

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА СОИ *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *GLYCINEA* В СЕМЕНАХ МЕТОДОМ ПЦР

Р.И. ТАРАКАНОВ¹, И.М. ИГНАТЬЕВА², О.О. БЕЛОШАПКИНА¹,
С.И. ЧЕБАНЕНКО¹, О.Г. КАРАТАЕВА¹, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ¹

(¹Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева;
²Всероссийский центр карантина растений)

В статье описано применение метода классической ПЦР для диагностики возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в семенах. Изучены 2 метода выделения патогена из инфицированных семян сои, 5 методов выделения ДНК и 2 мастер-микса для приготовления реакционной смеси. Использование тест-системы на основе ПЦР с олигонуклеотидами, специфичными на ген коронафакат-лигазы (*cfl*), позволило диагностировать возбудителя бактериального ожога сои в семенах при концентрации 2×10^3 КОЕ/мл. Аналитическая специфичность протокола составила 97,4% из 37 протестированных близкородственных и других бактерий. Показано, что выход продукта (площадь пика ампликона) был максимальным (645,0 ед.) при выделении ДНК при помощи набора Проба-ГС, использовании мастер-микса 5x MasDDTaqMIX-2025 и праймеров *PsgFOR-1* и *PsgREV-2* по 10 нМ на реакцию (25 мкл).

Ключевые слова: соя, бактериальный ожог сои, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, фитоэкспертиза семян, ПЦР.

Введение

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является важнейшей зернобобовой культурой в мире. Общий урожай ее семян в России в 2022 г. достиг 6,3 млн т, что на 22,6% больше, чем в 2021 г. [1]. Болезни значительно снижают потенциальную урожайность культуры и уменьшают сбор масла и белка. В глобальном масштабе финансовые потери по причине болезней сои в среднем составляют около 10% от стоимости урожая [2]. Возрастает экономический ущерб от бактериальных заболеваний, особенно когда зараженность семян выше экономического порога вредоносности сочетается с погодными условиями, благоприятными для развития патогенов [3, 4].

Одним из наиболее известных и вредоносных заболеваний сои бактериальной этиологии является бактериальный ожог, или бактериальная пятнистость (возбудитель – *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Coerper, 1919; Gardan et al., 1992) (далее – *Psg*). Заражению *Psg* подвержены все надземные органы сои. Первые симптомы поражения проявляются, как правило, на листьях среднего яруса [5, 6]. При наступлении благоприятных условий болезнь распространяется на все растение включая бобы. У пораженных растений снижение урожайности может достигать 40%, при этом ухудшаются посевные качества семян, уменьшается содержание масла и белка в зерне [7, 8].

Распространение бактерий на новые территории в связи с интенсификацией производства сои в стране возможно с семенным материалом, в котором инфекция может находиться в латентном состоянии и в благоприятных условиях способна вызывать эпифитотию данного заболевания сои [10]. Среди профилактических мер защиты от бактериальных болезней первоочередной является фитосанитарная диагностика, позволяющая не допустить распространения патогена в новые регионы [9]. В связи с этим особую актуальность приобретают высокочувствительные методы

фитосанитарной экспертизы, из которых наиболее перспективным и подходящим для массовой диагностики является метод ПЦР, описанный в ряде зарубежных источников [11].

Bereswill с коллегами [12] для диагностики патовариантов *Pseudomonas syringae* предложил использовать ген, кодирующий синтез коронафакат-лигазы (*cfl*). Этот фермент является компонентом синтеза фитотоксина коронатина, который необходим для инициации патогенеза в растении. Данные олигонуклеотиды хорошо себя зарекомендовали для предварительной диагностики Psg [5]. Однако для совершенствования методики тестирования и повышения достоверности массовой диагностики необходима разработка рекомендаций по пробоподготовке и проведению апробации различных тест-систем. Актуальность исследования также обусловлена трудностью и высокой стоимостью получения импортных реактивов для проведения фитосанитарного анализа.

Цель исследований: усовершенствование процедуры пробоподготовки при проведении анализа семян сои на наличие возбудителя бактериального ожога в семенах сои методом классической ПЦР с использованием отечественных реактивов.

Материал и методы исследований

Условия для проведения ПЦР. В качестве праймеров для проведения реакции использовали олигонуклеотиды PsgFOR-1 ('5-GGC GCT CCC TCG CAC TT-3') и PsgREV-2 ('5-GGT ATT GGC GGGGGT GC-3'), специфичные для гена *cfl* и образующие продукт размером ~650 п.н. [12]. Для амплификации готовили ПЦР-смесь, состоящую из 5x Master Mix (5x MasDDTaqMIX-2025, Диалат, ЛТД) – 5 мкл; 1,0 мкл каждого праймера в концентрации 10 пМ/мкл; 5 нг ДНК – 5 мкл; воды для ПЦР – 13 мкл. Конечный объем смеси составлял 25 мкл. Условия амплификации были следующими: предварительная денатурация при температуре 96°C – 10 мин; денатурация при 96°C – 30 с; отжиг праймеров при 67°C – 2 мин; элонгация при 72°C – 30 с, 40 циклов; финальная элонгация при 72°C – 5 мин.

Определение чувствительности и специфичности. Для определения чувствительности ПЦР колонии 3-дневной культуры штамма Psg CFBR 2214 [13], выращенной на среде Кинга Б, суспендировали в стерильном 10 мМ растворе MgCl₂ и проводили десятикратное разведение. 100 мкл суспензии из каждого разведения высевали в трех повторностях на среду Кинга Б и инкубировали в течение 72 ч, после чего проводили подсчет колоний. Параллельно из каждого разведения выделяли ДНК с помощью набора «Проба-ГС» («ООО ДНК-Технология», Москва, Россия) и амплифицировали согласно программе, представленной ранее. Реакцию осуществляли в амплификаторах «T100 Thermal Cycler Bio-RAD» (Applied Biosystems, США) и «Nyxtechnik» ATC 201 (Nyx Technik, Inc., США). Электрофоретическое разделение ампликонов проводили в 0,5-кратном буфере TBE в присутствии бромистого этидия. Визуализацию провели с помощью системы документирования гелей Gel DocXR+ (Bio-Rad, США). Повторность эксперимента – двукратная.

Для определения специфичности использовали ДНК близкородственных и других видов эндофитных и фитопатогенных бактерий, хранящихся в биоресурсных коллекциях Всероссийского центра карантина растений (Быково, Россия) и кафедры защиты растений Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия). Исследовали ДНК следующих бактерий: *Pseudomonas congelans*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*, *Pectobacterium wasabiae*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas* sp. (выделенный из моркови), *Pseudomonas*

sp. (выделенный из гороха), *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas hibiscicola*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pseudomonas holci*), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas graminis*, *Xanthomonas* sp. (выделенный из клевера), *Pseudomonas* sp. (выделенный из гороха), *Pseudomonas* sp. (выделенный из кукурузы), *Pseudomonas* sp. (выделенный из сои), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas* sp. (выделенный из плодовых деревьев), *Pseudomonas* sp. (выделенный из фасоли обыкновенной), *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas baetica*, *Pseudomonas* sp. (выделенный из плодовых деревьев), *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas* sp. (выделенный из плодовых деревьев). Условия проведения ПЦР были аналогичными вышеуказанным.

Искусственное заражение семян. Семена сои сорта Касатка были инокулированы в соответствии с протоколом Rooney et al. [14] с изменениями. Для этого трехдневную культуру штамма CFBR 2214 выращивали при температуре 18°C на среде Кинга Б, колонии ресуспендировали в стерильном 10 mM MgCl₂ и доводили концентрацию до OD₆₀₀ ~ 0,2, что соответствовало концентрации ~10⁴ КОЕ/мл. Семена переносили в стерильную колбу и заливали бактериальной суспензией до полного погружения семян. Однократно (в варианте с поверхностной локализацией патогена) семена оставляли на 1 ч в растворе и затем высушивали в течение 24 ч на бумажных полотенцах. В варианте с внутренней локализацией колбу с семенами и бактериальной суспензией помещали в вакуумную камеру при -10⁵ Па на 10 мин. Обработанные семена высушивали в течение 24 ч на бумажных полотенцах для удаления лишней жидкости и далее промывали однократно в растворе спирта, и трехкратно – в стерильной воде.

Определение оптимального метода выделения патогена из семян. Для определения оптимального метода экстракции патогена из семян использовали следующие варианты: 1) встряхивание семян с буфером на шейкере; 2) разрушение семян в буфере, рекомендованном для выделения *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* из семян фасоли [15]. Для первого метода 200 г искусственно зараженных семян сои с внутренней и поверхностной локализацией инфекции помещали в колбу, заливали 300 мл SPS-буфера и ставили на шейкер при температуре +4°C на 12 ч при 180 об/мин. При втором методе семена заливали буфером и помещали на 12 ч при +4°C. После набухания семена переносили в пластиковые пакеты и разрушали в гомогенизаторе BagMixer 400R в течение 300 с. В обоих случаях суспензию фильтровали на стерильных ватных фильтрах, центрифугировали при 8000 об/мин при +°C, удаляли супернатант, а осадок ресуспендировали в 1,5 мл SPS-буфера, центрифугировали при 13000 об/мин и удаляли супернатант. Из полученных экстрактов семян выделяли ДНК с помощью набора Проба-ГС (ООО «ДНК-Технология») в соответствии с инструкцией производителя и проводили амплификацию в соответствии с условиями, приведенными ранее.

Подбор мастер-микса. Для определения оптимальной пары «Метод выделения ДНК-мастер-микс» из экстракта семян с внутренней локализацией инфекции и экстракцией с помощью гомогенизатора ДНК выделяли 5 различными наборами и методами. В качестве вариантов использовали 3 отечественных коммерческих набора: Проба-ГС (ООО «ДНК-Технология»), Фитосорб и Цитосорб (ООО «Синтол») – и сравнивали 2 метода: нагревание в NaOH (так называемый термический метод)

и модифицированный SDS-СТАВ- метод (mSDS-СТАВ). В случае коммерческих наборов следовали инструкциям производителей.

В случае с методом нагревания в NaOH (термического) к экстракту добавляли NaOH до концентрации 50 mM и помещали в твердотельный термостат при температуре 96°C на 10 мин [16]. В случае метода mSDS-СТАВ следовали протоколу [17].

В анализе использовали два мастер-микса: 5x MasDDTaqMIX-2025 (Диалат ЛТД, Москва, Россия) и 5x ScreenMix-HS (Евроген, Москва, Россия). Таким образом, в опыте было проанализировано 10 вариантов (2 мастер-микса x 5 методов выделения ДНК). Подбор объема праймеров осуществляли, варьируя их от 0,5 до 2 мкл на реакцию (при концентрации каждого по 10 пМ/мкл).

Определение оптимального метода выделения ДНК при различной локализации патогена. В эксперименте из экстрактов семян с внутренней и поверхностной локализаций инфекции выделяли ДНК с помощью 5 различных наборов и методов, описанных выше. Количество вариантов эксперимента составило 20 (5 методов выделения x 4 варианта локализации и выделения патогена). После выделения ДНК провели амплификацию при ранее описанных условиях. Анализ графических изображений, полученных в результате электрофоретического разделения ДНК, производили денситометрическим методом с помощью программы IMAGE J2 (National Institute of Health, США) в соответствии с протоколом [18].

Статистическая обработка и визуализация. Статистическую обработку анализируемых данных осуществляли методом дисперсионного анализа с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft, США) путем сравнения средних значений по множественному интервальному тесту Дункана и при помощи теста Крускала-Уоллиса с применением теста множественных сравнений Данна. Графическое представление результатов и первичный статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, США).

Результаты и их обсуждение

Определение чувствительности и специфичности протокола. Для определения чувствительности методики проводили ПЦР с использованием серийных разведений суспензии Psg CFBP 2214. Анализ показал, что при использовании коммерческого мастер-микса 5x MasDDTaqMIX-2025 аналитическая чувствительность составила в среднем 2×10^3 КОЕ/мл (рис. 1).

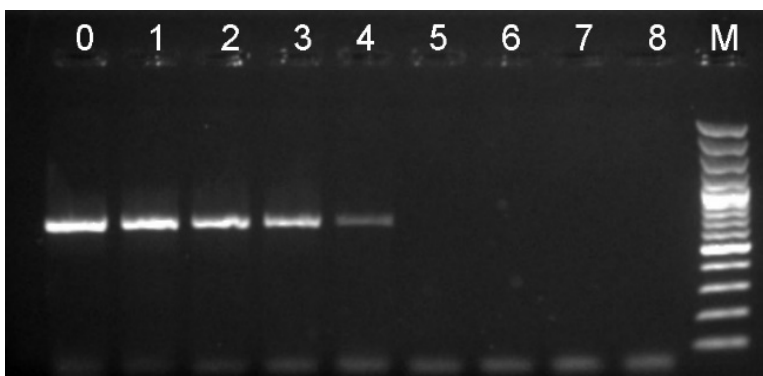


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами PsgFOR-1 и PsgREV-2, где 0– 10^7 КОЕ/мл; 1– 10^6 КОЕ/мл; 2– 10^5 КОЕ/мл; 3– 10^4 КОЕ/мл; 4– 10^3 КОЕ/мл; 5– 10^2 КОЕ/мл; 6– 10^1 КОЕ/мл; 7– 10^0 КОЕ/мл; 8 – отрицательный контроль; М – 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Москва, Россия) маркер молекулярного веса

При проверке аналитической специфичности не были отмечены перекрестные реакции праймеров с другими бактериями. У некоторых штаммов было отмечено образование неспецифических ампликонов, размеры которых не соответствовали длине продукта (целевого организма). У одного штамма (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) продукт по размеру совпадал с размером ампликона исследуемого патогена. Однако с учетом того, что данный патоген инфицирует томат, его присутствие в образцах семян сои является маловероятным, и это согласуется с результатами работ зарубежных коллег [12]. Таким образом, аналитическая чувствительность протокола составила 97,4% из 37 протестированных близкородственных и других бактерий.

Определение оптимального метода выделения патогена из семян. Учитывая, что патоген может находиться как на поверхности, так и под оболочкой семян, необходимо проводить экстракцию путем как смыва с поверхности семян, так и разрушения семян в буфере. По этой причине следовало определить наилучший метод для достижения максимальной площади пика ампликона для внутренней и поверхностной локализации патогена.

Полученные результаты показали, что максимальная площадь пика ампликона была достигнута при поверхностной локализации патогена как при промывке, так и при разрушении семян, при этом площадь пика составила 416,9 и 390,7 соответственно (рис. 2). При внутренней локализации патогена площадь пика была меньшей и составляла в среднем 245,0 и 85,5 ед. при разрушении и смыве семян соответственно. Поэтому в качестве метода выделения патогена из зараженных семян было решено в дальнейшем применять метод разрушения семян в гомогенизаторе.

Анализ результатов эксперимента с использованием ДНК, выделенной 5 различными методами с использованием двух мастер-миксов, показал, что площадь пика была максимальной (645,0 ед.) при выделении ДНК с помощью набора Проба-ГС и использовании мастер-микса 5x MasDDTaqMIX-2025 (рис. 3А).

Подбор мастер-микса. В результате проведения эксперимента по подбору оптимального мастер-микса было обнаружено, что в вариантах с использованием мастер-микса 5x ScreenMix-HS и разных методов выделения ДНК либо целевой ампликон не образовывался, либо площадь пика была очень низкой. Поэтому для дальнейших исследований необходимо выделять ДНК с помощью набора Проба-ГС и использовать мастер-микс 5x MasDDTaqMIX-2025. В то же время при использовании набора Проба-ГС было затрачено минимальное время на выделение ДНК из экстракта семян сои (рис. 3Б).

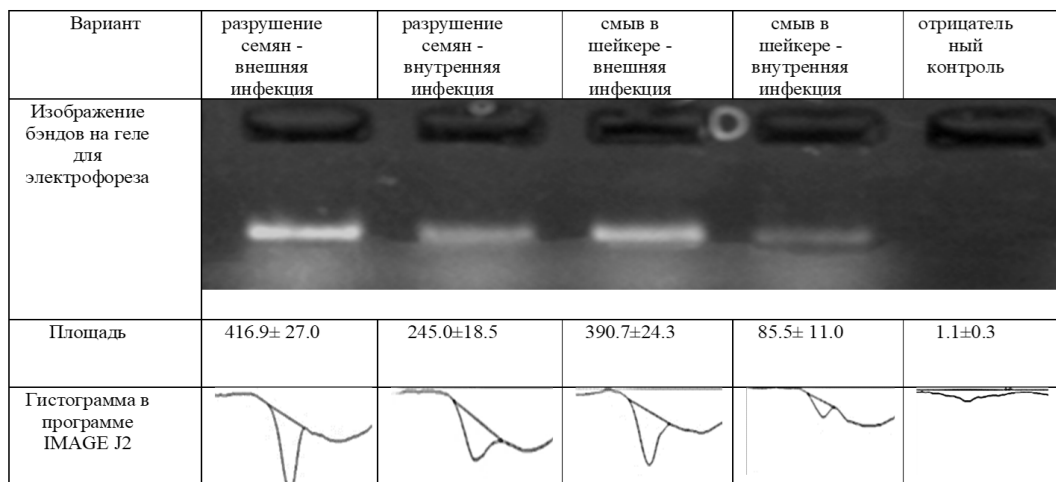


Рис. 2. Графическое представление результатов электрофореза, полученных при обработке в программе IMAGE J2, по вариантам локализации инфекции и методам выделения патогена из семян

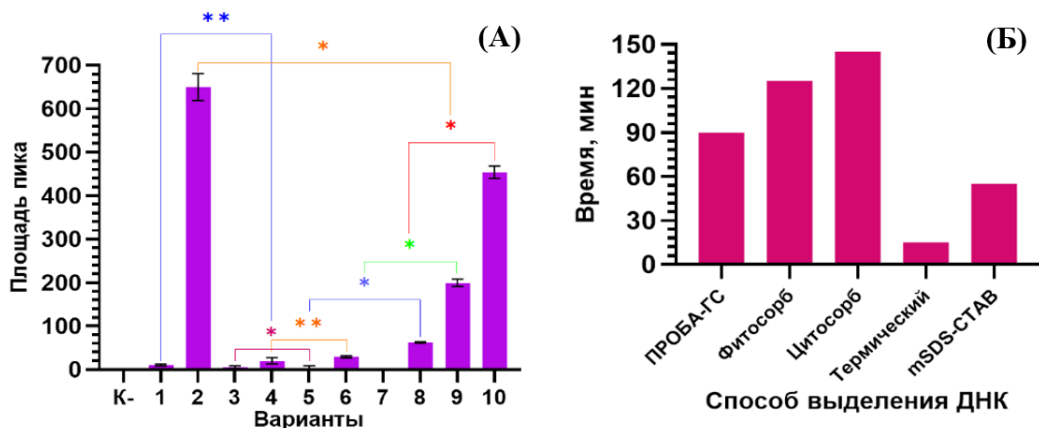


Рис. 3. Значения площади пика в зависимости от метода выделения ДНК и мастер-микса.

А: значения ошибок показывают стандартное отклонение в трех повторностях.

К – отрицательный контроль (ddH₂O); 1–2 – набор для выделения ДНК Проба-ГС;

3–4 – Фитосорб; 5–6 – Цитосорб; 7–8 – термический; 9–10 – mSDS-СТАВ.

Четные варианты – 5x MasDDTaqMIX-2025, нечетные – 5x ScreenMix-HS.

Статистические различия оценивались с помощью теста Крускалла-Уоллиса с использованием теста множественных сравнений Данна

(*Различий нет. **Различия при $p < 0,05$).

Б: время выделения ДНК из 3 образцов семян сои разными методами

Подбор объема праймера показал, что наибольшая площадь пика была достигнута при использовании мастер-микса 5x MasDDTaqMIX-2025 в сочетании с 1,0 и 2,0 мкл праймера на реакцию (рис. 4). Учитывая, что площади пиков в этих вариантах статистически не отличались, в дальнейшем использовали праймеры в объеме 1,0 мкл на реакцию (10 пМ на реакцию).

Определение оптимальной схемы диагностики в зависимости от метода выделения, локализации инфекции и способа выделения ДНК. В результате проведения эксперимента по определению оптимальной схемы диагностики показано, что наибольшая площадь пика ампликона была достигнута в варианте с выделением набором Проба-ГС, пробоподготовкой методом разрушения семян в гомогенизаторе и поверхностной локализацией патогена (рис. 5). При этом показано, что продукты амплификации не образовывались при использовании термического метода выделения ДНК. Скорее всего это связано с неполным лизисом клеток при нагревании и, возможно, с попаданием ингибиторов полимеразы в выделяемый раствор ДНК.

Выделение ДНК набором Цитосорб также приводило к низкой степени выхода продукта амплификации. Возможно, это связано с тем, что набор предназначен для выделения ДНК из фитоплазм, а не бактерий. Таким образом, для максимального выхода продукта амплификации и повышения точности диагностики в дальнейшем необходимо использовать пробоподготовку методом разрушения семян в гомогенизаторе и набор для выделения ДНК Проба-ГС.

Для повышения чувствительности и производительности тестирования семян сои на зараженность трудно искореняемым заболеванием (бактериальным ожогом сои) и улучшения достоверности диагностики его возбудителя *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* проведены исследования, на основе экспериментальных данных предложены рекомендации по оптимальной пробоподготовке и проведению апробации тест-системы с использованием реактивов отечественного производства.

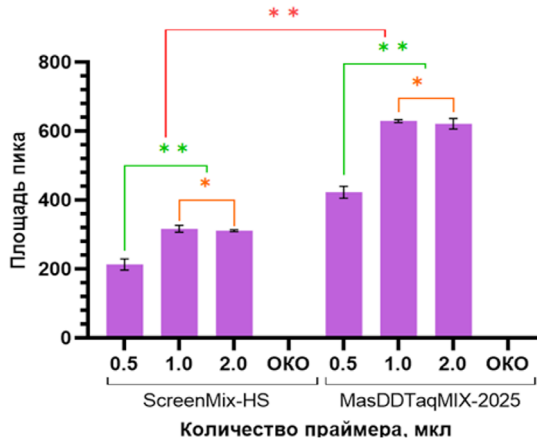


Рис. 4. Значения площади пика в зависимости от количества праймера и варианта мастер-микса при концентрации праймеров 10 пМ/мкл. Значения ошибок показывают стандартное отклонение в трех повторностях. ОКО-отрицательный контрольный образец. Статистические различия оценивали с помощью теста Крускала-Уоллиса с использованием теста множественных сравнений Данна (*Различий нет. **Различия при $p < 0,05$)

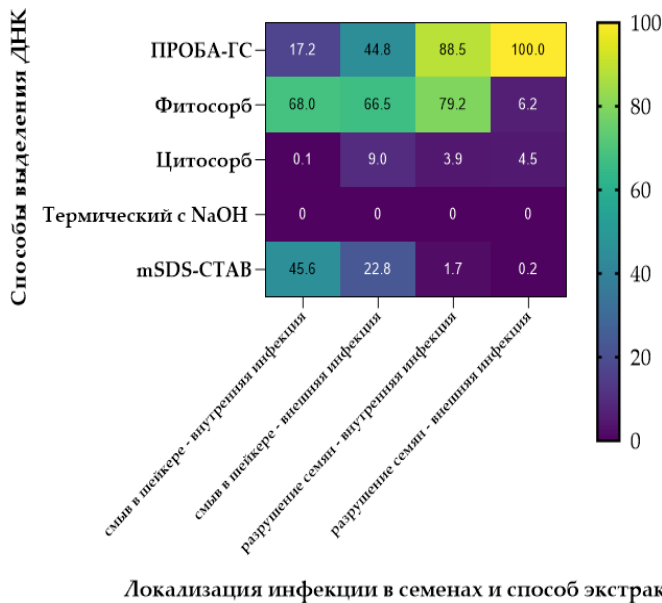


Рис. 5. Значения интенсивности сигнала (процент от максимального значения площади) в зависимости от метода выделения ДНК, локализации инфекции и способа экстракции (столбец справа показывает зависимость интенсивности сигнала от цвета)

Выводы

1. Показано, что использование тест-системы на основе ПЦР с олигонуклеотидами, специфичными на ген коронафакат-лигазы (*cfI*), позволяло диагностировать возбудителя бактериального ожога сои в семенах при концентрации 2×10^3 КОЕ/мл. Аналитическая чувствительность протокола составила 97,4% из 37 протестированных близкородственных и других фитопатогенных и эпифитных бактерий.

2. Максимальная площадь ампликона была достигнута при поверхностной локализации патогена на семенах как при поверхностной промывке, так и при разрушении семян, и составила 416,9 и 390,7 ед. соответственно. При внутреннем заражении площадь пика уменьшалась и составляла в среднем 245,0 и 85,5 ед.

3. Доказано, что при использовании двух мастер-миксов и пяти методов выделения ДНК площадь пика была максимальной (645,0 ед.) при выделении ДНК с помощью набора Проба-ГС и использовании в реакционной смеси мастер-микса 5x MasDDTaqMIX-2025. Оптимизированный протокол диагностики рекомендуется для использования в фитосанитарной экспертизе семян сои на наличие бактериального ожога.

Библиографический список

1. Посевные площади, валовые сборы и урожайность сельскохозяйственных культур в Российской Федерации в 2022 году: Бюллетень / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – [Электронный ресурс]. – URL: <https://mcx.gov.ru/> (дата обращения: 09.01.2024).

2. Bradley C.A., Allen T.W., Sisson A.J., Bergstrom G.C., Bissonnette K.M. et al. Soybean Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2015 to 2019 // *Plant Health Progress*. – 2021. – № 4. – Pp. 483–495.

3. Koening S.R., Wrather J.A. Suppression of soybean yield potential in the continental United States by plant diseases from 2006 to 2009 // *Plant Health Progress* – 2010. – № 11 (1). – P. 5.

4. Wrather J.A., Chambers A.Y., Fox J.A., Moore W.F., Sciombato G.L. Soybean disease loss estimates for the southern United States, 1974 to 1994 // *Plant Disease*. – 1995. – Vol. 79. – Pp. 1076–1079.

5. Ignjatov M., Milošević M., Nikolić Z., Vujaković M., Petrović D. Characterization of *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Glycinea* Isolates from Vojvodina // *Phytopathol. Pol.* – 2007. – Vol. 45. – Pp. 43–54.

6. Jagtap D. Bio-efficacy of different antibacterial antibiotic, plant extracts and bio-agents against bacterial blight of soybean caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* // *Scientific Journal of Microbiology*. – 2012. – № 1 (1). – Pp. 1–9.

7. Тараканов Р.И., Игнатов А.Н., Джалилов Ф.С. Выделение бактериофагов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* и их использование в защите сои от бактериального ожога // *Известия ТСХА*. – 2020. – № 4. – С. 43–53.

8. Масленникова В.С., Цветкова В.П., Бедарева Е.В., Круговых А.А. Эффективность обработки семян сои биопрепаратом в условиях Западной Сибири // *Аграрная наука-2022: Материалы Всероссийской конференции молодых исследователей, Москва, 22–24 ноября 2022 г.* – М.: Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2022. – С. 60–63.

9. Игнатьева И.М., Каримова Е.В. Изучение бактериозов возбудителей болезней зернобобовых культур и разработка методов их диагностики // *Современные подходы и методы в защите растений: Сборник материалов конференции, г. Екатеринбург, 12–14 ноября 2018 г.* – Екатеринбург, 2018. – С. 194–198.

10. Shepherd L.M., Block C.C. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in soybean seeds. In: M. Fatmi, R.R. Walcott And N.W. Schaad, eds. *Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material* 2nd ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, chap. 13. – 2017.

11. Ciampi-Guillard M., Ramiro J., Moraes M.H.D., Barbieri M.C.G., Massola Junior N.S. Multiplex qPCR assay for direct detection and quantification of *Colletotrichum*

truncatum, *Corynespora cassiicola*, and *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds // Plant Disease. – 2020. – Vol. 104, № 11. – Pp. 3002–3009.

12. Bereswill S., Bugert P., Völksch B., Ullrich M., Bender C.L., Geider K. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products // Appl Environ Microbiol. – 1994. – № 60 (8). – Pp. 2924–2930.

13. Tarakanov R., Shagdarova B., Varlamov V. Dzhililov, F. Biocidal and resistance-inducing effects of chitosan on phytopathogens // E3S Web Conf. – 2021. – № 254. – P. 05007.

14. Rooney W., Laird J., Chowdhury M., MacIntosh C., Deng X., McBride P., Milner J. *Pseudomonas Syringae* Seed Infections. – [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.protocols.io/view/pseudomonas-syringae-seed-infections-ewov18beygr2/v1> (дата обращения: 09.01.2024).

15. EPPO. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. OEPP/EPPO Bull. – 2011. – № 41.

16. Javan mard A., Khaledi K., Asadzadeh N., Solimanifarjam A.R. Detection of polymorphisms in the bovine leptin (LEP) gene: association of single nucleotide polymorphism with breeding value of milk traits in Iranian Holstein Cattle // Journal of Molecular Genetics. – 2010. – № 2. – Pp. 10–14.

17. Tsygankova S.V., Ignatov A.N., Boulygina E.S., Kuznetsov B.B., Korotkov E.V. Genetic intraspecies relationships in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* revealed by novel rep-PCR primers // European J. Plant Pathol. – 2004. – № 1 (10). – Pp. 845–853.

18. Rueden C.T., Schindelin J., Hiner M.C., DeZonia B.E., Walter A.E., Arena E.T., Eliceiri K.W. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data // BMC Bioinformatics. – 2017. – Vol. 29, № 18 (1). – P. 529.

DETECTION OF THE SOYBEAN BACTERIAL BLIGHT PATHOGEN *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *GLYCINEA* IN SEEDS BY THE PCR METHOD

R.I. TARAKANOV¹, I.M. IGNAT'eva², O.O. BELOSHAPKINA¹,
S.I. CHEBANENKO¹, O.G. KARATAEVA¹, F.S. DZHALILOV¹

(¹Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
²All-Russian Plant Quarantine Centre)

*This article describes the application of the classical PCR method for the diagnosis of the soybean bacterial blight pathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in seeds. Two methods for pathogen isolation from infected soybean seeds, five methods for DNA extraction and two master mixes for preparation of reaction mixture were investigated. The use of a PCR-based test system with oligonucleotides specific for the coronaphacate ligase (*cfl*) gene allowed the diagnosis of the soybean bacterial blight pathogen in seeds at a concentration of 2×10^3 CFU/ml. The analytical sensitivity of the protocol was 97.4% of 37 closely related and other bacteria tested. Product yield (amplicon peak area) was shown to be highest (645.0 units) when DNA was isolated using the Proba-GS kit, the master mix 5x MasDDDTaqMIX-2025 and the primers PsgFOR-1 and PsgREV-2 were used at 10 pM per reaction (25 μ L).*

*Keywords: soybean, soybean bacterial blight, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, phytosanitary seed diagnostics, PCR.*

References

1. Bulletin “Sown areas, gross yields and crop yields in the Russian Federation in 2022”. Ministry of Agriculture of the Russian Federation [Electronic source]. URL: <https://mcx.gov.ru/> (access date: 09.01.2024) (In Russ.)
2. Bradley C.A., Allen T.W., Sisson A.J., Bergstrom G.C., Bissonnette K.M. et.al. Soybean Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2015 to 2019. *Plant Health Progress*. 2021;4:483–495.
3. Koening S.R., Wrather J.A. Suppression of soybean yield potential in the continental United States by plant diseases from 2006 to 2009. *Plant Health Progress*. 2010;11(1):5.
4. Wrather J.A., Chambers A.Y., Fox J.A., Moore W.F., Sciombato G.L. Soybean disease loss estimates for the southern United States, 1974 to 1994. *Plant Disease*. 1995;79:1076–1079.
5. Ignjatov M., Milošević M., Nikolić Z., Vujaković M., Petrović D. Characterization of *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Glycinea* Isolates from Vojvodina. *Phytopathol. Pol*. 2007;45:43–54.
6. Jagtap D. Bio-efficacy of different antibacterial antibiotic, plant extracts and bio-agents against bacterial blight of soybean caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. *Scientific Journal of Microbiology*. 2012;1(1):1–9.
7. Tarakanov R.I., Ignatov A.N., Dzhililov F.S. Isolation of specific bacteriophages – *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* – and their use in soybean bacterial blight control. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2020;(4):43–53. (In Russ.) <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2020-4-43-53>
8. Maslennikova V.S., Cvetkova V.P., Bedareva E.V., Krugovoyh A.A. Efficiency of soybean seed treatment with biopreparation in Western Siberia. *Agrarnaya nauka – 2022: Proceedings of the All-Russian Conference of Young Researchers, Moscow, November 22–24, 2022*. Moscow, Russia: Russian State Agrarian University-Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, 2022:60–63. (In Russ.)
9. Ignat’eva I.M., Karimova E.V. Study of bacteriosis pathogens of grain legume crops and the development of methods for their diagnosis. *Sovremennye podkhody i metody v zashchite rasteniy: Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference With International Participation, Ekaterinburg, November 12–14, 2018*. Ekaterinburg, Russia: Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, 2018:194–198. (In Russ.)
10. Shepherd L.M., Block C.C. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in soybean seeds. In: M. Fatmi, R.R. Walcott and N.W. Schaad, eds. *Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material, 2nd ed.* St. Paul: The American Phytopathological Society, 2017.
11. Ciampi-Guillard M., Ramiro J., Moraes M.H.D., Barbieri M.C.G., Massola Junior N.S. Multiplex qPCR assay for direct detection and quantification of *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola*, and *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds. *Plant Disease*. 2020;104(11):3002–3009.
12. Bereswill S., Bugert P., Völksch B., Ullrich M., Bender C.L., Geider K. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(8):2924–2930.
13. Tarakanov R., Shagdarova B., Varlamov V. Dzhililov, F. Biocidal and resistance-inducing effects of chitosan on phytopathogens. *E3S Web Conf*. 2021;254:05007.

14. Rooney W., Laird J., Chowdhury M., MacIntosh C., Deng X., McBride P., Milner J. *Pseudomonas Syringae* Seed Infections [Electronic source]. URL: <https://www.protocols.io/view/pseudomonas-syringae-seed-infections-ewov18beygr2/v1> (access date: 09.01.2024)

15. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *EPPO Global Database*. 2011;41. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/CORBFL/datasheet>

16. Javan mard A., Khaledi K., Asadzadeh N., Solimanifarjam A.R. Detection of polymorphisms in the bovine leptin (LEP) gene: association of single nucleotide polymorphism with breeding value of milk traits in Iranian Holstein Cattle. *Journal of Molecular Genetics*. 2010;2:10–14.

17. Tsygankova S.V., Ignatov A.N., Boulygina E.S., Kuznetsov B.B., Korotkov E.V. Genetic intraspecies relationships in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* revealed by novel rep-PCR primers. *European J. Plant Pathol.* 2004;1(10):845–853.

18. Rueden C.T., Schindelin J., Hiner M.C., DeZonia B.E., Walter A.E., Arena E.T., Eliceiri K.W. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18:529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>

Сведения об авторах

Тараканов Рашит Ислямович, аспирант кафедры защиты растений, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 49; e-mail: tarakanov.rashit@mail.ru

Игнатьева Ирина Михайловна, научный сотрудник, заведующий лабораторией бактериологии и анализа ГМО, ИЛЦ ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», 140150, Российская Федерация, Московская область, г.о Раменский, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32; e-mail: babiraignirmi@yandex.ru

Белешапкина Ольга Олеговна, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, профессор кафедры защиты растений, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 49; e-mail: beloshapkina@rgau-msha.ru

Чебаненко Светлана Ивановна, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, доцент кафедры защиты растений, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 49; e-mail: svchebanenko@rgau-msha.ru

Каратаева Оксана Григорьевна, кандидат экономических наук, доцент, доцент педагогики и психологии профессионального образования, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 49; e-mail: okarataeva@rgau-msha.ru

Джалилов Февзи Сеид-Умерович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой защиты растений, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевская ул., 49; e-mail: dzhalilov@rgau-msha.ru

About the authors

Rashit I. Tarakanov, assistant at the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: r.tarakanov@rgau-msha.ru)

Irina M. Ignat'eva, Research Associate, Bacteriology Laboratory, All-Russian Plant Quarantine Centre (32 Pogranichnaya St., Bykovo Vlg., Ramenskiy Urban District, Moscow Region, 140150, Russian Federation; e-mail: babiraigirmi@yandex.ru)

Olga O. Beloshapkina, DSc (Agr), Professor, Professor at the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: beloshapkina@rgau-msha.ru)

Svetlana I. Chebanenko, CSc (Agr), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: svchebanenko@rgau-msha.ru)

Oksana G. Karatayeva, CSc (Econ), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Pedagogy and Psychology of Professional Education, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: okarataeva@rgau-msha.ru)

Fevzi S.-U. Dzhililov, DSc (Bio), Professor, Head of the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: dzhililov@rgau-msha.ru)