https://doi.org/10.17116/molgen20213902146

Новый ПЦР-тест в режиме «реального времени» для *Acidovorax citrulli*, основанный на последовательности, кодирующей белок S-box домена PAS

© О.Ю. СЛОВАРЕВА[1, 2], Е.В. СТАРИКОВА[2, 3]

[1]ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева», Москва, Россия;
[2]ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», р.п. Быково, Раменский район, Московская область, Россия;
[3]ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Диагностика возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* нуждается в новых высокоспецифичных методах, основанных на ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ). Целью исследования являлась разработка нового теста ПЦР-РВ для идентификации *A. citrulli.*

Материалы и методы. Методом кластеризации белковых последовательностей 9 геномов *A. citrulli* и 9 геномов *A. avenae* с помощью программы cd-hit были идентифицированы 153 белковых кластера, присутствующих во всех 9 штаммах *A. citrulli* и отсутствующих во всех штаммах *A. avenae*. Полученные кластеры сравнивали с известными белковыми последовательностями (nr) с помощью программы blastp с целью установления их специфичности для *A. citrulli*. Кодирующие последовательности специфичных для *A. citrulli* белков использовали для подбора праймеров и зонда. Специфичность ПЦР-РВ проверяли путем тестирования ДНК 6 штаммов *A. citrulli* и 188 штаммов нецелевых бактерий.

Результаты. В результате поиска специфичных для *A. citrulli* белковых последовательностей нами был идентифицирован белок S-box PAS домена. Проведенные ПЦР-тесты показали 100% специфичность как при тестировании целевых штаммов (все реакции положительны), так и с нецелевыми штаммами (все реакции отрицательны).

Заключение. Таким образом, был разработан новый тест ПЦР-РВ для идентификации *A. citrulli*, основанный на последовательности, кодирующей белок S-box домена PAS.

Ключевые слова: *Acidovorax citrulli, ПЦР в режиме «реального времени», домен PAS, белок S-box, диагностика фитопатогенов, карантин растений.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Словарева О.Ю. — https://orcid.org/0000-0001-6022-5955; e-mail: slovareva.olga@gmail.com
Старикова Е.В. — https://orcid.org/0000-0001-6582-210X; e-mail: hed.robin@gmail.com
Автор, ответственный за переписку: Словарева О.Ю. — e-mail: slovareva.olga@gmail.com

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Словарева О.Ю., Старикова Е.В. Новый ПЦР-тест в режиме «реального времени» для *Acidovorax citrulli*, основанный на последовательности, кодирующей белок S-box домена PAS. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021;39(2):46–50. https://doi.org/10.17116/molgen20213902146

Novel qPCR-based test system for *Acidovorax citrulli* based on PAS domain S-box protein gene

© O.Yu. SLOVAREVA[1, 2], E.V. STARIKOVA[2, 3]

[1]Russian State Agrarian University — Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Moscow, Russia;
[2]Federal State Organization «All-Russian Plant Quarantine Center», Bykovo, Russia;
[3]Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

ABSTRACT

Goal. The diagnosis of *Acidovorax citrulli* requires new highly specific methods based on qPCR. The goal of the study was to develop a new qPCR-based test for the identification of *A. citrulli*.

Materials and methods. By clustering the protein sequences of 9 *A. citrulli* genomes and 9 *A. avenae* genomes, the cd-hit program was used to identify 153 protein clusters present in all 9 *A. citrulli* strains and absent in all *A. avenae* strains. The resulting clusters were compared with known protein sequences (nr) using the blastp program to determine their specificity for *A. citrulli*. Coding sequences of *A. citrulli*-specific proteins were used for the selection of primers and the probe. The specificity of qPCR was tested by using the DNA of 6 *A. citrulli* strains and 188 non-target bacteria strains.

Results. As a result of the search for *A. citrulli*-specific protein sequences, identified the S-box PAS domain protein. The qPCR tests performed showed 100% specificity both when testing target strains (all reactions were positive) and with non-target strains (all reactions were negative).

Conclusion. Thus, a new qPCR test was developed for the identification of *A. citrulli*, based on the sequence encoding the S-box protein of the PAS domain.

Keywords: *Acidovorax citrulli, qPCR, PAS domain, S-box protein, phytopathogen diagnostic, plant quarantine.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Slovareva O.Yu. — https://orcid.org/0000-0001-6022-5955; e-mail: slovareva.olga@gmail.com
Starikova E.V. — https://orcid.org/0000-0001-6582-210X; e-mail: hed.robin@gmail.com
Corresponding author: Slovareva O.Yu. — e-mail: slovareva.olga@gmail.com

TO CITE THIS ARTICLE:
Slovareva OYu, Starikova EV. Novel qPCR-based test system for Acidovorax citrulli based on PAS domain S-box protein gene. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2021;39(2):46–50. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/molgen20213902146

Введение

Acidovorax citrulli — это фитопатогенная бактерия, способная наносить значительный ущерб производству продукции тыквенных культур в местах своего распространения [1]. *A. citrulli* является карантинным организмом для многих стран [2]. Ранняя диагностика возбудителя — ключ к контролю его распространения [3]. Использование методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) является самым быстрым способом обнаружения бактерий в образце. При этом ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) — метод, требующий минимальных трудозатрат [4]. На сегодняшний день для диагностики *A. citrulli* применяется только один метод ПЦР-РВ, представленный в диагностическом протоколе Европейской и средиземноморской организации по карантину и защите растений (EOKЗР) PM7/127(1) [5]. Однако оценка специфичности данного теста показала неудовлетворительный результат [6]. В связи с высокой актуальностью проведено исследование, целью которого являлась разработка нового теста на основе ПЦР-РВ для идентификации *A. citrulli*.

Материалы и методы

Для поиска мишени использовали аннотированные белки, соответствующие кодирующим последовательностям 9 геномных сборок *Acidovorax citrulli* и 9 геномных сборок *Acidovorax avenae,* загруженным с NCBI RefSeq (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/) в сентябре 2019 г. **(табл. 1)**.

С целью получения неизбыточных наборов белков для каждого из геномов каждый набор белковых последовательностей кластеризовали с помощью программы cd-hit. Алгоритм программы производит группировку последовательностей по заданному пользователем порогу идентичности с использованием «жадного» алгоритма фильтрации по коротким «словам» (коротким частям последовательностей: дипептидам, трипептидам и др.). Для создания неизбыточного набора последовательностей использовали порог идентичности 90%, допустимая разница в длине последовательностей составила 80%.

Неизбыточные наборы белковых последовательностей 9 штаммов *A. citrulli* и 9 штаммов *A. avenae* были помечены в соответствии с видом и кластеризованы с помощью программы cd-hit при пороге идентичности в 60% и допустимой разнице в длине последовательностей 80%. Для идентификации белковых кластеров, присутствующих во всех 9 штаммах *A. citrulli* и отсутствующих во всех 9 штаммах *A. avenae,* нами был применен скрипт на языке Python.

Полученные белковые кластеры, присутствующие у *A. citrulli* и отсутствующие у *A. avenae*, сравнивали с известными белковыми последовательностями (nr) с помощью программы blastp с целью оценки их специфичности для *A. citrulli*. Специфичными считались белки, имеющие низкое сходство (<70% идентичности) с белками других бактериальных видов как родственных, так и не родственных *A. citrulli*. Из анализа исключили фаговые белки, а также белки, имеющие внутривидовую вариабельность у *A. citrulli* как неподходящие в качестве мишени.

Праймеры подбирали с использованием программы PrimerBlast.

Праймеры и зонд произведены ЗАО «Евроген» (Россия).

Оценку аналитической специфичности нового метода ПЦР-РВ проводили со следующими штаммами: изоляты *A. citrulli*, выделенные из растений арбуза в США, Испании и Китае и позднее заложенные в Испанской коллекции фитопатогенов Института сельскохозяйственных исследований (IVIA), г. Валенсия под номерами 51, 2609 и 3000 соответственно. Также в исследовании использовали 2 штамма *A. citrulli* DLS 1035, выделенные из экстрактов семян арбуза и дыни, и штамм DLS 1456, выделенный из экстракта семян арбуза; происхождение экстрактов — Италия. Также использовали следующие нецелевые бактерии: *Acidovorax cattleya* (NBC 430), *Arthrobacter castelli*, *Arthrobacter* sp. (2 изолята), *Burkholderia* sp., *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (3 изолята), *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (CFBP (Франция) 2405 и 3491), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (10 изолятов, а также штамм NCPPB (UK) 2137), *Curtobacterium* sp. (2 изолята), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flacumfaciens* (1 изолят, а также штамм CFBP 3418), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii* (CFBP 1384), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* (CFBP 2403), *Dickeya* sp. (изолят из коллекции EVIRA, Финляндия), *Dickeya chrysanthemi* (DSMZ (Германия) 4610-0508-001), *Dickeya da-*

Таблица 1. **Геномные сборки штаммов *A. citrulli* и *A. avenae*, использованные для биоинформатического предсказания ПЦР-мишени**

Вид	Штамм	Идентификатор RefSeq Assembly	Число предсказанных белков
Acidovorax citrulli	AAC00-1	GCF_000015325.1	4581
»	KACC17005	GCF_002441975.1	4442
»	M6	GCF_001593665.2	4178
»	DSM 17060	GCF_900100305.1	4167
»	AAC00-1 #5684	GCF_003096435.1	4619
»	AAC00-1 #5596	GCF_003387255.1	4546
»	AAC00-1 #5593	GCF_003664145.1	4541
»	pslb65	GCF_000948135.1	4157
»	tw6	GCF_000968215.1	4267
Acidovorax avenae	ATCC 19860	GCF_000176855.2	4659
»	T10_61	GCF_001282395.1	4574
»	AA81_1	GCF_003029685.1	4701
»	MD5	GCF_003029725.1	4345
»	SH7	GCF_003029785.1	3958
»	AA78_5	GCF_003029805.1	3769
»	AA99_2	GCF_003029825.1	3580
»	KL3	GCF_003029905.1	3532
Acidovorax avenae	SF12	GCF_003030005.1	3636

dantii subsp. *dadantii* (DSMZ 18020-1112-001), *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* (DSMZ 18013), *Dickeya paradisiaca* (DSMZ 18069-0406-001), *Dickeya solani* (DSMZ 28711), *Dickeya zeae* (DSMZ 18068-0816-001), *Enterobacter amnigenus*, *Erwinia amylovora* (47 изолятов, а также штаммы CFBP 1430 и 3025, ACW (Швейцария) 35298, 35295, 58459, 37905, 35356 и 57467, LMG (USA) 2068 и NCPPB 683), *Erwinia billingiae*, *Erwinia piriflorinigrans* (2 изолята), *Erwinia tasmaniensis, Microbacterium* sp. (2 изолята), *Microbacterium phyllosphaerae*, *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum lupini*, *Ochrobactrum* sp. (2 изолята), *Paenibacillus*, *Pantoea agglomerans* (2 изолята, а также штамм DSMZ 1619), *Pantoea ananatis*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (6 изолятов), *Pectobacterium atrosepticum* (штамм DSMZ 18077 и изолят из коллекции EVIRA, Финляндия), *Pectobacterium betavasculorum* (DSMZ 18076-0306-001), *Pectobacterium cacticida* (DSMZ 21821-0908-001), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (DSMZ 30168), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* (DSMZ 22556-0509-001), *Pectobacterium wasabiae* (DSMZ 18074-0315-001), *Phyllobacterium* sp., *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas congelans* (ICMP (Новая Зеландия) 9032), *Pseudomonas corrugata, Pseudomonas fuscovaginae* (DSMZ 7231-0205-001), *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas hibiscicola*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (CFBP 2214), *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (штаммы CFBP 1390, 1429 и 3652), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (2 изолята), *Pseudomonas syringae*, *Rahnella aquantilis*, *Ralstonia solanacearum* (16 изолятов, а также штаммы NCPPB 2315 и 2316, AOBC PPSCD (Венгрия) 1069 и 1071), *Rathayibacter tritici* (CFBP 1385), *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas* sp. (2 изолята), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *alli* (CFBP 6107), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (CFBP 2534), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (2 изолята), *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* (NCPPB 1946), *Xanthomonas euvesicatoria* (DSMZ 19128), *Xanthomonas fragariae* (NCPPB 1469), *Xanthomonas gardneri* (DSMZ 19127), *Xanthomonas hyacinthi, Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (NCPPB 3002), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (CFBP 2286), *Xanthomonas perforans* (DSMZ 18975), *Xanthomonas translucens* (DSMZ 18974), *Xanthomonas vesicatoria* (DSMZ 22252), *Xylella fastidiosa* и *Xylophilus ampelinus* (2 изолята, а также штамм LSV 28.02, Франция). Всего для проведения тестов использовали 188 штаммов нецелевых бактерий.

ДНК-матрицу всех штаммов брали в концентрации 15—20 нг/мкл. Для измерения концентрации использовали спектрофотометр NanoDrop 2000C Thermo Fisher Scientific (США). Каждый штамм тестировали в трехкратной повторности.

Так, qPCR проводили, используя следующий состав смеси на 1 реакцию: 12 мкл деионизированной воды, 5 мкл мастер-микса 5X qPCRmix-HS производства фирмы ЗАО «Евроген» (Россия), по 1 мкл каждого праймера в концентрации 10 пкм, 1 мкл зонда в концентрации 5 пкм и 5 мкл ДНК-матрицы. Для проведения ПЦР использовали амплификатор детектирующий ДТпрайм, ООО «ДНК-Технология» (Россия). Программа амплификации: начальная денатурация — 5 мин при 95 °C, затем 40 циклов: 10 с при 94 °C, 30 с при 62 °C и 20 с при 72 °C.

Результаты и обсуждение

В результате кластеризации белковых последовательностей штаммов *A. citrulli* и 9 штаммов *A. avenae* были идентифицированы 4744 белковых кластера,

Таблица 2. **Последовательности праймеров и зонда на локус C8E07_RS00895**

Праймер/ зонд	Последовательность (5'-3')	Tm	Цепь	Начало в AAC00-1 #5596	Конец в AAC00-1 #5596
PAS F	CCAAAGCCAGCACGAGGAGA	62.45	+	208579	208598
PAS R	GAACAGCGAGACGGAGTGGT	62.14	—	208735	208716
PAS P	FAM-ACGCGCATCAACGGCGTCATCG-BHQ1	62	+	208600	208622

содержащих 2 и более белков. Не были определены ни в один кластер 977 белков.

Нами было идентифицировано 153 белковых кластера (размером от 60 до 1389 аминокислот), присутствующих во всех 9 штаммах *A. citrulli* и отсутствующих во всех штаммах *A. avenae*. Большинство из данных кластеров были аннотированы как мембранные белки, рестриктазы, фаговые белки и др. В результате сравнения полученных белковых кластеров с известными белковыми последовательностями (nr), многие из них были исключены из кандидатов на ПЦР-мишень, поскольку имели высокое сходство с белками других бактериальных видов и родов (таких как *Variovorax*, *Ottowia*, *Stenotrophomonas*, *Bordetella* и др.), хотя их кодирующие последовательности и отсутствовали в геноме близкородственного вида *A. avenae*.

В результате такого отбора нами был идентифицирован белок S-box длиной 524 аминокислотных остатка (WP_011796953.1). Этот белок принадлежит домену PAS и участвует в принятии бактерией сигналов, таких как фотоны, молекулы газа и др. Сигнальные домены PAS встречаются у многих организмов, но отличаются высокой вариабельностью (идентичность около 20%) [7]. Белок S-box домена PAS был идентичен во всех 9 штаммах *A. citrulli* и не имел значительного (согласно вышеупомянутому критерию в 70% идентичности) сходства с другими белками.

Кодирующая последовательность *A. citrulli* штамма AAC00-1 # 5596 (NZ_QUNC01000001.1), соответствующая белку WP_011796953.1 (locus_tag=«C8E07_RS00895»), была в дальнейшем использована для разработки праймеров. Были подобраны следующие праймеры на ген S-box PAS домена (локус C8E07_RS00895) *A. citrulli* штамма AAC00-1 #5596 (NZ_QUNC01000001.1) **(табл. 2)**.

В ходе оценки специфичности ПЦР-РВ были получены положительные результаты реакции со всеми 6 штаммами *A. citrulli*. Проведение реакции с 188 нецелевыми бактериальными изолятами показало отрицательные результаты. Таким образом, новый метод ПЦР-РВ, основанный на нуклеотидной последовательности гена S-box PAS домена, позволяет проводить выявление и идентификацию *A. citrulli*, избегая перекрестных реакций с нецелевыми бактериями.

Заключение

В данном исследовании методом кластеризации белковых последовательностей геномов *A. citrulli* и *A. avenae* были получены 153 белковых кластера, присутствующих только в штаммах *A. citrulli*. После анализа полученных кластеров на предмет их специфичности для *A. citrulli* нами был идентифицирован белок S-box PAS домена. Кодирующая последовательность, соответствующая данному белку, была использована для подбора праймеров и зонда. В результате оценки специфичности нового метода ПЦР-РВ было установлено, что тест подходит для обнаружения и идентификации всех штаммов *A. citrulli* и не приводит к получению ложноположительных реакций с нецелевыми бактериями. Использование нового метода ПЦР-РВ для идентификации *A. citrulli*, основанного на последовательности, кодирующей белок S-box домена PAS, позволит быстро проводить тестирование здоровья продукции тыквенных культур в условиях рутинной диагностики.

Соблюдение этических стандартов

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Информация о соблюдении стандартов работы с животными: настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Информация об исследованиях, где в качестве объектов выступали люди: настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Финансирование. Отсутствует.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Yang R, Garcia DS, Pérez Montaño F, Mateus da Silva G, Zhao M, Jiménez Guerrero I, et al. Complete assembly of the genome of an *Acidovorax citrulli* strain reveals a naturally occurring plasmid in this species. *Front. Microbiol.* 2019;10:1400. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01400

2. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), *Acidovorax citrulli. Categorizatio*n. 2020. https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC/categorization

3. Islam MR, Hossain MR, Kim HT, Jesse DMI, Abuyusuf M, Jong HJ, et al. Development of molecular markers for detection of *Acidovorax citrulli* strains causing bacterial fruit blotch disease in Melon. Intern. *J Mol Sci*. 2019;20(11). pii: E2715. https://doi.org/10.3390/ijms20112715

4. Xinyue B, Xiaodong L, Haibo Y, Mengnan A, Rui L, Zihao X, et al. Development of a multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of Cucumber green mottle mosaic virus and *Acidovorax citrulli* in watermelon. *Peer J*. 2019;7:e7539. https://doi.org/10.7717/peerj.7539

5. European and Mediterranean Plant Protection Organization. PM7/127(1) *Acidovorax citrulli*. *EPPO Bulletin*. 2016;46(3):444-462. ISSN 0250-8052. https://doi.org/10.1111/epp.12330

6. Slovareva OY, Kornev KP, Matyashova GN, Stakheev AA, Prikhodko SI. Recommended procedure for detection and identification *Acidovorax citrulli* in seeds. *AIP Conference Proceedings*. 2019;2063:030020. https://doi.org/10.1063/1.5087328

7. Nebert DW. Aryl hydrocarbon receptor (AHR): «pioneer member» of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of «sensors» of foreign and endogenous signals. *Prog Lipid Res*. 2017;67:38-57. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.06.001

Поступила в редакцию 07.02.2020
Received 07.02.2020
После доработки 20.02.2020
Revised 20.02.2020
Принята к публикации 27.02.2020
Accepted 27.02.2020

Поздравление!



Поздравляем с юбилеем
заместителя главного редактора журнала
Романову Юлию Михайловну!
Желаем здоровья, творческих успехов, удачи!