

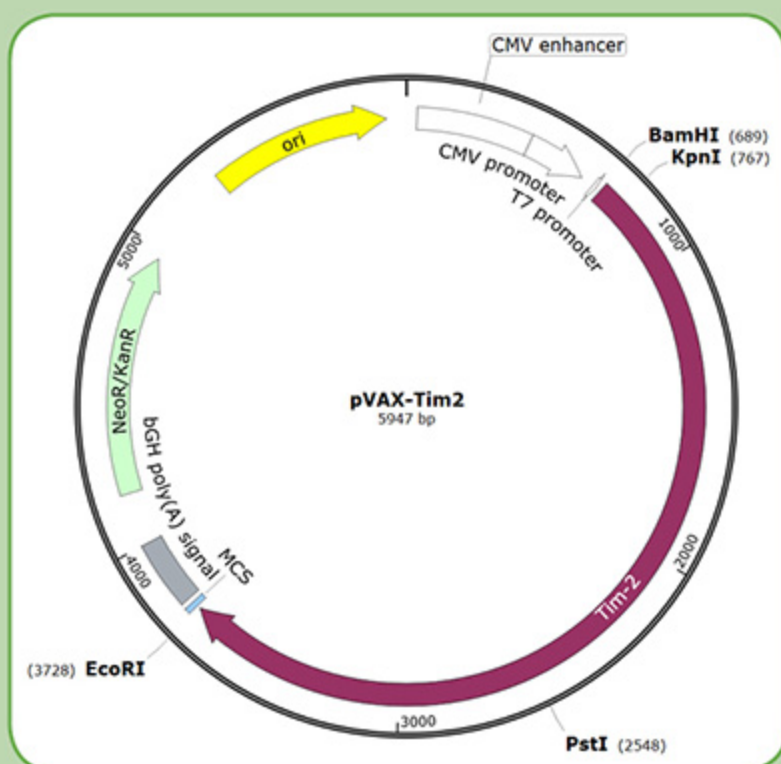


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2024 TOM VOLUME 107 ВЫПУСК ISSUE 3



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СТЕБЛЕВОГО МЕЛАНОЗА ПШЕНИЦЫ *PSEUDOMONAS CICHORII* МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Е.В. Воронов¹, О.Ю. Словарева^{1*}, А.А. Десятерик^{1,2}, М.О. Кондратьев¹, А.Н. Игнатов³

¹Всероссийский центр карантина растений, Быково

²Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва

³Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва

* ответственный за переписку, e-mail: slovareva.olga@gmail.com

Фитопатогенная бактерия *Pseudomonas cichorii* поражает широкий перечень сельскохозяйственных культур, в том числе вызывает стеблевой меланоз пшеницы – культуры стратегического значения для России. Возбудитель стеблевого меланоза регулируется импортерами российской зерновой продукции. В связи с этим, важная задача – актуализация метода идентификации *P. cichorii* на основе полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ). В качестве мишени для ПЦР-РВ использован участок длиной 90 п.о. одного из известных генов патогенности *hrcRST P. cichorii*. Положительный результат ПЦР-анализа был получен для референтных штаммов *P. cichorii* и подтвержден секвенированием ДНК последовательности ампликона. Полученные нуклеотидные последовательности были сопоставлены с гомологичными фрагментами генома типового штамма DSM 50259. В результате сравнительного анализа ДНК были изменены последовательности прямого праймера и зонда. Для зонда была показана возможность применения доступной на территории РФ модификации в которой используется сочетание красителя FAM и гасителя флуоресценции BHQ. Оценку специфичности новой праймерной системы ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 проводили с использованием 107 штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, включая *P. cichorii*, *P. fuscovaginae*, *P. syringae*, *P. trivialis*, *P. viridiflava*, *P. chlororaphis*, *P. lutea*, *P. orientalis*. С ДНК 4-х штаммов (*P. poae*, *P. graminis* и 2 штамма *P. fluorescens*) показана неспецифичная реакция на 35–37 пороговом цикле, накопление не имело экспоненциальный вид. Аналитическая чувствительность теста позволяет обнаружить *P. cichorii* в концентрации 10¹ КОЕ/мл. Тест ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 может быть использован в качестве отборочного при обнаружении *P. cichorii* в растительной продукции и для характеристики чистых бактериальных культур.

Ключевые слова: ПЦР-РВ, бактериозы зерновых культур, фитосанитарные требования, карантин растений, диагностика фитопатогенов, молекулярно-генетические методы идентификации

Поступила в редакцию: 16.08.2024

Принята к печати: 01.11.2024

Введение

Грамотрицательная гамма-протеобактерия *Pseudomonas cichorii* (далее – *Pc*) – опасный патоген, вызывающий заболевания многих сельскохозяйственных культур. Бактерия патогенна главным образом для культур семейств Сложноцветные, Мальвовые, Бобовые. Основными поражаемыми растениями являются *Apium graveolens* (сельдерей пахучий) (Surico, Iacobellis, 1978), *Chrysanthemum* (хризантема) (Janse, 1987; Osdashi, 2020), включая *Chrysanthemum morifolium* (хризантема садовая) (Rodrigues et al., 1976); *Cichorium endivia* (эндивий) (Patel et al., 2021) и его подвиды и сорта, *Cichorium intybus* (цикорий обыкновенный) (Van Outryve et al., 1989), *Gerbera* (гербера), в т.ч. *Gerbera jamesonii* (гербера Джемсона) (Miller, Knauss, 1973), *Hibiscus rosa-sinensis* (гибискус китайский) (Chase, 1986), *Vigna angularis* (адзуки) (Wood, Easdown, 1990) и *Lactuca sativa* (латук посевной) (Hikichi et al., 1996). К прочим растениям, которым может вредить патоген, относятся также представители семейств Тыквенные, Пасленовые, Яснотковые, Мятликовые и некоторых других: *Ocimum basilicum* (базилик душистый) (Miller et al., 1986), *Borago officinalis* (огуречная трава)

(Cambra et al., 2004), *Citrullus lanatus* (арбуз) (Amadi et al., 2009), *Coreopsis lanceolata* (кореопсис ланцетовидный) (Garibaldi et al., 2009), *Cucumis melo* (дыня), *Cucurbita pepo* (кабачок) (Bastas, 2013), *Duranta erecta* (дуранта ползучая) (Gumtow et al., 2013), *Glycine max* (соя) (Yu, Lee, 2012), *Luffa aegyptiaca* (люффа египетская) (Sharma, Agora, 2016), *Nicotiana tabacum* (табак), *Phlox paniculata* (флокс метельчатый) (Corryn et al., 2009), *Plumeria pudica* (плюмерия стыдливая) (Sugiyama et al., 2018), *Solanum lycopersicum* (томат) (Trantas et al., 2013), *Stevia rebaudiana* (стевия медовая) (Marque et al., 2016), *Solanum melongena* (баклажан) (Hikichi et al., 2013), *Perilla frutescens* (перилла) (Jang et al., 2023), *Triticum* (пшеница) (Piening, MacPherson, 1985) и ряд других видов.

В связи с широким перечнем поражаемых культур и многообразием вызываемых симптомов, бактериозы, вызываемые *Pc*, имеют множество названий – бактериальный ожог сельдерея (bacterial blight of celery) (Elsisi, 2019), мокрая гниль грибных пластинок (drippy gill of mushrooms) (Gill, 1994), листовая гниль перца (leaf rot of

capsicum) (Rivera et al., 1981), лаковая пятнистость латука (varnish spot of lettuce) (Grogan et al., 1977) и другие.

Как патоген зерновых культур, *Pc* впервые упомянут в 1965 г., когда бактерия была изолирована из яровой пшеницы, выращиваемой на почве с дефицитом меди в Канаде (Piening, MacPherson, 1985). В дальнейшем, сообщалось об обнаружении возбудителя на пшенице в 1974–1996 гг. в США, Новой Зеландии и Аргентине (Wilkie, Dye, 1974; Malhi et al., 1989; Perneznt et al., 1994; Alippi, 1996). Бактериоз, вызываемый *Pc* на пшенице, был назван стеблевым меланозом; симптомы заболевания появляются в фазе молочной спелости в виде мелких светло-коричневых поражений на стебле под нижними узлами (Piening,

Материалы и методы исследования

Материалами исследования являлись штаммы целевого вида *Pc* VNIИKR-B-0201, VNIИKR-B-0202, VNIИKR-B-0203 (Тешич и др., 2021) и 104 штамма родственных бактерий рода *Pseudomonas* (табл. 1).

В таблице 2 представлены характеристики используемых олигонуклеотидов.

Приведенный в публикации В. Cottyn с коллегами (2010) модифицированный олигонуклеотид (зонд) PscHrcMGB687 (5'-FAM-TTC AAG CAG GCC ATG T-MGB-NFQ3-3'), входящий в состав теста ПЦР-РВ PscHrc662F/PscHrc751R/PscHrcMGB687 на участок длиной 90 п.о. одного из генов патогенности *hrcRST* (Cottyn et al., 2010), в работе не использовали, поскольку длина зонда составляла 16 нуклеотидов, а температура отжига всего 48 °С. Указанные характеристики являются не оптимальными для зонда в случае использования его без модификации MGB (minor groove binder, торговая марка Applied Biosystems TaqMan, США), увеличивающей температуру отжига даже при низком GC-составе и небольшой длине.

Предварительный этап оценки наличия генетической мишени для праймеров PscHrc662F/PscHrc751R (Cottyn et al., 2010) у *Pc* проводили с ДНК штаммов VNIИKR-B-0201, VNIИKR-B-0202, VNIИKR-B-0203. Использовали следующий состав реакционной смеси: 16.0 мкл воды, свободной от нуклеаз, 5.0 мкл 5× qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), по 1 мкл каждого праймера в концентрации 10 пмоль и 2.0 мкл ДНК. В качестве отрицательного контрольного образца в реакционную смесь вместо ДНК вносили деионизированную воду. Параметры ПЦР: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин., затем 35 циклов: 95 °С – 15 с, 60 °С – 40 с, 72 °С – 15 с, финальная элонгация при 72 °С – 7 мин. ПЦР проводили на амплификаторе ДТпрайм 5М6 («ДНК-Технология», Россия). Каждый штамм тестировали в трех повторах. Продукты ПЦР двух повторов визуализировали с помощью электрофореза в 2.0% агарозном геле (размер ПЦР-продукта 90 п.о.) с окраской красителем бромистый этидий и документировали при помощи системы ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США). Продукты ПЦР третьего повтора очищали с помощью «Cleanup Standard» (ЗАО «Евроген», Россия), измеряли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) и секвенировали методом Сэнгера с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» (Thermo Scientific, США). Обработку полученных в результате секвенирования нуклеотидных последовательностей проводили в программе Ugene 47 (Unipro UGENE

MacPherson, 1985).

Актуальность изучения *Pc* как патогена пшеницы вызвана тем, что бактерия регулируется фитосанитарными требованиями Египта, Иордании и Мексики – крупных импортеров российской зерновой продукции (Словарева, 2023). Для проведения анализа экспортируемой из РФ пшеницы на наличие *Pc* требуются надежные экспресс-тесты, которые на момент начала исследования отсутствовали, или компоненты для них не были доступны на территории РФ.

Цель исследования – разработка оригинальной праймерной системы для ПЦР анализа в режиме «реального времени» для идентификации *Pc*.

software, [сайт] URL: <https://ugene.net/ru/download-all.html>).

Последовательности целевых ампликонов штаммов VNIИKR-B-0201, VNIИKR-B-0202, VNIИKR-B-0203, полученные с праймерами PscHrc662F/PscHrc751R, выравнивали в программе Ugene 47 (Unipro UGENE software, [сайт] URL: <https://ugene.net/ru/download-all.html>) вместе с гомологичной последовательностью из генома типового штамма *Pc* DSM 50259 (RefSeq NZ_CP007039.1) с помощью алгоритма UGENE. Выровненные нуклеотидные последовательности использовали при редактировании последовательностей праймеров и зонда для теста PscHrc662F/PscHrc751R/PscHrcMGB687 (Cottyn et al., 2010) и при разработке теста ПЦР-РВ. Испытание разработанного теста ПЦР-РВ проводили на амплификаторе детектирующем CFX96 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь содержала: 14.9 мкл воды, свободной от нуклеаз, 5.0 мкл 5X qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), по 1.0 мкл каждого праймера в концентрации 10 пмоль, 0.1 мкл внутреннего положительного контроля (ЗАО «Синтол», Россия), и 2.0 мкл ДНК. Параметры ПЦР: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин., затем 45 циклов: 95 °С – 15 с и 60 °С – 45 с.

Оценку способности нового теста ПЦР-РВ отличать *Pc* от других бактерий рода *Pseudomonas* проводили путем тестирования целевых и родственных штаммов, перечисленных в таблице 1.

Оценку аналитической чувствительности (наименьшего числа копий генетической мишени, детектируемых в образце) нового теста ПЦР-РВ проводили с использованием ДНК, выделенной из бактериальных суспензий штамма *Pc* VNIИKR-B-0201 в концентрациях от 10¹ КОЕ/мл (низкая) до 10⁷ КОЕ/мл (высокая). В качестве матрицы для суспензий использовали стерильную воду (тестирование чистой культуры) и аналитические пробы, приготовленные из семян пшеницы по методике, оптимизированной для идентификации других бактериозов зерновых культур (Мувинги и др., 2022). Концентрацию бактерий в суспензиях определяли методом стандартных разведений и высевом на питательный агар.

Результаты проведения нового теста ПЦР-РВ оценивали как положительные при наличии специфичной реакции в виде экспоненциальной кривой флуоресценции по каналу FAM и при отсутствии специфичной реакции при тестировании отрицательных контролей, а также при наличии реакции по каналу HEX (внутренний положительный контроль) при тестировании всех образцов ДНК.

Таблица 1. Штаммы бактерий, используемые в исследовании
Table 1. Bacteria strains, used in the study

Штамм VNIKR-B [Strain VNIKR-B]*	Вид бактерии [Bacterial species]	Растение -хозяин [Host plant]
0201, 0202, 0203	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Lactuca sativa</i>
0335 (DSM 7231)	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>Oryza sativa</i>
0440 (CFBP 2216)	<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	<i>Avena sativa</i>
0204 (20M5-11), 0205 (20M5-12), 0206 (20M52-170)	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0207 (20M25-82)	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	<i>Triticum durum</i>
0208 (20M32-116), 0209 (20M39-138)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0210 (20M5-10)	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0211 (20M29-101), 0213 (22B16-65), 0214 (22B48-183)	<i>P. syringae</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0212 (20M30-107)	<i>P. syringae</i>	<i>Triticum turgidum</i>
0215 (22C1-344), 0216 (22C1-360), 0217 (22C46-472)	<i>P. syringae</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
0218 (20M2-5), 0219 (20M19-55), 0221 (20M50-163)	<i>P. trivialis</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0220 (20M28-91)	<i>P. trivialis</i>	<i>Secale cereale</i>
0222 (20M3-6), 0223 (20M9-25), 0226 (20M22-66), 0227 (20M22-69), 0228 (20M26-83)	<i>P. graminis</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0224 (20M15-43)	<i>P. graminis</i>	<i>Triticum dicoccum</i>
0225 (20M18-50)	<i>P. graminis</i>	<i>Triticum sphaerococcum</i>
0229 (20M28-98)	<i>P. graminis</i>	<i>Secale cereale</i>
0230 (20M3-7), 0231 (20M9-26), 0232 (20M26-84), 0233 (20M27-85), 0234 (20M27-86)	<i>P. poae</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0235 (21K5-19), 0236 (22C1-339), 0237 (22C1-340), 0238 (22C1-341)	<i>P. poae</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
0239 (20M5-9), 0241 (20M33-120), 0242 (20M34-124)	<i>P. viridiflava</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0240 (20M25-81)	<i>P. viridiflava</i>	<i>Triticum durum</i>
0243 (20M33-121)	<i>P. chlororaphis</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0244 (22B27-152), 0246 (22B60-179)	<i>P. lutea</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0245 (22B62-155)	<i>P. lutea</i>	<i>Secale cereale</i>
0247 (22B11-316)	<i>P. orientalis</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0260 (20M23-74)	<i>P. fluorescens</i>	<i>Triticum aestivum</i>
0263 (20M31-109)	<i>P. fluorescens</i>	$\frac{1}{2}$ <i>Triticosecale</i>
0248 (20M1-1), 0262 (20M28-96), 0275 (20M55-177), 0286 (22B62-157)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Secale cereale</i>
0249 (20M6-13), 0250 (20M6-14), 0251 (20M7-21), 0252 (20M8-22), 0258 (20M19-56), 0259 (20M21-61), 0261 (20M24-80), 0264 (20M33-122), 0265 (20M38-136), 0266 (20M39-139), 0267 (20M40-142), 0268 (20M42-148), 0269 (20M43-149), 0270 (20M45-152), 0271 (20M49-162), 0272 (20M50-165), 0273 (20M51-166), 0274 (20M53-172), 2023, 0276 (21K16-63), 0278 (21K24-78), 0281 (22B58-6), 0283 (22B42-25), 0282 (22B42-23), 0284 (22B29-86), (22B52-181), 0288 (22B36-217), 0289 (22B33-225), 0290 (22B33-229), 0293 (22B11-317), 0295 (22C2-375), 0296 (22C8-394), 0298 (22To1-2), 0299 (22To1-3), 0300 (22To1-4), 0301 (2To1-8), 0302 (22To1-15)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Triticum aestivum</i>
0253 (20M11-31), 0255 (20M13-40), 0256 (20M16-45)	<i>Pseudomonas</i> sp.	$\frac{1}{2}$ <i>Triticosecale</i>
0254 (20M12-38)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Triticum turgidum</i>
0257 (20M17-49)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Triticum sphaerococcum</i>
0277 (21K18-69), 0291 (22B23-279), 0292 (22B23-281), 0294 (22C1-334), 0297 (22C37-509)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Hordeum vulgare</i>
0279 (21K45-92), 0280 (21K59-101), 0303 (22To2-16), 0304 (22To2-19), 0305 (22To2-21)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Avena sativa</i>
0285 (22C28-107)	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Triticum durum</i>

*VNIKR-B – Коллекция фитопатогенных бактерий ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИ-ИР»). Происхождение штаммов, кроме VNIKR-B-0335 (DSM 7231) и VNIKR-B-0440 (CFBP 2216) – Российская Федерация; 20M означает «2020 год, регион сбора Москва», 21K означает «2021 год, регион сбора Крым», 22B означает «2022 год, регион сбора Волгоградская область», 22C означает «2022 год, регион сбора Ставропольский край», 22To означает «2022 год, регион сбора Томская область».

Для выделения ДНК применяли набор «Проба-ГС» (ЗАО «АгроДиагностика», Россия). Олигонуклеотиды синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия).

Таблица 2. Характеристики олигонуклеотидов, использованных в исследовании
Table 2. Characteristics of the oligonucleotides, used in the study

Олигонуклеотид [Oligonucleotide]	Последовательность 5'-3' [Sequence]	GC-состав, % [GC-content, %]	Tm*, °C	Источник [Source]
PscHrc662F	AGG CTT TAT GGA AAC CCT GA CG	50	62	Cottyn et al., 2010
PscHrc751R	ACA ATC ACC GCC ACG ATC AG	55	60	
PscP1	6FAM-CAA GCA GGC CAT GTT GCT GGT GGT G-BHQ1	60	71	Это исследование [This study]
PscF	AGG CTT TAT GGA AAC CCT GAC	48	60	

*Tm – температура плавления праймера.

Результаты исследования и обсуждение

В результате проведения теста PscHrc662F/PscHrc751R (Cottyn et al., 2010) с ДНК штаммов VNIKР-B-0201, VNIKР-B-0202, VNIKР-B-0203 и электрофореза ПЦР-продуктов в агарозном геле, визуализированы фрагменты длиной 90 п.о. (рис. 1).

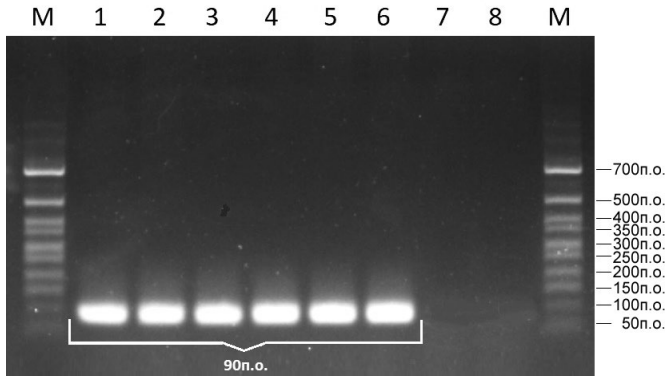


Рисунок 1. Электрофореграмма результатов теста PscHrc662F/PscHrc751R с ДНК *Pseudomonas cichorii*.

Примечание: М – маркер длин ДНК 50+ bp; 1, 2 – ДНК штамма VNIKР-B-0201; 3, 4 – ДНК штамма VNIKР-B-0202; 5, 6 – ДНК штамма VNIKР-B-0203; 7, 8 – отрицательный контроль амплификации

Figure 1. Electropherogram of PscHrc662F/PscHrc751R test results of amplification of *Pseudomonas cichorii* DNA.

Note: M – DNA length marker 50+ bp; 1, 2 – DNA of strain VNIKР-B-0201; 3, 4 – DNA of strain VNIKР-B-0202; 5, 6 – DNA of strain VNIKР-B-0203; 7, 8 – negative amplification control

Путем проведения ПЦР *in silico* с праймерами PscHrc662F и PscHrc751R на последовательности генома штамма DSM 50259 (RefSeQ NZ_CP007039.1) в программе Ugene 47 (Unipro UGENE software, [сайт] URL: <https://ugene.net/ru/download-all.html>), получена нуклеотидная последовательность, представленная на рисунке 2.

Длина зонда была увеличена до 25 п.о., что привело к повышению температуры отжига с 48 °С до 71 °С. Указанное изменение позволило применить для модификации зонда стандартную и наиболее доступную по цене конструкцию 6FAM-/BHQ1 вместо MGB.

В результате проведения нового теста ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 со штаммами бактерий рода *Pseudomonas*, получена специфичная реакция в виде экспоненциальной кривой флуоресценции по каналу FAM только для ДНК штаммов *Pc* (рис. 3).

Уровень флуоресценции для ДНК штаммов *Pc* составил от 1200 до 1600 оптических единиц (рис. 3). Отмечена неспецифичная реакция по каналу FAM для четырех штаммов – *P. poae* (VNIKР-B-0231), *P. graminis* (VNIKР-B-0225) и двух штаммов *P. fluorescens* (VNIKР-B-0260, VNIKР-B-0263). Важно отметить, что значение порогового цикла находилось в диапазоне от 35 до 37 (рис. 3).

Исходя из того, что при тестировании остальных штаммов *Pseudomonas* spp., включая *P. poae* и *P. graminis*, реакция по каналу FAM не наблюдалась, можно сделать вывод о частичном сродстве используемых в тесте олигонуклеотидов с последовательностями генов некоторых бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из зерновых культур. Анализ доступных в базе данных NCBI геномов бактерий не позволяет окончательно подтвердить этот вывод. Отметим, что при идентификации штаммов в более ранней работе (Словарева и др., 2023) использовали праймеры PSF/PSR (Kazempour et al., 2009) длина ПЦР-продукта с которыми составляла около 600 п.о., и полученные с этими праймерами нуклеотидные последовательности сравнивали с другими последовательностями BLAST NCBI (BLAST..., <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для штамма VNIKР-B-0231 отмечено максимальное совпадение 99.49% с *P. poae*, а другие виды с таким

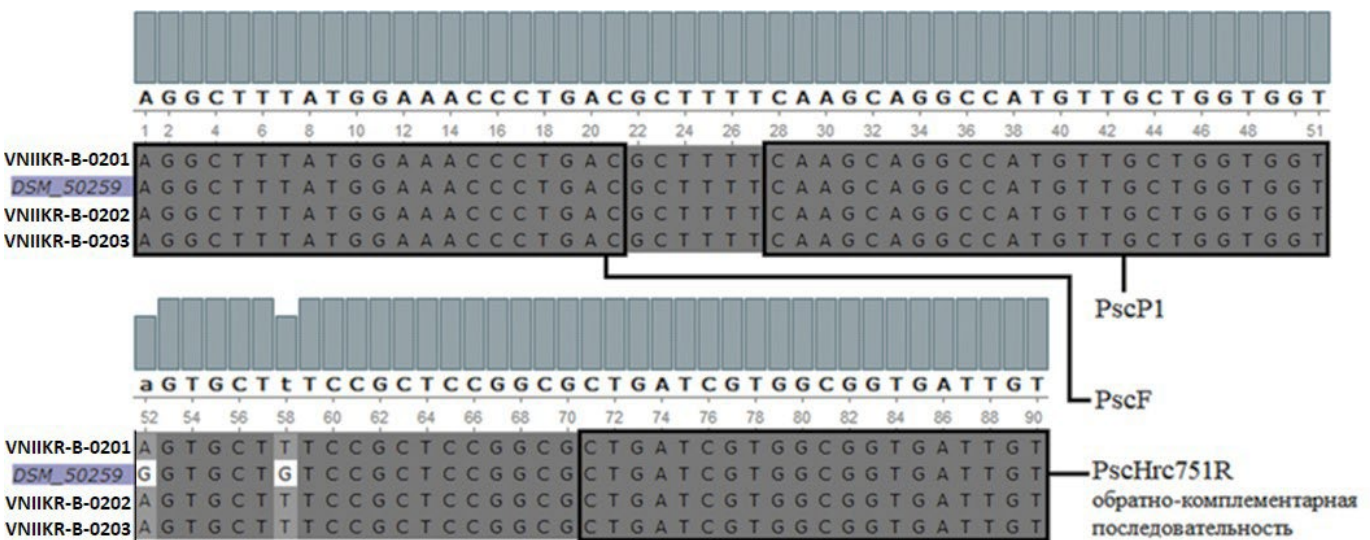


Рисунок 2. Выравнивание нуклеотидных последовательностей ПЦР-продуктов теста PscHrc662F/PscHrc751R с штаммами VNIKР-B-0201, VNIKР-B-0202, VNIKР-B-0203 и геномной последовательности штамма *Pseudomonas cichorii* DSM 50259 (RefSeQ NZ_CP007039.1)

Figure 2. Nucleotide sequences alignment of PscHrc662F/PscHrc751R PCR products with strains VNIKР-B-0201, VNIKР-B-0202, VNIKР-B-0203 and the genomic sequence of the *Pseudomonas cichorii* strain DSM 50259 (RefSeQ NZ_CP007039.1)

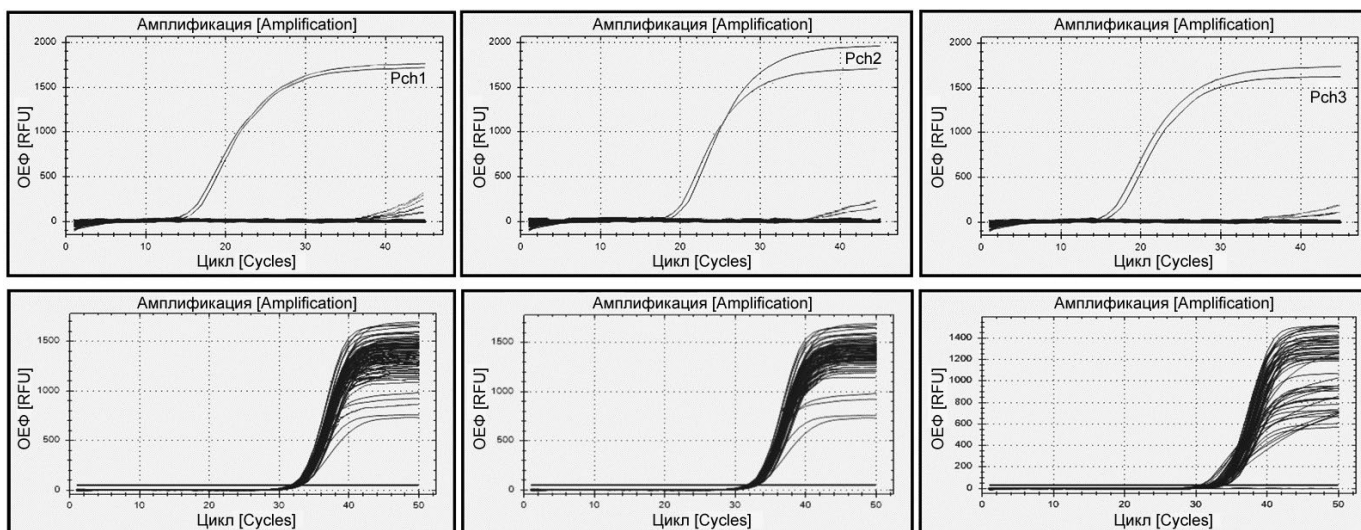


Рисунок 3. Зависимость уровня флуоресценции (ОЕФ) от номера порогового цикла (Ct) по каналу FAM при проведении теста PscF/PscHrc751R/PscP1 с ДНК бактерий рода *Pseudomonas*

Figure 3. Dependence of the fluorescence level (RFU) on the threshold cycle number (Ct) via the FAM channel when performing the PscF/PscHrc751R/PscP1 test with DNA of *Pseudomonas* bacteria

же высоким совпадением отсутствовали. Принадлежность штамма VNIKР-B-0225 определена как *P. graminis* в связи с максимальным видовым сходством 98.17%. Для штаммов VNIKР-B-0260 и VNIKР-B-0263 ближайшим видом являлся *P. fluorescens* (99.43% для обоих штаммов). В то же время, результат выравнивания не показал совпадения с *P. cichorii* в числе первых 100 последовательностей с максимальным сходством. Следовательно, наличие перекрестных реакций при проведении ПЦР может являться результатом гомологии части олигонуклеотида с нуклеотидными последовательностями генов некоторых штаммов *Pseudomonas* sp. Исходя из полученных данных, при тестировании бактериальных культур может быть получено до 4% неспецифических реакций с поздним (от 35 до 37) пороговым циклом.

В результате тестирования других бактерий рода *Pseudomonas*, включая *P. fuscovaginae*, *P. syringae* (в том

числе патовары *syringae*, *coronafaciens*, *atrofaciens*, *aptata*), *P. trivialis*, *P. viridiflava*, *P. chlororaphis*, *P. lutea*, *P. orientalis*, а также отрицательных контролей, специфическая реакция отсутствовала.

Для каждого тестируемого образца отмечена реакция внутреннего положительного контроля, детектируемая по каналу HEX (рис. 3) и указывающая на отсутствие ингибирования ПЦР. Таким образом, Новый тест PscF/PscHrc751R/PscP1 способен отличать штаммы *Pc* от других бактерий рода *Pseudomonas*.

В результате применения чашечного метода Коха, определены концентрации бактериальных суспензий *Pc*, используемых при оценке аналитической чувствительности нового теста ПЦР-РВ. Для подсчета использовали чашки Петри с высевными суспензиями *Pc* 4-го, 5-го и 6-го разведений (рис. 4).

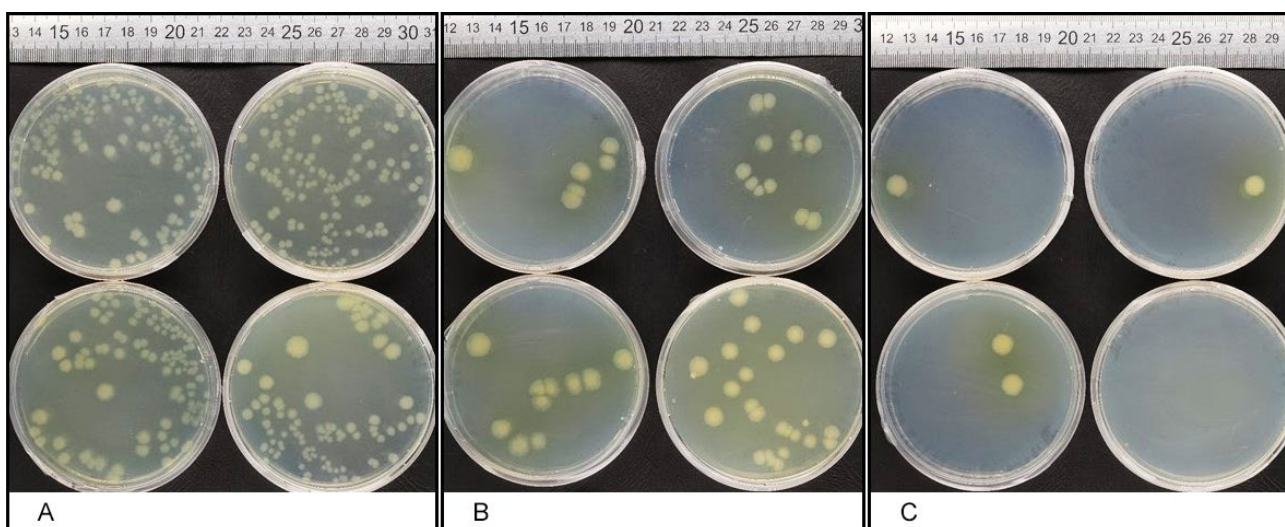


Рисунок 4. Чашки Петри с посевом на каждую по 50 мкл суспензий *Pseudomonas cichorii*
Примечание: А – 4-е разведение, В – 5-е разведение, С – 6-е разведение; спустя 6 суток инкубирования при температуре 27°C, R2A

Figure 4. Petri dishes each plated with 50 µl of *Pseudomonas cichorii* suspensions
Note: A – 4th dilution, B – 5th dilution, C – 6th dilution; after 6 days of incubation at 27°C, R2A

Спустя 6 суток инкубирования при 27°C суспензий *Pc*, высеванных на R2A (Reasoner, Geldreich, 1985), были отмечены глянцевые, беловатые, флуоресцирующие полупрозрачные колонии, круглой или неправильной формы, с плоским профилем и волнистым краем, диаметром от 1 до 9 мм (рис. 4). Подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) показал, что для 4-го, 5-го и 6-го разведений культуры *Pc* соответствуют значения $2.4 \cdot 10^3$, $2.8 \cdot 10^2$ и $2.0 \cdot 10^1$ КОЕ/мл соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Число колониеобразующих единиц в 1 мл суспензии *Pseudomonas cichorii*

Table 3. Number of colony forming units in 1 ml of *Pseudomonas cichorii* suspension

Разведение [Dilution]	Среднее число КОЕ в 50 мкл [Average number of CFU in 50 µl]	КОЕ/мл [CFU/ml]
4'	120	$2.4 \cdot 10^3$
5'	14	$2.8 \cdot 10^2$
6'	1	$2.0 \cdot 10^1$

Учитывая, что все суспензии являлись серией последовательных десятикратных разведений одной суспензии, то для 3-го, 2-го и 1-го разведений соответствуют значения 10^4 , 10^5 и 10^6 КОЕ/мл соответственно, а начальной суспензии – 10^7 КОЕ/мл.

Оценка аналитической чувствительности теста PscF/PscHrc751R/PscP1 с ДНК чистых культур показала, что тест способен обнаруживать *Pc* в анализируемом образце в концентрации более $2 \cdot 10^1$ КОЕ/мл (рис. 5).

Положительные реакции отмечены в результате ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 с ДНК суспензий *Pc* в концентрациях от $2 \cdot 10^1$ до 10^7 КОЕ/мл для каждого из повторов теста (рис. 5).

Таблица 4. Результат определения аналитической чувствительности теста PscF/PscHrc751R/PscP1 на ДНК *Pseudomonas cichorii*

Table 4. The result of determining the analytical sensitivity of the PscF/PscHrc751R/PscP1 test using *Pseudomonas cichorii* DNA

КОЕ/мл [CFU/ml]	Среднее значение Ct, FAM [Average Ct, FAM]	
	Чистая бактериальная культура [Pure bacterial culture]	Бактериальная культура в аналитической пробе семян [Bacterial culture in analytical seed sample]
$1 \cdot 10^7$	21.31	Не проводили
$1 \cdot 10^6$	26.3	Не проводили
$1 \cdot 10^5$	27.0	Не проводили
$1 \cdot 10^4$	29.89	32.53
$2.4 \cdot 10^3$	32.19	34.17
$2.8 \cdot 10^2$	35.79	37.47
$2.0 \cdot 10^1$	36.67	39.12

Заключение

В результате исследования разработана праймерная система для ПЦР в режиме «реального времени» PscF/PscHrc751R/PscP1, направленная на идентификацию возбудителя стеблевого меланоза пшеницы *P. cichorii*. Оценка аналитической чувствительности, проведенная с использованием референтных штаммов ДНК *P. cichorii* в воде и аналитической пробе семян пшеницы, показала способность теста к обнаружению патогена в анализируемом

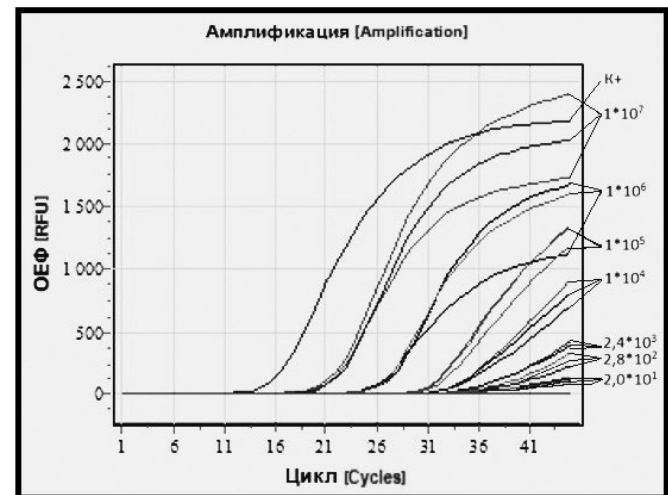


Рисунок 5. Результат теста PscF/PscHrc751R/PscP1 с ДНК, выделенной из бактериальных суспензий штамма *Pseudomonas cichorii* VNIKR-B-0201 в концентрациях от 10^1 КОЕ/мл до 10^7 КОЕ/мл

Figure 5. The result of the PscF/PscHrc751R/PscP1 test with DNA isolated from bacterial suspensions of strain *Pseudomonas cichorii* VNIKR-B-0201 in concentrations from 10^1 CFU/ml to 10^7 CFU/ml

Тестирование образцов ДНК, выделенных из проб семян, зараженных суспензиями *Pc* и прошедших пробоподготовку, также показало аналитическую чувствительность теста $2 \cdot 10^1$ КОЕ/мл (табл. 4).

Таким образом, тест ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1 может быть использован для идентификации *Pc* как среды бактериальных культур, так и в семенном материале пшеницы.

образце при концентрации не менее $2 \cdot 10^1$ КОЕ/мл. Оценка аналитической специфичности теста, проведенная с использованием ДНК 104 близкородственных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных преимущественно из зерновых культур, показала наличие неспецифичных реакций (флуоресценция на 35–37 пороговом цикле, накопление не имеет экспоненциальный вид) с 4 штаммами: *P. poae* (VNIKR-B-0231), *P. graminis* (VNIKR-B-0225)

и *P. fluorescens* (VNIKR-B-0260, VNIKR-B-0263). ПЦР-реакции с ДНК других бактерий рода *Pseudomonas*, включая *P. fuscovaginae*, *P. syringae*, *P. trivialis*, *P. viridiflava*, *P. chlororaphis*, *P. lutea* и *P. orientalis* были отрицательными. ПЦР-РВ PscF/PscHrc751R/PscP1, в связи с высокой аналитической чувствительностью, может быть

использована в качестве отборочного теста в комплексе методов при идентификации *P. cichorii* в ходе установления фитосанитарного состояния растительной продукции и посевов, а также для идентификации патогена в чистых и смешанных бактериальных культурах.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБУ «ВНИИКР», регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 123022100104-4.

Библиографический список (References)

- Мувинги М, Словарева ОЮ, Заргар М (2022) Идентификация *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* в зерне пшеницы методом ПЦР. *Вестник Российского университета дружбы народов, Серия: Агронимия и животноводство*. 17(4): 473–483. <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2022-17-4-473-483>
- Словарева ОЮ (2023) Анализ производства и экспорта российского зерна и составление перечня регулируемых фитосанитарными требованиями стран-импортеров возбудителей бактериозов зерновых культур. *Аграрный вестник Северного Кавказа*. 3(51):47–54. doi:10.31279/2222-9345-2023-14-51-47-54
- Словарева ОЮ, Мувинги М, Яремко АБ, Игонин ВН, Рубец ВС (2023) Выявление значимых для экспорта зерна возбудителей бактериозов и комплекса сопутствующих микроорганизмов в посевах зерновых культур (на примере Тимирязевской полевой опытной станции). *Сельскохозяйственная биология*. 58(1):184–199. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.1.184rus>
- Тешич С, Пакина ЕН, Игнатов АН (2021) Идентификация *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 в гидропонном производстве салата. *Овощи России*. 3:110–115. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-3-110-115>
- Alippi AM (1996) First report of bacterial spot of celery caused by *Pseudomonas cichorii* in Argentina. *Plant Dis* 80(5):599. <https://doi.org/10.1094/PD-80-0599C>
- Amadi JE, Omoniyi AM, Eze CS (2009) Isolation and identification of a bacterial blotch organism from watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai). *Afr J Agric Res* 4(11):37–39.
- Bastas KK (2013) Vegetable bacterial diseases in Turkey. *Eur J Plant Pathol Sci Biotechnol* 1S:14–24
- BLAST. Basic Local Alignment Search Tool [Electronic resource]. – Access mode: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (date of access: 2020–2022).
- Cambra MA, Palacio-Bielsa A, López MM (2004) Borage (*Borago officinalis*) is a new host of *Pseudomonas cichorii* in the Ebro Valley of Spain. *Plant Dis* 88(7):769–769. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.7.769A>
- Chase AR (1986) Comparison of three bacterial leaf spots of *Hibiscus rosa-sinensis*. *Plant Dis* 70(4):334–336
- Cottyn B, Baeyen S, Pauwelyn E, Verbaendert I, De Vos P, Bleyaert P, Höfte M, Maes M (2010) Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathol* 3(60):453–461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02388.x>
- Cottyn B, Heylen K, Heyrman J, Vanhouteghem K, Pauwelyn E, Bleyaert P, Van Vaerenbergh J, Höfte M, De Vos P, Maes M (2009) *Pseudomonas cichorii* as the causal agent of midrib rot, an emerging disease of greenhouse-grown butterhead lettuce in Flanders. *Syst Appl Microbiol* 32(3):211–225. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.11.006>
- Elsisi AA (2019) Bacterial blight disease caused by *Pseudomonas cichorii* on chrysanthemum in Egypt. *J Phytopathol Pest Manag* 6(1):11–23
- Garibaldi A, Gilardi G, Moretti C, Gullino ML (2009) First Report of Leaf Spot Caused by *Pseudomonas cichorii* on *Coreopsis lanceolata* in Italy. *Plant Dis* 93(9):967. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0967A>
- Gill WM (1994) «Drippy gill»: An ooze disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas agarici*. University of Canterbury. 234
- Grogan RG, Misaghi IJ, Kimble KA, Greathead AS, Ririe D, Bardin R (1977) Varnish spot, destructive disease of lettuce in California caused by *Pseudomonas cichorii*. *Phytopathology* 67(8):957–960.
- Gumtow RL, Aftab K, Bocsanczy AM, Yuen JMF, Palmateer AJ, Norman DJ (2013) First report of a leaf spot disease of golden dewdrop (*Duranta erecta*) caused by *Pseudomonas cichorii* and a *Xanthomonas* species in Florida. *Plant Dis* 97(6):836–836. <https://doi.org/10.1094/pdis-12-12-1117-pdn>
- Hikichi Y, Saito A, Suzuki K (1996) Relationship between population dynamics of *Pseudomonas cichorii* on lettuce and disease incidence of bacterial rot of lettuce. *Jap J Phytopathol* 62(2):141–146
- Hikichi Y, Wali UM, Ohnishi K, Kiba A (2013) Mechanism of disease development caused by a multihost plant bacterium, *Pseudomonas cichorii*, and its virulence diversity. *J Gen Plant Pathol* 79(6):379–389. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0461-7>
- Jang YW, Yoon YN, Maharjan R, Yi HJ, Jung MH, Hong SY, Lee MH, Kim SW, Kim JI, Yang JW (2023) First Report of *Pseudomonas cichorii* causing bacterial vein necrosis on perilla plants in South Korea. *Plant Dis* 107(2):549. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-22-0143-PDN>
- Janse JD (1987) Biology of *Pseudomonas cichorii* in chrysanthemum 1. *EPPO Bull* 17(3):321–333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1987.tb00045.x>

- Kazempour MN, Kheyrgoo M, Pedramfar H, Rahimian H (2009) Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *Afr J Biotechnol* 9(20):2860–2865
- Malhi SS, Piening LJ, MacPherson DJ (1989) Effect of copper on stem melanosis and yield of wheat: Sources, rates and methods of application. *Plant Soil* 119:199–204.
- Marques E, Borges RCF, Uesugi CH (2016) Identification and pathogenicity of *Pseudomonas cichorii* associated with a bacterial blight of gerbera in the Federal District. *Hortic Brasil* 34(2):244–248. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620160000200015>
- Miller JW, Knauss JF (1973) Bacterial blight of *Gerbera jamesonii* incited by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis Reporter* 57(6):504–505
- Miller WJ, Burgess SM, Lawson BO (1986) Leaf spot and blight of basil, *Ocimum basilicum* caused by *pseudomonas cichorii*. *Florida State Hortic Soc Proc* 99:249–251
- Osdaghi E (2020) *Pseudomonas cichorii* (bacterial blight of endive). 10.1079/ISC.44942.20210200740
- Patel N, Patel R, Wyenandt CA, Kobayashi DY (2021) First Report of *Pseudomonas cichorii* Causing Bacterial Leaf Spot on Romaine Lettuce (*Lactuca sativa* var. *longifolia*) and Escarole (*Cichorium endivia*) in New Jersey. *Plant Dis* 105(12):4150. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0929-PDN>
- Pernezny K, Datnoff L, Sommerfeld ML (1994) Brown stem of celery caused by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis* 78(9):917–919
- Piening LJ, MacPherson DJ (1985) Stem melanosis, a disease of spring wheat caused by *Pseudomonas cichorii*. *Canadian J Plant Pathol* 7(2):168–172. <https://doi.org/10.1080/07060668509501496>
- Reasoner DJ, Geldreich EE (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49(1):1–7. <https://doi.org/10.1128/aem.49.1.1-7.1985>
- Rivera N, Amat Z, Hevesi M (1981) Capsicum leaf rot caused by *Pseudomonas cichorii* in Cuba. *Agrotecn Cuba* 13(2):67–72
- Rodrigues Neto J, Pereira ALG, Zagatto AG (1976) Bacterial spot caused by *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, 1928 on *Chrysanthemum morifolium* Ram leaves in Sao Paulo State. *Biologico* 42(5/6):118–122
- Sharma DK, Arora P (2016) Seed-borne and post-harvest diseases of sponge gourd (*Luffa Cylindrica* (L.) Rox.) and their management. *CIBTech J Microbiol* 5(2):4–8
- Sugiyama LS, Bushe BC, Heller WP, Keith LM (2018) First report of *Pseudomonas cichorii* causing bacterial leaf blight of *Plumeria pudica* in Hawaii. *Plant Dis* 102(5):1025–1025. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1771-PDN>
- Surico G, Iacobellis NS (1978) Un marciume batterico del Sedano (*Apium graveolens* L.) causato da *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens (A bacterial soft rot of Celery (*Apium graveolens* L.) caused by *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens). *Phytopathol Mediterr* 17:69–71
- Trantas EA, Sarris PF, Mpalantinaki E, Pentari MG, Ververidis FN, Goumas DE (2013) A new genomovar of *Pseudomonas cichorii*, a causal agent of tomato pith necrosis. *E J Plant Pathol* 137:477–493. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0258-8>
- Unipro UGENE software – [Electronic resource] access mode: <https://ugene.net/ru/download-all.html> (access date: 04/03/2023)
- Van Outryve MF, Gossele F, Swings J (1989) The bacterial microflora of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) leaves. *Microb Ecol* 18:175–186. <https://doi.org/10.1007/BF02030125>
- Wilkie JP, Dye DW (1974) *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand. *New Zealand J Agric Res* 17(2):123–130. <https://doi.org/10.1080/00288233.1974.10420990>
- Wood BA, Easdown WJ (1990) A new bacterial disease of mung bean and cowpea for Australia. *Australasian Plant Pathology*. 19(1):16–21
- Yu SM, Lee YH (2012) First report of *Pseudomonas cichorii* associated with leaf spot on soybean in South Korea. *Plant Dis* 96(1):142–142. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0653>

Translation of Russian References

- Muvingi M, Slovareva OY, Zargar M (2022) Identification of *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* in wheat seeds using PCR. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 17(4):473–483. <https://doi.org/10.22363/2312-797X-2022-17-4-473-483>.
- Slovareva OY, Muvingi M, Iaremko AB, Igonin VN, Rubets VS (2023) Detection of bacteriosis pathogens significant for grain export and a complex of associated microorganisms in grain crops (on the example of Timiryazevskaya field experimental station). *Agricultural Biology*. 58(1):184–199. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2023.1.184rus>.
- Slovareva OY (2023) Production, export and import of cereals and compilation of a list of phytopathogenic bacteria associated with them. *Agrarian Bulletin of the North Caucasus*. 3(51):47–54. doi:10.31279/2222-9345-2023-14-51-47-54.
- Tesic S, Pakina EN, Ignatov AN (2021) Identification of *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 in hydroponic lettuce production. *Vegetable crops of Russia*. (3):110–115. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-3-110-115>.

IDENTIFICATION OF STEM MELANOSIS OF WHEAT (*PSEUDOMONAS CICHORII*) BY REAL-TIME PCR

E.V. Voronov¹, O.Y. Slovareva^{1*}, A.A. Desyaterik^{1,2}, M.O. Kondratiev¹, A.N. Ignatov³

¹All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIKR”), Bykovo, Russia

²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

³Peoples’ Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia

*corresponding author, e-mail: slovareva.olga@gmail.com

The phytopathogenic bacterium, *Pseudomonas cichorii*, affects a wide range of crops in field and greenhouse production and causes wheat stem melanosis, which has been regulated by importers of Russian grain products. It is crucial to update the identification method based on real-time polymerase chain reaction (PCR) (PCR-RT). This method helps confirming *P. cichorii* in wheat samples. A 90 base pair long section of the *hrcRST* pathogenicity gene cluster was used as the target. Positive results were obtained for reference strains, confirmed by amplicon sequencing. Nucleotide sequences were then compared to the typical strain, DSM 50259. As a result of comparative DNA analysis, the sequences of the direct primer and probe were modified. The possibility of using a modification of 6FAM/BHQ1 dye/quencher available on the territory of the Russian Federation was demonstrated. The specificity of the new PCR-RT primer system PscF/PscHrc751R/PscP1 was assessed using 107 bacterial strains of the genus *Pseudomonas*, including *P. cichorii*, *P. fuscovaginae*, *P. syringae*, *P. trivialis*, *P. viridiflava*, *P. chlororaphis*, *P. lutea* and *P. orientalis*. The DNA of 4 strains (*P. poae*, *P. graminis* and 2 strains of *P. fluorescens*) showed a non-specific reaction at the 35–37 cycle threshold, with an accumulation that did not appear exponential. The analytical sensitivity of the test allows for the detection of *P. cichorii* at a concentration of 10¹ CFU/mL. The PCR-RV PscF/PscHrc751R/PscP1 test can be used as a screening tool for the detection of *P. cichorii* in plant products and for the characterization of pure bacterial cultures.

Keywords: RT-PCR, bacterioses of grain crops, phytosanitary requirements, plant quarantine, diagnosis of phytopathogens, molecular genetic identification methods

Submitted: 16.08.2024

Accepted: 01.11.2024