



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

# ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

---

## PLANT PROTECTION NEWS

2024    TOM    ВЫПУСК  
          VOLUME    107    ISSUE    4



Санкт-Петербург  
St. Petersburg, Russia

## ПЕКТОЛИТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ РОДА *PSEUDOMONAS* ИЗ ПОРАЖЁННЫХ МОКРОЙ ГНИЛЬЮ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

В.А. Платонов<sup>1</sup>, О.И. Хасбиуллина<sup>2</sup>, В.М. Андреевская<sup>3,4</sup>, Г.Л. Филатова<sup>5</sup>,  
С.Н. Еланский<sup>1,3</sup>, Е.М. Чудинова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов, Agrарно-технологический институт, Москва

<sup>2</sup>Камчатский научно-исследовательский институт сельского хозяйства - филиал ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», с. Сосновка, Камчатский край

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

<sup>4</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Большие Вяземы, Московская область

<sup>5</sup>Научно-исследовательский институт проблем хранения Росрезерва, Москва

\*ответственный за переписку, e-mail: chudinova\_em@pfur.ru

При обследовании промышленных картофелехранилищ в Костромской области и Камчатском крае из клубней картофеля, пораженных мокрой гнилью, были выделены в чистую культуру и идентифицированы пектолитические бактерии рода *Pseudomonas*. Выделенные штаммы различались между собой и отличались от штаммов пектолитических *Pseudomonas*, выделенных из картофеля ранее, по последовательностям гена 16S рибосомной РНК, участку гена субъединицы В ДНК-гиразы и фрагмента гена сигма-фактора ДНК-зависимой РНК-полимеразы. На основании анализа последовательностей можно отнести выделенные бактерии к группе *P. fluorescens*. Выделенные бактерии вызывали мацерацию тканей клубней картофеля при температурах 10 °С и 25 °С, причем пораженный участок ткани картофеля интенсивно флуоресцировал при освещении ультрафиолетом. При температуре 37 °С рост бактерий полностью ингибировался. LOPAT профиль соответствовал группе IVa фитопатогенных *Pseudomonas*.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum*, мягкая гниль картофеля, бактериальные болезни картофеля, хранение картофеля

Поступила в редакцию: 02.10.2024

Принята к печати: 06.12.2024

### Введение

Бактериальные болезни картофеля особенно опасны в период хранения. Из-за высокой скорости развития болезни и отсутствия эффективных химических бактерицидов фитопатогенные бактерии способны вызвать значительные потери продукции в послеуборочный период. Самыми распространенными видами, вызывающими мокрую гниль картофеля, являются пектолитические энтеробактерии, включая виды *Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp. (Игнатов и др., 2018, Czajkowski et al., 2015, Ignatov et al., 2018, Charkowski et al., 2020, Voronina et al., 2021, Bastas, 2023, Vasilyeva et al., 2024). Тем не менее, хорошо известны

случаи, когда возбудителями мокрой гнили картофеля являлись другие бактерии. В Китае было зарегистрировано поражение клубней картофеля *Lelliottia amnigena* (Osei et al., 2022), а также отмечено поражение клубней фитопатогенными бактериями рода *Pseudomonas*: *P. marginalis* в Китае (Li et al., 2007) и Иране (Ghasemi et al., 2024) и *P. palleroniana* в Китае (Zhang et al., 2022), *P. fluorescens* в Кении (Muturi et al., 2018). Пектолитические бактерии, относящиеся к роду *Pseudomonas*, были впервые обнаружены нами на пораженных клубнях картофеля в период хранения на территории Российской Федерации.

### Материалы и методы

Для исследования отбирали клубни картофеля с признаками начальной стадии развития бактериальной мокрой гнили. Бактерии рода *Pseudomonas* отбирали на среде Кинга Б (King et al., 1954) по их способности флуоресцировать в ультрафиолетовом свете. Для оценки пектолитической активности 15 мкл водной суспензии бактерий (10<sup>9</sup> КОЕ/мл, приготовленную из 48-часовой культуры, выращенной на питательном агаре Кинга Б) наносили на ломтик картофеля, помещенного во влажную камеру. Опыт проводили при температурах 10 °С и 25 °С. Результаты анализировали через 20 часов.

LOPAT тест проводили следующим образом. Тест на образование левана и тест на гиперчувствительность табака проводили так как описано в статье Лелиотта с

соавторами (Lelliott et al., 1966). Тест на образование левана проводили на среде СМЗ с добавлением 5% сахарозы. Тест на растениях табака проводили в теплице ВНИИФ, в третий и четвертый лист растения табака с помощью шприца закалывали суспензию бактерий в концентрации 10<sup>8</sup> КОЕ/мл, приготовленную из 48-часовой культуры, выращенной на питательном агаре Кинга Б. Тест на присутствие оксидазы и аргининдигидролазы проводили с помощью набора реагентов №1 «Системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов» (АО «НПО» «Микроген»).

Изоляты пектолитических бактерий рода *Pseudomonas* характеризовали с помощью секвенирования универсальных таксономических маркеров: почти полного фрагмента

© Платонов В.А., Хасбиуллина О.И., Андреевская В.М., Филатова, Г.Л., Еланский С.Н., Чудинова Е.М.

Статья открытого доступа, публикуемая Всероссийским институтом защиты растений (Санкт-Петербург) и распространяемая на условиях Creative Commons Attribution License 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

гена 16S рибосомной РНК (праймеры 27f и 1492g) (Lane, 1991), участка субъединицы В гена ДНК-гиразы (*gyrB*) (праймеры *gyrB-F* и *gyrB-R*) (Agaras and Valverde, 2018) и участка гена сигма фактора ДНК-зависимой РНК-полимеразы (*rpoD*) (праймеры PsEG30F и PsEG790R) (Mulet et al., 2009). Амплификацию фрагментов генов проводили в соответствии с опубликованными ранее протоколами (Lane, 1991; Agaras and Valverde, 2018; Mulet et al., 2009). Полученные ПЦР фрагменты секвенировали в компании Евроген (Москва, Россия).

### Результаты и обсуждение

Изоляты флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, обладающие пектолитической активностью, были выделены из клубней с признаками бактериальной мокрой гнили поражения из двух промышленных картофелехранилищ, расположенных в Камчатском крае и

**Таблица 1.** Места сбора клубней и номера, депонированных в Генбанк NCBI последовательностей участков генов 16S рибосомной РНК (16S), субъединицы В ДНК-гиразы (*gyrB*), и сигма-фактора ДНК-зависимой РНК-полимеразы (*rpoD*)

**Table 1.** Place of tuber collection and NCBI database sequence numbers of gene regions: 16S ribosomal RNA (16S), DNA gyrase subunit B (*gyrB*), sigma factor of DNA-dependent RNA polymerase (*rpoD*)

Название штаммов	Место сбора клубней	NCBI 16S	NCBI <i>gyrB</i>	NCBI <i>RpoD</i>
B23Kam9B	Камчатский край	PP422961	PP429243	PP429244
203_3	Костромская область	PQ459469	PQ461830	PQ461829
203_4	Костромская область	PQ459470	PQ461831	PQ497111

При описании фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* стандартным тестом является LOPAT. При исследовании штаммов выяснилось, что они обладают профилем - L+O+P+A+T- (таблица 2). Полученный профиль соответствует группе IVa фитопатогенных *Pseudomonas* (Lelliott et al., 1966), такие же характеристики были отмечены у *P. marginalis* pv. *marginalis*, вызывающей мягкую гниль у картофеля (Li et al., 2007).

**Таблица 2.** LOPAT профиль для выделенных штаммов (L – образование левана, O – тест на наличие оксидазы, P – мацерация ломтиков картофеля, A – присутствие аргининдигидролазы, T – гиперчувствительность табака при уколе суспензией бактерий); «+» – наличие признака, «-» – отсутствие признака

**Table 2.** LOPAT profile for isolated strains (L – Levan formation, O – Oxidase production, P – Pectinolytic activity, A – Arginine dihydrolase production, T – Tobacco hypersensitivity); “+” – presence of a sign, “-” – absence of a sign

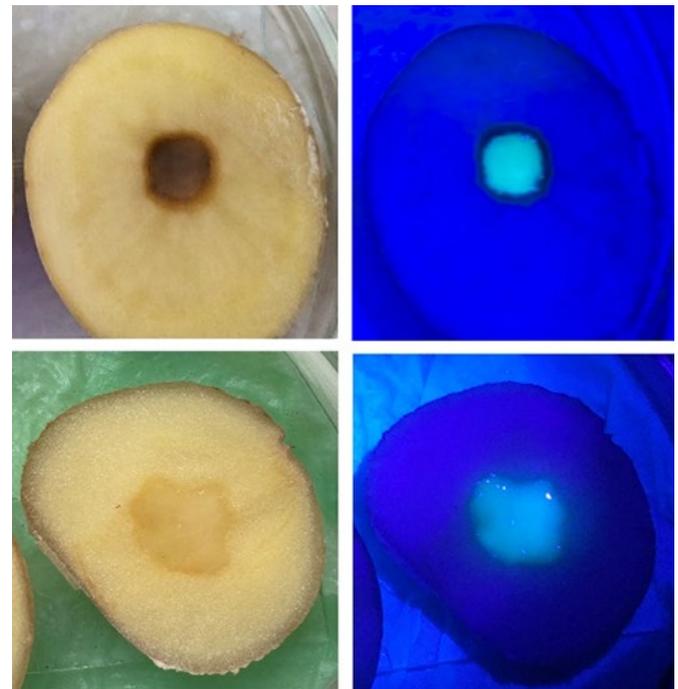
Название штаммов	L	O	P	A	T
B23Kam9B	+	+	+	+	-
203_3	+	+	+	+	-
203_4	+	+	+	+	-

Все штаммы проявляли пектолитическую активность как при температуре 10 °C, так и при 25 °C, причём при 10 °C поражение было менее интенсивным. При 37 °C рост бактерий ингибировался как на ломтиках картофеля, так и на питательном агаре. При освещении ультрафиолетом бактерии флюоресцировали в зеленом спектре на среде Кинга В и на ломтиках картофеля (рис. 1).

Для подтверждения патогенности мы выделили бактерии с зараженных в лабораторных условиях ломтиков

Полученные последовательности диагностических генов сравнивали с гомологичными последовательностями из базы NCBI, найденными с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1990) Выравнивание последовательностей ДНК проводили с помощью алгоритма ClustalW (Larkin et al., 2007), филогенетический анализ проводили с помощью метода maximum likelihood, основанный на модели Tamura-Nei в программе MegaX с параметрами по умолчанию (Kumar et al., 2018) Бутстреп-анализ достоверности филогенетической группировки был проведен для 1000 итераций (Tamura and Nei, 1993).

Костромской области. После видовой идентификации три штамма были сохранены в коллекции фитопатогенных микроорганизмов РУДН им. Патриса Лумумбы, а соответствующие им последовательности таксономически-важных генов депонированы в Генбанк NCBI (таблица 1).



**Рисунок 1.** Тест на пектолитическую активность штаммов B23Kam9B (сверху) и 203\_3 (снизу) при дневном освещении (слева) и освещении светом ультрафиолетового спектра (справа)

**Figure 1.** Pectolytic activity test of strains B23Kam9B (top) and 203\_3 (bottom) under daylight (left) and ultraviolet light (right)

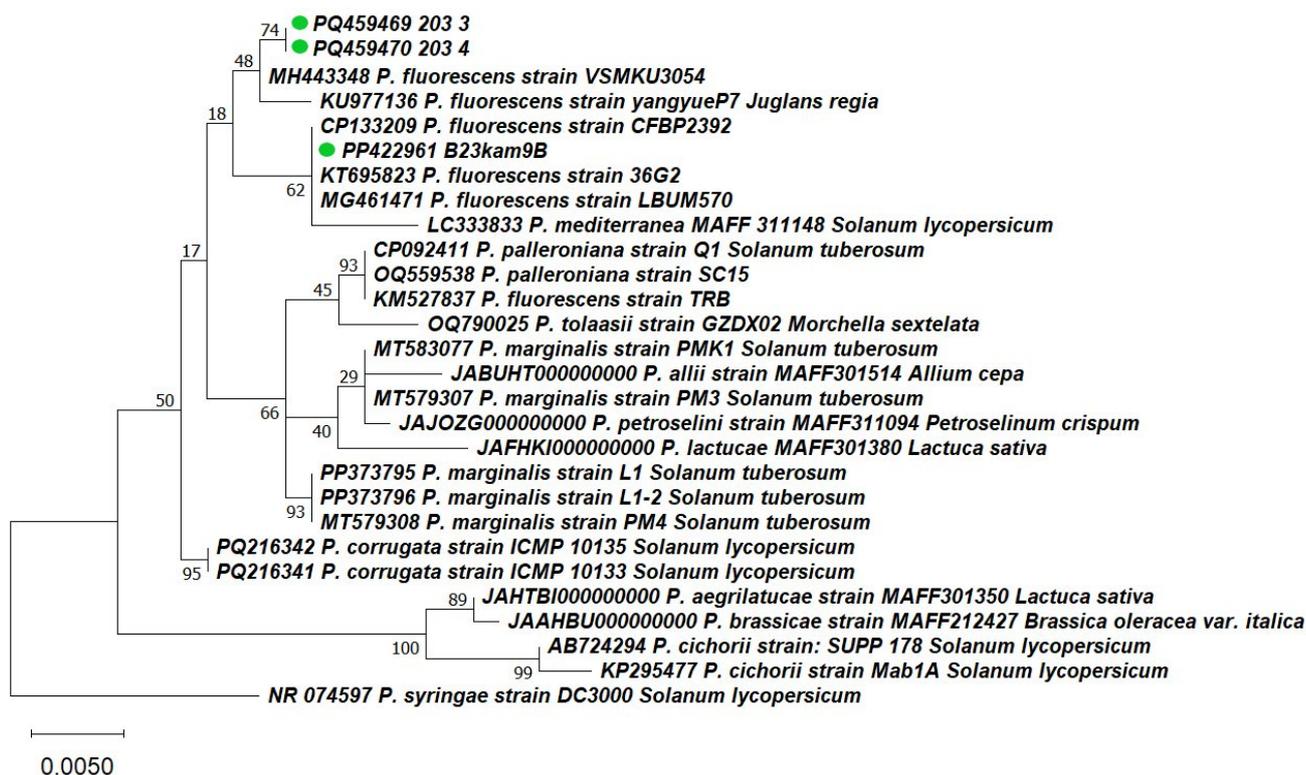
картофеля. Все проверенные флюоресцирующие на агаре Кинга В штаммы обладали пектолитической активностью и флуоресценцией при повторном тестировании.

По всем трем генам штамм В23Кам9В (из Камчатки) и штаммы 203\_3 и 203\_4 были родственны видовому комплексу *Pseudomonas fluorescens*. По участкам генов *guyB*, *groD* и 16S рРНК, штамм В23Кам9В был соответственно на 99,35%; 99,59%; 99,86% сходен с гомологичными генами штамма *P. fluorescens* CFBP2392 (последовательность CP133209.1).

Штаммы из Камчатки и Костромы отличались друг от друга по участкам генов *guyB*, *groD* и 16S рРНК на 97,55%, 97,76% и 98,75% соответственно. Штаммы 203\_3 и 203\_4 были идентичны друг другу и больше всего похожи по последовательности гена 16S (99,93% идентичности) на штамм *P. fluorescens* VSMKU3054 (GenBank № MN443348), по последовательностям генов *guyB* и *groD* – на *P. crudilactis* UCMA 17988 (99,64% идентичности с

последовательностью MT080625; 99,55% – с MT080623 соответственно).

Ранее были описаны патогенные для картофеля бактерии, относящиеся к роду *Pseudomonas*: *P. fluorescens* (Muturi et al., 2018), *P. marginalis* (Cuppels and Kelman, 1980, Li et al., 2007, Ghasemi et al., 2024) и *P. palleroniana* (Zhang et al., 2022). Сравнение последовательностей гена 16S рРНК показало отличие наших штаммов от штаммов этих бактерий, причем штаммы В23Кам9В, 203\_3 и 203\_4 группируются на фоне близкородственных штаммов вместе, несмотря на некоторые различия в последовательностях (рис. 2). На основании анализа последовательностей и LOPAT теста можно отнести выделенные бактерии к группе *P. fluorescens*.



**Рисунок 2.** Дерево, построенное на основе анализа 28 последовательностей гена 16S рРНК пектолитических бактерий рода *Pseudomonas* методом максимального правдоподобия на основе генетических расстояний, определенных по модели Тамуры-Нея (Tamura and Nei, 1993). Рядом с ветвями показано значение бутстреп-анализа, рассчитанного для 1000 повторений. Изоляты 203\_3, 203\_4 и В23кам9В (отмечены зелеными точками) получены в представленной работе

**Figure 2.** Tree constructed from the analysis of 28 16S rRNA gene sequences of pectolytic bacteria of the genus *Pseudomonas* by the maximum likelihood method based on genetic distances determined by the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993).

The bootstrap value calculated for 1000 repetitions is shown next to the branches. Isolates 203\_3, 203\_4 and B23kam9B (marked with green dots) were obtained in the presented work

Род *Pseudomonas* – обширная группа, обитающая в самых разнообразных экологических нишах, включающая в себя как виды, используемые для биотехнологических приложений, так и патогенные виды для животных и растений. Пектолитические штаммы флюоресцирующих *Pseudomonas* могут вызывать поражение корней и прикорневой части у широкого круга растений, и ранее их относили к *P. marginalis* и ряду родственных видов (*P. virgiflava*, *P. allii*, и др.). При развитии молекулярных методов филогенетического анализа, выяснилось, что

штаммы, определенные ранее как *P. marginalis*, довольно гетерогенны и могут принадлежать разным видам (Sawada et al., 2023).

Пектолитические бактерии рода *Pseudomonas*, вызывающие мягкую гниль клубней картофеля, мало изучены, между тем эти бактерии могут быть причиной значительных потерь при хранении. По-видимому, эти бактерии отличаются высоким генетическим разнообразием и нуждаются в дальнейшем исследовании.

#### Благодарности

Исследование выполнено при поддержке РФФ (грант № 23-26-00069)

**Библиографический список (References)**

- Игнатов АН, Панычева ЮС, Воронина МВ, Джалилов ФСУ (2018) Бактериозы картофеля в Российской Федерации. *Картофель и овощи*. 1: 3–7
- Agaras BC, Valverde C (2018) A novel oligonucleotide pair for genotyping members of the pseudomonas genus by single-round pcr amplification of the gyrb gene. *Methods and Protocols* 1(3): 24. <https://doi.org/10.3390/mps1030024>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- Bastas KK (2023) Bacterial diseases of potato and their control. In: Çaliskan ME, Bakhsh A, Jabran K. (eds) *Potato Production World wide*. Cambridge: Academic Press. 179–197.
- Charkowski A, Sharma K, Parker ML, Seco GA, Elphinstone J (2020) Bacterial diseases of potato. In: *The Potato Crop* (Campos H., Ortiz O., eds). Springer: Cham. 351–388.
- Cuppels DA, Kelman A (1980) Isolation of pectolytic fluorescent pseudomonads from soil and potatoes. *Phytopathology* 70: 1110–1115
- Czajkowski R, Pérombelon M, Jafra S, Lojkowska E et al (2015) Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Ann Appl Biol.* 166: 18-38. <https://doi.org/10.1111/aab.12166>
- Ghasemi S, Khodaygan P, Acimović SG, Basavand E (2024) First report of *Pseudomonas marginalis* causing tuber soft rot of potato in Iran. *Journal of Plant Protection Research*. <https://doi.org/10.24425/jppr.2024.150255>
- Ignatov AN, Lazarev AM, Panycheva JS, Provorov NA, Chebotar VK (2018) Potato phytopatogens of genus *Dickeya* - a mini review of systematics and etiology of diseases. *Agricultural Biology*. 53: 123-131.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 35(6):1547-1549
- Lane DJ (1991) 16S/23S sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M editors. *Nucleic Acid Technologies in Bacterial Systematics*. Wiley: Chichester. 115–
- Lelliott RA, Billing E, Hayward AC (1966) A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J Appl Bacteriol.* 29(3):470-89
- Li J, Chai Z, Yang H, Li G, Wang D (2007) First report of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* as a cause of soft rot of potato in China. *Australasian Plant Disease Notes.* 2: 71-73. <https://doi.org/10.1071/DN07029>
- Mulet M, Bennisar A, Lalucat J, García-Valdés E (2009) An rpoD-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples *Mol. Cell. Probes.* 23: 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.02.001>
- Muturi P, Yu J, Li J, Jiang M, et al (2018) Isolation and characterization of pectolytic bacterial pathogens infecting potatoes in Nakuru County, Kenya. *J Appl Microbiol.* 124(6): 1580-1588. <https://doi.org/10.1111/jam.13730>
- Osei R, Yang C, Cui L, Ma T, et al (2022) Isolation, identification, and pathogenicity of *Lelliottia amnigena* causing soft rot of potato tuber in China. *Microb Pathog.* 164: 105441. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105441>
- Sawada H, Fujikawa T, Satou M (2023) Dismantling and reorganizing *Pseudomonas marginalis* sensu lato. *Plant Pathology.* 72: 654-666. <https://doi.org/10.1111/ppa.13690>
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution.* 10: 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Vasilyeva AA, Evseev PV, Ignatov AN, Dzhililov FS-U (2024) *Pectobacterium punjabense* causing blackleg and soft rot of potato: the first report in the Russian Federation. *Plants.* 13: 2144. <https://doi.org/10.3390/plants13152144>
- Voronina MV, Lukianova AA, Shneider MM, Korzhenkov AA, et al (2021) First report of *Pectobacterium polaris* causing soft rot and black leg of potato in Russia. *Plant Dis.* 105(6):1851. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1864-PDN>
- Zhang Y, Peng S, Ren Y, Yao T, et al (2022) First report of *Pseudomonas palleroniana* causing potato soft rot in China. *Plant Dis.* 553. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0816-PDN>

**Translation of Russian References**

- Ignatov AN, Panycheva YuS, Voronina MV, Dzhililov FSU (2018) [Bacterioses of potato in Russian Federation]. *Kartofel i ovoshchi*. 1: 3–7 (In Russian)

**Short communication**

**PECTOLYTIC BACTERIA OF THE GENUS PSEUDOMONAS FROM DISEASED POTATO TUBERS**

V.A. Platonov<sup>1</sup>, O.I. Khasbiullina<sup>2</sup>, V.M. Andreevskaya<sup>3,4</sup>, G.L. Filatova<sup>5</sup>, S.N. Elansky<sup>1,3</sup>, E.M. Chudinova<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Agrarian and Technological Institute, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Kamchatka Research Institute of Agriculture – branch of the Federal Research Center “All-Russian Institute of Plant Genetic Resources named after N. I. Vavilov”, Sosnovka, Kamchatka, Russia

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>4</sup>All-Russian Research Institute of Phytopathology, Bolshie Vyazemy, Moscow oblast, Russia

<sup>5</sup>Research Institute for Problems of Storage of Rosrezerv', Moscow, Russia

\*corresponding author, e-mail: [chudinova\\_em@pfur.ru](mailto:chudinova_em@pfur.ru)

During the examination of industrial potato storage facilities in the Kostroma Region and Kamchatka Krai, potato tubers with soft rot symptoms were collected. Pectolytic bacteria of the genus *Pseudomonas* were isolated and identified. The isolated pectolytic *Pseudomonas* strains differed from each other and from other isolated from potatoes in the sequences of the 16S ribosomal RNA gene, a region of the B subunit gene of DNA gyrase, and a fragment of the sigma factor gene of DNA-dependent RNA polymerase. Based on the analysis of the sequences, the isolated bacteria can be attributed to the *P. fluorescens* group. The isolated bacteria caused maceration of potato tuber tissues at a temperature of 10 °C and 25 °C. The affected potato tissue intensely fluoresced when illuminated with ultraviolet light. At a temperature of 37 °C bacterial growth was completely inhibited. The LOPAT profile corresponds to group IVa of phytopathogenic *Pseudomonas*.

**Keywords:** *Solanum tuberosum*, soft rot of potato, bacterial diseases of potato, storage of potatoes

Submitted: 02.10.2024

Accepted: 06.12.2024