

Пунина Н. В.¹, Зотов В. С.¹,
Кузнецов Б. Б.², Игнатов А. Н.³,

Центр «Биоинженерия» РАН,

¹ младший научный сотрудник, аспирант,

² ведущий научный сотрудник.

³ ведущий научный сотрудник, д.б.н.

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
МЕЖГЕННОГО ТРАНСКРИБИРУЕМОГО РЕГИОНА
16S-23S рРНК, ГЕНА *gyrB* И РАЗРАБОТКА ПЦР
ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕННЫХ КСАНТОМОНАД**

Бактерии рода *Xanthomonas* поражают важнейшие сельскохозяйственные культуры, и распространяются с семенами и посадочным материалом. Для изучения межвидовых отношений в пределах рода и создания универсальной молекулярной маркерной системы для диагностики видов *Xanthomonas* были выбраны межгенный регион 16S – 23S рРНК и ген субъединицы Б фермента гиразы (*gyrB*). В результате исследования филогенетических различий были найдены видоспецифичные сигнатуры для ряда видов ксантомонад, и созданы специфичные праймеры и пробы для ПЦР и RT-ПЦР диагностики этих фитопатогенов.

Punina N.V., Zotov V.S., Kuznetsov B.B., Ignatov A.N.

EVALUATION OF VARIABILITY OF 16S-23S INTERNAL TRANSCRIBED SPACER, GYRASE B GENE AND DEVELOPMENT OF PCR DIAGNOSTICS FOR PLANT PATHOGENIC XANTHOMONADS

Plant pathogenic bacteria of genus *Xanthomonas* infect all major economic agricultural crops, and spread across regions and counties with seeds and planting materials. Internal transcribed spacer (ITS) of 16S-23S rRNA genes and *gyrase B* gene were selected for evaluation of interspecies relations and development of molecular markers for some species of *Xanthomonas*. As result of the gene sequence analysis in a number of xanthomonads we found specific signatures on the DNA fragments and designed primers and probes for PCR and RT-PCR diagnostics of the plant pathogens.

Введение

Болезни растений, вызываемые фитопатогенными бактериями рода *Xanthomonas*, приводят к серьезным экономическим потерям, так как они поражают наиболее важные злаковые, крестоцветные, пасленовые, бобовые, citrusовые и другие сельскохозяйственные культуры. Поскольку производство семян и посадочного материала сельскохозяйственных культур все больше сосредотачивается в странах с благоприятным для бактериозов климатом, фитопатогенные бактерии распространяются по всему миру. В связи с этим проблема идентификации и диагностики *Xanthomonas* sp. становится все более экономически значимой.

Диагностика бактерий этого рода затруднена как большим числом близкородственных видов (более 25) и патовариантов (более 150), так и тем, что виды *Xanthomonas* sp. могут представлять собой либо природные популяции с высоким генетическим и фенотипическим разнообразием, либо клональные группы с низ-

кой вариабельностью. Метод ДНК:ДНК гибридизации позволяет диагностировать виды рода *Xanthomonas* при попарном сравнении штаммов, но он длителен, дорог и трудоемок (15). Анализ универсальных диагностических генов 16S и 23S рРНК выявил высокую (98,9-100%) гомологию последовательностей у разных видов ксантомонад (4, 6, 9). В связи с этим, возникает задача поиска целевых последовательностей для анализа внутривидовых филогенетических отношений и создания молекулярных маркеров с более высокой степенью изменчивости. В качестве кандидатов для таких последовательностей были выбраны межгенный транскрибируемый регион 16S – 23S рРНК (далее: МТР) и ген субъединицы Б гиразы (далее *gyrB*).

Выбранные участки генома бактерий эволюционируют от 4 до 10 раз быстрее чем 16S рРНК, и являются перспективными объектами для изучения филогенеза бактерий и создания маркерной системы эффективной на уровне вида и даже штамма (17, 18, 19).

Обязательным условием при разработке ПЦР диагностики является тестирование большого числа штаммов, принадлежащего целевой группе бактерий и родственным таксономическим группам, и анализ изменчивости нуклеотидной последовательности гомологичной маркеру. В тех случаях, когда полиморфизм целевой последовательности недостаточен для разделения видов или патовариантов, необходимо применение мультиплексного ПЦР, включающего ПЦР маркеры нескольких таксономических уровней. Применение мультиплексного анализа потенциально позволяет диагностировать штаммы не только известных групп, но и новых, пока не изученных.

Целью данной работы явилось уточнение филогенетической структуры рода *Xanthomonas* и создание диагностической системы для этих бактерий на уровне рода-вида-подвида (патоварианта).

Материалы и методы

Штаммы

В работе использована предоставленная лабораторией бактериальных болезней ГНУ-ВНИИ фитопатологии РАСХН коллекция штаммов ксантомонад, включающая *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), другие патоварианты *X. campestris* (*Xc*), виды *X. oryzae*, *X. malvacearum*, *X. vesicatoria*, *X. albilineans*, *X. citri* и *X. phaseoli*, собранные в различных странах мира. Все штаммы были проверены на патогенность на соответствующих растениях-хозяевах.

Условия культивирования бактерий и выделения ДНК

Бактерии культивировали на модифицированной агаризованной среде Кинга Б для уменьшения синтеза экзополисахарида при 28°C в течение 72 часов. Бактериальная ДНК была выделена с помощью модифицированной методики щелочного выделения ДНК Бирнбойма-Доли (3) и Wizard-технологии фирмы Promega (США), адаптированной для видов бактерий с обильным продуцированием экзополисахарида и вторичных метаболитов.

ПЦР анализ и секвенирование

Для ПЦР анализа МТР и *gyrB* были сконструированы праймеры, представленные в Таблице 1. Условия проведения ПЦР для каждой пары праймеров были оптимизированы согласно модифицированной методике Тагучи и Ву (14). ПЦР

проводили на амплификаторе «Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler» («Perkin Elmer», США). ПЦР амплификацию фрагмента МГР проводили в 25 мкл смеси содержащей: 1x буфер для ПЦР («Диалат ЛТД», Россия), 1,25 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 70 нг ДНК-матрицы, по 20 пкМ специфических праймеров и 1,25 ед. ДНК полимеразы BioTaq. ПЦР амплификацию фрагментов гена *gyrB* проводили в 25 мкл реакционной смеси: 1x ПЦР буфер, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 50 нг ДНК-матрицы, по 25 пкМ соответствующих специфических праймеров F5063-R6500 или F6361- R7437, 1,25 ед. ДНК полимеразы BioTaq.

Для ПЦР амплификации МГР был использован температурно-временной профиль: первый цикл – 94°C 3 мин.; последующие 40 циклов – 94°C x 30 сек., 65°C x 30 сек. и 72°C x 1 мин.; окончательная элонгация – 7 мин. при 72°C. Для амплификации гена *gyrB*: первый цикл – 94°C 7 мин; последующие 29 циклов – 94°C x 20 сек., 63°C x 20 сек. и 72°C x 1 мин. 30 сек.; окончательная элонгация – 7 мин. при 72°C.

Анализ продуктов ПЦР проводили электрофорезом в 1.5% агарозном геле окрашенном бромистым этидием при напряженности поля 6 В/см и документировали с помощью системы «BioDoc Analyze» («Biometra», Германия). В качестве молекулярных маркеров размеров были использованы DNA Ladder mix SM1173 и 1kb DNA Ladder (GeneRuler™, Fermentas, Латвия).

Нуклеотидные последовательности МГР и фрагмента гена *gyrB* очищены с помощью набора «Wizard» фирмы «Promega» (США) в 0.8% легкоплавкой агарозе LMP («Хеликон», Россия) и секвенированы (9) на автоматическом секвенаторе ABI 373 (Perkin Elmer, США) согласно инструкции по применению. Каждая последовательность была секвенирована, как минимум, в двух повторностях в обоих направлениях для каждого штамма.

Биоинформационная и статистическая обработка данных

Первичный сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных Генбанка проводили с помощью программы NCBI Blast при вероятности случайного совпадения не более 10⁻⁵⁰ (2). По результатам поиска были отобраны 130 полных секвенированных последовательностей МГР *Xanthomonas sp.*: *Xcc* и *Xc* (88 последовательностей), *X. vesicatoria*, *X. axonopodis*, *X. alfae*, *X. translucens*, *X. oryzae* и *X. albinea*s. Также, в Генбанке были обнаружены 7 последовательностей, гомологичных секвенированному фрагменту гена *gyrB*. Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы CLUSTALW 1.75v. (15). Проверку и редактирование последовательностей вручную проводили с помощью редактора «BioEdit 7.0.5.3» (5).

Попарные генетические расстояния между последовательностями были определены по 2-параметрной модели Кимуры (7) и по методу Нея и Ли (7). Построение филогенетических деревьев проводили с использованием алгоритма «ближнего соседа» (neighbor joining) (13), реализованного в пакете программ MEGA 4.0 (11). Значения бутстрепа (bootstrap) были рассчитаны для 1000 повторностей и даны в процентах от исходного значения.

Результаты и обсуждение

Анализ последовательностей МТР

С помощью праймеров ITS/F и ITS/R нуклеотидные последовательности МТР длиной 500-550 п.н. (100% полной последовательности) у 28 изученных штаммов *Xcc* и *Xc* были амплифицированы, секвенированы, и сравнены со 130 нуклеотидными последовательностями МТР *Xanthomonas* sp., отобранными в базе данных NCBI. По всем последовательностям были рассчитаны попарные генетические расстояния используя 2-параметрную модель Кимуры, и с помощью алгоритма ближнего соседа (NJ) построено филогенетическое дерево, показанное на Рис. 1. В качестве удаленного контроля при построении дерева были использованы последовательности МТР штамма K279a близкородственного вида *Stenotrophomonas maltophilia*.

Топология полученного дерева имела значительное сходство с филогенетическими деревьями, полученными для 16S рРНК (6) и МТР типовых штаммов 20 видов ксантомонад (4). Штаммы рода *Xanthomonas* были достоверно разделены на 2 группы: «*Xanthomonas 1*» (далее: X1) - ксантомонады сходные с типовым видом *X. campestris*, и «*Xanthomonas 2*» (далее: X2), включающую виды *X. axonopodis*, *X. codiaei*, *X. sacchari*, *X. albilineans*, *X. theicola*, *X. hyacinthi* и *X. translucens*, выделяющиеся в отдельные кластеры (2-8). Среднее генетическое расстояние (Табл. 2) между группами X1 и X2 составляло 0,042, а средние внутригрупповые расстояния для X1 и X2 соответственно 0,008 и 0,040.

Сходство между видами составило от 63 до 99%, среднее $83,8 \pm 10,4\%$. Существенно менее высокий уровень сходства был определен для *X. hyacinthi* (63,0-89,1%), *X. theicola* и *X. translucens* (70,1-89,1%).

Для видов группы X1 были найдены сигнатурные последовательности МТР (Табл. 3), позволившие отличить их от типового вида *X. campestris* и в большинстве случаев друг от друга, что отражено на филогенетическом дереве (рис.1). Разделение по группам идет в зависимости от наличия вставки в МТР2 (МТР2-L) и специфических n-нуклеотидных замен или делеций/вставок. Кроме того, 3'-конец в районе 469- 484 нуклеотидов у большинства штаммов отличается высокой степенью полиморфизма. Полиморфные участки наблюдаются как у разных видов *Xanthomonas*, так и у анализируемых штаммов *Xc* и *Xcc*.

Тем не менее, сходные нуклеотидные последовательности МТР для каждого вероятного места посадки праймеров и зонда встречаются одновременно у нескольких видов ксантомонад, что затрудняют оценку генетического разнообразия и идентификацию видов по этой последовательности.

Анализ последовательностей гена *gyrB*

Были амплифицированы и секвенированы фрагменты гена *gyrB* длиной 1060 п.о. (43,37% всего гена) у 108 штаммов *Xanthomonas* sp.. Нуклеотидные последовательности были сравнены с семью последовательностями *gyrB* штаммов *Xanthomonas* sp., представленных в Генбанке. По итогам анализа были выявлены 8 групп при достоверности различий не менее 65%. Анализ выявил межвидовые и внутривидовые различия среди штаммов *Xcc*, *Xc*, *X. vesicatoria*, *X. oryzae*, *X. axonopodis*. Для последовательностей гена *gyrB* также были рассчитаны попарные генетические расстояния. В результате кластерного анализа было выделено

5 генотипов *Xcc*: генотип 1 объединил 41 штамм с бутстрепом более 98%, включая типовой штамм *Xcc* NCPPB528^T и штаммы, выделенные из капустных культур пораженных эпифитотиями сосудистого бактериоза. Генотип 2 (*Xcc* 1385-1391) включал штаммы с юга России, выделенные в 2006 г. Генотип 3 включал штамм выделенный из капустных культур в США (*Xcc* PHW117) и типовой штамм *X. c. pv. raphani* NCPPB1946^T. Генотип 4 был выделен в Московской области и имел сходство с бактериями из подсолнечника (штамм *Xc*26). Генотип 5 был представлен штаммами выделенными в Краснодарском крае в 2006 г. Штаммы, сгруппированные в генотипы 4 и 5 имели большее сходство с *X. vesicatoria*.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что в популяции ксантомонад, поражающих крестоцветные культуры существует высокий видовой и внутривидовой полиморфизм. Этот факт может быть объяснен во-первых, тем, что патогенность бактерий рода *Xanthomonas* по отношению к крестоцветным возникла в процессе конвергентной эволюции, и *X. campestris* может быть полифилетическим (сборным) видом, так же как и *X. vesicatoria*, *X. vitians* и *X. vasculorum* (8,16). Во-вторых, внутривидовые группы *Xcc* могли эволюционировать от одной и той же популяции по пути адаптации к определенным климатическим условиям (1).

Однако надо учитывать, что делать вывод о разнообразии бактерий рода *Xanthomonas*, применяя для исследований консервативные МГР и ген *gyrB* и можно только относительно таксономического уровня рода-вида-подвида.

Анализ сигнатур генов и подбор специфичных праймеров и проб для диагностики бактерий рода *Xanthomonas*

Нуклеотидные последовательности МГР *Xanthomonas* sp. и *S. maltophilia* имеют длину от 492 п.н. до 578 п.н.. тРНК^{Ала} и тРНК^{Иле} достаточно консервативны у всех бактерий рода *Xanthomonas*. тРНК^{Ала} имеет длину 75-79 п.н.. У группы X1 гены тРНК^{Ала} идентичны, группа X2 имеет единичные нуклеотидные замены в позициях 10, 69 и 4 делеции. Гены тРНК^{Иле} имеет длину 73-79 п.н.. Последовательность гена более вариабельна, чем тРНК^{Ала}. Группа X2 имеет единичные нуклеотидные замены и делеции в позициях 17, 59, 68-69. Для отдельных видов бактерий рода *Xanthomonas* были найдены специфичные сигнатуры МГР, представленные в Табл. 3.

Регионы МГР1, МГР2 и МГР3, разделенные генами тРНК^{Ала} и тРНК^{Иле}, имеют более вариабельные нуклеотидные последовательности. МГР1 имеет длину 103-113 п.н., с нуклеотидными последовательностями, идентичными по всей длине у *X. arboricola*, *X. gardneri*, *X. cucurbitae*, *X. pisi*, *X. vesicatoria*. У других видов группы X2 найдены единичные нуклеотидные замены в позициях 30-31, 60, 93, 97, 104, 111, и делеции в позициях 40, 88-90, 116-118, 125-127. Для различных видов ксантомонад сходство составляет 87.1±9.2%.

Регион МГР2 является наиболее вариабельным. Группа X1 и некоторые виды отнесенные к группе X2 (*X. sacchari*, *X. albilineans* и *X. hyacinthi*, *X. axonopodis*, содержат МГР2 длиной 19 п.н. (МГР2-К). Представители группы X2: *X. translucens*, *X. theicola*, *X. hyacinthi*, *X. codiaei* имеют длинный МГР2 от 78 до 85 п.н., в которой находится вставка 55-58 п.н. с низким уровнем гомологии между видами (МГР2-Д). *X. melonis* также имеет МГР2-Д, однако не отличается по сигнатурам других участков МГР от видов группы X1. Анализ МГР2-Д выявил консерватив-

ные участки I и II, длиной 16 п.н. и 9 п.н., соответственно.

Предполагается, что наличие консервативных блоков во вставке в МГР2-Д связано со связыванием данных регионов с РНКазой III во время процессинга тРНК^{Ala} и тРНК^{Ile} (4).

Вариабельный по длине регион МГР3 имеет длину от 166 до 232 п.н. и среднее сходство у различных видов *Xanthomonas* sp. равно $82.3 \pm 11.5\%$. В консервативной части данного региона также найдены от 1 до 5 сайтов нуклеотидных замен и делеций, а также видоспецифичная делеция у штамма *X. hyacinthi* в районе 103-146 п.н..

Аналогичным образом был проанализирован фрагмент гена *gyrB* и найдены видоспецифичные сигнатуры *Xanthomonas* sp. (Табл. 4).

На основании полученных данных, были определены целевые регионы для создания видоспецифичных ПЦР праймеров, а также TaqMan® RT-PCR праймеров и проб для *Xanthomonas* sp., которые представлены в Табл. 4.

Проверка предложенных праймеров и проб подтвердила их ожидаемую видоспецифичность (данные не показаны). Таким образом, нами была показана применимость последовательности гена *gyrB* и региона МГР в качестве мишени для разработки видоспецифичных маркеров для рода *Xanthomonas*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Игнатов А.Н., Поляков К.Л., Самохвалов А.Н. Количественный анализ серологических признаков *Xanthomonas campestris* // Сельскохозяйственная биология. 1998. №1. С. 106-115.
2. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389-3402.
3. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. P. 1513-1523.
4. Edmilton R. Goncalves and Yoko B. Rosato. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences // Int. J. Syst. Bacteriology. 2002. V.52. P. 355-361.
5. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp. 1999. Ser. 41. P. 95-98.
6. Hauben L., Vauterin L., Swings J., Moore E.R.S. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species // Int. J. Syst. Bacteriology. 1997. V. 47. P. 328-335.
7. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate at base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. P. 111-120.
8. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., de Bruijn F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR // Appl. Envir. Microbiol. 1994. V. 60. P. 2286-2295.
9. Moore E.R., Kruger A.S., Hauben L., Seal S.E., Daniels M.J., De Baere R., De Wachter R., Timmis K.N., Swings. 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia* // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 151. P. 145-153.
10. Nei M. and W.H. Li. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 1979. V. 76. P. 5269-5273.
11. Nei M. and Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics // Oxford University Press. New York. 2000.
12. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 84. P. 5463-5467.

13. Saitou, N. and Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. P.406-425.
14. Taguchi G., Wu Y. Introduction to off-line quality control // Japan Quality Control Organisation. Nagoya. Japan. 1980.
15. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673-4680.
16. Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J. Reclasification of *Xanthomonas* // *Int. J. Syst. Bacteriology.* 1995. V. 45. P. 472-489.
17. Yamamoto S. and Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V.61. P. 1104-1109.
18. 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.
19. Yamamoto S. and Harayama S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998. V.48. P. 813-819.

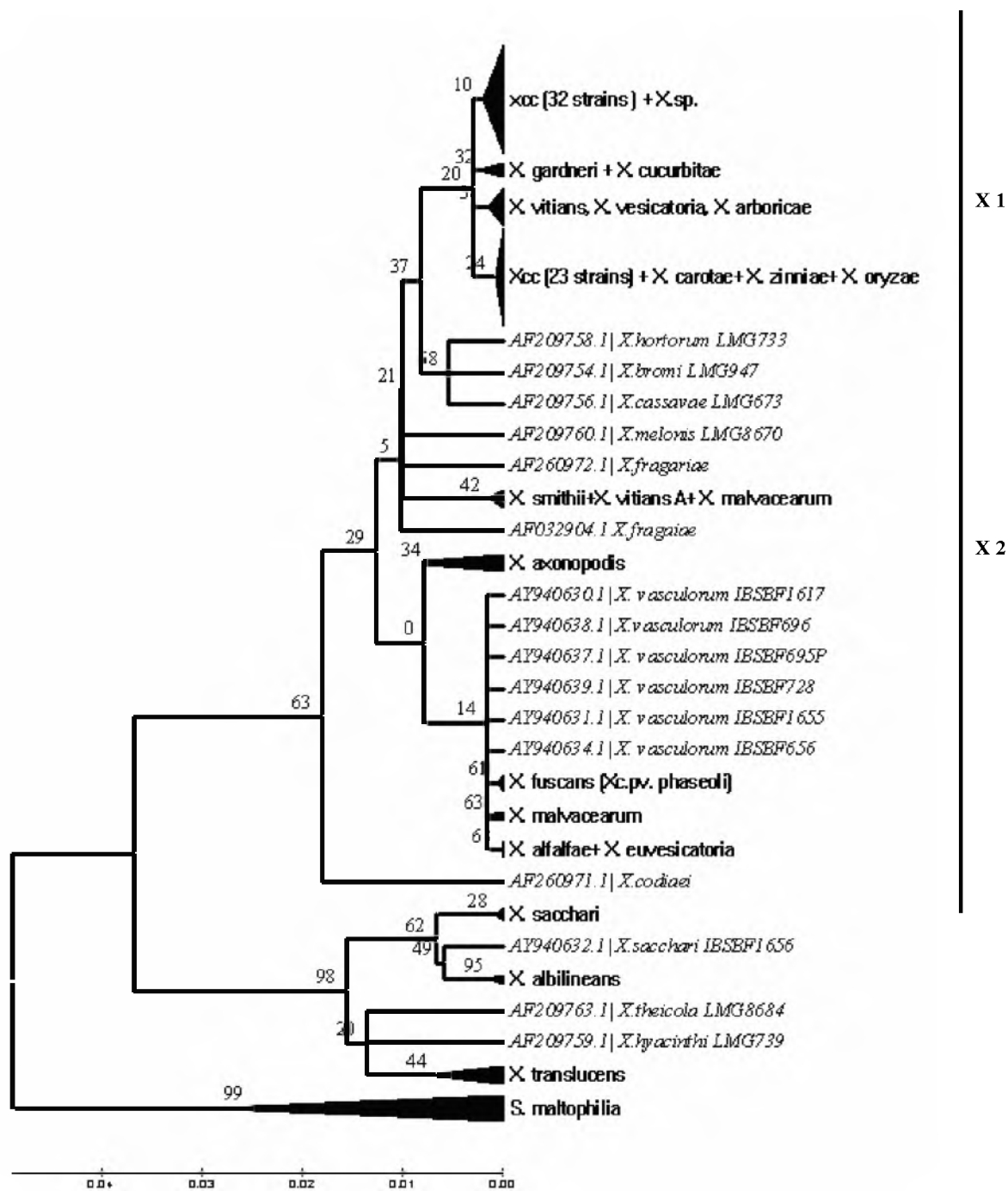


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, отражающее степень родства рода *Xanthomonas*. Дерево построено на основе сравнения последовательностей МТР методом NJ. Шкала отражает генетические расстояния по Нею-Ли (10). Значения бутстрепа рассчитаны для 1000 повторностей и даны в процентах от исходного значения. В скобках указаны номера GenBank.

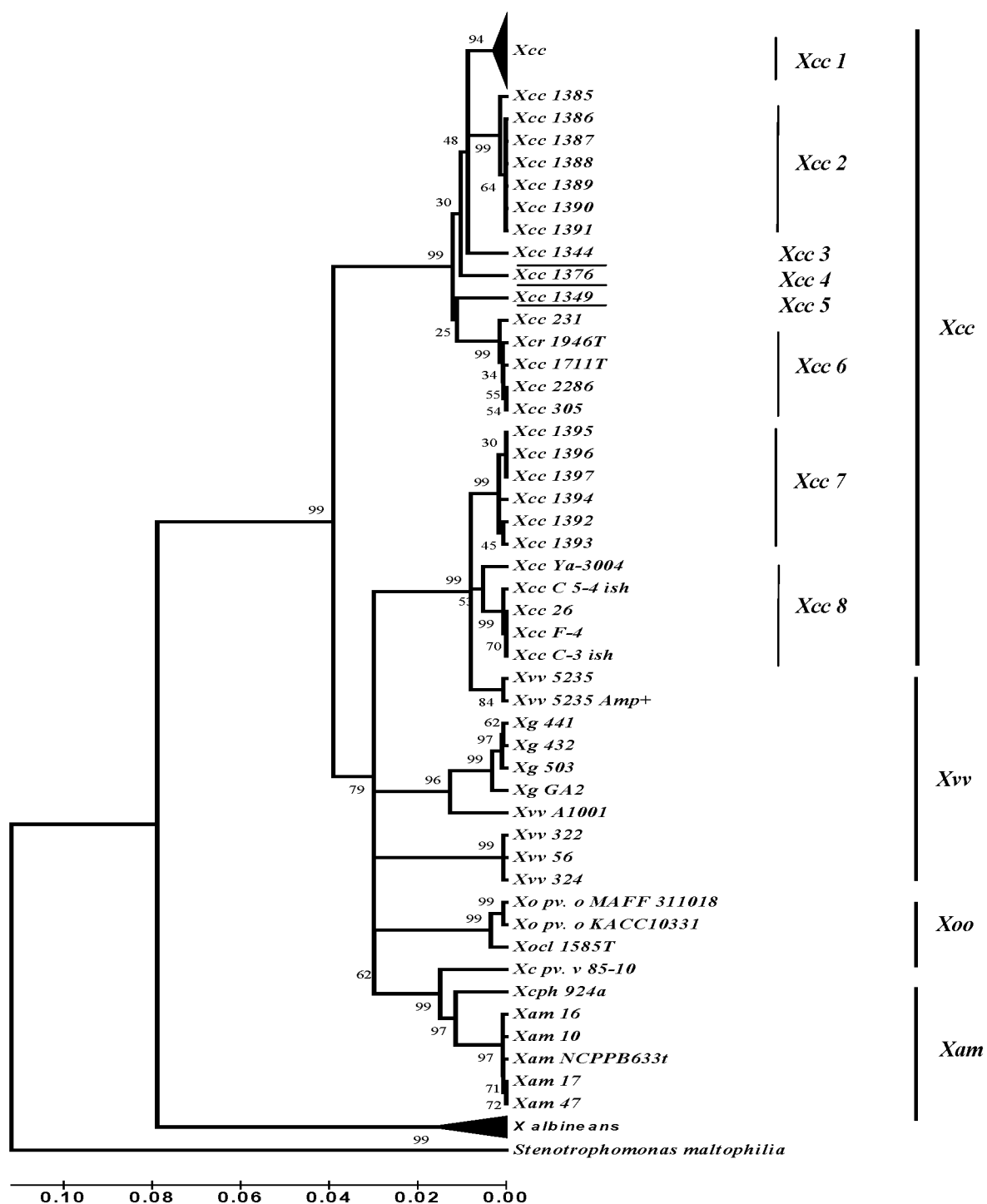


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, отражающее степень родства бактерий рода *Xanthomonas*. Дерево построено на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gyrB* методом NJ. Шкала отражает генетические расстояния по Нею-Ли (10). Значения бутстрепа рассчитаны для 1000 повторностей и даны в процентах от исходного значения. В скобках указаны номера генбанка NCBI.

Таблица 1.

Праймеры, использованные в работе.

Обозначение праймера	Последовательность	Расположение на последовательности генома <i>Xss</i> ATCC33913, п.н.
<i>F 5063</i>	CACCCAACGGCACCTACGACTC	4881
<i>R 6500</i>	CAGCTTGTCCGGGTTGTA CTCTCGTC	6323
<i>F 6361</i>	CCAAGCAGGGCCGCAACCGCAAG	6177
<i>R 7437</i>	CCTTCAGCGCGTTGTCCTCGATG	7255
ITS/F	TYACACACCTCCCGT	1406 от начала 16S
ITS/R	KTTCGCTCGCCRCTAC	242 от начала 23S

Таблица 2.

Внутри- и межвидовые генетические расстояния МТР и *gyrB*, рассчитанные по 2-параметровому алгоритму Кимуры (2-parameter Kimura's distance).

Группы		d МТР		d <i>gyrB</i>			
		Вв	Мв	Вв	Мв		
1	X1	0,0080	0,000	0,0023	0,000		
2				0,0011	0,0210		
3				н/о	0,0168		
4				н/о	0,0206		
5				н/о	0,0256		
6				0,0020	0,0230		
7				0,0029	0,0737		
8				0,0045	0,0687		
<i>X.o pvs.</i>				0,0050	0,0779		
<i>X.v pvs.</i>				0,0017-0,0124	0,0682-0,0810		
<i>X axonopodis pvs.</i>	X2	0,0130	0,0290	0,0085	0,0825		
<i>X.alb pvs.</i>				0,0020	0,0840	0,0099	0,1434
<i>X hyac</i>				н/о	0,0940	-	-
<i>X sacch</i>				0,0040	0,0770	-	-
<i>Xtheic</i>				н/о	0,0710	-	-
<i>Xtr pvs.</i>				0,0110	0,0830	-	-

d - генетическое расстояние; Вв – внутривидовое d; Мв – межвидовое d; н/о – не определено; «-» - виды, неиспользованные в работе.

Таблица 3.

Сигнатуры МГР для специфичной амплификации видов *Xanthomonas* sp..

Виды	ITS2-L П.н.	Позиции группо-специфичных сигнатур					
		ITS1 167	168-243 тРНК ^{Ала}	244-262 ITS2	263-339 тРНК ^{Гле}	340-497 ITS3	23s
МГР 16S-23S ITS рРНК							
<i>Xcc</i> ^{X1}	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. vesicatoria</i> ^{X1}	-	-	-	-	-	T/G 389, G/A 392,	T/C 525
<i>X. fragariae</i> ^{X1}	-	A/T 129, -A/TT 161,162, A/- 163,	-	G/T 257	-	A/G 371, TG/GA 389,390, A/C 471, -/A 485, G/C 492	G/T 541
<i>X. hortorum</i> ^{X1}	-	-	-/G 179	-	-	A/- 489	-/T 499, -/T 508, A/C 520
<i>X. arboricola</i> ^{X1}	-	G/T 138	-	-	-	AG/GA 341,342	-
<i>X. bromi</i> ^{X1}	-	A/- 163, G/A 334	-	-/C 236	-/A 323	C/T 415, -/G 454, G/- 471, GGTA/---A 531,532, -/T 534	C/- 500
<i>X. gardneri</i> ^{X1}	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. cassavae</i> ^{X1}	-	-/C/T- 163,164	G/A 237	-	G/A 288	-/T 396	GACTG/---GC 531- 533, A/C 540
<i>X. cucurbitae</i> ^{X1}	-	-	-	-	-	G/A 388, ---/GACA 389-392, G/A 481, -/T 483,	CG 510, -/T 512, G/A 522, --/CA 525,526
<i>X. vasicola</i> ^{X1}	-	C/T 89, C/T 144,	-	-	-/T 311,	G/- 427,	-/C 520
<i>X. o pvs., Xoocl</i> ^{X1}	-	-	-	-	-	C(T)/T 396,	T/C 519, G/A 527
<i>X. pisi</i> ^{X1}	-	-	-	-	A/G 284,	T/C 385, A/G 411, A/G 465, T/- 471, C/T 475,	T/C 540
<i>X. melonis</i> ^{X1}	55	-/C 90,	-	-	T/-308, T/C 324,	CG/--360, A/- 363, -/G 371, CA/-- 373, CT/AC 390,391, -/T 396, -/T 401, ----/CTTG 406-409, -/G 417, G/C 476, CC/AA 480,481,	-/A 526, T/-G 531,532, CG/AA 550,551, AC/-T 552,553
<i>X. codiae</i> ^{X2}	58	GG/TA 148,149	CAC/--A 236,237	C/A 253	C/- 307	-/A 390, -/G 394, A/G 409, A/-442, C/- 448, G/- 466	
<i>X. axonopodis pvs., X. fuscans, X. alfae, X. euvesicatoria, X. vasculorum X. vitians, X. smithi</i> ^{X2}	-	G/T 129, C/T 144, A(G)/G 147, A/- 155, A/T 161, CA/--163	-	-	-	G(A)/A 359, C(-)/-362, C(T,A)/A 372	T(G)/G 507, T(C)/C 540

<i>X. albicans</i> ^{X2}	-	TTC/CCG 134-136, TG/CA 140,141, CG-GAA/TC-GG 144-147, ATA, ---/CTTT 160-163				GA/-- 365, ---/ATG 368-370, T/- 373, C/T 379, A/T 408, T/- 433, -/T 437, -/A 482, -(T)/- 487, -(A)/- 496	T/A 522, A(G)/C 533
<i>X. sacchari</i> ^{X2}	-	C(A)/G 88, CGGA/TC-G 144-146	-	C/T 248	-	AG/-- 365, ---/AT 368,369, T/A 390, T/- 393	A/G 507, A/C 533
<i>Xhyacinti</i> ^{X2}	56	C/- 112, CGG-/TC-G 144-146	-	-	A/G 317, -/T 322, A/G 328	T/G 348, G/A 361, AGA/---365, CT/GC 384,385, G/A 390, A/T 403, C/G 417, -/T 424, -AA/AT- 432,433, --/GA 389,390, делеция 422-465, G/A 485, TCG/CG-492,493	AA--/AGTT 496-499, A/C 521, -----/CA-CACA 522-523, -/G 532, A/C 540, -/G 556
<i>Xtheicola</i> ^{X2}	57	CC/TT 85,86, G/- 112, C/A 141, CGG/TC-144,145, T/- 155	-	-	-	C/G 348, GAC/--A 365,366, -/T 451, -/G 466, -/C 471, --/AA 484,485, -/T 487, C/- 496	-/T 498, C-/TG 505,506, -/A 517, -/A 524
<i>Xtranslucens</i> ^{X2}	55-56	A/G 93	-	-	-	A/G 348, AAG/---365, GT/AC 390,391, T/A 441	

Таблица 4.

Сигнатуры гена *gyrB* для специфичной амплификации видов *Xanthomonas* sp..

Группы, подгруппы, виды	Штаммы	Позиции группоспецифичных сигнатур
1 ^{X1}	<i>Xcc</i> all, <i>Xca</i>	-
2 ^{X1}	<i>Xcc</i> 231, <i>Xcc</i> 1711, <i>Xcr</i> 1946T, <i>Xcc</i> 2286, <i>Xcc</i> 305	A/C 129, T/A 300
3 ^{X1}	<i>Xcc</i> 1344	A/G 414, A/G 723, T/C 732, T/C 762
4 ^{X1}	<i>Xcc</i> 1376	A/G 189
5 ^{X1}	<i>Xcc</i> 1349	A/C 114, T/C 231, T/C 249, T/G 403, C/G 405, T/C 720
6 ^{X1}	<i>Xcc</i> 1385-1391	A/C 183, A/G 189, T/C 345, T/C 351, A/G 414, A/G 459, G(C)/C 794
7 ^{X1}	<i>Xcc</i> F-4, <i>Xcc</i> C-3 исх, <i>Xcc</i> 26, <i>Xcc</i> 5-4 исх, <i>Xcc</i> Я-3004	A/C 624, G(A)/A 643, T/C 678, G/A 687
8 ^{X1}	<i>Xcc</i> 1392-1397	T/C 63, A/C 231, A/C 333, A/G 363, C/G 652, G/C 720, G(C)/C 769, T(C)/C 771, G(A)/A 778
<i>Xo pvs.</i> ^{X1}	<i>Xoo</i>	T/C 42, A/G 246, C/T 548, T/C 561, T/C 603, T/G 717, T/C 780
<i>Xooc</i> ^{X1}	<i>Xooc</i>	A/G 210, A/C 220, T/C 603, T/G 717, T/C 780

Группы, подгруппы, виды	Штаммы	Позиции группоспецифичных сигнатур
<i>Xa pvs.</i> ^{X2}	<i>Xam</i> NCPPB633 ^T XM10, XM16 XM17, XM47	A/G 216, CT/TG 224,225, C/G 243, C(G)/G 473, T/C 624, T/C 640, C/G 793, T/C 796
<i>Xa phaseoli</i> ^{X2}	<i>Xaph</i> HRI924a	T/C 87, A/C 220, CC/TG 224,225, A/G 240, T/G 243, T/C 366, CT/GC 639,640, T/C 693, T/C 699, T/C 715
<i>Xvv</i> группа D ^{X1}	<i>Xvv</i> 444, <i>Xvv</i> 441, <i>Xvv</i> 432, <i>Xvv</i> 503	T/C 261, C/G 501, T/C 765
<i>Xvv</i> 1001 группа B ^{X1}	<i>Xvv</i> 1001	A/C 318, T/C 333, A/G 339, T/C 345, T/C 597
<i>Xvv</i> группа B + D ^{X1}	<i>Xvv</i> 322, <i>Xvv</i> 56, <i>Xvv</i> 324	T/C 157, A/G 184, A/G 187, T/C 212, G/C 241, C/T 256, A/G 271, T/C 301, T/C 358, A/G 454, T/C 497, T/G 508, A/G 556, T/C 557, T/C 562, A/G 571, A/C 655, A(C)/C 697, A/G 751
<i>Xg</i> группа D ^{X1}	XGA2	T/C 261, C/G 501

Таблица 5.

Праймеры и пробы для видоспецифичной амплификации *Xanthomonas* sp., рассчитанные на основе анализа последовательностей МТР и гена *gyrB*..

Проба/ праймер	Последовательность 5r->3r	T _{опт.} , °C	Длина фрагмента, п.н.	Позиция олиго-нуклеотида	Целевой вид, группа
<i>PF1 gyrB</i> *	tgcgccgcgctcgatcagc	68,7	127	632	<i>Xcc1</i> ^{X1}
F1	tcgagttcattacgacatcctgctg ccgccttcgtagtggaatcg	58,9		538	
R1		59,7		664	
<i>PF2 gyrB</i> *	atgccgttgctcgcggtcac	69,0	121	779	<i>Xcc2</i> ^{X1}
F2	gcagcttcgtggagcatctg tggtaggcgctcggtcattg	59,8		698	
R2		60,2		818	
<i>PF3 gyrB</i> *	cgcgacggctccactaccagcag	68,6	89	436	<i>Xcc3</i> ^{X1}
F3	gaacacctgtggctggatatctg agctgcttgagcgggtactg	59,7		412	
R3		60,5		500	
-	-	-	-	-	<i>Xcc4</i> ^{X1}
<i>PR4 gyrB</i> *	cgcgacggctccactaccagcag	68,6	87	436	<i>Xcc5</i> ^{X1}
F4	gcacctgtggctggatatctg agctgcttgagcgggtactg	59,1		414	
R4		60,5		500	
<i>PR5 gyrB</i> *	tgcgccgcgctcgatcagc	68,7	87	660	<i>Xcc6</i> ^{X1}
F5	agctctgttctcaattccg caccttcgtagtggaatcgtc	58,4		605	
R5		57,6		691	

Проба/ праймер	Последовательность 5г->3г	T _{м.п.} , °C	Длина фрагмента, п.н.	Позиция олиго-нуклеотида	Целевой вид, группа
<i>PR6 gyrB*</i> F6 R6	cgctccgaagcgccccggca cgactccgaagatcactgtg gaccacctggaacaccatgtg	68,6 59,8 59,5	117	83 45 161	<i>Xcc7</i> ^{X1}
<i>PR7 gyrB*</i> F7 R7	cgcgacggcttccactaccagcag gaacacctgtggctggatatctg agctgctgagcgggtactg	68,6 59,7 60,5	89	436 412 500	<i>Xcc8</i> ^{X1}
<i>PR8 gyrB</i> F8 R8	ttcgccgcgctcgtcgatcagc agctgtcgttctcaattccg ggatgccgccttcgtaatgg	68,7 59,0 59,7	93	659 604 696	<i>X. vesic</i> ^{X1}
<i>PR9 gyrB*</i> F9 R9	accacgtcgcgttcaagccgg gtaccgcgtaagcaactcg cgccaggatgtcgtaatgaaac	69,2 59,4 58,5	109	522 482 590	<i>X. gardneri</i> ^{X1}
<i>PR10 gyrB*</i> F10 R10	cgctccgaagcgccccggca ccaccaagatgaccgtgctg acctggaacaccatgtgatgc	69,9 59,3 59,2	108	83 50 157	<i>X. axon pvs.</i> ^{X1}
<i>PR11 ITS*</i> F11 R11	agaacacgcatcagcctcaacgct agaccaccactctgaatgtag gatattctcaaacgctcgtacg	66,1 57,7 57,9	108	335 264 371	<i>X. fragariae</i> ^{X1}
<i>PR12 ITS*</i> F12 R12	ctttcgcataccgacctgtgccgg ggcgtcctcacaattacctg cttcccagtgagctaaggc	66,9 57,6 57,5	92	92 32 123	<i>X. hortorum</i> ^{X1}
<i>PF13 ITS*</i> F13 R13	accagaccaccacgctagatgt ctgataagggtgaggtcggtag gatattctcaaacgctcgtacg	66,2 57,9 57,9	143	255 224 366	<i>X. arboricola</i> ^{X1}
<i>PF14 ITS*</i> F14 R14	tgcaaagcaggtgctctcccagc ggatgccaagtcctttatgg tcactatggtgagcctgtcg	66,5 57,4 57,2	101	136 80 180	<i>X. bromi</i> ^{X1}
<i>PF15 ITS*</i> F15 R15	atcccgacaggtcgcgatagt gagagcacctgctttgcaag gtagactcgaactaccgacctc	66,2 57,8 57,9	141	158 120 260	<i>X. cassavae</i> ^{X1}
<i>PR16 ITS*</i> F16 R16	agtcccgccttagcctcaacgaca agcgagcgtttgagaatatctatc aagccaacaacggaacatac	66,7 57,8 58,4	98	402 349 446	<i>X. o pvs., Xooel</i> ^{X1}

Проба/ праймер	Последовательность 5г->3г	T _{отж.} , °С	Длина фрагмента, п.н.	Позиция олиго-нуклеотида	Целевой вид, группа
<i>PF17</i> ITS*	aaggcggagacttctgagcccct	66,1	98	392	<i>X. pisi</i> ^{X1}
F17	cgtagcgcgagcgtttgagatac	57,9		347	
R17	сaccaacgcgaacatacgac	58,0		444	
<i>PF18</i> ITS*	tgcaaaagcaggtgctctcccagc	66,5	103	137	<i>X. vasc</i> ^{X2}
F18	cagtatgcgaaagtcccacatg	58,5		79	
R18	tcaaatggtggagcctgtcg	58,3		181	
F19: R19:	gtcatcgccttgcgggcgtcctc общий для <i>X. codiaei</i> и <i>X. melonis</i> ccccagtgcggcctcggagctata	61,9	529	25 530	<i>X. melonis</i> ^{X1}
F20: R20:	gtcatcgccttgcgggcgtcctc общий для <i>X. codiaei</i> и <i>X. melonis</i> ссаagttgcctcggggtcacatgc	62,0	539	25 540	<i>X. codiaei</i> ^{X2}
F21: R21:	gttccgcatggggcggaa cgaagtccccgccttagcca	60,2	337	60 377	<i>X. albicans</i> ^{X2}
F22: R22:	ctgcattcagagattccgccaca aaagcctggagcgaactataacg	59,8	391	48 415	<i>X. sacchari</i> ^{X2}
F23: R23:	ggacgcgtttatacgaactcaa cgaagtccccgccttagcca	58,7	413	36 422	<i>Xhyacinti</i> ^{X2}
F24: R24:	gtcaggcgtcctcacaagtgacc gcgcagtc aaattcttagtgtgt	59,9	333	35 344	<i>Xtheicola</i> ^{X2}
F25: R25:	cctacaggcgtcctcacaagtaa tgatctcaaacgctcgtacgtc	58,6	422	32 405	<i>Xtranslucens</i> ^{X2}

*- TaqMan® проба; F – прямой праймер; R – обратный праймер.