	Pseudomonas syringae CC1557	30958	2.091e+05	100%	0.0	94.04%	5758024	CP007014.1
✓ Pseudomonas congelans strain TL2 chromosome, complete genome	Pseudomonas congelans	30524	1.889e+05	99%	0.0	93.03%	5719128	CP053029.1
✓ Pseudomonas congelans strain 508 chromosome, complete genome	Pseudomonas congelans	30367	1.924e+05	99%	0.0	92.90%	5843414	CP053030.1
✓ Pseudomonas syringae pv. lapsa strain ATCC_10859 chromosome, complete ge...	Pseudomonas syringae pv. lapsa	30070	1.704e+05	100%	0.0	92.64%	5918899	CP013183.1
✓ Pseudomonas syringae strain U643 chromosome, complete genome	Pseudomonas syringae	29593	1.669e+05	100%	0.0	92.22%	6191793	CP074410.1
✓ Pseudomonas syringae strain KF529 chromosome, complete genome	Pseudomonas syringae	28978	1.977e+05	100%	0.0	91.69%	6077291	CP074409.1
✓ Pseudomonas syringae strain SHP26 chromosome	Pseudomonas syringae	28923	1.969e+05	100%	0.0	91.64%	5969308	CP075880.1
✓ Pseudomonas syringae pv. syringae HS191, complete genome	Pseudomonas syringae pv. syringae...	28814	1.935e+05	100%	0.0	91.03%	5950211	CP006256.1
✓ Pseudomonas syringae pv. atrofaciens strain LMG5095 chromosome, complete...	Pseudomonas syringae pv. atrofaci...	28773	2.364e+05	100%	0.0	91.51%	6080544	CP028490.1

Рис. 5 - Анализ специфичности гена *sypC* *Pseudomonas syringae* (фрагмент)

Pseudomonas_syringae_strain_U643	-----	0
Pseudomonas_syringae_pv._syringae_HS191,	-----	0
Pseudomonas_syringae_CC1557,	GCCGTCGCCACCGATGAAGATCTCACCGCCACGCCGATGGCACTGGCTGCTGATGGGC	1204
Pseudomonas_syringae_CC440	GAGATATCTGACCGGACACGACTGGACGCTTTCAGC---GGCGCCTTCAAGCGGTGATC	1602
Pseudomonas_syringae_strain_Susan762	-----	0
Pseudomonas_congelan_strain_508	GCCTTTGACAACCTCGAGCGCCTGGACGCTTTCGTT---CAGGCCTTGCAGATGGTCATC	3663
Pseudomonas_syringae_pv._lapsa_10859	GCCTTTGACAATCGCGAGCGCCTGGACGCTTTCGTT---CAGGCCTTGCAGATGGTCATC	3663
Pseudomonas_syringae_strain_KF529	AGCTTTGACAGCCAGGAGCATGTCGACGATTTTCGCC---CGCGCCTTGCAGTTCGTGATC	903
Pseudomonas_syringae_strain_CAS02	GCCTTCGACAGCCAGGAGCATGTCGACGACTTTTCGCC---CGCGCCTTGCAGTTCGTGATC	1038
Pseudomonas_syringae_strain_BIM_B-268	CCCGTCGCCACCGATGAAAATCTCACCGCCACGCCATACGGTACTGGCTGCTGGTGGGC	5646
Pseudomonas_syringae_strain_StP26	-----	0
Pseudomonas_syringae_strain_U643	-----	0
Pseudomonas_syringae_pv._syringae_HS191,	-----	0
Pseudomonas_syringae_CC1557,	GTCGAGCAGGTAGATGCGGGTATTGGCCATCGGCTTGCCGATGGTCGCGTTGCCGCTGCC	1264
Pseudomonas_syringae_CC440	AACCGGCACG-ATATCCTGCGTACCGCGTGTGTGGCAAGGTTTCGATGAACCGGTGCA	1661
Pseudomonas_syringae_strain_Susan762	-----	0
Pseudomonas_congelan_strain_508	GATCGTCACG-ATATTCGCGTACCGGTGTGGTCTGGGACGGTCTGGACTCCCCCGTGCA	3722
Pseudomonas_syringae_pv._lapsa_10859	GATCGTCACG-ACATTCGCGTACCGGGTGGTATGGGACGGTCTGGAGTCACCGGTGCA	3722
Pseudomonas_syringae_strain_KF529	CAGCGTCATG-ACGTGCTGCGCACCGCATTTGGTCTGGGAGGGCTGGACGAACCGATGCA	962
Pseudomonas_syringae_strain_CAS02	CAGCGCCATG-ACATTCGCGCACTGCACTGGTCTGGGAGGGACTGGACGAACCGATGCA	1097
Pseudomonas_syringae_strain_BIM_B-268	ATCAAGCAGGTAGATTCGGGTGTGGCCATCGGCTTGCCGATGGTTCGCTTACCGCTGCC	5706
Pseudomonas_syringae_strain_StP26	-----	0
Pseudomonas_syringae_strain_U643	-----	0
Pseudomonas_syringae_pv._syringae_HS191,	-----	0
Pseudomonas_syringae_CC1557,	TTGCTGCGCGGTACCGCGTCATGACTG-ACGTAGGCGCGGTGCAGGAAACCGTGGCCT	1323
Pseudomonas_syringae_CC440	AGTGGTGTGCGCAGAGCCGAACGCAAGTCACGGAGTTGCTCTCGACCCGGCAGACGG	1721
Pseudomonas_syringae_strain_Susan762	-----	0
Pseudomonas_congelan_strain_508	GGTGGTCTGGCGTCAAGCGAAATTCACCTTGAGGGGCTTGAACCTGACCCGGCGGACGG	3782
Pseudomonas_syringae_pv._lapsa_10859	AGTGGTATGGCGCCAGGCTCAGTTGCACCTTGAAGGGCTTGAACCTGACCCGGCGGACGG	3782
Pseudomonas_syringae_strain_KF529	AGTGGTCTGGCGTCAGCGCCGCTGATGCGCGAAAGCTTGTATGCCGACCCACACCGGAG	1022
Pseudomonas_syringae_strain_CAS02	AGTGGTCTGGCGTCAGCGCTTGCAGATGCGCGAAAGCTTGCACCCAGATCCGCAAGGCGG	1157
Pseudomonas_syringae_strain_BIM_B-268	TTGCTGCCAGCAAGCGCTCATGGCTG-ACGTAGGCGCGAGTGCAGGACACCGTGCCTT	5765
Pseudomonas_syringae_strain_StP26	-----	0

Рис. 6 - Выравнивание гена *sypC* (фрагмент) *Pseudomonas syringae*.

Таблица 1

Система олигонуклеотидов (праймеров и зонда) для детекции фрагмента генов фитотоксинов *Pseudomonas syringae*

ген	праймеры	олигонуклеотиды
smA	Прямой	CAATTGCATCTCGTCGGCTG
	Обратный	ATTACAAGCGGCTAACGCCT
	Зонд	BHQ1-ACCACACGACGGCTTTCAGCC-Fam
sypC	Прямой	CTTGACAGTTCGTGATCCAGC
	Обратный	TTGCATCGGTTTCGTCCAGTC
	Зонд	BHQ1- TGCGCACTGCACTGGTCTGG-Fam

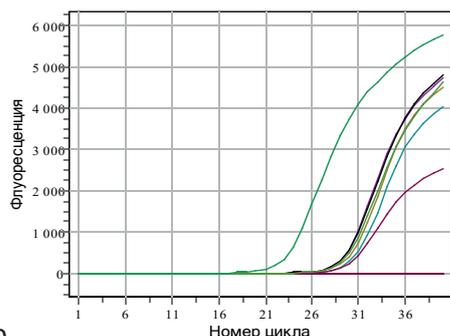
Таблица 2

Протокол для проведения амплификации

№ шага	Температура, °C	Время, сек.	Количество повторов
1	95	300	1
2	95	10	5
	60	30	
3	95	5	40
	60	10 - флуоресценция	

вторичных структур при реакции.

После синтеза праймеров и олигонуклеотидного зонда с флуоресцентной меткой FAM (использован тушитель BHQ1) был проведен ряд экспериментов по оптимизации протокола проведения амплификации. В результате работы были получены данные, представленные в таблице 2 и рис. 12-15. Установлено, что фрагменты гена *staA* и *syuC* были выявлены в геноме штамма *Pseudomonas syringae* № 3, который был использован при выделении и селекции бактериофагов *Ps.s.7* УлГАУ и *Ps.s.27* УлГАУ.



0

Рис. 7 - Результаты амплификации фрагмента гена *staA* *Pseudomonas syringae*

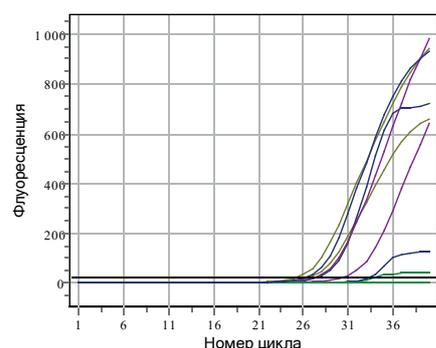


Рис. 8 - Результаты амплификации фрагмента гена *syuC* *Pseudomonas syringae*

### Обсуждение

Изначально геномный анализ генов, кодирующих эффекторы и токсины, был использован для изучения филогенетики и эволюции патогенности среди различных штаммов *Pseudomonas syringae* [3]. Вопросам, посвященным разработке стратегии биоконтроля на основе фагов, уделяется значительное внимание, но без определения детерминант патогенности невозможно рекомендовать бактериофаг в качестве кандидата для изготовления биопрепарата [10, 13]. Полученные нами данные по изучению возможности горизонтального переноса генов, кодирующих экспрессию коронатина и сиринопептина, подтверждаются данными

соавторами, которые также получили отрицательные результаты при проведении аналогичных исследований, изучая бактериофаг РНВ09 [15].

### Заключение

При разработке биопрепаратов на основе бактериофагов важна, прежде всего, безопасность. Учитывая возможность горизонтального переноса генов, было необходимо установить, что ДНК бактериофагов *Ps.s.7* УлГАУ и *Ps.s.27* УлГАУ не может нести в своем составе гены (или их фрагменты), определяющие видовую патогенность. Одним из характерных признаков инфицирования *Pseudomonas syringae* является появление хлороза на листьях, задержка роста и гипертрофия тканей растения, что обусловлено синтезом фитотоксинов коронатина и сиринопептина. Коронатин вызывает ряд реакций у растений, которые могут быть аналогичны таковым на этилен или индолуксусную кислоту. Цитотоксичность сиринопептина определяется его способностью образовывать ионные поры в плазматической мембране клеток-мишеней.

Результатом проведенных исследований было конструирование системы детекции фрагментов детерминант фитотоксинов, которая включает для коронатина (ген *staA*) праймеры: прямой - СААТТGCATCTCGTCGGCTG, обратный - АТТАСААGCGGCTAACGCCT, зонд - ВHQ1-ACCACACGACGGCTTTCAGCC-Fam и сиринопептина (ген *syuC*): прямой праймер - СТТGCAGTTCGTGATCCAGC, обратный - ТТGCATCGGTTCGTCCAGTC, зонд - ВHQ1-TGCGCACTGCACTGGTCTGG-Fam. Авторами была проведена оптимизация протокола проведения амплификации, включающая 3 этапа: 1 этап - денатурацию ДНК при температуре 95 °С 300 секунд однократно; 2 этап - отжиг праймеров - при температуре 95 °С 10 секунд, при температуре 60 °С 30 секунд - 5 циклов; 3 этап - элонгацию - при температуре 95 °С 5 секунд, при температуре 60 °С 10 секунд (флуоресценция) – 40 циклов.

Полученные при апробации разработанной системы данные амплификации позволяют утверждать, что детерминанты коронатина и сиринопептина не были идентифицированы в геномах бактериофагов *Ps.s.7* УлГАУ и *Ps.s.27* УлГАУ, входящих в состав биопрепарата, разработанного коллективом авторов для фагоидентификации бактерий *Pseudomonas syringae* и биопроцессинга пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья, но были выявлены при изучении генома бактериального штамма

*Pseudomonas syringae* № 3, использованного в качестве маточной культуры при наработке биомассы бактериофагов.

#### Библиографический список

1. Мирошников К.А. Геномика и протеомика литических бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*: автореф. дис. ...докт. хим. наук: 03.01.04, 03.01.06 /Мирошников Константин Анатольевич. – Москва, 2013. – С.5 (169с).
2. Испытание различных методов идентификации возбудителя бактериальной пятнистости листьев цветной капусты *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*mcculloch*) *young et al.* / С.И. Приходько, А.Б. Яремко, К.П. Корнев // Таврический вестник аграрной науки. – 2021. - № 1(25). - С. 174-187.
3. Genome-wide identification of *Pseudomonas syringae* genes required for fitness during colonization of the leaf surface and apoplast / T. C. Helmann, A. M. Deutschbauer, S. E. Lindow // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – Т. 116. – №. 38. – С. 18900-18910.
4. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases / C. L. Bender, F. Alarcon-Chaidez, D. C. Gross // Microbiology and Molecular biology reviews. - 1999. Vol. 63 (2). - P. 266–292.
5. Sarkar S. F. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen / S. F. Sarkar, D. S. Guttman // Applied and Environmental Microbiology. - 2004. - Vol. 70 (4). - P. 1999–2012.
6. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae* / M. S. H. Hwang, R. L. Morgan, S. F. Sarkar, P. W. Wang, D. S. Guttman // Applied and Environmental Microbiology. - 2005. - Vol. 71 (9). - P. 5182–5191.
7. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster / H. Sawada, F. Suzuki, I. Matsuda, N. Saitou // Journal of Molecular Evolution. - 1999. - Vol. 49. - P. 627–644.
8. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pvs. from different host plants by repetitive sequence-based PCR and multiplex-PCR / R. Ilicic, J. Balaz, V. Stojsin, F. Bagi, R. Pivic, A. Stanojkovic-Sebic, D. Josic D. // Zemdirbyste-Agriculture. - 2016. - Vol. 103 (2). - P. 199–206.
9. Molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated in Korea and a multiplex PCR assay for haplotype differentiation / H. S. Koh, G. H. Kim, Y. S. Lee, Y. J. Koh, J. S. Jung // The Journal of Plant Pathology. – 2014. – Vol. 30, № 1. – P. 96–101.
10. Red light delays programmed cell death in non-host interaction between *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 and tobacco plants / L. Moyano, M.P. Lopéz-Fernández, A. Carrau et.al. // Plant Science. – 2020. – Vol. 291. – P. 110361.
11. Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae* / Y. Ichinose, F. Taguchi, T. Mukaihara // Journal of General Plant Pathology. – 2013. – Vol. 79. – P. 285–296.
12. Jungblut, P. R. Proteomics of microbial pathogens / P. R. Jungblut, M. Hecker // Proteomics. - 2004. - Vol. 4. - № 10. - P.2829–2830.
13. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the «hodgepodge» of the *Pseudomonas syringae* complex / J. A. Gutiérrez-Barranquero, F. M. Cazorla, A. de Vicente // Frontiers in plant science. – 2019. – Т. 10. – С. 570.
14. The *sypA*, *sypS*, and *sypC* synthetase genes encode twenty-two modules involved in the nonribosomal peptide synthesis of syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D / B. K. Scholz-Schroeder, J. D. Soule, D. C. Gross // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2003. - Vol. 16(4). – P. 271-280.
15. Isolation of the Novel Phage PHB09 and Its Potential Use against the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* / Y. Liu, M. Liu, R. Hu, J. Bai, X. He, Y. Jin // Viruses. - 2021 - № 13 – P. 2275

## DEVELOPMENT OF SYSTEMS FOR GENETIC DETECTION OF CORONATIN AND SYRINGOPEPTIN PHYTOTOXINS IN GENOMES OF PSEUDOMONAS SYRINGAE BACTERIOPHAGES

Feoktistova N. A., Mastilenko A. V., Suldina E. V., Bogdanov I. I.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ulyanovsk State Agrarian University  
432017, Ulyanovsk, NovyiVenets boulevard, 1; 8(8422)55-95-47; e-mail: feokna@yandex.ru

**Key words:** coronatin, syringopeptin, *Pseudomonas syringae*, bacteriophage, genetic detection, genome, system

The article presents results of studies on development of systems for genetic detection of coronatin and syringopeptin phyto toxins in genomes of *Pseudomonas syringae* bacteriophages. A team of authors designed detection systems for fragments of determinants of pathogenicity factors (phyto toxins) – coronatin and syringopeptin with application of electronic resources of NCBI: BLAST nucleotide and PRIMER BLAST. Nucleotide sequences were determined, homologues characteristic of other phytopathogens were studied. The system of oligonucleotides (primers and probe) for detecting a fragment of *Pseudomonas syringae* phyto toxin coronatin genes (*cmA* gene) includes primers: forward - CAATTGCATCTCGTCGGCTG, reverse - ATTACAAGCGGCTAACGCCT, probe - BHQ1-ACCAACACGACGGCTTTCAGCC-Fam and syringopeptin (*sypC* gene): forward primer - CTTGCAGCTT, reverse - TTGCATCGGTTCTGCCAGTC, probe - BHQ1-TGCGCACTGCCTGGTGG-Fam. A number of experiments were carried out to improve the amplification protocol: DNA denaturation at a temperature of 95 °C for 300 seconds once; primer annealing - at a temperature of 95 °C for 10 seconds, at a temperature of 60 °C for 30 seconds - 5 cycles; elongation - at a temperature of 95 °C for 5 seconds, at a temperature of 60 °C for 10 seconds fluorescence - 40 cycles. According to the amplification data, these determinants of coronatin and syringopeptin were not identified in the genomes of bacteriophages Ps.s.7 UIGAU and Ps.s.27 UIGAU, which are part of biological product. When studying the genome of the bacterial strain *Pseudomonas syringae* № 3, used as a mother culture in production of bacteriophage biomass, coronatin and syringopeptin determinants were identified.

### Bibliography:

1. Miroshnikov K.A. Genomics and proteomics of lytic bacteriophages *Pseudomonas aeruginosa*: abstract of dissertation for the degree of Doctor of Chemical Sciences: 03.01.04, 03.01.06 / Miroshnikov Konstantin Anatolevich. - Moscow, 2013. - P.5 (169p).
2. Testing of various methods for identification of cauliflower leaf spot pathogen *Pseudomonas siringaepv. maculicola* (mcculloch) young et al. / S.I. Prikhodko, A.B. Yaremko, K.P. Kornev // *TaurideVestnik of Agrarian Science*. - 2021. - № 1 (25). - P. 174-187.
3. Genome-wide identification of *Pseudomonas syringae* genes required for fitness during colonization of the leaf surface and apoplast / T. C. Helmann, A. M. Deuschbauer, S. E. Lindow // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2019. - T. 116. - № 38. - S. 18900-18910.
4. *Pseudomonas syringae* phyto toxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases / C. L. Bender, F. Alarcon-Chaidiez, D. C. Gross // *Microbiology and Molecular biology reviews*. - 1999. Vol. 63(2). - P. 266–292.
5. Sarkar S. F. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen / S. F. Sarkar, D. S. Guttman // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2004. - Vol. 70(4). - P. 1999–2012.
6. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae* / M. S. H. Hwang, R. L. Morgan, S. F. Sarkar, P. W. Wang, D. S. Guttman // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2005. - Vol. 71(9). - P. 5182–5191.
7. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster / H. Sawada, F. Suzuki, I. Matsuda, N. Saitou // *Journal of Molecular Evolution*. - 1999. - Vol. 49. - P. 627–644.
8. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pvs. from different host plants by repetitive sequence-based PCR and multiplex-PCR / R. Ilicic, J. Balaz, V. Stojsin, F. Bagi, R. Pivic, A. Stanojkovic-Sebic, D. Josic D. // *Zemdirbyste- agriculture*. - 2016. - Vol. 103(2). - P. 199–206.
9. Molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pvs. *actinidiae* strains isolated in Korea and a multiplex PCR assay for haplotype differentiation / H. S. Koh, G. H. Kim, Y. S. Lee, Y. J. Koh, J. S. Jung // *The Journal of Plant Pathology*. - 2014. - Vol. 30, № 1. - P. 96–101.
10. Red light delays programmed cell death in non-host interaction between *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and tobacco plants / L. Moyano, M.P. Lopez-Fernández, A. Carrau et al. // *Plant Science*. - 2020. - Vol. 291. - P. 110361.
11. Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae* / Y. Ichinose, F. Taguchi, T. Mukaihara // *Journal of General Plant Pathology*. - 2013. - Vol. 79. - P. 285–296.
12. Jungblut, P. R. Proteomics of microbial pathogens / P. R. Jungblut, M. Hecker // *Proteomics*. - 2004. - Vol. 4. - № 10. - P.2829–2830.
13. *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the “hodgopodge” of the *Pseudomonas syringae* complex / J. A. Gutiérrez-Barranquero, F. M. Cazorla, A. de Vicente // *Frontiers in plant science*. - 2019. - V. 10. - P. 570.
14. The *sypA*, *sypS*, and *sypC* synthetase genes encode twenty-two modules involved in the nonribosomal peptide synthesis of syringopeptin by *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae* B301D / B. K. Scholz-Schroeder, J. D. Soule, D. C. Gross // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. - 2003. - Vol. 16(4). - P. 271-280.
15. Isolation of the Novel Phage PHB09 and Its Potential Use against the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* / Y. Liu, M. Liu, R. Hu, J. Bai, X. He, Y. Jin // *Viruses*. - 2021 - № 13 – P. 2275