

As a manuscript

MUVINGI MUFARO

**DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF METHODS FOR DETECTION AND
IDENTIFICATION OF BACTERIOSES SIGNIFICANT FOR THE EXPORT AND IMPORT
OF RUSSIAN GRAIN PRODUCTS**

Specialty: 4.1.3 Agrochemistry, Agrosoil Science, Plant Protection and Quarantine

ABSTRACT

Dissertation for an academic degree
Candidate of Agricultural Sciences

Moscow – 2024

The work was carried out at the Agrarian and Technological Institute of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia" (RUDN University) of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and on the basis of the Scientific and Methodological Department of Bacteriology of the All-Russian Plant Quarantine Center

Supervisors: **Zargar Meisam**, Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the Agrobiotechnological Department of ATI RUDN University
Slovareva Olga Yurevna, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher-Acting Head of the Scientific and Methodological Department of Bacteriology of the Federal State Budgetary Institution "All-Russian Plant Quarantine Center»

Official opponents: **Glinushkin Alexey Pavlovich**, Doctor of Agricultural Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher at the N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry of the Russian Academy of Sciences
Shuklina Olga Alexandrovna, Candidate of Agricultural Sciences, Acting Head of the Department, Senior Researcher at the P. V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences.

Lead organization: **Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Vegetable Center**

The defense will take place on September 16, 2024 ...hrs at the meeting of the Dissertation Council of the PDS 2021.002 at the Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba at the address: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya Street, 8, building 2, hall 2.

The dissertation can be found in the library at the UNIBC (Scientific Library) of the Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia at the address: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya Street, 6 and on the site: <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Abstract sent out by " __ " _____ 2024

Acting Academic Secretary
of the Dissertation Council of the PDS 2021.002,
Doctor of Biological Sciences,
Professor, Agrobiotechnological Department

Ignatov A. N.

GENERAL CHARACTERISTICS OF THE WORK

Relevance of the work. Plant products can transmit dangerous phytopathogenic bacteria that can cause the loss of up to 100% of the yield of valuable crops and thus lead to significant economic damage. Due to the high phytosanitary risk, such bacteria are included in the list of quarantine objects and regulated at the legislative level. At the same time, one of the tasks of the federal project "Export of Agricultural Products" is "Elimination of trade barriers (tariff and non-tariff) to ensure access of agricultural products to target markets". With regard to Russian grain products, a non-tariff barrier that impedes international trade may be pathogens of bacteriosis regulated by the phytosanitary requirements of importing countries. The list of regulated species includes *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens*, and another species, *Rathayibacter tritici*, is a quarantine object for the countries of the Eurasian Economic Union, which includes the Russian Federation. Total volume of exports of grain crops to importing countries for which *P. fuscovaginae*, *P. syringae* (pathovars *syringae*, *atrofaciens*, *coronafaciens* and *lapsa*), *X. translucens* (pathovars *translucens*, *undulosa*, *graminis*, *cerealis* and *secalis*) and *Rathayibacter tritici* are of phytosanitary importance, – Turkey, Egypt, South Africa, Israel, Kazakhstan and others, is more than 25 per year million tonnes. In order to carry out phytosanitary control of bacteriosis, samples from batches of imported and exported products are subject to laboratory diagnostics. Due to the above reasons, there is a need to develop and optimize methods for detecting and identifying pathogens of bacteriosis of grain crops, which are significant for the import and export of grain products.

The degree of development of the topic. At the beginning of the study, there were no approved for Russian Federation guidelines for the detection and identification of pathogens of bacteriosis of cereal crops – *P. fuscovaginae*, *P. syringae* (pathovars *syringae*, *atrofaciens*, *coronafaciens* and *lapsa*) and *X. translucens* (pathovars *translucens*, *undulosa*, *graminis*, *cerealis* and *secalis*). Existing guidelines for the detection and identification of *R. tritici* do not allow for reliable and rapid diagnosis of the causative agent of yellow mucosal bacteriosis. Scientific articles contain a description of molecular genetic diagnostic tests that require mandatory approbation and applicability assessment. In laboratories on the territory of the Russian Federation, the identification of bacterial species significant for grain export is carried out by isolation on media and assessment of the morphology of colonies, but without molecular analysis, these methods are unreliable even with the successful isolation of bacteria with morphologically similar colonies. Information in the literature on the distribution of the studied bacteria in the territory of the Russian Federation is based mainly on visual examinations and methods of classical microbiology. that are not sufficient for reliable identification.

Purpose and objectives of the research. The purpose of the research was to develop and optimize methods for the detection and identification of bacterial pathogens significant for the import and export of grain products by the Russian Federation.

To achieve the goal, the following tasks are set:

1. Collection of plant samples in different regions of the Russian Federation and examination for the presence of DNA of *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens*.

2. Development of PCR -based diagnostics for the identification of *Xanthomonas translucens*.

3. Determination of the optimal nutrient medium for isolation of *Rathayibacter tritici*.

4. Optimization of seed sample preparation for simultaneous detection and identification of *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *coronafaciens* and *X. translucens* pv. *translucens*.

5. Characterization of bacterial microbiota in the plant samples from Moscow, the Stavropol region and the Republic of Crimea.

Scientific novelty. Plant samples of cereal crops from several regions of the Russian Federation

were examined for bacterial infection by molecular methods; the presence of DNA of *X. translucens* and *P. syringae* was confirmed. *X. translucens*, and new primers for PCR analysis of this species were developed. An improved method of preparing grain samples and identifying pathogens made it possible to reduce the analysis time to 6 hours. The bacterial microbiota of grain crops in the phytocenoses of Moscow, the Stavropol region and the Republic of Crimea was studied by microbiological and PCR methods.

Theoretical and practical significance of the work. The available information on bacterial species important for grain import, including nomenclature, biology, distribution data, phytosanitary status, affected crops and diagnostic methods, was collected and summarized. Sample preparation processes, methods of isolation of cultures and PCR tests were tested and optimized. The applicability of some PCR tests was assessed. The results of the research were used in the development of methodological recommendations of the FSBI "VNIKR" for the detection and identification of pathogens bacteriosis of grain crops, which have now been put into operation and recommended for use by testing laboratories in the territory of the Russian Federation.

Research methods and methodology. The molecular-genetic, cultural and biological methods used in the work are both a means of obtaining experimental data and the object of the study itself. The results of complex 4-year experimental studies were obtained using generally accepted methods, GOSTs, modern molecular-genetic, cultural-morphological and biological methods of analysis, statistical analysis and various methods of interpretation of the results.

Provisions submitted for the defense of the dissertation:

1. New PCR tests have been developed to identify *Xanthomonas translucens*.
2. *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* were identified in samples of grain crops from Moscow, the Republic of Crimea and the Stavropol region.
3. The identification of cultivated bacteria from plants of grain crops collected in Moscow, the Republic of Crimea and the Stavropol region was carried out.
4. The seed sample preparation process has been optimized for the detection and identification of *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens*.

Degree of reliability. The research was carried out according to well-known methods. All conclusions and recommendations for production are confirmed by experimental studies, statistical processing of the results obtained.

Approbation of the results of the work. The results of the research were presented at 3 international scientific conferences: the 20th All-Russian Conference of Young Scientists, dedicated to the memory of Academician of the Russian Academy of Agricultural Sciences Georgy Sergeevich Muromtsev, Moscow, October 27–29, 2020; the International Scientific Conference "Plant Protection in the Context of the Transition to Precision Farming", Institute of Plant Protection, Priluki (Republic of Belarus), July 27–29, 2021; the 11th International Scientific and Practical Conference "Biological Defense plants are the basis for stabilizing Agroecosystems", Krasnodar, September 12–16, 2022;

Publishing. The main results of the research carried out in the framework of this dissertation work are published in 9 publications, including 2 articles in the international citation databases Scopus/WoS, 1 article in a peer-reviewed publication recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Federation and 1 article in other journals.

Personal contribution of the author. The work is the result of original research. The dissertator personally participated in all the experimental works presented in the dissertation, carried out analytical processing of the data obtained, reviewed literary sources, participated in the preparation of publications.

Scope and structure of the work. The thesis is presented on 193 pages. It consists of an introduction, the main part containing 54 figures, 31 tables, conclusions, a list of references (includes 142 titles), accepted abbreviations and 15 appendixes.

MAIN CONTENT OF THE WORK

Chapter 1. Literature review

This chapter provides information on the studied pathogens of bacteriosis, provides information on existing methods for diagnosing bacteriosis, as well as molecular methods for identifying bacterial pathogens. The importance and relevance of the features of international trade in grain products between the Russian Federation and other countries is highlighted.

Chapter 2. Materials and methods

Materials

The study materials included 38 bacterial strains from foreign collections and the collection of the Federal State Budgetary Institution "VNIKR", 181 samples of grain plants, 434 bacterial isolates from grain crops, as well as 171 genomic assemblies of bacteria of the genus *Xanthomonas* obtained from NCBI GenBank.

Collection of plant samples in the regions of the Russian Federation in order to identify and identify objects of study, as well as to form a collection of pathogenic and non-pathogenic microbiota of grain crops.

Samples were collected randomly during the growing season. A chlorine solution was used to clean and disinfect gloves and tools before each collection of plant samples. The collected samples were placed in a plastic bag with paper filters, sealed and labeled. If there was information about the varieties, it was recorded. For each gathering point, the coordinates were recorded. The collected samples were delivered to the laboratory and stored for no more than a week at a temperature of 2–8 °C.

Preparation of plant samples

An analytical sample (microbiota suspension) was prepared from each sample of plant tissue in the laboratory. 5 g of plant tissues were chopped and 30 mL of phosphate buffer saline (PBS) was added. The sample was then shaken on a Unimax 2010 orbital shaker (Heidolph, Germany) at 200 rpm for 45–60 minutes. After filtration, the extracts were centrifuged for 10 min at 4 °C and 10000 g on an Allegra X-30R centrifuge, Beckman Coulter, Denmark. The supernatant was removed and the precipitate was resuspended in 1 mL of PBS, and the resulting suspension was an analytical sample. 200 µl of this sample was used for DNA isolation and inoculation on culture media, and two drops of glycerol were added to 600 µl and stored at a temperature of -18 °C for future use.

Optimization of seed sample preparation

Weights of wheat grain, each weighing 25 ± 0.2 g, were transferred to homogenization bags and 54 mL of PBS were added. The bags were placed on an orbital shaker and left at 100 rpm for 2 h. 6 mL of one of the dilutions of the bacterial suspension: 2, 3, 4, or 5 strains of 0337 *X. translucens* pv. *translucens*, 0378 *R. tritici*, 0335 *P. fuscovaginae* and 0440 *P. syringae* pv. *coronafaciens*. The concentration of bacterial suspensions was determined by the Koch method. One of the bags was left uninfected as a negative control. After 2 hours, the contents of the bags were processed in a homogenizer (BagMixer 400SW, Interscience, France) at a mode of 4.5 minutes. Then the bags were placed on a shaker at 100 rpm for 15 min. The liquid part of the homogenate was transferred to

centrifuge tubes with a capacity of 50 ml and centrifuged at a mode of 5 min., 1200 g. 4 °C. The supernatant was transferred to clean centrifuge tubes and centrifuged again for 10 min at 10000 g and 4 °C. After the second centrifugation, the supernatant was removed and 1 mL of PBS was added to the sediment, shaken on a vortex, and the resulting analytical sample was transferred to a microtube. To isolate DNA, 200 µl of each analytical sample was used in double repeat, as well as 200 µl of 3, 4, 5, and 6 dilutions of bacterial suspensions in PBS. Classical PCR and real-time PCR (RT-PCR) were performed in isolated DNA using species-specific primers.

Isolation of bacterial cultures

Analytical samples of plants were used to isolate bacterial cultures. Culture media CRL, YDC and R2A were used in the study. After inoculation, the Petri dishes were tightly wrapped with Parafilm sealing film and left at a temperature of 25 °C in an incubator (MIR-254, Panasonic Healthcare Co., Ltd., Japan). When well-distinguishable individual colonies of all morphotypes appeared, they were sown with a loop on new Petri dishes to obtain a pure culture. PCR and sequencing. Pure cultures were placed in microtubes and stored at -80° C. for further use.

Determination of the optimal culture medium for *Rathayibacter tritici*

One bacterial colony of the 0338 *R. tritici* strain was suspended in 1 ml of PBS, and then a series of consecutive 10-fold dilutions was performed. 50 µL of 4 and 5 dilutions were inoculated on two culture media: YPGA and NBY. Each dilution was inoculated in 10-fold repeat. The results were evaluated after 5 days of incubation at 25°C.

DNA isolation

DNA isolation from bacterial isolates, bacterial suspensions and analytical samples was carried out using the Proba-GS kit, AgroDiagnostics CJSC, Russia, in accordance with the manufacturer's instructions.

Molecular genetic methods

Both classical PCR and RT-PCR were used in the study. Classical PCR tests: PSF/PSR for the identification of bacteria of the genus *Pseudomonas* (PCR product size 610 bp), SyD1/SyD2 for the identification of *P. syringae* pv. *syringae* and *P. syringae* pv. *Atrofaciens* (1040 bp), PsyF/PsyR for *P. syringae* identification (144 bp), Mus714F/Mus714R for internal positive control (714 bp), 8UA/519B (500 bp) and/or 27f/907r (880 bp) for subsequent sequencing of the 16–23S rRNA region (3500, Applied Biosystems, USA), Rt 3F/3R for the identification of *R. tritici* (520 bp).

RT-PCR tests: BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 for the detection of *R. tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*-PB kit, Syntol CJSC, Russia, for the detection of *P. fuscovaginae*

Development of PCR tests for the identification of *Xanthomonas translucens*

The nucleotide targets were searched using 10 genomic assemblies of *X. translucens* strains and 161 genomic assemblies of 25 other (non-target) bacterial species of the genus *Xanthomonas*. Protein sequences were labeled according to species and strain and clustered using the Cd-hit program (version 4.1) at an identity threshold of 70% with an acceptable difference in sequence length of 80% and a "word" length of 5 amino acid residues. The nucleotide sequences of genes encoding proteins from the selected clusters specific to *X. translucens* were used to develop primers. Primers were selected using the Primer-BLAST program and synthesized at Evrogen, Russia. genus *Xanthomonas*, including *X. translucens*.

Chapter 3. Research results and discussion

Collection of samples of grain crops from different regions of the Russian Federation (Moscow, Republic of Crimea, Stavropol region)

Plant accessions were collected on the territory of the Timiryazevskaya Field Experimental Station (Moscow) in 2020 (55 accessions), in the Krasnogvardeysky, Simferopolsky and Belogorsky

districts of the Republic of Crimea in 2021 (60 accessions) and Aleksandrovsky, Andropovsky, Budennovsky, Georgievsky, Kochubeevsky, Mineralvodsky, Novoselitsky and Sovetsky districts of the Stavropol region in 2022 (66 accessions). In total, 181 samples of wheat plants were collected in three regions of the Russian Federation, rye, barley, oats, triticale and leguminous mixture.

Development of PCR tests for the identification of *Xanthomonas translucens*

After clustering 667416 protein sequences according to the established criteria of specificity, length and variability, sequences of 6 genes were selected and used for primer selection. (Table 1).

Table 1 - Nucleonucleotide sequences of genes used for primer selection

No p/n	NCBI accession	Gene coordinates in the genome	Encoded protein	Encoded protein annotation	Names of primer pairs	Length of PCR product, b.p.
1	NZ_FLTU01000142.1	6002-8863	WP_039956369.1	DUF5110 domain-containing protein	1F8/1R8	711
					1F10/1R10	379
2	FLTU01000085.1	5245-7368	WP_009581062.1	TonB-dependent siderophore receptor	2F6/2R6	759
3	NZ_FLTU01000009.1	3500-2202	WP_039955267.1	nucleoside hydrolase	3F3/3R3	246
					3F5/3R5	209
					3F9/3R9	869
4	NZLHSI01000001.1	2522179-2523426	WP_009581060.1	ATP-grasp domain-containing protein	4F1/4R1	503
					4F3/4R3	904
5	NZ_ANGG01000457.1	10914-12119	WP_009598496.1	aldose 1-epimerase family protein	5F3/5R3	200
					5F6/5R6	424
6	NZ_ANGG01000136.1	4667-3489	WP_009581057.1	MFS transporter Encoded protein annotation	6F6/6R6	970
					6F10/6R10	663

For each of the 6 sequences, 1 to 3 pairs of primers were selected. A total of 12 pairs of primers were selected (Table 1). As a result of PCR with all 12 pairs of primers, products of the expected length were obtained using the DNA template of the 0337 *X. translucens* strain (Fig. 1).

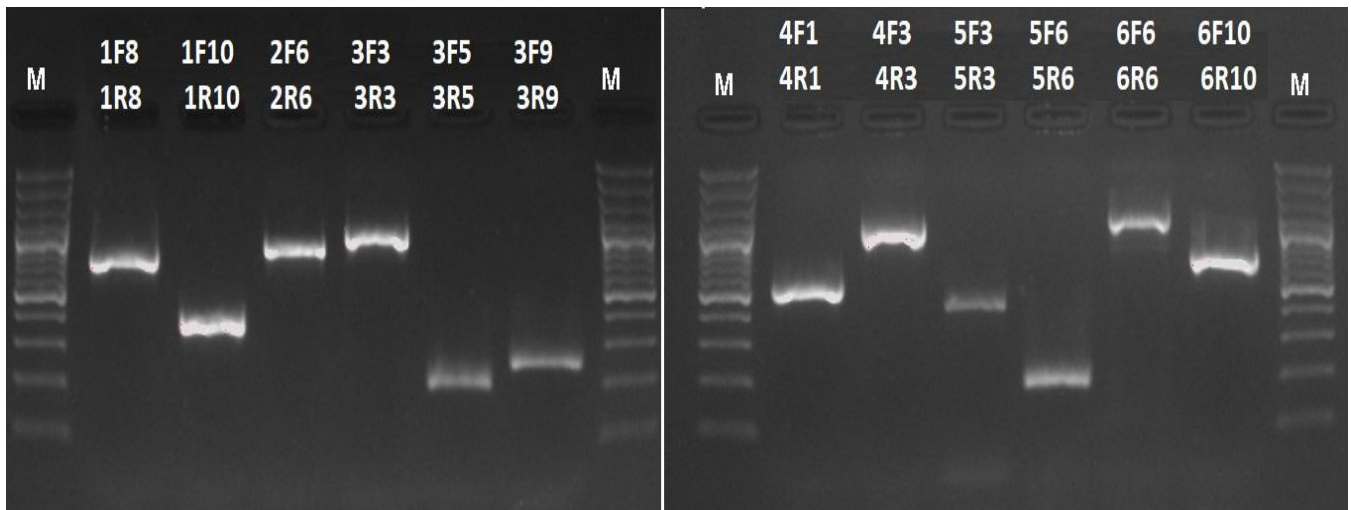


Figure 2 – Electrophoregram of PCR results with DNA of the 0337 *Xanthomonas translucens* strain for each pair of primers used in the study. M – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder genetic weight marker, Thermo Fisher Scientific, USA

Primers 3F3/3R3, 3F5/3R5, 3F9/3R9, 4F3/4R3, 5F3/5R3 and 6F6/6R6 showed low specificity. At the same time, primer pairs 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 and 6F10/6R10 showed high specificity when tested for *Xanthomonas*; PCR with these primers resulted in 1 well-defined amplicon of the expected size (711, p. 379, 503, 424 and 663 bp, respectively) with *X. translucens* DNA. With other strains of bacteria of the genus *Xanthomonas*, the PCR product is either absent or differs in size from what is expected for each of the tests. Thus, the use of pairs of primers 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 and 6F10/6R10 allows the identification of *X. translucens*.

Determination of the optimal culture medium for *Rathayibacter tritici*

5 days after inoculation, the colonies of *R. tritici* reached their maximum size (up to 6 mm in diameter) and acquired a bright yellow color. The colonies were round, with smooth edges and a convex profile (Fig. 2).

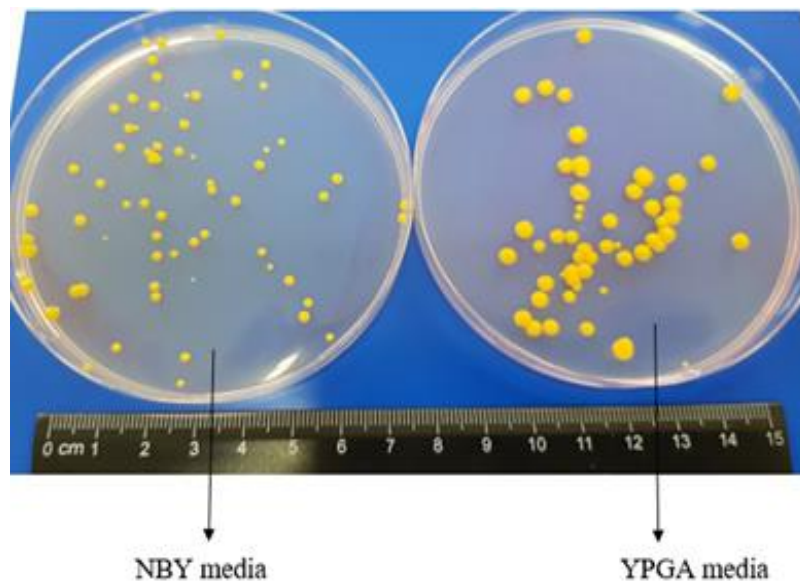


Figure 2 – Petri dishes with 50 μ L of 5th dilution of *Rathayibacter tritici* on NBY and YPGA after 5 days of incubation at 25°C.

Colonies on the YPGA had an average size of 3.92 mm, while on the NBY the average size was 2.44 mm (Table 2).

Table 2 - Mean, standard deviation and confidence level for *Rathayibacter tritici* colony sizes

Significance (significance level 0.05)	6 th dilution		5 th dilution	
	YPGA	NBY	YPGA	NBY
Avg.	3,92	2.44	3.54	2.15
Standard deviation	0,99	0,81	3.30	0,82
Reliability	0,46	0,37	0,42	0,12

The average colony size on the YPGA medium was larger (average 5.60 mm) than on the NBY (about 3.00 mm). The average colony size on the YPGA medium was larger than the maximum colony size on the NBY. In both the 5th and 6th dilutions, the average colony size on the YPGA was significantly larger than on the NBY. The mean colony count was the same in both environments in the 6th dilution (Table 3).

Table 3 - Result of counting the number of colonies

Significance (significance level 0.05)	6- ° разведение		5- ° разведение	
	YPGA	NBY	YPGA	NBY
General	48	47	586	444
Avg.	4,8	4,7	58,6	44,4
Standard deviation	2,1	1,4	9,6	10,3
Reliability	0,59	0,41	0,78	0,96

In the 5th dilution, YPGA had significantly more colonies than NBYs (Table 3). The YPGA medium is more optimal for the cultivation of *R. tritici* than the NBY medium, since it forms larger colonies and their number is larger.

Optimization of seed sample preparation for subsequent detection and identification of *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* by PCR

The first low-speed centrifugation for 5 min., 1200 g, 4 °C resulted in the formation of a flour sludge weighing 1±0.3 g in each centrifuge tube. Thus, the first centrifugation made it possible to get rid of most of the starch, which is one of the PCR inhibitors. Subsequent high-speed centrifugation (10 min., 10000 g, 4 °C) made it possible to obtain a concentrated microbiota contained in the grain sample, which increased the probability of detecting the phytopathogen in the sample.

To estimate the number of bacterial cells in suspensions used to infect seed samples, colony-forming units were counted on petri dishes. It was found that the suspensions used contained bacteria in concentrations of 107, 106, 105, 104, 103 CFU/ml in the 2nd, 3rd, 4th, 5th and 6th 10-fold dilutions, respectively (Table 4).

Table 4 - Result of determining the number of colony-forming units (CFU/ml) in the tested bacterial suspensions 7 days after inoculation

Напряжение	Разведение исходной суспензии				
	2	3	4	5	6
0335	4,2×10 ⁷	4,2×10 ⁶	4,2×10 ⁵	4,2×10 ⁴	4,2×10 ³

0440	$3,7 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$
0337	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
0378	$0,6 \times 10^7$	$0,6 \times 10^6$	$0,6 \times 10^5$	$0,6 \times 10^4$	$0,6 \times 10^3$

Since bacterial suspensions in 2, 3, 4 and 5 dilutions in a ratio of 1:9 were used for inoculation of seed samples, the bacterial concentrations in the extracts of infected seeds before centrifugation were 106, 105, 104, 103 CFU/ml, respectively.

PCR testing of samples containing strain 0335 showed the presence of *P. fuscovaginae* in both bacterial suspensions in PBS and in samples of infected wheat grain (Table 5), with negative controls for DNA isolation and amplification being negative.

Table 5 – Result of the “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” test, Sintol, Russia for the identification of *P. fuscovaginae* (strain 0335) and the BTRIT2F/BTRIT2R/BTRITP1 test for the identification of *R. tritici*

Sample	Ct, FAM	Ct, HEX	Result	Sample	Ct, FAM	Ct, HEX	Result
0335-10 ⁶ - PBS	27,0	34,0	+	0378-10 ⁶ - PBS	30,1	30,8	+
0335-10 ⁵ - PBS	29,7	33,8	+	0378-10 ⁵ - PBS	32,2	31,3	+
0335-10 ⁴ - PBS	30,8	34,1	+	0378-10 ⁴ - PBS		31,1	-
0335-10 ³ - PBS	31,6	34,2	+	0378-10 ³ - PBS		31,6	-
0335-10 ⁶ - Extract -1	25,4	34,2	+	0378-10 ⁶ - Extract -1	28,5	30,7	+
0335-10 ⁶ - Extract -2	25,2	34,6	+	0378-10 ⁶ - Extract -2	27,7	30,5	+
0335-10 ⁵ - Extract -1	29,2	34,3	+	0378-10 ⁵ - Extract -1	31,6	31,2	+
0335-10 ⁵ - Extract -2	29,4	34,3	+	0378-10 ⁵ - Extract -2	32,0	31,5	+
0335-10 ⁴ - Extract -1	32,3	34,3	+	0378-10 ⁴ - Extract -1		31,6	-
0335-10 ⁴ - Extract -2	31,6	34,2	+	0378-10 ⁴ - Extract -2		31,5	-
0335-10 ³ - Extract -1	34,3	34,5	+	0378-10 ³ - Extract -1		31,8	-
0335-10 ³ - Extract -2	35,3	34,5	+	0378-10 ³ - Extract -2		31,5	-
0335-10 ⁷ - PBS -PC	22,9	34,1	+	0378-10 ⁷ - PBS -PC	27,7	31,0	+
Extract -1- NC		34,4	-	Extract -1- NC		34,4	-
Extract-2- NC		34,6	-	Extract -2-NC		34,6	-
PBS - NC		34,6	-	PBS -NC		34,6	-

Note: Ct is the PCR threshold cycle, FAM is the PCR specificity detection channel, HEX is the internal positive PCR control detection channel, "+" is positive, "-" is negative, PBS is phosphate buffered saline, PC is positive control sample, NC is negative control sample

PCR testing of samples containing strain 0378 showed the presence of *R. tritici* in bacterial suspensions in PBS and in samples of contaminated wheat grain with concentration of bacterial cells in the analyzed sample of 105 CFU/ml (Table 5).

In each of the studied samples infected with strain 0440, *P. syringae* DNA was found (Fig. 3).

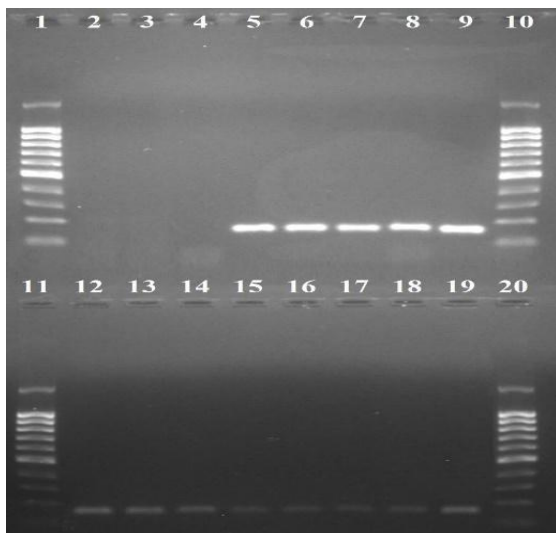


Figure 3 – Electrophoregram of PsyF/PsyR PCR test results with DNA of samples infected with strain 0440

1, 10, 11 and 20 – DNA length marker, 2, 3 – negative control sample (extract), 4 – negative control sample (buffer), 5–8 – buffer infected with strain 0440 at a concentration of $3.7 \cdot 10^6$ – $3.7 \cdot 10^3$ respectively, 9, 12 – strain 0440 in extract ($3.7 \cdot 10^6$), 13, 14 – strain 0440 in extract ($3.7 \cdot 10^5$), 15, 16 – strain 0440 in extract ($3.7 \cdot 10^4$), 17, 18 – strain 0440 in extract ($3.7 \cdot 10^3$), 19 – positive control sample

DNA of *X. translucens* was detected in all infected samples tested with 4F1/4R1 primers and was not detected in the DNA of negative controls (Fig. 4).

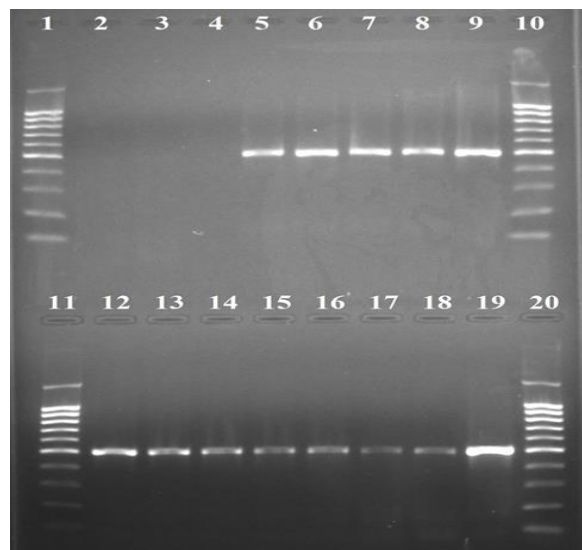


Figure 4 – Electrophoregram of 4F1/4R1 PCR test results with DNA of samples infected with strain 0337

1, 10, 11 and 20 are a marker of DNA length; 2, 3 – negative control sample (extract); 4 – negative check sample (buffer); 5–8 – buffer infected with strain 0337 in concentrations of $1.5 \cdot 10^6$ – $1.5 \cdot 10^3$ respectively; 9, 12 – strain 0337 in extract ($1.5 \cdot 10^6$); 13, 14 – strain 0337 in extract ($1.5 \cdot 10^5$); 15, 16 – strain 0337 in extract ($1.5 \cdot 10^4$); 17, 18 – strain 0337 in extract ($1.5 \cdot 10^3$); 19 – positive control sample

PCR inhibition was not observed in any of the DNA samples tested isolated from samples contaminated with strains 0335, 0337, 0338 and 0440. The results show that double centrifugation in sample

preparation is effective in removing the starch remaining in the sample after seed homogenization. The use of the two-stage centrifugation method to remove inhibitory substances from plant material is used in laboratory practice, but this method has not been used before for the preparation of wheat seed samples with subsequent PCR identification of bacteria. In this work, the method was optimized to remove starch during the preparation of grain samples. The following sample preparation method is recommended: place 25 g of wheat grain in a homogenization bag. Add 60 mL of PBS and leave on the orbital shaker at 100 rpm for 2 hours. Then process the bags in a homogenizer at a speed of 4 for 5 minutes, then soak the bag on an orbital shaker at 100 rpm for 15 minutes. Centrifuge the tubes at 1,200 g, 4°C for 5 min. Gently transfer the supernatant to another centrifuge tube and centrifuge for 10 min. at 10,000 g and 4 °C. Gently remove the supernatant and add 1 ml of PBS to the sediment. Resuspend the precipitate on Vortex and transfer the suspension to a 1.5 mL Eppendorf test tube.

Identification of *Pseudomonas fuscovaginae*, *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* in plant samples collected in Moscow, the Republic of Crimea and the Stavropol region.

As a result of PCR testing, DNA extracted from plant samples of cereal crops, DNA of *R. tritici*

and *P. fuscovaginae* was not detected in any of the 181 samples. As a result of the identification of *X. translucens* in the studied samples, one positive result was obtained for a sample of winter wheat of the Asket variety from the Krasnogvardeysky district of the Republic of Crimea. In two other regions of the Russian Federation, Moscow and the Stavropol region, *X. translucens* was not detected.

The following results were obtained after running PCR using PSYf/PSYr for the detection of *Pseudomonas syringae* in the analytical plant samples. A total of 55 DNA samples extracted from analytical plant samples collected in Moscow were tested. Electropherograms of DNA testing with primers PSYf/PSYr are shown in figure 5.

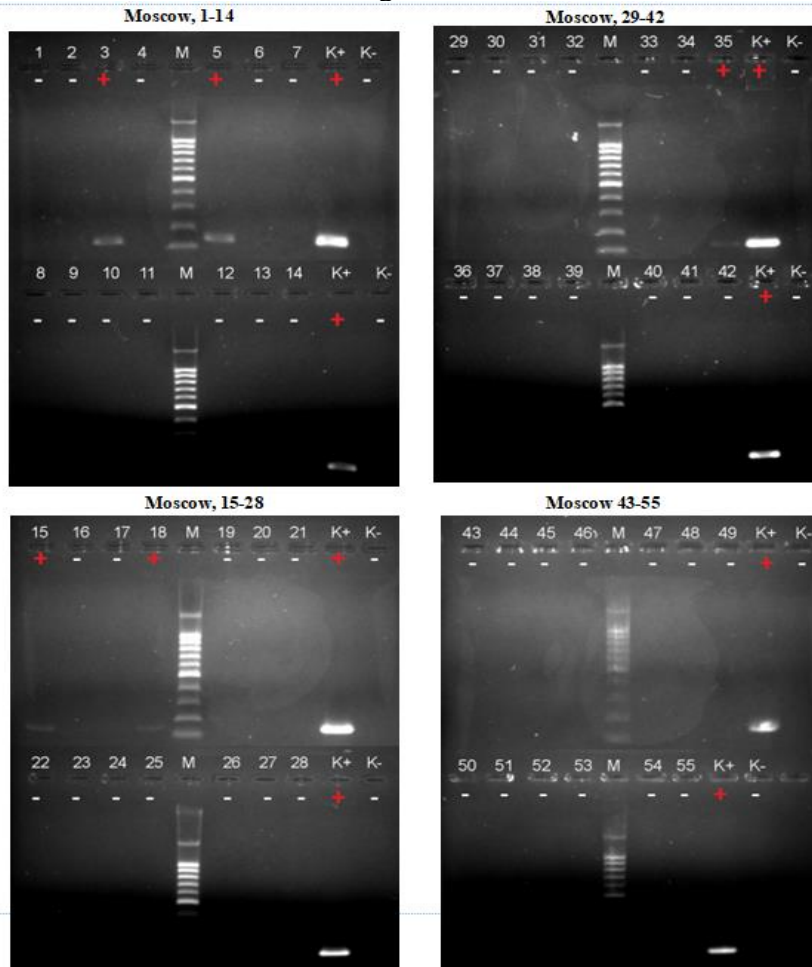


Figure 5. Note: (⊔) means unknown cultivar, + means detected and – means not detected. 1. Winter rye Snezhana, 2. Soft winter wheat Zhiva, 3. Soft winter wheat Alekseevich, 4. Soft winter wheat Urup, 5. Soft winter wheat Morozko, 6. Soft winter wheat Timiryazevskaya Yubilejnaya, 7. Soft winter wheat Moskovskaya 56, 8. Soft winter wheat Biryuza, 9. Soft winter wheat Timiryazevskaya 150, 10. Soft winter wheat Graf, 11. Triticale winter Aleksandr, 12. Winter wheat Don yantarnaya, 13. Triticale winter Victor, 14. Soft winter wheat Vassa, 15. Winter wheat two-grain ⊔, 16. Triticale winter Nemchinovskij 56, 17. Winter wheat Eremeevna, 18. Triticale winter spherical Titus, 19. Soft winter wheat Moskovskaya 39, 20. Triticale winter Valentin 90, 21. Soft winter wheat Dublet, 22. Soft winter wheat Kavalerka, 23. Soft winter wheat Skarlet Zarya, 24. Soft winter wheat Nemchinovskaya 24, 25. Winter durum wheat Pobeda 70, 26. Soft winter wheat Legenda, 27. Soft winter wheat Avesta, 28. Winter rye Verasen', 29. Soft winter wheat Inna, 30. Winter wheat Terra, 31. Triticale

winter Timiryazevskaya 150, 32. Soft winter wheat Mel'nica, 33. Soft winter wheat Asket, 34. Soft winter wheat Velena, 35. Soft winter wheat Vanya, 36. Soft winter wheat Artel', 37. Soft winter wheat Nemchinovskaya 85, 38. Soft winter wheat Vidya, 39. Soft winter wheat Don Lira, 40. Soft winter wheat Golubaya, 41. Soft winter wheat Moskovskaya 40, 42. Soft winter wheat Don 107, 43. Soft winter wheat Stepnaya, 44. Soft winter wheat Gubernator Dona, 45. Soft winter wheat Rostovchanka, 46. Soft winter wheat Vekha, 47. Soft winter wheat Nemchinovskaya 57, 48. Soft winter wheat Avgusta, 49. Soft winter wheat Soberbash, 50. Soft winter wheat Anka, 51. Soft winter wheat Prignala, 52. Soft winter wheat Antonina, 53. Soft winter wheat Nemchinovskaya 17, 54. Soft winter wheat Bezostaya 100 and 55. Winter rye _ . M — DNA Length Marker 100+ bp DNA ladder (100-1000 b.p. («Evrogen», Russia) (Timiryazev field experimental station, Russian State Agrarian University — Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Moscow, 2020).

Pseudomonas syringae DNA was detected in 5 analytical plant samples. Positive results like 144b.p amplicon were also obtained for positive control (PC). In the rest of the 50 DNA samples *P. syringae* was not detected also in the negative control samples (NC). That is 9% of the DNA samples.

A total of 60 DNA samples extracted from analytical plant samples collected in the Republic of Crimea were tested. Electropherograms of DNA testing with primers PSYf/PSYr are shown in figure 6.

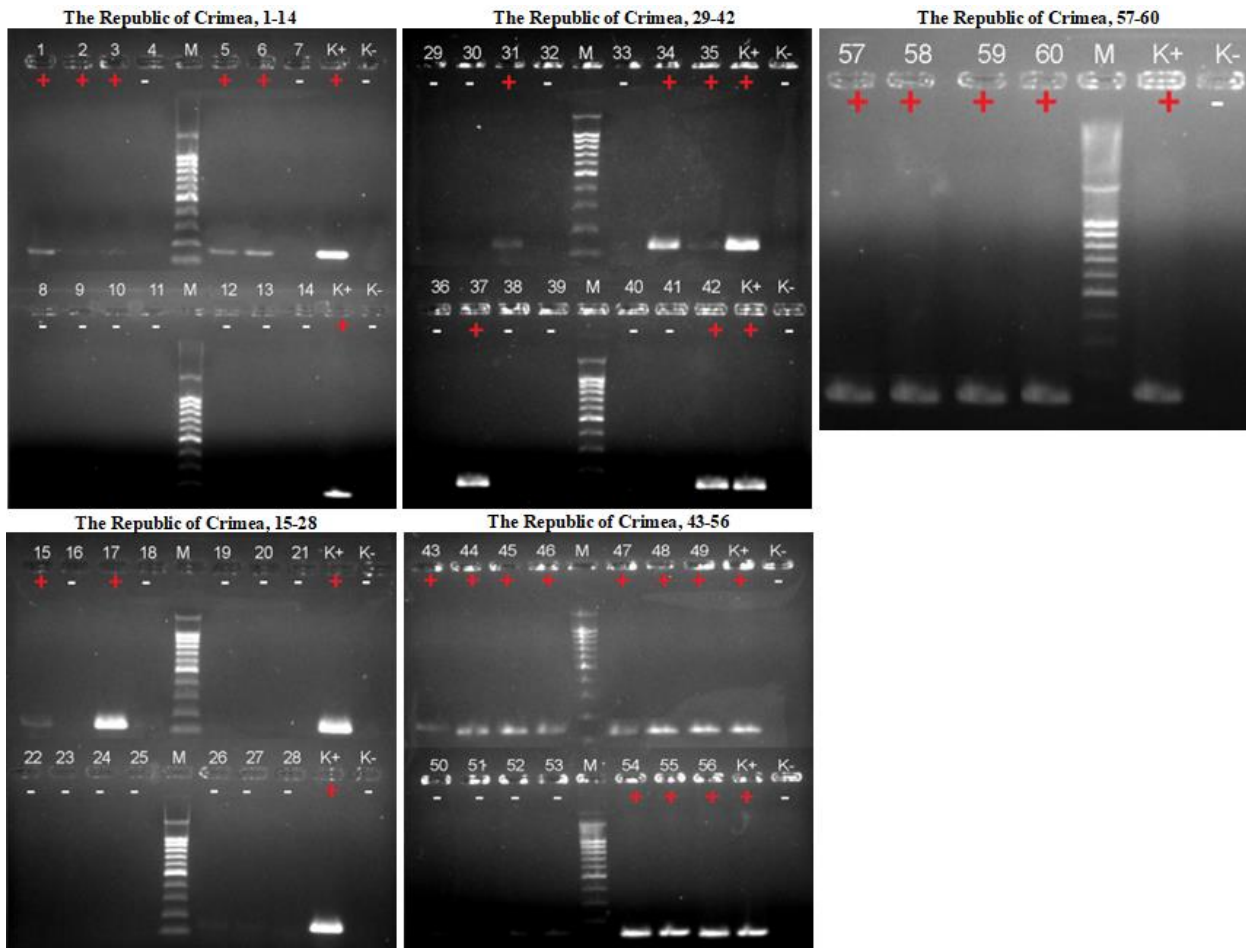


Figure 6. Note: (-) means not detected, + means detected and _ cultivar unknown. 1. Winter barley Onega, 2. Winter wheat Aksiniya, 3. Winter wheat Asket, 4. Winter wheat Asket, 5. Winter barley Rajz, 6. Winter wheat Governor of the Don, 7. Winter wheat Governor

of the Don, 8. Winter barley Rajz, 9. Winter barley Rajz, 10. Winter wheat Asket, 11. Winter barley Onega, 12. Winter wheat Gubernator Dona, 13. Winter wheat Gubernator Dona, 14. Winter wheat Gubernator Dona, 15. Winter wheat Gubernator Dona, 16. Winter wheat Asket, 17. Winter barley Onega, 18. Winter barley Onega, 19. Winter barley Onega, 20. Winter wheat Asket, 21. Winter wheat Asket, 22. Winter wheat Asket, 23. Winter wheat Asket, 24. Winter wheat Asket, 25. Winter wheat Asket, 26. Winter wheat Asket, 27. Winter wheat Asket, 28. Winter wheat Asket, 29. Winter wheat Asket, 30. Winter wheat Asket, 31. Winter wheat Asket, 32. Winter barley V'yuga, 33. Winter barley Rubezh, 34. Winter barley Sprinter, 35. Winter barley Ob'em. 36. Winter barley Master, 37. Winter barley Espada, 38. Winter wheat Anka, 39. Winter wheat Vlena, 40. Winter wheat Vekha, 41. Winter wheat Karavan, 42. Oats Vernyj, 43. Oats Mezmaj, 44. Oats Chernigovskij -nebo, 45. Oats Loshad', 46. Oats Podgornyj, 47. Oats Guzeripl', 48. Winter barley Master, 49. Winter barley Espada, 50. Winter barley V'yuga, 51. Winter barley Rubezh, 52. Winter barley Sprinter, 53. Winter barley Ob'em, 54. Triticale, wheat, barley _, 55. Winter wheat Korona, 56. Winter barley Sprinter, 57. Winter barley Rubezh, 58. Cereal-legume mixture _, 59. Oat_ and 60. Winter wheat Korona. M — DNA Length Marker 100+ bp DNA ladder (100-1000 b.p. («Evrogen», Russia) (three regions Belogorskij, Krasnogvardejskij, and Simferopolskij of the Republic of Crimea, 2021).

Pseudomonas syringae DNA was detected in 26 analytical plant samples. Positive results like 144b.p amplicon were also obtained for positive control (PC). In the rest of the 34 DNA samples *P. syringae* was not detected also in the negative control samples (NC). That is 43% of the analytical plant DNA samples.

A total of 66 DNA samples extracted from analytical plant samples collected in Stavropol region were tested. Electropherograms of DNA testing with primers PSYf/PSYr are shown in figure 7.

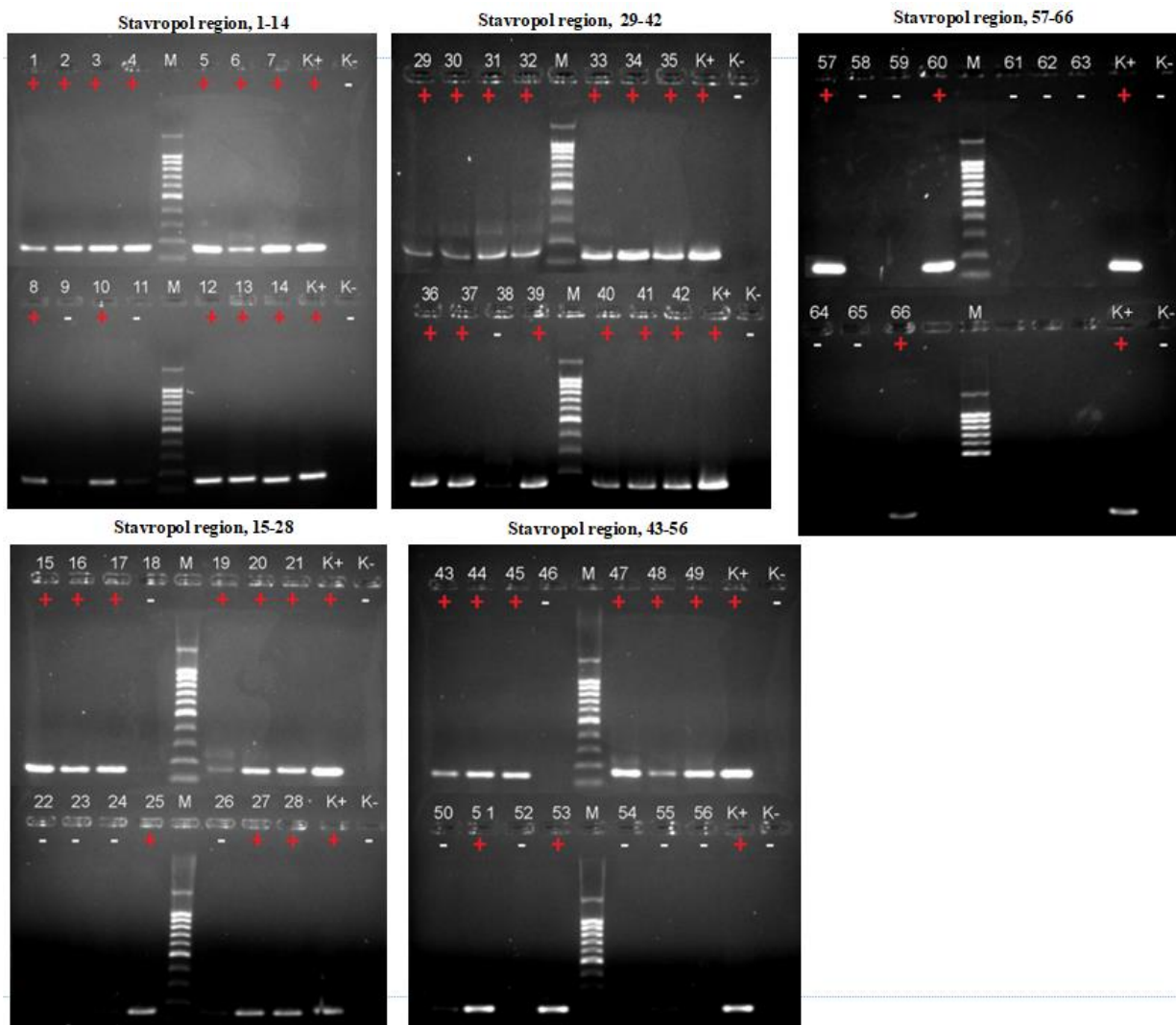


Figure 7. Note: (-) means not detected, + means detected and _ cultivar unknown. 1. Winter barley Rubezh, 2. Winter wheat Soberbash, 3. Winter wheat Stil' 18, 4 Winter wheat Tanya, 5. Winter wheat Stil' 18, 6. Winter wheat Tanya, 7. Winter wheat Stil' 18, 8. Winter wheat Tanya, 9. Winter wheat Tanya, 10. Winter wheat Grom, 11. Winter wheat Tanya, 12. Winter wheat Tanya, 13. Winter wheat Tanya, 14. Winter wheat Grom, 15. Winter wheat Tanya, 16. Winter barley Bazal't, 17. Winter wheat Godovshchina, 18. Winter wheat Godovshchina, 19. Winter durum wheat Amazonka, 20. Winter durum wheat Amazonka, 21. Spring durum wheat Yasen'ka, 22. Winter durum wheat Amazonka, 23. Winter durum wheat Amazonka, 24. Winter durum wheat Yahont, 25. Winter durum wheat Agat Donskoj, 26. Winter durum wheat Stepnoj yantar', 27. Winter wheat Centrina, 28. Durum winter wheat Odari, 29. Winter durum wheat Amazonka, 30. Winter wheat Soft Yukka, 31. Winter durum wheat Yahont, 32. Winter durum wheat Amazonka, 33. Durum winter wheat Odari, 34. Winter wheat_, 35. Winter barley + oats_, 36. Winter soft wheat_, 37. Winter barley_, 38. Winter soft wheat_, 39. Winter soft wheat_, 40. Winter soft wheat_, 41. Winter soft wheat_, 42. Winter soft wheat_, 43. Winter barley_, 44. Winter soft wheat_, 45. Winter soft wheat_, 46. Winter barley_, 47. Wheat Chernyava, 48. Winter wheat Alekseevich, 49. Winter wheat Alekseevich, 50. Winter wheat Chernyava, 51. Winter barley Karrera, 52. Winter barley Karrera, 53. Barley Alekseevich, 54. Winter barley Karrera, 55. Wheat Chernyava. 56. Triticale Grain, 57. Winter wheat Antonina, 58. Spring barley Gris, 59. Spring barley

Azimuth, 60. Spring barley Leon, 61. Spring barley Voin, 62. Spring barley Format, 63. Spring barley Shchedrin, 64. Spring barley Vakula, 65. Spring barley Avalon and 66. Winter wheat soft_ M — DNA Length Marker 100+ bp DNA ladder (100-1000 b.p. (Kochubeevskij, Budennovskij, Sovetskij, Georgievskij, Andropovskij, Aleksandrovskij, Shpakovskij, Novoselickij and Mineralovodskij of Stavropol region. 2022).

P. syringae DNA was found in 5 out of 55 analytical plant samples collected in Moscow, in 26 out of 60 analytical plant samples from the Republic of Crimea, and in 45 out of 66 analytical plant samples from the Stavropol region (Fig. 8).

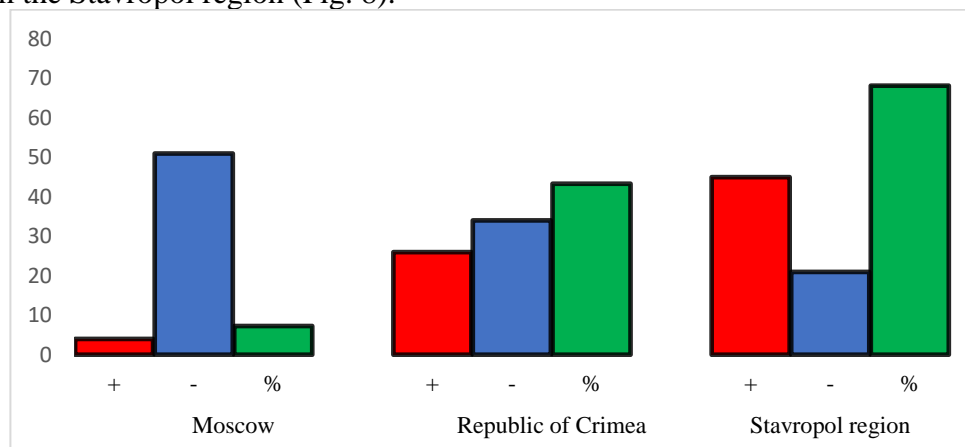


Figure 5 – Results of *P. syringae* detection in plant analytical samples. "+" *P. syringae* detected, "-" *P. syringae* not detected, "%" frequency of *P. syringae*, %

The frequency of occurrence of *P. syringae* in samples of grain crops was 9 %, 43 % and 68 % for Moscow, the Republic of Crimea and the Stavropol region, respectively (Fig. 8). In the Stavropol region, the frequency of occurrence of *P. syringae* is 25 % higher than in the Republic of Crimea, and 57 % higher than in Moscow. 34% higher than in Moscow, but lower than in the Stavropol region. Moscow has the lowest detection rate among the three regions. The overall incidence of *P. syringae* in the three regions was 41%.

Identification of bacterial isolates from samples collected at the Timiryazev Field Experimental Station (Moscow)

A total of 168 isolates were identified. Among the identified isolates of bacteria of the genus *Pseudomonas*, which were the most widely represented (frequency of occurrence 70.9%), such species as *P. chlororaphis*, *P. graminis*, *P. poae*, *P. syringae*, *P. trivialis* and *P. viridiflava* were identified.

The next most common genus was *Frigoribacterium* (36.4 %). Bacteria of the genus *Frigoribacterium* are common representatives of the plant microbiota, contributing to their growth and adaptation. Among them, 4 isolates of *F. faeni* have been identified. This species is classified as an extremophile organism that can reproduce even at low temperatures, such as 2°C, as well as at moderate temperatures, such as 20 °C.

Bacteria of the genus *Clavibacter*, which rank third after *Pseudomonas* and *Frigoribacterium* (frequency of occurrence was 16.4%), are characterized by gram-positive anaerobic properties. A total of 12 strains of bacteria of the genus *Clavibacter* have been identified. Among them, 10 strains of *C. michiganensis* have been identified. This species is characterized as a causative agent of bacteriosis, which can lead to a noticeable decrease in yield (up to 50%) due to fire blight and wilting.

Other bacteria identified include members of the genera *Agreia*, *Arthrobacter* (including *A. chlorophenolicus*), *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Dyadobacter*, *Erwinia*, *Fronidhabitans*, *Kineococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Oerskovia*, *Pantoea* (including *P. ananatis*), *Paucimonas*

(including *P. lemoignei*), *Phycococcus*, *Plantibacter*, *Pseudoclavibacter* (including *P. helvolus*), *Rathayibacter* (including *R. festucae*), *Rhodococcus* (including *R. fascians*), *Salinibacterium*, *Sanguibacter*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* and *Streptomyces*.

Identification of bacterial isolates from samples collected in the Republic of Crimea

A total of 86 isolates were identified. Among them, 27 isolates (with a frequency of occurrence of 42% on the collected samples of cereal crops) belonged to the genus *Pantoea*, including species *P. agglomerans*, *P. ananatis*, *P. vagans* and *P. pleuroti*. *P. agglomerans* is characterized as an endophyte and epiphyte. Some pathogenic strains of *P. agglomerans* cause bacterial blight in cereals. Other strains of *P. agglomerans* have a beneficial effect on the rhizosphere. *P. ananatis* causes brownish lesions on wheat leaves with clear edges and yellow halos. *P. ananatis* can be transmitted by the grass leaf beetle (*Oulema melanopus*). *P. vagans* is used to control *Erwinia amylovora*, which causes fire blight in stone fruit crops. *P. Pleuroti* is known for causing fire blight.

In addition to bacteria of the genus *Pantoea*, representatives of the genera *Ochrobactrum*, *Erwinia*, *Rathayibacter*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Frigoribacterium*, *Pseudomonas*, *Plantibacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Rosenbergiella*, *Exiguobacterium*, *Agrococcus*, *Microbacterium* and *Enterococcus* were identified in plant accessions from the Republic of Crimea.

Identification of bacterial isolates from samples collected in the Stavropol region.

A total of 164 isolates were identified. The highest frequency of occurrence was observed in bacteria of the genus *Rhodococcus*: 48.5%. A total of 36 strains of bacteria of the genus *Rhodococcus* were isolated, which is 19% of all isolated strains. In addition to bacteria of the genus *Rhodococcus*, representatives of such genera as *Achromobacter*, *Agreia*, *Agrococcus* (including species *A. citreus* and *A. jenensis*), *Arthrobacter* (including *A. aurescens*), *Bacillus* (including *B. pumilus*), *Chryseobacterium*, *Clavibacter* (including *C. michiganensis*), *Curtobacterium* (including *C. flaccumfaciens*), *Exiguobacterium*, *Frigoribacterium*, *Glutamicibacter* (including *G. bergerei*), *Knoellia* (species *K. aerolata*), *Labeledella*, *Luteimonas*, *Microbacterium* (including species *M. hydrocarbonoxydans*), *Mycobacterium* (species *M. frederiksbergense*), *Okibacterium*, *Paenibacillus* (species *P. lautus*), *Paeniglutamicibacter* (including *P. sulfureus* and *P. terrestris*), *Pantoea*, *Pedobacter* (species *P. petrophilus*), *Plantibacter*, *Pseudarthrobacter* (including species *P. equi*), *Pseudomonas* (including *P. poae* and *P. syringae*), *Psychrobacillus* (*P. psychrodurans*), *Rahnella*, *Rathayibacter* (including *R. festucae*), *Rhizobium*, *Sphingobacterium* (including *S. faecium*), *Sphingomonas*, and *Staphylococcus* (including *S. equorum*).

CONCLUSION

➤ Samples of grain crops were taken in three regions of the Russian Federation: Moscow (2020), the Republic of Crimea (2021) and the Stavropol region (2022). In these three regions, 181 samples of wheat, rye, barley, oats and triticale plants were collected.

➤ Unique genetic targets for the causative agent of black bacteriosis of cereal crops *X. translucens* have been found, and 5 new PCR tests for the identification of the phytopathogen have been developed on their basis: 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 and 6F10/6R10. New PCR tests can be part of the solution to the problem of establishing the phytosanitary condition of batches of Russian grain products.

➤ It has been established that the optimal nutrient medium for the cultivation of *R. tritici* is the YPGA nutrient medium.

➤ The method of preparing grain samples for subsequent PCR identification of *R. tritici*, *X. translucens*, *P. fuscovaginae* and *P. syringae* has been optimized, the use of which, in conjunction with PCR tests, will allow the identification of phytopathogens within 6 hours.

- For the first time in the Russian Federation, using molecular genetic diagnostic methods, a study of plant samples of cereal crops for the content of phytopathogenic bacteria was carried out. As a result of testing samples from phytocenoses in Moscow, the Republic of Crimea and the Stavropol region, *R. tritici* and *P. fuscovaginae* were not detected, *X. translucens* was found in one sample of wheat from the Krasnogvardeysky district of the Republic of Crimea, and *P. syringae* was found in all three regions, the total frequency of occurrence was 41%.

- For the first time, a large-scale study of the components of the cultured bacterial microbiota of cereal crops using PCR and sequencing was carried out. A variety of bacteria included in the microbiome of cereal crops was found.

The identified isolates made it possible to form a collection of pathogenic and non-pathogenic bacteria isolated from cereal crops. The collection can be further used for scientific developments, production activities and in the educational process.

The results of the research were used in the development of methodological recommendations of the FSBI "VNIKR" for the detection and identification of pathogens of bacteriosis of grain crops, which are currently put into operation and recommended for use by testing laboratories in the Russian Federation.

LIST OF WORKS PUBLISHED ON THE TOPIC OF THE THESIS

Publications in journals indexed in the international citation and analytical databases Scopus and Web of Science:

1. Slovareva O.Yu., Muvingi M., Yaremko A.B., Igonin V.N., Rubets V.S. Identification of pathogens of bacterioses and a complex of associated microorganisms in grain crops significant for grain export (on the example of the Timiryazev field experimental station) / Slovareva O.Yu., **Muvingi M.**, Yaremko A.B., Igonin V.N., Rubets V.S. // Agricultural biology. – 2023. – T. 58. – No 1. – P. 188–199.

2. Kavhiza, N. J. Germination response of 12 onion varieties to inoculation with *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *Allii* / N. J. Kavhiza, M. Zargar, S. I. Prikhodko, E. N. Pakina, **M. Muvingi** // AIP Conference Proceedings. – 2023. – No 2777.

Publications (without duplication) in publications recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Federation:

1. **Muvingi, M.** Identification of *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* in wheat grain by PCR / **M. Muvingi**, O.Y. Slovareva, M. Zargar // Bulletin of the Russian University of Peoples' Friendship. Series: Agronomy and Animal Husbandry. – 2022. – Vol. 17. – No 4. – P. 473–483.

Publications in peer-reviewed scientific journals:

1. Slovareva, O.Yu. Development of new PCR tests for the diagnosis of the causative agent of black bacteriosis of grain crops *Xanthomonas translucens* / O.Yu. Starikova, **M. Muvingi** Phytosanitary. Plant Quarantine. – 2021. – No 2(6). – P. 37-49.

Abstracts and conference materials:

1. **Muvingi, M.** Detection and identification of *Rathayibacter tritici* in Russian grain crop survey / **M. Muvingi**, O.Yu. Slovareva, V.S. Rubets, V.N. Igonin // Biotechnology in plant production, animal husbandry and agricultural microbiology: Collection of abstracts of reports of the 20th All-Russian Conference of Young Scientists, dedicated to the memory of Academician of the Russian Academy of Agricultural Sciences Georgy Sergeevich Muromtsev, Moscow, October 27–29, 2020. – Moscow: Federal State Budget Scientific Society All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 2020. – P. 158–159.

2. **Muvingi, M.** Determining the optimal nutrient medium for *Rathayibacter tritici* / **M. Muvingi**, O.Y. Slovareva, M. Zargar // Plant protection in the transition to precision farming = Plant protection in the transition to precision farming: materials of the International Scientific Conference (Priluki, July 27–29, 2021) // National Academician of Belarus, Scientific and Practical Center for Agriculture, Institute of Plant Protection. – Minsk: Colorgrad, 2021, – P. 111–114.
3. Slovareva, O.Yu. Grain Bacterioses Phytosanitary Diagnostic as a Component of Food Security / O.Y. Slovareva, **M. Muvingi** // Conference Proceedings: Global Food Forum 2021. EurAsian Scientific Editions SA, Geneva, Switzerland / EurAsian Scientific Editions Ltd, Hong Kong / EurAsian Scientific Editions OÜ, Tallinn, Estonia. – 2022. – P. 76–83.
4. Slovareva, O.Yu. Application of bioinformatic methods in the development of tests for PCR identification of the causative agent of black bacteriosis of grain crops *Xanthomonas translucens* O.Y. Dictionary, E.V. Starikova, **M. Muvingi** Plant protection in the transition to precision farming = Plant protection in the transition to precision farming: materials of the International Scientific Conference (Priluki, July 27–29, 2021) // National Academy of Sciences of Belarus, Scientific and Practical Center for Agriculture, Institute of Plant Protection. – Minsk : Kolorgrad, 2021, – P. 97–100.
5. **Muvingi, M.** The composition of the bacterial microbiota of wheat and barley grown in the crop rotation system after sunflower and black fallow in the conditions of the central steppe zone of the Republic of Crimea / **M. Muvingi**, O.Yu. Slovareva, A.B. Yaremko, T.L. Ganotskaya, M. Zargar // Biological foundations of plant protection: a collection of scientific works based on the materials of the Zhuchenkov readings VII, Krasnodar, September 15, 2022 / Federal Scientific Center for Biological Protection of Plants. – Krasnodar: EDVI Publishing House, 2022. – P. 149–156.

ABSTRACT

One of the factors that can limit the export of grain from the Russian Federation is bacterial phytopathogens, regulated by the phytosanitary requirements of importing countries. The most significant among the regulated species are *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fuscovaginae* and *Xanthomonas translucens*, since their presence in grain products has been banned by such large importers as Egypt and Turkey. One of the types of phytopathogenic bacteria, *Rathayibacter tritici*, is a quarantine object for the countries of the Eurasian Economic Union and must be detected in wheat products. At the time of the start of work, there were no reliable and rapid methods for identifying these phytopathogens. The objects of the study were *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Xanthomonas translucens* and *Rathayibacter tritici*, due to the relevance of developing methods for their detection and identification during grain export and import by the Russian Federation.

Based on unique data, new PCR tests have been developed - 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 and 6F10/6R10 for reliable species identification of *X. translucens*. It has been established that the optimal nutrient medium for the cultivation of *R. tritici* is YPGA. 181 samples of grain crop plants were collected in three regions of the Russian Federation, in Moscow (breeding experimental station of the Russian State Agrarian University-Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev), the Republic of Crimea and the Stavropol region. The samples were tested by PCR for the presence of DNA of the studied bacteria, as a result, DNA of *P. fuscovaginae* and *R. tritici* was not detected, DNA of *X. translucens* was found in sample 21C31 (winter wheat variety Asket) from the Republic of Crimea, and DNA of *P. syringae* was found in 41.4% samples. 444 bacterial isolates were

isolated from plant samples, among which 87 species of bacteria belonging to 49 genera were identified by sequencing and comparison of the obtained nucleotide sequences with sequences in NCBI. Species such as *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Pseudomonas chromraphis*, *Microbacterium foliorum* and others have been identified. The method for preparing grain samples for subsequent PCR testing during laboratory analysis for the presence of *P. syringae*, *P. fuscovaginae*, *X. translucens* and *R. tritici* has been optimized. Using an optimized method in combination with PCR tests allows laboratory analysis to be carried out within one day.

Methods for identifying and identifying pathogens of bacterial diseases of grain crops that are significant for the import and export of grain products by the Russian Federation have been developed and optimized.

На правах рукописи

МУВИНГИ МУФАРО

**РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
БАКТЕРИОЗОВ, ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ ЭКСПОРТА И ИМПОРТА РОССИЙСКОЙ
ЗЕРНОПРОДУКЦИИ**

Специальность: 4.1.3 Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Аграрно-технологическом институте Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и на базе научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»

Научные руководители: **Заргар Мейсам**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор Агробиотехнологического департамента АТИ РУДН

Словарева Ольга Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник-и.о. начальника научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»

Официальные оппоненты: **Глинушкин Алексей Павлович**, доктор сельскохозяйственных наук, академик РАН, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской Академии Наук»

Щуклина Ольга Александровна, кандидат сельскохозяйственных наук, и.о. заведующего отделом, старший научный сотрудник Главного ботанического сада имени П. В. Цицина РАН.

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства»**

Защита состоится «16» Сентябрь 2024 г. в ... часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя, д. 8, корп. 2, зал 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в УНИБЦ (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя, д. 6.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

И.о. учёного секретаря
диссертационного совета ПДС 2021.002,
аграрно-технологического института РУДН
Доктор биологических наук,
профессор, агробиотехнологический департамент

Игнатов А. Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. С растительной продукцией могут передаваться опасные фитопатогенные бактерии, способные вызвать гибель до 100 % урожая ценных сельскохозяйственных культур и приводить таким образом к существенному экономическому ущербу. В связи с высоким фитосанитарным риском, такие бактерии вносят в перечень карантинных объектов и регулируют на законодательном уровне. Вместе с тем, одной из задач федерального проекта «Экспорт продукции АПК» является «Устранение торговых барьеров (тарифных и нетарифных) для обеспечения доступа продукции АПК на целевые рынки». Применительно к российской зерновой продукции, нетарифным барьером, препятствующим международной торговле, могут являться возбудители бактериозов, регулируемые фитосанитарными требованиями стран-импортеров. В перечень регулируемых видов входят *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens*, а еще один вид, *Rathayibacter tritici*, является карантинным объектом для стран Евразийского экономического союза, в которых входит Российская Федерация. Суммарный объем экспорта зерновых культур в страны-импортеры, для которых *P. fuscovaginae*, *P. syringae* (патовары *syringae*, *atrofaciens*, *coronafaciens* и *lapsa*), *X. translucens* (патовары *translucens*, *undulosa*, *graminis*, *cerealis* и *secalis*) и *Rathayibacter tritici* имеют фитосанитарное значение, – Турция, Египет, Южная Африка, Израиль, Казахстан и другие, составляет ежегодно более 25 млн тонн. С целью осуществления фитосанитарного контроля бактериозов, пробы от партий импортируемой и экспортируемой продукции подлежат лабораторной диагностике. В силу вышеуказанных причин, существует потребность в разработке и оптимизации методов выявления и идентификации возбудителей бактериозов зерновых культур, значимых для импорта и экспорта зернопродукции.

Степень разработанности темы. На момент начала исследования отсутствовали утвержденные в Российской Федерации методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителей бактериозов зерновых культур – *P. fuscovaginae*, *P. syringae* (патовары *syringae*, *atrofaciens*, *coronafaciens* и *lapsa*) и *X. translucens* (патовары *translucens*, *undulosa*, *graminis*, *cerealis* и *secalis*). Существующие методические рекомендации по выявлению и идентификации *R. tritici* не позволяют достоверно и быстро проводить диагностику возбудителя желтого слизистого бактериоза. Научные статьи содержат описание молекулярно-генетических диагностических тестов, которые требуют обязательной апробации и оценки применимости. В лабораториях на территории РФ идентификация значимых для экспорта зерна видов бактерий проводится путем изоляции на средах и оценке морфологии колоний, но без молекулярного анализа данные методы недостоверны даже при успешном выделении бактерий с морфологически схожими колониями. Информация в литературных источниках о распространении исследуемых бактерий на территории РФ основана по большей части на визуальных обследованиях и методах классической микробиологии, не являющихся достаточными для достоверной идентификации.

Цель и задачи исследований. Целью исследований являлась разработка и оптимизация методов обнаружения и идентификации бактериальных возбудителей, значимых для импорта и экспорта зернопродукции Российской Федерацией.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Сбор образцов растений в разных регионах Российской Федерации и исследование на наличие ДНК *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens*.

2. Разработка метода ПЦР-диагностики для идентификации *Xanthomonas translucens*.

3. Определение оптимальной питательной среды для выделения *Rathayibacter tritici*.

4. Оптимизация протоподготовки семян для одновременного обнаружения и

идентификации *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *coronafaciens* и *X. translucens* pv. *translucens*.

5. Характеризация компонентов бактериальной микробиоты образцов растений из Москвы, Ставропольского края и Республики Крым.

Научная новизна. Растительные образцы зерновых культур из нескольких регионов Российской Федерации исследованы на бактериальную инфекцию молекулярными методами; было подтверждено присутствие ДНК *X. translucens* и *P. syringae*. На основе биоинформатического анализа геномов бактерий рода *Xanthomonas* идентифицированы нуклеотидные последовательности, уникальные для *X. translucens*, и разработаны новые праймеры для ПЦР-анализа этого вида. Усовершенствованный метод подготовки проб зерна и идентификации возбудителей позволили сократить время анализа до 6 часов. Бактериальную микробиоту зерновых культур в фитоценозах Москвы, Ставропольского края и Республики Крым исследовали микробиологическими и ПЦР-методами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Собрана и обобщена имеющаяся информация о видах бактерий, важных для импорта зерна, включая номенклатуру, биологию, данные о распространении, фитосанитарный статус, поражаемые культуры и методы диагностики. Апробированы и оптимизированы процессы подготовки проб, методы выделения культур и ПЦР-тесты. Проведена оценка применимости некоторых ПЦР-тестов. Результаты исследований использованы при разработке методических рекомендаций ФГБУ «ВНИИКР» по выявлению и идентификации возбудителей бактериозов зерновых культур, которые в настоящее время введены в действие и рекомендованы к применению испытательными лабораториями на территории РФ.

Методы и методология исследований. Используемые в работе молекулярно-генетические, культуральные и биологические методы являются как средством получения экспериментальных данных, так и объектом самого исследования. Результаты комплексных 4-х летних экспериментальных исследований получены при использовании общепринятых методик, ГОСТов, современных молекулярно-генетических, культурально-морфологических и биологических методов анализа, статистического анализа и различных методов интерпретации результатов.

Положения, выносимые на защиту диссертационной работы:

1. Разработаны новые ПЦР-тесты для идентификации *Xanthomonas translucens*.
2. Проведена идентификация *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* в образцах растений зерновых культур из Москвы, Республики Крым и Ставропольского края.
3. Проведена идентификация культивируемых бактерий из растений зерновых культур, собранных в Москве, Республике Крым и Ставропольском крае.
4. Оптимизирован процесс подготовки проб семян для обнаружения и идентификации *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens*.

Степень достоверности. Исследования выполнены по известным методикам. Все выводы и рекомендации производству подтверждены экспериментальными исследованиями, статистической обработкой полученных результатов.

Апробация результатов работы. Результаты исследований были представлены на 3 международных научных конференциях: 20-я Всероссийская конференция молодых учёных, посвященная памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, г. Москва, 27–29 октября 2020; Международная научная конференция «Защита растений в условиях перехода к точному земледелию», Институт защиты растений, аг. Прилуки (Р. Беларусь), 27–29 июля 2021; 11-я международная научно-практическая конференция «Биологическая защита

растений – основа стабилизации Агрэкосистем», г. Краснодар, 12–16 сентября 2022;

Публикации. Основные результаты проведённых в рамках настоящей диссертационной работы исследований представлены в 9 публикациях, в том числе 2 статьи в международных базах цитирования Scopus/WoS, 1 статья в рецензируемом издании, рекомендованном ВАК РФ и 1 статья в других журналах.

Личный вклад автора. Работа является результатом оригинальных исследований. Диссертант лично участвовал в проведении всех экспериментальных работ, представленных в диссертации, проводил аналитическую обработку полученных данных, обзор литературных источников, участвовал в подготовке публикаций. Разработка программы исследований и выбор необходимых методов исследований выполнены при участии научного руководителя.

Объём и структура работы. Диссертация изложена на 193 страницах. Состоит из введения, основной части, содержащей 54 рисунок, 31 таблицу, заключения, списка литературы (включает 142 наименования), принятых сокращений и 15 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В этой главе представлена информация об исследуемых возбудителях бактериозов, приведены сведения о существующих методах диагностики бактериозов, а также о молекулярных методах идентификации бактериальных патогенов. Освещается важность и актуальность особенностей осуществления международной торговли зернопродукцией между Российской Федерацией и другими странами.

Глава 2. Материалы и методы

Материалы

Материалами исследования являлись 38 штаммов бактерий из зарубежных коллекций и коллекции ФГБУ «ВНИИКР», 181 образец растений зерновых культур, 434 бактериальных изолята из зерновых культур, а также 171 геномная сборка бактерий рода *Xanthomonas*, из депонированных в Генбанк NCBI.

Сбор образцов растений в регионах Российской Федерации с целью выявления и идентификации объектов исследования, а также формирования коллекции патогенной и непатогенной микробиоты зерновых культур.

Сбор образцов осуществляли случайным образом, в течение вегетационного периода. Для очистки и дезинфекции перчаток и инструментов перед каждым сбором образцов растений использовали раствор хлора. Собранные образцы помещали в пластиковый пакет с бумажными фильтрами, запечатывали и маркировали. При наличии информации о сортах, ее записывали. Для каждой точки сбора фиксировали координаты. Собранные образцы доставляли в лабораторию и хранили не более недели при температуре 2–8 °С. В течение указанного периода времени проводили подготовку проб.

Подготовка проб растений

Из каждого образца растительной ткани в лаборатории готовили аналитическую пробу (суспензию микробиоты). Нарезали 5 г растительных тканей и добавляли 30 мл фосфатно-солевого буфера (PBS). Затем пробу встряхивали на орбитальном шейкере Unimax 2010 (Heidolph, Германия) при 200 об/мин. в течение 45–60 мин. Жидкую часть пробы (экстракт) фильтровали, используя бумажные фильтры «Синяя лента». После фильтрации экстракты

центрифугировали 10 мин. при 4 °С и режиме 10000 g на центрифуге Allegra X-30R, Beckman Coulter, Дания. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS, и полученная суспензия представляла собой аналитическую пробу. По 200 мкл этой пробы использовали для выделения ДНК и посева на питательные среды, а к 600 мкл добавляли две капли глицерина и хранили при температуре - 18 °С для будущего использования.

Оптимизация подготовки проб семян

Навески зерна пшеницы, массой 25±0,2 г каждая, переносили в пакеты для гомогенизации и добавляли 54 мл PBS. Пакеты помещали на орбитальный шейкер и оставляли при 100 об/мин. на 2 ч. В пакеты добавляли 6 мл одного из разведений бактериальной суспензии: 2-х, 3-х, 4-х или 5-и штаммов, включающих 0337 *X. translucens* pv. *translucens*, 0378 *R. tritici*, 0335 *P. fuscovaginae* и 0440 *P. syringae* pv. *coronafaciens*. Концентрацию бактериальных суспензий определяли методом Коха. Один из пакетов оставили незараженным в качестве отрицательного контроля. По истечении 2 ч, содержимое пакетов обрабатывали в гомогенизаторе (BagMixer 400SW, Interscience, Франция) при режиме 4, 5 мин. Затем пакеты помещали на шейкер при 100 об/мин. на 15 мин. Жидкую часть гомогената переносили в центрифужные пробирки емкостью 50 мл и центрифугировали при режиме 5 мин., 1200 g, 4 °С. Супернатант перемещали в чистые центрифужные пробирки и снова центрифугировали 10 мин. при 10000 g и 4 °С. После второго центрифугирования супернатант удаляли, а к осадку добавляли 1 мл PBS, встряхивали на вортексе и полученную аналитическую пробу переносили в микропробирку. Для выделения ДНК использовали по 200 мкл каждой аналитической пробы в двукратной повторности, а также по 200 мкл 3, 4, 5 и 6 разведений бактериальных суспензий в PBS. Классическую ПЦР и ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) проводили в выделенной ДНК с использованием видоспецифичных праймеров.

Выделение бактериальных культур

Для выделения бактериальных культур использовали аналитические пробы растений. В работе использовали питательные среды CRL, YDC и R2A. Посев на питательные среды проводили методом Дригальского, используя 2–4 чашки Петри диаметром 90 мм на одну аналитическую пробу. После посева чашки Петри плотно оборачивали герметизирующей пленкой Parafilm и оставляли при температуре 25 °С в инкубаторе (MIR-254, Panasonic Healthcare Co., Ltd., Япония). При появлении хорошо отличимых отдельных колоний всех морфотипов, их пересекали с помощью петли на новые чашки Петри для получения чистой культуры. Морфологические характеристики колоний фиксировали. Отдельные колонии каждого изолята использовали для выделения ДНК, ПЦР и секвенирования. Чистые культуры помещали в микропробирки и хранили при - 80°С для дальнейшего использования.

Определение оптимальной питательной среды для *Rathayibacter tritici*

Одну бактериальную колонию штамма 0338 *R. tritici* суспендировали в 1 мл PBS, а затем проводили серию последовательных 10-кратных разведений. По 50 мкл 4 и 5 разведений высевали на две питательные среды: YPGA и NBY. Каждое разведение высевали в 10-кратной повторности. Результаты оценивали через 5 суток инкубирования при 25 °С.

Выделение ДНК

Выделение ДНК из бактериальных изолятов, бактериальных суспензий и аналитических проб проводили с использованием набора «Проба-ГС», ЗАО «АгроДиагностика», Россия, в соответствии с инструкцией производителя.

Молекулярно-генетические методы

В работе использовали как классическую ПЦР, так и ПЦР-РВ. Классические ПЦР-тесты: PSF/PSR для идентификации бактерий рода *Pseudomonas* (размер ПЦР-продукта 610 п.о.), SyD1/SyD2 для идентификации *P. syringae* pv. *syringae* и *P. syringae* pv. *atrofaciens* (1040 п.о.), PsyF/PsyR для идентификации *P. syringae* (144 п.о.), Mus714F/Mus714R для проведения

внутреннего положительного контроля (714 п.о.), 8UA/519B (500 п.о.) и/или 27f/907r (880 п.о.) для последующего секвенирования участка 16–23S рПНК (3500, Applied Biosystems, USA), Rt 3F/3R для идентификации *R. tritici* (520 п.о.).

Тесты ПЦР-РВ: BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 для идентификации *R. tritici*, набор *Pseudomonas fuscovaginae*-РВ, ЗАО «Синтол», Россия, для идентификации *P. fuscovaginae*

Разработка ПЦР-тестов для идентификации *Xanthomonas translucens*

Поиск нуклеотидных мишеней проведен с использованием 10 геномных сборок штаммов *X. translucens* и 161 геномной сборки 25 других (нецелевых) видов бактерий рода *Xanthomonas*. Белковые последовательности маркировали в соответствии с видом и штаммом и проводили кластеризацию с помощью программы Cd-hit (версия 4.1) при пороге идентичности 70 % с допустимой разницей в длине последовательностей 80 % и длине «слова» из 5 аминокислотных остатков. Используя скрипт Python, из полученных наборов белковых кластеров выделили те, которые содержали только белковые последовательности *X. translucens*. Нуклеотидные последовательности генов, кодирующих белки из выделенных кластеров, специфичных для *X. translucens*, были использованы для разработки праймеров. Праймеры подбирали с помощью программы Primer-BLAST и синтезировали в ЗАО «Евроген», Россия. Апробацию разработанных праймеров проводили с ДНК бактериальных штаммов, принадлежащих к роду *Xanthomonas*, включая *X. translucens*.

Глава 3. Результаты исследований и обсуждение

Сбор образцов растений зерновых культур из разных регионов Российской Федерации (Москва, Республика Крым, Ставропольский край)

Образцы растений собраны на участках Тимирязевской полевой опытной станции (Москва) в 2020 г. (55 образцов), в Красногвардейском, Симферопольском и Белогорском районах Республики Крым в 2021 г. (60 образцов) и Александровском, Андроповском, Будённовском, Георгиевском, Кочубеевском, Минеральноводском, Новоселицком и Советском районах Ставропольского края в 2022 г. (66 образцов). Всего в трех регионах РФ собран 181 образец растений пшеницы, ржи, ячменя, овса, тритикале и зернобобовой смеси.

Разработка ПЦР-тестов для идентификации *Xanthomonas translucens*

После кластеризации 667416 белковых последовательностей по установленным критериям специфичности, длины и вариабельности были отобраны последовательности 6 генов и использованы для подбора праймеров. (табл. 1).

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности генов, используемые для подбора праймеров

№ п/п	Геномная последовательность NCBI	Координаты гена в геноме, п.о.	Кодируемый белок	Аннотация	Названия пар праймеров	Длина ПЦР-продукта, п.о.
1	NZ_FLTU01000142.1	6002-8863	WP_039956369.1	Белок, содержащий домен DUF5110	1F8/1R8	711
					1F10/1R10	379
2	FLTU01000085.1	5245-7368	WP_009581062.1	ТопВ -зависимый сидерофорный рецептор	2F6/2R6	759
3	NZ_FLTU01000009.1	3500-2202	WP_039955267.1	нуклеозидгидролаза	3F3/3R3	246
					3F5/3R5	209

					3F9/3R9	869
4	NZLHSI01 000001.1	2522179- 2523426	WP_00958106 0.1	Белок, содержащий домен АТФ- захвата	4F1/4R1	503
					4F3/4R3	904
5	NZ_ANGG 01000457.1	10914- 12119	WP_00959849 6.1	белок семейства альдозо-1- эпимераз	5F3/5R3	200
					5F6/5R6	424
6	NZ_ANGG 01000136.1	4667-3489	WP_00958105 7.1	Транспортер МФС	6F6/6R6	970
					6F10/6R10	663

Для каждой из 6 последовательностей было подобрано от 1 до 3 пар праймеров. Всего было подобрано 12 пар праймеров (табл. 1). В результате ПЦР со всеми 12 парами праймеров были получены продукты ожидаемой длины с использованием в качестве матрицы ДНК штамма 0337 *X. translucens* (рис. 1).

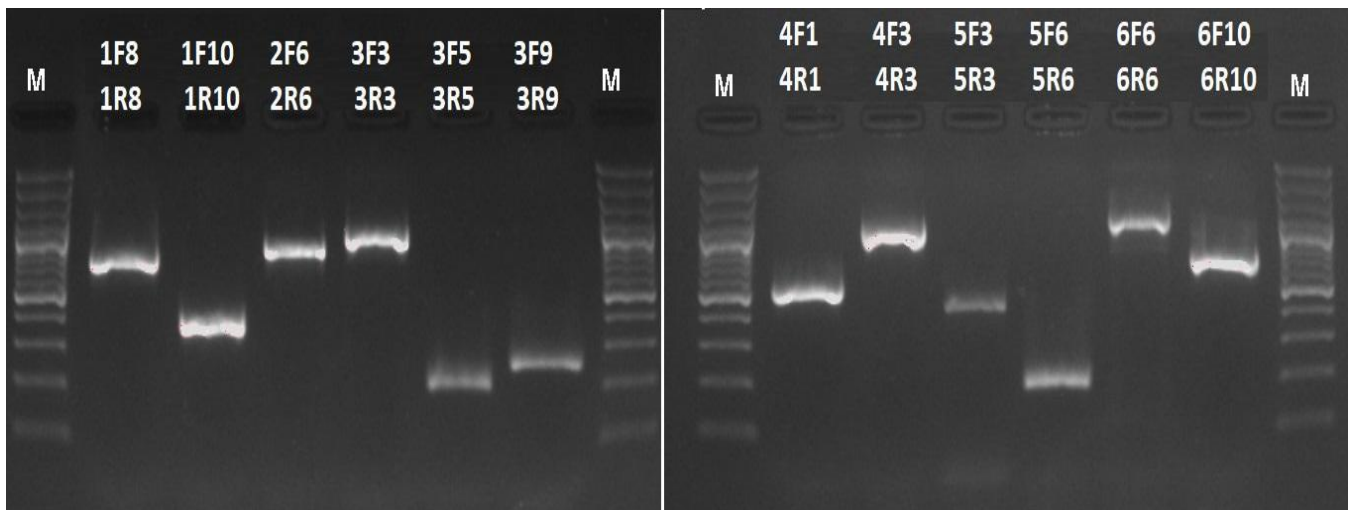


Рисунок 2 – Электрофореграмма результатов ПЦР с ДНК штамма 0337 *Xanthomonas translucens* для каждой пары праймеров, использованных в исследовании. М – маркер генетического веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, США

Праймеры 3F3/3R3, 3F5/3R5, 3F9/3R9, 4F3/4R3, 5F3/5R3 и 6F6/6R6 показали низкую специфичность. В то же время, пары праймеров 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 и 6F10/6R10 показали высокую специфичность при тестировании бактерий рода *Xanthomonas*; в результате ПЦР с указанными праймерами образуется 1 четко определяемый ампликон ожидаемого размера (711, 379, 503, 424 и 663 п.о. соответственно) с ДНК *X. translucens*. С другими штаммами бактерий рода *Xanthomonas* ПЦР-продукт либо отсутствует, либо отличается по размеру от ожидаемого для каждого из тестов. Таким образом, использование пар праймеров 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 и 6F10/6R10 позволяет проводить идентификацию *X. translucens*.

Определение оптимальной питательной среды для *Rathayibacter tritici*

Через 5 дней после посева на среды NBY и YPGA, колонии *R. tritici* достигли своего максимального размера (до 6 мм в диаметре) и приобрели ярко-желтый цвет. Колонии имели круглую форму, с ровными краями и выпуклым профилем (рис. 2).

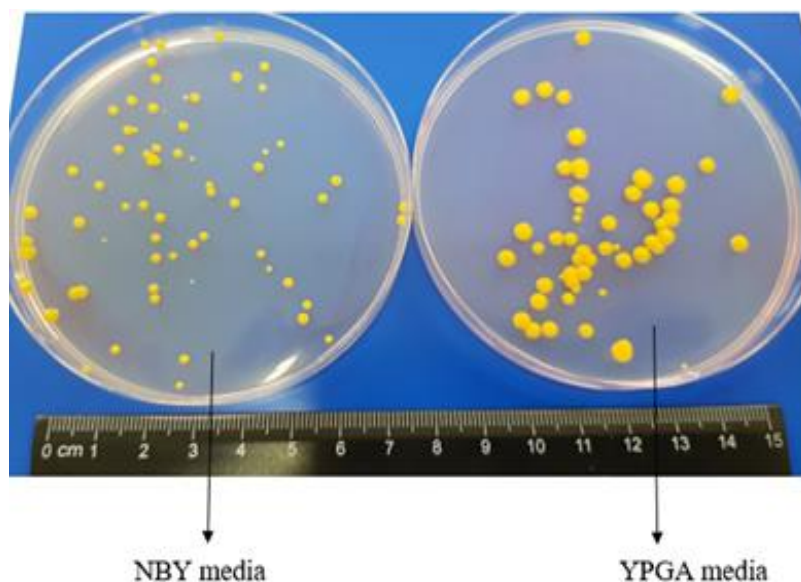


Рисунок 2 – Чашки Петри с 50 мкл 5-го разведения *Rathayibacter tritici* на NBY и YPGA после 5 дней инкубирования при 25 °С

Колонии на YPGA имели средний размер 3,92 мм, тогда как на NBY средний размер составил 2,44 мм (табл. 2).

Таблица 2 – Среднее значение, стандартное отклонение и уровень достоверности для размеров колоний *Rathayibacter tritici*

Значение (уровень значимости 0,05)	6- ^е разведение		5- ^е разведение	
	YPGA	NBY	YPGA	NBY
Средн.знач.	3,92	2,44	3,54	2,15
Станд.отклон.	0,99	0,81	3,30	0,82
Достоверность	0,46	0,37	0,42	0,12

На среде YPGA колонии были более крупные (в среднем 5,60 мм), чем на NBY (около 3,00 мм). Средний размер колоний на среде YPGA был больше, чем максимальный размер колоний на NBY. Как в 5-^м, так и в 6-^м разведениях средний размер колоний на YPGA был значительно больше, чем на NBY. Среднее количество колоний было одинаковым в обеих средах в 6-^м разведении (табл. 3).

Таблица 3 – Результат подсчета числа колоний

Значение (уровень значимости 0,05)	6- ^е разведение		5- ^е разведение	
	YPGA	NBY	YPGA	NBY
Общее	48	47	586	444
Средн.знач.	4,8	4,7	58,6	44,4
Станд.отклон.	2,1	1,4	9,6	10,3
Достоверность	0,59	0,41	0,78	0,96

В 5-^м разведении на YPGA было значительно больше колоний, чем NBY (табл. 3). Среда YPGA является наиболее оптимальной для культивирования *R. tritici*, чем среда NBY, поскольку на ней образуются более крупные колонии, и их количество больше.

Оптимизация подготовки проб семян для последующего обнаружения и идентификации *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* методом ПЦР

Первое низкоскоростное центрифугирование в течение 5 мин., 1200 г, 4 °С привело к образованию осадка муки массой $1 \pm 0,3$ г в каждой центрифужной пробирке. Таким образом, первое центрифугирование позволило избавиться от большей части крахмала, который является одним из ингибиторов ПЦР. Последующее высокоскоростное центрифугирование (10 мин., 10000 г, 4 °С) позволило получить концентрированную микробиоту, содержащуюся в образце зерна, что повысило вероятность обнаружения фитопатогена в пробе.

Для оценки числа бактериальных клеток в суспензиях, используемых для заражения проб семян, проводили подсчет колониеобразующих единиц на чашках Петри. Установлено, что используемые суспензии содержали бактерии в концентрациях 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 КОЕ/мл во 2-м, 3-м, 4-м, 5-м и 6-м 10-кратных разведениях соответственно (табл. 4).

Таблица 4 – Результат определения количества колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в испытуемых бактериальных суспензиях через 7 дней после посева

Напряжение	Разведение исходной суспензии				
	2	3	4	5	6
0335	$4,2 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$
0440	$3,7 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$
0337	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
0378	$0,6 \times 10^7$	$0,6 \times 10^6$	$0,6 \times 10^5$	$0,6 \times 10^4$	$0,6 \times 10^3$

Поскольку для инокуляции проб семян использовали бактериальные суспензии в 2, 3, 4 и 5 разведений в соотношении 1:9, концентрации бактерий в экстрактах инфицированных семян до центрифугирования составили соответственно 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 КОЕ/мл.

ПЦР-тестирование образцов, содержащих штамм 0335, показало наличие *P. fuscovaginae* как в бактериальных суспензиях в PBS, так и в пробах инфицированного зерна пшеницы (табл. 5), при этом отрицательные контроли выделения ДНК и амплификации были отрицательными.

Таблица 5 – Результат проведения теста «*Pseudomonas fuscovaginae*-PB», Синтол, Россия для идентификации *P. fuscovaginae* (штамм 0335) и теста VTRIT2F/VTRIT2R/VTRITP1 для идентификации *R. tritici*

Проба	Ст, FAM	Ст, HEX	Результат	Проба	Ст, FAM	Ст, HEX	Результат
0335- 10^6 - PBS	27,0	34,0	+	0378- 10^6 - PBS	30,1	30,8	+
0335- 10^5 - PBS	29,7	33,8	+	0378- 10^5 - PBS	32,2	31,3	+
0335- 10^4 - PBS	30,8	34,1	+	0378- 10^4 - PBS		31,1	-
0335- 10^3 - PBS	31,6	34,2	+	0378- 10^3 - PBS		31,6	-
0335- 10^6 - Экстракт-1	25,4	34,2	+	0378- 10^6 - Экстракт-1	28,5	30,7	+
0335- 10^6 - Экстракт-2	25,2	34,6	+	0378- 10^6 - Экстракт-2	27,7	30,5	+
0335- 10^5 - Экстракт-1	29,2	34,3	+	0378- 10^5 - Экстракт-1	31,6	31,2	+
0335- 10^5 -	29,4	34,3	+	0378- 10^5 -	32,0	31,5	+

Проба	Ct, FAM	Ct, HEX	Результат	Проба	Ct, FAM	Ct, HEX	Результат
Экстракт-2				Экстракт-2			
0335-10 ⁴ - Экстракт-1	32,3	34,3	+	0378-10 ⁴ - Экстракт-1		31,6	-
0335-10 ⁴ - Экстракт-2	31,6	34,2	+	0378-10 ⁴ - Экстракт-2		31,5	-
0335-10 ³ - Экстракт-1	34,3	34,5	+	0378-10 ³ - Экстракт-1		31,8	-
0335-10 ³ - Экстракт-2	35,3	34,5	+	0378-10 ³ - Экстракт-2		31,5	-
0335-10 ⁷ - PBS - ПКО	22,9	34,1	+	0378-10 ⁷ - PBS - ПКО	27,7	31,0	+
Экстракт-1-ОКО		34,4	-	Экстракт-1-ОКО		34,4	-
Экстракт-2-ОКО		34,6	-	Экстракт-2-ОКО		34,6	-
PBS -ОКО		34,6	-	PBS -ОКО		34,6	-

Примечание: Ct — пороговый цикл ПЦР, FAM — канал обнаружения специфичности ПЦР, HEX — канал обнаружения внутреннего положительного ПЦР-контроля, «+» — положительный, «-» — отрицательный, PBS — фосфатно-солевой буфер, ПКО — положительный контрольный образец, ОКО — отрицательный контрольный образец

ПЦР-тестирование образцов, содержащих штамм 0378, показало наличие *R. tritici* в бактериальных суспензиях в PBS и в образцах зараженного зерна пшеницы при концентрации бактериальных клеток в анализируемой пробе 10⁵ КОЕ/мл (табл. 5).

В каждом из исследованных образцов, инфицированных штаммом 0440, обнаружена ДНК *P. syringae* (рис. 3).

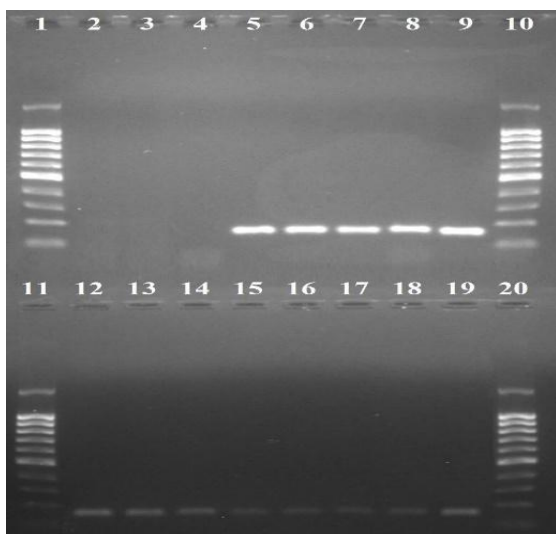


Рисунок 3 – Электрофореграмма результатов ПЦР-теста PsyF/PsyR с ДНК образцов, инфицированных штаммом 0440
1, 10, 11 и 20 – маркер длины ДНК, 2, 3 – отрицательный контрольный образец (экстракт), 4 – отрицательный контрольный образец (буфер), 5–8 – буфер, инфицированный штаммом 0440 в концентрации 3,7*10⁶ – 3,7*10³ соответственно, 9, 12 – штамм 0440 в экстракте (3,7*10⁶), 13, 14 – штамм 0440 в экстракте (3,7*10⁴), 15, 16 – штамм 0440 в экстракте (3,7*10⁴), 17, 18 – штамм 0440 в экстракте (3,7*10⁵), 19 – положительный контрольный образец

ДНК *X. translucens* обнаружена во всех зараженных тестируемых с праймерами 4F1/4R1 пробах и не обнаружена в отрицательных контролях (рис. 4).

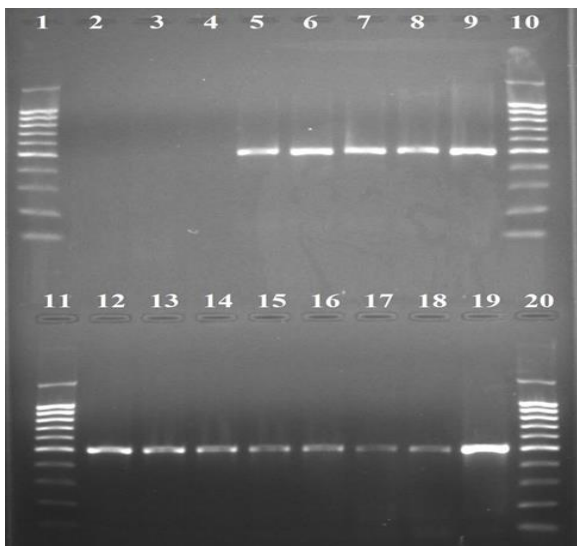


Рисунок 4 – Электрофореграмма результатов ПЦР-теста 4F1/4R1 с ДНК образцов, инфицированных штаммом 0337

1, 10, 11 и 20 – маркер длины ДНК; 2, 3 — отрицательный контрольный образец (экстракт); 4 — отрицательный контрольный образец (буфер); 5–8 – буфер, инфицированный штаммом 0337 в концентрациях $1,5 \cdot 10^6$ – $1,5 \cdot 10^3$ соответственно; 9, 12 – штамм 0337 в экстракте ($1,5 \cdot 10^6$); 13, 14 – штамм 0337 в экстракте ($1,5 \cdot 10^5$); 15, 16 – штамм 0337 в экстракте ($1,5 \cdot 10^4$); 17, 18 — штамм 0337 в экстракте ($1,5 \cdot 10^5$); 19 — положительный контрольный образец

Ингибирование ПЦР не наблюдалось ни в одном из протестированных проб ДНК, выделенных из образцов, зараженных штаммами 0335, 0337, 0338 и 0440. Результаты показывают, что двойное центрифугирование при подготовке проб эффективно для удаления крахмала, оставшегося в пробе после гомогенизации семян. Использование метода двухстадийного центрифугирования для удаления ингибирующих веществ из растительного материала применяется в лабораторной практике, но для подготовки проб семян пшеницы с последующей ПЦР-идентификацией бактерий данный метод ранее не использовался. В работе метод был оптимизирован с целью удаления крахмала при подготовке проб зерна. Рекомендуется следующий метод подготовки проб: 25 г зерна пшеницы поместить в пакет для гомогенизации. Добавить 60 мл PBS и оставить на орбитальном шейкере при режиме 100 об/мин. в течение 2 часов. Затем обработать пакеты в гомогенизаторе при скорости 4 в течение 5 мин. После выдержать пакет на орбитальном шейкере при режиме 100 об/мин. в течение 15 мин. Перенести жидкую часть гомогената в центрифужные пробирки. Центрифугировать пробирки при 1 200 g, 4°C в течение 5 мин. Аккуратно перенести надосадочную жидкость в другую центрифужную пробирку и центрифугировать 10 мин. при 10 000 g и 4 °C. Аккуратно удалить надосадочную жидкость, а к осадку добавить 1 мл PBS. Ресуспендировать осадок на вортексе и перенести суспензию в пробирку Эппендорф 1,5 мл. Полученную аналитическую пробу можно использовать для тестирования.

Идентификация *Pseudomonas fuscovaginae*, *Rathayibacter tritici*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* в образцах растений, собранных в Москве, Республике Крым и Ставропольском крае

В результате ПЦР-тестирования ДНК, выделенной из образцов растений зерновых культур, ДНК *R. tritici* и *P. fuscovaginae* не обнаружена ни в одном из 181 образца. В результате идентификации *X. translucens* в исследуемых образцах, получен один положительный результат для образца озимой пшеницы сорта Аскет из Красногвардейского района Республики Крым. В двух других регионах РФ, Москве и Ставропольском крае, *X. translucens* не выявлен.

Следующие результаты были получены после проведения ПЦР-теста PSYf/PSYr для обнаружения *P. syringae* в анализируемых образцах растений. Всего было исследовано 55 образцов ДНК, выделенных из аналитических проб растений, собранных в Москве.

Электроферограммы анализа ДНК с помощью праймеров PSYf/PSYr представлены на рисунке 5.

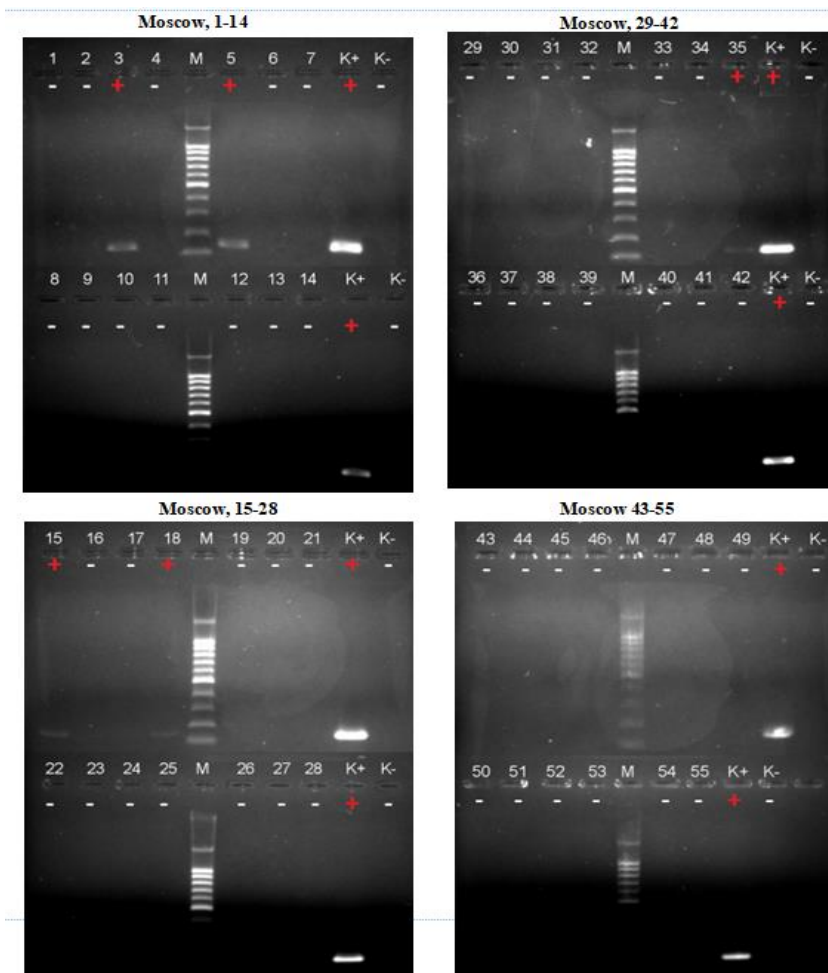


Рисунок 5. Примечание: «+» – обнаружен, «-» не обнаружен. 1. Озимая рожь Снежана, 2. Мягкая озимая пшеница Жива, 3. Мягкая озимая пшеница Алексеевич, 4. Мягкая озимая пшеница Уруп, 5. Мягкая озимая пшеница Морозко, 6. Мягкая озимая пшеница Тимирязевская Юбилейная, 7. Мягкая озимая пшеница Московская 56, 8. Мягкая озимая пшеница Бирюза, 9. Мягкая озимая пшеница Тимирязевская 150, 10. Мягкая озимая пшеница Граф, 11 Тритикале озимая Александр, 12. Озимая пшеница Дон Янтарная, 13. Тритикале озимое Виктор, 14. Мягкая озимая пшеница Васса, 15. Пшеница озимая двузернянка, 16. Тритикале озимое Немчиновский 56, 17. Озимая пшеница Еремеевна, 18. Тритикале озимое шаровидное Тит, 19. Мягкая озимая пшеница Московская 39, 20. Тритикале озимое Валентин 90, 21. Мягкая озимая пшеница Дублет, 22. Мягкая озимая пшеница Кавалерка, 23. Мягкая озимая пшеница Заря, 24. Мягкая озимая пшеница Немчиновская 24, 25. Озимая твердая пшеница Победа 70, 26. Мягкая озимая пшеница Легенда, 27. Мягкая озимая пшеница Авеста, 28. Озимая рожь Верасень, 29. Мягкая озимая пшеница Инна, 30. Озимая пшеница Терра, 31. Тритикале озимое Тимирязевская 150, 32. Мягкая озимая пшеница Мельница, 33. Мягкая озимая пшеница Аскет, 34. Мягкая озимая пшеница Велена, 35. Мягкая озимая пшеница Ваня, 36. Мягкая озимая пшеница Артель, 37. Мягкая озимая пшеница Немчиновская 85, 38. Мягкая озимая пшеница Видеа, 39. Мягкая озимая

пшеница Донская Лира, 40. Мягкая озимая пшеница Голубая, 41. Мягкая озимая пшеница Московская 40, 42. Мягкая озимая пшеница Донская 107, 43. Мягкая озимая пшеница Степная, 44. Мягкая озимая пшеница Губернатор Дона, 45 лет. Мягкая озимая пшеница Ростовчанка, 46. Мягкая озимая пшеница Веха, 47. Мягкая озимая пшеница Немчиновская 57, 48. Мягкая озимая пшеница Августа, 49. Мягкая озимая пшеница Собербаш, 50. Мягкая озимая пшеница Анка, 51. Мягкая озимая пшеница Гурт, 52. Мягкая озимая пшеница Антонина, 53. Мягкая озимая пшеница Немчиновская 17, 54. Мягкая озимая пшеница Безостая 100 и 55. Озимая рожь. М — ДНК-маркер 100+bp DNA-ladder (100-1000п.о. («Евроген», Россия) (Тимирязевская полевая опытная станция, РГАУ — МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 2020).

ДНК *Pseudomonas syringae* была обнаружена в 5 аналитических образцах растений. Положительные результаты в виде ПЦР-продукта длиной 144п.о, получены также при тестировании положительного контроля. В остальных 50 образцах ДНК *P. syringae* не был обнаружен и в отрицательных контрольных образцах (ОКО). Это 9% образцов ДНК.

Всего было исследовано 60 образцов ДНК, выделенных из аналитических образцов растений, собранных в Республике Крым. Электроферограммы анализа ДНК с праймерами PSYf/PSYr представлены на рисунке 6.

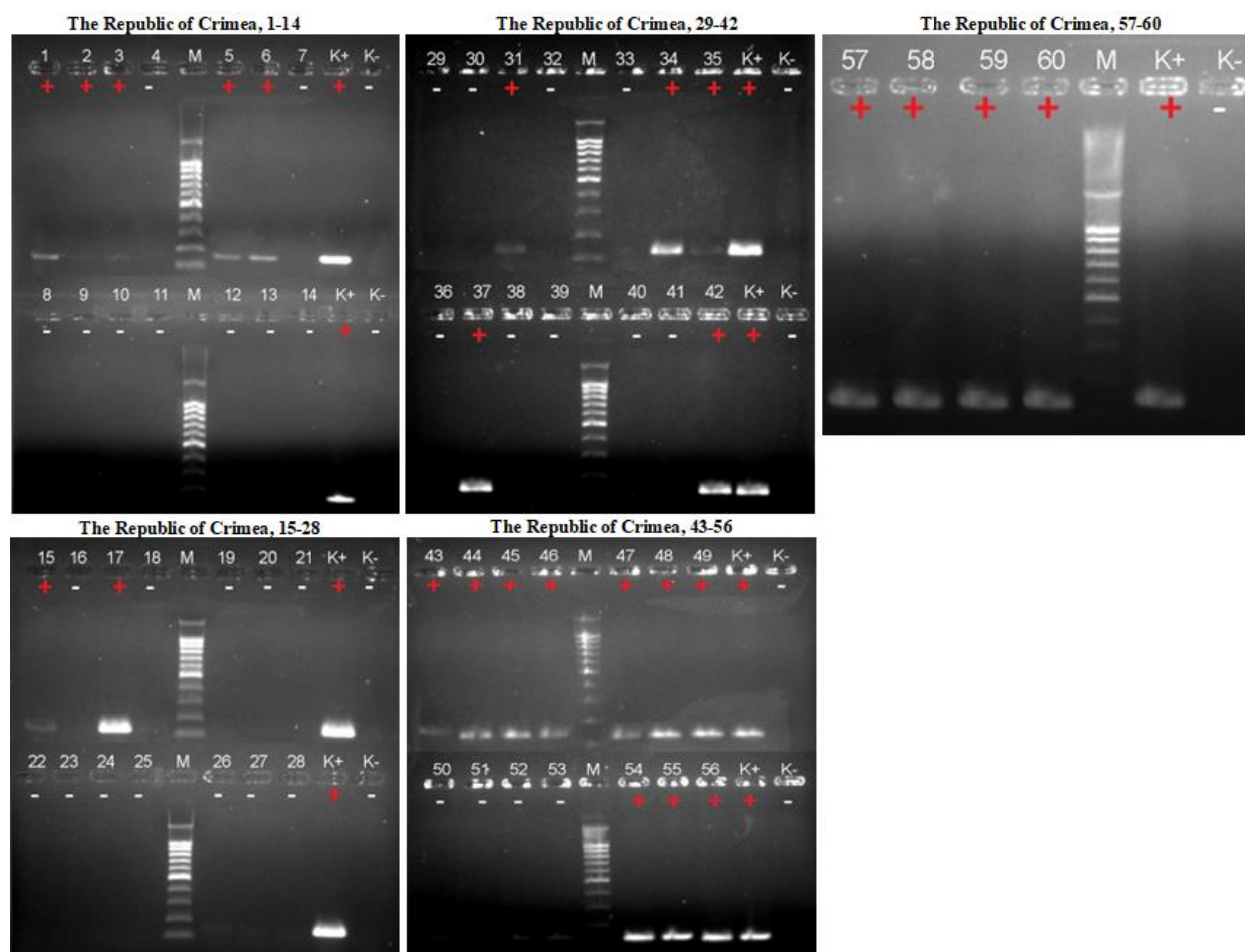


Рисунок 6. Примечание: «+» – обнаружен, «-» не обнаружен. 1, 11, 17, 18, 19. Озимый ячмень Онега, 2. Озимая пшеница Аксиция, 3, 4, 10, 16, 20–31. Озимая пшеница Аскет, 5, 9. Озимый ячмень Восход, 6, 7, 12, 13, 14, 15. Озимая пшеница Губернатор Дона, 8,

32, 50. Озимый ячмень Вьюга, 33, 51, 57. Озимый ячмень Рубеж, 34, 52, 56. Озимый ячмень Спринтер, 35, 53. Озимый ячмень Тома. 36, 48. Озимый ячмень Мастер, 37, 49. Озимый ячмень Эспада, 38. Озимая пшеница Анка, 39. Озимая пшеница Велена, 40. Озимая пшеница Веха, 41. Озимая пшеница Караван, 42. Овес Верный, 43. Овес Мезмай, 44. Овес Черниговский, 45. Овес Скакун, 46. Овес Подгорный, 47. Овес Гузерибль, 54. Тритикале, пшеница, ячмень, 55, 60. Озимая пшеница Корона, 58. Злаково-бобовая смесь, 59. Овес. М — ДНК-маркер 100+bp DNA-ladder (100-1000п.о. («Евроген», Россия) (три района: Белогорский, Красногвардейский и Симферопольский Республики Крым, 2021).

ДНК *Pseudomonas syringae* была обнаружена в 26 аналитических образцах растений. Положительные результаты в виде ПЦР-продукта длиной 144п.о, получены также при тестировании положительного контроля. В остальных 34 образцах ДНК *P. syringae* не был обнаружен и в контрольных образцах с отрицательным результатом (ОКО). Это 43% анализируемых образцов ДНК растений.

Всего было исследовано 66 образцов ДНК, выделенных из аналитических образцов растений, собранных в Ставропольском крае. Электроферогаммы анализа ДНК с праймерами PSYf/PSYr представлены на рисунке 7.

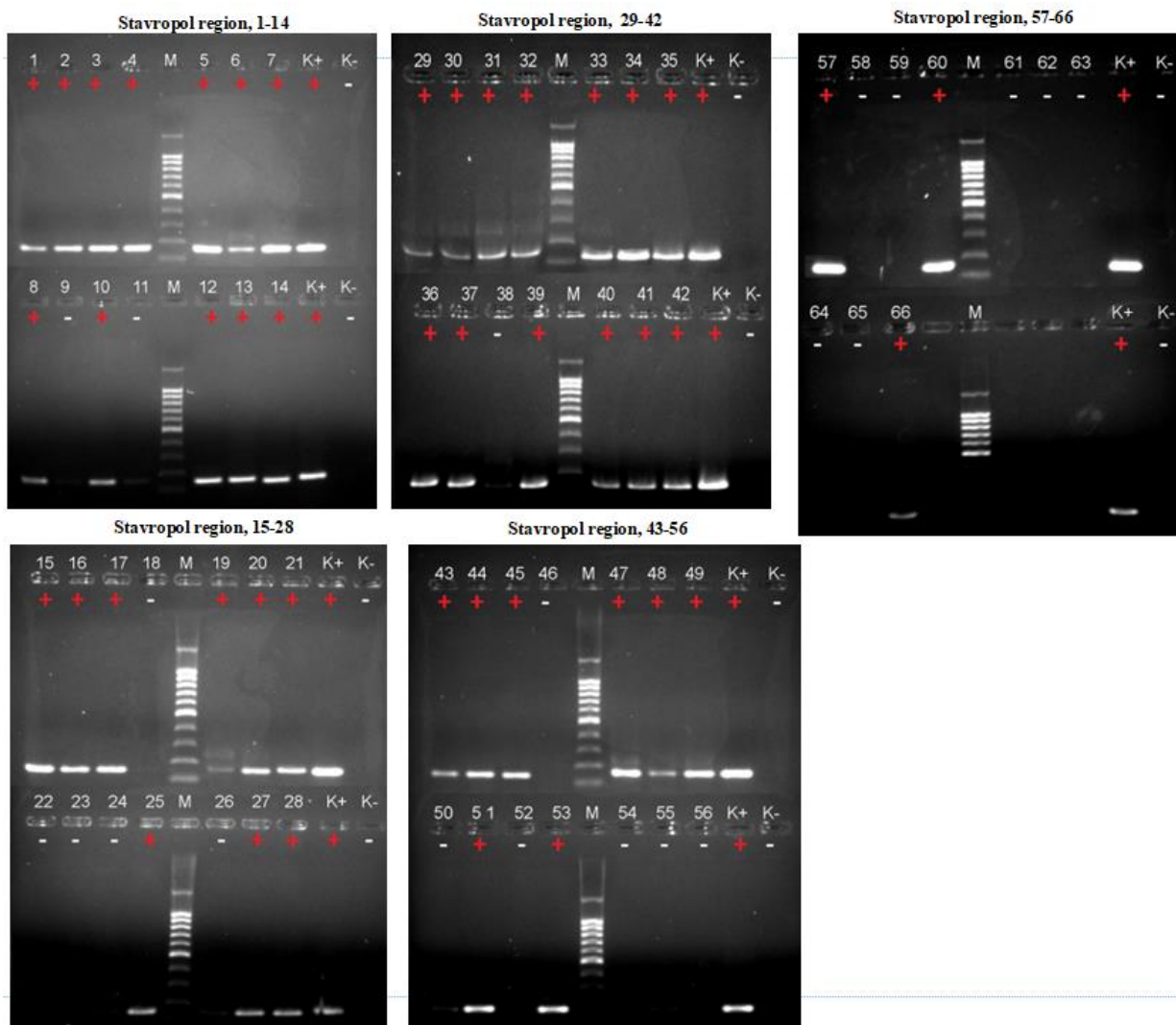


Рисунок 7. Примечание: «+» – обнаружен, «-» не обнаружен. 1. Озимый ячмень Рубеж, 2. Озимая пшеница Собербаш, 3. Озимая пшеница Стиль 18, 4, 6, 8, 9, 11–13, 15. Озимая пшеница Таня, 5, 7. Озимая пшеница Штиль 18, 10, 14. Озимая пшеница Гром, 16. Озимый ячмень Базальт, 17, 18. Озимая пшеница Юбилейная, 19, 20, 22, 23, 29, 32. Озимая твердая пшеница Амазонка, 21. Яровая твердая пшеница Ясенская, 24, 31. Озимая твердая пшеница Яхонт, 25. Озимая твердая пшеница Агат Донской, 26. Озимая твердая пшеница Степной янтарь, 27. Озимая пшеница Центрина, 28, 33. Твердая озимая пшеница Одари, 30. Озимая пшеница Мягкая Юкка, 34, 36, 38–42, 44, 45, 66. Озимая пшеница, 35. Озимый ячмень + овес, 37, 43, 46. Озимый ячмень, 47, 50, 55. Пшеница Чернява, 48, 49. Озимая пшеница Алексеевич, 51, 52, 54. Озимый ячмень Каррера, 53. Ячмень Алексеевич, 56. Тритикале, 57. Озимая пшеница Антонина, 58. Яровой ячмень Грис, 59. Яровой ячмень Азимут, 60. Яровой ячмень Леон, 61. Яровой ячмень Ратник, 62. Яровой ячмень Формат, 63. Яровой ячмень Щедрый, 64. Яровой ячмень Вакула, 65. Яровой ячмень Авалон. М — ДНК-маркер 100+bp DNA-ladder (100-1000п.о. («Евроген», Россия) (Кочубеевский, Буденновский, Советский, Георгиевский, Андроповский, Александровский, Шпаковский, Новоселицкий и Минераловодский Ставропольского края. 2022).

ДНК *P. syringae* была обнаружена в 5 из 55 аналитических проб растений, собранных в

Москве, в 26 из 60 аналитических проб растений из Республики Крым и в 45 из 66 аналитических проб растений из Ставропольского края (рис. 8).

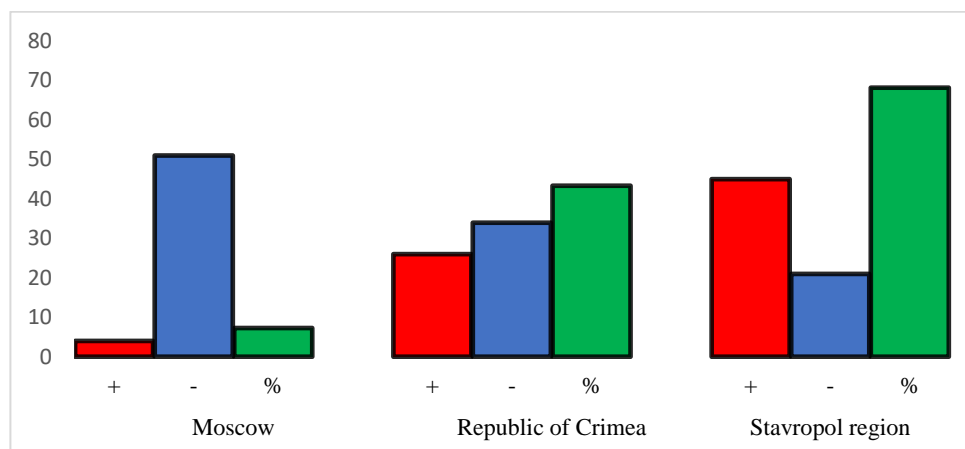


Рисунок 8 – Результаты обнаружения *P. syringae* в аналитических пробах растений. «+» *P. syringae* обнаружен, «-» *P. syringae* не обнаружен, «%» частота встречаемости *P. Syringae*, %

Частота встречаемости *P. syringae* в образцах зерновых культур составила 9 %, 43 % и 68 % для Москвы, Республики Крым и Ставропольского края соответственно (рис. 8). В Ставропольском крае частота встречаемости *P. syringae* на 25 % выше, чем в Республике Крым, и на 57 % выше, чем в Москве. Указанная величина в Республике Крым на 34 % выше, чем в Москве, но ниже, чем в Ставропольском крае. В Москве отмечен самый низкий процент обнаружения среди трех регионов. Общий показатель частоты встречаемости *P. syringae* по трем регионам составил 41 %.

Идентификация бактериальных изолятов из образцов, собранных на территории Тимирязевской полевой опытной станции (Москва)

Всего идентифицировано 168 изолятов. Среди идентифицированных изолятов бактерий рода *Pseudomonas*, которые были представлены наиболее широко (частота встречаемости 70,9 %), идентифицированы такие виды, как *P. chlororaphis*, *P. graminis*, *P. poae*, *P. syringae*, *P. trivialis* и *P. viridiflava*.

Следующим по частоте встречаемости был представлен род *Frigoribacterium* (36,4 %). Бактерии рода *Frigoribacterium* являются распространенными представителями микробиоты растений, способствующими их росту и адаптации. Среди них идентифицировано 4 изолята *F. faeni*. Указанный вид относят к экстремофильным организмам, которые могут размножаться даже при низких температурах, таких как 2 °С, а также в умеренных температурах, таких как 20 °С.

Бактерии рода *Clavibacter*, занимающие третье место после *Pseudomonas* и *Frigoribacterium* (частота встречаемости составила 16,4%), характеризуется грамположительными анаэробными свойствами. Представители рода характеризуются фитопатогенными свойствами, вызывая на растениях симптомы в виде увядания и др. Всего выделено 12 штаммов бактерий рода *Clavibacter*. Среди них идентифицировано 10 штаммов *C. michiganensis*. Этот вид характеризуется как возбудитель бактериозов, который может привести к заметному снижению урожайности (до 50 %) вследствие бактериального ожога и увядания.

К прочим идентифицированным бактериям относятся представители родов *Agreia*, *Arthrobacter* (включая *A. chlorophenolicus*), *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Dyadobacter*,

Erwinia, *Frondehabitans*, *Kineococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Oerskovia*, *Pantoea* (включая *P. ananatis*), *Paucimonas* (включая *P. lemoignei*), *Phycococcus*, *Plantibacter*, *Pseudoclavibacter* (включая *P. helvolus*), *Rathayibacter* (включая *R. festucae*), *Rhodococcus* (включая *R. fascians*), *Salinibacterium*, *Sanguibacter*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* и *Streptomyces*.

Идентификация бактериальных изолятов из образцов, собранных в Республике Крым

Всего идентифицировано 86 изолятов. Среди них 27 изолятов (при частоте встречаемости на собранных образцах зерновых культур 41 %) принадлежали к роду *Pantoea*, включая виды *P. agglomerans*, *P. ananatis*, *P. vagans* и *P. pleuroti*. Бактерии рода *Pantoea* уникальны, поскольку представители рода обладают как хозяйственно-ценными, так и патогенными свойствами. *P. agglomerans* характеризуется как эндофит и эпифит. Некоторые патогенные штаммы *P. agglomerans* вызывают бактериальный ожог зерновых культур. Другие штаммы *P. agglomerans* характеризуются благотворным влиянием на ризосферу. *P. ananatis* вызывает на листьях пшеницы коричневатые поражения с четкими краями и желтыми ореолами. Переносчиком *P. ananatis* может являться злаковый листоед (*Oulema melanopus*). *P. vagans* используется для контроля *Erwinia amylovora*, которая вызывает бактериальный ожог косточковых культур. *P. pleuroti* известен тем, что вызывает бактериальный ожог.

Кроме бактерий рода *Pantoea*, в растительных образцах из Республики Крым идентифицированы представители родов *Ochrobactrum*, *Erwinia*, *Rathayibacter*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Frigoribacterium*, *Pseudomonas*, *Plantibacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Rosenbergiella*, *Exiguobacterium*, *Agrococcus*, *Microbacterium* и *Enterococcus*.

Идентификация бактериальных изолятов из образцов, собранных в Ставропольском крае

Всего идентифицировано 164 изолята. Наибольшая частота встречаемости наблюдалась у бактерий рода *Rhodococcus*: 48,5 %. Всего выделено 36 штаммов бактерий рода *Rhodococcus*, что составляет 19 % от всех выделенных штаммов. Среди них идентифицированы виды *R. cerastii*, *R. yunnanensis* и *R. fascians*. Кроме бактерий рода *Rhodococcus*, идентифицированы представители таких родов, как *Achromobacter*, *Agreia*, *Agrococcus* (включая виды *A. citreus* и *A. jenensis*), *Arthrobacter* (включая *A. aurescens*), *Bacillus* (включая *B. pumilus*), *Chryseobacterium*, *Clavibacter* (включая *C. michiganensis*), *Curtobacterium* (включая *C. flaccumfaciens*), *Exiguobacterium*, *Frigoribacterium*, *Glutamicibacter* (включая *G. bergerei*), *Knoellia* (вид *K. aerolata*), *Labedella*, *Luteimonas*, *Microbacterium* (включая вид *M. hydrocarbonoxydans*), *Mycobacterium* (вид *M. frederiksbergense*), *Okibacterium*, *Paenibacillus* (вид *P. lautus*), *Paeniglutamicibacter* (включая *P. sulfureus* и *P. terrestris*), *Pantoea*, *Pedobacter* (вид *P. petrophilus*), *Plantibacter*, *Pseudarthrobacter* (включая вид *P. equi*), *Pseudomonas* (включая виды *P. poae* и *P. syringae*), *Psychrobacillus* (вид *P. psychrodurans*), *Rahnella*, *Rathayibacter* (включая вид *R. festucae*), *Rhizobium*, *Sphingobacterium* (включая вид *S. faecium*), *Sphingomonas* и *Staphylococcus* (включая *S. equorum*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

➤ Проведен отбор образцов растений зерновых культур в трех регионах Российской Федерации: Москва (2020 г.), Республика Крым (2021 г.) и Ставропольский край (2022 г.). В этих трех регионах собран 181 образец растений пшеницы, ржи, ячменя, овса и тритикале.

➤ Найдены уникальные генетические мишени для возбудителя черного бактериоза злаковых культур *X. translucens*, и на их основе разработано 5 новых ПЦР-тестов для идентификации фитопатогена: 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 и 6F10/6R10. Новые ПЦР-тесты могут стать частью решения проблемы установления фитосанитарного состояния партий

российской зерновой продукции.

➤ Установлено, что оптимальной питательной средой для культивирования *R. tritici* является питательная среда YPGA.

➤ Оптимизирован метод подготовки проб зерна для последующей ПЦР-идентификации *R. tritici*, *X. translucens*, *P. fuscovaginae* и *P. syringae*, использование которого в совокупности с ПЦР-тестами позволит проводить идентификацию фитопатогенов в течение 6 часов.

• Впервые в Российской Федерации с использованием молекулярно-генетических методов диагностики проведено исследование образцов растений зерновых культур на содержание фитопатогенных бактерий. В результате тестирования образцов из фитоценозов на территории Москвы, Республики Крым и Ставропольского края, *R. tritici* и *P. fuscovaginae* не обнаружены, *X. translucens* обнаружен в одном образце пшеницы из Красногвардейского района Республики Крым, а *P. syringae* обнаружена во всех трех регионах, суммарная частота встречаемости составила 41 %.

➤ Впервые проведено масштабное исследование компонентов культивируемой бактериальной микробиоты зерновых культур с использованием ПЦР и секвенирования. Идентифицированные изоляты позволили сформировать коллекцию патогенных и непатогенных бактерий, выделенных из зерновых культур. Коллекция в дальнейшем может быть использована для научных разработок, производственной деятельности и в обучающем процессе.

Результаты исследований использованы при разработке методических рекомендаций ФГБУ «ВНИИКР» по выявлению и идентификации возбудителей бактериозов зерновых культур, которые в настоящее время введены в действие и рекомендованы к применению испытательными лабораториями на территории РФ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных Scopus и Web of Science:

1. Словарева, О.Ю. Идентификация возбудителей бактериозов и комплекса ассоциированных микроорганизмов в зерновых культурах, значимых для экспорта зерна (на примере Тимирязевской полевой опытной станции) / О.Ю. Словарева, М. Мувинги, А.Б. Яремко, В.Н. Игонин, В.С. Рубец // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т. 58. – № 1. – С. 188–199.
2. Kavhiza, N. J. Germination response of 12 onion varieties to inoculation with *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *Allii* / N. J. Kavhiza, M. Zargar, S. I. Prikhodko, E. N. Pakina, M. Muvingi // AIP Conference Proceedings. – 2023. – No 2777.

Публикации (без дублирования) в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

3. Мувинги, М. Идентификация *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* в зерне пшеницы методом ПЦР / М. Мувинги, О.Ю. Словарева, М. Заргар // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. – 2022. – Т. 17. – № 4. – С. 473–483.

Публикации в рецензируемых научных изданиях:

4. Словарева, О.Ю. Разработка новых ПЦР-тестов для диагностики возбудителя черного бактериоза зерновых культур *Xanthomonas translucens* / О.Ю. Словарева, Е.В. Старикова, М. Мувинги // Фитосанитария. Карантин растений. – 2021. – № 2(6). – С. 37-49.

Тезисы и материалы конференций:

5. **Muvingi, M.** Detection and identification of *Rathayibacter tritici* in Russian grain crop survey / **M. Muvingi**, O.Y. Slovarova, V.S. Ruberts, V.N. Igonin // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: Сборник тезисов докладов 20-й Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, Москва, 27–29 октября 2020 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 2020. – P. 158–159.
6. **Muvingi, M.** Determining the optimal nutrient medium for *Rathayibacter tritici* / **M. Muvingi**, O.Y. Slovarova, M. Zargar // Защита растений в условиях перехода к точному земледелию = Plant protection in the transition to precision farming: материалы Международной научной конференции (аг. Прилуки, 27–29 июля 2021г.) // Нац. акад. наук Беларуси, Науч.-практ. центр по земледелию, Ин-т защиты растений. – Минск : Колорград, 2021, – С. 111–114.
7. Slovarova, O.Y. Grain Bacterioses Phytosanitary Diagnostic as a Component of Food Security / O.Y. Slovarova, **M. Muvingi** // onference Proceedings: Global Food Forum 2021. EurAsian Scientific Editions SA, Geneva, Switzerland / EurAsian Scientific Editions Ltd, Hong Kong / EurAsian Scientific Editions OÜ, Tallinn, Estonia. – 2022. – P. 76–83.
8. Словарева, О.Ю. Применение биоинформатических методов в разработке тестов для ПЦР-идентификации возбудителя черного бактериоза зерновых культур *Xanthomonas translucens* О.Ю. Словарева, Е.В. Старикова, **М. Мувинги** // Защита растений в условиях перехода к точному земледелию = Plant protection in the transition to precision farming: материалы Международной научной конференции (аг. Прилуки, 27–29 июля 2021г.) // Нац. акад. наук Беларуси, Науч.-практ. центр по земледелию, Ин-т защиты растений. – Минск : Колорград, 2021, – С. 97–100.
9. **Мувинги, М.** Состав бактериальной микробиоты пшеницы и ячменя, выращенных в системе севооборота после подсолнечника и черного пара в условиях центральной степной зоны Республики Крым / **М. Мувинги**, О.Ю. Словарева, А.Б. Яремко, Т.Л. Ганоцкая, М. Заргар // Биологические основы защиты растений : сборник научных трудов по материалам Жученковских чтений VII, Краснодар, 15 сентября 2022 года / Федеральный научный центр биологической защиты растений. – Краснодар: Издательство "ЭДВИ", 2022. – С. 149-156.

АННОТАЦИЯ

Одним из факторов, способных ограничивать экспорт зерна из Российской Федерации, являются бактериальные фитопатогены, регулируемые фитосанитарными требованиями стран-импортеров. Наиболее значимыми среди регулируемых видов являются *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fuscovaginae* и *Xanthomonas translucens*, поскольку запрет на их наличие в зерновой продукции введен такими крупными импортерами, как Египет и Турция. Один из видов фитопатогенных бактерий, *Rathayibacter tritici*, является карантинным объектом для стран Евразийского экономического союза и подлежит выявлению в продукции пшеницы. На момент начала работы отсутствовали надежные и быстрые методы идентификации указанных фитопатогенов. Объектами исследования являлись *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Xanthomonas translucens* и *Rathayibacter tritici*, в связи с актуальностью разработки методов их выявления и идентификации при экспорте и импорте зерна Российской Федерацией.

На основании уникальных данных разработаны новые ПЦР-тесты – 1F8/1R8, 1F10/1R10,

4F1/4R1, 5F6/5R6 и 6F10/6R10 для достоверной видовой идентификации *X. translucens*. Установлено, что оптимальной питательной средой для культивирования *R. tritici* является YPGA. Проведен сбор 181 образца растений зерновых культур в трех регионах РФ, в Москве (селекционная опытная станция РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева), Республике Крым и Ставропольском крае. Образцы протестированы методом ПЦР на наличие ДНК исследуемых бактерий, в результате ДНК *P. fuscovaginae* и *R. tritici* не обнаружена, ДНК *X. translucens* обнаружена в одном образце из Республики Крым, а ДНК *P. syringae* обнаружена в 42 % образцов. Из растительных образцов выделены 434 бактериальных изолята, среди которых путем секвенирования и сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями в NCBI идентифицировано 87 вида бактерий, принадлежащих 49 родам. Идентифицированы такие виды, как *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Pseudomonas chromraphis*, *Microbacterium foliorum* и другие. Оптимизирован метод подготовки проб зерна для последующего ПЦР-тестирования при проведении лабораторного анализа на наличие *P. syringae*, *P. fuscovaginae*, *X. translucens* и *R. tritici*. Использование оптимизированного метода в сочетании с ПЦР-тестами позволяет провести лабораторный анализ в течение одного дня.

Разработаны и оптимизированы методы выявления и идентификации возбудителей бактериальных болезней зерновых культур, значимых для импорта и экспорта зернопродукции Российской Федерацией.