

DOI 10.33952/2542-0720-2021-1-25-174-186

УДК 579.64:632.3

Приходько С. И., Яремко А. Б., Корнев К. П.

**ИСПЫТАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ ЦВЕТНОЙ
КАПУСТЫ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *MACULICOLA* (McCULLOCH)
YOUNG ET AL.**

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ВНИИКР)

Реферат. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. является возбудителем бактериальной пятнистости цветной капусты и поражает большое количество растений семейства крестоцветные. Фитосанитарный контроль мест производства растительной продукции, предназначенной для экспорта, делает необходимой качественную диагностику фитопатогенных представителей данного рода. Цель исследований – определение комплекса методов для диагностики возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты, а также оценка их применимости в лабораторной практике. Объектом исследований является возбудитель бактериальной пятнистости капусты *P. syringae* pv. *maculicola*. В статье представлены результаты испытаний двух методов идентификации *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al., проведенных в 2020 г. на базе ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений». Первый метод основан на определении биохимических свойств с использованием тест-набора API 20E производства (bioMérieux's, Франция), второй метод представляет собой классическую ПЦР. В исследованиях применяли типовой бактериальный штамм CFBR 1657, полученный специалистами ФГБУ «ВНИИКР» из Французской коллекции бактерий, ассоциированных с растениями (Cirm-CFBR). Сравнение биохимических свойств 23 бактерий рода *Pseudomonas* показало наличие в рамках данного теста двух характеристик, позволяющих отличить патовар *Pseudomonas* s. pv. *maculicola* от других патоваров вида, – продукция ацетоина и гидролиз желатина. Также протестированы две пары праймеров, ориентированных на различные мишени в геноме *P. syringae*. Наиболее высокие показатели сходства получаемых фрагментов с базой данных NCBI показал ПЦР с праймерами PsyF/PsyR (97,2 %). Аналитическая чувствительность ПЦР с праймерами PsyF/PsyR в растительном и семенном экстрактах составила 10⁵ КОЕ/мл. Определение аналитической специфичности с 33 штаммами бактерий рода *Pseudomonas* позволило выявить кросс-реакции с штаммами следующих видов: *P. congelans*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *syringae*. Таким образом, для дифференциации видов методом ПЦР с праймерами PsyF/PsyR необходимо дополнительно определить нуклеотидную последовательность полученных продуктов амплификации с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, ПЦР, биохимия, секвенирование, аналитическая специфичность, аналитическая чувствительность.

Для цитирования: Приходько С. И., Яремко А. Б., Корнев К. П. Испытание различных методов идентификации возбудителя бактериальной пятнистости листьев цветной капусты *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (mcculloch) Young et al. // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 1(25). С. 174–186. DOI 10.33952/2542-0720-2021-1-25-174-186.

For citation: Prikhodko S. I., Iaremko A. B., Kornev K. P. Testing of different methods for identification of bacterial leaf spot (*Siringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al.) plant pathogen in cauliflower leaves // *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2021. No. 1(25). P. 174–186. DOI 10.33952/2542-0720-2021-1-25-174-186.

Введение

Впервые род *Pseudomonas* был описан Migula в 1894. Данный род входит в число наиболее сложных для определения и в настоящее время насчитывает более 100 видов. Большинство этих видов являются сапрофитами, обитающими в водной и почвенной среде, успешно применяемыми в различных биотехнологиях. Производство антибиотических веществ или сидерофоров позволяет использовать виды *Pseudomonas* для биологической борьбы с фитопатогенами. В свою очередь, некоторые псевдомонады являются патогенами для растений, например, вид *Pseudomonas syringae* [1].

P. syringae поражает широкий спектр растений, причем симптомы заболеваний могут проявляться в виде гнилей (быстрое отмирание растительных тканей), различного рода пятнистостей листьев, а также образования галлов, благодаря чему вид разделили на несколько патовариантов [2]. Вид часто можно обнаружить на растении без каких-либо симптомов поражения, что свидетельствует о его способности выступать в роли комменсала. Известно, что многие фитопатогенные бактерии довольно длительное время существуют в виде эпифитов или эндофитов, не причиняя растению вреда. В определенный момент происходит переход бактерии из стадии резидента в фитопатогенную [1–3].

Разделение вида *P. syringae* на патовары в зависимости от поражаемого растения было полезно с точки зрения сельского хозяйства, но утратило актуальность при обнаружении случаев поражения клонами разных растений-хозяев, кроме того, штаммы *P. syringae* одного патовара не всегда имеют близкое филогенетическое родство [1, 4, 5]. На сегодняшний день по патогенезу и кругу поражаемых растений изучаемый вид разделяют на более чем 60 патоваров, а на основе гомологии ДНК выделяют девять геномовидов [6].

Эволюционная динамика фитопатогенных псевдомонад позволяет обходить системы защиты сельскохозяйственных культур, быстро адаптироваться к новым растениям-хозяевам, обеспечивает устойчивость к антибактериальным агентам [2]. Поэтому важно иметь надежные методы идентификации, которые позволят выявить низкие концентрации бактерий вида *P. syringae* в различных субстратах.

P. s. pv. maculicola поражает сельскохозяйственные и дикорастущие растения семейства Крестоцветные (Капустные). Наиболее восприимчивыми культурами являются цветная капуста (*B. oleracea* var. *botrytis*), брюссельская капуста (*B. oleracea* var. *gemmifera*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), репа (*B. rapa* subsp. *rapa*) [7, 8].

Бактерия распространена практически повсеместно, в том числе и на территории Российской Федерации. Зонами наибольшей вредоносности бактерии в России являются регионы Южного Федерального округа, Центрального Черноземья, а также возбудитель встречался в отдельных областях Северо-Западного и Центрального Федеральных округов. Данные регионы характеризуются возникновением спорадических эпифитотий с поражением более 10 % растений [7]. Необходимость в качественной диагностике *P. s. pv. maculicola* возникла в связи с запуском государственного проекта по поддержке экспорта продукции АПК. В рамках данного проекта ежегодно фитосанитарные службы проводят обследования мест производства экспортной продукции. Экспортируемая за рубеж продукция, а также места ее выращивания должны соответствовать фитосанитарным

требованиям стран-импортеров, в том числе и по отсутствию бактериальных болезней. Такие требования существуют у Китая, Мексики, Египта, Израиля, Судана и Индонезии. Пораженная *P. syringae* pv. *maculicola* продукция полностью теряет товарный вид, что делает невозможным ее переработку или реализацию [9].

Сложность идентификации *P. syringae* pv. *maculicola* заключается в ее близком генетическом родстве и культуральном сходстве с другими патоварами вида [10, 11]. Выявление возбудителя по симптомам не представляется возможным благодаря частому нахождению инфекции в растениях в латентной форме. Одним из характерных признаков инфицирования *P. syringae* pv. *maculicola* является появление хлороза на листьях, что обусловлено синтезом фитотоксина коронатина. Подобный токсин синтезируют еще несколько патоваров *P. syringae*: *atropurpurea*, *glycinea*, *morsprunorum* и *tomato*. Данные патовары инфицируют райграсс, бобовые культуры, растения рода *Prunus* и томаты. Синтез коронатина регулируется кластером генов, расположенном в плазмиде [12, 13]. Помимо хлороза, коронатин также вызывает задержку роста и гипертрофию тканей растения. Токсин играет важную роль в вирулентности патоваров, которые его продуцируют. Коронатин вызывает ряд реакций у растений, которые могут быть аналогичны таковым на этилен или индолуксусную кислоту. Следовательно, можно предположить, что токсин изменяет метаболизм хозяина также как гормоны роста растений. Международный опыт в диагностике патогена показывает отсутствие каких-либо специфичных молекулярно-генетических тестов. Так, в Австралии во время вспышки бактериальной пятнистости, изоляты, полученные с растений семейства крестоцветные, были идентифицированы как *P. syringae* pv. *maculicola* следующими методами: тест на патогенность на цветной капусте и томате, профиль жирных кислот, гер-PCR, RLFP-анализ полиморфизма длин фрагментов внутренней спейсерной области гена 16S-23S (ITS) с использованием семи рестриктаз [14].

В 2015 г. Wang W. с соавторами разработали портативные иммунохроматографические (ИХА) полоски на основе меченых золотом моноклональных антител. Авторы рекомендуют использовать ИХА-тест для экспресс-диагностики *P. syringae* pv. *maculicola*. Порог выявления на чистой культуре патогена составляет 10^5 КОЕ/мл. Результат теста может быть получен в течение 10 мин и показывает хорошую специфичность при проверке со следующими бактериями: *Burkholderia glumae* (NCPPB 3591), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (NCPPB 1585), *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (NCPPB 3002), *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (NCPPB 449) и *P. syringae* pv. *syringae* (NCPPB 2844). На семенах брокколи и редиса чувствительность ИХА-полосок составляла 5×10^5 КОЕ/мл и 10^6 КОЕ/мл соответственно [15].

Патовар *maculicola* имеет генетическое сходство и общие признаки патогенеза с другими патоварами *P. syringae*, в частности *P. syringae* pv. *tomato*, что в значительной степени затрудняет разработку специфичного метода диагностики [10].

Цель исследований – определение комплекса методов для диагностики возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты, а также оценка их применимости в лабораторной практике.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования является возбудитель бактериальной пятнистости капусты *P. syringae* pv. *maculicola*. Исследования проводили в 2020 г. на базе ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ВНИИКР).

Изучение биохимических свойств.

Для изучения биохимических свойств использовали систему API 20E производства bioMérieux's, Франция. С ее помощью проверено 23 штамма

Pseudomonas sp. из бактериологической коллекции ФГБУ «ВНИИКР»: *P. syringae* pv. *maculicola*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. congelans*, 2 штамма *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *glycinea*, 4 штамма *P. corrugata*, *P. congelans*, *P. fuscovaginae*, *P. azotoformans*, *P. hibiscicola*, *P. graminis*, *P. mediterranea*.

Принцип теста и учет результатов: стрип API-20E состоит из 20 микролунок, содержащих дегидрированные субстраты. Редегидратация субстратов происходит при внесении в лунки суспензии исследуемой бактерии. В результате накопления продуктов метаболизма происходит изменение цвета среды, спонтанное или проявляющееся при добавлении реактивов. Результаты интерпретировали по таблице в инструкции производителя теста. Заполнение лунок стрипов и расшифровку результатов анализа проводили согласно инструкции производителя. Общее время инкубирования стрипов и анализ результатов занял 72 часа. Реакции, не требующие внесения дополнительных реагентов, детектировали по истечении 48 часов. Если в трех или более лунках стрипа наблюдали положительную реакцию, то проверяли все остальные лунки и регистрировали результаты. Если положительными оказывались менее трех тестов, то стрип инкубировали еще 24 часа.

Испытание тестов на основе ПЦР

Оптимизацию и апробацию молекулярно-генетических тестов по выявлению и идентификации возбудителя бактериальной пятнистости листьев цветной капусты *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. проводили с применением типового бактериального штамма CFBP 1657 из Французской коллекции бактерий, ассоциированных с растениями (Cirm-CFBP).

Для установления возможности использования теста ПЦР в качестве отборочного, без предварительного высева на питательную среду, аналитическую чувствительность определяли в растительном экстракте. Растительный экстракт готовили из вегетативных частей и семян рапса (*Brassica napus* L.)

Подготовка проб вегетативных частей растений.

От растений отделяли фрагменты растительной ткани и формировали навеску массой 5 г. Навеску помещали в контейнер с 30 мл PBS-буфера (10 mM буфер: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 2,9 г; $\text{KH}_2\text{PO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г; NaCl – 8,0 г; KCl – 0,2 г; до 1000 мл дистиллированной воды, pH = 7,2), затем шейкировали при 200 об./мин в течение 1–1,5 ч. Полученный мацерат фильтровали через обеззоленный бумажный фильтр «Синяя лента». Фильтрат концентрировали методом центрифугирования при 8000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS-буфера.

Подготовка проб семян рапса.

Навеску семян около 10 г заливали стерильным PBS-буфером и оставляли на ночь при температуре +4 °C в стерильном пакете для гомогенизации BagFilter (Interscience, Франция) с боковым фильтром (диаметр пор < 250 мкм). Далее навеску кратковременно гомогенизировали на лопаточном гомогенизаторе BagMixer 400 W (Interscience, Франция). Полученный гомогенат сливали в центрифужную пробирку объемом до 50 мл типа OakRidge (Nalgene, ThermoFisherScientific) и концентрировали методом центрифугирования при 10000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в PBS-буфере.

Для инокуляции полученных растительных экстрактов готовили ряд предельных десятикратных разведений чистой культуры штамма *P. syringae* pv. *maculicola* CFBP 1657 в PBS-буфере. Для определения концентрации бактерий в разведениях проводили посев на среду Кинга Б с последующим подсчетом КОЕ

через 48 часов культивирования при 27 °С. Растительные и семенные экстракты инокулировали приготовленными разведениями в концентрациях от 10⁷ до 10² КОЕ/мл и использовали для выделения ДНК набором реагентов «Проба-ГС» («Агродиагностика», Россия) согласно инструкции производителя. Искусственно зараженные экстракты использовали для определения аналитической чувствительности. Нуклеиновые кислоты из чистой культуры целевого организма выделяли нагреванием водной бактериальной суспензии при 96 °С в течение 10 мин.

Для определения специфичности теста использовали бактериальные штаммы рода *Pseudomonas* (таблица). Часть бактерий приобретена в международных коллекциях, часть изолирована сотрудниками ФГБУ «ВНИИКР» с различных растений. Для определения специфичности использовали как эпифитные штаммы, так и фитопатогенные псевдомонады.

Таблица – Перечень штаммов, использованных для определения специфичности ПЦР с праймерами PsyF/PsyR

№	Номер в коллекции ФГБУ «ВНИИКР»	Название штамма
1	0222	<i>Pseudomonas congelans</i>
2	0335	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>
3	0363	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>
4	0382	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>
5	0385	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>
6	0396	<i>Pseudomonas</i> sp. = <i>fluorescens</i>
7	0401	<i>Pseudomonas corrugata</i>
8	0403	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
9	0440	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>
10	1327-1	<i>Pseudomonas kilonensis</i> , <i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Pseudomonas corrugata</i>
11	1328	<i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas kilonensis</i>
12	1601-1	<i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas mediterranea</i>
13	1601-2	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
14	1431	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas mosselii</i> ,
15	1845	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
16	М65	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
17	К-чистая	отрицательный контроль
18	0046	<i>Pseudomonas congelans</i>
19	0223	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
20	0359	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
21	0361	<i>Pseudomonas syringae</i>
22	0366	<i>Pseudomonas</i> sp.(<i>nitrireducensens/aeruginosa/denitrificans</i>)
23	0370	<i>Pseudomonas</i> sp. (<i>nitriroducensens/nitrireducensens/multiresinivorans/aeruginosa/ denitrificans</i>)
24	0383	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>
25	0384	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>
26	0392	<i>Pseudomonas graminis</i>
27	0395	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>baetica/moraviensis/helmanticensis/migulae/mandelii/granadensis /fluorescens</i>
28	0397	<i>Pseudomonas argentensis/parafulva/straminea</i>
29	0402	<i>Pseudomonas corrugata</i>
30	0428	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>
31	0430	<i>Pseudomonas</i> sp.(<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>)
32	0431	<i>Pseudomonas</i> sp.(<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>)
33	0432	<i>Pseudomonas</i> sp.(<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>)
34	К-чистая	отрицательный контроль

Примечание. Нумерация соответствует электрофореграмме, представленной на рисунке 4.

Для диагностики *P. syringae* pv. *maculicola* в растениях и семенах рапса, а также для идентификации чистой культуры использовали два теста на основе ПЦР с праймерами:

PsyF (5'-ATGATCGGAGCGGACAAG-3')

PsyR (5'-GCTCTTGAGGCAAGCACT-3') [16];

PsF (5'-AGCCGTAGGGGAACCTGCGG-3')

PsR (5'- TGA CTGCCAAGGCATCCACC-3') [17].

Для составления реакционной смеси использовали окрашенный ПЦР-буфер 5× (MasDD Mix (Dialat Ltd.)).

Условия амплификации с праймерами PsyF/PsyR: 1× (96 °С – 10 мин), 30× (94 °С – 30 сек.; 61 °С – 30 сек.; 72 °С – 30 сек.), 1× (72 °С – 10 мин). Размер продукта амплификации составляет 144 н.п. Мишень в геноме *Pseudomonas syringae* расположена между двух смежных генов «домашнего хозяйства» *plsX* и *rpmF*, кодирующих соответственно белок синтеза жирных кислот/фосфолипидов *PlsX* и рибосомный белок *L32*.

Условия амплификации с праймерами PsF/PsR: 1× (96 °С – 10 мин), 25× (95 °С – 20 сек.; 64 °С – 15 сек.; 72 °С – 15 сек.), 1× (72 °С – 5 мин). Целевая последовательность в геноме *Pseudomonas syringae* располагается на участке гена 23S рРНК.

Амплификацию проводили на термоциклере модели SimpliAmp VeriFlex 96 (ThermoFisherScientific, США) с последующей визуализацией фрагментов методом горизонтального электрофореза в 1,5 % триборатном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Визуализацию продуктов ПЦР осуществляли на гельдокументирующей системе Gel Doc XR+ (BioRad, США).

Определение нуклеотидной последовательности ПЦР-продуктов проводили методом секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе «Нанофор-05» (ЗАО «Синтол», Россия). Выравнивание и редактирование последовательностей вручную проводили с помощью программы «BioEditv.7.0.9» (Hall, 2007), проверка и сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями базы данных GenBank проводили с помощью программы NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Результаты и их обсуждение

Для идентификации патогенов некоторые фитопатологи рекомендуют прибегать к определению биохимических свойств изолятов [18–20].

В результате определения биохимических свойств установлено, что практически для всех исследуемых штаммов характерна реакция утилизации цитратов. Единственный штамм, не утилизовавший цитраты, из 23 изученных – это *P. syringae* pv. *glycinea*. Иная ситуация наблюдалась с синтезом фермента β-галактозидазы и лизиндекарбоксылазы. Почти все проанализированные псевдомонады не вырабатывали данные ферменты, кроме штамма *P. hibiscicola* и *P. graminis* соответственно. Все изученные штаммы, кроме *P. azotoformans*, не являются сульфидогенными. У данного штамма наблюдали слабую реакцию в тесте на продукцию сероводорода (H₂S). Также всего два штамма способны к продуцированию уреазы – это *P. fluorescens* и *P. syringae* pv. *glycinea*. Способность к восстановлению N₂ была выявлена только у двух штаммов *P. corrugata* из четырех, все остальные псевдомонады показали отрицательный результат. Большинство псевдомонад ферментировали меллибиозу и арабинозу, но всего пять штаммов использовали в качестве источника углерода глюкозу, рамнозу и сахарозу. Утилизировать амигдалин оказался способен только 1 вид – *P. hibiscicola*.

Следует выделить отрицательный результат на желатиназу у *P. syringae* pv. *maculicola*. Согласно данным Shaad с соавторами [20], эта реакция имеет неопределенный результат для *P. syringae* pv. *maculicola*. В опытах японских ученых также не все группы штаммов *P. syringae* pv. *maculicola* осуществляли протеолитическое

разжижение желатина [19]. *P. syringae* pv. *Maculicola* продуцирует ацетоин и триптофандезаминазу. Ацетоин является летучим метаболитом и характеризуется ростстимулирующим действием, он также играет важную роль в образовании растительно-бактериальных сообществ [21]. Реакция на образование ацетоина позволяет отличить *P. syringae* pv. *maculicola* от патоваров *syringae* и *tomato*.

На рисунке 1 представлены фотографии стрипов API-20E некоторых штаммов, в том числе целевого объекта.



Рисунок 1 – Результаты биохимических реакций для штамма 1657 *P. syringae* pv. *maculicola*, двух штаммов *P. syringae* pv. *syringae* (0223, 1845), *Pseudomonas congelans* (0222) и *P. fluorescens* (M65)

Как мы указывали ранее, из-за высокого генетического сходства между патоварами *P. syringae* разработка теста, позволяющего диагностировать *P. syringae* pv. *maculicola* в растительном экстракте, крайне затруднительна.

В ходе научно-исследовательской работы мы провели испытание двух тестов ПЦР, рекомендованных для идентификации *P. syringae*.

Оба теста показали положительную реакцию с ДНК, выделенной из чистой культуры типового штамма *P. syringae* pv. *maculicola* (рисунок 2).

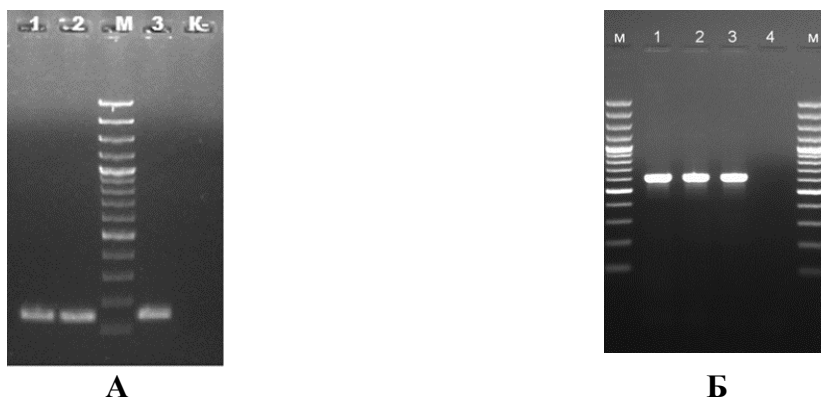


Рисунок 2 – Электрофореграмма классической ПЦР с праймерами PsyF/PsyR (А) и PsF/PsR (Б)

Примечание. 1-3 – ДНК *P. syringae* pv. *maculicola*; (К-), 4 – отрицательный контроль.

ПЦР с праймерами PsF/PsR рекомендована в качестве теста для идентификации *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* с образованием продукта амплификации длиной 752 н.п. [17]. Продукт такого же размера получен и при постановке ПЦР с ДНК *P. syringae* pv. *maculicola* (см. рисунок 2). По результатам секвенирования максимальное сходство последовательности изучаемого штамма с последовательностью штамма *P. syringae* pv. *maculicola* strain 10 (Sequence ID: AY342174.1) составило 89,49 %. По результатам секвенирования продукта амплификации ДНК *P. syringae* pv. *maculicola* с праймерами PsyF/PsyR максимальное сходство с полногеномной последовательностью *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 (Sequence ID: CP047260.1) составило 97,20 %.

В дальнейшей работе использовали только праймерную пару PsyF/PsyR. При проведении диагностики в лаборатории необходимо применять тесты с высокими критериями эффективности, для чего проводят валидацию. Основными критериями, позволяющими оценить возможность применения метода в качестве отборочного при проведении исследований образцов растений и семян являются аналитическая чувствительность и специфичность.

На рисунке 3 представлены результаты определения аналитической чувствительности теста ПЦР с праймерной парой PsyF/PsyR.

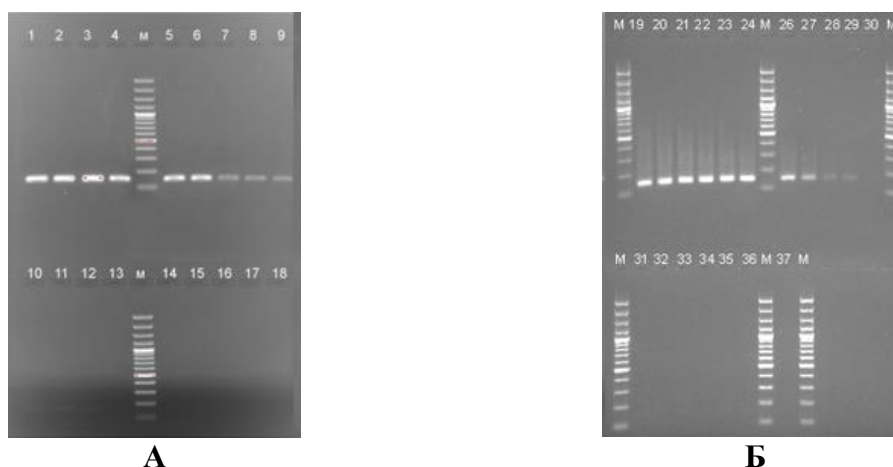


Рисунок 3 – Определение аналитической чувствительности ПЦР с праймерами PsyF/PsyR

Примечание. А – (1–18) – инокулированные экстракты из крестоцветных растений в концентрациях 10^7 – 10^2 КОЕ/мл; Б – (20–37) – инокулированные экстракты из семян в концентрациях 10^7 – 10^2 КОЕ/мл.

Таким образом, порог чувствительности теста при исследовании искусственно зараженных растительных экстрактов составил 10^4 КОЕ/мл (дорожки № 10, 11, 12), при этом фрагмент очень слабо визуализировался.

При проверке чувствительности теста в семенном экстракте пороговой можно считать концентрацию 10^5 КОЕ/мл (дорожки № 26, 27, 28). В одной повторности концентрации 10^4 КОЕ/мл также обнаружен специфичный продукт (№ 29).

На рисунке 4 представлена электрофореграмма, отражающая результаты определения аналитической специфичности.

По результатам электрофореза специфичные продукты амплификации получены со следующими бактериальными изолятами: 1 – 0222 *Pseudomonas congelans*, 3 – 0382 *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, 4 – 0385 *Pseudomonas*

savastanoi pv. *glycinea*, 9 – 0440 *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*, 15 – 1845 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, 18 – 0223 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

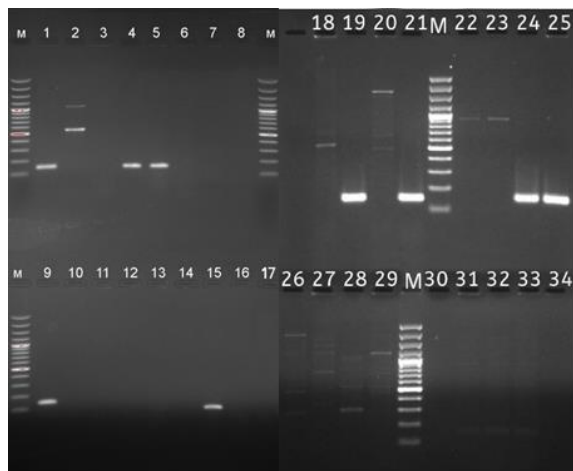


Рисунок 4 – Определение аналитической специфичности теста ПЦР PsyF/PsyR

Из перечисленных штаммов 0223 и 1845 являются фитопатогенными, могут поражать растения семейства крестоцветные и, следовательно, могут давать ложноположительные результаты при лабораторных исследованиях образцов растений по показателю *P. syringae* pv. *maculicola*. Штаммы 0383 и 0384 являются патогенами бобовых культур и риск присутствия данных бактерий в образцах рапса крайне низок. Штамм 0440 – патогенен для овса и присутствие в образцах рапса маловероятно. Штамм 0222 *Pseudomonas congelans* не является фитопатогеном, это флуоресцирующая псевдомонада-эпифит [22]. Благодаря ее возможному нахождению на различных растениях увеличивается вероятность ложноположительной реакции при проведении лабораторного анализа. Неспецифичные фрагменты обнаружены на дорожках под № 2, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 28, 29.

Выводы

Диагностика возбудителя бактериальной пятнистости листьев цветной капусты представляет собой комплексный процесс. Для проведения идентификации фитопатогена необходимо использовать несколько методов, основанных на различных биологических принципах. Два испытанных теста ПЦР позволяют определить вид *P. syringae*. Для дифференциации патоваров необходимо дополнительно определить нуклеотидную последовательность полученных ПЦР-фрагментов путем секвенирования по Сэнгеру. Наиболее высокие показатели сходства получаемых фрагментов с базой данных NCBI показал ПЦР с праймерами PsyF/PsyR (97,2 %). При проверке работы теста непосредственно в искусственно зараженном экстракте из вегетативных частей и семян рапса чувствительность составила 10^5 КОЕ/мл, поэтому работа с данным тестом и напрямую с зараженным материалом возможна только при наличии характерных симптомов заболевания. Кроме того, при определении специфичности установлены кросс-реакции с штаммами следующих видов: *P. congelans*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *syringae*. Данные бактерии могут находиться на растениях в качестве эпифитов и соответственно давать ложноположительный результат тестирования. Таким образом, использование теста ПЦР с праймерами PsyF/PsyR рекомендуется проводить на изолятах чистых бактериальных культур. Также дополнительно возможно применение определение биохимических свойств изолятов. Исследование

и сравнение некоторых биохимических свойств типового штамма *P. syringae* pv. *maculicola* с другими видами рода *Pseudomonas* показало их значительное сходство между собой. При определении патовара следует особое внимание уделить тестам на продукцию ацетона и реакции на желатиназу.

Литература

1. Bender C. L., Alarcon-Chaidez F., Gross D. C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases // *Microbiology and Molecular biology reviews*. 1999. Vol. 63 (2). P. 266–292. DOI: 10.1128/MMBR.63.2.266-292.1999.
2. Sarkar S. F., Guttman D. S. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen // *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. Vol. 70 (4). P. 1999–2012. DOI: 10.1128/aem.70.4.1999-2012.2004.
3. Приходько С. И., Селицкая О. В. Антагонистические свойства бактерий, выделенных из листьев капусты // *АгроЭкоИнфо*. 2015. № 6(22). [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://agroecoinfo.narod.ru/journal/TEXT/RUSSIAN/2015/st_40_annot.html (дата обращения 08.09.2020).
4. Hwang M. S. H., Morgan R. L., Sarkar S. F., Wang P. W., Guttman D. S. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71 (9). P. 5182–5191. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5182-5191.2005.
5. Sawada H., Suzuki F., Matsuda I., Saitou N. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster // *J. Mol. Evol.* 1999. Vol. 49. P. 627–644. DOI: 10.1007/pl00006584.
6. Ilicic R., Balaz J., Stojšin V., Bagi F., Pivic R., Stanojkovic-Sebic A., Josic D. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pvs. from different host plants by repetitive sequence-based PCR and multiplex-PCR // *Zemdirbyste-Agriculture*. 2016. Vol. 103 (2). P. 199–206. DOI: 10.13080/z-a.2016.103.026.
7. Станчева Й. Атлас болезней сельскохозяйственных культур. Том I. Болезни овощных культур. М: ПЕНСОФТ, 2005. 118 с.
8. Агроэкономический атлас России и сопредельных стран. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Brassicaceae/Brassicaceae_Pseudomonas_syringae_pv_maculicola/index.html (дата обращения 09.09.2020).
9. Приходько С. И., Яремко А. Б., Корнев К. П. Характеристика и распространение возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. // *Фитосанитария. Карантин растений*. 2020. № 3 (3). С. 25–32.
10. Gironde S., Manceau C. Housekeeping gene sequencing and multilocus variable-number tandem-repeat analysis to identify subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* that correlate with host specificity // *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. Vol. 78 (9). P. 3266–3279. DOI: 10.1128/AEM.06655-11.
11. Álvarez-Mejía C., Hernández-Guzmán G., López-Ramírez V., Valenzuela-Soto J-H., Marsch R. Genetic diversity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains // *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018. Vol. 12(3). P. 1233–1238. DOI: 10.22207/JPAM.12.3.24.
12. Cuppels D. A., Ainsworth T. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine // *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. Vol. 61(10). P. 3530–3536. DOI: 10.1128/AEM.61.10.3530-3536.1995.
13. Zhao Y., Damicone J. P., Demezas D. H., Rangaswamy V., Bender C. L. Bacterial leaf spot of leafy crucifers in Oklahoma caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* // *Plant Disease*. 2000. Vol. 84 (9). P. 1016–1020. DOI: 10.1094/PDIS.2000.84.9.1015.
14. Peters B. J., Ash G. J., Cother E. J., Hailstones D. L., Noble D. H., Urwin N. A. R. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity // *Plant Pathology*. 2004. Vol. 53. P. 72–79. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2004.00946.x.
15. Wang W., Feng M., Kong D., Liu L., Song S., Xu C. Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in broccoli and radish seeds // *Food and Agricultural Immunology*. 2015. Vol. 26(5). P. 738–745. DOI: 10.1080/09540105.2015.1023266.
16. Guilbaud C., Morris C.E., Barakat M., Ortet P., Berge O. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group // *FEMS Microbiology Ecology*. 2016. Vol. 92 (1). P. 1–9. DOI: 10.1093/femsec/fiv146.
17. Kazempour M. N., Kheyrghoo M., Pedramfar H., Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran // *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9 (20). P. 2860–2865.

18. Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material // Ed. by Fatmi M., Walcott R. R., Shaad N.W. 2nd edition. USA: American Phytopathological Society Press, 2017. P. 165–172.
19. Takikawa Y., Takahashi F. Bacterial leaf spot and blight of crucifer plants (Brassicaceae) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *alisalensis* // J Gen Plant Pathol. 2014. Vol. 80. P. 466–474. DOI: 10.1007/s10327-014-0540-4.
20. Shaad N. W., Jones J. B., Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogen Bacteria. 3rd edition. USA: American Phytopathological Society Press, 2001. P. 84–117.
21. Шапошников А. И., Белимов А. А., Кравченко Л. В., Виванко Д. М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3. С. 16–22.
22. Peix A., Ramírez-Bahena M.-H., Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas* // Infection, Genetics and Evolution. 2009. Vol. 9 (6). P. 1132–1147. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.08.001.

References

1. Bender C. L., Alarcon-Chaidez F., Gross D. C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases // Microbiology and Molecular biology reviews. 1999. Vol. 63 (2). P. 266–292. DOI: 10.1128/MMBR.63.2.266-292.1999.
2. Sarkar S. F., Guttman D. S. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen // Applied and Environmental Microbiology. 2004. Vol. 70 (4). P. 1999–2012. DOI: 10.1128/aem.70.4.1999-2012.2004.
3. Prikhodko S. I., Selitskaya O. V. Antagonistic properties of bacteria isolated from cabbage leaves // AgroEcoInfo. 2015. No. 6 (22). [Electronic resource]. Access point: http://agroecoinfo.narod.ru/journal/TEXT/RUSSIAN/2015/st_40_annot.html. (reference's date 08.09.2020).
4. Hwang M. S. H., Morgan R. L., Sarkar S. F., Wang P. W., Guttman D. S. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae* // Applied and Environmental Microbiology. 2005. Vol. 71 (9). P. 5182–5191. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5182-5191.2005.
5. Sawada H., Suzuki F., Matsuda I., Saitou N. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster // J. Mol. Evol. 1999. Vol. 49. P. 627–644. DOI: 10.1007/pl00006584.
6. Ilicic R., Balaz J., Stojsin V., Bagi F., Pivic R., Stanojkovic-Sebic A., Josic D. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pvs. from different host plants by repetitive sequence-based PCR and multiplex-PCR // Zemdirbyste-Agriculture. 2016. Vol. 103 (2). P. 199–206. DOI: 10.13080/z-a.2016.103.026.
7. Stancheva J. Atlas of diseases of agricultural crops. Volume I. Diseases of vegetable crops. Moscow: PENSOFT, 2005. 118 p.
8. Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. [Electronic resource]. Access point: http://www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Brassicaceae/Brassicaceae_Pseudomonas_syringae_pv_maculicola/index.html (reference's date 09.09.2020)
9. Prikhodko S. I., Yaremko A. B., Kornev K. P. Characteristics and distribution of cauliflower bacterial spot pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. // Plant Health and Quarantine. 2020. No. 3 (3). P. 25–32.
10. Gironde S., Manceau C. Housekeeping gene sequencing and multilocus variable-number tandem-repeat analysis to identify subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* that correlate with host specificity // Applied and Environmental Microbiology. 2012. Vol. 78 (9). P. 3266–3279. DOI: 10.1128/AEM.06655-11.
11. Álvarez-Mejía C., Hernández-Guzmán G., López-Ramírez V., Valenzuela-Soto J-H., Marsch R. Genetic diversity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains // Journal of Pure and Applied Microbiology. 2018. Vol. 12(3). P. 1233–1238. DOI: 10.22207/JPAM.12.3.24.
12. Cuppels D. A., Ainsworth T. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61(10). P. 3530–3536. DOI: 10.1128/AEM.61.10.3530-3536.1995.
13. Zhao Y., Damicone J.P. Demezas D. H., Rangaswamy V., Bender C. L. Bacterial leaf spot of leafy crucifers in Oklahoma caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* // Plant Disease. 2000. Vol. 84 (9). P. 1016–1020. DOI: 10.1094/PDIS.2000.84.9.1015.
14. Peters B. J., Ash G. J., Cother E. J., Hailstones D. L., Noble D. H., Urwin N. A. R. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity // Plant Pathology. 2004. Vol. 53. P. 72–79. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2004.00946.x.

15. Wang W., Feng M., Kong D., Liu L., Song S., Xu C. Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in broccoli and radish seeds // Food and Agricultural Immunology. 2015. Vol. 26(5). P. 738–745. DOI: 10.1080/09540105.2015.1023266.
16. Guilbaud C., Morris C.E., Barakat M., Ortet P., Berge O. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group // FEMS Microbiology Ecology. 2016. Vol. 92 (1). P. 1–9. DOI: 10.1093/femsec/fiv146.
17. Kazempour M. N., Kheyrghoo M., Pedramfar H., Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran // African Journal of Biotechnology. 2010. Vol. 9 (20). P. 2860–2865.
18. Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material // Ed. by Fatmi M., Walcott R. R., Shaad N.W. 2nd edition. USA: American Phytopathological Society Press, 2017. P. 165–172.
19. Takikawa Y., Takahashi F. Bacterial leaf spot and blight of crucifer plants (Brassicaceae) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *alisalensis* // J Gen Plant Pathol. 2014. Vol. 80. P. 466–474. DOI: 10.1007/s10327-014-0540-4.
20. Shaad N. W., Jones J. B., Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogen Bacteria. 3rd edition. USA: American Phytopathological Society Press, 2001. P. 84–117.
21. Shaposhnikov A. I., Belimov A. A., Kravchenko L. V., Vivanko D. M. Interaction of rhizosphere bacteria with plants: mechanisms of formation and factors of the efficiency in associative symbioses (review) // Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]. 2011. No. 3. P. 16–22.
22. Peix A., Ramírez-Bahena M.-H., Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas* // Infection, Genetics and Evolution. 2009. Vol. 9 (6). P. 1132–1147. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.08.001.

UDC 579.64:632.3

Prikhodko S. I., Iaremko A. B., Kornev K. P.

TESTING OF DIFFERENT METHODS FOR IDENTIFICATION OF BACTERIAL LEAF SPOT (*SIRINGAE* PV. *MACULICOLA* (McCULLOCH) YOUNG ET AL.) PLANT PATHOGEN IN CAULIFLOWER LEAVES

Summary. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. is a pathogen of cauliflower bacterial spot that affects many plants of the Cruciferae family. The need for quality diagnostics of this species arose due to the mandatory phytosanitary inspection of places of production of plant products intended for export. Our research aims at determining a set of methods for the diagnosis of the pathogen of cauliflower bacterial leaf spot and evaluating these methods' applicability in laboratory practice. The object of the research is *P. syringae* pv. *maculicola* – the causative agent of cauliflower bacterial leaf spot. The article presents the test results of two methods for the identification of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. carried out in 2020 at the All-Russian Plant Quarantine Center (VNIKKR). The first method is based on the determination of biochemical properties using the API 20E test kit produced by bioMérieux's (France); the second one – is a conventional PCR. The type bacterial strain CFBP 1657 obtained by specialists of the All-Russian Plant Quarantine Center (VNIKKR) from French collection of plant-associated bacteria (Cirm-CFBP) was used in the studies. A comparison of the biochemical properties of 23 bacteria of the genus *Pseudomonas* showed that there are only two characteristics within this test that distinguish *P. s.* pv. *maculicola* from other species pathovars: acetoin products and gelatin hydrolysis. Two pairs of primers with different targets in the *P. syringae* genome were also tested. PCR with PsyF/PsyR primers demonstrated the highest similarity of the obtained fragments with the NCBI database (97.2 %). The analytical sensitivity of PCR with PsyF/PsyR primers in plant and seed extracts was 105 CFU/ml. Determination of analytical specificity with 33 bacterial strains of the genus *Pseudomonas* revealed cross-reactions with strains of the following species: *P. congelans*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *syringae*. Thus, to differentiate the species by means of PCR with PsyF/PsyR primers, the

nucleotide sequence of the obtained amplification products should be additionally determined by Sanger sequencing.

Keywords: *Pseudomonas syringae pv. maculicola, PCR, biochemistry, sequencing, analytical specificity, analytical sensitivity.*

Приходько Светлана Игоревна, научный сотрудник, заведующая лабораторией бактериологии испытательного лабораторного центра ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ВНИИКР); 140150, Московская область, Раменский район, р. п. Быково, ул. Пограничная, 32; e-mail: svetlana.prik@yandex.ru.

Яремко Анастасия Богдановна, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ВНИИКР); 140150, Московская область, Раменский район, р. п. Быково, ул. Пограничная, 32; e-mail: an_ya94@mail.ru.

Корнев Константин Павлович, кандидат биологических наук, заместитель директора ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ВНИИКР); 140150, Московская область, Раменский район, р.п. Быково, ул. Пограничная, 32; e-mail: konstantin.kornev@gmail.com.

Prikhodko Svetlana Igorevna, researcher, head of the bacteriology Laboratory of the Testing Laboratory Center of the All-Russian Plant Quarantine Center (VNIKCR); 32, Pogradichnaya str., vill. Bykovo, Ramensky district, Moscow region, 140150, Russia; e-mail: svetlana.prik@yandex.ru.

Iaremko Anastasia Bogdanovna, junior researcher of the Scientific Department of molecular genetic methods of diagnostics of the All-Russian Plant Quarantine Center (VNIKCR); 32, Pogradichnaya str., vill. Bykovo, Ramensky district, Moscow region, 140150, Russia; e-mail: an_ya94@mail.ru.

Kornev Konstantin Pavlovich, Cand. Sc. (Biol.), deputy director of the All-Russian Plant Quarantine Center (VNIKCR); 32, Pogradichnaya str., vill. Bykovo, Ramensky district, Moscow region, 140150, Russia; e-mail: konstantin.kornev@gmail.com.

Дата поступления в редакцию – 06.11.2020.

Дата принятия к печати – 11.12.2020.