

Оригинальные статьи / Original articles

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-3-110-115>
 УДК632.35:635.5:631.589.2

С. Тешич,
 Е.Н. Пакина,
 А.Н. Игнатов

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО РУДН) 117198, Россия, ЮЗАО, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Благодарности: Авторы выражают признательность В.Д. Красилникову за предоставленный материал.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: С. Тешич и А.Н. Игнатов провели исследование, получили и проанализировали полученные результаты. Е.Н. Пакина предоставила материалы для исследования и оказывала консультационную помощь. Все авторы в равной доле участвовали в написании статьи, рассмотрели и одобрили это заключение.

Для цитирования: Тешич С., Пакина Е.Н., Игнатов А.Н. Идентификация *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 в гидропонном производстве салата. *Овощи России*. 2021;(3):110-115.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-3-110-115>

Поступила в редакцию: 11.05.2021
Принята к печати: 01.06.2021
Опубликована: 25.06.2021

Svjetlana Testic,
 Elena N. Pakina,
 Aleksandr N. Ignatov

People's Friendship University of Russia (RUDN University)
 Miklukho-Maklaya Str. 6, Moscow, Russia,
 117198

Acknowledgment. The authors are deeply grateful to V.D. Krasilnikov for provided materials.

Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Authors' Contribution: Svjetlana Testic, and Aleksandr N. Ignatov performed the research, did the data management and analyzed the data. Elena N. Pakina provided material for the study and consulting assistance. All authors contributed equally to the writing of the article. All authors reviewed and approved this submission.

For citations: Testic S., Pakina E.N., Ignatov A.N. Identification of *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 in hydroponic culture of lettuce in Russia. *Vegetable crops of Russia*. 2021;(3):110-115. (In Russ.)
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-3-110-115>

Received: 11.05.2021
Accepted for publication: 01.06.2021
Accepted: 25.06.2021

Идентификация *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 в гидропонном производстве салата



Резюме

Актуальность. Салат посевной, латук посевной или салат латук (лат. *Lactuca sativa*) – вид однолетних травянистых растений рода Латук семейства Астровые (Asteraceae). В качестве овощной культуры возделывается повсеместно в мире, особое развитие в последние годы получило выращивание салата в защищенном грунте при гидропонной технологии выращивания. Одним из распространенных патогенов салата является *Pseudomonas cichorii* – возбудитель бактериозов нескольких важных культурных растений. В связи с этим, изучение встречаемости этого патогена является актуальным.

Материал и методика. Исследование проводили на базе департамента Агробиотехнологии АТИ РУДН. Образцы были предоставлены коммерческой компанией – производителем салата, выращиваемого на проточной гидропонной линии в условиях минимального заражения микроорганизмами. Изучение фитопатогенных бактерий включает ряд этапов: выделение бактерий на полу-селективные питательные среды и получение чистой культуры бактерий; постановка теста на патогенность (вирулентность); изучение фенотипических свойств бактерий; определение таксономического положения выделенных штаммов молекулярными методами. Все исследования проводили с соответствии со стандартными методиками идентификации фитопатогенных бактерий.

Результаты. В результате работы получено подтверждение распространения вида *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 в гидропонной культуре салата в РФ. Хотя, согласно базе данных ЕОКЗР, *P. cichorii* был впервые описан в России в 1965 году на основании микробиологических методов идентификации, выделенные изоляты бактерий недоступны в коллекциях для подтверждения данного вывода современными диагностическими методами. Двенадцать изолятов *P. cichorii* были изучены по комплексу биохимических признаков и четыре изолята (01, 04, 06 и 12), показавшие наибольшую агрессивность при проведении инокуляции растений-хозяев и табака, были использованы для секвенирования ДНК фрагмента гена *16S rPHK*. Полученные фрагменты ДНК показали высокое сходство (99-100%) с последовательностями *P. cichorii* из Генбанка. Оценка вирулентности выделенных изолятов на ряде культурных растений, и однородность их биохимических признаков показали, что они представляют группу бактерий, специализированных на салате.

Ключевые слова: салат, бактериоз, гидропоника, ПЦР

Identification of *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928 in hydroponic lettuce production

Abstract

Relevance. Lettuce (Latin: *Lactuca sativa*) is a species of annual herbaceous plant in the genus Lettuce of the Asteraceae family. As a vegetable crop, it is cultivated everywhere in the world, and its hydroponic cultivation technology has received special development in recent years. One of the common pathogens of lettuce is *Pseudomonas cichorii*, causing bacterial diseases of several important cultivated plants. In this regard, the study of the occurrence of this pathogen is important.

Material and methodology. The study was conducted on the basis of the Department of Agrobiotechnology of the ATI of RUDN University. The samples were provided by a commercial manufacturer of lettuce grown on a flow-through hydroponic line under conditions of minimal microbial contamination. The study of phytopathogenic bacteria includes a number of stages: isolation of bacteria on semi-selective culture media and obtaining a pure culture of bacteria; setting a test for pathogenicity (virulence); studying the phenotypic properties of bacteria; determining the taxonomic position of the isolated strains by molecular methods. All studies were conducted in accordance with the standard methods of identification of phytopathogenic bacteria.

Results. As a result of the work, the distribution of the species *Pseudomonas cichorii* in the hydroponic culture of lettuce in the Russian Federation was confirmed. Although, according to the EPPO database, *P. cichorii* was first described in Russia in 1965 by microbiological methods, but isolated bacteria are not available in microbiological collections to confirm this conclusion with appropriate diagnostic methods. Twelve isolates of *P. cichorii* were studied by a biochemical and phytopathological tests, and four isolates (01, 04, 06, and 12) that showed the greatest aggressiveness on host plants and tobacco leaves were identified by DNA sequencing of the *16S rRNA* gene fragment. The obtained DNA fragments showed a high similarity (99-100%) with the sequences of *P. cichorii* from the Genbank. Evaluation of the virulence of the isolated isolates on a number of other cultivated plants, and the uniformity of their biochemical characteristics showed that they represent a group of bacteria specialized in lettuce.

Keywords: lettuce, bacterial diseases, hydroponics, PCR

Введение

Салат посевной, латук посевной или салат латук (лат. *Lactuca sativa*) — вид однолетних травянистых растений рода Латук семейства Астровые (Asteraceae). В качестве овощной культуры возделывается повсеместно в мире, особое развитие в последние годы получило выращивание салата в защищенном грунте при гидропонной технологии выращивания. Салат, как и многие овощные культуры, сильно подвержен различным заболеваниям, среди которых широко распространены бактериальные болезни, являющиеся одной из причин ежегодных потерь урожая [1].

Одним из распространенных патогенов салата является *Pseudomonas cichorii* – возбудитель бактериозов нескольких важных культурных растений. *Pseudomonas cichorii* относится к грамотрицательным бактериям, населяющим почву [2]. Он имеет широкий спектр хозяев и из-за своей высокой патогенности может оказывать значительное экономическое влияние на урожайность различных культур, включая салат. Название этого возбудителя происходит от растения *Cichorium endivia*, на котором он был впервые выделен в качестве фитопатогена [3]. Анализ мультилокусных последовательностей ряда консервативных генов (MultiLocus Sequence Analysis – MLSA) показал высокое генетическое разнообразие в популяции штаммов *P. cichorii*. Это генетическое разнообразие связано со специализацией ряда клональных групп патогена на разных растениях-хозяевах в удаленных географических районах [4].

P. cichorii – широко распространенная бактерия в регионах с высокой влажностью и умеренными температурами, где она наносит серьезный ущерб на многих культурах – от овощных до зерновых. Патоген включен в Список карантинных вредных организмов в Мексике, в Египте (список A1) и в Иордании (Список A2) [5].

Целью наших исследований было определение возбудителя бактериоза салата, впервые зарегистрированного в гидропонной культуре в 2019-2020 гг. в Хабаровском крае.

Материалы и методы

Исследование проводили на базе департамента Агробиотехнологии АТИ РУДН.

Материал исследований

Образцы были предоставлены коммерческой компанией – производителем салата, выращиваемого на точной гидропонной линии в условиях минимального заражения микроорганизмами. В начале 2020 года до 30% растений проявляли симптомы почернения оснований листьев (Рис. 1) и замедления роста.

Методика опыта

Выделение бактерий из пораженных образцов растений салата проводили методами, описанными в руководстве по определению фитопатогенных бактерий [6]. Листья промывают водой, после чего небольшие фрагменты (4 x 4 мм) размельчают в капле стерильной воды, и гомогенат высевают микробиологической петлей на неселективные агаризованные питательные среды (NBY, YDC, LB) [6]. Инкубацию проводили при 28°C в течение 4-7 суток. Отдельные колонии бактерий пересевали на диагностические питательные среды, проверяли на

чистоту и закладывали на хранение. Для длительного хранения использовали метод криоконсервации в питательном бульоне с глицерином при -80°C.

Для сравнения физиологических признаков и вирулентности бактерий использовали референтные штаммы *Pseudomonas cichorii* GSPB 2097 (Göttinger Sammlung Phytopathogener Bakterien, Germany), CFPB 2101 (CIRM-Plant Associated Bacteria, France), NCPPB 3802 (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, FERA, UK), и штаммы близкородственных видов рода *Pseudomonas*: DC3000 (*P. syringae* pv. *tomato*), 1845 (*P. syringae* pv. *syringae*), Pwf6 (*P. marginalis*), полученные из коллекции РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева.

Морфологические, физиологические и биохимические свойства бактерий

Идентификацию бактерий проводили с помощью физиолого-биохимических и молекулярных методов исследования, описанных в руководстве [6]. При первичном отборе фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* в качестве критериев выбирают следующие: характеристика колоний (скорость роста, форма, окраска, синезеленая флуоресценция на среде Кинга Б); окраска по Граму; тест на оксидазу, леван, аргинин-дегидролазу; реакция сверхчувствительности (PCЧ) и тест по мацерации тканей ломтика клубня картофеля (пектолитические свойства).



Рис. 1. Симптомы бактериоза, вызываемого *Pseudomonas cichorii* на растениях салата в гидропонной культуре
Fig. 1. Symptoms of *Pseudomonas cichorii* on lettuce in hydroponic culture

Характеристика колоний

При описании колоний отмечали форму, размер, консистенцию, наличие пигмента колоний или выделение пигмента в среду. Определение Грам-реакции проводили по методу Руу [7] с использованием водного 3% раствора КОН: 1 каплю наносили на предметное стекло на мазок бактерии. Тянувшаяся бактериальная масса за петлей – реакция грамм (-) бактерий, Грамм (+) бактерии остаются без изменений.

В качестве инокулята для постановки биохимических и физиологических тестов использовали суспензию бактерий (10⁸ КОЕ/мл), приготовленную из 48-часовой культуры, выращенной при 28°C на питательном агаре Кинга Б [6].

Наличие оксидазы определяли методом Ковача (Kovacs) [8]. Бактерии выращивали на среде с 1% глюкозой. Мазок бактериальной массы помещали на фильтровальную бумагу, пропитанную 1%-ным раствором тетра-

метилпарафенилен-диаминодигидрохлорида. Окраска пурпурного цвета через 10 сек указывает на положительную реакцию. Если окрашивание не появляется в течение 60 сек. – реакция отрицательная. Для проведения теста на агринин-дегидролазу: петлей (2-4 мм в диаметре) делали посев 18-часовой микробной культуры в питательные среды, не содержащие аминокислоты (контроль) и содержащие аргинин. Через 48 ч культивирования при 28°C отмечают результаты. Изменение цвета среды с аминокислотой и бромтимоловым синим с оливково-зеленого на синий вследствие защелачивания среды образовавшимися аминами (диаминами) или аммиаком свидетельствует соответственно о наличии аргининдегидролазы. Тест на образование левана проводили на среде с 5% сахарозой.

Дополнительные биохимические признаки (наличие каталазы, утилизацию цитрата, гидролиз желатина, крахмала, казеина, редукцию нитрата) определяли стандартными методами [6, 8].

Пектолитические свойства бактерий оценивали по способности размягчать ломтики клубней картофеля. Для этих целей части растений тщательно промывают водой, погружали в 0,5% раствор $KMnO_4$ на 30 мин., затем промывали стерильной водой и подсушивали. После того как они подсохли, их разрезали скальпелем пополам и на одной из половинок делали насечку, на которую наносили 0,5 мл бактериальной суспензии. Зараженный материал закрывали второй половинкой и помещали во влажную камеру при температуре 28°C на 48 часов. Реакцию РСЧ определяли инфильтрацией бактериальной суспензии в лист растений табака (*Nicotiana tabacum* L. Сорт Samsun NN).

Для оценки вирулентности выделенных бактерий использовали молодые (стадия 5-8 настоящих листьев) растения салата (сорт Кирибати, Rijk Zwaan), эндивия (*Cichorium endivia*, сорт Витлуф, ООО Гавриш), капусты пекинской (*Brassica rapa*, сорт ТСХА2), моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus*, сорт Нантская, Седек) и томата (*Solanum lycopersicum*, сорт Хурма, ООО Поиск). Растения заражали инфильтрацией бактериальной суспензии в черешок листа.

Молекулярно-генетическая диагностика бактерий

Выделение ДНК

Выделение ДНК из 48-ч культуры бактерий проводили с помощью набора «Проба-ГС» («ДНК-технология», Москва) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию и чистоту ДНК исследуют при проведении электрофореза на агарозном геле с использованием в качестве стандарта ДНК маркера (100 bp Fermentas).

Секвенирование ПЦР-фрагментов и анализ нуклеотидных последовательностей

Для амплификации ДНК неизвестных штаммов использовали универсальные праймеры 8UA/519B на участок гена 16S рРНК, которые амплифицируют продукт 500 п.о. [9, 10]. Синтез праймеров проводили в ЗАО «Синтол», Москва. Реакцию ПЦР проводили в ДНК-амплификаторе «StepOne (ThermoFisher Co., США)». Для амплификации ДНК с праймерами 8UA/519B, смесь реактивов для постановки одной реакции объемом 25 мкл содержала: 5 мкл 10x ПЦР буфера MagMix (ООО «Диалат Лтд», Москва), 20пМ каждого праймера, и 20 нг целевой ДНК.

Температурно-временные параметры амплификации для праймеров 8UA/519B включали пре-денатурацию 96 – 15 мин, далее 35 циклов, состоящих из денатурации 95°C – 15 сек, отжига праймеров 55 – 30 сек, элонгации 72°C – 30 сек; после завершения циклической амплификации – досинтез ДНК при 72°C – 10 мин и хранение до выключения амплификатора – при +4°C.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (1 мкг/мл) при напряженности электрического поля 5 В/см. Для фиксации полученных данных использовали установку гель-документации BioDoc II. Секвенирование продуктов амплификации проводили в прямом и обратном направлениях по методу Сэнгера на базе ЗАО «Евроген» (Москва).

Редактирование полученных сиквенсных спектрограмм проводили с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor 7.1.3.0 [11]. Нуклеотидные последовательности участков генов изучаемых видов были проанализированы с помощью и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) и программного обеспечения «BioEdit».

Филогенетическое дерево для фрагмента гена 16S rRNA было построено при помощи программы MEGA-X [12].

Результаты и обсуждение

Из свежесобранных листьев салата с симптомами почернения основания листьев (рис. 1) выделяли предполагаемых патогенов на питательных средах Кинга Б, Чапека-Доусона, YDC, LB, NBY [6, 13]. На всех питательных средах наблюдали рост бактериальных колоний, причем доминировали (>90%) колонии серо-белого цвета, круглые, плоские, дающие водорастворимый сине-зеленый флуоресцентный пигмент на среде Кинга Б.

Для фитопатогенных псевдомонад в качестве надежного метода идентификации основных групп патогенов применяю LOPAT (Levan, Oxidase, Potato, Arginine, Tobacco - тест на синтез Левана, образование Оксидазы, мацерацию тканей ломтика клубня картофеля, тест на аргинин-дегидролазу и реакция сверхчувствительности (РСЧ) на табаке). По ключевым биохимическим признакам теста LOPAT (-,+,-,-,+) [13], проведенного для 12 изолятов бактерий из салата, сходных с большинством колоний по морфологическим признакам, бактерии принадлежали Группе III рода *Pseudomonas* (*P. cichorii*, EPPC Code: PSDMCI) (Табл. 1).

Все изоляты были положительны по синтезу левана на среде с сахарозой, положительны в тесте на оксидазу, отрицательны в тесте на ломтиках картофеля (пектолитические свойства), и в реакции на аргининдегидролазу. Все изоляты давали РСЧ на растениях табака в течении 12 часов после инфильтрации суспензии бактерий в лист растений.

Оценка вирулентности выделенных изолятов на ряде других культурных растений (эндивий, Пекинская капуста, морковь и томат) (Табл. 2), показала, что бактерии были более агрессивны (вирулентны) по отношению к салату, чем к другим растениям. и однородность их биохимических признаков, отличающих *P. cichorii* от близких видов рода *Pseudomonas* (Табл. 3) показали, что они представляют группу бактерий, специализированных на салате.

Таблица 1. Признаки LOPAT [6, 13] для выделенных изолятов и типовых культур *Pseudomonas cichorii*, *P. syringae* и *P. marginalis*
 Table 1. LOPAT traits [6, 13] for isolates and type cultures of *Pseudomonas cichorii*, *P. syringae*, and *P. marginalis*

| Изолят, штамм. | Растение | Тесты | | | | |
|----------------|---|-------|---|---|---|---|
| Рс 01 | Салат | L* | O | P | A | T |
| Рс 02 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 03 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 04 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 05 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 06 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 07 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 08 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 09 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 10 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 11 | - | - | + | - | - | + |
| Рс 12 | - | - | + | - | - | + |
| GSPB 2097 | Салат, типовой штамм <i>P. cichorii</i> | - | + | - | - | + |
| CFPB 2101 | - | - | + | - | - | + |
| NCPBV 3802 | Томат, типовой штамм <i>P. cichorii</i> | - | + | - | - | + |
| DC3000 | Томат, типовой штамм <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> | + | - | - | - | + |
| 1845 | Подсолнечник, референтный штамм <i>P. syringae</i> | + | - | - | - | + |
| Pwf6 | Картофель, референтный штамм <i>P. marginalis</i> | + | + | + | + | + |

*L: леван на среде с сахарозой, O: оксидаза,
 P: реакция ломтиков картофеля,
 A: аргинин, T: РСЧ на листьях табака
 +, наличие признака, -, отсутствие признака

Таблица 2. Реакция выделенных изолятов и типовых культур *Pseudomonas cichorii* при заражении некоторых культурных растений
 Table 2. Reaction of isolates and typical cultures of *Pseudomonas cichorii* by infection of some cultivated plants

| Изолят, штамм | Исходное растение: | Салат | Эндивий | Пекинская капуста | Морковь | Томат |
|---------------|--------------------|-------|---------|-------------------|---------|-------|
| Рс 01 | Салат | +++ | + | + | + | + |
| Рс 02 | - | +++ | +++ | + | + | + |
| Рс 03 | - | +++ | + | + | + | + |
| Рс 04 | - | +++ | + | + | + | + |
| Рс 05 | - | +++ | + | + | + | + |
| Рс 06 | - | +++ | + | + | + | + |
| Рс 07 | - | +++ | + | + | + | + |
| Рс 08 | - | +++ | + | + | + | + |
| Рс 09 | - | +++ | + | + | + | + |
| Рс 10 | - | +++ | + | + | + | + |
| Рс 11 | - | +++ | + | + | + | + |
| Рс 12 | - | + | + | + | + | + |
| GSPB 2097 | Салат | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| CFPB 2101 | - | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| NCPBV 3802 | Томат | - | + | ++ | + | +++ |

+, слабовирулентен
 ++, средневирulentен
 +++, сильновирulentен

Таблица 3. Диагностические биохимические признаки выделенных изолятов и типовых культур *Pseudomonas cichorii*
Table 3. Diagnostic biochemical signs of isolates and type cultures of *Pseudomonas cichorii*

| Изолят, штамм | Каталаза | Цитрат | Желатин | Редукция нитрата | Казеин | Крахмал |
|---------------|----------|--------|---------|------------------|--------|---------|
| Pc 01 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 02 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 03 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 04 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 05 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 06 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 07 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 08 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 09 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 10 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 11 | + | - | - | - | - | - |
| Pc 12 | + | - | - | - | - | - |
| GSPB 2097 | + | - | - | - | - | - |
| CFPB 2101 | + | - | - | - | - | - |
| NCPPB 3802 | + | - | - | - | - | - |

+, наличие признака,
-, отсутствие признака

Четыре изолята (01, 04, 06 и 12), показавшие наибольшую агрессивность при проведении РСЧ на листьях табака, были использованы для ПЦР амплификации фрагмента гена 16S рРНК (с праймерами 8UA/519B) и для них был получен ПЦР продукт ожидаемой длиной около 500 п.о. ПЦР фрагменты были секвенированы и при поиске гомологов в Генбанке показали высокое сходство (99-100%) с ранее депонированными последовательностями *Pseudomonas cichorii*.

Таким образом, впервые в РФ был обнаружен и идентифицирован патоген салата *Pseudomonas cichorii* в гидропонной культуре.

Заключение

Особое развитие в последние годы получило выращивание салата в защищенном грунте при гидропонной технологии выращивания. Несмотря на значительные дости-

жения в селекции растений и технологии выращивания салата, в последние годы увеличивается вредоносность бактериозов и других болезней. Появление новых возбудителей болезней в России – в стране с различными климатическими и почвенными условиями и большим разнообразием культурных и диких растений, представляет потенциальную опасность для сельскохозяйственного производства. В нашей работе впервые получено подтверждение распространения вида *Pseudomonas cichorii* в гидропонной культуре салата в РФ. Хотя, согласно базе данных Европейской Организации Карантина и Защиты Растений (EPPO, ЕОЗКР), *P. cichorii* был впервые описан в России в 1965 году на основании микробиологических методов идентификации, выделенные изоляты бактерии недоступны в коллекциях для подтверждения данного вывода современными диагностическими методами. В

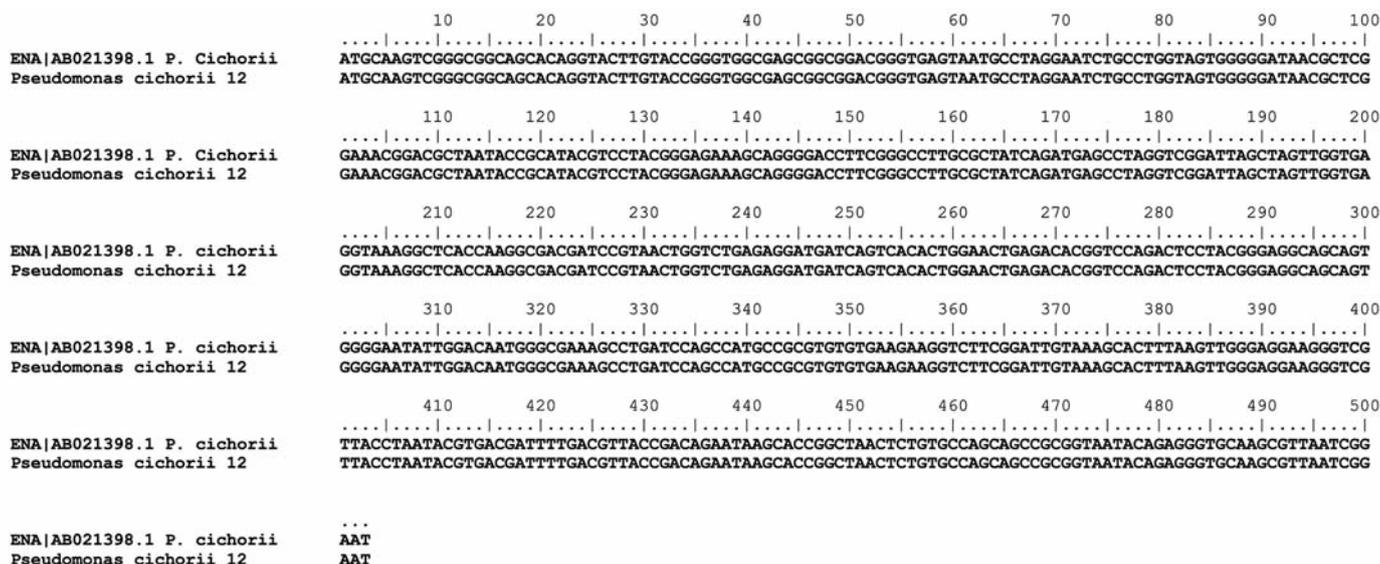


Рис. 2. Выравнивание последовательностей (BIOEDIT) фрагмента гена 16S rRNA, амплифицированного с праймерами 8UA/519B, для изолята *Pseudomonas cichorii* Pc12 и образца Генбанка ENA|AB021398.1 *Pseudomonas cichorii* ATCC 10857
Fig. 2. Sequence alignment (BIOEDIT) of a 16S rRNA gene fragment amplified with primers 8UA / 519B for *Pseudomonas cichorii* Pc12 isolate and Genbank sample AB021398.1 *Pseudomonas cichorii* ATCC 10857

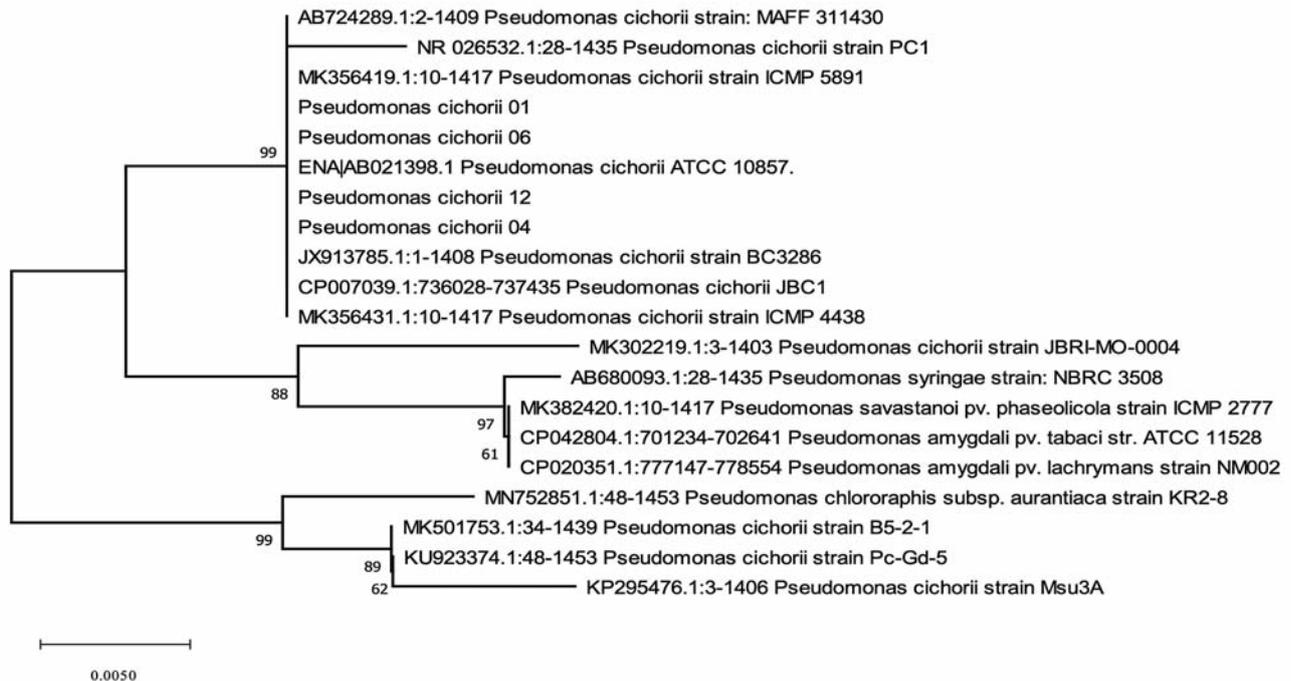


Рис. 3. Эволюционная история фрагмента (500 п.о.) гена 16S rRNA для Российских изолятов *Pseudomonas cichorii* 01, 04, 06, 12 и образцов генбанка *Pseudomonas cichorii* и родственных псевдомонад. Дерево получено методом Ближнего Соседа (the Neighbor-Joining method) [14]. Достоверность ветвей оценивалась методом бутстрепа (bootstrap test) (500 повторов) и показана у узлов дерева [15, 16]. Дерево построено при помощи программы MEGA X [12].

то же время, *P. cichorii* является для стран-импортеров важным регулируемым объектом и наличие его в РФ имеет важное значение для беспроблемного экспорта сельскохозяйственной продукции за рубеж.

Двенадцать изолятов *P. cichorii* были выделены из пораженных растений, собранных в тепличном комплексе на Дальнем Востоке РФ и изучены по комплексу биохимических признаков и четыре изолята (01, 04, 06 и 12), показавшие наибольшую агрессивность при проведении

РЧЧ на листьях табака, были использованы для ПЦР амплификации и секвенирования ДНК фрагмента гена 16S рНК. Полученные фрагменты ДНК показали высокое сходство (99-100%) с последовательностями *P. cichorii* из Генбанка. Оценка вирулентности выделенных изолятов на ряде других культурных растений, и однородность их биохимических признаков показали, что они представляют группу бактерий вида *P. cichorii*, специализированных на салате.

Об авторах:

Светлана Тешич (Svjetlana Testic) – магистрант Аграрно-технологического института ФГАОУ ВО РУДН, redagro9@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1797-4886>

Елена Николаевна Пакина, – кандидат биол. наук, доцент, руководитель департамента Агробиотехнологии Аграрно-технологического института ФГАОУ ВО РУДН, pakina-en@rudn.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6493-6121>

Александр Николаевич Игнатов – доктор биол. наук, профессор Аграрно-технологического института ФГАОУ ВО РУДН, an.ignatov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2948-753X>

About the authors:

Svjetlana Testic – MSc student, Agrarian and Technological Institute, People's Friendship University of Russia (RUDN University), redagro9@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1797-4886>

Elena N. Pakina – Cand. Sci. (Biology), Ass. Professor, Chair of Agrobiotechnology Department, Agrarian and Technological Institute, People's Friendship University of Russia (RUDN University), pakina-en@rudn.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6493-6121>

Aleksandr N. Ignatov – Doc. Sci. (Biology), Professor, Agrarian and Technological Institute, People's Friendship University of Russia (RUDN University), an.ignatov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2948-753X>

• Литература / References

- Koike, Steven T. Vegetable diseases: a color handbook. Burlington, MA: Academic Press, 2007. 448 p. ISBN 978-0-12-373675-7, 978-0-12-373675-8).
- Bradbury J.F. *Pseudomonas cichorii*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. In: IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. 1981. Wallingford, UK: CAB International. Sheet 695. <https://doi.org/10.1079/DFB/20056400695>
- Anzai Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H. et al. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence". *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;5(4):1563–89. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1563>. PMID 10939664.
- Trantas E.A., Sarris P.F., Mpalandinaki E.E., Pentari M.G., Ververidis F.N., Goumas D.E. A new genomovar of *Pseudomonas cichorii*, a causal agent of tomato pith necrosis. *European Journal of Plant Pathology.* 2013;137(3):477-493. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0258-8>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Global database, 2020. [Available: <https://gd.eppo.int>].
- Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*, 2001. Ed. 3:xii + 373 pp.; 24 ref
- Ryu E. On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *J. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 1938;(17):31.
- Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd edition. 2010. ASM. Washington, D.C.

- Lane D.L., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R.. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985;(82):6955-6959.
- Eden P.A., Schmidt T.M., Blakemore R.P., Pace N.R. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1991;41(2):324–325. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-2-324>
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series.* 1999;41(41):95-98.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution.* 2018;(35):1547-1549
- Lelliott R.A., Stead D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Oxford, UK: *Blackwell Scientific Publications*, 1987. 216 pp.
- Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* 1987;(4):406-425.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1987;(39):783-791.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 2004;(101):11030-11035.