



DOI: 10.22363/2312-797X-2024-19-1-139-154

УДК 632.3.01/.08

EDN: AIEVBJ

Научная статья / Research article

## Разнообразие штаммов возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в РФ

Р.И. Тараканов<sup>1</sup>  , П.В. Евсеев<sup>2</sup> , К.С. Трошин<sup>1</sup> ,  
А.Н. Игнатов<sup>3</sup> , Ф.С.-У. Джалилов<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева,  
г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,  
г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup>Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация  
 tarakanov.rashit@mail.ru

**Аннотация.** Бактериальный ожог, вызываемый бактерией *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg), является одной из самых вредоносных бактериальных болезней сои. Болезнь способна снижать урожайность (до 40 %), маслячность и всхожесть семян. Меры защиты и снижения вредоносности патогена должны носить комплексный характер, наиболее кардинальной из них является селекция на устойчивость. Для выведения устойчивых сортов необходима оценка разнообразия патогена на территории районирования будущего сорта и селекция в отношении наиболее распространенных и вредоносных форм патогена. Цель исследования — характеристика циркулирующих на территории РФ штаммов Psg как возбудителей бактериального ожога сои. Из растений и семян сои, выращенных в разных регионах РФ, выделили 12 штаммов возбудителя бактериального ожога сои Psg. Выделенные штаммы были идентичны референтному штамму Psg CFBP 2214 по флуоресценции, морфологии колоний на среде Кинга Б и результатам теста ЛОРАТ (+, –, –, +) и образовывали ампликон при видоспецифичном ПЦР-анализе гена *cfl* (коронафакат-лигазы). Штаммы обладали разной степенью вирулентности при инокуляции растений сои сорта Касатка, и значения ширины зоны с симптомами при искусственной инокуляции листьев варьировали от 3,23 мм (у штамма G7) до 6,53 мм (у штамма G4). Последовательности генов *gltA* и *ITS* 16S-23S рРНК российских штаммов имели низкую степень генетического полиморфизма и высокую (95,8...98,8 %) идентичность с соответствующими последовательностями штаммов возбудителя бактериального ожога сои из базы данных NCBI. Анализ расового состава штаммов показал, что доминирующей в стране является раса 4.

**Ключевые слова:** расы патогена, сорта-дифференциаторы, филогения, вирулентность, сорт Касатка, штаммы Psg

© Тараканов Р.И., Евсеев П.В., Трошин К.С., Игнатов А.Н., Джалилов Ф.С.-У., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

**Заявление о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Вклад авторов:** Р.И. Тараканов — выделение бактерий и их характеристика, проведение опытов по вирулентности, определению рас, написание черновика статьи; П.В. Евсеев — проведение секвенирования и анализ полученных данных; К.С. Трошин — выделение, биохимическая и фенотипическая характеристика штаммов; А.Н. Игнатов — редактирование статьи; Ф.С.-У. Джалилов — концепция и дизайн исследования, написание текста.

**Финансирование. Благодарности.** Авторы выражают искреннюю благодарность куратору коллекции сои, канд. биол. наук, вед. науч. сотруднику И.В. Сеферовой и руководителю отдела генетических ресурсов зернобобовых культур, д-ру биол. наук, проф. М.В. Вишняковой (ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР)) за предоставление образцов сортов-дифференциаторов *P. savastanoi* pv. *glycinea*.

**История статьи:** поступила в редакцию 11 января 2024 г., принята к публикации 27 февраля 2024 г.

**Для цитирования:** Тараканов Р.И., Евсеев П.В., Трошин К.С., Игнатов А.Н., Джалилов Ф.С.-У. Разнообразие штаммов возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в РФ // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2024. Т. 19. № 1. С. 139–154. (In Russ.). doi: 10.22363/2312-797X-2024-19-1-139-154

## Diversity of soybean bacterial blight pathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in the Russian Federation

Rashit I. Tarakanov<sup>1</sup>  , Peter V. Evseev<sup>2</sup> , Konstantin S. Troshin<sup>1</sup> ,  
Aleksandr N. Ignatov<sup>3</sup> , Fevzi S.U. Dzhalilov<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup>RUDN University, Moscow, Russian Federation

 tarakanov.rashit@mail.ru

**Abstract.** One of the most harmful bacterial diseases of soybean is bacterial blight caused by bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. The pathogen can reduce soybean yield (up to 40 %), oil content and seed germination. To manage the pathogen damage, protection measures should be comprehensive, the most cardinal of which is breeding for resistance. To obtain resistant varieties, it is necessary to understand the diversity of the pathogen in the area and to breed against the most common and harmful forms of the pathogen. In this regard, the aim of the study was to characterize *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* strains circulating in the Russian Federation as casual agents of bacterial blight of soybean. 12 strains of the soybean bacterial blight pathogen were isolated from soybean plant parts and seeds grown in different regions of the Russian Federation. The isolated strains were identical to the reference strain Psg CFBP 2214 in fluorescence, colony morphology on King B medium and LOPAT test results (+, –, –, –, +) and formed an amplicon in specific PCR analysis of *cfI* (coronafacate ligase) gene. The strains had different virulence to Kasatka soybean plants, and the width of symptomatic zone when leaves were artificially inoculated ranged from 3.23 mm (in strain G7) to 6.53 mm in

strain G4. Comparison of the obtained *gltA* and *ITS* 16S-23S rRNA gene sequences showed a high (95.8...98.8 %) identity to the bacterial blight pathogen strains deposited to NCBI Genbank, and phylogenetic analysis showed a low intra-strain genetic polymorphism. Analysis of the race composition of the strains showed that the race 4 was predominant in the Russian Federation.

**Keywords:** pathogen races, differentiator varieties, phylogeny, virulence, Kasatka variety, Psg strains

**Conflicts of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Acknowledgements.** The authors express their sincere gratitude to the curator of the soybean collection PhD (Bio), leading researcher I.V. Seferova and Head of the Department of Genetic Resources of Leguminous Crops Dr. Bio. Sc., Prof. M.V. Vishnyakova (Vavilov all-Russian Institute of Plant Genetic Resources) for providing samples of differentiator varieties of *P. savastanoi* pv. *glycinea*.

**Author contributions:** R.I. Tarakanov — isolation of bacteria and their characterization, conducting experiments on virulence, race determination, writing the paper; P.V. Evseev — sequencing and analysis of obtained data; K.S. Troshin — isolation, biochemical and phenotypic characterization of strains; A.N. Ignatov — editing of the paper; F.S.-U. Dzhililov — concept and design of the research, writing the paper.

**Article history:** Received: 11 January 2024. Accepted: 27 February 2024.

**For citation:** Tarakanov RI, Evseev PV, Troshin KS, Ignatov AN, Dzhililov FSU. Diversity of soybean bacterial blight pathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in the Russian Federation. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2024;19(1):139–154. (In Russ.). doi: doi: 10.22363/2312-797X-2024-19-1-139-154

## Введение

Соя (*Glycine max* Willd) является одной из основных сельскохозяйственных культур во всем мире. Наиболее вредоносной среди болезней бактериальной этиологии сои считается бактериальный ожог (или угловатая пятнистость), способная снизить урожайность на 40 % [1]. Возбудителем болезни является граммотрицательная бактерия *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Coerper 1919) Gardan et al. 1992 (синоним — *P. syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young et al.) (далее — Psg) [2]. Патоген обнаружен в 41 стране мира, включая все климатические зоны производства сои<sup>1</sup>. Psg поражает все надземные части сои, но характерные симптомы обычно наблюдаются на листьях среднего и верхнего ярусов и на бобах. Болезнь может приводить к карликовости, снижению листовой поверхности и полной гибели растения [3].

Борьба с болезнью включает использование устойчивых сортов, соблюдение севооборота, посев только свободных от болезни семян и применение бактерицидов во время вегетации. Селекция устойчивых сортов сои считается наиболее надежным подходом, однако она сдерживается эволюцией вирулентности патогена и необходимостью тщательной характеристики штаммов на определенной территории для целенаправленной селекции на устойчивость к местным штаммам. Штаммовый состав возбудителя бактериального ожога сои на территории РФ на данный момент остается неизвестным, в связи с чем, **целью исследования** являлась характеристика штаммов *P. savastanoi* pv. *glycinea*, циркулирующих на территории РФ, как возбудителей бактериального ожога сои.

<sup>1</sup> *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea* // EPPO Global Database. Режим доступа: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMGL>, Дата обращения: 29 октября 2023 г.

## Материалы и методы исследования

**Выделение штаммов Psg.** Штаммы Psg выделяли из инфицированных листьев и семян сои по общепринятой методике [4] с небольшими изменениями. Семена и части растений с симптомами гомогенизировали в ступке с добавлением стерильной дистиллированной воды до однородного состояния. Последовательные десятикратные разведения гомогената наносили на среду Кинга Б, дополненную 10 мкг/мл цефалексина (модификация среды Кинга Б — КВС) и инкубировали при 28 °С в течение 4–6 дней. Типичные колонии флуоресцирующих псевдомонад очищали путем трех последовательных пересевов и использовали для дальнейшего анализа. Для сравнения во всех тестах использовали эталонный штамм Psg CFBR 2214.

Фенотипически изоляты оценивали по форме колоний и образованию флуоресцирующего сидерофора [5] при культивировании на среде Кинга Б. Биохимическая характеристика включала себя анализ LOPAT (образования лева-на (L), оксидазы (O), пектолитической активности на ломтиках картофеля (P), активности аргининдигидролазы (A) и реакции сверхчувствительности (СВЧ) на растениях табака (Т)) [6]. Штаммы хранили при –72 °С в 15%-м водном растворе глицерина.

**Молекулярно-генетическая характеристика.** Штаммы, показавшие идентичность Psg на предварительных этапах анализа, проверяли ПЦР со специфическими праймерами и сравнением последовательностей ДНК общепринятых таксономических генов. Для этого из двухсуточных культур штаммов выделяли ДНК с помощью набора для выделения «ГС-Проба» («АгроДиагностика», Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР-анализ проводили с использованием праймеров PsgFOR-1 (5'-GGC GCT CCC TCG CAC TT-3') и PsgREV-2 (5'-GGT ATT GGC GGG GGT GC-3') (размер продукта — 650 п.н.), специфичных для гена *cfl*, кодирующего коронафакат-лигазу, необходимого для синтеза фитотоксина коронатина [7]. Для проведения амплификации готовили 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 5 мкл 5×Master Mix (5×MasDDTaqMIX-2025, Диалат, Москва, Россия); 1,0 мкл каждого праймера с концентрацией 10 пМ и 5 нг целевой ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе T100 (Bio-Rad, Геркулес, США) в соответствии с рекомендованной программой [8]. Ампликоны разделяли электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием в 0,5×TBE-буфере, и анализировали в системе гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

Для более детальной генетической характеристики выделенных штаммов проводили секвенирование последовательностей гена цитратсинтазы (далее — *gltA*) и межгенного спейсера (далее — *ITS 16S-23S pPHK*). Для амплификации гена *gltA* использовали праймеры *cts-Fs* (5'-CCC GTC GAG CTG CCA ATW CTG A-3') и *cts-Rs* (5'-ATC TCG CAC GGS GTR TTG AAC ATC-3'), описанные в [9], а для гена *ITS 16S-23S pPHK* — оригинальные праймеры *ITS-1\_Psg* (5'-GAA CCT GCG GCT GGA TCA-3') и *ITS-2\_Psg* (5'-GCG CTT CTT CAC TTG ACC ATA TAA-3'),

разработанные нами на основе последовательности генома штамма Psg ICMP 2189. Состав реакционной смеси был аналогичен составу при амплификации гена *cfl*.

Температурно-временные условия амплификации гена *gltA* были аналогичны работе [9], а в случае с геном ITS 16S-23S рПНК использовали те же условия, но температуру отжига — 61 °С. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на генетическом анализаторе 3130xl ABI (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя в компании Евроген (Москва, Россия).

Эволюционная история была выведена с помощью метода минимальной эволюции [10] в программе MEGA X с помощью алгоритма Close-Neighbour-Interchange (CNI) и показаны оптимальные деревья (рис. 3). Тепловая карта попарных сравнений штаммов построена в программе GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software Inc., Бостон, МА, США).

Последовательности ДНК собирали с помощью программного пакета Bioedit. Для определения величины сходства последовательностей их сравнивали с имеющимися в GenBank с помощью программы Basic Local Alignment Search Tool — BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве критерия для определения видовой идентичности использовались последовательности, сходные с ранее опубликованными на более 96 % и являющиеся близкородственными к Psg.

*Оценка вирулентности штаммов.* У выделенных штаммов, показавших высокую (более 95 %) идентичность к штаммам группы 3 геновида 2 *P. syringae* (*P. savastanoi*) на предыдущем этапе, оценивали вирулентность по отношению к растениям сои согласно описанной ранее методике [11]. Для этого, штаммы культивировали на среде Кинга Б при 18 (± 2) °С в течение 72 ч. Колонии суспендировали в стерильной воде, после чего доводили концентрацию до 10<sup>8</sup> КОЕ/мл, измеряя оптическую плотность при помощи спектрофотометра Nanodrop One (Thermo FS, Уолтем, МА, США). Для лучшего контакта с листом в суспензию добавляли смачивающий агент Silwet Gold (Chemtura, США) до концентрации 0,01 %.

Для заражения использовали метод разрезания листьев сорта Касатка ножницами, смоченными в суспензии штамма, перпендикулярно жилкам на глубину 1 см от края, как описано ранее [11]. Условия культивирования растений были аналогичными упомянутому выше. Сорт Касатка был выбран по нескольким причинам. Во-первых, в ходе предварительной оценки реакции 47 образцов сои [11], сорт Касатка был средневосприимчивым, т.е. типичным для районированных сортов. Во-вторых, сорт раннеспелый и районирован в Центральных регионах РФ, в которых бактериальный ожог является потенциально вредоносным.

Положительным контролем в опытах служила суспензия типового штамма CFBP 2214, отрицательными — стерильная вода и суспензии штаммов непатогенных видов: *Pseudomonas fluorescens* и *P. putida* из коллекции фитопатогенов кафедры защиты растений. Инокуляцию штаммов проводили в мае-августе 2022–2023 гг. в экспериментальных теплицах лаборатории защиты растений РГАУ — МСХА. Опыт повторяли двукратно (в июне и в августе каждого года), заражая одним штаммом

все листья 4 растений. Учет проводили на 12-е сутки после инокуляции, измеряя ширину зоны листа с симптомами при помощи цифрового штангенциркуля MaYuan MY-1720 (Guangzhou MaYuan Electronic Technology, Guangdong, Китай).

**Оценка расового состава.** Дифференциацию штаммов Psg по расам основывали по толерантности/восприимчивости сорта-дифференциатора к заражению штаммом. Набор дифференциаторов, включавший сорта Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit и Norchief, Hardee, Peking, Centennial [12], получили из коллекции образцов сои ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР, Санкт-Петербург). Для определения рас патогена готовили бактериальные суспензии и заражали сорта-дифференциаторы аналогично разделу выше. Через 12 дней отмечали для каждого штамма наличие (+) или отсутствие (–) симптомов на листе вокруг зоны разреза ножницами. Каждым штаммом заражали по 3 растения.

**Статистический анализ и визуализация.** Данные анализировали с применением метода дисперсионного анализа в программе Statistica 12.0 (StatSoft, США), сравнивая средние значения по критерию Дункана. Значения  $p < 0,05$  считались значимыми. Графики были построены с помощью GraphPad Prism 9.2.0.

## Результаты исследования и обсуждение

**Фенотипическая и биохимическая характеристика выделенных штаммов Psg.** С 2019 по 2022 гг. из семян и частей растений сои, собранных на территории РФ, выделили около 150 изолятов, проявляющих флуоресценцию и предварительно относящихся к *Pseudomonas* sp. Для сравнения с местными изолятами в качестве положительного контроля во всех тестах использовали штамм CFBR 2214.

После микробиологических и молекулярных тестов для дальнейшего анализа отобрали около 40 изолятов, наиболее похожих на Psg. Предварительная оценка ВОХ-ПЦР указала на наличие 12 штаммовых групп, и в дальнейшем анализе было использовано по 1 представителю каждой группы (табл. 1). Выделенные изоляты имели сходные биохимические и морфологические характеристики: белый, слегка кремовый цвет колоний, круглые, блестящие колонии, которые образовывали флуоресцирующий сидерофор за три дня и не проявляли пектолитической активности.

Таблица 1

### Штаммы *Pseudomonas* sp., использованные в работе

Штамм	Растение-хозяин	Орган изоляции	Источник	Год выделения
<i>Штаммы Pseudomonas savastanoi pv. glyciniae</i>				
G1	Соя ( <i>Glycine max</i> )	Семена	Воронежская область	2019
G2			Амурская область	2019
G3			Амурская область	2019
G4			Хабаровский край	2020
G5			Воронежская область	2020
G6			Воронежская область	2021

Окончание табл. 1

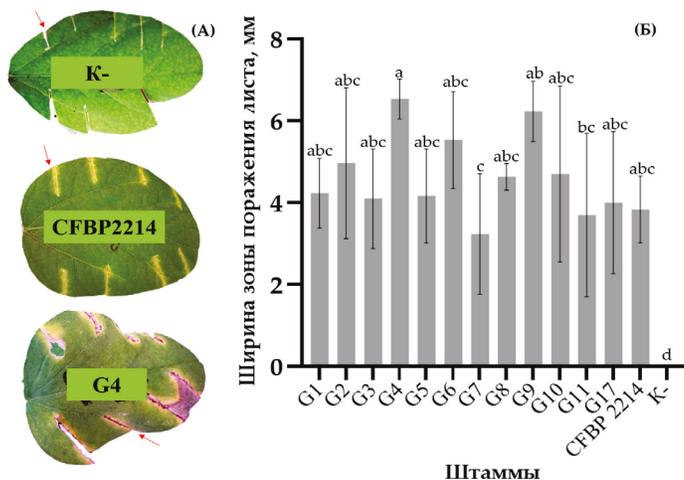
Штамм	Растение-хозяин	Орган изоляции	Источник	Год выделения
G7	Соя ( <i>Glycine max</i> )	Семена	Воронежская область	2021
G8		Листья	Приморский край	2021
G9		Семена	Хабаровский край	2021
G10			Амурская область	2021
G11			Хабаровский край	2021
G17			Хабаровский край	2021
CFBP 2214		Листья	Новая Зеландия	1968
<b>Другие виды <i>Pseudomonas</i> sp.</b>				
<i>P. fluorescens</i>	–	Почва	Краснодарский край	2021
<i>P. putida</i>	–	Почва		2021

Table 1

***Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* strains used in the research**

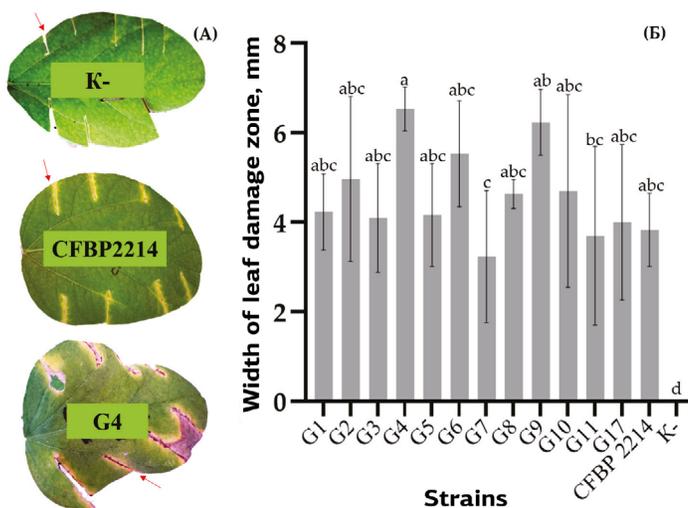
Strain	Host	Part of plant	Source	Year of isolation
<b>Strains of <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i></b>				
G1	Soybean ( <i>Glycine max</i> )	seeds	Voronezh region	2019
G2			Amur region	2019
G3			Amur region	2019
G4			Khabarovsk region	2020
G5			Voronezh region	2020
G6			Voronezh region	2021
G7			Voronezh region	2021
G8		leaves	Primorsky region	2021
G9		seeds	Khabarovsk region	2021
G10			Amur Region	2021
G11			Khabarovsk region	2021
G17			Khabarovsk region	2021
CFBP 2214		leaves	New Zealand	1968
<b><i>Pseudomonas</i> sp.</b>				
<i>P. fluorescens</i>	–	soil	Krasnodar region	2021
<i>P. putida</i>	–	soil		2021

Вирулентность штаммов Psg. Штаммы Psg обладали разной степенью вирулентности по отношению к растениям сорта Касатка, образуя разной ширины зоны хлороза вокруг места разреза листа ножницами, смоченными в суспензии бактерии (рис., 1, А). Так, к примеру, наименьшим значением ширины зоны с симптомами обладал изолят G7 с шириной 3,23 мм, наибольшим — G4 (6,53 мм), а листья, инокулированные штаммом CFBP 2214, демонстрировали среднее значение 3,83 мм (рис., 1, Б). Другие штаммы показывали промежуточные значения. На листьях, инокулированных стерильной водой и штаммами других видов *Pseudomonas* (*fluorescens* и *putida*), не наблюдали симптомов поражения. Различия в вирулентности штаммов могли быть связаны как с различным каскадом факторов-вирулентности (например системы секреции III типа), так и с возможным ослаблением вирулентности при культивировании — известного явления среди патогенов. Различия в вирулентности штаммов, выделенных из одного растения известны, например, для *P. syringae* pv. *tomato* [13].



**Рис. 1.** Вирулентность штаммов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*: А – разница в ширине зоны хлороза между штаммами и контролем; Б – значения ширины зоны поражения листьев через 12 дней после инокуляции разными штаммами. Буквенные индексы при столбиках указывают группы, статистически различаемые по критерию Дункана ( $P < 0,05$ )

Источник: выполнено авторами

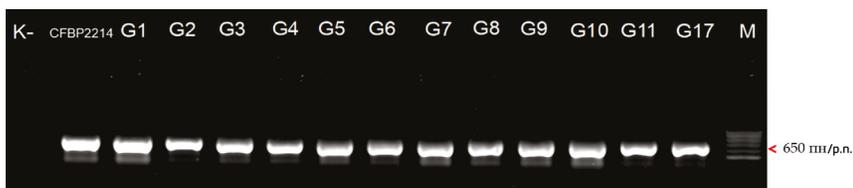


**Fig. 1.** Virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* strains: A – difference in chlorosis zone width between strains and control; Б – Values of leaf lesion zone width 12 days after inoculation with different strains. Different letters near bars indicate statistical difference by Duncan test ( $P < 0.05$ )

Source: created by the authors

**Молекулярно-генетическая характеристика.** При амплификации с Psg-специфичными праймерами, все штаммы, в т. ч. CFBP 2214, образовывали четкий продукт размером ~ 650 п.н. (рис. 2). Амплификация гена *cfl* указывала на принадлежность к Psg [7], однако Moriawaki et. al. доказали, что существуют штаммы патогена, которые не продуцируют данный фитотоксин и не реагируют с этими праймерами при ПЦР [14]. Помимо этого, данный ген присутствовал у ряда па-

товаров *P. syringae*, поражающих другие культуры, например у *P. syringae* pv. *morsprunorum*, *atropurpurea* и *tomato* [8]. Таким образом, амплификация гена *cfl* косвенно указывала на принадлежность выделенных штаммов к Psg.



**Рис. 2.** ПЦР-детекция гена *cfl* у штаммов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*: М – маркер молекулярного веса 100+bp (Евроген) (#NL002); К– отрицательный контроль (реакция без ДНК); G1-G17 – анализируемые штаммы  
 Источник: выполнено авторами

**Fig. 2.** PCR detection of *cfl* gene in *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* strains: М – 100+bp molecular weight marker (Eurogen) (#NL002); К– negative control (reaction without DNA); G1-G17 – analyzed strains  
 Source: created by the authors

Для окончательного подтверждения и видовой идентификации ДНК штаммов секвенировали по генам цитратсинтазы *gltA* и *ITS* 16S-23S рРНК. Аннотированные последовательности генов *gltA* и *ITS* 16S-23S рРНК Psg были депонированы в NCBI GenBank; номера депонирования приведены в табл. 2. При сравнении последовательностей с имеющимися в базе данных NCBI GenBank, оказалось, что все штаммы с высокой степенью идентичности (более 95 %) комплементарны видам *P. syringae* и *savastanoi* по гену *gltA*. Связано это с тем, что вид *P. syringae* совсем недавно был перегруппирован в девять отдельных геномных подвидов с *P. savastanoi*, включая патовары *phaseolicola*, *savastanoi*, *glycinea* и *tabaci* [15].

Таблица 2

**Штаммы *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, идентифицированные по последовательностям генов *gltA* и *ITS* 16S-23S рРНК**

Штамм	Наиболее близкие виды при сравнении последовательностей с базой Genbank по гену		Идентификационный номер последовательности в Genbank по гену	
	цитратсинтазы ( <i>gltA</i> )	<i>ITS</i> рРНК 16S-23S	цитратсинтазы ( <i>gltA</i> )	<i>ITS</i> рРНК 16S-23S
G1	<i>P. syringae</i> ; <i>P. savastanoi</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743493	OR750531
G2	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743494	OR750532
G3	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. savastanoi</i>	OQ743495	OR750533
G4	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	OQ743496	OR750534
G5	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	OQ743497	OR750535
G6	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	OQ743498	OR750536
G7	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743499	OR750537
G8	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. savastanoi</i>	OQ743500	OR750538
G9	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	OQ743501	OR750539
G10	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	OQ743502	OR750540
G11	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743503	OR750541
G17	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	OQ743504	OR750542

***Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* strains identified by *gltA* and *ITS* 16S-23S rRNA genes sequences**

Strain	Closest species when comparing sequences with Genbank database by		Sequence identification number in Genbank	
	citrate synthase gene ( <i>gltA</i> )	<i>ITS</i> rRNA 16S-23S gene	by citrate synthase gene ( <i>gltA</i> )	by <i>ITS</i> rRNA 16S-23S gene
G1	<i>P. syringae</i> ; <i>P. savastanoi</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743493	OR750531
G2	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743494	OR750532
G3	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. savastanoi</i>	OQ743495	OR750533
G4	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	OQ743496	OR750534
G5	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	OQ743497	OR750535
G6	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	OQ743498	OR750536
G7	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743499	OR750537
G8	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. savastanoi</i>	OQ743500	OR750538
G9	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	OQ743501	OR750539
G10	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	OQ743502	OR750540
G11	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743503	OR750541
G17	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	OQ743504	OR750542

Ряд штаммов, например, G1, G2, G7 и G11 также с высокой идентичностью (99,2...99,6 %) по последовательностям гена *ITS* 16S-23S рНК были комплементарны к *P. amygdali*. Данный факт можно объяснить тем, что ген *gltA* принадлежит к числу генов так называемого «домашнего хозяйства», а последовательность *ITS* 16S-23S рНК является достаточно консервативной последовательностью, что приводит к тому, что они имеют высокую идентичность у близкородственных видов [20]. Похожая картина высокой степени гомологии к близкородственным видам наблюдалась, например у *P. syringae* pv. *coriandricola* в работе Popović *et. al.* [16].

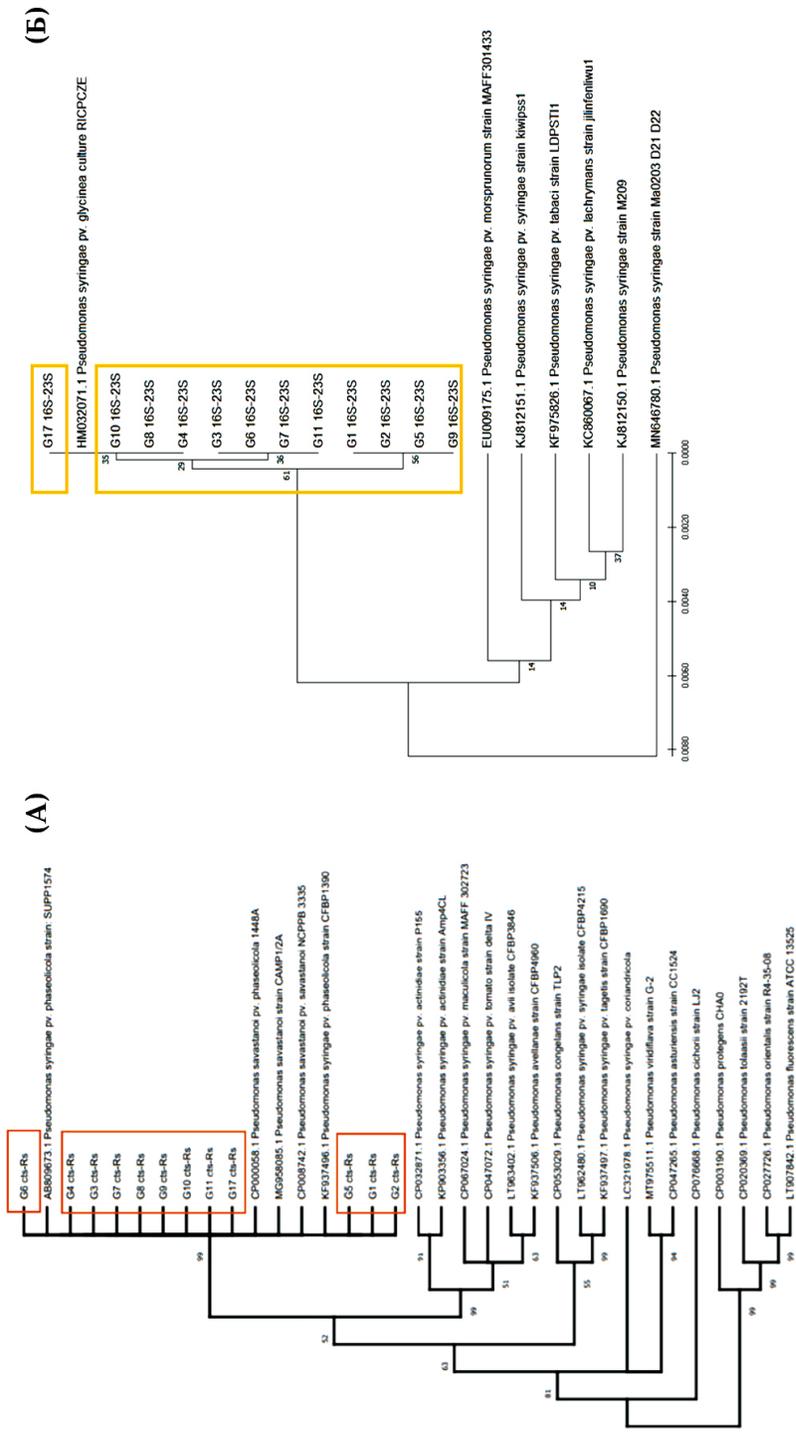
Для определения филогенетического родства 12 штаммов Psg с близкородственными видами проведен молекулярно-филогенетический анализ и построены филогенетические деревья с использованием программы MEGA X. Анализ последовательностей гена *gltA* поместил все штаммы Psg в одну кладу вместе с видами *P. syringae* и *P. savastanoi* (рис., 3, А). Штаммы отличались между собой по генетическому расстоянию. К примеру, отделились 3 группы штаммов, включавших:

— группу 1 (G6) с наиболее близким по последовательности *gltA* к *P. savastanoi*. pv. *phaseolicola* штаммом SUPP 1574;

— группу 2 (G3-G4, G7-G11, G17), близкую к другим штаммам *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* и штамму NCPPB 3335 *P. sav.* pv. *savastanoi*;

— группу 3 (G1-G2, G5), сходную с *P. savastanoi* по *gltA*, но наиболее близкую по последовательности *ITS* 16S-23S рНК к *P. amygdali*.

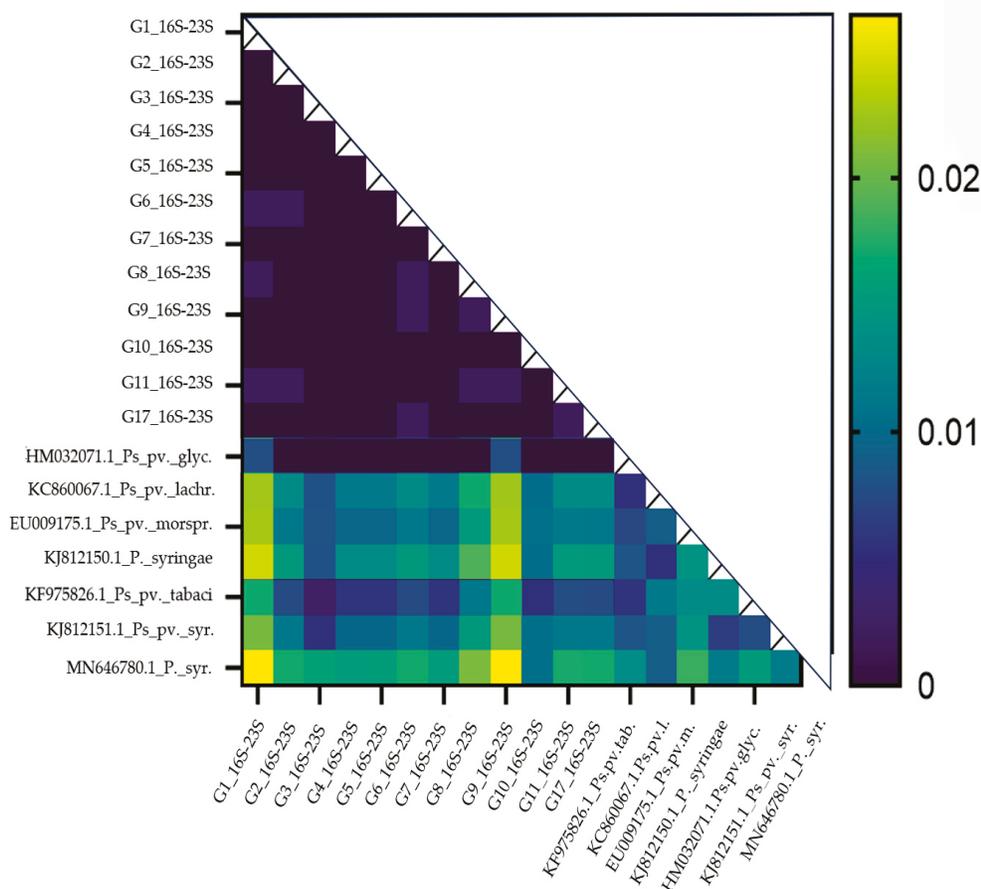
Филогенетический анализ по последовательностям гена *ITS* 16S-23S рНК поместил штаммы Psg в три монофилетические клады (рис. 3, Б). Первая кладка включала в себя штаммы G4, G8, G10, G17 и штамм Psg RICPCZE из Genbank. Вторая кладка была самой многочисленной и включала в себя штаммы G3-G4, G6-G8 и G10-G11, а третья — штаммы G1-G2, G5 и G9. В другие кладки были помещены штаммы других патогенов, а именно *morsprunorum*, *syringae* и *lachrymans*.



**Рис. 3.** Филогенетические деревья нуклеотидных последовательностей генов цитратсинтазы (*gltA*) (А) и *ITS* 16S-23S рРНК (Б) *Pseudomonas* spp. Оранжевыми рамками обведены штаммы, изученные в данной работе

Источники: выполнено авторами  
 indicate the strains studied in the research  
 Source: created by the authors

По генетическому расстоянию штаммы в целом не отличались между собой, однако имелись минимальные различия между несколькими штаммами (рис. 4). Например, отличались между собой в минимальных значениях штамм G4 и штаммы G1-G2 и G8-G9 в пределах 0,00187 единиц. Другие исследователи также указывали на малый генетический полиморфизм популяции *Psg* при анализе методами тандемных повторов с переменным числом множественных локусов (MLVA) [17], ВОХ-ПЦР [18] и макро-рестриктоного анализа (pulsed-field gel electrophoresis — PFGE) [19]. Таким образом, мы выявили низкую вариабельность и генетическую однородность штаммов популяции *Psg* в РФ.



**Рис. 4.** Тепловая карта последовательностей гена *ITS* 16S-23S рПНК, показывающая попарные генетические расстояния штаммов *P. savastanoi* pv. *glycinea* и других патоваров *P. syringae*. Различные цвета соответствуют проценту генетического расстояния при попарном сравнении ДНК разных штаммов

Источник: выполнено авторами

**Fig. 4.** Heat map of *ITS* 16S-23S rRNA gene sequences showing pairwise genetic distances of *P. savastanoi* pv. *glycinea* strains and other *P. syringae* pathovars. Different colors correspond to the percent of genetic difference in pairwise comparison of DNA from different strains

Source: created by the authors

Анализ расового состава патогена показал, что все штаммы поражали все сорта-дифференциаторы (табл. 3). Таким образом, все 12 штаммов Psg, выделенных в РФ, относятся к расе 4, согласно схеме «ген-на-ген» взаимоотношений рас патогена и сортов дифференциаторов [12, 21]. Похожие результаты были получены другими исследователями, к примеру, Abo-Moch *et al.* провели анализ встречаемости рас Psg в Европе и пришли к выводу, что из 58 штаммов 42 относились к расе 4 [12]. Широкая распространенность расы 4 также подтверждена анализом изолятов из Канады [22], Сербии [7], США [23] и некоторых других странах [24]. Доминирование расы 4 показывает, что в селекции сои на устойчивость к бактериальному ожогу в РФ необходимо использовать штаммы именно этой расы, как наиболее распространенные и вредоносные в РФ и ближайших регионах мира.

Таблица 3 / Table 3

**Результаты инокуляции сортов-дифференциаторов с штаммами *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, использованными в работе**

(S = susceptible (восприимчивый), R = resistant (устойчивый))

**Results of inoculation of differentiator varieties with *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* strains used in this work (S = susceptible, R = resistant)**

Сорт-дифференциатор / Differentiator variety	Штамм / Strain												
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G17	CFBP 2214
Acme	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Chippewa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Flambeau	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Harosoy	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lindarin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Merit	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Norchief	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Hardee	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Peking	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Centennial	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Номер расы / Number of race	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

### Заключение

1. Выделенные штаммы *P. savastanoi* pv. *glycinea* обладают разной степенью вирулентности по отношению к растениям сои. Значения ширины зоны с симптомами поражения варьировали от 3,23 мм у штамма G7 до 6,53 мм у штамма G4.

2. Сравнение последовательностей генов *gltA* и *ITS 16S-23S* рРНК с имеющимися в базе данных NCBI Genbank показало высокую (95,8...98,8 %) степень идентичности выделенных штаммов к другим штаммам возбудителя бактериаль-

ного ожога сои, а генетический анализ выявил низкую степень внутривидового генетического полиморфизма.

3. Анализ расового состава штаммов показал, что доминирующей в популяции патогена в стране является раса 4. При селекции на устойчивость сои к возбудителю бактериального ожога сои рекомендуется использовать штаммы расы 4, как наиболее распространенные в РФ.

## Библиографический список / References

1. Jagtap GP, Dhopte SB, Dey U. Bio-efficacy of different antibacterial antibiotic, plant extracts and bioagents against bacterial blight of soybean caused by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Sci J Microbiol*. 2012;1(1):1–9.
2. Zhang J, Wang X, Lu Y, Bhusal SJ, Song Q, Cregan PB, et al. Genome-wide scan for seed composition provides insights into soybean quality improvement and the impacts of domestication and breeding. *Mol Plant*. 2018;11(3):460–472. doi: 10.1016/j.molp.2017.12.016
3. Shepherd LM, Block CC. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in Soybean Seeds. In: *Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material*. 2nd ed. The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA; 2017. doi: 10.1094/9780890545416.013
4. Alvarez E. New assays for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in soybean seed. *Plant Dis*. 1995;79(1):12–14. doi: 10.1094/PD-79-0012
5. Wensing A, Braun SD, Büttner P, Expert D, Völksch B, Ullrich MS, et al. Impact of Siderophore Production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 on Epiphytic Fitness and Biocontrol Activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 1a/96. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(9):2704–2711. doi: 10.1128/AEM.02979-09
6. Lelliott RA, Billing E, Hayward AC. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J Appl Bacteriol*. 1966;29(3):470–489. doi: 10.1111/j.1365-2672.1966.tb03499.x
7. 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.
8. Bereswill S, Bugert P, Völksch B, Ullrich M, Bender CL, 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. doi: 10.1128/aem.60.8.2924-2930.1994
9. Sarkar SF, Guttman DS. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(4):1999–2012. doi: 10.1128/AEM.70.4.1999-2012.2004
10. Rzhetsky A, Nei M. A Simple Method for Estimating and Testing Minimum-Evolution Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1991;9(5):945–967.
11. Tarakanov RI. Evaluation of the resistance of soybean cultivars to bacterial diseases on an artificial inoculation background. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2022;(5):92–107. (In Russ.). doi: 10.26897/0021-342X-2022-5-92-107
12. Тараканов Р.И. Оценка устойчивости сортов сои к бактериальным болезням на искусственном инфекционном фоне // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2022. № 5. С. 92–107. doi: 10.26897/0021-342X-2022-5-92-107
13. Abo-Moch F, Mavridis A, Rudolph K. Determination of Races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* Occurring in Europe. *Journal of Phytopathology*. 1995;143(1):1–5. doi: 10.1111/j.1439-0434.1995.tb00190.x
14. Jones LA, Saha S, Collmer A, Smart CD, Lindeberg M. Genome-Assisted Development of a Diagnostic Protocol for Distinguishing High Virulence *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Strains. *Plant Disease*. 2015;99(4):527–534. doi: 10.1094/PDIS-08-14-0833-RE
15. Moriwaki J, Mizuno A, Sato M, Kadota I, Nishiyama K. Difference in production of coronatine on potato tuber tissue and in liquid culture by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Japanese Journal of Phytopathology*. 1996;62(5):544–547. doi: 10.3186/jjphytopath.62.544

15. Gardan L, Bollet C, Ghorrah MA, Grimont F, Grimont PAD. DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1992;42(4):606–612.
16. Popović T, Jelušić A, Dimkić I, Stanković S, Poštić D, Aleksić G, et al. Molecular Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* and Biochemical Changes Attributable to the Pathological Response on Its Hosts Carrot, Parsley, and Parsnip. *Plant Dis*. 2019;103(12):3072–3082. doi: 10.1094/PDIS-03-19-0674-RE
17. Rahi YJ, Turco S, Taratufolo MC, Tañi M, Cerboneschi M, Tegli S, et al. Genetic diversity and population structure of *Pseudomonas savastanoi*, an endemic pathogen of the Mediterranean area, revealed up to strain level by the MLVA assay. *J Plant Pathol*. 2020;102:1051–1064. doi: 10.1007/s42161-020-00589-0
18. Marques ASdA, Corbière R, Gardan L, Tourte C, Manceau C, Taylor JD, et al. Multiphasic Approach for the identification of the different classification levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. *European Journal of Plant Pathology*. 2000;106:715–734. doi: 10.1023/A:1026563831461
19. Grothues D, Rudolph K. Macrorestriction analysis of plant pathogenic *Pseudomonas* species and pathovars. *FEMS Microbiology Letters*. 1991;79(1):83–88. doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04509.x
20. Li L, Yuan L, Shi Y, Xie X, Chai A, Wang Q, et al. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* NM002: Insights into its potential virulence genes and putative invasion determinants. *Genomics*. 2019;111(6):1493–1503. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.10.004
21. Cross JE, Kennedy BW, Lambert JW, Cooper RL. Pathogenic races of bacterial blight pathogen of soybeans, *Pseudomonas glycinea*. *Plant Disease Report*. 1966;50(8):557–560.
22. Gnanamanickam SS, Ward EWB. Bacterial blight of soybeans: a new race of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and variations in systemic symptoms. *Can J Plant Pathol*. 1982;4(1):73–78. doi: 10.1080/07060668209501341
23. Prom LK, Venette JR. Races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* on Commercial Soybean in Eastern North Dakota. *Plant Dis*. 1997;81(5):541–544. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.5.541
24. Fett WF, and Sequeira L. Further characterization of the physiologic races of *Pseudomonas glycinea*. *Can J Bot*. 1981;59(3):283–287. doi: 10.1139/b81-040

#### Об авторах:

*Тараканов Рашид Ислямович* — ассистент, аспирант кафедры защиты растений, Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева, Российская Федерация, 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: tarakanov.rashit@mail.ru

ORCID: 0000-0002-3235-8467 SPIN: 9049–7157

*Евсеев Пётр Владимирович* — кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российская Федерация, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10; e-mail: petevseev@gmail.com

ORCID: 0000-0002-1646-9802 SPIN: 4275–9187

*Трошин Константин Сергеевич* — магистрант, младший научный сотрудник кафедры защиты растений, Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева, Российская Федерация, 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: konstantinetr@gmail.com

ORCID: 0009-0004-5018-1265 SPIN: 6032–4313

*Игнатов Александр Николаевич* — доктор биологических наук, профессор агробиотехнологического департамента, Российский университет дружбы народов, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; e-mail: an.ignatov@gmail.com

ORCID: 0000-0003-2948-753X SPIN: 3324–4985

*Джалилов Февзи Сеид-Умерович* — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой защиты растений, Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева, Российская Федерация, 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: labzara@mail.ru

ORCID: 0000-0002-5014-8375 SPIN: 3033–3991

**About authors:**

*Tarakanov Rashit Islyamovich* — assistant, PhD student, Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya st., Moscow, 127434, Russian Federation; e-mail: tarakanov.rashit@mail.ru

ORCID: 0000-0002-3235-8467 SPIN: 9049–7157

*Evseev Peter Vladimirovich* — Candidate of Biological Sciences, Researcher, Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 16/10 Miklouho-Maklaya st., Moscow, 117997, Russian Federation; e-mail: petevseev@gmail.com

ORCID: 0000-0002-1646-9802 SPIN: 4275–9187

*Troshin Konstantin Sergeevich* — Master student, Junior researcher, Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya st., Moscow, 127434, Russian Federation; e-mail: konstantinetr@gmail.com

ORCID: 0009-0004-5018-1265 SPIN: 6032–4313

*Ignatov Aleksandr Nikolaevich* — Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Agrobiotechnology, 6 Miklouho-Maklaya st., Moscow, 117198, RUDN University, Russian Federation; e-mail: an.ignatov@gmail.com

ORCID: 0000-0003-2948-753X SPIN: 3324–4985

*Dzhalilov Fevzi Seid-Umerovich* — Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya st., Moscow, 127434, Russian Federation; e-mail: labzara@mail.ru

ORCID: 0000-0002-5014-8375 SPIN: 3033–3991