

## ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ ЦВЕТНОЙ КАПУСТЫ *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al

С.И. Приходько, А.Б. Яремко, К.П. Корнев, кандидат биологических наук

Всероссийский центр карантина растений,  
140150, Московская обл., Раменский район, р.п. Быково, ул. Пограничная, 32  
Email: svetlana.prik@yandex.ru

Исследования проводили с целью оценки применимости и апробации ПЦР-теста в соответствии с Inoue & Takikawa (2021) в диагностике *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. Тест был оптимизирован для использования в формате «реального времени». Для этого в реакционную смесь добавляли краситель SYBR Green I с длиной волны испускания флуоресценции 520 нм. Оценка применимости теста в режиме «реального времени» показала достаточную аналитическую чувствительность, которая составляла  $10^3 \dots 10^4$  КОЕ/мл, что соответствует низкой и средней степени зараженности. Определение аналитической специфичности показало ложноположительный результат с *P. syringae* pv. *tomato*. Имеются также данные *in silico* по 100 %-ному совпадению с *P. syringae* pv. *avii*, pv. *persicae*, pv. *spinaciae*. Полученные данные указывают на возможность использования теста для прямой диагностики фитопатогена из растительного экстракта. Апробацию методики проводили на образцах рапса из Тульской, Липецкой областей и Забайкальского края. Генетический материал *Psm* был обнаружен в одном образце рапса из Тульской области.

## APPLICATION OF MOLECULAR METHODS IN THE DIAGNOSIS OF THE PATHOGEN OF THE BACTERIAL LEAF SPOT OF CABBAGE *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al

Prikhodko S. I., Yaremko A.B., Kornev K.P.

All-Russian Plant Quarantine Center (VNIKR),  
140150, Moskovskaya obl., Ramenskii raion, r.p. Bykovo, ul. Pogranichnaya, 32  
E-mail: svetlana.prik@yandex.ru

**Abstract.** The studies were performed to evaluate the applicability and validation of the PCR test according to Inoue & Takikawa (2021) in the diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. (*Psm*). The test was optimized for real-time application. For this purpose, the intercalating dye SYBR Green I with a fluorescence emission wavelength of 520 nm was added to the reaction mixture. Method performance criteria were determined according to EPPO standard PM 7/098 (4). The evaluation of the applicability of the test in real-time mode showed sufficient analytical sensitivity, which was 103-104 CFU/ml. Determination of analytical specificity showed false positive results with *P. syringae* pv. *tomato*. There is also *in silico* data on 100% match with *P. syringae* pv. *avii*, pv. *persicae*, pv. *spinaciae*. These pathovars affect other crop species; there is also no information on their distribution in Russia; therefore, they were not considered in these studies. Determination of selectivity showed the effect of the matrix on the sensitivity of the test. Thus, the detection threshold decreased from 103 to 104 CFU/ml when studying extracts of vegetative parts of rapeseed as compared to seeds. The repeatability and reproducibility of the test was 100% when the concentration of the target object in the matrix was 104 CFU/ml. The obtained values of the test efficiency criteria indicate the possibility of using PCR according to Inoue & Takikawa (2021) for direct diagnosis of the phytopathogen from the plant extract of seeds and vegetative parts of *Psm* host plants. The method was tested on rapeseed samples from Tula, Lipetsk region, and the Zabaykalsky Krai. *Psm* genetic material was found in one rape sample from the Tula region.

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция (ПЦР), *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, бактериоз, крестоцветные культуры, обследование, валидация.

**Key words:** PCR, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, bacteriosis, cruciferous crops, monitoring, validation.

*Pseudomonas syringae* – повсеместно распространенный патоген. Первоначально этот вид был выделен из растений с симптомами бактериоза. Изучение особенностей распространения, механизмов заражения и филогении псевдомонад привело к тому, что на сегодняшний день идентифицировано несколько десятков патоваров вида *P. syringae*, поражающих почти все экономически важные виды сельскохозяйственных культур [1].

Несмотря на то, что вид изначально идентифицирован как патоген, было установлено, что многие изоляты, которые филогенетически принадлежат к этому виду, не патогенны и существуют на растениях как комменсалы. Это в значительной степени затрудняет диагностику возбудителя из-за близкого генетического родства патоваров и их высокого фенотипического сходства [2, 3, 4].

Возбудитель бактериальной пятнистости цветной капусты относится к виду-полифагу *Pseudomonas syringae*

обозначается как патовар *maculicola*. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, описанный в 1911 г., поражает крестоцветные культуры, в том числе рапс [5].

Рапс представляет собой одну из важнейших сельскохозяйственных культур, используемых в масложировой промышленности, а также для производства дополнительного кормового белка [6]. Посевные площади рапса в Российской Федерации в 2020 г., по данным Росстата, составили 1488,2 тыс. га из них яровой рапс (кольза) занимал 1180,9 тыс. га, озимый – 307,3 тыс. га. Наибольшая часть посевов этой культуры расположена в Сибирском ФО (567,9 тыс. га на 2020 г). Выращивание рапса на экспорт сегодня крайне выгодно в связи со значительными увеличением спроса на мировом рынке. Из рапса производят масло, а шрот используют на корм сельскохозяйственным животным. Кроме того, рост спроса на рапс связан с расширением производства

биодизеля [7]. Согласно данным Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, для увеличения производства рапса на экспорт с 2021 г. введены меры государственной поддержки для предприятий и индивидуальных предпринимателей, выращивающих эту культуру, а также для предприятий, осуществляющих его дальнейшую переработку.

По сведениям, предоставляемым Федеральной таможенной службой РФ, экспорт семян рапса по коду ТН ВЭД 1205 в 2020 г. составил 714,7 тыс. т наибольшая его часть приходилась на Китай (347,5 тыс. т), Беларусь (185,7 тыс. т), Казахстан (45,2 тыс. т), Монголию (38,5 тыс. т), Германию (12,1 тыс. т) и другие страны (85,7 тыс. т).

Сельскохозяйственная продукция, производимая на экспорт должна соответствовать фитосанитарным требованиям страны-торгового партнера. Так, на сайте Россельхознадзора опубликованы фитосанитарные требования КНР, согласно которым российской сторона должна проводить мониторинг вредных организмов карантинного значения для КНР в местах производства экспортных культур, в том числе рапса, руководствуясь соответствующими стандартами МККЗР. В части бактериологии в этой стране регламентировано отсутствие *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* [8].

На сегодняшний день не существует единой международной методики выявления и идентификации возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты, которую можно было бы применять при проведении мониторинга в местах производства экспортного рапса на территории Российской Федерации. Кроме того, согласно стандарту ИСО/ИЕС 17025-2019 аккредитованная лаборатория должна использовать только те методы, которые прошли валидацию (признаны надежными и достоверными). В сфере диагностики вредных организмов растений тест должен быть подходящим для проведения рутинной диагностики. В зарубежной практике для выявления и идентификации возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты принят комплексный подход, предусматривающий сочетание культурально-морфологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследований [9, 10, 11].

В 2021 г. японские ученые Inoue Y. и Takikawa Y. разработали ПЦР тест с использованием специфичной последовательности заменяемых эффекторных локусов, фланкирующих кластер *hrp* генов. Прямые праймеры, общие для обеих бактерий (*hrpK\_fw1* и *hrpK\_fw2*), были подобраны к последовательности гена *hrpK*, расположенного на конце кластера *hrp*. *Psm*-специфичные праймеры (*MAC\_rv1* и *MAC\_rv2*) ориентированы на последовательность гена *hopPtoB1 Psm* [11].

Цель наших исследований – оценка применимости и апробация ПЦР-теста в соответствии с Inoue & Takikawa (2021) при диагностике *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*.

**Методика.** Объект исследований – возбудитель бактериальной пятнистости цветной капусты *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. (далее *Psm*). Типовой штамм бактерии получен из Международного центра микробиологических ресурсов – Французской коллекции бактерий, ассоциированных с растениями (Ситм-СФБР). Исследования проводили в 2021 г. на базе ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ВНИИКР).

При подготовке проб вегетативных органов от растений рапса отделили фрагменты размером 1×1 см и помещали в контейнер для сбора биологического материала. Затем заливали буфером фосфатно-солевым

(PBS) так, чтобы лабораторная проба была полностью покрыта (примерно 20...30 мл). Далее ее мацерировали на орбитальном шейкере в режиме 200 об/мин в течение 1 ч. Мацерат фильтровали через бумажный обеззоленный фильтр в центрифужную пробирку. При подготовке проб семян навеску массой 10 г помещали в пакеты или контейнеры для биологических материалов и заливали 20 мл буфера PBS. Далее семена выдерживали в течение 16...18 ч при 4...8 °С, затем проводили мацерацию при 200 об/мин в течение 30...60 мин. Мацерат фильтровали в центрифужную пробирку через бумажный фильтр.

Фильтрат концентрировали в центрифуге в режиме 10000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4...10 °С. Супернатант сливали в резервуар с дезинфицирующим раствором, а осадок ресуспендировали в 1 мл буфера PBS и переносили в чистые микропробирки объемом 1,5...2,0 мл.

ДНК чистых культур бактерий получали путем нагревания водной суспензии при 96 °С в течение 10 мин. Тотальную ДНК из искусственно инокулированных растительных и семенных экстрактов выделяли при помощи комплектов реагентов «Проба-ГС» (ООО «Агродиагностика») и «ФитоСорб-Автомат-48» (ЗАО «Синтол») на автоматической станции выделения нуклеиновых кислот Tecan Freedom EVO (Tecan, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителей.

В ходе исследований, которые выполняли согласно методике Inoue & Takikawa [11], были проведены испытания следующих олигонуклеотидов:

прямой праймер – *hrpK\_fw1*  
GTCTGGGCGGACAGATGAT;  
обратный праймер – *MAC\_rv1*  
CGCCTTCTGGTGTGCTTTAC.

Аmplификацию проводили в оптимизированном режиме с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I, производства фирмы ООО «Евроген» (табл. 1). Возможно также использование других коммерческих смесей с этим красителем.

**Табл. 1. Состав реакционной смеси и условия амплификации**

Состав реакционной смеси		
компонент	объем, мкл	рабочая концентрация
Ультрачистая вода	16,0	–
5x qPCRmix-HS SYBR	5,0	1x
Прямой праймер <i>hrpK_fw1</i>	1,0	10 пкм/мкл
Обратный праймер <i>MAC_rv1</i>	1,0	10 пкм/мкл
ДНК	2,0	–
Объем реакции	25,0	–
Условия амплификации		
температура, °С	время	число циклов
95	10 мин	1
95	30 с	35
60	25 с	
72	30 с	

Согласно стандарту ЕОКЗР РМ 7/98 (4) определяли следующие критерии эффективности: аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность, повторяемость, воспроизводимость и селективность.

Для определения аналитической чувствительности готовили 5 серий (повторностей) экстрактов из вегетативных частей и семян рапса и проводили их инокуляцию целевым организмом в концентрациях 10<sup>8</sup>... 10<sup>2</sup> КОЕ/мл. Затем определяли средние значения по-

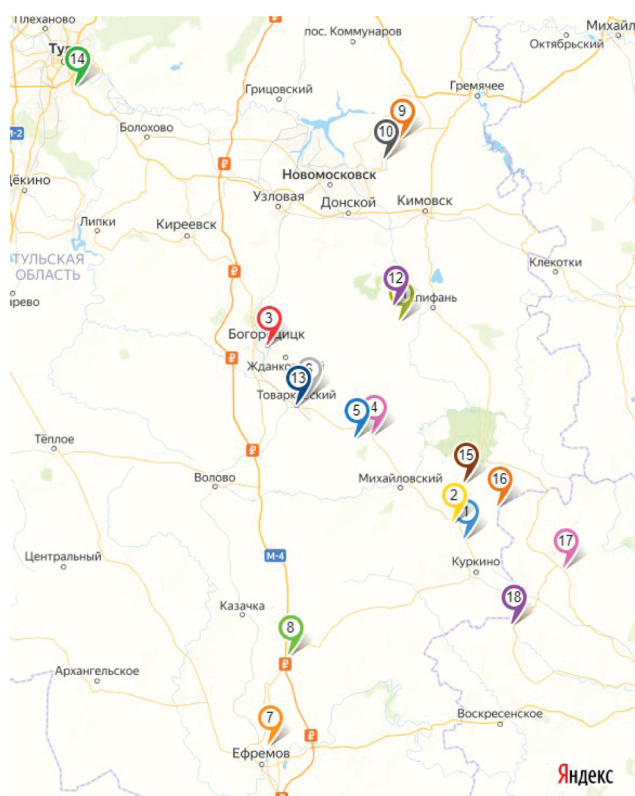


Рис. 1. Районы отбора образцов растений рапса при проведении научных обследований.

роговых циклов ( $St_{cp}$ ). С целью сравнения результатов определения чувствительности, была также проведена ПЦР с праймерами *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* в классическом варианте с последующей постановкой гелеэлектрофореза в 1,5 %-ном трисборатном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Состав ПЦР-смеси был аналогичным, только вместо 5x qPCRMix-HS SYBR использовали 5x ScreenMix-HS (ООО «Евроген»).

Аналитическую специфичность определяли путем тестирования 34 близкородственных штаммов бактерий рода *Pseudomonas* из бактериологической коллекции ФГБУ «ВНИИКР». Дополнительно обратный, специфичный для *Psm* праймер *MAC\_rv1*, был проверен *in silico* через базу Национального центра биотехнологической информации NCBI с помощью инструмента Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Повторяемость теста ПЦР определяли путем исследования серии 10-кратных разведений искусственно зараженных экстрактов в 6-кратной повторности на уровне пороговых концентраций фитопатогена, установленных в ходе определения чувствительности, одним человеком и на одном приборе, в одинаковых условиях и за короткий период времени.

Для определения воспроизводимости готовили искусственно инокулированные экстракты с низким и средним уровнем зараженности в 6 кратной повторности по методике, аналогичной определению аналитической чувствительности. При этом тестирование серий проводили 2 оператора на различном оборудовании (ДТ-прайм, «ДНК-Технология»; CFX96 Touch, «BioRad») и в разное время.

Для оценки селективности тестов использовали экстракты из семян таких крестоцветных культур, как рапс, китайская капуста, цветная капуста, брокколи, брюссельская капуста, редька масличная, которые наи-

более восприимчивы к *Psm* и относятся к экономически значимым сельскохозяйственным культурам. Селективность определяли путем исследования искусственно зараженных экстрактов в 3-кратной повторности на уровне пороговой концентраций фитопатогена  $10^3$  КОЕ/мл.

Для контроля за ингибированием использовали внутренний положительный контроль (ВПК) производства ООО «Синтол».

Апробацию оптимизированного ПЦР-теста проводили на образцах рапса, полученных в рамках научно-исследовательского сбора материала и в ходе мониторинга, выполняемого в рамках государственного задания по контролю за распространением на территории РФ вредных организмов, имеющих карантинное значение для КНР.

В рамках исследовательского сбора материала на территории Тульской и Липецкой областей (рис. 1) было отобрано и проанализировано 55 образцов рапса.

В ходе мониторинга предприятий АПК в Забайкальском крае проанализировано 100 образцов вегетативных частей рапса. Обследования проводили в июле–августе 2021 г. При отборе образцов особое внимание уделяли симптомам бактериальных инфекций.

**Результаты и обсуждение.** Определение аналитической чувствительности ПЦР с праймерами *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* и интеркалирующим красителем SYBR Green I в зависимости от использованного метода выделения ДНК из двух матриц (семена и вегетативные части) показало, что при тестировании искусственно инокулированных экстрактов из вегетативных частей она составляет  $10^4$  КОЕ/мл независимо от метода выделения ДНК (табл.2). При тестировании искусственно инокулированных экстрактов из семян с использованием ДНК комплекта реагентов «Проба-ГС» аналитическая чувствительность ПЦР была равна  $10^3$  КОЕ/мл, «Фито-Сорб-Автомат-48» –  $10^4$  КОЕ/мл. При такой аналитической чувствительности ПЦР с праймерами *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* и интеркалирующим красителем SYBR Green I может быть использован для анализа бессимптомного растительного и семенного материала. В то же время тест обладает селективностью. Его чувствительность при использовании экстракта из семян рапса была на порядок выше, чем в варианте с экстрактом из его вегетативных частей.

Следует отметить, что аналитическая чувствительность теста зависит как от метода выделения ДНК, так и от матрицы. Вещества, оказывающие ингибирующее воздействие на компоненты ПЦР-смеси, влияют на

Табл. 2. Определение чувствительности ПЦР с праймерами *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* и интеркалирующим красителем SYBR Green I в растительных экстрактах,  $St_{cp}$ .

Концентрация <i>Psm</i> , КОЕ/мл	Метод выделения			
	«Проба-ГС»		«ФитоСорб-автомат-48»	
	экстракт из семян	экстракт из вегетативных частей	экстракт из семян	экстракт из вегетативных частей
$10^8$	16,4	16,5	18,6	18,5
$10^7$	19,9	19,6	22,1	21,7
$10^6$	23,5	23,4	25,8	25,2
$10^5$	27,4	26,9	29,7	28,3
$10^4$	30,8	30,3	31,9	32,3
$10^3$	33,7	–	–	–
<b>К-выделения</b>	–	–	–	–
<b>К-чистая зона</b>	–	–	–	–

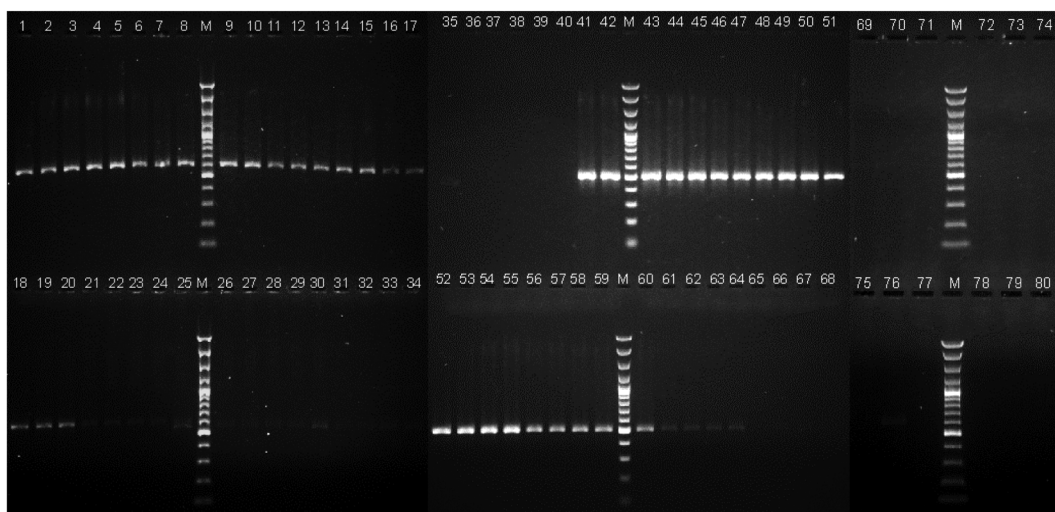


Рис. 2. Определение чувствительности ПЦР с праймерами *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* с детекцией результатов методом гелелектрофореза: дорожки №1-35 – концентрация целевого объекта в экстракте вегетативных частей рапса  $10^8 \dots 10^2$  КОЕ/мл в 5-кратной повторности; дорожки № 36-39 – отрицательные контроли; дорожки № 40-74 – концентрация целевого объекта в экстракте из семян рапса  $10^8 \dots 10^2$  КОЕ/мл в 5-кратной повторности; дорожки №75-80 – отрицательные контроли, М – маркер молекулярного веса.

эффективность амплификации ДНК-мишени, взаимодействуя с матрицей ДНК, вмешиваясь в активность ДНК-полимеразы или снижая эффективность ферментативных кофакторов ( $Mg^{2+}$ ). Процедуры экстракции ДНК должны исключить или значительно уменьшить количество веществ, ингибирующих ПЦР. Однако конечное количество ингибиторов в образце сильно зависит от природы образца и процедуры экстракции. Растительный материал может содержать такие вторичные метаболиты, как полифенолы, масла и полисахариды, которые могут образовывать комплексы с нитями ДНК. Кроме того, ингибиторы могут быть добавлены во время процедуры выделения ДНК: соли  $KCl$  и  $NaCl$ , ионные детергенты, этанол, изопропанол и фенол и др. [12]. Таким образом, использование набора для выделения ДНК «Проба-ГС» позволяет в большей степени удалять ингибиторы и повысить чувствительность теста на порядок.

Согласно результатам ПЦР в соответствии с Inoue & Takikawa (2021) в классическом варианте с детекцией результатов методом электрофореза специфичные хорошо визуализированные фрагменты с молекулярным весом 591 п.о. отмечены во всех образцах растительного экстракта с концентрациями целевого объекта  $10^8 \dots 10^2$  КОЕ/мл (дорожки с №1 по 20). Слаборазличимые фрагменты отмечены в образцах растительного экстракта, инокулированного *Psm* в концентрации  $10^4 \dots 10^2$  КОЕ/мл (дорожки № 21...35). Причем в образцах с самой низкой величиной этого показателя ПЦР-продукт практически не различим (рис. 2). Таким образом, чувствительность ПЦР-теста без использования интеркалирующего красителя составила  $10^4$  КОЕ/мл, что в экстрактах из семян рапса на порядок ниже, чем при проведении анализа в режиме «реального времени».

Следует отметить, что использование интеркалирующих красителей дает возможность проводить ПЦР «в реальном времени» довольно несложным и относительно дешевым способом [13]. Предлагаемая модификация позволяет выполнять такой тест в лабораториях, не оборудованных зоной электрофореза, и получать результаты в значительно более короткие сроки, нежели при дополнительной постановке гелелектрофореза.

Определение влияния экстрактов, полученных из семян различных видов крестоцветных растений, на результат лабораторного тестирования (табл. 3) показало, что при низкой концентрации ( $10^3$  КОЕ/мл) целевого объекта оно практически отсутствует. Тестирование экстрактов позволило выявить фитопатоген на уровне аналитической чувствительности.

Табл. 3. Определение селективности ПЦР с праймерами *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* и интеркалирующим красителем SYBR Green I,  $Ct_{cp}$ .

Матрица	Результат определения целевого объекта ( $Psm$ )	Результат внутреннего положительного контроля
Яровой рапс сорт Лунеди	33,5	34,5
Китайская капуста сорт Краса Востока	32,4	35,8
Цветная капуста сорт Сноуболл 123	32,5	36,5
Брокколи сорт Фортуна	32,2	32,4
Брюссельская капуста сорт Геркулес	32,6	33,6
Редька масличная	32,7	34,5
К-выделения	–	33,8
К-чистая зона	–	33,6

При определении аналитической специфичности выявлена неспецифическая реакция с *P. syringae* pv. *tomato* (рис. 3), которая определяется более пологой кривой (Б), в отличие от положительного контроля (А).

В результате проверки праймеров *in silico* через базу NCBI было установлено 100 %-ное совпадение нуклеотидной последовательности праймера с имеющимися в базе последовательностями бактерий *P. syringae* pv. *tomato* и *P. syringae* pv. *spinaciae*. Диапазоны хозяев *P. s.* pv. *tomato* и *P. s.* pv. *maculicola* перекрываются, ранее также предлагалось объединить эти два патовара [14]. Результаты французских исследователей показали наличие двух популяций *P. s.* pv. *tomato*, образованных разными генетическими линиями. Одна из них не пато-

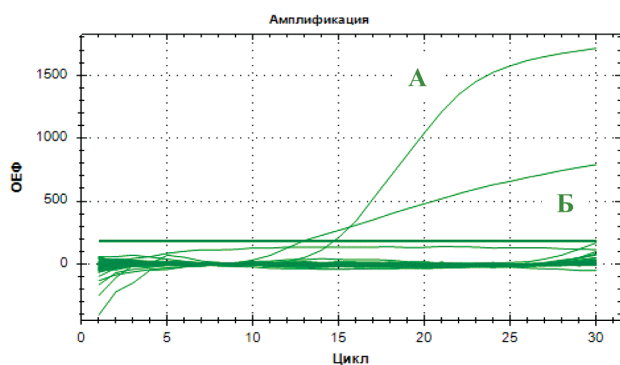


Рис. 3. Определение специфичности ПЦР с праймерами *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* и интеркалирующим красителем *SYBR Green I*: А – положительный контроль, Б – *P. syringae pv. tomato*.

гена для *Brassicaceae*, а вторая патогенна как для томатов, так и для растений семейства *Brassicaceae*, что характерно и для *P. s. pv. maculicola* [3].

Согласно данным разработчика теста, при оценке специфичности были проанализированы 76 штаммов фитопатогенных бактерий. При этом инклюзивности оценивали на 13 штаммах *Psm* и 30 штаммах других патогенов *Pseudomonas syringae*. Остальные 33 штамма использовали для оценки эксклюзивности. В ходе тестирования были выявлены кросс-реакции с *P. syringae pv. tomato* и *P. syringae pv. spinaciae*. Кроме того, авторы уточняют,

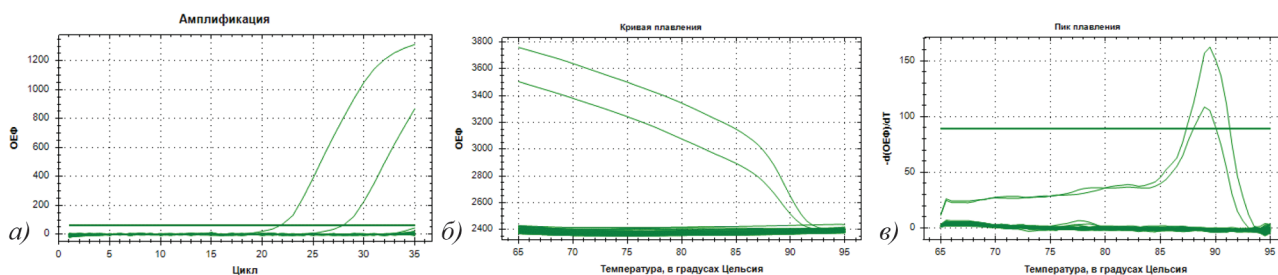


Рис. 4. Результаты тестирования образцов рапса из Тульской и Липецкой областей: А) график накопления флуоресценции во время амплификации; Б) график кривых плавления ПЦР-продуктов; В) график пиков плавления.

что праймеры *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* не позволяют отличить патогены *tomato* и *spinaciae* от *Psm*. Прямой праймер *hrpK\_fw1* подобран к последовательности *hrpK Pca*. При подборе обратного специфичного для *Psm* праймера выявлена гомология участка гена *hrpK* за пределами области *hopPto B1* патогена *spinaciae* с патогенами *avii* и *persicae*, возбудителями болезней косточковых плодовых культур. В связи с этим возможна также амплификация специфичных фрагментов с ДНК патогенов *avii* и *persicae* [11]. Поскольку сведения о распространении патогенов *avii*, *persicae*, *spinaciae* на территории Российской Федерации и о возможности обнаружения их на растениях-хозяевах объекта исследований отсутствуют, эти патогены при определении специфичности не учитывали.

При определении повторяемости ПЦР с праймерами *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* и интеркалирующим красителем *SYBR Green I* было установлено, что при концентрации целевого объекта  $10^4$  КОЕ/мл она составляет 100 %, при концентрации  $10^3$  КОЕ/мл – 73 %. Результаты тестов, выполненных разными операторами на разном оборудовании и в разные сроки, оказались полностью идентичными, их воспроизводимость при концентрации целевого объекта в матрице  $10^4$  КОЕ/мл составила 100 %, при концентрации  $10^3$  КОЕ/мл – 83 %.

При проведении апробации метода ПЦР с праймерами *hrpK\_fw1/MAC\_rv1* и интеркалирующим красителем *SYBR Green I* в Тульской и Липецкой области отмечен положительный результат ( $C_t=27,8$ ) в одном образце. Анализ графиков кривых амплификации ПЦР-РВ, полученных в ходе исследования образцов рапса, собранных в Тульской и Липецкой областях (рис. 4) свидетельствует, что накопление флуоресценции и температуры плавления происходило аналогично положительному контролю. Более низкий пик плавления может быть связан с меньшей концентрацией мишени.

В образцах из Забайкалья положительных реакций не выявлено.

Таким образом, на базе ФГБУ «ВНИИКР» валидирован метод ПЦР с праймерами, подобранными к участку гена системы патогенности *hrp* (по Inoue Y. & Takikawa Y., 2021), и интеркалирующим красителем *SYBR Green I*, который позволяет проводить исследования в формате «реального времени». Определенные критерии эффективности показали возможность использования теста в качестве отборочного для выявления ДНК возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты в растительном экстракте без предварительного высева на питательную среду, что снижает время лабораторных исследований. Порог чувствительности теста при выделении ДНК набором реагентов «Проба-ГС» (ООО «Агродиагностика») из экстракта вегетативных частей рапса – концентрация бактерии  $10^4$  КОЕ/мл (100 %), из экстракта семян рапса –  $10^3$  КОЕ/мл (100 %). Влияния матрицы, полученной из семян других крестоцветных

культур, на результаты исследования образцов с низкой концентрацией целевого объекта не выявлено. Воспроизводимость и повторяемость при концентрации целевого объекта в матрице  $10^4$  КОЕ/мл составила 100 %,  $10^3$  КОЕ/мл – 83 % и 73 % соответственно. Тем не менее, при проведении лабораторной диагностики следует учитывать отсутствие дополнительных молекулярно-генетических тестов и наличие кросс-реакций с патогеном *tomato*.

Апробация методики в ходе научных обследований посевов рапса в Тульской и Липецкой областях, а также результаты мониторинга предприятий АПК в Забайкальском крае свидетельствуют о том, что она позволяет выявлять генетический материал возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты. При этом неспецифических реакций, требующих дополнительных исследований, не обнаружено.

### Литература

1. Xin X. F., Kvitko B., He S. Y. *Pseudomonas syringae: what it takes to be a pathogen // Nature Reviews Microbiology*. 2018. Vol. 16. No. 5. P. 316–328.
2. *Genetic Diversity in Pseudomonas syringae pv. maculicola Strains / C. Alvarez-Mejia, G. Hernández-Guzmán, V. López-Ramírez, et al. // Journal of Pure*

- and Applied Microbiology. 2018. No. 3 (12). P. 1233–1238.
3. Gironde S., Manceau C. Housekeeping gene sequencing and multilocus variable-number tandem-repeat analysis to identify subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* that correlate with host specificity // *Applied and environmental microbiology*. 2012. Vol. 78. No. 9. P. 3266–3279.
  4. Fujikawa T., Takikawa Y., Inoue Y. Complete and Draft Genome Sequences of the Cruciferous Pathogens *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* // *Microbiology Resource Announcements*. 2021. Vol. 10 (17). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8086205/> (дата обращения: 18.10.2021). doi: 10.1128/MRA.00149-21.
  5. Detection of plant-pathogenic bacteria in seed / M. Fatmi, R.R. Walcott, N.W. Schaad, et al. // St. Paul, Minnesota: APS-Press, 2017. 360 p.
  6. Малахов А. В., Хорунжин М. Г. Экономические предпосылки производства рапса в России и Алтайском крае // *Аграрная наука-сельскому хозяйству»: сборник материалов XIII Международной научно-практической конференции*. Барнаул: Алтайский государственный аграрный университет, 2018. № 2. С. 165–167.
  7. Олейникова Е. Н., Янова М.А., Пыжикова Н.И. и др. Яровой рапс – перспективная культура для развития агропромышленного комплекса Красноярского края // *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2019. № 1 (142). С. 74–80.
  8. Приходько С. И., Яремко А. Б., Корнев К. П. Характеристика и распространение возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al // *Фитосанитария. Карантин растений*. 2020. № 3. С. 24–32.
  9. Ilicic R., Balaz J., Stojsin V., Bagi F., Pivic R., Stanojkovic-Sebic A., Josic D. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pvs. from different host plants by repetitive sequence-based PCR and multiplex-PCR // *Zemdirbyste-Agriculture*. 2016. No. 2 (103). P. 199–206.
  10. Takikawa Y., Takahashi F. Bacterial leaf spot and blight of crucifer plants (Brassicaceae) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *alisalensis* // *J. Gen. Plant Pathol.* 2014. No. 80. P. 466–474.
  11. Inoue Y., Takikawa Y. Primers for specific detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *alisalensis* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021. No. 4 (105). P. 1575–1584.
  12. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods / L. Hougs, F. Gatto, O. Goerlich, et al. // *Testing and Analysis of GMO-containing Foods and Feed* // Boca Raton: CRC Press, 2019. P. 245–266.
  13. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / С. М. Бикбулатова, Д. А. Чемерис, Ю. М. Никоноров и др. // *Вестник Башкирского университета*. 2012. Т. 17(1). С. 59–67.
  14. Takikawa Y. Synonymy of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* // *Plant Pathogenic Bacteria; Proc. 8th Int. Conf. Plant Path. Bact. Versailles: INRA*, 1994. P. 199–204.

Поступила в редакцию 30.11.2021  
 После доработки 29.12.2021  
 Принята к публикации 28.01.2022