

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ СТАТЬЯ

Выявление и идентификация возбудителей бактериальных болезней пшеницы и ячменя в России

О. Ю. Словарева^{1,2#}

¹ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева», Москва, Российская Федерация

² ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», Быково, Московская область, Российская Федерация

Для корреспонденции: Ольга Словарева, e-mail: slovareva.olga@gmail.com

Ключевые слова: экспорт зерна, зерновые культуры, бактериозы зерновых культур, карантин растений

DOI: 10.18527/2500-2236-2020-7-1-1-12

Получена 31 декабря 2019 г.

Принята к печати 13 февраля 2020 г.

Опубликована 2 марта 2020 г.

АННОТАЦИЯ

Экспорт зерна представляет собой важную статью продовольственного бизнеса в России. Импортёрами российского зерна являются страны Европы, Азии, Африки и Южной Америки. Каждая страна-импортёр предъявляет свои требования к фитосанитарному состоянию ввозимой продукции. Важным требованием импортёров является отсутствие в партиях зерна таких возбудителей бактериальных болезней зерновых культур, как *Pectobacterium rhapontici*, *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* pvs., *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Xanthomonas translucens* pvs., *Rathayibacter rathayi* и *Pseudomonas cichorii*. Достоверная информация о распространении данных видов бактерий на территории Российской Федерации ограничена. Методы выявления и идентификации возбудителей бактериозов на сегодняшний день не разработаны, что повышает риск распространения фитопатогенов, способных нанести существенный экономический вред сельскому хозяйству.

Цель данного исследования состояла в выявлении и идентификации возбудителей бактериальных болезней пшеницы и ячменя. Для этого нами был проведен сбор образцов растительного материала пшеницы и ячменя в Родионовско-Несветайском, Мясниковском, Зерноградском, Азовском и Мартыновском районах Ростовской области. Представители различных штаммов бактерий были выделены из полученных образцов с использованием соответствующих питательных сред. Тестирование штаммов было проведено методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, разработанных для участка 16S рибосомальной РНК (PSF/PSR и 8UA/519B), и праймеров SyD1/SyD2, подобранных для участка генома *Pseudomonas syringae* (GenBank CP047267.1), с последующим секвенированием по Сэнгеру.

В результате из проб пшеницы и ячменя были выделены и идентифицированы штаммы следующих бактерий: *Curtobacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas azotoformans*, *P. poae*, *P. azotoformans*, *P. hibiscicola*, *P. fluorescens*, *Stenotrophomonas* sp., *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *Bacillus* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* sp. и *Pantoea agglomerans*.

Detection and identification of wheat and barley phytopathogens in Russia

O. Y. Slovareva^{1,2#}

¹ Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K. A. Timiryazev, Moscow, Russian Federation

² All-Russian Plant Quarantine Center, Bykovo, Moscow Oblast, Russian Federation

Corresponding author: Olga Slovareva slovareva.olga@gmail.com

Keywords: grain export, grain crops, crop bacteriosis, plant quarantine

ABSTRACT

Grain export is an important branch of the food business in the Russian Federation. The countries of Europe, Asia, Africa, and South America are importers of Russian grain. Each importing country has its own requirements for the phytosanitary condition of imported products. One important requirement for importers is the absence of pathogens that can cause bacterial diseases of grain crops, such as *Pectobacterium rhapontici*, *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* pvs., *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Xanthomonas translucens* pvs., *Rathayibacter rathayi*, and *Pseudomonas cichorii*. Reliable information on the distribution of these bacterial strains in the Russian Federation is limited. Methods for the isolation and identification of these

bacterial pathogens have not been developed to date, which increases the risk of the spread of phytopathogens that could cause significant economic harm to agriculture.

The purpose of this study was to isolate and identify the causative agents of bacterial diseases of wheat and barley. In order to do this, we collected samples of plant material of wheat and barley in the Rodionovo-Nesvetaysky, Myasnikovsky, Zernogradsky, Azovsky, and Martynovsky districts of the Rostov Oblast. Various bacterial strains were isolated from the obtained samples using the appropriate cultural media. The strains were tested by polymerase chain reaction (PCR) using primers designed for the 16S ribosomal RNA (PSF/PSR and 8UA/519B) and SyD1/SyD2 primers selected for the *Pseudomonas syringae* genome (GenBank CP047267.1) with subsequent sequencing according to the Sanger method. As a result, the following bacterial strains were isolated and identified from wheat and barley samples: *Curtobacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas azotoformans*, *P. poae*, *P. azotoformans*, *P. hibiscicola*, *P. fluorescens*, *Stenotrophomonas* sp., *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *Bacillus* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., and *Pantoea agglomerans*.

ВВЕДЕНИЕ

С 2011 года Россия входит в тройку крупнейших мировых экспортеров продукции зерновых культур, в частности пшеницы и ячменя [1]. В каждой стране, закупающей российское зерно, существуют требования, предъявляемые к качеству ввозимых зерновых культур. Особое внимание уделяется фитосанитарному состоянию зерна. Организации по карантину и защите растений в разных странах имеют перечни вредных организмов, рекомендованных для регулирования в качестве карантинных вредных организмов. Список A1 перечня включает карантинные вредные организмы, отсутствующие в данной зоне, а список A2 – карантинные вредные организмы, присутствующие в данной зоне, но не широко распространенные и служащие объектом официальной борьбы. В Европе такой надзор осуществляет Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений (European and Mediterranean Plant Protection organization, EPPO) [2]. В большинстве стран-импортеров российской продукции зерновых культур имеется перечень микроорганизмов, содержание которых в зерне не допускается. Следует отметить, что при указании таксономических названий бактерий могут использоваться синонимы, что затрудняет работу фитосанитарных служб. В перечень бактериальных возбудителей болезней зерновых культур, относящихся к родам *Triticum* L. (пшеница) и *Hordeum* L. (ячмень) семейства *Poaceae* (злаки), включены следующие виды:

- *Pectobacterium rhapontici* (Millard 1924) Patel & Kulkarni 1951, возбудитель розового бактериоза зерна пшеницы и ржи. Синонимы: *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 [3], *Erwinia carotovora* var. *rhapontici* (Millard) Dye [3]. Этот фитопатоген до настоящего времени не описан на территории Российской Федерации (РФ). Зерновые культуры не являются основными растениями-хозяевами данной бактерии, тем не менее, *P. rhapontici* входит в карантинный перечень стран Восточной и Южной Африки (подкарантинная продукция – пшеница) [2];
- *Rathayibacter tritici* (Carlson & Vidaver) Zgurskaya, Evtushenko, Akimov & Kalakoutskii, возбудитель

желтого слизистого бактериоза пшеницы. Синонимы: *Clavibacter tritici* (Carlson & Vidaver) Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris, *Corynebacterium michiganense* pv. *tritici* (Hutchinson) Dye & Kemp, *Corynebacterium tritici* (Hutchinson) Burkholder, *Phytomonas tritici* (Hutchinson) Bergey, *Pseudomonas tritici* Hutchinson [2]. Бактерия поражает пшеницу [4] и входит в перечень карантинных видов (список A1) в Бразилии, Узбекистане, Греции, Молдавии и странах ЕАЭС, а также находится в карантинном перечне США [2] и Народной Республики Бангладеш [5];

- *Pseudomonas fuscovaginae* (ex Tanii et al. 1976) Miyajima et al. 1983 [3], возбудитель бурой гнили листовой оболочки злаковых культур. Поражает в основном пшеницу, однако в настоящее время считается растительным патогеном и для других злаков, включая кукурузу и сорго [6]. Бактерия находится в списке A1 Египта [7], а также является карантинным видом в Нигерии. Микроорганизм распространен на территории Азии (Япония, Китай, Малайзия, Иран, Филиппины, Непал), Океании (Австралия), Южной Америки (Бразилия), Северной Америки (Мексика) и Африки (Бурунди и Мадагаскар) [8]. Информация о распространении на территории РФ отсутствует.
- *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch) Young, Dye & Wilkie [2], возбудитель базально-го бактериоза пшеницы. Синоним – *Pseudomonas atrofaciens* (McCulloch) Stevens. В природных условиях, кроме пшеницы, фитопатоген поражает рожь, ячмень и овес. Данные о распространении на территории РФ отсутствуют. Возбудитель является карантинным видом в Мексике [2] и Египте [7].
- *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* (Elliott) Young, Dye & Wilkie, возбудитель ореольного бактериоза ржи. Бактерия может поражать также овес. В фитосанитарных требованиях стран-импортеров подкарантинной продукцией для данного фитопатогена является пшеница. Карантинный вид в Нигерии и Мексике, входит в перечень ограниченно распространенных карантинных видов (список A2) в Восточной и Южной

- Африке. Бактерия распространена на территории РФ [2].
- *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 [2], возбудитель базального ожога. Может поражать растения различных видов, включая злаковые. Точные данные о распространении на территории РФ отсутствуют. Входит в список A1 в Бразилии и A2 – в Иордании, а также в карантинный перечень Мексики [2];
 - *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Manns 1909) Willems et al. 1992 [9], возбудитель бактериальной полосатости листьев. Синонимы: *Pseudomonas avenae* subsp. *avenae* Manns 1909, *Acidovorax avenae* (Manns) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters & De Ley. Бактерия может вызывать болезни у многих растений, имеющих экономическое значение, включая рис, кукурузу, овес, сахарный тростник, просо и лисохвост [10, 11]. Карантинный вид в Египте [7] и Марокко, входит в список A2 в Восточной и Южной Африке, при этом подкарантинной продукцией является пшеница. Считается, что на территории РФ бактерия отсутствует [2];
 - *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* (Hagborg) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, возбудитель черного бактериоза ржи. Синонимы: *Xanthomonas campestris* pv. *cerealis* (Hagborg) Dye, *Xanthomonas translucens* f. sp. *cereal* Hagborg. Поражает такие злаки, как пшеница, рожь, ячмень и овес. Точные данные о распространении в РФ отсутствуют. Карантинный вид в Мексике [2];
 - *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* (Jones, Johnson & Reddy) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, возбудитель черного бактериоза ячменя. Название этой бактерии имеет множество синонимов: *Pseudomonas translucens* (Jones, Johnson & Reddy) Stapp, *Xanthomonas campestris* pv. *hordei* (Hagborg) Dye, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (Jones, Johnson & Reddy) Dye, *Xanthomonas translucens* (Jones, Johnson & Reddy) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, *Xanthomonas translucens* pv. *hordei* (Hagborg) Dye. Основным растением-хозяином является ячмень. Патоген может поражать рожь и пшеницу, а также травы: тимopheевку луговую, бромус и пырей ползучий. Считается, что бактерия распространена на территории РФ. Карантинный вид в Марокко и Нигерии, входит в список A2 в Иордании и Турции [2];
 - *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (Egli, Goto & Schmidt) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, возбудитель бактериального увядания зерновых культур. Синонимы: *Xanthomonas campestris* pv. *graminis* (Egli, Goto & Schmidt) Dye, *Xanthomonas graminis* Egli, Goto & Schmid. Поражает злаки, включая пшеницу, рожь и ячмень. Из дикорастущих видов может поражать ежу сборную. Фитопатоген встречается в Европе (Франция, Германия, Швейцария, Великобритания) [2]. Точные данные о распространении на территории РФ отсутствуют. Карантинный вид в Египте [7];
 - *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Smith, Jones & Reddy) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings [2], возбудитель черного бактериоза пшеницы. Синонимы: *Phytomonas translucens* var. *undulosa* Stapp, *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* (Smith, Jones & Reddy) Dye, *Xanthomonas translucens* f. sp. *undulosa*. Считается, что патоген распространен по всему миру, поражает пшеницу и ячмень [12]. Входит в карантинный перечень Нигерии.
 - *Rathayibacter rathayi* (Smith) Zgurskaya, Evtushenko, Akimov & Kalakoutskii, смолистый бактериоз. Синонимы: *Corynebacterium michiganense* pv. *rathayi* (Smith) Dye & Kemp, *Corynebacterium rathayi* (Smith) Dowson, *Phytomonas rathayi* (Smith) Bergey et al. Бактерия поражает рожь, пшеницу, а также ежу сборную. Данный вид распространен во многих странах Европы (Австрия, Кипр, Дания, Германия, Норвегия, Румыния, Швеция, Великобритания), однако считается, что в РФ он отсутствует. Входит в список A1 в странах Южной Африки [2].
 - *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, возбудитель бактериального ожога различных сельскохозяйственных культур. В большей степени поражает салат [13], однако для стран-импортеров подкарантинной продукцией является в том числе и пшеница [7]. Синонимы: *Phytomonas cichorii*, *Pseudomonas endiviae*, *Pseudomonas papaveris*. Бактерия широко распространена на всех континентах. Входит в карантинный перечень Мексики, в список A1 в Египте и A2 – в Иордании [2].
- Возбудители бактериозов зерновых культур, кроме *Rathayibacter tritici*, не являются карантинными видами в РФ, в связи с чем исследования с целью их выявления не проводились, и достоверные данные об их распространении на территории РФ отсутствуют. Кроме того, отсутствует методика диагностики ряда бактериальных фитопатогенов зерновых культур. Соответственно, выявление возбудителей бактериозов (за исключением *Rathayibacter tritici*) в партиях как экспортируемого, так и импортируемого зерна в РФ на сегодняшний день не проводится, что приводит к высокому риску проникновения на территорию РФ фитопатогенов, способных нанести существенный экономический вред сельскому хозяйству.
- Таким образом, разработка методов диагностики фитопатогенов зерновых культур является актуальной задачей.
- Цель настоящего исследования состояла в выделении и идентификации возбудителей бактериальных болезней пшеницы и ячменя для установления фитосанитарного состояния российской продукции зерновых культур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала

Всего было обследовано 1720 га посевных площадей, из них 1536 га – озимая пшеница, 184 га – ячмень. Во время проведения обследования растения озимой

пшеницы и ячменя находились в фазе колошения. В первую очередь осматривали растения с симптомами пятнистости, наличия штрихов и полос, а также признаков увядания и деформации листьев. Подобные симптомы встречаются, например, при заболеваниях, вызванных бактериями *Pseudomonas syringae* pvs. Обращали также внимание на наличие гнили, которая является потенциальным переносчиком бактерий *Xanthomonas translucens* pvs. [14]. Особое внимание уделяли растениям с наличием гнили и хлоротично-некротичными полосами на листьях, так как подобные симптомы могут быть вызваны *X. translucens* pv. *translucens* [15]. Растения с механическими повреждениями также отмечали, поскольку повреждения могут способствовать проникновению патогенных бактерий, например, *X. translucens* pv. *graminis*, в ткани протоксилемы, откуда возбудитель впоследствии мигрирует в сосудистую ткань [16]. С каждого участка отбирали один образец вегетативных частей растений зерновых культур с соответствующими симптомами, добавляя при этом к образцу достаточное количество здоровой ткани тех же растений. Сбор и упаковка образцов были организованы так, чтобы предотвратить повреждения, контакт с другими образцами и контаминацию. Листья и стебли перекладывали фильтровальной бумагой и помещали в контейнеры с отверстиями для доступа воздуха. До проведения исследования образцы хранили при температуре от 2 до 8°C.

Подготовка аналитических проб

В лаборатории получали суспензии микробиоты образцов (аналитические пробы). Отбор проб проводили из участков на стыке симптоматической и здоровой тканей. От каждого образца отбирали лабораторную пробу массой от 1.0 до 2.5 г и помещали в емкость объемом 100 мл. Взвешивание проб проводили на лабораторных электронных весах (AJN-4200CE, Vibra, Япония). К лабораторным пробам добавляли фосфатно-солевой буфер (PBS) [17] в соотношении 20:1, после чего пробы подвергали интенсивному встряхиванию на ротационном шейкере Unimax 2010 (Heidolph, Германия) при режиме 200 об/мин в течение 45–60 мин. Экстракт отделяли от примесей растительных тканей безнапорной фильтрацией с использованием фильтров обеззоленных «Синяя лента», размер пор 3–5 мкм. Полученные экстракты центрифугировали 10 мин при 4°C (10 000 g, Allegra X-30R, Beckman Coulter, Дания). Сразу после центрифугирования супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS. Полученную суспензию использовали для выделения бактерий.

Изоляция бактерий

Выделение культур проводили на средах CRL, CRL.2 и mCRL.2. Среда CRL содержала следующие компоненты: пептон 12.0 г, глицерин 10.0 г, агар 18.0 г, MgSO₄ 0.7 г, K₂HPO₄ 2.0 г, KH₂PO₄ 2.0 г, глюкозу 2.5 г, дрожжевой экстракт 2.0 г, мясной пептон 2.0 г,

сахарозу 15.0 г, NaCl 2.0 г, CaCO₃ 20.0 г (реактивы производства PanReac AppliChem, Испания) на 1 л дистиллированной воды. Среда CRL.2 состояла из тех же компонентов, за исключением CaCO₃. Все ингредиенты перемешивали, доводили pH 20%-м раствором соляной кислоты до 7,0–7,2 с помощью pH-метра (MP 220, Mettler Toledo, Швейцария) и стерилизовали при температуре 121°C в течение 15 мин (автоклав MLS-3020U, Sanyo, Япония). Для получения среды mCRL.2 к среде CRL.2 после стерилизации и охлаждения до 50°C добавляли спиртовой (70%) раствор циклогексимида до его конечной концентрации 200 мг на 1 л среды и водный раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ) до конечной концентрации 50 мг на 1 л среды.

Аналитические пробы использовали для приготовления серии десятикратных разведений в PBS. Разведения 10⁻³ и 10⁻⁴ в объеме 100 мкл высевали с помощью шпателя Дригальского на чашки Петри со средой mCRL.2, используя метод растяжения на 2 чашки в двух повторях (4 чашки на каждый образец). После посева чашки Петри плотно оборачивали герметизирующей пленкой «Parafilm» и выдерживали при температуре +25°C в инкубаторе (MIR-254, Panasonic Healthcare Co., Япония) в течение пяти суток. По истечении этого срока проводили отбор колоний различных морфотипов. Отдельные колонии пересеивали на чашки Петри со средами CRL и CRL.2 с помощью бактериологической петли для получения чистой культуры бактерий. Чашки, обернутые пленкой «Parafilm», инкубировали при температуре +25°C в течение 72 ч. Затем с помощью бактериологической петли отбирали отдельные колонии и помещали в микропробирки с 200 мкл PBS.

ПЦР и секвенирование

Для лизирования клеток пробы инкубировали 10 мин при 96°C, после чего охлаждали в морозильной камере в течение 5 мин. Полученный препарат использовали для проведения ПЦР, которую проводили в несколько этапов. На первом этапе ДНК всех изолятов тестировали методом классической ПЦР с праймерами PSF/PSR (PSF 5'-AGC CGT AGG GGA ACC TGC GG-3', PSR 5'-TGA CTG CCA AGG CAT CCA CC-3'), специфичными к роду *Pseudomonas*. В качестве положительного контроля использовали штаммы *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, полученные из венгерской коллекции AOBC PPSCD. Для приготовления реакционной смеси на одну реакцию использовали 16.0 мкл деионизированной воды, 5.0 мкл мастер-микс 5X Mas^{DP}TaqMIX-2025 (ЗАО «Диалат», Россия) и по 1.0 мкл каждого праймера в концентрации 10 пмоль. Для проведения реакции использовали 2 мкл ДНК. Итоговый объем – 25 мкл. Амплификацию проводили в следующем режиме: начальная денатурация 95°C – 10 мин, затем 25 циклов: 95°C – 20 с, 64°C – 15 с, 72°C – 15 с; финальная элонгация 72°C – 2 мин.

Изоляты, отрицательные в ПЦР с праймерами PSF/PSR, тестировали повторно в ПЦР с универсальными праймерами 8UA/519B, специфичными

к участку 16S-23S рибосомальной РНК (рРНК) (8UA: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', 519B: 5'-GTA TTA CCG CGG CKG CTG-3'). Размер продукта амплификации – 500 п.о. Праймеры заказывали в ООО «Евроген» (РФ). Для приготовления реакционной смеси для одного образца использовали 14 мкл деионизированной воды, 5 мкл мастер-микс 5X Mas^{DD}TaqMIX-2025 (ЗАО «Диалат», РФ), по 2 мкл каждого праймера в концентрации 10 пмоль. Затем в микропробирку вносили 2 мкл ДНК-матрицы образца. Итоговый объем – 25 мкл. Режим амплификации: начальная денатурация 96°C – 10 мин, затем 35 циклов: 95°C – 15 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с; финальная элонгация 72°C – 10 мин.

Изоляты, положительные в тесте с праймерами PSF/PSR, далее анализировали с праймерами SyD1/SyD2 (SyD1 5'-CAGCGCGTTGCGTCCATTGC-3', SyD2 5'-TGCCGCCGACGATGTAGACCAGC-3'), специфичными к *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. В качестве положительного контроля также использовали штаммы *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Для приготовления реакционной смеси для одной реакции использовали 17.4 мкл деионизированной воды, 5 мкл мастер-микс 5X Mas^{DD}TaqMIX-2025 (ЗАО «Диалат», Россия), по 0.3 мкл каждого праймера в концентрации 10 пмоль. В каждую пробирку вносили 2 мкл ДНК образца. Итоговый объем – 25 мкл. Программа амплификации: начальная денатурация 95°C – 10 мин, затем 25 циклов: 95°C – 20 с, 64°C – 15 с, 72°C – 45 с; финальная элонгация 72°C – 7 мин.

Для проведения всех ПЦР-реакций использовали амплификатор Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Определение продуктов реакции проводили в 1.5%-м агарозном геле, используя источник питания для электрофореза Power Pac HV и Bio-Rad Imaging System (Bio-Rad, США).

Для каждого образца, положительного в одном из тестов, проводили идентификацию методом секвенирования по Сэнгеру [18]. Для этого ампликоны, полученные методом ПЦР, очищали при помощи DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Затем в каждом образце, содержащем очищенные ампликоны, проводили измерение концентрации ДНК, используя спектрофотометр NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию ДНК каждого образца доводили до рабочей, исходя из длины продукта амплификации на электрофореграмме (длина продукта, деленная на 100). Для разведения использовали воду. Затем проводили амплификацию, используя набор Big Dye Kit (Thermo Fisher Scientific, США); данный набор содержит меченые dNTP для получения меченой цепи. Состав реакционной смеси для одной реакции: 1 мкл Big Dye 3.1, 1.5 мкл Big Dye buffer, 2 мкл праймера (прямого или обратного) в концентрации 0.8 пмоль, 4.5 мкл воды, 1 мкл ДНК. Режим амплификации: 96°C – 1 мин, затем 25 циклов 96°C – 10 с, 50°C – 5 с, 60°C – 4 мин. После амплификации очищали ДНК, используя BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции

производителя. Затем по 25 мкл очищенной ДНК вносили в лунки секвенатора AB-3500 (Applied Biosystems, США). Программу секвенирования выбирали исходя из длины фрагментов. Результаты обрабатывали с помощью программы BioEdit. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями бактерий, размещенными в GenBank, с помощью сервиса BLAST [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация бактериальных изолятов

Объектами исследования являлись бактериальные изоляты, выделенные из образцов пшеницы и ячменя. Отбор образцов растительного материала проводили в мае 2019 года в Родионовско-Несветайском, Мясниковском, Зерноградском, Азовском и Мартыновском районах Ростовской области (Рис. 1). Отбирали растения с симптомами заболевания (пятнистость, наличие штрихов и полос) (Рис. 2). Информация об обследованных сортах с указанием площадей под посевами представлена в Таблице 1. Всего было отобрано 22 образца. В процессе выделения бактериальных культур на питательной среде mCRL.2 были получены колонии различных морфотипов (Рис. 3). Для ПЦР-тестов и идентификации было отобрано 116 колоний.

Чтобы выбрать изоляты, принадлежащие роду *Pseudomonas*, ДНК всех изолятов тестировали методом ПЦР с праймерами PSF/PSR, специфичными к данному роду [20]. В результате тестирования были получены продукты амплификации длиной от 420 до 750 п.о. для 43 образцов ДНК бактериальных изолятов из 116 (Рис. 4А). В 31 случае из 43 длина продукта амплификации составляла 600 п.о., что соответствовало положительному контролю (Рис. 4Б).

Пробы, выделенные из 73 бактериальных изолятов, показавших отрицательный результат при тестировании с праймерами PSF/PSR, далее анализировали в ПЦР с универсальными праймерами 8UA/519B, специфичными к участку 18S-23S рРНК [21]. Полученные продукты амплификации имели длину 500 п.о. (Рис. 4В). Пробы, выделенные из 43 бактериальных изолятов, положительных при тестировании с праймерами PSF/PSR, далее анализировали с праймерами SyD1/SyD2, специфичными к *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* [20]. В результате были получены фрагменты длиной 1100 п.о., соответствующие положительному контролю, для 7 образцов (Рис. 4Г).

Таким образом, для идентификации методом секвенирования было получено 43 образца продуктов амплификации с праймерами PSF/PSR, 73 – с праймерами 8UA/519B и 7 – с праймерами SyD1/SyD2. Результаты изучения состава бактериальных изолятов, идентифицированных методом секвенирования указанных продуктов амплификации, представлены в Таблице 2.



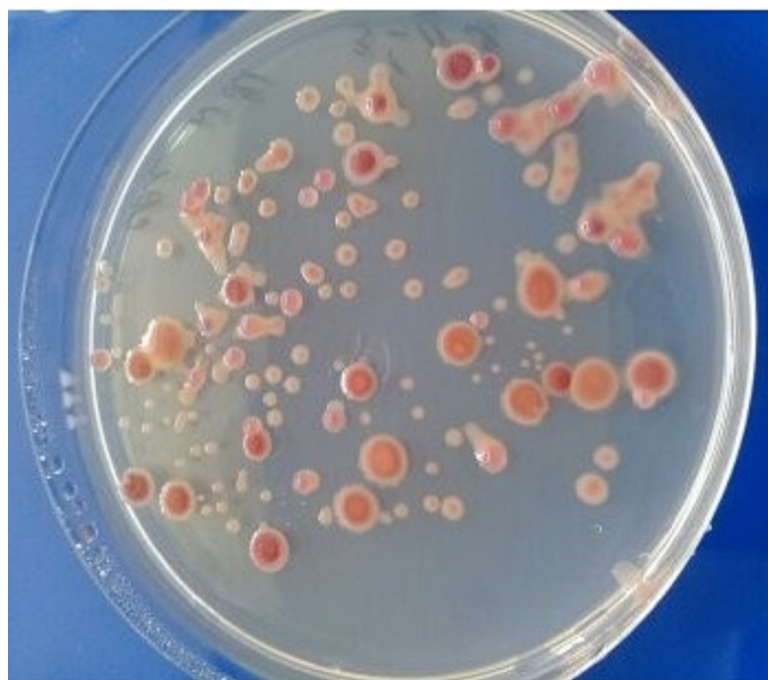
Рис. 1. Карта Ростовской области. Голубым цветом обозначены районы проведения обследования посевов зерновых культур.



Рис. 2. Симптомы бактериальной болезни на растениях пшеницы

Таблица 1. Характеристика обследованных площадей, засеянных озимой пшеницей и ячменем в районах Ростовской области

Район	Культура	Сорт	Площадь (га)
Родионово-Несветайский	Ячмень яровой	Леон	18
	Пшеница озимая	Калым	47
		Алексеич	50
		Тарасовская 70	57
Мясниковский	Пшеница озимая	Безостая 100	168
		Калым	146
		Лидия	90
		Баграт	88
	Ячмень озимый	Достойный	15
		Эспада	15
Зерноградский	Пшеница озимая	Табор	100
		Танаис	81
		Таня	252
		Табор	114
		Баграт	110
Азовский	Пшеница озимая	Сила	69
		Васса	42
		Стан	46
		Юкка	42
		Гром	16
	Ячмень озимый	Тимофей	136
Мартыновский	Пшеница озимая	Баграт	18

**Рис. 3.** Колонии бактерий различных морфотипов, полученные на среде mCRL.2. Колонии получены через 72 ч после посева суспензии микробиоты.

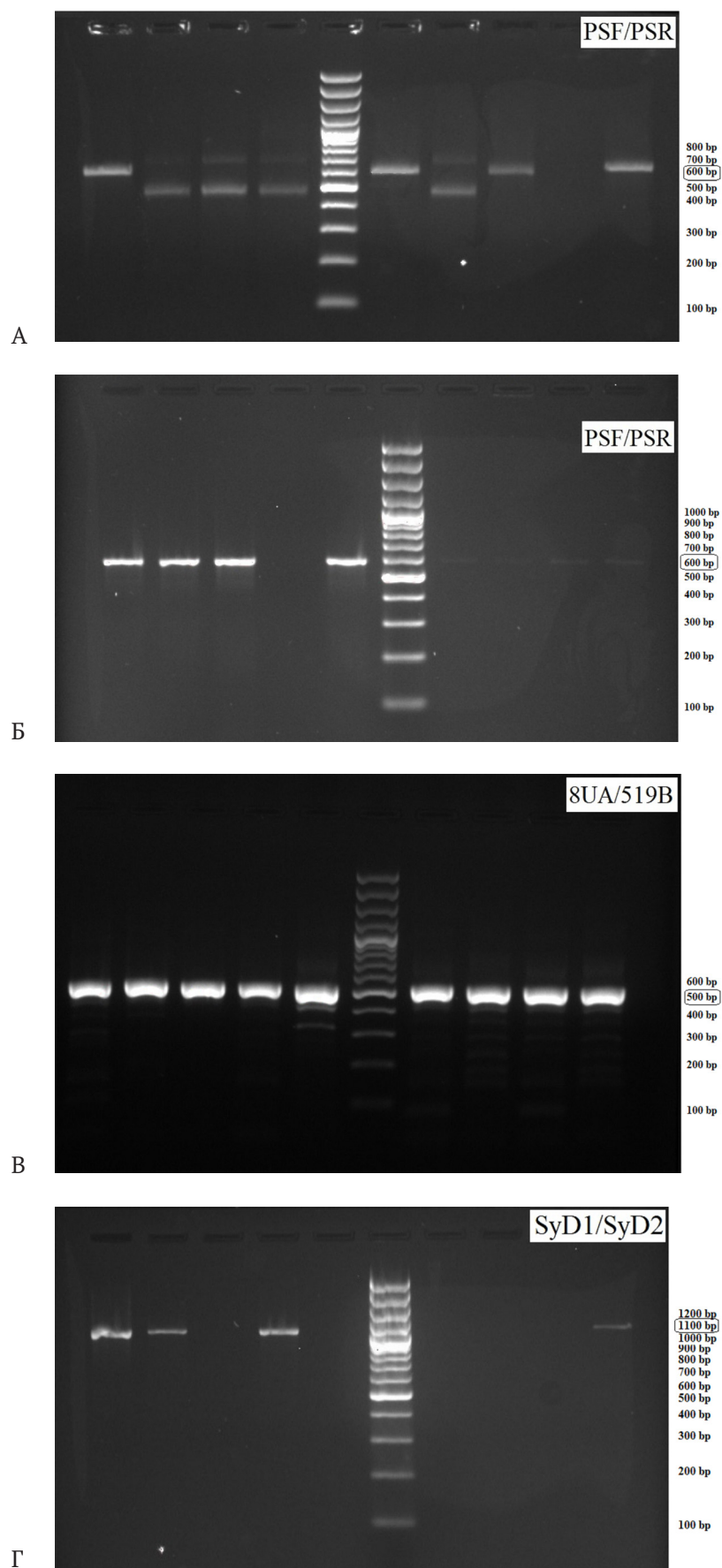


Рис. 4. Продукты ПЦР, полученные для изученных образцов в агарозном геле. (А) Продукты ПЦР, полученные с праймерами PSF/PSR для образцов бактериальных изолятов. (Б) Продукты ПЦР, полученные с праймерами PSF/PSR, соответствующие роду *Pseudomonas* (600 п.о.). (В) Продукты ПЦР, полученные с праймерами 8UA/519B (500 п.о.). (Г) Продукты ПЦР, полученные с праймерами SyD1/SyD2. Проба положительного контроля на Рис. 4 Б, В находится в первой лунке.

Таблица 2. Бактерии, выявленные на исследуемых образцах озимой пшеницы и ячменя и идентифицированные с помощью ПЦР с последующим секвенированием

Культура	Сорт	Бактерии, идентифицированные в ПЦР с соответствующими праймерами		
		PSF/PSR	8UA/519B	SyD1/SyD2
Ячмень яровой	Леон	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Pantoea</i> sp.	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>
Пшеница озимая	Калым		<i>Paenibacillus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Pantoea</i> sp.	
	Алексеич	<i>P. fluorescens</i> , <i>P. poae</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.		
	Тарасовская 70	<i>Pseudomonas</i> sp.		
Пшеница озимая	Безостая 100	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Pantoea</i> sp.	
	Калым	<i>Curtobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.		
	Лидия	<i>Pseudomonas</i> sp.		
	Баграт			
Ячмень озимый	Достойный	<i>Pseudomonas</i> sp.		
	Эспада			
Пшеница озимая	Табор	<i>P. fluorescens</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Pantoea</i> sp.	
	Танаис	<i>Pseudomonas</i> sp.		
	Таня			
	Табор	<i>P. fluorescens</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.		
	Баграт	<i>Pseudomonas</i> sp.		
Пшеница озимая	Сила	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Pantoea</i> sp.	
	Васса			
	Стан			
	Юкка	<i>P. hibiscicola</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.		
	Гром	<i>Pseudomonas</i> sp.		
Ячмень озимый	Тимофей	<i>P. azotoformans</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Pantoea</i> sp.	
Пшеница озимая	Баграт	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Paenibacillus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Pantoea</i> sp.	

В результате секвенирования продуктов амплификации с праймерами PSF/PSR идентифицированы следующие бактериальные изоляты:

- *Pseudomonas fluorescens* (из образца озимой пшеницы сорта Алексеич Родионово-Несветайского района, а также образца озимой пшеницы сорта Табор Зерноградского района). Колонии бактерии на питательной среде mCRL.2 были круглые с неровными краями, 0.02 мм в диаметре, белого цвета;
- *P. roae* (из образца озимой пшеницы сорта Алексеич). Культура на среде mCRL.2 представляла собой круглые колонии правильной формы розового цвета, 0.05 мм в диаметре.
- *Curtobacterium* sp. (из образца озимой пшеницы сорта Калым Мясниковского района). Культура на среде CRL.2 имела плоские желто-бежевые колонии неровной формы, 1.0 мм в диаметре. На среде CRL колонии были ярко-оранжевого цвета;
- *P. azotoformans* (из образца озимого ячменя сорта Тимофей Азовского района). На среде CRL колонии бактерии были молочно-белые, неровной формы, выпуклые, до 5.0 мм в диаметре;
- *P. hibiscicola* (из образца озимой пшеницы сорта Юкка Азовского района). На среде CRL колонии культуры были матовые, кремово-желтые, выпуклые, круглые с ровными краями, от 1.0 до 5.0 мм в диаметре.

Другие продукты амплификации, полученные с праймерами PSF/PSR, путем сравнения с последовательностями, размещенными в GenBank, идентифицированы как *Pseudomonas* sp.

В процессе анализа нуклеотидных последовательностей, полученных после амплификации с праймерами 8UA/519B, были идентифицированы следующие изоляты:

- *Pantoea agglomerans* (из образца ярового ячменя сорта Леон Родионово-Несветайского района). Колонии данного изолята на среде mCRL.2 были круглые, 4 мм в диаметре, персикового цвета с ярко-малиновым центром. На средах CRL.2 и CRL культура имела колонии желтого цвета, неровные, растекающиеся;
- *Enterobacteriaceae* (из образца ярового ячменя сорта Леон). На среде mCRL.2 культура имела круглые слабовыпуклые колонии малинового цвета, 3.0 мм в диаметре.

Также во всех образцах пшеницы и ячменя были идентифицированы изоляты, относящиеся к бактериям *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus* sp., *Erwinia* sp. и *Pantoea* sp.

В результате секвенирования продуктов амплификации, полученных с праймерами SyD1/SyD2, были идентифицированы изоляты *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* и *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* в образцах ярового ячменя сорта Леон Родионово-Несветайского района и озимой пшеницы сорта Калым Мясниковского района. На средах CRL.2 и CRL культуры данных изолятов имели белые, матовые, растекающиеся колонии неровной формы, характеризующиеся быстрым агрессивным ростом (Рис. 5).

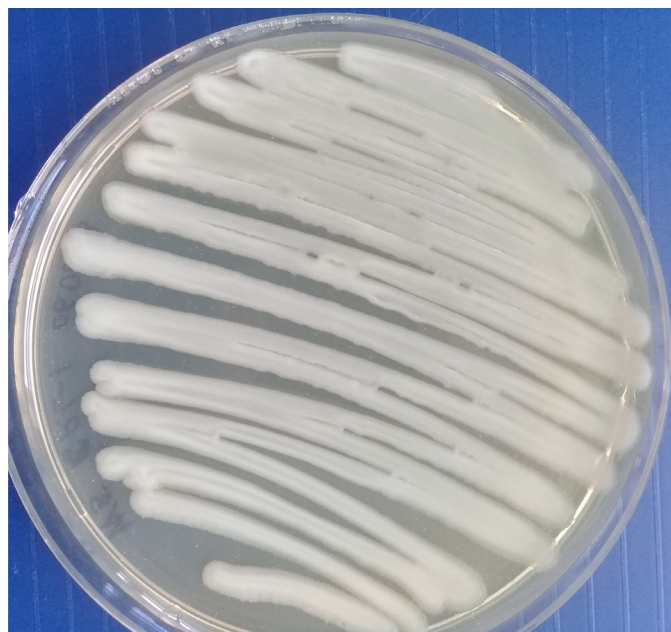


Рис. 5. Культура *P. syringae* на среде CRL.2 после инкубирования при 25°C в течение 48 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании проведено выделение и идентификация возбудителей бактериальных болезней пшеницы и ячменя. В процессе проведения обследований посевов и сбора образцов озимой пшеницы и ячменя в Родионово-Несветайском, Мясниковском, Зерноградском, Азовском и Мартыновском районах Ростовской области на растениях было отмечено наличие симптомов бактериальных болезней, таких как полосы, пятнистости, хлоротичные и некротические участки тканей. Данные наблюдения позволяют сделать вывод о присутствии на посевах зерновых культур в Ростовской области бактериальных фитопатогенов с высокой вирулентностью.

Для посева бактериальных суспензий использовались три экспериментальные питательные среды. На всех средах отмечался быстрый рост бактерий. Использование среды mCRL.2, содержащей циклогексимид, позволило избежать зарастания чашек Петри колониями грибов при посеве. При этом данное противомикробное вещество не проявляло бактериостатических свойств, что позволило провести выделение максимального числа различных бактерий. Другой компонент среды – водный раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого в концентрации 50 мг/л – позволил окрасить некоторые бактериальные колонии, что упростило описание их морфологии. Использование для культивирования чистых культур сред CRL.2 и CRL показало их перспективность при работе с возбудителями бактериозов зерновых культур.

В процессе проведения ПЦР-теста с праймерами PSF/PSR не были получены продукты реакции длиной 752 п.о., описанные разработчиками праймеров [17]. Данная ПЦР позволяет получать продукты амплификации длиной от 420 до 750 п.о. с различными видами

бактерий рода *Pseudomonas*. Размер продукта амплификации для положительного контроля ПЦР, *P. syringae* pv. *syringae*, составил 600 п.о. В рамках данного исследования идентифицированы бактерии *Pseudomonas azotoformans*, *P. poae*, *P. hibiscicola* и *P. fluorescens*. Данный тест можно использовать в качестве метода определения псевдомонад среди отобранных колоний.

Использование праймеров 8UA/519B с последующим секвенированием позволило провести идентификацию бактерий, принадлежащих различным родам, таким как *Curtobacterium* sp., *Enterobacteriaceae*, *Pantoea agglomerans*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus* sp., *Erwinia* sp. и *Pantoea* sp. Виды, принадлежащие роду *Pseudomonas*, с помощью данных праймеров идентифицировать не удалось, так как участок генома, который является мишенью, идентичен у большинства псевдомонад.

Амплификация с ДНК бактерий, принадлежащих виду *P. syringae* pv. *atrofaciens*, с праймерами SyD1/SyD2, по данным литературы [17], должна приводить к образованию продукта реакции длиной 558 п.о., однако мы установили, что размер продукта ПЦР составляет 1100 п.о., в том числе и для положительного контроля, *P. syringae* pv. *syringae*, что соответствует расположению данных праймеров на участке-мишени последовательности генома *P. syringae* (с 2966585 по 2967602 п.о., GenBank CP047267.1). Использование данных праймеров с последующим секвенированием позволило идентифицировать бактерии *P. syringae* pv. *atrofaciens* и *P. syringae* pv. *syringae*, входящие в карантинные перечни стран-импортеров зерновых культур.

Данные, представленные в Таблице 2, показывают, что каждый образец озимой пшеницы и ячменя содержит в составе своей микробиоты бактерии, принадлежащие родам *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Erwinia* и *Pantoea*. Среди найденных фитопатогенов бактерии *Pseudomonas*, *Erwinia* и *Pantoea* потенциально могут обладать наибольшей вирулентностью, так как именно данные роды бактерий содержат наибольшее число фитопатогенных видов [22]. Это может быть связано с тем, что вышеуказанные бактерии, являясь грамотрицательными, имеют системы секреции, отличные от имеющих у грамположительных бактерий [23]. Типы секреции III, IV и VI позволяют грамотрицательным бактериям доставлять факторы вирулентности через клеточные мембраны растения-хозяина [24]. Принимая во внимание наличие симптомов бактериальных болезней на посевах озимой пшеницы

и ячменя в период проведения обследования, можно предположить, что выделенные изоляты, такие как *P. syringae* pvs., являются высоковирулентными в отношении растений-хозяев [22].

Виды фитопатогенных бактерий, входящие в карантинные перечни стран-импортеров, за исключением *P. syringae* pv. *atrofaciens* и *P. syringae* pv. *syringae*, не были обнаружены в исследованных образцах. Используемые методы идентификации могли быть недостаточными для идентификации некоторых псевдомонад, таких как *P. cichorii* и *P. fuscovaginae*, так как при сравнении полученных последовательностей нуклеотидов с последовательностями, размещенными в GenBank, ряд бактерий, идентифицированных как бактерии рода *Pseudomonas*, не определены до вида.

Тем не менее, использованный подход позволяет сделать вывод об отсутствии в отобранных образцах таких бактерий, как *Pectobacterium rhapontici*, *Rathayibacter tritici*, *R. rathayi*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* и *Xanthomonas translucens* pvs.

Данные о составе микробиоты пшеницы и ячменя, полученные в результате исследования, могут быть использованы для определения соответствия российской продукции зерна фитосанитарным требованиям стран-импортеров.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор не преследует коммерческих или финансовых интересов.

ЦИТИРОВАНИЕ

Словарева ОЮ. Выявление и идентификация возбудителей бактериальных болезней пшеницы и ячменя в России. MIR J 2020; 7(1), 1-12. doi: 10.18527/2500-2236-2020-7-1-1-12.

АВТОРСКИЕ ПРАВА

© 2020 Словарева. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Развитие российского экспорта. Российский экспортный центр. https://www.exportcenter.ru/international_markets/russian_exports/?sphrase_id=116943.
2. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Global database, 2020. Available: <https://gd.eppo.int>.
3. Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J, Tindall BJ. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7, 2007. Part 5 – The Bacteria: Phylum “Proteobacteria”, Class Gammaproteobacteria, pp. 148-245. Available: <http://taxonomicoutline.org/content/7/7/148/pdf>.

4. Baek KY, Lee HH, Son GJ, Lee PA, Roy N, Seo YS, Lee SW. Specific and Sensitive Primers Developed by Comparative Genomics to Detect Bacterial Pathogens in Grains. *Plant Pathol J* 2018; 34(2), 104-112. doi: 10.5423/PPJ.OA.11.2017.0250.
5. Phyto requirements Bangladesh, 2015. Ministry of Bangladesh Foreign Affairs, MOFA/Europe/EE/Russia/216/15(022). Available: http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/importExport/bangladesh/files/phyto_requirements_bangladesh.pdf.
6. Patel HK, da Silva DP, Devescovi G, Maraite H, Paszkiewicz K, Studholme DJ, Venturi V. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas fuscovaginae*, a Broad-Host-Range Pathogen of Plants. *Journal of Bacteriology* 2012; 194(10), 2765-2766. doi: 10.1128/JB.00341-12.
7. wheat, part 1: general principles for wheat (*triticum aestivum* L.). Egyptian Organization for Standards & Quality (EOS), Standard No. 1601-1, 2010.
8. Patel HK, Matiuzzo M, Bertani I, Bigirimana VdeP, Ash GJ, Höfte M, Venturi V. Identification of virulence associated loci in the emerging broad host range plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae*. *BMC Microbiology* 2014; 14, 274. doi: 10.1186/s12866-014-0274-7.
9. Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzeby J, Tindall BJ. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7, 2007. Part 4 – The Bacteria: Phylum “Proteobacteria”, Class Betaproteobacteria, pp. 112-147. Available: <http://taxonomicoutline.org/content/7/7/112/pdf>.
10. Xie G, Zhang G, Liu H, Lou M, Tian W, Li B, Zhou X, Zhu B, Jin G. Genome Sequence of the Rice-Pathogenic Bacterium *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* RS-1. *Journal of Bacteriology*. 2011; 193(18), 5013-14. doi: 10.1128/JB.05594-11.
11. Chu N, Zhou JR, Fu HY, Huang MT, Zhang HL, Gao SJ. Global Gene Responses of Resistant and Susceptible Sugarcane Cultivars to *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* Identified Using Comparative Transcriptome Analysis settings. *Microorganisms* 2020; 8(1), 10. doi: 10.3390/microorganisms8010010.
12. Sharma A, Sharma D, Verma SK. Zinc binding proteome of a phytopathogen *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. *Royal Society Open Science* 2019; 6(9): 190369. doi: 10.1098/rsos.190369.
13. Komatsu H, Shirakawa T, Uchiyama T, Hoshino T. Chemical structure of cichorinotoxin, a cyclic lipopeptide that is produced by *Pseudomonas cichorii* and causes varnish spots on lettuce. *Beilstein J Org Chem* 2019; 15, 299-309. doi: 10.3762/bjoc.15.27.
14. Boosalis MG. The epidemiology of *Xanthomonas translucens* on cereals and grasses. *Phytopathology* 1952; 42, 387-395.
15. Sands DS, Fourest E. *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* in North and South America and in the Middle East. *Bulletin OEPP/EPPO* 1989; 19(1), 127-130. doi: 10.1111/j.1365-2338.1989.tb00138.x.
16. Wichmann F, Vorhölter F, Hersemann L, Widmer F, Blom J, Niehaus K, et al. The noncanonical type III secretion system of *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* is essential for forage grass infection. *Mol Plant Pathol* 2013; 14(6), 576-88. doi: 10.1111/mpp.12030.
17. Giovanardi D, Sutton SA, Stefani E, Walcott RR. Factors influencing the detection of *Acidovorax citrulli* in naturally contaminated cucurbitaceous seeds by PCR-based assays. *Seed Science and Technology* 2018; 46(1), 93-106. doi: 10.15258/sst.2018.46.1.09.
18. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94(3), 441-8. doi: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
19. Basic Local Alignment Search Tool, 2020. Available: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.
20. Kazempour MN, 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* 2009; 9(20), 2860-2865.
21. Daffonchio D, Cherif A, Brusetti L, Rizzi A, Mora D, Boudabous A, et al. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(9), 5128-37. doi: 10.1128/aem.69.9.5128-5137.2003.
22. Горшков ВЮ. Бактериозы растений: молекулярные основы формирования растительно-микробных патосистем. Казань: Изд-во Сергея Бузукина; 2017.
23. Green ER, Mecsas J. Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiol Spectr* 2016; 4(1), 1-19. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.
24. El Qaidi S, Scott NE, Hays MP, Geisbrecht BV, Watkins S, Hardwidge PR. An intra-bacterial activity for a T3SS effector. *Sci Rep* 2020; 10(1), 1073. doi: 10.1038/s41598-020-58062-y.