

Изоляция возбудителя бурой бактериальной гнили влагалища листа злаковых культур *Pseudomonas fuscovaginae* из семян

* ДЕСЯТЕРИК А.А.¹, СЛОВАРЕВА О.Ю.², КОНОНОВА Е.П.³

^{1,2,3} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150

¹ Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия, 127434

¹ e-mail: anastasiya.10.00@mail.ru

² e-mail: slovareva.olga@gmail.com

³ e-mail: catamont@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Бурая бактериальная гниль влагалища листа злаковых культур – бактериальное заболевание, которому подвержены посевы пшеницы, риса, кукурузы и сорго практически во всех регионах, где их выращивают. Возбудителем является бактерия вида *Pseudomonas fuscovaginae* (ex Tanii, Miyajima and Akita, 1976) Miyajima, Tanii and Akita (1983), имеющая карантинный статус для ряда стран, которые импортируют пшеницу из России. Для того чтобы улучшить процесс диагностики бактерии *Pseudomonas fuscovaginae* в фитосанитарных лабораториях, требуется разработка метода изоляции культуры из семян пшеницы. В исследовании растительные экстракты пшеницы, полученные в результате пробоподготовки, инокулировали суспензиями *P. fuscovaginae* в различных концентрациях и высевали на питательную среду R2A. Колонии *P. fuscovaginae*, выросшие на чашках со средой R2A, тестировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), чтобы установить зависимость порогового цикла от концентрации бактерии в пробе. Установлено, что изоляция *P. fuscovaginae* возможна в случае содержания в пробе бактерии в концентрации $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл и выше, что соответствует пороговому циклу флуоресценции (Ct) 32,0 на амплификаторе «ДТпрайм 5М6» (ООО «ДНК-Технология», Россия) и (Ct) 31,5 на амплификаторе CFX (Bio-Rad, США) при использовании набора «*Pseudomonas fuscovaginae*-РВ» (ООО «Синтол», Россия). Посев следует выполнять истощающим способом на среду R2A, используя 20 мкл концентрированной вытяжки семян, и осуществлять поиск колоний *P. fuscovaginae* спустя 3–7 суток после посева. Эта методика рекомендована для проведения исследований в лабораториях в области фитосанитарии и карантина растений.

Isolation of sheath brown rot pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* from seeds

* ANASTASIA A. DESYATERIK¹, OLGA YU. SLOVAREVA², ELENA P. KONONOVA³

^{1,2,3} FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIICR”), Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia, 140150

¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia, 127434

¹ e-mail: anastasiya.10.00@mail.ru

² e-mail: slovareva.olga@gmail.com

³ e-mail: catamont@yandex.ru

ABSTRACT

Sheath brown rot is a bacterial disease affecting wheat, rice, corn and sorghum in almost all regions where they are grown. The causative agent is a bacterium of the species *Pseudomonas fuscovaginae* (ex Tanii, Miyajima and Akita, 1976) Miyajima, Tanii and Akita (1983), of quarantine status for some countries importing Russian wheat. To enhance the diagnosis of the bacterium *Pseudomonas fuscovaginae* in phytosanitary laboratories, the development of a method for isolating a culture from wheat seeds is required. In the study, wheat plant extracts obtained as a result of sample preparation were inoculated with *P. fuscovaginae* suspensions in various concentrations and sown on R2A nutrient medium. *P. fuscovaginae* colonies grown on plates with R2A medium were tested by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) to determine the dependence of the threshold cycle on the bacteria concentration in the sample. It was determined that *P. fuscovaginae* isolation is possible if the sample contains bacteria in concentration $1 \cdot 10^4$ CFU/ml and higher, which corresponds to a threshold fluorescence cycle (Ct) of 32.0 on the DTPRIME 5M6 cycler (DNA-Technology, Russia) and (Ct) 31.5 on the CFX cycler (Bio-Rad, USA) when using the “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” kit (Syntol, Russia). Sowing should be done in a depleting manner on R2A medium using 20 µl of concentrated seed extract and searching for colonies *P. fuscovaginae* 3–7 days after sowing. This technique is recommended for conducting research in laboratories in the field of phytosanitary and plant protection.

Ключевые слова. Фитосанитария, молекулярно-генетические методы, диагностика, ПЦР, культурально-морфологические методы, морфология бактериальных колоний, пшеница, потенциальный ущерб сельскохозяйственной продукции.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель бурой бактериальной гнили влагалища листа злаковых культур *Pseudomonas fuscovaginae* (ex Tanii, Miyajima and Akita, 1976) Miyajima, Tanii and Akita (1983) регулируется фитосанитарными требованиями стран – импортеров пшеницы. Египет и Пакистан импортируют зерно и предъявляют требования к состоянию ввозимой продукции. Одним из важных требований является отсутствие в партиях зерна возбудителя бурой бактериальной гнили влагалища листа злаковых культур *Pseudomonas fuscovaginae*. В эти страны, по данным Федеральной государственной информационной службы (ФГИС) «Аргус-Фито», в 2022 г. Россия экспортировала 6,6 млн тонн пшеницы (ФГИС, 2023).

О *Pseudomonas fuscovaginae* впервые сообщили как о возбудителе бурой бактериальной гнили влагалища листа риса в 1976 г. на севере Японии. В дальнейшем бактерию выделяли из растений кукурузы (*Zea mays*), сорго (*Sorghum bicolor*) и пшеницы (*Triticum aestivum*) с типичными симптомами бурой гнили влагалища листа. Бактерия классифицируется в пределах царства бактерий, типа Proteobacteria, класса Gammaproteobacteria, отряда Pseudomonadales, семейства Pseudomonadaceae, рода *Pseudomonas*, вида *Pseudomonas fuscovaginae*. Бактерия является грамотрицательной, не образует споры, клетки имеют форму палочек с закругленными концами, размером 0,5–0,8 x 2,0–3,5 мкм. Клетки располагаются поодиночке или парами, подвижны, двигательная способность обусловливается наличием от одного до четырех полярных жгутиков. Образует на питательном агаре белые или светло-коричневые полупрозрачные гладкие блестящие приподнятые колонии с ровным краем, диаметр которых на 4–5-е сутки культивирования составляет 3–5 мм (González et al., 2017).

Основным способом распространения *P. fuscovaginae* являются инфицированные семена (Tambong, 2022). Чаще всего проростки из таких семян погибают. *P. fuscovaginae* способна колонизировать все растение как эндофит. Если проросток выживает, *P. fuscovaginae* находится в эпифитном состоянии до стадии выхода в трубку. На этой стадии происходит заражение колоса, что впоследствии приводит к образованию зараженных семян или стерильных колосков. Распространение *P. fuscovaginae* может вызывать серьезные экономические потери в растениеводстве из-за ухудшения качества продукции и снижения урожайности пшеницы. Воздействие *P. fuscovaginae* на урожайность сельскохозяйственных культур связано с тем, что вызывает стерильность зерна и влияет на его качество. Это

Key words. Phytosanitary, molecular genetic methods, diagnosis, PCR, cultural and morphological methods, morphology of bacterial colonies, wheat, potential damage to agricultural products.

INTRODUCTION

Sheath brown rot pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* (ex Tanii, Miyajima and Akita, 1976) Miyajima, Tanii and Akita (1983) is regulated by the phytosanitary requirements of wheat importing countries. Egypt and Pakistan import grain and have requirements for the condition of imported products. One of the important requirements is the absence of *Pseudomonas fuscovaginae* in grain batches. According to the Federal State Information Service (FSIS) Argus-Fito, Russia exported 6.6 million tons of wheat in 2022 to these countries (FSIS, 2023).

Pseudomonas fuscovaginae was first reported as the pathogen of rice sheath brown rot in 1976 in the north of Japan. Later, the bacterium was isolated from maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*) with typical symptoms of sheath brown rot. The bacterium is classified within the kingdom Bacteria, phylum Proteobacteria, class Gammaproteobacteria, order Pseudomonadales, family Pseudomonadaceae, genus *Pseudomonas*, species *Pseudomonas fuscovaginae*. The bacterium is gram-negative, does not form spores, the cells have the shape of rods with rounded ends, measuring 0.5–0.8 x 2.0–3.5 µm. The cells are located singly or in pairs, are mobile, and their motor ability is determined by the presence of one to four polar flagella. Forms on nutrient agar white or light brown translucent smooth shiny raised colonies with a smooth edge, the diameter of which on the 4th–5th day of cultivation is 3–5 mm (González et al., 2017).

One of the main pathways for *P. fuscovaginae* are infected seeds (Tambong, 2022). Most often, seedlings from such seeds die. *P. fuscovaginae* is capable of colonizing the entire plant as an endophyte. If the seedling survives, *P. fuscovaginae* is in an epiphytic state until the stage of eruption into a tube. At this stage, infection of the ear occurs, which subsequently leads to the formation of infected seeds or sterile spikelets. The spreading of *P. fuscovaginae* can cause serious economic losses in crop production due to deterioration in product quality and reduced wheat yields. The influence of *P. fuscovaginae* on crop yields is due to the fact that it causes grain sterility and affects its quality. This is expressed in unfilled grain and spotting. All of the above has a negative impact on the subsequent use of grain as seed material (Cottyn, 2003). Due to the high prevalence of the bacterium, rice yield losses were up to 58% in Japan (Jaunet et al., 1996), 72.2% in Indonesia and 100% in Madagascar (Razak et al., 2009). *P. fuscovaginae* is capable of causing sheath brown rot on wheat,

выражено в незаполненности зерна и пятнистости. Все вышеперечисленное оказывает негативное влияние на последующее использование зерна в качестве семенного материала (Cottyn, 2003). Из-за высокой распространенности бактерии потери урожая риса составили до 58% в Японии (Jaunet et al., 1996), 72,2% в Индонезии и 100% на Мадагаскаре (Razak et al., 2009). *P. fuscovaginae* способна вызывать бурую бактериальную гниль влагалища листа на растениях пшеницы, кукурузы, сорго и риса (Patel et al., 2012). Она распространилась практически во всех регионах, где выращивают рис, а также зарегистрирована на Филиппинах, в Индонезии, Непале, Китае и Иране. С целью контроля за фитосанитарным состоянием зерна необходимо проводить лабораторную диагностику проб каждой партии. Это позволяет выявить наличие бурой бактериальной гнили влагалища листа злаковых культур. Выявление и идентификация возбудителей бактериозов требуют применения специальных нормативных документов, регламентирующих процесс лабораторного исследования. Нормативные документы по выявлению и идентификации *P. fuscovaginae* из зерна пшеницы не разработаны.

В научных публикациях описаны случаи выявления *P. fuscovaginae* в больных растениях риса. Путем смывов с зараженных растений и культивирования на полуселективной среде (KBS), основанной на модификации среды King B с добавлением казаминовых кислот и пяти антибиотиков (Rott et al., 1989), ученым удалось выделить чистую культуру возбудителя бурой бактериальной гнили влагалища листа пшеницы. Бактерия была идентифицирована с помощью полифазного подхода, сочетающего биохимические, физиологические и фенотипические тесты, анализ патогенности, иммунодиагностику и молекулярную диагностику с использованием специфических праймеров (González et al., 2017).

Для того чтобы эффективно применять метод изоляции культуры, необходимо установить критерий его применимости. Он основывается на тестировании образцов ДНК методом ПЦР-РВ с последующим установлением зависимости порогового цикла от концентрации бактерии в пробе.

Целью настоящей работы являлась разработка метода изоляции культуры *Pseudomonas fuscovaginae* из семян пшеницы и установление критерия его применимости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования было зерно пшеницы, свободное от *P. fuscovaginae*, и штамм 0335 *P. fuscovaginae* из коллекции ФГБУ «ВНИИКР». Исследование проводили в июне 2023 г.

Пробоподготовку выполняли по уже оптимизированной методике, которая заключалась в замачивании лабораторной пробы пшеницы в фосфатно-солевом буфере, обработке на лопаточном гомогенизаторе и 2-этапном центрифугировании полученной пробы (Мувинги и др., 2022). Растительные экстракты инокулировали суспензиями *P. fuscovaginae*.

Для приготовления суспензий использовали 2-суточную культуру *P. fuscovaginae*. Для посева

corn, sorghum and rice plants (Patel et al., 2012). It has spread to almost all rice-growing regions and has also been reported in the Philippines, Indonesia, Nepal, China and Iran. In order to control the phytosanitary condition of grain, it is necessary to carry out laboratory diagnosis of samples of each batch. This makes it possible to detect the presence of sheath brown rot of cereal crops. Detection and identification of pathogens of bacteriosis require the use of special regulatory documents for the process of laboratory research. Regulatory documents on detection and identification of *P. fuscovaginae* from wheat grain are not developed.

Scientific publications describe cases of *P. fuscovaginae* detection in diseased rice plants. By means of washings from infected plants and cultivation on a semi-selective medium (KBS), based on a modification of King B medium with the addition of casamino acids and five antibiotics (Rott et al., 1989), scientists were able to isolate a pure culture of the causative agent of wheat leaf sheath brown rot. The bacterium was identified using a polyphasic approach combining biochemical, physiological and phenotypic tests, pathogenicity assays, immunodiagnostics and molecular diagnostics using specific primers (González et al., 2017).

In order to effectively apply the culture isolation method, it is necessary to establish a criterion for its applicability. It is based on testing DNA images using RT-PCR followed by establishing the dependence of the threshold cycle on the concentration of bacteria in the sample.

The purpose of this work was to develop a method for isolating the *Pseudomonas fuscovaginae* culture from wheat seeds and establishing a criterion for its applicability.

MATERIALS AND METHODS

The research material was wheat grain free from *P. fuscovaginae*, and strain 0335 *P. fuscovaginae* from the collection of FGBU "VNIICR". The study was conducted in June 2023.

Sample preparation was carried out according to an already optimized method, which consisted of soaking a laboratory wheat sample in phosphate-buffered saline, processing on a paddle homogenizer and 2-stage centrifugation of the resulting sample (Muvingi et al., 2022). Plant extracts were inoculated with *P. fuscovaginae* suspensions.

A 2-day culture was used to prepare *P. fuscovaginae* suspensions. For inoculation, we used ready-made R2A medium (HiMedia, India) with the addition of 5 g of agar per 1 liter of medium. Bacterial suspensions were prepared in 1.5 ml microtubes using sterile distilled water. The prepared bacterial suspensions were immediately used to infect laboratory samples of wheat seeds.

The concentration of bacteria in the prepared suspensions was determined by the Koch method (Fedorenko, Zemlyanskaya, 2015), by sowing 50 µl by stretching onto 4 Petri dishes using a Drigalsky spatula. We used 3, 4, 5 and 6 dilutions of *P. fuscovaginae* pure culture in sterile distilled water. Colonies were counted after 7 days of incubation of the plates at 25 °C in an incubator.

применяли готовую среду R2A (HiMedia, Индия) с добавлением 5 г агара на 1 л среды. Суспензии бактерии готовили в микропробирках объемом 1,5 мл, используя стерильную дистиллированную воду. Приготовленные бактериальные суспензии сразу применяли для заражения лабораторных проб семян пшеницы.

Концентрацию бактерий в приготовленных суспензиях определяли методом Коха (Федоренко, Землянская, 2015), высевая с помощью шпателя Дригальского по 50 мкл растяжением на 4 чашки Петри. Использовали 3, 4, 5 и 6-е разведения чистой культуры *P. fuscovaginae* в стерильной дистиллированной воде. Колонии подсчитывали спустя 7 суток инкубирования чашек при 25 °C в инкубаторе.

В пробирки с экстрактом семян пшеницы добавляли бактериальную суспензию 10-кратных разведений. В качестве отрицательного контроля использовали незараженную аналитическую пробу семян. Посев проводили с помощью шпателя Дригальского на чашки Петри со средой R2A по 20 мкл экстракта с растяжением на 4 чашки.

На 10-й день после посева проводили скрининг аналитических проб и колоний методом ПЦР. Для этого выделяли ДНК сорбционным методом с помощью набора «ФитоСорб» («Синтол», Россия), используя 200 мкл каждой аналитической пробы в 3-кратной повторности, а также 200 мкл 3, 4 и 5-го разведений бактериальных суспензий в дистиллированной воде. Диагностику полученной ДНК на наличие целевой бактерии проводили с использованием коммерческого набора «*Pseudomonas fuscovaginae*-PB» («Синтол», Россия). В работе

Табл. 1. Параметры амплификации для ПЦР-РВ набором «*Pseudomonas fuscovaginae*-PB»

Table 1. Amplification parameters for RT-PCR kit “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT”

Цикл Cycle	Повторы Replicates	Время Time	Температура, °C Temperature, °C
1	1	05:00	95
2	45	00:15	95
		00:40	60

A bacterial suspension of 10-fold dilutions was added to test tubes with wheat seed extract. An uncontaminated analytical seed sample was used as a negative control. Sowing was carried out using a Drigalski spatula on Petri dishes with R2A medium, 20 µl of extract, stretched into 4 dishes.

On the 10th day after sowing, analytical samples and colonies were screened using PCR. To do this, DNA was isolated by the sorption method using the “FitoSorb” kit (Synthol, Russia), using 200 µl of each analytical sample in 3 replicates, as well as 200 µl of 3, 4 and 5 dilutions of bacterial suspensions in distilled water. Diagnosis of the obtained DNA for the presence of the target bacterium was carried out using the “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” commercial kit (Synthol, Russia). The detection amplifier “DTprime 5M6” (DNA-Technology, Russia) was used in the work. The total volume of the working mixture in the test tube is 25 µl. The amplification program is presented in Table 1.

Табл. 2. Результат тестирования образцов ДНК, выделенной из зараженных аналитических проб и бактериальных суспензий

Table 2. The result of testing DNA samples isolated from contaminated analytical samples and bacterial suspensions

Образец Sample					Концентрация, КОЕ/мл Concentration, CFU/ml	Среднее значение Ct по каналу FAM Average Ct value over FAM channel
Разведение Dilution	Повторность Replicate	Ct, FAM	Ct, HEX	Результат Result		
6'	1	38,6	33,1	+	1 * 10 ¹	39,6 ± 0,95
	2	—	33,1	—	1 * 10 ¹	
	3	40,5	32,9	+	1 * 10 ¹	
5'	1	37,0	32,5	+	1,8 * 10 ²	37,2 ± 0,44
	2	38,0	33,1	+	1,8 * 10 ²	
	3	36,5	32,8	+	1,8 * 10 ²	
4'	1	34,2	32,7	+	2,3 * 10 ³	34,3 ± 0,07
	2	34,4	32,8	+	2,3 * 10 ³	
	3	34,4	32,7	+	2,3 * 10 ³	
3'	1	32,9	32,5	+	1 * 10 ⁴	33 ± 0,23
	2	33,2	32,6	+	1 * 10 ⁴	
	3	32,9	32,6	+	1 * 10 ⁴	
ПКО PCS		22,4	30,1	+	10 ⁹	22,4

Примечание: Ct – пороговый цикл ПЦР; FAM – канал детекции спецификации ПЦР; HEX – канал детекции внутреннего положительного контроля ПЦР; «+» – положительный образец; «—» – отрицательный образец; ПКО – положительный контрольный образец.

Note: Ct – PCR threshold cycle; FAM – PCR specific detection channel; HEX – PCR internal positive control detection channel; “+” – positive sample; “—” – negative sample; PCS – positive control sample.

использовали детектирующий амплификатор «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия). Общий объем рабочей смеси в пробирке равен 25 мкл. Программа амплификации представлена в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подсчет колоний высеванной бактериальной суспензии объемом 50 мкл показал, что 3-му разведению соответствует $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, 4-му разведению – $2,3 \cdot 10^3$ КОЕ/мл, а 5-му – $1,8 \cdot 10^2$ КОЕ/мл. Тестирование образцов ДНК, выделенной из бактериальных суспензий, позволило обнаружить ДНК *P. fuscovaginatae* в образцах ДНК с концентрацией целевой бактерии 10^2 КОЕ/мл в трех тестах из трех, а с концентрацией 10^1 КОЕ/мл – в двух тестах из трех (см. табл. 2).

Экспоненциальные кривые накопления флуоресценции были специфичными, флуоресценцию отмечали на уровне 1150 RFU (см. рис. 1).

Таким образом, критерий применимости метода изоляции при тестировании набором «*Pseudomonas fuscovaginatae*-PB» («Синтол», Россия) при использовании амплификатора «ДТпрайм» составил 10^2 КОЕ/мл.

Колонии на чашках Петри со средой R2A, спустя 7 суток инкубирования при 25 °C посева зараженной аналитической пробы, по форме круглые, неправильной формы, пуповидного профиля, с волнистым краем. Диаметр колоний – от 3–5 мм до 1 см. В начале роста они выглядели беловатыми, по мере роста становились более прозрачными, гладкими и глянцевыми (см. рис. 2).



Рис. 2. Колонии *Pseudomonas fuscovaginatae* (3-е разведение, 3-я чашка). Истощающий посев на среде R2A после 7 суток инкубирования при 25 °C (фото Е.П. Кононовой)

Fig. 2. *Pseudomonas fuscovaginatae* colonies (3rd dilution, 3rd cup). Exhaustive inoculation on R2A medium after 7 days of incubation at 25 °C (photo by E.P. Kononova)

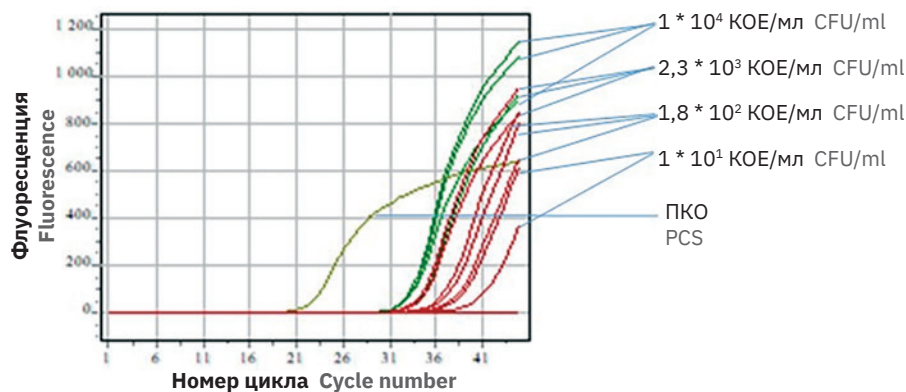


Рис. 1. Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла при использовании набора «*Pseudomonas fuscovaginatae*-PB» («Синтол», Россия) (фото А.А. Десятерик)

Fig. 1. Dependence of FAM channel fluorescence on cycle number when using the kit «*Pseudomonas fuscovaginatae*-RT» (Syntol, Russia) (photo by A.A. Desyaterik)

RESULTS AND DISCUSSION

Counting the colonies of a sown bacterial suspension with a volume of 50 µl showed that the 3rd dilution corresponds to $1 \cdot 10^4$ CFU/ml, 4th dilution – $2,3 \cdot 10^3$ CFU/ml, and the 5th one – $1,8 \cdot 10^2$ CFU/ml. Testing DNA samples isolated from bacterial suspensions revealed *P. fuscovaginatae* DNA in DNA samples with the target bacterium concentration of 10^2 CFU/ml in three tests out of three, and with concentration of 10^1 CFU/ml – in two out of three tests (see Table 2).

The exponential fluorescence accumulation curves were specific, with fluorescence observed at 1150 RFU (see Fig. 1).

Thus, the criterion for the applicability of the isolation method when testing with a kit «*Pseudomonas fuscovaginatae*-RT» (Syntol, Russia) when using the DTprime amplifier was 10^2 CFU/ml.

Colonies on Petri dishes with R2A medium, after 7 days of incubation at 25 °C inoculating an infected analytical sample, are round, irregular in shape, umbilical in profile, with a wavy edge. The diameter of the colonies is from 3–5 mm to 1 cm. At the beginning of growth, they looked whitish, as they grew, they became more transparent, smooth and glossy (see Fig. 2).

On Petri dishes incubated under similar conditions with colonies of the target bacterium *P. fuscovaginatae* (K+), the concentration of which was $1 \cdot 10^4$ CFU/ml, colonies similar in morphology were noted (see Fig. 3).

When sowing using the Drigalsky method (Lavrenchuk, Ermoshin, 2019) *P. fuscovaginatae* colonies were detected on the 1st and 2nd Petri dishes. On the remaining plates, these colonies were absent due to the very low concentration (see Fig. 3). Photos of the *P. fuscovaginatae* colonies, taken at high magnification using an Olympus MVX10 macroscope are shown in Fig. 4.

Throughout the entire experiment, colony growth was monitored, and on the 10th day, photography, selection of colonies similar to the target bacterium in morphology, DNA extraction from these colonies, and PCR testing were performed. Colonies similar in morphology to the target bacterium were noted on the 3rd day of sowing (see Table 3).

На инкубированных в аналогичных условиях чашках Петри с колониями целевой бактерии *P. fuscovaginae* (K+), концентрация которой составила $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, отмечали схожие по морфологии колонии (см. рис. 3).

При проведении посева методом Дригальского (Лавренчук, Ермошин, 2019) колонии *P. fuscovaginae* были обнаружены на 1-й и 2-й чашках Петри. На остальных чашках эти колонии отсутствовали из-за очень низкой концентрации (см. рис. 3). Фотографии колоний *P. fuscovaginae*, сделанные при высоком увеличении с использованием микроскопа Olympus MVX10, представлены на рис. 4.

В течение всего опыта проводили мониторинг роста колоний, а на 10-е сутки – фотографирование,

Табл. 3. Изоляция культуры *P. fuscovaginae* из зараженных аналитических проб на среде R2A

Table 3. *P. fuscovaginae* culture isolation from contaminated analytical samples on R2A medium

Концентрация бактерии, КОЕ/мл Bacterium concentration, CFU/ml	№ чашки № cup	1	2	3	4	7	10
$1 \cdot 10^4$ – I	1	–	–	–	–	–	–
$1 \cdot 10^4$ – I	2	–	–	+	+	+	+
$1 \cdot 10^4$ – I	3	–	–	–	–	–	–
$1 \cdot 10^4$ – I	4	–	–	–	–	–	–
$1 \cdot 10^4$ – II	1	–	–	–	–	–	–
$1 \cdot 10^4$ – II	2	–	–	+	+	+	+
$1 \cdot 10^4$ – II	3	–	–	+	+	+	+
$1 \cdot 10^4$ – II	4	–	–	–	–	–	–
$2,3 \cdot 10^3$ – I	1	–	–	–	–	–	–
$2,3 \cdot 10^3$ – I	2	–	–	–	–	–	–
$2,3 \cdot 10^3$ – I	3	–	–	–	–	–	–
$2,3 \cdot 10^3$ – I	4	–	–	–	–	–	–
$2,3 \cdot 10^3$ – II	1	–	–	–	–	–	–
$2,3 \cdot 10^3$ – II	2	–	–	–	–	–	–
$2,3 \cdot 10^3$ – II	3	–	–	–	–	–	–
$2,3 \cdot 10^3$ – II	4	–	–	–	–	–	–
$1,8 \cdot 10^2$ – I	1	–	–	–	–	–	–
$1,8 \cdot 10^2$ – I	2	–	–	–	–	–	–
$1,8 \cdot 10^2$ – I	3	–	–	–	–	–	–
$1,8 \cdot 10^2$ – I	4	–	–	–	–	–	–
$1,8 \cdot 10^2$ – II	1	–	–	–	–	–	–
$1,8 \cdot 10^2$ – II	2	–	–	–	–	–	–
$1,8 \cdot 10^2$ – II	3	–	–	–	–	–	–
$1,8 \cdot 10^2$ – II	4	–	–	–	–	–	–

Примечание: I – 1-я повторность; II – 2-я повторность; «–» – отсутствие или невозможность идентификации колоний; «+» – похожие по морфологии колонии просматриваются; «++» – соответствие колоний *P. fuscovaginae* подтверждено ПЦР-тестом.

Note: I – first replicate; II – second replicate; “–” – absence or impossibility of identifying colonies; “+” – colonies similar in morphology are visible; “++” – correspondence of colonies *P. fuscovaginae* confirmed by PCR test.

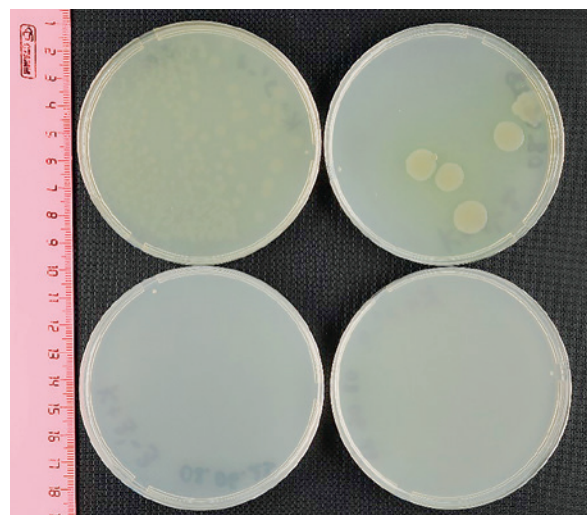


Рис. 3. Колонии штамма 0335 *P. fuscovaginae* коллекции ФГБУ «ВНИИКР» в истощающем посеве на среде R2A после 7 суток инкубирования при 25 °C (фото Е.П. Кононовой)

Fig. 3. Colonies of the strain 0335 *P. fuscovaginae* of FGBU “VNIICR” collections in exhaustive inoculation on R2A medium after 7 days of incubation at 25 °C (photo by E.P. Kononova)



Рис. 4. Колонии *P. fuscovaginae* на среде R2A (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 4. *P. fuscovaginae* colonies on R2A medium (photo by O.Yu. Slovarova)

Individual colonies of the target bacterium are clearly visible when inoculating a contaminated analytical sample at a concentration of $1 \cdot 10^4$ CFU/ml on the first and second replicates (see Fig. 5).

RT-PCR testing with the “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” kit made it possible to confirm the identity of colonies that were morphologically similar to *P. fuscovaginae* (see Table 4).

On Petri dishes with a lower degree of contamination with the target bacterium, *P. fuscovaginae* colonies were not detected.

There were no morphologically similar colonies on Petri dishes inoculated with seed extract without infection.

Testing with the “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” kit (Synthol, Russia) made it possible to detect *P. fuscovaginae* DNA in samples of total DNA isolated from infected analytical samples (see Table 5).

Since there are several dozen testing laboratories in the Russian Federation and they are all equipped with different equipment, we tested two types of cyclers most often used for diagnostics – DTprime 5M6

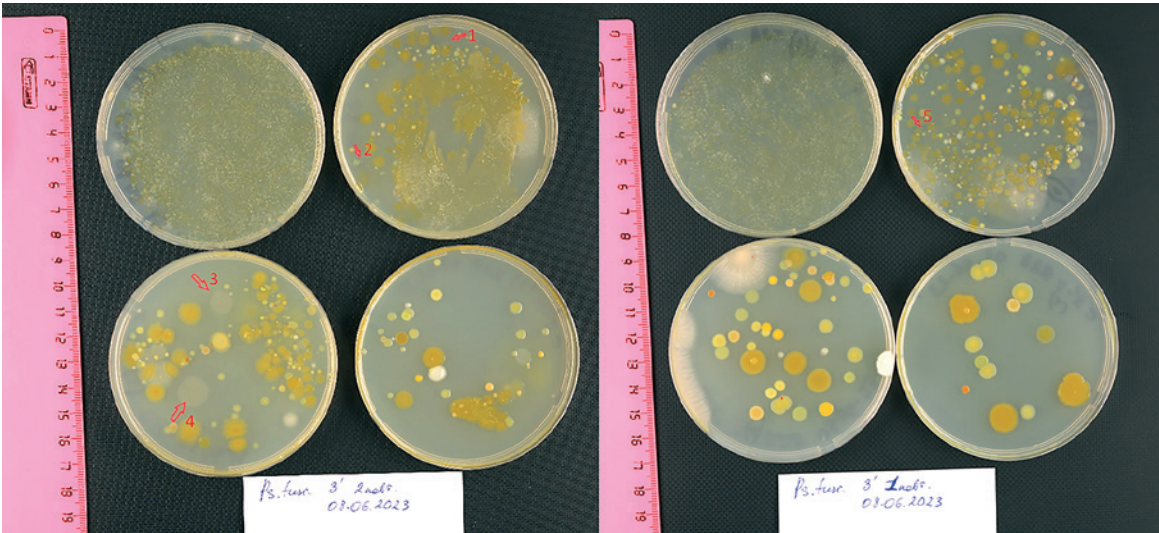


Рис. 5. Колонии бактерий на среде R2A после 7 суток инкубирования при 25 °С (колонии *P. fuscovaginae* отмечены красными стрелками и обозначены цифрами) (фото Е.П. Кононовой)

Fig. 5. Bacterial colonies on R2A medium after 7 days of incubation at 25 °C (*P. fuscovaginae* colonies marked with red arrows and indicated by numbers) (photo by E.P. Kononova)

отбор колоний, схожих с целевой бактерией по морфологии, выделение ДНК из этих колоний и ПЦР-тестирование. Похожие по морфологии на целевую бактерию колонии отмечали на 3-и сутки посева (см. табл. 3).

Отдельные колонии целевой бактерии отчетливо различимы при посеве зараженной аналитической пробы в концентрации $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл на 1-й и 2-й повторностях (см. рис. 5).

Тестирование методом ПЦР-РВ набором «*Pseudomonas fuscovaginae*-РВ» позволило подтвердить принадлежность колоний, морфологически схожих с *P. fuscovaginae* (см. табл. 4).

На чашках Петри с меньшей степенью зараженности целевой бактерией колонии *P. fuscovaginae* не отмечены.

На чашках Петри с посевом семенного экстракта без заражения морфологически схожие колонии отсутствовали.

Тестирование набором «*Pseudomonas fuscovaginae*-РВ» («Синтол», Россия) позволило обнаружить ДНК *P. fuscovaginae* в образцах тотальной ДНК, выделенной из зараженных аналитических проб (см. табл. 5).

Так как в Российской Федерации существует несколько десятков испытательных лабораторий и все они оснащены различным оборудованием, мы испытали два типа амплификатора, наиболее часто используемые для диагностики, – «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия) и CFX96 (Bio-Rad, США). Тестирование ДНК, выделенных из зараженных аналитических проб, при использовании двух разных амплификаторов помогло установить схожую зависимость между концентрацией бактерии и пороговым циклом. Результаты представлены в табл. 5.

(DNA-Technology, Russia) and CFX96 (Bio-Rad, USA). Testing DNA isolated from contaminated assay samples using two different cyclers helped establish a similar relationship between bacterial concentration and threshold cycle. The results are presented in table. 5.

The exponential fluorescence accumulation curves were specific, fluorescence was observed at a level of 1000 RFU (see Fig. 6).

The exponential fluorescence accumulation curves were specific; fluorescence was observed at a level of 1500 RFU (see Fig. 7).

Табл. 4. Результат тестирования ДНК колоний, морфологически схожих с *P. fuscovaginae*, набором «*Pseudomonas fuscovaginae*-РВ» («Синтол», Россия)

Table. 4. Result of DNA testing of colonies morphologically similar to *P. fuscovaginae* using the “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” kit (Synthol, Russia)

Образец Sample	Ct, FAM	Ct, HEX	Результат Result
1	17,8	–	+
2	28,0	30,0	+
3	16,4	–	+
4	15,1	–	+
5	19,9	–	+
ПКО PCS	31,1	32,2	+
ОКО NCS	–	31,9	–
ОКО NCS	–	32,0	–

Примечание: Ct – пороговый цикл ПЦР; FAM – канал детекции специфики ПЦР; HEX – канал детекции внутреннего положительного контроля ПЦР; «+» – положительный образец; «–» – отрицательный образец; ПКО – положительный контрольный образец; ОКО – отрицательный контрольный образец.

Note: Ct – PCR threshold cycle; FAM – PCR specificity detection channel; HEX – PCR internal positive control detection channel; “+” – positive sample; “–” – negative sample; PCS – positive control sample; NCS – negative control sample.

Табл. 5. Результат тестирования на амплификаторах «ДТпрайм 5М6» и CFX96 образцов ДНК, выделенных из зараженных аналитических проб и бактериальных суспензий *P. fuscovaginae*

Table 5. The result of testing DNA samples isolated from contaminated analytical samples and bacterial suspensions of *P. fuscovaginae* using DTprime 5M6 and CFX96 amplifiers

Образец	Sample	Амплификатор «ДТпрайм 5М6» Amplifier DTprime 5M6			Амплификатор CFX96 Amplifier CFX96		
		Ct, Fam	Ct, Hex	Результат Result	Ct, Fam	Ct, Hex	Результат Result
5'-экстракт-1	5'-extract-1	36,6	33,1	+	37,15	34,38	+
5'-экстракт-2	5'- extract -2	37,1	32,8	+	38,07	34,76	+
5'-экстракт-3	5'- extract -3	36,7	32,6	+	37,49	34,97	+
4'-экстракт-1	4'- extract -1	34,2	33,0	+	34,12	34,46	+
4'-экстракт-2	4'- extract -2	34,4	32,9	+	34,12	34,67	+
4'-экстракт-3	4'- extract -3	34,2	32,5	+	34,64	34,42	+
3'-экстракт-1	3'- extract -1	32,2	32,5	+	32,11	34,48	+
3'-экстракт-2	3'- extract -2	32,0	32,5	+	31,18	34,38	+
3'-экстракт-3	3'- extract -3	31,9	32,5	+	31,18	34,01	+
Семенной экстракт-1	Seed extract -1	–	32,6	–	–	34,37	–
Семенной экстракт-2	Seed extract -2	–	33,0	–	–	34,22	–
Семенной экстракт-3	Seed extract -3	–	33,2	–	–	34,33	–
ПКО	PCS	22,4	30,1	+	14,51	–	+
ОКО	NCS	–	32,5	–	–	33,62	–
ОКО	NCS	–	32,8	–	–	32,7	–

Примечание: Ct – пороговый цикл ПЦР; FAM – канал детекции спецификации ПЦР; HEX – канал детекции внутреннего положительного контроля ПЦР; «+» – положительный образец; «–» – отрицательный образец; ПКО – положительный контрольный образец; ОКО – отрицательный контрольный образец.

Note: Ct – PCR threshold cycle; FAM – PCR specificity detection channel; HEX – PCR internal positive control detection channel; “+” – positive sample; “–” – negative sample; PCS – positive control sample; NCS – negative control sample.

Экспоненциальные кривые накопления флуоресценции были специфичные, флуоресценцию отмечали на уровне 1000 RFU (см. рис. 6).

Экспоненциальные кривые накопления флуоресценции были специфичные, флуоресценцию отмечали на уровне 1500 RFU (см. рис. 7).

Таким образом, данный метод изоляции культуры *P. fuscovaginae* может быть использован в случае заражения пробы пшеницы в концентрации $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, что соответствует пороговому циклу флуоресценции (Ct) 32,0 при использовании набора «*Pseudomonas fuscovaginae*-PB» («Синтол», Россия) на амплификаторе «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия) и Ct 31,5 при использовании «*Pseudomonas fuscovaginae*-PB» («Синтол», Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Несмотря на то, что критерий применимости метода при использовании теста компании «Синтол» составил 10^2 КОЕ/мл, метод изоляции может быть использован эффективно только при более высокой концентрации бактерии в пробе (10^4 КОЕ/мл и более). Высокий критерий применимости теста, равный 10^2 КОЕ/мл, позволит сделать заключение о наличии ДНК бактерии в образце.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были установлены критерии применимости метода изоляции культуры *Pseudomonas fuscovaginae* из семян пшеницы. Метод заключается в определенном способе

Thus, this method of isolating the *P. fuscovaginae* culture can be used in case of contamination of a wheat sample at a concentration of $1 \cdot 10^4$ CFU/ml, which corresponds to a fluorescence threshold cycle (Ct) of 32.0 using the kit “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” (Synthol, Russia) on the DTprime 5M6 amplifier (DNA-Technology, Russia) and Ct 31.5 when using “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” (Synthol, Russia) on a CFX96 amplifier (Bio-Rad, USA). Despite the fact that the criterion for the applicability of the method when using the Synthol test was 10^2 CFU/ml, the isolation method can only be used effectively when the concentration of bacteria in the sample is higher (10^4 CFU/ml and more). High test applicability criterion equal to 10^2 CFU/ml will allow us to draw a conclusion about the presence of bacterial DNA in the sample.

CONCLUSION

As a result of the study, criteria for the applicability of the method of isolating the *Pseudomonas fuscovaginae* culture from wheat seeds were established. The method consists in a certain way of inoculating an analytical sample, which, as a result of PCR testing, has shown the presence of the causative agent of sheath brown rot of cereal crops. Sowing should be carried

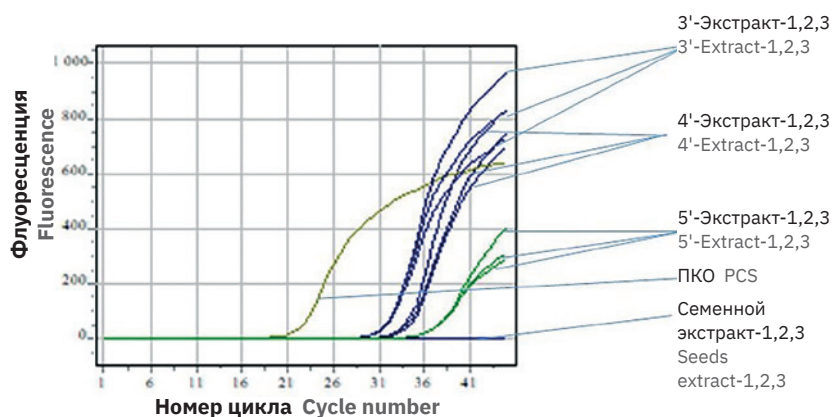


Рис. 6. Графики возрастания флуоресценции по каналу FAM в зависимости от концентрации целевой ДНК при использовании набора «*Pseudomonas fuscovaginae*-РВ» («Синтол», Россия) на амплификаторе «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия) (фото А.А. Десятерик)

Fig. 6. Graphs of the increase in fluorescence through the FAM channel depending on the concentration of the target DNA when using the “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” kit (Syntol, Russia) on a DTprime 5M6 amplifier (DNA-Technology, Russia) (photo by A.A. Desyaterik)

посева аналитической пробы, показавшей в результате ПЦР-тестирования наличие возбудителя бактериальной гнили влагилица листа злаковых культур. Посев следует проводить истощающим способом на 4 чашки Петри со средой R2A, используя 20 мкл концентрированной вытяжки семян, в двух повторностях. Одновременно в качестве положительного контроля следует высевать 20 мкл суспензии *P. fuscovaginae* в концентрации 10^5 – 10^7 КОЕ/мл. Чашки Петри после посева следует инкубировать при температуре 25 °С в течение 7 суток. Спустя 72 ч после посева следует проверить чашки с посевом аналитической пробы на наличие колоний, морфологически схожих с колониями *P. fuscovaginae*. Схожесть проверяют по появившимся на чашках с положительным контролем колониям. Колонии, схожие с *P. fuscovaginae*, следует идентифицировать молекулярно-генетическими методами.

Критерий применимости метода изоляции показал, что он может быть использован в случае заражения пробы пшеницы в концентрации $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, что соответствует пороговому циклу флуоресценции (Ct) 32,0 при использовании набора «*Pseudomonas fuscovaginae*-РВ» («Синтол», Россия) на амплификаторе «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия) и (Ct) 31,5 при использовании «*Pseudomonas fuscovaginae*-РВ» («Синтол», Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США).

Статья подготовлена по результатам научно-исследовательской работы в рамках государственного задания по теме: «Разработка методов диагностики возбудителей бактериозов зерновых культур, имеющих фитосанитарное значение при экспорте и импорте зерновой продукции», регистрационный номер НИОКТР 123022100104-4.

out in an exhaustive manner on 4 Petri dishes with R2A medium, using 20 µl of concentrated seed extract, in duplicate. At the same time, as a positive control, 20 µl of *P. fuscovaginae* suspension should be inoculated at a concentration of 10^5 – 10^7 CFU/ml. After inoculation, Petri dishes should be incubated at 25 °C for 7 days. 72 hours after inoculation, plates with inoculation of the analytical sample should be checked for the presence of colonies morphologically similar to the *P. fuscovaginae* colonies. Similarity is checked by the colonies that appear on the positive control plates. Colonies similar to *P. fuscovaginae* should be identified by molecular genetic methods.

The criterion for the applicability of the isolation method showed that it can be used in case of contamination of a wheat sample at a concentration of $1 \cdot 10^4$ CFU/ml, which corresponds to

a fluorescence threshold cycle (Ct) of 32.0 when using the kit “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” (Syntol, Russia) on the DTprime 5M6 amplifier (DNA-Technology, Russia) and (Ct) 31.5 when using “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” (Syntol, Russia) on a CFX96 amplifier (Bio-Rad, USA).

The article was prepared based on the results of research work within the framework of a state assignment on the topic: “Development of methods for diagnosing pathogens of bacteriases of grain crops that have phytosanitary significance for the export and import of grain products”, registration number R&D 123022100104-4.

REFERENCES

1. Lavrenchuk L.S., Ermoshin A.A. Microbiology: practice [Mikrobiologiya: praktikum]. Ekaterinburg: Ural, 2019, 107 p. (In Russ.)

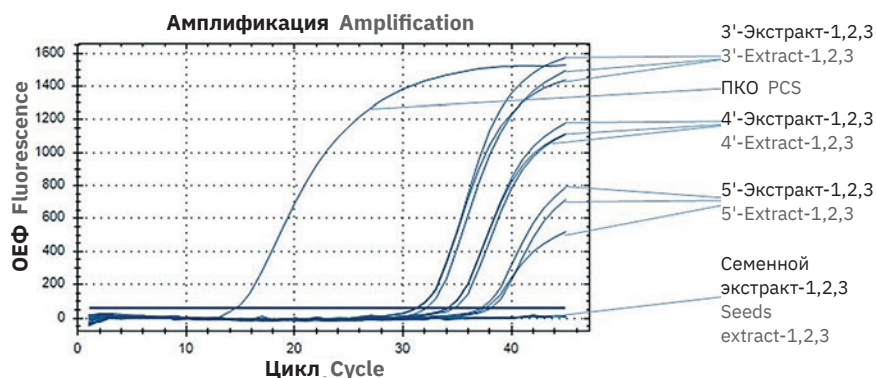


Рис. 7. Графики возрастания флуоресценции по каналу FAM в зависимости от концентрации целевой ДНК при использовании набора «*Pseudomonas fuscovaginae*-РВ» («Синтол», Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) (фото А.А. Десятерик)

Fig. 7. Graphs of the increase in fluorescence through the FAM channel depending on the concentration of the target DNA when using the “*Pseudomonas fuscovaginae*-RT” kit (Syntol, Russia) on a CFX96 amplifier (Bio-Rad, USA) (photo by A.A. Desyaterik)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лавренчук Л.С., Ермошин А.А. Микробиология: практикум. Екатеринбург: Урал, 2019, 107 с.
2. Муvingи М., Словарева О.Ю., Заргар М. Идентификация *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* в зерне пшеницы методом ПЦР // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2022. Т. 17. № 4. С. 473–483.
3. Федоренко Т.В., Землянская Н.И. Санитарная микробиология. Часть 1. Благовещенск: Дальневосточный ГАУ, 2015, 52 с.
4. Федеральная государственная информационная система (ФГИС) «Аргус-Фито» [Электронный ресурс]. URL: <https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/foremployees/argusfito/index.html> (дата обращения: 27.07.2023).
5. Cottyn B. Bacteria associated with rice seed from Philippine farmers' fields [PhD Thesis]. Los Baños: International Rice Research Institute (IRRI), 2003.
6. González D., Corzo-Lopez M., Márquez O.P., Cruz A., Martínez B., Martínez Y. Characterization and diagnosis of *Pseudomonas fuscovaginae* Miyajima, Tani and Akita, causal agent of the Brown Sheath Rot in rice. *Biotechnología Aplicada*. 2017. Vol. 34. P. 2101–2108.
7. Jaunet T., Notteghem J., Rapilly F. Pathogenicity process of *Pseudomonas fuscovaginae*, the causal agent of sheath brown rot of rice. *J Phytopathol*. 199. Vol. 144 (9–10). P. 425–430.
8. Patel H.K., da Silva D.P., Devescovi G., Marate H., Paszkiewicz K., Studholme D.J., Venturi V. Draft genome sequence of *Pseudomonas fuscovaginae*, a broad-host-range pathogen of plants // *J. Bacteriol*. No. 194. 2012. P. 2765–2766.
9. Razak A.A., Zainudin N.A.I.M., Sidiq S.N.M., Ismail N.A., Mohamad N.M.I.N., Salleh B. Sheath brown rot disease of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the Peninsular Malaysia. *J. Plant Protect Res*. 2009. Vol. 49 (3). P. 244–249.
10. Rott P., Honegger J., Notteghem J. Isolation of *Pseudomonas fuscovaginae* with a semiselective medium (KBS). *Int Rice Res Newslett*. 1989. Vol. 14 (1). P. 29.
11. Tambong J. Bacterial Pathogens of Wheat: Symptoms, Distribution, Identification, and Taxonomy. In (Ed.), *Wheat* [Working Title]. 2022. 25 p.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Десятерик Анастасия Андреевна, младший научный сотрудник отдела организации межлабораторных сравнительных испытаний, ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; магистрант Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия; e-mail: anastasiya.10.00@mail.ru.

Словарева Ольга Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела организации межлабораторных сравнительных испытаний, ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; e-mail: slovareva.olga@gmail.com.

Кононова Елена Петровна, агроном лаборатории бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; e-mail: catamont@yandex.ru.

2. Muvingi M., Slovaeva O.Yu., Zargar M. Identification of *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* in wheat grain by PCR method [Identifikatsiya *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* i *Xanthomonas translucens* v zerne pshenitsy metodom PTSR] // Bulletin of the Russian Peoples' Friendship University. Series: Agronomy and animal husbandry. 2022; 17; 4: 473–483. (In Russ.)

3. Fedorenko T.V., Zemlyanskaya N.I. Sanitary microbiology. Part 1. [Sanitarnaya mikrobiologiya. Chast' 1] Blagoveshchensk: Far Eastern State Agrarian University, 2015, 52 p. (In Russ.)

4. Federal State Information System (FSIS) "Argus-Fito" [Electronic resource]. URL: <https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/foremployees/argusfito/index.html> (last accessed: 27.07.2023).

5. Cottyn B. Bacteria associated with rice seed from Philippine farmers' fields [PhD Thesis]. Los Baños: International Rice Research Institute (IRRI), 2003.

6. González D., Corzo-Lopez M., Márquez O.P., Cruz A., Martínez B., Martínez Y. Characterization and diagnosis of *Pseudomonas fuscovaginae* Miyajima, Tani and Akita, causal agent of the Brown Sheath Rot in rice. *Biotechnología Aplicada*. 2017. Vol. 34. P. 2101–2108.

7. Jaunet T., Notteghem J., Rapilly F. Pathogenicity process of *Pseudomonas fuscovaginae*, the causal agent of sheath brown rot of rice. *J Phytopathol*. 199. Vol. 144 (9–10). P. 425–430.

8. Patel H.K., da Silva D.P., Devescovi G., Marate H., Paszkiewicz K., Studholme D.J., Venturi V. Draft genome sequence of *Pseudomonas fuscovaginae*, a broad-host-range pathogen of plants // *J. Bacteriol*. No. 194. 2012. P. 2765–2766.

9. Razak A.A., Zainudin N.A.I.M., Sidiq S.N.M., Ismail N.A., Mohamad N.M.I.N., Salleh B. Sheath brown rot disease of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the Peninsular Malaysia. *J. Plant Protect Res*. 2009. Vol. 49 (3). P. 244–249.

10. Rott P., Honegger J., Notteghem J. Isolation of *Pseudomonas fuscovaginae* with a semiselective medium (KBS). *Int Rice Res Newslett*. 1989. Vol. 14 (1). P. 29.

11. Tambong J. Bacterial Pathogens of Wheat: Symptoms, Distribution, Identification, and Taxonomy. In (Ed.), *Wheat* [Working Title]. 2022. 25 p.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasia Desyaterik, Junior Researcher, Inter-laboratory Comparisons Organization Department, FGBU "VNIICR", Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia; Master's student Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia; e-mail: anastasiya.10.00@mail.ru.

Olga Slovaeva, PhD in Biology, Senior Researcher, Interlaboratory Comparisons Organization Department, FGBU "VNIICR", Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia; e-mail: slovareva.olga@gmail.com.

Elena Kononova, Agronomist, Bacteriology and GMO Analysis Laboratory, Laboratory Testing Center, FGBU "VNIICR", Bykovo, Urban district Ramensky, Moscow Oblast, Russia; e-mail: catamont@yandex.ru.