

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-69

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ  
*R. ANDROPOGONIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ЗЛАКОВ**

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *R. ANDROPOGONIS* STRAINS ISOLATED  
FROM INFECTED CEREAL PLANTS**

А. Н. Игнатов<sup>1</sup>, Е. В. Матвиенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва

<sup>2</sup>Поволжский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства им. П. Н. Константинова, Кинель

A. N. Ignatov<sup>1</sup>, E. V. Matvienko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia named after P. Lumumba, Moscow

<sup>2</sup>Volga Research Institute of Plant Breeding and Seed Science, Kinel

✉ opel0076687@yandex.ru

**Аннотация**

Характерные симптомы бактериоза, вызываемого *Robbsia andropogonis* на растениях сорго и кукурузы, были обнаружены в двух областях Поволжья в 2018–2020 гг. Семь бактериальных изолятов с морфологией, сходной с *R. andropogonis*, были получены из пораженных листьев. Видовая принадлежность была доказана с помощью фенотипических тестов и секвенирования генов 16S рРНК, rpoD и gyrB.

**Abstract**

Characteristic symptoms of bacteriosis caused by *Robbsia andropogonis* on sorghum and maize plants were detected in two regions of the Volga region between 2018 and 2020. Seven bacterial isolates with morphology similar to *R. andropogonis* were obtained from affected leaves. Species affiliation was confirmed using phenotypic tests and sequencing of the 16S rRNA, rpoD and gyrB genes.

*Robbsia andropogonis* (син.: *Pseudomonas andropogonis* [1, 2]; *Burkholderia andropogonis*; *Paraburkholderia andropogonis* [3]) — фитопатоген, вызывающий экономические потери во всем мире. Впервые вызываемое им заболевание было описано как бактериальная полосатость листьев кукурузы (*Zea mays*), суданской травы (*Sorghum × drummondii*) и сорго (*S. bicolor*) [4, 5].

Патоген относится к группе грамотрицательных бактерий, обладает окислительным метаболизмом [5–8] и одним полярным жгутиком [9]. Молекулярная диагностика *R. andropogonis* не стандартизирована [10–13], и поэтому определение *R. andropogonis* проводится на основе комплекса морфологических, физиологических и генетических признаков. Патоген дает положительные реакции на каталазу и образование поли-β-гидроксипутирата, но отрицательные — на оксидазу, аргининдигидролазу, восстановление нитратов, образование флуоресцентного пигмента на агаре Кинга Б и на разжижение желатина.

Секвенирование одного или нескольких подходящих генетических маркеров может дать представление о таксономической структуре этой группы [14]. Считается, что последовательностей 16S рРНК, gyrB и rpoD достаточно для достоверной идентификации *R. andropogonis* [15].

В настоящем исследовании были проведены фенотипические и генотипические характеристики штаммов *R. andropogonis*, выделенных из инфицированных растений злаков.

**Отбор проб и выделение бактерий**

Характерные симптомы полосатости на листьях были обнаружены в областях Поволжья в 2018–2020 гг. Пораженные растения были собраны и доставлены в лабораторию, где листья с симптомами поверхностно стерилизовали 10%-м раствором коммерческого препарата «Белизна» (гипохлорит натрия) в течение 10 с с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Ткань листьев разрезали скальпелем на небольшие кусочки (2–3 мм в длину и ширину) и помещали в капли стерильной воды на 5 мин, дожидаясь выхода бактерий из листьев. Капли суспензии микробиологической петлей наносили на агаризованную среду Кинга В [16].

Инокулированные чашки Петри со средой инкубировали при 28 °С и проверяли на рост бактериальных колоний в течение 5 последующих дней. Колонии бактерий, морфологически сходных с *R. andropogonis* [17],

пересеивали для проверки их чистоты и сохраняли на среде YDC при температуре 4 °С до их окончательной идентификации (см. таблицу).

**Бактериальные штаммы, использованные в данном исследовании,  
и их происхождение, дата выделения и анализы диапазона хозяев**

№ штамма	Место и год выделения	Растение-хозяин	Вирулентность для					Доля сходства с соответствующими генами из генома штамма LMG 2129T*, %		
			<i>Zea mays</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>16S рPHK</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
1	2019	<i>Zea mays</i>	++	+	–	+	+	99,90	98,60	99,86
2	2019	<i>Zea mays</i>	++	+	–	+	+	99,80	98,71	99,90
3	2020	<i>Zea mays</i>	++	++	+	+	–	99,93	99,10	99,50
4	2020	<i>Zea mays</i>	++	+	–	+	+	99,96	99,30	99,32
5	2018	<i>Sorghum bicolor</i>	++	++	+	–	–	99,78	98,81	99,02
6	2019	<i>Sorghum bicolor</i>	++	++	+	+	–	99,93	98,91	99,42
7	2019	<i>Sorghum bicolor</i>	++	++	+	+	+	99,86	90,89	99,31
LMG 2129T	–	–	+	+	+	+	+	100,0	100,0	100,0

\* геном *Robbsia andropogonis* LMG 2129T — образец GCF\_902833845.1

**Фенотип бактериальных штаммов**

Все изоляты прошли первоначальное тестирование, включая выполнение теста Рю с 3 % КОН [18]. Оксидазу, гидролиз желатина, аргининдигидролазу и утилизацию источников углерода проводили в соответствии с ранее описанными методами [19]. Для теста на накопление поли-β-гидроксибутирата изоляты выращивали на среде с красителем Nile Blue (NB) [20] при 28 °С в течение 4 дней. Флуоресцентные включения наблюдали в длинноволновом ультрафиолетовом свете. Наличие гиперчувствительной реакции на листьях табака (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) проверяли после инъекции 10<sup>8</sup> КОЕ·мл<sup>-1</sup> в лист с помощью шприца и гиподермальной иглы в течение 48 ч.

**Тесты на патогенность и диапазон хозяев**

Все изоляты были использованы для заражения ряда потенциальных растений-хозяев. Молодые листья были инокулированы суспензией изолятов 10<sup>7</sup> КОЕ·мл<sup>-1</sup>. Для каждого изолята было протестировано по 4 растения каждого вида (см. таблицу). Стерильная вода была использована в качестве отрицательного контроля.

Листья инокулировали методом поверхностного нанесения суспензии бактерий с карборундом. Инокулированные и контрольные растения держали в климатической камере при постоянной температуре 28 °С и относительной влажности воздуха 80 % с 16-часовым фотопериодом.

**Литература**

1. Smith E. F. Bacteria in Relation to Plant Diseases // Carnegie Institution of Washington. Washington, DC, 1911. URL: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/60542>
2. Stapp C. Schizomycetes (Spaltpilze oder Bakterien) // Handb. Pflanzenkrankheiten. 1928. Vol. 2. P. 286–287.
3. Sawana A., Adeolu M. and Gupta R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus Burkholderia: Proposal for division of this genus into the emended genus Burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus Paraburkholderia gen. nov. harboring environmental species // Front. Genet. 2014. Vol. 5. P. 1–22. URL: <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>
4. Smith E. F. Bacteria in Relation to Plant Diseases // Carnegie Institution of Washington. Washington, DC, 1905. URL: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/20583>
5. Ullstrup J.A. Bacterial stripe of corn // Phytopathology. 1960. Vol. 50. P. 906–910.
6. Anderson D. Bacterial leaf spot of static caused by *Pseudomonas andropogonis* // Plant Dis. 1994. Vol. 78. P. 1218C. URL: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Abstracts/PD\\_78\\_1218C.htm](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Abstracts/PD_78_1218C.htm)
7. Caruso F.L. Bacterial blight of chickpea incited by *Pseudomonas andropogonis* // Plant Dis. 1984. Vol. 68. P. 910. URL: <https://doi.org/10.1094/PD-68-910>
8. Kobayashi D.Y. A bacterial leaf spot of highbush blueberry hardwood cuttings caused by *Pseudomonas andropogonis* // Plant Dis. 1995. Vol. 79. P. 839. URL: <https://doi.org/10.1094/PD-79-0839>
9. Lelliott R.A., Stead D.E. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants // Methods Plant Pathology. 1<sup>st</sup> Ed. Blackwell, Oxford, UK, 1987.

10. Fuerst J.A., Hayward A. C. The sheathed flagellum of *Pseudomonas stizolobii* // J. Gen. Microbiol. 1969. Vol. 58. P. 239–245. URL: <https://doi.org/10.1099/00221287-58-2-239>
11. Bagsic R. D., Fegan M., Li X. and Hayward A. C. Construction of species-specific primers for *Pseudomonas andropogonis* based on 16S rDNA sequences // Lett. Appl. Microbiol. 1995. Vol. 21. P. 87–92. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01013.x>
12. Duan Y.P., Sun X., Zhou L. J. et al. Bacterial brown leaf spot of citrus, a new disease caused by *Burkholderia andropogonis* // Plant Dis. 2009. Vol. 93. P. 607–614. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0607>
13. Salles J. F., De Souza F.A. and Van Elsas J. D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. P. 1595–1603. URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1595-1603.2002>
14. Slischuk H., Volkova N., Zakharova O. et al. *Robbsia andropogonis* molecular diagnostics markers design using bioinformatical approaches // International Congress on Oil and Protein Crops. Chişinău, Moldova, 2018.
15. Mehan-Llontop M. E., Tian L., Bernal-Galeano V. et al. Assessing the potential of culture-independent 16S rRNA microbiome analysis in disease diagnostics: the example of *Dianthus gratianopolitanus* and *Robbsia andropogonis* // Eur. J. Plant Pathol. 2019. Vol. 155. P. 1211–1223. URL: <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01850-8>
16. Tayeb L.A., Lefevre M., Passet V. et al. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences // Res. Microbiol. 2008. Vol. 159. P. 169–177. URL: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.005>
17. King E. O., Ward M. K. and Raney D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein // J. Lab. Clin. Med. 1954. Vol. 44. P. 301–307.
18. Schaad N. W., Jones J. B. and Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN, 2001. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2338.1997.tb00648.x>
19. Ryu E. A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining // Kitasato Arch. Exp. Med. 1940. Vol. 17. P. 58–63. URL: <https://www.cabdirect.org/?target=%2fcabdirect%2fabstract%2f19412200657>
20. Pierce L., Schroth M. N. Detection of *Pseudomonas* colonies that accumulate poly-beta-hydroxybutyrate on Nile blue medium // Plant Dis. 1994. Vol. 78. P. 683–685. URL: <https://doi.org/10.1094/PD-78-0683>