



УДК 579.64, 632.3
DOI 10.25230/conf11-2021-182-186

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ
БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА ГОРОХА *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI*
В СЕМЕННОМ И РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР**

Игнатъева И.М., Словарева О.Ю.
ФГБУ «ВНИИКР»
babiraigirmi@ya.ru

Возбудитель бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* является основным фитопатогеном гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Увеличение объемов производства зернобобовых культур в Российской Федерации и во всем мире требует надежных методов подтверждения отсутствия возбудителя бактериоза. Цель данной работы – изучить и применить метод ПЦР в диагностике возбудителя бактериального ожога гороха с использованием коммерческих наборов, официально принятых в Российской Федерации. Эти коммерческие наборы вместе с методами ПЦР демонстрируют свою эффективность. После полных проверочных испытаний предложенный метод ПЦР может быть использован в качестве одного из официальных тестов для обнаружения бактериального ожога гороха *P. syringae* pv. *pisi* как в растительном, так и в семенном материале.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, бактериальный ожог гороха, ПЦР, аналитическая специфичность.

Введение. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) Young et al. (далее *P. syringae* pv. *pisi*) – возбудитель бактериального ожога гороха является опасным и вредоносным заболеванием гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Данный фитопатоген – угроза стабильному производству значимой продовольственной сельскохозяйственной культуры во всем мире. Бактерия также может поражать вику посевную (*Vicia sativa* L), вигну (*Vigna* sp.), горошек душистый (*Lathyrus odoratus*), долихос или лаблаб пурпурный (*Lablab purpureus*), чину (*Lathyrus latifolius*, *Lathyrus odoratus*) [1; 2]. Патоген выживает в семенах в течение межсезонья. В случае высокой степени заражения семян могут наблюдаться симптомы до и после всходов. Симптомы болезни проявляются в виде маленьких, неправильной формы водянистых повреждений на листьях и створках бобов. С развитием заболевания зоны поражения разрастаются, растения усыхают и, в итоге, погибают. Инфекция на стеблях может распространиться вверх на прилистники и листья [1].



Распространяясь с посевным материалом, зараженным бактериальной инфекцией в латентном состоянии, бактериоз значительно расширил свой ареал за последние годы. В регионе Европейско-средиземноморской организации по защите растений (ЕОКЗР) отмечены неоднократные перехваты фитопатогена в подкарантинном материале (Сирия, Венгрия, Италия). Патоген включен в списки А2 (регулируемые карантинные виды) стран Восточной Африки (2001) и Международной ассоциации профессиональных консультантов по безопасности (IAPSC) (1989), А1 (отсутствующие карантинные виды) Чили, Парагвая, А1/А2 ЕОКЗР список карантинных организмов Израиля [3]. Вид включен в карантинный список стран-импортеров из РФ (Китай, Турция). Наличие бактерии в сельскохозяйственной продукции ограничивает экспортный потенциал государства. Основными покупателями российского гороха в 2019 г являлись: Турция – 20,8 %, Пакистан – 17,5 %, Индия – 16,7 %, Италия – 10,0 %) [4].

Ранняя диагностика *P. syringae* pv. *pisi* предотвращает интродукцию патогена на территорию Российской Федерации. С целью определения зон производства свободных от вредного организма и распространения фитопатогена в РФ необходим научный мониторинг. В связи со всем вышесказанным является актуальным разработка российских методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *P. syringae* pv. *pisi*. Разработанные методические рекомендации позволят проводить качественную диагностику *P. syringae* pv. *pisi* в посевном материале, импортируемом на территорию Российской Федерации, проводить идентификацию чистых бактериальных культур патогена и препаратов ДНК, определять *P. syringae* pv. *pisi* при обнаружении в исследуемой продукции, а также проводить обследование территорий Российской Федерации и досмотр партий подкарантинной продукции.

Материалы и методы. Перспективным направлением диагностики фитопатогена является анализ на основе полимеразной цепной реакции (далее ПЦР), который способствует проведению быстрой и достоверной идентификации *P. syringae* pv. *pisi* в семенах зернобобовых культур.

Метод ПЦР в соответствии с Qing Ch. et al, 2016 позволяет детектировать амплифицируемый фрагмент длиной продукта 272 п.о., который специфичен для *P. syringae* pv. *pisi* с помощью праймеров, разработанных на основе участка гена 16S-23S (прямой праймер AN7F 5' – ТСАСТССГАГСТССТСАСТА – 3' и обратный праймер AN7R 5' – ААСГГССГАГГГТТГТГГААА -3') [5]. Рекомендуемый состав реакционной смеси и условия амплификации представлены в таблице 1.

В качестве целевого организма в исследовании применяли референтный штамм бактерии CFBP 2105 *P. syringae* pv. *pisi* из Французской коллекции бактерий фитопатогенов (Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes (CFBP), Париж, Франция). В качестве нецелевых организмов в исследовании применяли фитопатогены из бактериологической коллекции фитопатогенных штаммов Всероссийского центра карантина растений.

Результаты и обсуждение. Диагностические праймерные системы различаются по степени взаимодействия праймеров с реакционной смесью. Для корректной работы диагностического набора необходимо проводить оптимизацию ПЦР-теста. В лаборатории бактериологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» было проведено исследование на основе ПЦР с использованием коммерческой смеси для амплификации «5X Screen Mix-HS» («Евроген» РФ) и «5X Mas^{DD} MIX-2025» («Dialat» РФ). Испытания проводили на амплификаторе «Т 100 Thermal Cycler Bio-RAD» (Bio-RAD, США). Результат тестирования состава реакционных смесей классической ПЦР представлен на рисунке 1.



Таблица 1. Состав реакционной смеси и условия амплификации для проведения теста на основе ПЦР в соответствии с Qing Ch. et al, 2016 [5]

Состав реакционной смеси		
Компоненты реакционной смеси	Рабочая концентрация	Объем на 1 реакцию, мкл
Вода для ПЦР	-	16,8
PCRmix	5x	5,0
Прямой праймер AN7-F	10 пмоль/мкл	0,6
Обратный праймер AN7-R	10 пмоль/мкл	0,6
ДНК образца	-	2,0
Объем реакции	-	25,0
Условия амплификации		
Температура, °C	Время	Количество циклов
94	5 мин	1
94	30 сек	35
55	30 сек	
72	30 сек	
72	5 мин	1



Рисунок 1 – Электрофореграмма классической ПЦР образцов с праймерами AN7F и AN7R и использованием различных коммерческих смесей для амплификации, где 1– коммерческая смесь «5X Screen Mix-HS» («Евроген» РФ), 2– коммерческая смесь «5X Mas DD MIX-2025» («Dialat» РФ), м – маркер молекулярного веса 100-1500 п.о.

Для определения аналитической специфичности ПЦР-теста подготовили 1 образец целевого вредного организма (концентрация 10^6 КОЕ) и 29 образцов сходных нецелевых организмов (из бактериологической коллекции фитопатогенных штаммов) в стерильном фосфатно-солевом буфере: *Pseudomonas congelans* – 0046; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* – 0222; *Pseudomonas* sp.: 0299, 0366, 0370, 0395, 0396, 0397, 0430; *Pseudomonas fuscovaginae* – 0335; *Pseudomonas azotoformans* – 0359; *Pseudomonas syringae* – 0361; *Pseudomonas hibiscicola* 0363; *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 0382, 0383, 0384; *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*: 0385, 0428; *Pseudomonas graminis* – 0392; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* – 0393; *Pseudomonas corrugata*: 0401, 0476; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: 0403, 0474; *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* – 0440; *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* – 0441; *Pseudomonas nitroreducens*: 0451, 0472; *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* – 0475; *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* – 0484. Результат определения аналитической специфичности ПЦР-теста представлен на рисунке 2.

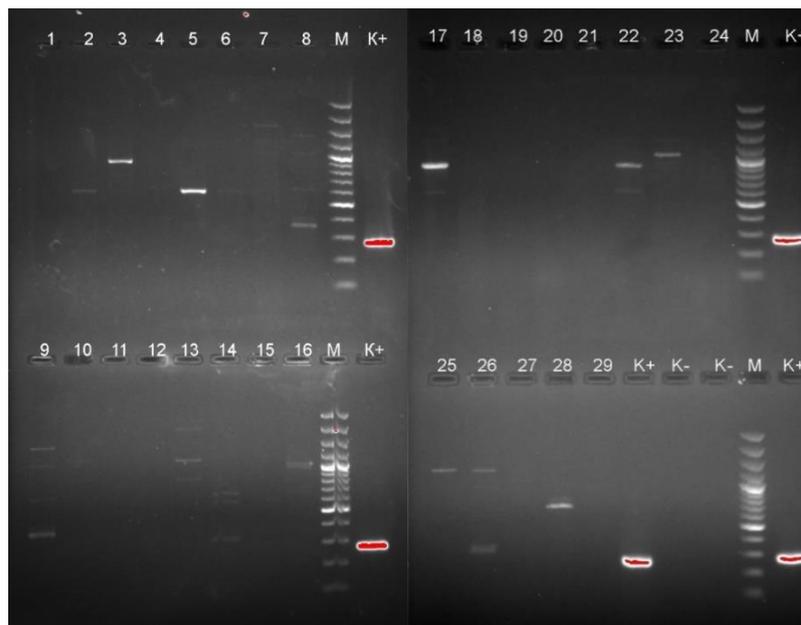


Рисунок 2 – Электрофореграмма классической ПЦР при определении аналитической специфичности с праймерами AN7F и AN7R, где 1–29 – нецелевые организмы, K⁺ – целевой организм или положительный контроль, K⁻ – отрицательный контроль, M – маркер молекулярного веса 100–1500 п.о.

В результате оценки установлено, что кросс-реакций с другими фитопатогенами не выявлено, показатель аналитической специфичности составил 100 %.

Заключение. Оценка результатов апробации состава реакционной смеси ПЦР показала, что тест эффективен для выявления и идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *P. syringae* pv. *pisi*, при использовании коммерческой смеси для амплификации «5X Mas DD MIX-2025» («Dialat» РФ). В результате оценки на аналитическую специфичность метода ПЦР в соответствии с Qing Ch. *et al.* [5] установлено, что кросс-реакций с другими фитопатогенами не выявлено, показатель аналитической специфичности составил 100 %. Данный метод может быть включен в разработку российских методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *P. syringae* pv. *pisi* и использоваться в качестве подтверждающего метода для идентификации патогена из экстракта растительного и семенного материала в диагностических лабораториях сельскохозяйственного профиля, а также при проведении научного мониторинга с целью определения зон производства свободных от вредного организма и распространения фитопатогена в РФ.

Литература

1. Ali M.W., Raja M.U., Irshad G., Zafar K, Hasan M.U., Shaheen F.A. Isolation and characterization of seedborne *Pseudomonas syringae* pv *pisi* from pea (*Pisum sativum* L.) // Asian. J agri biol. – 2015. – 3 (3). – P. 78–83.
2. International rules for seed testing. 7-029: *Pseudomonas syringae* on *Pisum sativum*. Annexe to Chapter 7: Seed Health Methods: 7-029-2. Effective from 1 January 2014. Crop: *Pisum sativum* (pea). Pathogen: *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (bacterial blight). Authors: V.Grimault, R. Germain and A. Politikou.
3. Janse, J D, Phytobacteriology: Principles and Practice. – 2006. – Wallingford, UK: CABI Publishing (<http://www.cabi-publishing.org>).



4. АБ Центр. Экспорт гороха из России в 2001–2019 гг. [Электронный ресурс] / АБ Центр – Электрон. текстовые дан. – М., 2019 – Режим доступа <https://ab-centre.ru/news/eksport-goroха-iz-rossii-v-2001-2019-gg> свободный.

5. Qing Ch, Jun-ting Q, Zhen-ji L, Zhi-peng F, Fu-rong L, Hong-yun C, Jian-ping Y, Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from imported Canadian pea seeds. Acta Phytopathologica Sinica. – 2016. – № 46 (2). – P. 169–175.

**THE APPLICATION OF THE PCR METHOD FOR IDENTIFICATION
OF THE BACTERIAL PEA BLIGHT PATHOGEN *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI*
IN SEED AND PLANT MATERIAL OF LEGUMINOUS CROPS**

Ignatieva I.M., Slovareva O.Yu.

The pathogen of bacterial pea blight *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* is the main phytopathogen of the edible pea (*Pisum sativum* L.). An increase in the production of leguminous crops in the Russian Federation and throughout the world requires reliable methods of confirmation of the absence of bacteriosis pathogen. The aim of this work is to study and apply the PCR method in the diagnosis of the bacterial pea blight pathogen using commercial sets, officially approved in the Russian Federation. Together with the PCR methods, these commercial sets showed their efficiency. After complete proof tests, the proposed PCR method can be used as one of the official tests for the detection of the bacterial pea blight *P. syringae* pv. *Pisi* in both plant and seed material.

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, bacterial pea blight, PCR, analytical specificity.