

Применение теста на патогенность возбудителя бактериального ожога гороха

И.М. ИГНАТЬЕВА¹, О.Ю. СЛОВАРЕВА²,
И.Г. БАШКИРОВА³

^{1,2,3} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

³ ФGAOU VO «Российский университет дружбы народов» (ФGAOU VO «РУДН»), г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0003-1047-0105,
e-mail: babiraignirmi@ya.ru

² ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

³ ORCID 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkiroid@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Возбудитель бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) Young et al. (*P. s.* pv. *pisi*) является основным фитопатогеном гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Национальные организации по карантину и защите растений (НОКЗР) требуют надежных методов подтверждения отсутствия возбудителя бактериоза. Цель данной работы – изучение возможности применения теста на патогенность в диагностике возбудителя бактериального ожога гороха. В ходе апробации теста использовали растения гороха сорта Пионер, штамм *P. s.* pv. *pisi* CFBP 2105, набор «Проба-ГС», произведенный ООО «АгроДиагностика» (Россия), и праймеры AN7F/AN7R (Qing Ch. et al., 2016). После предварительных испытаний предложенный тест на патогенность может быть использован для определения вирулентности изолята, а также может быть предложен в качестве одного из дополнительных подтверждающих методов идентификации фитопатогена в исследуемом образце при разработке методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителя ожога гороха.

Ключевые слова. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, разработка методических рекомендаций, инокуляция, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный ожог гороха, вызванный *P. s.* pv. *pisi*, впервые был идентифицирован в 1915 г. в Колорадо, США (Sackett, 1916), и впоследствии был выявлен во многих странах, где развито производство гороха (Martín-Sanz A. et al., 2011; Martín-Sanz A. et al., 2012).

Using a pathogenicity test for the diagnosis of the bacterial pea blight agent

I.M. IGNATYEVA¹, O.YU. SLOVAREVA²,
I.G. BASHKIROVA³

^{1,2,3} FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

³ FGAOU VO “Peoples’ Friendship University of Russia” (FGAOU VO “RUDN”), Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0003-1047-0105,
e-mail: babiraignirmi@ya.ru

² ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

³ ORCID 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkiroid@mail.ru

ABSTRACT

The agent of the bacterial pea blight, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) Young et al. (*P. s.* pv. *pisi*), is a main phytopathogen of pea (*Pisum sativum* L.). National Plant Protection Organizations (NPPOs) require reliable techniques to confirm the absence of the bacterial blight agent. The aim of this work is to study the possibility of applying a pathogenicity test for the diagnosis of the bacterial pea blight agent. During the approbation of the test, we used pea plants of the Pioneer variety, strain *P. s.* pv. *pisi* CFBP 2105, “Proba-GS” kit produced by LLC “AgroDiagnostika” (Russia), and the primers AN7F/AN7R (Qing Ch. et al., 2016). After preliminary tests, the proposed test for pathogenicity can be used to determine the virulence of the isolate, and can also be proposed as one of the additional confirmatory methods for identifying a phytopathogen in a test sample when developing guidelines for detecting and identifying the causative agent of the bacterial pea blight.

Key words. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, development of guidelines, inoculation, polymerase chain reaction (PCR).

INTRODUCTION

Bacterial pea blight caused by *P. s.* pv. *pisi* was first identified in Colorado, USA (Sackett, 1916), in 1915, and later it was detected in many countries where pea is produced (Martín-Sanz A. et al., 2011; Martín-Sanz A. et al., 2012). The pest is included in the Quarantine

Патоген включен в Карантинный перечень (список ограниченно распространенных карантинных видов) стран Восточной Африки (2001) и в Карантинный перечень Межафриканского фитосанитарного совета (IAPSC) (1989); в список карантинных вредных организмов, отсутствующих на территории Боливии, Парагвая, Перу, Чили (COSAVE) (2019); является карантинным организмом для Израиля и Туниса. Распространяясь с посевным материалом, зараженным бактериальной инфекцией в латентном состоянии, бактериоз значительно расширил свой ареал за последние годы. Вид включен в карантинный перечень ряда стран – импортеров гороха из РФ (Китай, Турция). Это ограничивает экспортный потенциал РФ. Основными покупателями российского гороха в январе – июле 2019 г. являлись: Турция – 20,8% (70 тыс. тонн), Пакистан – 17,5% (58,9 тыс. тонн), Индия – 16,7% (56,3 тыс. тонн), Италия – 10,0% (33,5 тыс. тонн), Бангладеш – 7,8% (26,2 тыс. тонн), Испания – 6,4% (21,5 тыс. тонн), Объединенные Арабские Эмираты – 3,3% (11,2 тыс. тонн), Германия – 2,9% (9,9 тыс. тонн), Египет – 2,6% (8,8 тыс. тонн), Непал – 2,2% (7,6 тыс. тонн). Экспортные поставки гороха из России в 2018 г. находились на отметке в 1143,7 тыс. тонн. По сравнению с 2017 г. в 2018 г. объемы увеличились на 9,7% (на 100,9 тыс. тонн), с 2013 г. – на 240,3% (на 807,6 тыс. тонн) (АБ Центр, 2019; Игнатьева и др., 2021; Akhtar M. A. et al., 1985; Benlioglu K. et al., 2010). На данное время ведутся фитосанитарные согласования по экспорту гороха в Китай.

После сбора урожая фитопатоген сохраняется в семенах. В случае высокой степени заражения семян могут наблюдаться симптомы как на самих всходах, так и на семенах. Симптомы болезни – маленькие, неправильной формы водянистые повреждения на листьях, черешках и стручках, распространяющиеся в стебли и часто сопровождающиеся некрозом (Ali M. et al., 2015). В дальнейшем инфекция в стеблях может распространиться вверх на другие прилистники и листья. С развитием заболевания зоны поражения разрастаются, растения усыхают и в итоге погибают. В условиях, подходящих для проникновения бактерий в ткани растений, распространение может происходить по всему полю. Чаще всего заражению способствуют иней, град или любой вид повреждения, облегчающий проникновение бактерии через поранения растений, за счет переноса фитопатогена с ветром на здоровые растения. Ранняя и достоверная диагностика *P. s. pv. pisi* предотвращает распространение патогена на новые территории Российской Федерации. Для определения распространения фитопатогена в РФ и установления зон, свободных от вредного организма, необходимо научное обследование посевных площадей. В связи со всем вышесказанным является актуальной разработка методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *P. s. pv. pisi*. Тест на патогенность может быть предложен в качестве одного из дополнительных подтверждающих методов идентификации фитопатогена в исследуемом образце при разработке методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителя ожога гороха, ранее идентифицированного с помощью молекулярных методов диагностики.

List (list of limitedly present quarantine species) of East African countries (2001) and the Inter-African Phytosanitary Council Quarantine List (IAPSC) (1989); the List of quarantine pests absent in Bolivia, Paraguay, Peru, Chile (COSAVE) (2019); it is a quarantine pest for Israel and Tunisia. Spreading with plants for planting infected with a bacterial infection in a latent state, the bacteriosis has significantly expanded its area in recent years. The species is included in the quarantine list of a number of countries importing peas from the Russian Federation (China, Turkey). This limits the export potential of the Russian Federation. The main buyers of Russian peas in January – July 2019 were: Turkey – 20.8% (70 thousand tons), Pakistan – 17.5% (58.9 thousand tons), India – 16.7% (56, 3 thousand tons), Italy – 10.0% (33.5 thousand tons), Bangladesh – 7.8% (26.2 thousand tons), Spain – 6.4% (21.5 thousand tons), United Arab Emirates – 3.3% (11.2 thousand tons), Germany – 2.9% (9.9 thousand tons), Egypt – 2.6% (8.8 thousand tons), Nepal – 2.2% (7.6 thousand tons). Export deliveries of peas from Russia in 2018 were at around 1,143.7 thousand tons. Compared to 2017, in 2018 the volumes increased by 9.7% (by 100.9 thousand tons), since 2013 – by 240.3% (by 807.6 thousand tons) (AB Center, 2019; Ignatyeva et al., 2021; Akhtar M. A. et al., 1985; Benlioglu K. et al., 2010). Phytosanitary agreements concerning the export of peas to China are being discussed.

After harvest, the phytopathogen remains in the seeds. In the case of a high degree of seed infestation, symptoms can be observed both on the seedlings themselves and on the seeds. Symptoms include small, irregular, watery lesions on leaves, petioles, and pods that extend into the stems and are often accompanied by necrosis (Ali M. et al., 2015). The infection in the stems can later spread upward to other stipules and leaves. With the development of the disease, the affected areas grow, the plants dry out and eventually die. Under conditions suitable for the penetration of bacteria into plant tissue, spreading can occur throughout the field. Most often, frost, hail, or any kind of damage that facilitates the penetration of bacteria through lesions to plants, due to the transfer of the phytopathogen with the wind to healthy plants, contributes to the infection. Early and reliable diagnosis of *P. s. pv. pisi* prevents the spread of the pathogen to new territories of the Russian Federation. To determine the spread of the phytopathogen in the Russian Federation and establish areas free from the pest, a scientific examination of the cultivated areas is necessary. Considering all of the stated above, it is relevant to develop guidelines for the detection and identification of the bacterial pea blight agent *P. s. pv. pisi*. The pathogenicity test can be proposed as one of the additional confirmatory methods for the identification of a phytopathogen in the sample under study when developing guidelines for the detection and identification of the bacterial pea blight agent, previously identified with molecular diagnostic methods.

MATERIALS AND METHODS

When conducting the research, a bacterial culture of the reference bacterial strain CFBP 2105 *P. s. pv. pisi* was used from the French collection of bacteria

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении исследований использовали бактериальную культуру референтного штамма бактерии CFBP 2105 *P. s. pv. pisi* из Французской коллекции бактерий фитопатогенов (Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes (CFBP), Франция). С целью апробации теста на патогенность проводили заражение растений гороха сорта Пионер штаммом CFBP.

При выборе сорта гороха отталкивались от сроков созревания культуры. Важно провести тест в кратчайшие сроки, не задерживая сроки диагностики фитопатогена в исследуемом образце. В исследовании был использован сорт гороха овощного Пионер (код сорта 9900993; год регистрации 2001; оригинатор Spojnia-Hodowla I Nasiennictwo Ogrodnicze SP. Z.O.O., W. Nochowice, 63-100, Srem, Poland; срок созревания очень ранний; сорт устойчив к вирусу желтой мозаики фасоли). В список очень ранних сортов гороха овощного, которые также могут быть использованы при проведении данного теста, включены Ария, Корвин, Никитка, Оскар, Прима, Спринтер (сорт относительно устойчив к корневым гнилям) и Увертюра (Государственный реестр, 2019).

Провели посев 60 шт. семян гороха, предварительно замоченных в стерильной дистиллированной воде в течение суток. Каждое семя помещали в отдельную ячейку кассеты для рассады емкостью 90 мл, в качестве грунта использовали готовую смесь из верхового и низинного торфа, известняковой доломитовой муки, нитроаммофосфата и речного песка. В период получения всходов, а также на протяжении всего опыта применяли следующие условия: продолжительность освещения – 16 ч., температура – 25–27 °С, относительная влажность воздуха – 55–70%.

Заражение растений в фазе 2–3 листьев суточной культурой *P. s. pv. pisi* проводили на 11-й день. Для заражения одного растения использовали 10 мкл бактериальной суспензии в концентрации 10⁶ КОЕ/мл. Метод заражения заключался в несквозном прокалывании основания листа и нанесении с помощью дозатора капли суспензии на место прокола (рис. 1) (International Seed Federation, 2020). В качестве отрицательного контроля заражения использовали стерильную дистиллированную воду. Растения, зараженные *P. s. pv. pisi* (50 шт.), пространственно изолировали от растений, представляющих собой отрицательный контроль заражения (10 шт.). Наблюдения за растениями проводили ежедневно.

Для подтверждения заражения проводили отбор и подготовку аналитических проб на 22-й день. Отдельные пробы брали от каждого из 10 зараженных растений и от одного растения, представляющего собой отрицательный контроль. Растение отделяли от корневой системы и измельчали с помощью скальпеля. К пробе добавляли 20–30 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), после чего пробу помещали на ротационный шейкер и устанавливали режим 200 об/мин, встряхивали от 30 до 40 мин. Полученный мацерат фильтровали через бумажный фильтр с диаметром пор 3–5 мкм в пробирку объемом 50 мл. Пробирки уравнивали попарно буфером, который использовали для мацерации, и центрифугировали в течение 10 мин. при 8000–10000 об/мин при температуре от 4 до 10 °С, используя центрифугу

phytopathogens (Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes (CFBP), France). In order to test the pathogenicity test, pea plants of the Pioneer variety were infected with the CFBP strain.

Choosing pea cultivars was based on the timing of the ripening of the culture. It is important to carry out the test as soon as possible, without delaying the diagnosis of the phytopathogen in the test sample. The study used the vegetable pea variety Pioneer (cultivar code 9900993; year of registration 2001; originator Spojnia-Hodowla I Nasiennictwo Ogrodnicze SP. Z.O.O., W. Nochowice, 63-100, Srem, Poland; ripening period is very early; variety resistant to yellow mosaic bean virus). The list of very early varieties of vegetable peas that can also be used in this test includes Aria, Corvin, Nikitka, Oscar, Prima, Sprinter (the variety is relatively resistant to root rot) and Overture (State Register, 2019).

60 pea seeds were sown, pre-soaked in sterile distilled water for 24 hours. Each seed was placed in a separate cell of a seedling cassette with a capacity of 90 ml; a ready-made mixture of high and low peat, limestone dolomite flour, nitroammophosphate and river sand was used as a soil. During the germination period, as well as throughout the entire experiment, the following conditions were used: duration of illumination – 16 h., temperature – 25–27 °C, and relative air humidity – 55–70%.

Infection of plants in the phase of 2–3 leaves with a daily culture of *P. s. pv. pisi* was performed on the 11th day. To infect one plant, 10 µl of a bacterial suspension at a concentration of 10⁶ CFU/ml was used. The method of infection consisted in blind piercing of the base of the leaf and applying a drop of suspension to



Рис. 1. Капли суспензии *P. s. pv. pisi*, нанесенные на места проколов оснований листьев растений гороха (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 1. Suspension drops of *P. s. pv. pisi* applied to the puncture sites of the bases of the leaves of pea plants (photo by O.Yu. Slovarева)



Рис. 2. Симптомы увядания на верхней части инокулированного листа гороха через 7 суток после заражения *P. s. pv. pisi* (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 2. Wilting symptoms on the top of the inoculated pea leaf 7 days after infection with *P. s. pv. pisi* (photo by O.Yu. Slovaeva)

с охлаждением Allegra X-30R (Beckman Coulter, Дания). После центрифугирования супернатант осторожно удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS. От каждой пробы отбирали 200 мкл и использовали для экстракции ДНК с помощью набора «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика», Россия) и для проведения ПЦР с праймерами AN7F/AN7R, специфичными для *P. s. pv. pisi* (Qing Ch. et al., 2016). Для контроля ингибирования амплификации использовали смесь плазмиды и праймеров Mus714F/Mus714R (Мазурин и др., 2012). Классическую ПЦР с праймерами и с внутренним положительным контролем проводили в отдельных пробирках для каждого образца, используя амплификатор T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Детекцию продуктов амплификации проводили, используя камеру для горизонтального электрофореза SE-2 (ООО «Хеликон», Россия), источник тока для электрофореза «Эльф» (ООО «ДНК-Технология», Россия) и гель-документирующую систему ChemiDoc (Bio-Rad, США).

Дополнительно в течение 21 суток (со дня заражения) с целью выявления симптомов заражения продолжали наблюдения за растениями, от которых пробы не отбирали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение всего периода с момента заражения растений гороха суспензией *P. s. pv. pisi* до этапа отбора аналитических проб проводили наблюдения за развитием симптомов бактериального ожога гороха. Первые симптомы заражения отмечены на 18-й день, через 7 суток после инокуляции растений суспензией возбудителя бактериоза. На верхней части листа, в которой проводили инокуляцию, отмечены симптомы увядания (рис. 2). На растениях, инокулированных стерильной дистиллированной водой, отсутствовали признаки увядания и иные симптомы заболевания.

the puncture site using a dispenser (Fig. 1) (International Seed Federation, 2020). Sterile distilled water was used as a negative control of infection. Plants infected with *P. s. pv. pisi* (50 pieces) were spatially isolated from plants representing negative control of infection (10 pieces). Plants were observed daily.

To confirm the infection, the samples under study were taken and prepared on the 22nd day. Separate samples were taken from each of the 10 infected plants and from one plant, which is a negative control. The plant was separated from the root system and cut with a scalpel. 20–30 ml of phosphate-buffered saline (PBS) was added to the sample, after which the sample was placed on a rotary shaker and set to 200 rpm and shaken for 30 to 40 min. The resulting macerate was filtered through a paper filter with a pore diameter of 3–5 μm into a 50 ml test tube. The tubes were equilibrated in pairs with the maceration buffer and centrifuged for 10 min. at 8000–10000 rpm at a temperature of 4 to 10 °C using an Allegra X-30R refrigerated centrifuge (Beckman Coulter, Denmark). After centrifugation, the supernatant was carefully removed and the pellet was resuspended in 1 ml PBS. 200 μL was taken from each sample and used for DNA extraction using the Proba-GS kit (AgroDiagnostika, Russia) and for PCR with AN7F/AN7R primers specific for *P. s. pv. pisi* (Qing Ch. et al., 2016). To control the inhibition of amplification, a mixture of plasmid and primers Mus714F/Mus714R was used (Mazurin et al., 2012). Classical PCR with primers and with an internal positive control was performed in separate tubes for each sample using a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Amplification products were detected using an SE-2 horizontal electrophoresis chamber (Helikon, Russia), an Elf electrophoresis current source (DNA-Technology, Russia) and a ChemiDoc gel documenting system (Bio-Rad, USA).

Additionally, in order to identify symptoms of infection, the plants from which samples were not taken were still observed for 21 days (from the day of infection).

RESULTS AND DISCUSSION

During the entire period from the moment of infection of pea plants with a *P. s. pv. pisi*, prior to the stage of taking samples for studying, the development of the bacterial pea blight symptoms was monitored. The first symptoms of infection were noted on the 18th day, 7 days after inoculation of plants with a suspension of the bacteriosis causative agent. Symptoms of wilting were noted on the upper part of the inoculated leaf (Fig. 2). Plants inoculated with sterile distilled water showed no signs of wilting and other symptoms of the disease.

11 days after infection, wilting symptoms were noted both on the entire area of inoculated leaves of pea plants and on the leaves located below (Fig. 3). There were no signs of wilting and other symptoms of the disease on plants inoculated with sterile distilled water. As a result of PCR with primers AN7F/AN7R for DNA samples isolated from inoculated plants, products with a length of 272 base pairs (bp) were obtained, which corresponded to a positive control of amplification, for which the DNA of *P. s. pv. pisi* was used (Fig. 4).

Через 11 суток после заражения симптомы увядания отмечены как на всей площади инокулированных листьев растений гороха, так и на листьях, расположенных ниже (рис. 3). Признаки увядания и иные симптомы заболевания отсутствовали на растениях, инокулированных стерильной дистиллированной водой. В результате проведенной ПЦР с праймерами AN7F/AN7R для образцов ДНК, выделенной из инокулированных растений, получены продукты длиной 272 пары оснований (п. о.), что соответствовало положительному контролю амплификации, в качестве которого использовали ДНК *P. s. pv. pisi* (рис. 4).

Для отрицательного контроля заражения (растение, инокулированное стерильной дистиллированной водой) и для отрицательных контролей выделения ДНК, а также для проведения ПЦР продукт амплификации с праймерами AN7F/AN7R отсутствовал. Для всех образцов и контролей в результате ПЦР с внутренним положительным контролем получены продукты амплификации длиной 714 п. о., что свидетельствует об отсутствии ингибирования ПЦР-реакции (рис. 4). Полученные результаты ПЦР позволяют сделать вывод о том, что возбудитель бактериального ожога гороха через 11 суток после заражения присутствовал в растениях, инокулированных бактериальной суспензией, и отсутствовал в растениях, инокулированных стерильной дистиллированной водой.

В течение последующих 10 суток после подтверждения заражения методом ПЦР отмечали развитие заболевания на инокулированных суспензией возбудителя растениях гороха. Спустя 21 сутки после заражения отмечено увядание всего растения целиком и гибель 14 растений из 40 (рис. 5). На других 26 зараженных растениях отмечали наличие симптомов в виде увядания нижних листьев, малообширных хлорозов и краевых ожогов белого цвета (рис. 6). В то же время среди 9 растений, инокулированных стерильной дистиллированной водой, не отмечено симптомов заболевания.



Рис. 3. Симптомы увядания на нижних листьях гороха через 11 суток после заражения *P. s. pv. pisi* (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 3. Wilting symptoms on the lower leaves of peas 11 days after infection with *P. s. pv. pisi* (photo by O.Yu. Slovarева)

For negative control of infection (plant inoculated with sterile distilled water) and for negative controls of DNA extraction, as well as for PCR, the amplification product with primers AN7F/AN7R was absent. For all samples and controls, as a result of PCR with an internal positive control, amplification products of 714 bp in length were obtained, which indicates the absence of inhibition of the PCR reaction (Fig. 4). The obtained PCR results allow us to conclude that the causative agent of bacterial pea blight was present in plants inoculated with a bacterial suspension 11 days after infection, and was absent in plants inoculated with sterile distilled water.

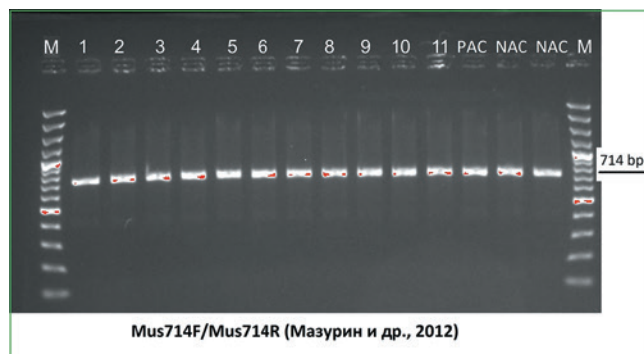


Рис. 4. Электрофореграмма, демонстрирующая результат ПЦР с праймерами AN7F/AN7R (Qing Ch. et al, 2016) для *P. s. pv. pisi* и Mus714F/Mus714R (Мазурин и др., 2012) для внутреннего положительного контроля ПЦР. 1 – отрицательный контроль заражения, 2–11 – зараженные растения гороха, PAC – положительный контроль амплификации, NAC – отрицательный контроль амплификации. 1 деление маркера генетического веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, США) (M) = 100 п. о.

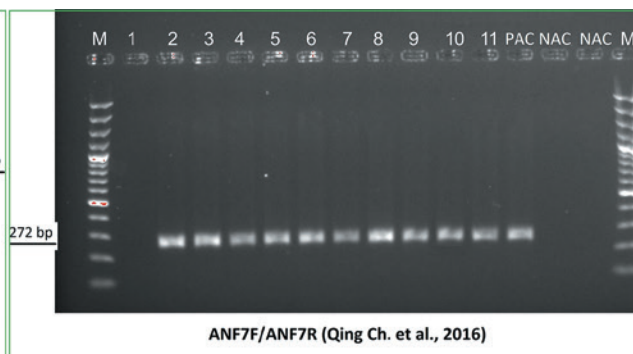


Fig. 4. Electrophoregram showing the result of PCR with primers AN7F/AN7R (Qing Ch. Et al, 2016) for *P. s. pv. pisi* and Mus714F/Mus714R (Mazurin et al., 2012) for internal positive PCR control. 1 – negative control of infection, 2–11 – infected pea plants, PAC – positive amplification control, NAC – negative amplification control. 1 division of the genetic weight marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, USA) (M) = 100 bp.



Рис. 5. Гибель растений гороха спустя 21 сутки с момента заражения *P. s. pv. pisi* (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 5. The death of pea plants 21 days after infection with *P. s. pv. pisi* (photo by O.Yu. Slovarева)



Рис. 6. Симптомы заболевания растений гороха спустя 21 сутки с момента заражения *P. s. pv. pisi* (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 6. Symptoms of the disease of pea plants 21 days after infection with *P. s. pv. pisi* (photo by O.Yu. Slovarева)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования проведена апробация теста на патогенность возбудителя бактериально-огожа гороха *P. s. pv. pisi*. В ходе работы установлено, что видимые симптомы заражения растений гороха могут быть получены не ранее чем через 7 суток после инокуляции растений при указанных условиях, таких как концентрация возбудителя в инокулянте, фенологическая фаза растений, условия освещения, температуры и влажности. Через 10 суток после инокуляции возможно подтверждение заражения молекулярными методами при тестировании экстрактов растений. Проведенное исследование показывает, что *P. s. pv. pisi* в условиях искусственного заражения может вызывать видимые симптомы заболевания на растениях гороха посевного, в ряде случаев приводя к их гибели.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. «Сорта растений» (официальное издание). – М: ФГБНУ «Росинформагротех», 2019, 516 с.
2. Игнатьева И., Словарева О., 2021. Применение метода ПЦР для идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* в семенном и растительном материале зернобобовых культур. – Сборник материалов 11-й Всероссийской конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур». – Краснодар, 182–186.
3. Мазурин Е., Копина М., Шероколава Н., 2012. Контроль достоверности результатов фитосанитарной экспертизы при использовании молекулярных методов диагностики. – Вестник РУДН, № 3: 31–38.
4. Akhtar M., Aslam M., 1985. Outbreaks and new records. Pakistan. Bacterial blight of pea caused

During the next 10 days after confirmation of infection by PCR, the development of the disease was noted on pea plants inoculated with a suspension of the pathogen. Twenty-one days after infection, the whole plant withered and 14 out of 40 plants died (Fig. 5). On the other 26 infected plants, symptoms were noted in the form of wilting of the lower leaves, small-scale chlorosis, and white marginal burns (Fig. 6). At the same time, among 9 plants inoculated with sterile distilled water, no symptoms of the disease were noted.

CONCLUSION

As a result of the study, the pathogenicity test of the bacterial pea blight agent, *P. s. pv. pisi*, was approved. During the work, it was found that visible symptoms of infection of pea plants can be obtained no earlier than 7 days after inoculation of plants under specified conditions, such as the concentration of the pathogen in the inoculant, phenologi-

cal phase of plants, lighting conditions, temperature and humidity. 10 days after inoculation, it is possible to confirm the infection by molecular methods when testing plant extracts. The study shows that *P. s. pv. pisi* under conditions of artificial infection can cause visible symptoms of the disease on pea plants, in some cases leading to their death.

REFERENCES

1. State register of breeding achievements approved for use. V. 1. “Plant varieties” (official publication). M. FGBNU «Rosinformagrotekh», 2019; 516 pp. (in Russian).
2. Ignatyeva I., Slovarева O. The application of the PCR method for identification of the bacterial pea blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* in seed and plant material of leguminous crops [Primeneniye metoda PTSR dlya identifikatsii vozбудitelya bakterialnogo ozhoga gorokha *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* v semennom i rastitelnom materiale zernobobovykh kultur]. Collection of materials of the 11th All-Russian conference of young scientists and specialists “Topical issues of biology, selection, technology of cultivation and processing of agricultural crops.” Krasnodar, 2021; 182–186 (in Russian).
3. Mazurin E., Kopina M., Sherokolava N. Controlling the reliability of results received during laboratory testing for phytosanitary purposes when molecular diagnostic methods are used [Kontrol dostovernosti rezultatov fitosanitarной ekspertizy pri ispolzovanii molekulyarnykh metodov diagnostiki]. *RUDN Bulletin*, 2012; 3: 31–38 (in Russian).
4. Akhtar M., Aslam M. Outbreaks and new records. Pakistan. Bacterial blight of pea caused by

by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. – FAO Plant Protection Bulletin, 33 (2): 75–76.

5. Ali M., Raja M., Irshad G., Zafar K., Hasan M., Shaheen F., 2015. Isolation and characterization of seedborne *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from pea (*Pisum sativum* L.). – Asian J Agribiol, 3 (3): 78–83.

6. Benlioglu K., Ozyilmaz U., Ertan D., 2010. First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on pea in Turkey. – Plant Disease, 94 (7): 923.

7. Martín-Sanz A., Palomo J., Pérez de la Vega M. et al., 2011. Identification of pathovars and races of *Pseudomonas syringae*, the main causal agent of bacterial diseases in pea in North-Central Spain, and the search for resistance. – European Journal of Plant Pathology, 129: 57–69.

8. Martín-Sanz A., Pérez de la Vega M., Murillo J. et al., 2012. Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* strains. – Plant Pathology, 61: 1063–1072.

9. Sackett W., 1916. A bacterial stem blight of field garden peas. – Bulletin of the Colorado Agricultural Experimental Station, 217: 3–43.

10. Qing Ch., Jun-ting Q., Zhen-ji L., Zhi-peng F., Fu-rong L., Hong-yun C., Jian-ping Y., 2016. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from imported Canadian pea seeds. – Acta Phytopathologica Sinica, 46 (2): 169–175.

11. АБ Центр, 2019. Экспорт гороха из России в 2001–2019 гг. – URL: <https://ab-centre.ru/news/eksport-goroha-iz-rossii-v-2001-2019-gg> (дата обращения: 19.04.2021).

12. El Comité de Sanidad Vegetal (COSAVE), 2019. Lista de Plagas Cuarentenarias para la Región del COSAVE. – URL: http://www.cosave.org/sites/default/files/paginas/adjuntos/An.Res_N%C2%B0266_LISTA%20DE%20PLAGAS%20CATEGORIA%20I%20y%20II%20-%20SEPT%202019.pdf (дата обращения: 12.04.2021).

13. EPPO Global Database. Inter-African Phytosanitary Council (IAPSC). Categorization. – <https://gd.eppo.int/rppo/IAPSC/categorization> (дата обращения: 19.04.2021).

14. International Seed Federation, 2020. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on Pea Seed. – URL: https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2021/02/Protocol_Pea_Psp_December-2020.pdf (дата обращения: 01.02.2021).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Игнатьева Ирина Михайловна, научный сотрудник лаборатории бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0003-1047-0105, e-mail: babiraignirmi@ya.ru.

Словарева Ольга Юрьевна, младший научный сотрудник отдела организации межлабораторных сличительных испытаний ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-6022-5955, e-mail: slovareva.olga@gmail.com.

Башкирова Ида Геннадьевна, младший научный сотрудник лаборатории бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; аспирант ФГАОУ ВО «РУДН», г. Москва, Россия; ORCID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirovaaid@mail.ru.

Pseudomonas syringae pv. *pisi*. FAO Plant Protection Bulletin, 1985; 33 (2): 75–76.

5. Ali M., Raja M., Irshad G., Zafar K., Hasan M., Shaheen F. Isolation and characterization of seedborne *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from pea (*Pisum sativum* L.). *Asian J Agribiol*, 2015; 3 (3): 78–83.

6. Benlioglu K., Ozyilmaz U., Ertan D. First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on pea in Turkey. *Plant Disease*, 2010; 94 (7): 923.

7. Martín-Sanz A., Palomo J., Pérez de la Vega M. et al. Identification of pathovars and races of *Pseudomonas syringae*, the main causal agent of bacterial diseases in pea in North-Central Spain, and the search for resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 2011; 129: 57–69.

8. Martín-Sanz A., Pérez de la Vega M., Murillo J. et al. Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* strains. *Plant Pathology*, 2012; 61: 1063–1072.

9. Sackett W. A bacterial stem blight of field garden peas. *Bulletin of the Colorado Agricultural Experimental Station*, 1916; 217: 3–43.

10. Qing Ch., Jun-ting Q., Zhen-ji L., Zhi-peng F., Fu-rong L., Hong-yun C., Jian-ping Y. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from imported Canadian pea seeds. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2016; 46 (2): 169–175.

11. АБ Center. Export of peas from Russia in 2001–2019. 2019. URL: <https://ab-centre.ru/news/eksport-goroha-iz-rossii-v-2001-2019-gg> (last accessed: 19.04.2021).

12. El Comité de Sanidad Vegetal (COSAVE), 2019. Lista de Plagas Cuarentenarias para la Región del COSAVE. URL: http://www.cosave.org/sites/default/files/paginas/adjuntos/An.Res_N%C2%B0266_LISTA%20DE%20PLAGAS%20CATEGORIA%20I%20y%20II%20-%20SEPT%202019.pdf (last accessed: 12.04.2021).

13. EPPO Global Database. Inter-African Phytosanitary Council (IAPSC). Categorization. <https://gd.eppo.int/rppo/IAPSC/categorization> (last accessed: 19.04.2021).

14. International Seed Federation, 2020. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on Pea Seed. URL: https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2021/02/Protocol_Pea_Psp_December-2020.pdf (last accessed: 01.02.2021).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina Ignatyeva, Researcher, Bacteriology and GMO Analysis Laboratory, Laboratory Testing Center, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-1047-0105, e-mail: babiraignirmi@ya.ru.

Olga Slovareva, Junior Researcher, Bacteriology and GMO Analysis Laboratory, Laboratory Testing Center, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-6022-5955, e-mail: slovareva.olga@gmail.com.

Ida Bashkirova, Junior Researcher, Bacteriology and GMO Analysis Laboratory, Laboratory Testing Center, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; Post-graduate student of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “RUDN”, Moscow, Russia; ORCID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirovaaid@mail.ru.