

Оценка применимости ПЦР-теста в режиме «реального времени» для идентификации возбудителя желтого слизистого бактериоза пшеницы *Rathayibacter tritici*

* ОБОЛЕНСКИЙ Р.Р.¹, СЛОВАРЕВА О.Ю.², ДОРОФЕЕВА Л.В.³

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

¹ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева), г. Москва, Россия, 127434

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН), г. Москва, Россия, 117198

³ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН), Пущино, Россия, 142290

¹ ORCID 0009-0001-5462-4199,
e-mail: 7812romalist@mail.ru

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

³ ORCID 0000-0002-9486-3389,
e-mail: dekabr28@rambler.ru

АННОТАЦИЯ

Возбудитель желтого слизистого бактериоза пшеницы *Rathayibacter tritici* (Carlson & Vidaver) Zgurskaya et al. входит в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза. Быстрая идентификация возбудителя является важным элементом в сфере карантина растений. Метод ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) наиболее оптимален при проведении лабораторной диагностики. В настоящий момент существует только два теста ПЦР-РВ для идентификации *Rathayibacter tritici*, разработанные Postnikova et al., 2017. Тесты предназначены для идентификации *Rathayibacter tritici* в чистых бактериальных культурах. Сведения о значениях основных параметров применимости теста ПЦР-РВ – аналитической специфичности, включая эксклюзивность и инклюзивность, и аналитической чувствительности, – а также об испытаниях теста для обнаружения патогена в растительных образцах в оригинальной статье отсутствуют. Целью настоящей работы являлась оценка применимости ранее известных тестов ПЦР-РВ для идентификации *R. tritici*. Материалами исследований являлись штаммы *R. tritici*, а также 26 штаммов

Evaluation of the real-time PCR applicability for the identification of bacterial ear rot of wheat *Rathayibacter tritici*

* ROMAN R. OBOLENSKY¹, OLGA YU. SLOVAREVA², LIUBOV V. DOROFEEVA³

^{1, 2} Federal State Budgetary Institution “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIIEKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

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

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Patrice Lumumba Peoples’ Friendship University of Russia” (RUDN University), Moscow, Russia, 117198

³ Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences” (G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences), Pushchino, Russia, 142290

¹ ORCID 0009-0001-5462-4199,
e-mail: 7812romalist@mail.ru

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

³ ORCID 0000-0002-9486-3389,
e-mail: dekabr28@rambler.ru

ABSTRACT

Bacterial ear rot of wheat *Rathayibacter tritici* (Carlson & Vidaver) Zgurskaya et al. is included in the Common List of Quarantine Pests of the Eurasian Economic Union. Rapid identification of the pathogen is an important element in the field of plant quarantine. The “real time” PCR method (real-time PCR) is the most optimal for laboratory diagnosis. Currently, there are only two real-time PCR tests for identification of *Rathayibacter tritici* developed by Postnikova et al., 2017. The tests are designed to identify *Rathayibacter tritici* in pure bacterial cultures. The original article does not contain information on the values of the main parameters of the real-time PCR test applicability – analytical specificity, including exclusivity and inclusivity, and analytical sensitivity, as well as on testing the test for detecting the pathogen in plant samples. The aim of

бактерий рода *Rathayibacter*, включая все существующие виды внутри указанного рода. В результате оценки применимости тестов ПЦР-РВ для идентификации возбудителя желтого слизистого бактериоза пшеницы *Rathayibacter tritici* было установлено, что значение инклюзивности – способности теста идентифицировать все многообразие штаммов бактерии внутри вида – для исследуемых тестов составляет 83,3%. Использование указанных тестов позволило идентифицировать 5 из 6 штаммов целевого объекта – *Rathayibacter tritici*. Значение эксклюзивности – способности теста отличать целевые штаммы от нецелевых – составило 100% для обоих тестов. Тесты ПЦР-РВ, разработанные Postnikova et al., 2017, несмотря на их высокую эксклюзивность (100%), неприменимы для фитосанитарной диагностики, поскольку в случае их применения достаточно высоким является риск ложноотрицательных результатов и, как следствие, проникновения карантинного фитопатогена на новые территории.

Ключевые слова. Бактериозы зерновых культур, фитосанитария, молекулярно-генетические методы, ПЦР-РВ, диагностика болезней растений, идентификация фитопатогенов.

ВВЕДЕНИЕ



елтый слизистый бактериоз пшеницы, вызываемый фитопатогенной бактерией *Rathayibacter tritici* (Carlson & Vidaver) Zgurskaya et al., способен поражать такие растения, как пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.), ячмень (*Hordeum* L.) и канареечник малый (*Phalaris minor* Retz.) (Gupta, Swarup, 1972; Paruthi et al., 1987; Postnikova et al., 2017; Park et al., 2017; Murray et al., 2017; Starodumova et al., 2024). Основным источником заражения возбудителем желтого слизистого бактериоза является повреждение растений-хозяев нематодами *Anguina tritici* (Sabet, 1954). В случае частичного развития болезни, может наблюдаться потеря урожайности зерна до 70%, а при полном поражении колосьев семена не образуются (Paruthi et al., 1987).

Патоген входит в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза (Решение... № 158). Подкарантинной продукцией, к которой предъявляются специальные карантинные фитосанитарные требования по ее происхождению из зон, свободных от *R. tritici*, являются семена пшеницы и тритикале (Решение... № 157). Кроме того, бактерия является карантинным объектом для Туниса, Грузии, Бангладеша, Узбекистана и Молдовы (Словарева, 2023; Обновленные фитосанитарные требования Бангладеша 2015 г.; Перечень вредных организмов карантинного значения для Республики Узбекистан; Перечень вредных организмов, ввоз и распространение которых в Республике Молдова запрещен).

Клетки *R. tritici* представляют собой грамположительные, неподвижные, аэробные, прямые или слегка изогнутые палочки, размер которых

this work was to assess the applicability of previously known real-time PCR tests for the identification of *R. tritici*. The study materials were *R. tritici* strains, as well as 26 strains of bacteria of the genus *Rathayibacter*, including all existing species within this genus. As a result of assessing the applicability of real-time PCR tests for the identification of the causative agent of bacterial ear rot of wheat *Rathayibacter tritici*, it was found that the inclusivity value – the ability of the test to identify the entire diversity of bacterial strains within a species – for the studied tests is 83.3%. The use of these tests allowed us to identify 5 out of 6 strains of the target object – *Rathayibacter tritici*. The exclusivity value – the ability of the test to distinguish target strains from non-target ones – was 100% for both tests. The real-time PCR tests developed by Postnikova et al., 2017, despite their high exclusivity (100%), are not applicable for phytosanitary diagnosis, since in the case of their use the risk of false negative results and, as a consequence, the introduction of the quarantine pest into new territories is quite high.

Key words. Bacteriosis of grain crops, phytosanitary, molecular genetic methods, real time PCR, plant disease diagnosis, phytopathogens identification.

INTRODUCTION

Bacterial ear rot of wheat caused by *Rathayibacter tritici* (Carlson & Vidaver) Zgurskaya et al., can affect such plants as wheat (*Triticum aestivum* L.), barley (*Hordeum* L.) and little seed canary grass (*Phalaris minor* Retz.) (Gupta, Swarup, 1972; Paruthi et al., 1987; Postnikova et al., 2017; Park et al., 2017; Murray et al., 2017; Starodumova et al., 2024). The main infection source of bacterial ear rot of wheat is damage to host plants by nematodes *Anguina tritici* (Sabet, 1954). In case of partial development of the disease, a loss of grain yield of up to 70% can be observed, and if the ears are completely affected, seeds are not formed (Paruthi et al., 1987).

The pathogen is included in the Common List of Quarantine Pests of the Eurasian Economic Union (Decision... No. 158). Regulated articles to which special quarantine phytosanitary requirements are imposed on their origin from areas free from *R. tritici* are wheat and triticale seeds (Decision... No. 157). In addition, the bacterium is a quarantine pest for Tunisia, Georgia, Bangladesh, Uzbekistan and Moldova (Slovareva, 2023; Updated phytosanitary requirements of Bangladesh 2015; List of quarantine pests for the Republic of Uzbekistan; List of pests, the import and distribution of which is prohibited in the Republic of Moldova).

R. tritici cells are gram-positive, non-motile, aerobic, straight or slightly curved rods measuring 1.1–1.6 µm long and 0.5–0.6 µm wide (Zgurskaya et al., 1993; Park et al., 2017; Shashkov et al., 2020).

On general-purpose solid nutrient media such as nutrient broth-yeast extract (NBY) (Postnikova

составляет 1,1–1,6 мкм в длину и 0,5–0,6 мкм в ширину (Zgurskaya et al., 1993; Park et al., 2017; Шашков и др., 2020).

На твердых питательных средах общего назначения, таких как питательный бульон-дрожжевой экстракт (NBY) (Postnikova et al., 2017), дрожжевой пептонно-глюкозный агар (YPGA) (EPPO PM 7/60 (2), 2016), R2A (Reasoner, Geldreich, 1985) и др., *R. tritici* образует ярко-желтые круглые колонии, непрозрачные на большинстве сред (см. рис. 1).

Высота профиля, форма края и размер колоний могут отличаться в зависимости от используемой среды (Postnikova et al., 2017; Park et al., 2017; Muvingi et al., 2020; Оболенский, Словарева, 2024). Zgurskaya с соавт. в результате изучения *R. tritici* приводят подробное описание его биохимических характеристик и их отличий от характеристик близкородственных видов (Zgurskaya et al., 1993). Идентификация данного возбудителя среди других бактерий классическими микробиологическими методами возможна, но необходимый в данном случае этап изоляции чистой культуры занимает достаточно длительное время – от 4 до 20 суток (Gupta, Swarup, 1972; Postnikova et al., 2017). Кроме того, ошибка в результатах идентификации карантинных патогенов недопустима, поскольку влечет за собой ограничения торговли и другие последствия. В этой связи положительный результат идентификации *R. tritici* требует подтверждения другими методами, основанными на различных биологических принципах.

Молекулярно-генетические методы позволяют более надежно, по сравнению с классическими, идентифицировать фитопатогенные бактерии (Приходько и др., 2021; Тараканов и др., 2024). Среди молекулярно-генетических диагностических методов наиболее универсальным, а потому широко применимым в испытательных фитосанитарных лабораториях является метод ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) (Ignatyeva et al.,

et al., 2017), yeast peptone glucose agar (YPGA) (EPPO PM 7/60 (2), 2016), R2A (Reasoner, Geldreich, 1985), etc., *R. tritici* forms bright yellow round colonies that are opaque on most media (see Fig. 1).

The profile height, edge shape and colony size may vary depending on the medium used (Postnikova et al., 2017; Park et al., 2017; Muvingi et al., 2020; Obolensky, Slovareva, 2024). Zgurskaya et al. (1993), as a result of studying *R. tritici*, provide a detailed description of its biochemical characteristics and their differences from the characteristics of closely related species. Identification of this pathogen among other bacteria by classical microbiological methods is possible, but the required stage of pure culture isolation takes quite a long time – from 4 to 20 days (Gupta, Swarup, 1972; Postnikova et al., 2017). In addition, an error in quarantine pathogens identification is unacceptable, since it entails trade restrictions and other consequences. In this regard, a positive result of *R. tritici* identification requires confirmation by other methods based on different biological principles.

Molecular genetic methods allow more reliable identification of phytopathogenic bacteria compared to classical methods (Prikhodko et al., 2021; Tarakanov et al., 2024). Among the molecular genetic diagnostic methods, the most universal and therefore widely applicable in phytosanitary testing laboratories is the real-time PCR method (Ignatyeva et al., 2021; Domoratskaya et al., 2024). Species-specific real-time PCR tests make it possible to quickly and accurately identify the causative agent of the disease (Karabay, Ignatyeva, 2024). When introducing a test into diagnostic practice, an assessment of its applicability is required, within the framework of which the key test parameters are established (EPPO PM 7/76 (5), 2018). These parameters are analytical specificity (AS), which shows the ability of the test to reliably distinguish the target organism from non-target ones, and analytical sensitivity (ASen), which reflects the minimum detectable content of the target in the tested DNA sample

(EPPO PM 7/98 (3), 2018; Slovareva, Kornev, 2020; Beloshapkina, Pisareva, 2024). Additionally, two indicators characterizing AS were introduced – inclusivity, or the ability of the test to identify the entire diversity of bacterial strains within a species, and exclusivity, or the ability of the test to distinguish target strains from non-target ones (EPPO PM 7/98 (3), 2018).

Two real-time PCR tests have been developed for the identification of *R. tritici*: BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 (Postnikova et al., 2017). The tests are designed to identify *R. tritici* in pure bacterial cultures. There is no information on the AS and ASen values, as well as on trying out the test for detecting the

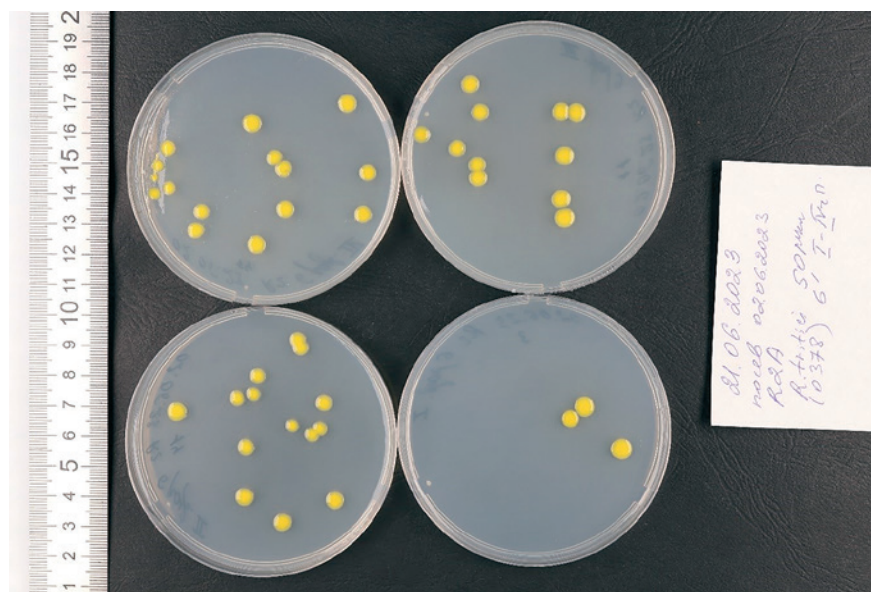


Рис. 1. Колонии *Rathayibacter tritici* на среде R2A спустя 19 суток инкубирования при температуре 25 °C (фото Р. Р. Оболенского)

Fig. 1. *Rathayibacter tritici* colonies on R2A medium after 19 days of incubation at 25 °C (photo by R. R. Obolensky)

Табл. 1. Штаммы *Rathayibacter tritici*, используемые в работе
Table 1. *Rathayibacter tritici* strains used in the work

№ п/п	Номер штамма Strain number	Номер штамма в других коллекциях Strain number in other collections	Источник, страна Source, country
1	VNIIKR-B-0837 [†]	BKM Ac-1603 [†] VKM Ac-1603 [†] ; ATCC 11403; CCUG 23914; CIP 104038; DSM 7486; ICMP 2626; JCM 9309; LMG 3728; NCPPB 1857; CFBP 1385	<i>Triticum aestivum</i> L., Египет <i>Triticum aestivum</i> L., Egypt
2	VNIIKR-B-1014	BKM Ac-2585 VKM Ac-2585; ICMP 2623; ICPB CT103	<i>Triticum aestivum</i> L., Индия <i>Triticum aestivum</i> L., India
3	VNIIKR-B-1015	BKM Ac-2586 VKM Ac-2586; ICMP 2624; ICPB CT106; NCTC 6255	<i>Triticum aestivum</i> L., Египет <i>Triticum aestivum</i> L., Egypt
4	VNIIKR-B-1016	BKM Ac-2587 VKM Ac-2587; ICMP 2625; ATCC 11402	<i>Triticum aestivum</i> L., Индия <i>Triticum aestivum</i> L., India
5	VNIIKR-B-1017	BKM Ac-2588 VKM Ac-2588; ICMP 2627; NCPPB 471	<i>Triticum aestivum</i> L., Индия <i>Triticum aestivum</i> L., India
6	VNIIKR-B-1018	BKM Ac-2589 VKM Ac-2589; ICMP 2628	<i>Triticum aestivum</i> L., Иран <i>Triticum aestivum</i> L., Iran

Примечание: VNIIKR – Исследовательская коллекция научно-методического отдела ФГБУ «ВНИИКР» (Россия), BKM – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Россия), ATCC – American Type Culture Collection (США), CCUG – Culture Collection, University of Göteborg (Швеция), CIP – Collection de l’Institut Pasteur (Франция), DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Германия), ICMP-PDDCC – Culture Collection of Plant Diseases Division (Новая Зеландия), JCM – Acronym used by the Microbiology section of the College of Biology and Environmental Sciences (Китай), BCCM-LMG – Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica (Бельгия), NCPPB – National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (Великобритания), CFBP – Collection Francaise des Bacteries Phytopathogenes (Франция), ICPB – International Collection of Phytopathogenic Bacteria (США), NCTC – National Collection of Type Cultures (Великобритания)

Note: VNIIKR – Research collection of the Research and Methodology Department of FGBU “VNIIKR” (Russia), VKM – All-Russian collection of microorganisms (Russia), ATCC – American Type Culture Collection (USA), CCUG – Culture Collection, University of Göteborg (Sweden), CIP – Collection de l’Institut Pasteur (France), DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Germany), ICMP-PDDCC – Culture Collection of Plant Diseases Division (New Zealand), JCM – Acronym used by the Microbiology section of the College of Biology and Environmental Sciences (China), BCCM-LMG – Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica (Belgium), NCPPB – National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (UK), CFBP – Collection Francaise des Bacteries Phytopathogenes (France), ICPB – International Collection of Phytopathogenic Bacteria (USA), NCTC – National Collection of Type Cultures (UK)

2021; Доморацкая и др., 2024). Видоспецифичные тесты ПЦР-РВ дают возможность быстро и точно идентифицировать возбудителя болезни (Каракай, Игнатьева, 2024). При внедрении теста в диагностическую практику требуется оценка его применимости, в рамках которой устанавливают ключевые параметры теста (EPPO PM 7/76 (5), 2018). Такими параметрами являются аналитическая специфичность (АС), показывающая способность теста достоверно отличать целевой организм от нецелевых, и аналитическая чувствительность (АЧ), отражающая минимальное детектируемое содержание целевой мишени в тестируемом образце ДНК (EPPO PM 7/98 (3), 2018; Словарева, Корнев, 2020; Белошапкина, Писарева, 2024). Дополнительно введены два показателя, характеризующие АС – инклюзивность, или способность теста идентифицировать все многообразие штаммов бактерии внутри вида, и эксклюзивность, или способность теста отличать целевые штаммы от нецелевых (EPPO PM 7/98 (3), 2018).

Для идентификации *R. tritici* разработано два теста ПЦР-РВ: BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 (Postnikova et al., 2017). Тесты предназначены для идентификации *R. tritici* в чистых бактериальных культурах. Сведения о значениях АС и АЧ, а также об испытаниях теста для обнаружения патогена в растительных образцах отсутствуют, что не позволяет сделать вывод о применимости тестов BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1.

pathogen in plant samples, which does not allow us to conclude on the applicability of the BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 tests.

The aim of this work was to evaluate the applicability of the real-time PCR tests BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 for *R. tritici* identification.

MATERIALS AND METHODS

The research materials were the *R. tritici* strains: VNIIKR-B-0837T, VNIIKR-B-1014, VNIIKR-B-1015, VNIIKR-B-1016, VNIIKR-B-1017, VNIIKR-B-1018 from the Research Collection of the Research and Methodology Department of FGBU “VNIIKR” (Russia) (see Table 1).

Apart from *R. tritici* strains, 17 bacterial strains belonging to all known species of the genus *Rathayibacter* were used: *R. toxicus*, *R. rathayi*, *R. iranicus*, *R. festucae*, *R. caricis*, *R. oskolensis*, *R. agropyri* и *R. tanacetum* (see Table 2).

The study materials also included bacterial strains identified using molecular genetic, spectrometric and biochemical analyses as representatives of the genus *Rathayibacter* (Slovareva et al., 2024) (see Table 3).

Thus, the study was conducted using 32 strains isolated from plants of the families Poaceae, Fabaceae,

Табл. 2. Штаммы прочих видов бактерий рода *Rathayibacter*, кроме *Rathayibacter tritici*, используемые в работе

Table 2. Strains of other bacteria species of the genus *Rathayibacter*, except *Rathayibacter tritici*, used in the work

№ п/п	Номер штамма Strain number	Название бактерии Bacterium	Номер штамма в других коллекциях Strain number in other collections	Источник, страна Source, country
1	VNIIKR-B-0454	<i>Rathayibacter toxicus</i>	BKM Ac-1600 VKM Ac-1600; ICMP 6309; LMG 7339; PDDCC 6309	<i>Phalaris minor</i> Retz., Австралия <i>Phalaris minor</i> Retz., Australia
2	VNIIKR-B-0451 ^T	<i>Rathayibacter rathayi</i>	BKM Ac-1601 ^T VKM Ac-1601 ^T ; CIP 104036; DSM 7485; ICMP 2574; JCM 9307; LMG 7288; NCPPB 2980	<i>Dactylis glomerata</i> L., Новая Зеландия <i>Dactylis glomerata</i> L., New Zealand
3	VNIIKR-B-0457 ^T	<i>Rathayibacter iranicus</i>	BKM Ac-1602 ^T VKM Ac-1602 ^T ; CCUG 23897; CIP 104037; DSM 7484; ICMP 3496; ICPB CI148; JCM 9308; LMG 3677; NCPPB 2253; CFBP 807	<i>Triticum aestivum</i> L., Иран <i>Triticum aestivum</i> L., Iran
4	VNIIKR-B-0458 ^T	<i>Rathayibacter festucae</i>	BKM Ac-1390 ^T VKM Ac-1390 ^T ; DSM 15932; JCM 13577	<i>Festuca Tourn.</i> ex L., Россия <i>Festuca Tourn.</i> ex L., Russia
5	VNIIKR-B-0455 ^T	<i>Rathayibacter caricis</i>	BKM Ac-1799 ^T VKM Ac-1799 ^T ; DSM 15933; JCM 13576	<i>Carex</i> L., Россия <i>Carex</i> L., Russia
6	VNIIKR-B-0455	<i>Rathayibacter oskolensis</i>	BKM Ac-2121 ^T VKM Ac-2121 ^T ; BCCM/LMG 22542	<i>Androsace villosa</i> subsp. <i>koso-poljanskii</i> (Ovcz.) Fed. <i>Androsace villosa</i> subsp. <i>koso-poljanskii</i> (Ovcz.) Fed.
7	VNIIKR-B-0450	<i>Rathayibacter agropyri</i>	BKM Ac-2828 VKM Ac-2828; DSM 104101; ATCC TSD-78	<i>Elymus smithii</i> (Rydb.) Gould, США (Калифорния) <i>Elymus smithii</i> (Rydb.) Gould, USA (California)
8	VNIIKR-B-0459 ^T	<i>Rathayibacter tanacetum</i>	BKM Ac-2596 ^T VKM Ac-2596 ^T	<i>Tanacetum vulgare</i> L., Россия <i>Tanacetum vulgare</i> L., Russia
9	VNIIKR-B-0452	<i>Rathayibacter "tanacetum"</i>	BKM Ac-2761 VKM Ac-2761	<i>Tanacetum vulgare</i> L., Россия <i>Tanacetum vulgare</i> L., Russia
10	VNIIKR-B-0499	<i>Rathayibacter "acroptylon"</i>	BKM Ac-2630 VKM Ac-2630	<i>Rhaponticum repens</i> (L.) Hidalgo, Узбекистан <i>Rhaponticum repens</i> (L.) Hidalgo, Uzbekistan
11	VNIIKR-B-0461	<i>Rathayibacter festucae</i>	BKM Ac-3063 VKM Ac-3063; 20M31-111	x <i>Triticosecale</i> Wittm. & A.Camus, Россия x <i>Triticosecale</i> Wittm. & A.Camus, Russia
12	VNIIKR-B-0827	<i>Rathayibacter festucae</i>	BKM Ac-3064 VKM Ac-3064; 21K1-3	<i>Hordeum vulgare</i> L., Россия <i>Hordeum vulgare</i> L., Russia
13	VNIIKR-B-0460	<i>Rathayibacter oskolensis</i>	BKM Ac-3061 VKM Ac-3061; 22B16-68	<i>Triticum aestivum</i> L., Россия <i>Triticum aestivum</i> L., Russia
14	VNIIKR-B-0831	<i>Rathayibacter festucae</i>	22C1-338	<i>Hordeum vulgare</i> L., Россия <i>Hordeum vulgare</i> L., Russia
15	VNIIKR-B-0832	<i>Rathayibacter festucae</i>	22C1-357	<i>Hordeum vulgare</i> L., Россия <i>Hordeum vulgare</i> L., Russia
16	VNIIKR-B-0834	<i>Rathayibacter festucae</i>	22C1-370	<i>Hordeum vulgare</i> L., Россия <i>Hordeum vulgare</i> L., Russia
17	VNIIKR-B-0835	<i>Rathayibacter festucae</i>	ВНИИКР (ИЛЦ) 0554 VNIIKR (TLC) 0554	<i>Lathyrus oleraceus</i> Lam., Россия <i>Lathyrus oleraceus</i> Lam., Russia

Примечание: VNIIKR – Исследовательская коллекция научно-методического отдела ФГБУ «ВНИИКР», BKM – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Россия), ATCC – American Type Culture Collection (США), CCUG – Culture Collection, University of Göteborg (Швеция), CIP – Collection de l'Institut Pasteur (Франция), DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Германия), ICMP- PDDCC – Culture Collection of Plant Diseases Division (Новая Зеландия), JCM – Acronym used by the Microbiology section of the College of Biology and Environmental Sciences (Китай), BCCM/LMG – Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica (Бельгия), NCPPB – National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (Великобритания), CFBP – Collection Francaise des Bacteries Phytopathogenes (Франция), ICPB – International Collection of Phytopathogenic Bacteria (США), ВНИИКР (ИЛЦ) – Исследовательская коллекция Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР» (Россия)

Note: VNIIKR – Research collection of the Research and Methodology Department of FGBU “VNIIKR” (Russia), VKM – All-Russian collection of microorganisms (Russia), ATCC – American Type Culture Collection (USA), CCUG – Culture Collection, University of Göteborg (Sweden), CIP – Collection de l'Institut Pasteur (France), DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Germany), ICMP-PDDCC – Culture Collection of Plant Diseases Division (New Zealand), JCM – Acronym used by the Microbiology section of the College of Biology and Environmental Sciences (China), BCCM-LMG – Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica (Belgium), NCPPB – National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (UK), CFBP – Collection Francaise des Bacteries Phytopathogenes (France), ICPB – International Collection of Phytopathogenic Bacteria (USA), VNIIKR (TLC) – Research collection of the Testing laboratory center of FGBU “VNIIKR” (Russia)

Табл. 3. Штаммы бактерий рода *Rathayibacter* с неустановленной видовой принадлежностью, используемые в работе
Table 3. Strains of bacteria of the genus *Rathayibacter* with unspecified species affiliation used in the work

№ п/п	Номер штамма Strain number	Название бактерии Bacterium	Номер штамма в других коллекциях Strain number in other collections	Источник, страна
1	VNIIKR-B-0828	<i>Rathayibacter</i> sp.	BKM Ac-3062 VKM Ac-3062; 22B42-16	<i>Triticum aestivum</i> L., Россия <i>Triticum aestivum</i> L., Russia
2	VNIIKR-B-0178	<i>Rathayibacter</i> sp.	BKM Ac-3057 VKM Ac-3057; 22B16-64	<i>Triticum aestivum</i> L., Россия <i>Triticum aestivum</i> L., Russia
3	VNIIKR-B-0181	<i>Rathayibacter</i> sp.	BKM Ac-3056 VKM Ac-3056; 22B16-70	<i>Triticum aestivum</i> L., Россия <i>Triticum aestivum</i> L., Russia
4	VNIIKR-B-0413	<i>Rathayibacter</i> sp.	BKM Ac-3060 VKM Ac-3060; 22B20-115	<i>Triticum aestivum</i> L., Россия <i>Triticum aestivum</i> L., Russia
5	VNIIKR-B-0829	<i>Rathayibacter</i> sp.	BKM Ac-3059 VKM Ac-3059; 22B37-215	<i>Triticum aestivum</i> L., Россия <i>Triticum aestivum</i> L., Russia
6	VNIIKR-B-0830	<i>Rathayibacter</i> sp.	BKM Ac-3058 VKM Ac-3058; 22B28-251	<i>Triticum aestivum</i> L., Россия <i>Triticum aestivum</i> L., Russia
7	VNIIKR-B-0462	<i>Rathayibacter</i> sp.	BKM Ac-3065 VKM Ac-3065; 22C29-452	<i>Triticum durum</i> Desf., Россия <i>Triticum durum</i> Desf., Russia
8	VNIIKR-B-0833	<i>Rathayibacter</i> sp.	22C1-362	<i>Hordeum vulgare</i> L., Россия <i>Hordeum vulgare</i> L., Russia
9	VNIIKR-B-0836	<i>Rathayibacter</i> sp.	ВНИИКР (ИЛЦ) 0591 VNIIKR (TLC) 0591	<i>Glycine max</i> (L.) Merr., Россия <i>Glycine max</i> (L.) Merr., Russia

Примечание: VNIIKR – Исследовательская коллекция научно-методического отдела ФГБУ «ВНИИКР», ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Россия), ВНИИКР (ИЛЦ) – Исследовательская коллекция Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР»

Note: VNIIKR – Research collection of the Research and Methodology Department of FGBU “VNIIKR” (Russia), VKM – All-Russian collection of microorganisms (Russia), VNIIKR (TLC) – Research collection of the Testing laboratory center of FGBU “VNIIKR”

Целью настоящей работы являлась оценка применимости тестов ПЦР-РВ BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 для идентификации *R. tritici*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами исследований являлись штаммы *R. tritici*: VNIIKR-B-0837T, VNIIKR-B-1014, VNIIKR-B-1015, VNIIKR-B-1016, VNIIKR-B-1017, VNIIKR-B-1018 из Исследовательской коллекции научно-методического отдела ФГБУ «ВНИИКР» (Россия) (см. табл. 1).

Кроме штаммов *R. tritici*, использовали 17 штаммов бактерий, принадлежащих всем известным видам рода *Rathayibacter*: *R. toxicus*, *R. rathayi*, *R. iranicus*, *R. festucae*, *R. caricis*, *R. oskolensis*, *R. agropyri* и *R. tanacetum* (см. табл. 2).

Материалами исследования также являлись бактериальные штаммы, идентифицированные с помощью молекулярно-генетического, спектрометрического и биохимического анализов как представители рода *Rathayibacter* (Словарева и др., 2024) (см. табл. 3).

Таким образом, исследование проводили с использованием 32 штаммов, выделенных из растений семейств Poaceae, Fabaceae, Asteraceae и Primulaceae. Из них 6 – *R. tritici*, 17 – представители других видов рода *Rathayibacter* и 9 бактерии рода *Rathayibacter* с неустановленной видовой принадлежностью.

В опытах использовали суспензии чистых бактериальных культур в концентрации 10⁶–10⁷ КОЕ/мл. Культивирование проводили

Asteraceae and Primulaceae. Of these, 6 were *R. tritici*, 17 were representatives of other species of the genus *Rathayibacter* and 9 were bacteria of the genus *Rathayibacter* with an unspecified species affiliation.

In the experiments, suspensions of pure bacterial cultures were used at a concentration of 10⁶–10⁷ CFU/ml. Cultivation was carried out for 48 h at a temperature of 25 °C on agarized R2A medium (Reasoner, Geldreich, 1985), modified by adding 5 g of agar per 1 l of medium (per 1 l of medium: 0.5 g of peptone, 0.5 g of yeast extract, 0.5 g of glucose, 0.5 g of casein hydrolysate, 0.3 g of sodium pyruvate, 0.5 g of starch, 0.3 g of K₂HPO₄, 0.024 g of MgSO₄ × 7H₂O, 23 g of agar).

DNA extraction was performed using the Proba-GS kit (AgroDiagnostica, Russia) in accordance with the manufacturer’s instructions. Each strain was tested in triplicate.

The species identity of each *R. tritici* strain was preliminarily confirmed using classical Rt-5F/Rt-5R PCR (Baek et al., 2018) and subsequent Sanger sequencing.

The oligonucleotide sequences were used according to the source (Postnikova et al., 2017). The region of the oligonucleotide location in NZ_CP015515.1 (*Rathayibacter tritici* strain NCPPB 1953 chromosome, complete genome) was determined using the Ugene software (Unipro UGENE software).

Табл. 4. Состав реакционной смеси и условия амплификации тестов ПЦР-РВ
Table 4. Composition of the reaction mixture and conditions for amplification of real-time PCR tests

BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1			BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1		
Компонент Component	Рабочая концентрация Working concentration	Количество, мкл Quantity, µl	Компонент Component	Рабочая концентрация Working concentration	Количество, мкл Quantity, µl
Вода Water	–	14,4	Вода Water	–	13,1
5X ПЦР-микс 5X PCR mix	5X	5,0	5X ПЦР-микс 5X PCR mix	5X	5,0
BTRITF1	10 пмоль/мкл 10 pmol/µl	1,9	BTRITF2	10 пмоль/мкл 10 pmol/µl	1,9
BTRITR1	10 пмоль/мкл 10 pmol/µl	0,6	BTRITR2	10 пмоль/мкл 10 pmol/µl	1,9
BTRITP1	5 пмоль/мкл 5 pmol/µl	1,0	BTRITP1	5 пмоль/мкл 5 pmol/µl	1,0
ВПК IPC	–	0,1	ВПК IPC	–	0,1
ДНК DNA	–	2,0	ДНК DNA	–	2,0
Общий объем Total volume	–	25,0	Общий объем Total volume	–	25,0
Режим амплификации Amplification mode					
Температура Temperature	Время Time	Количество циклов Number of cycles			
95 °C	5 мин 5 min	1			
95 °C	15 сек 15 sec	45			
60 °C	40 сек 40 sec				

Примечание: ВПК – внутренний положительный контроль (ООО «НПФ Синтол», Россия);
 5X ПЦР-микс – 5X qPCRMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия)
Note: IPC – internal positive control (Syntol, Russia); 5X PCR mix – 5X qPCRMix-HS (Evrogen, Russia)

Табл. 5. Характеристики использованных олигонуклеотидов
Table 5. Characteristics of the oligonucleotides

Название олигонуклеотида Oligonucleotide name	Последовательность нуклеотидов, 5'-3' Nucleotide sequence, 5'-3'	Регион Region	Модификация Modification	Длина, п.о. Length, bp	GC-состав, % GC-content, %	Tm, °C
BTRITF1	CGGGCAGGTACGAGTAATGG	Не найден Not found	Нет No	20	60	63
BTRITR1	CCGGCCGTCGTCGAAGGCGAT	557126-557145	Нет No	20	70	67
BTRITF2	AATTTGATCTGTTTGGAAGCTGC	557181-557203	Нет No	23	39	59
BTRITR2	GCCGTCGTCGAAGGCGAT	557129-557145	Нет No	17	65	57
BTRITP1	CGTGACGTGGATAAGTTGATCAGCCTGA	557152-557179	6FAM/BHQ1	28	50	70

Примечание: регион в NZ_CP015515.1 (*Rathayibacter tritici* strain NCP PB 1953 chromosome, complete genome);
 Tm – температура плавления
Note: region in NZ_CP015515.1 (*Rathayibacter tritici* strain NCP PB 1953 chromosome, complete genome);
 Tm – melting temperature

в течение 48 ч при температуре 25 °C на агаризо-
 ванной среде R2A (Reasoner, Geldreich, 1985), моди-
 фицированной путем добавления 5 г агара на 1 л
 среды (на 1 л среды: 0,5 г пептона, 0,5 г дрожжевого
 экстракта, 0,5 г глюкозы, 0,5 г гидролизата казеина,
 0,3 г пирувата натрия, 0,5 г крахмала, 0,3 г K₂HPO₄,
 0,024 г MgSO₄ x 7H₂O, 23 г агара).
 Выделение ДНК проводили при помощи на-
 бора «Проба-ГС», (ООО «Агродиагностика», Россия)
 в соответствии с инструкцией производителя. Те-
 стирование каждого штамма проводили в трех-
 кратной повторности.
 Видовую принадлежность каждого штамма
R. tritici предварительно подтверждали при помо-
 щи классической ПЦР Rt-5F/Rt-5R (Baek et al., 2018)
 и последующего секвенирования по Сэнгеру.

The original article did not provide information
 on the dyes/ fluorescence extinguishers used, so for
 the 5'-3' ends of the BTRITP1 probe, a standard modi-
 fication of the 6FAM/BHQ1 dyes was used, which is
 most widely available in the Russian Federation (Vo-
 ronov et al., 2024). The gC composition, expressed
 in %, and the melting temperature (Tm) were de-
 termined using the OligoCalc software (Oligo Calc);
 Table 4 shows the Tm parameters adjusted for salt
 concentration. Oligonucleotide synthesis was carried
 out at Evrogen (Russia).

Последовательности олигонуклеотидов использованы в соответствии с источником (Postnikova et al., 2017). Регион расположения олигонуклеотида в NZ_CP015515.1 (*Rathayibacter tritici* strain NCPPB 1953 chromosome, complete genome) определяли, используя программу Ugene (Unipro UGENE software).

В оригинальной статье отсутствовали сведения об использованных красителях/гасителях флуоресценции, поэтому для участков 5'-3'-концов зонда BTRITP1 использовали стандартную модификацию красителей 6FAM/BNQ1, наиболее доступную на территории РФ (Воронов и др., 2024). GC-состав, выраженный в %, и температуру плавления (Tm) определяли в программе Олиго Кальк (Олиго Кальк); в табл. 4 приведены параметры Tm с корректировкой по концентрации солей. Синтез олигонуклеотидов осуществляли в ЗАО «Евроген» (Россия).

Состав реакционной смеси и условия амплификации представлены в табл. 4.

ПЦР-РВ проводили на детектирующем амплификаторе «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия).

Инклюзивность рассчитывали как отношение положительных результатов при тестировании штаммов *R. tritici* к общему числу проведенных реакций, выраженное в процентах. Эксклюзивность рассчитывали как отношение отрицательных результатов при тестировании штаммов бактерий, не относящихся к виду *R. tritici*, к общему числу проведенных реакций, выраженное в процентах (EPPO PM 7/98 (3), 2018).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристики использованных олигонуклеотидов в тестах ПЦР-РВ BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 (Postnikova et al., 2017) представлены в табл. 5.

Первичная проверка олигонуклеотидов в программе Ugene (Unipro UGENE software) позволила провести ПЦР *in silico*. Все последовательности олигонуклеотидов, кроме BTRITF1, были найдены в NZ_CP015515.1. Последовательность олигонуклеотида BTRITF1, как прямая, так и обратная комплементарная, не была найдена в NZ_CP015515.1. В указанном геноме, в регионе 557244-557256, присутствует последовательность GTACGAGTAATGG длиной 13 п.о., аналогичная части олигонуклеотида BTRITF1. Tm указанной последовательности составляет 38 °C. Анализ положения олигонуклеотидов в NZ_CP015515.1 показал, что длина ПЦР-продукта BTRITF1/BTRITR1 составляет 126 п.о., а BTRITF2/BTRITR2 – 74 п.о.

В результате проведения тестов BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 получены положительные реакции для штаммов

The composition of the reaction mixture and the amplification conditions are presented in Table 4.

Real-time PCR was performed on a DTprime 5M6 detection amplifier (DNA-Technology, Russia).

Inclusivity was calculated as the ratio of positive results when testing *R. tritici* strains to the total number of reactions performed, expressed as a percentage. Exclusivity was calculated as the ratio of negative results when testing non-*R. tritici* bacterial strains to the total number of reactions performed expressed as a percentage (EPPO PM 7/98 (3), 2018).

RESULTS AND DISCUSSION

The characteristics of the oligonucleotides used in the real-time PCR tests BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 (Postnikova et al., 2017) are presented in Table 5.

Primary screening of oligonucleotides in Ugene (Unipro UGENE software) allowed *in silico* PCR to be performed. All oligonucleotide sequences except BTRITF1 were found in NZ_CP015515.1. The BTRITF1 oligonucleotide sequence, both direct and reverse complementary, was not found in NZ_CP015515.1. In the specified genome, in the region 557244-557256, there is a 13 bp sequence gTACGAGTAATGG, similar to a part of the BTRITF1 oligonucleotide. Tm of the specified sequence is 38 °C. Analysis of the position of oligonucleotides in NZ_CP015515.1 showed that the length of the BTRITF1/BTRITR1 PCR product is 126 bp, and BTRITF2/BTRITR2 is 74 bp.

As a result of the BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 tests, positive reactions were obtained for the *R. tritici* strains VNIKR-B-0837T, VNIKR-B-1014, VNIKR-B-1016, VNIKR-B-1017 and VNIKR-B-1018 (see Table 6).

The fluorescence accumulation graphs were specific, and the fluorescence level reached 600 in the

Табл. 6. Результат тестирования ДНК штаммов *Rathayibacter tritici*
Table 6. DNA testing result of *Rathayibacter tritici* strains

Среднее значение Ct, FAM (специфика) и Cy5 (ВПК) и интерпретация результатов ПЦР, полученных на амплификаторе, детектирующем «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия) Average value of Ct, FAM (specificity) and Cy5 (VPK) and interpretation of PCR results obtained on the amplifier detecting "DTprime 5M6" ("DNA-Technology", Russia)					
№ п/п	Номер штамма Strain number	BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1		BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1	
		Ct, FAM	Cy5	Ct, FAM	Cy5
1	VNIKR-B-0837T	24,4	33,1	23,2	32,6
2	VNIKR-B-1014	25,9	32,9	24,2	32,9
3	VNIKR-B-1015	-	33,7	-	33,5
4	VNIKR-B-1016	27,1	33,1	25,6	33,2
5	VNIKR-B-1017	22,7	32,9	21,3	32,7
6	VNIKR-B-1018	23,8	33,1	22,4	32,9

Примечание: Ct – пороговый цикл ПЦР-РВ, ВПК – внутренний положительный контроль

Note: Ct – threshold cycle of real-time PCR, IPC – internal positive control

R. tritici VNIKR-B-0837T, VNIKR-B-1014, VNIKR-B-1016, VNIKR-B-1017 и VNIKR-B-1018 (см. табл. 6).

Графики накопления флуоресценции были специфичными, а уровень флуоресценции достигал значения 600 в тесте BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 (см. рис. 2) и 500 – в тесте BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 (см. рис. 3).

Для одного из штаммов *R. tritici*, VNIKR-B-1015, реакции ПЦР-РВ были отрицательными (см. табл. 6). Для всех остальных штаммов бактерий рода *Rathayibacter*, кроме *R. tritici*, результаты тестов BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 также были отрицательными.

Последовательности, амплифицируемые с праймерами BTRITF1/BTRITR1 и BTRITF2/BTRITR2, расположенные в регионе 557126-557256 и 557129-557203 в NZ_CP015515.1 (*Rathayibacter tritici* strain NCPPB 1953 chromosome, complete genome) соответственно, не имеют сходства с какими-либо другими последовательностями кроме соответствующих регионов NZ_CP015515.1. Исходя из полученных результатов ПЦР-тестирования штаммов *R. tritici* можно сделать вывод о том, что участки геномов этих штаммов частично или полностью гомологичны используемым олигонуклеотидам. Исключение представляет собой штамм VNIKR-B-1015, результаты тестирования которого обеими праймерными системами отрицательны, и это позволяет предположить, что указанный штамм имеет существенное отличие в участке генома, являющегося мишенью ПЦР.

В то же время реакция внутреннего положительного контроля (ВПК), детектируемая по каналу Cy5, показала отсутствие ингибирования ПЦР (см. рис. 4).

Тестирование всех штаммов *R. tritici* с помощью классической ПЦР Rt-5F/Rt-5R (Baek et al., 2018) показало наличие для каждого из них ПЦР-продукта ожидаемой длины 613 п.о., характерной для указанного вида (см. рис. 5).

Результаты ПЦР подтвердили последующим секвенированием по Сэнгеру. Нуклеотидная последовательность всех шести анализируемых штаммов показала 100% гомологии с геномным участком *R. tritici* в BLAST NCBI (BLAST). Как показал анализ с помощью Eugene (Unipro UGENE software), последовательность, амплифицируемая с праймерами Rt-5F/Rt-5R, расположена в регионе 3200539-3201151 в NZ_CP015515.1 (*Rathayibacter tritici* strain NCPPB 1953 chromosome, complete genome). Таким образом, регион, являющийся мишенью ПЦР Rt-5F/Rt-5R, отличается от региона, представляющего собой мишень праймерных систем BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1,

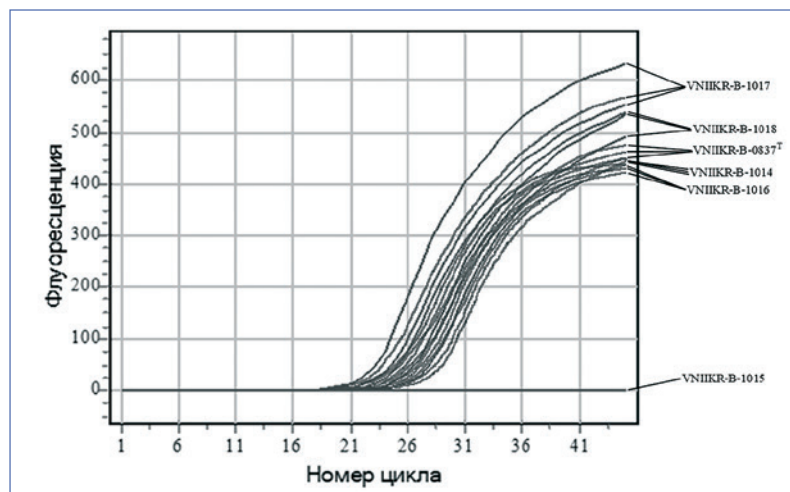


Рис. 2. Зависимость уровня флуоресценции от номера порогового цикла по каналу FAM в результате использования теста BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 на амплификаторе, детектирующем «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия) (ориг.)

Fig. 2. Dependence of the fluorescence level on the threshold cycle number in the FAM channel as a result of using the BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 test on a thermocycler detecting "DTprime 5M6" ("DNA-Technology", Russia) (orig.)

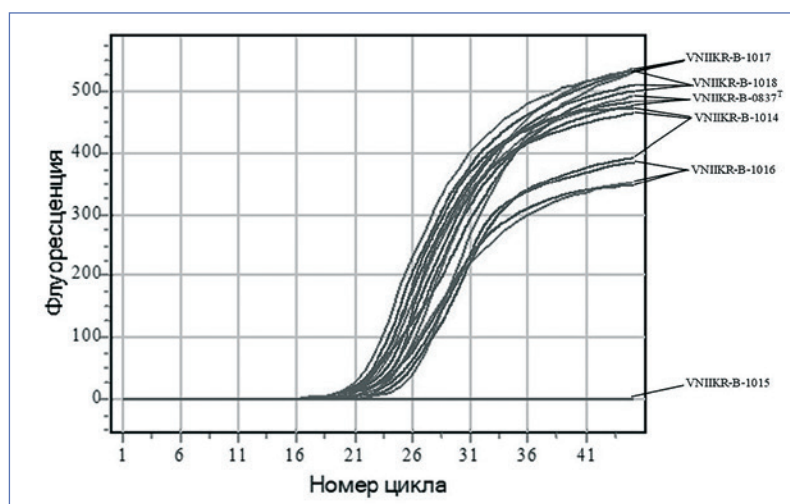


Рис. 3. Зависимость уровня флуоресценции от номера порогового цикла по каналу FAM в результате использования теста BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 на амплификаторе, детектирующем «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия) (ориг.)

Fig. 3. Dependence of the fluorescence level on the threshold cycle number in the FAM channel as a result of using the BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 test on a thermocycler detecting "DTprime 5M6" ("DNA-Technology", Russia) (orig.)

BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 test (see Fig. 2) and 500 in the BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 test (see Fig. 3).

For one of the *R. tritici* strains, VNIKR-B-1015, the real-time PCR reactions were negative (see Table 6). For all other strains of the *Rathayibacter* genus, except *R. tritici*, the results of the BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 tests were also negative.

Sequences amplified with primers BTRITF1/BTRITR1 and BTRITF2/BTRITR2 located in the region 557126-557256 and 557129-557203 in NZ_CP015515.1 (*Rathayibacter tritici* strain NCPPB 1953

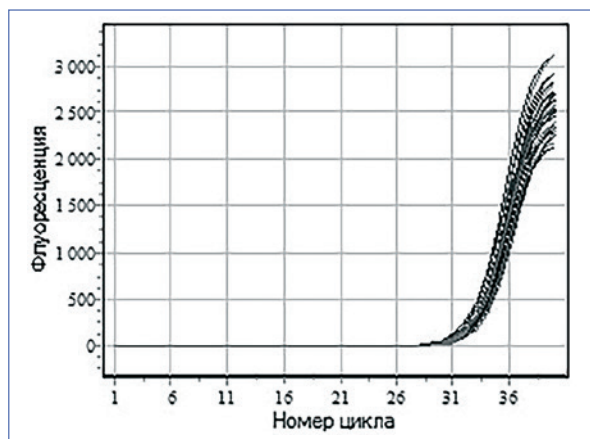


Рис. 4. Зависимость уровня флуоресценции от номера порогового цикла по каналу Cy5 (ВПК) в результате использования тестов BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 со всеми анализируемыми штаммами на амплификаторе, детектирующем «ДТпрайм 5М6» («ДНК-Технология», Россия) (ориг.)

Fig. 4. Dependence of the fluorescence level on the threshold cycle number in the Cy5 channel (IPC) as a result of using the BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 tests with all analyzed strains on a thermocycler detecting "DTprime 5M6" ("DNA-Technology", Russia) (orig.)

и присутствует во всех шести анализируемых штаммах *R. tritici*.

Расчет инклюзивности в соответствии с методикой (ЕППО РМ 7/98 (3), 2018) показал, что ее значение одинаково для обоих тестов и составляет 83,3%. Тесты ПЦР-РВ BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 не позволяют идентифицировать один из шести штаммов целевого объекта – *R. tritici*. В связи с этим, несмотря на высокую эксклюзивность (100%), оба испытанных теста не могут быть использованы в лабораторной диагностике, поскольку в случае их применения достаточно высоким является риск ложноотрицательных результатов и, как следствие, проникновения карантинного фитопатогена на новые территории.

Опыты по определению АЧ в рамках данного исследования не проводились, поскольку тесты BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 определены как неприменимые в результате оценки их АС.

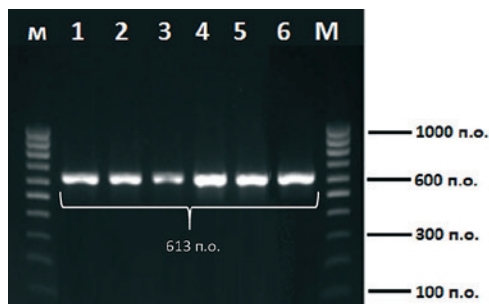


Рис. 5. Электрофореграмма результатов ПЦР-теста Rt-5F/Rt-5R с ДНК штаммов *Rathayibacter tritici* (ориг.): образцы: 1 – VNIKR-B-0837T; 2 – VNIKR-B-1014; 3 – VNIKR-B-1015; 4 – VNIKR-B-1016; 5 – VNIKR-B-1017; 6 – VNIKR-B-1018; M – маркер длин ДНК 100bp DNA Ladder (Eurogen)

Fig. 5. Electropherogram of the results of the Rt-5F/Rt-5R PCR test with DNA of *Rathayibacter tritici* strains (orig.): samples: 1 – VNIKR-B-0837T; 2 – VNIKR-B-1014; 3 – VNIKR-B-1015; 4 – VNIKR-B-1016; 5 – VNIKR-B-1017; 6 – VNIKR-B-1018; M – DNA length marker 100bp DNA Ladder (Eurogen)

chromosome, complete genome), respectively, have no similarity with any other sequences except for the corresponding regions of NZ_CP015515.1. Based on the obtained results of PCR testing of *R. tritici* strains, it can be concluded that the genome regions of these strains are partially or completely homologous to the oligonucleotides used. An exception is strain VNIKR-B-1015, the testing results for which with both primer systems are negative, and this suggests that this strain has a significant difference in the genome region that is the PCR target.

At the same time, the internal positive control (IPC) reaction detected by the Cy5 channel showed no inhibition of PCR (see Fig. 4).

Testing of all *R. tritici* strains using the classical Rt-5F/Rt-5R PCR (Baek et al., 2018) showed the presence of a PCR product of the expected length of 613 bp for each of them, characteristic of this species (see Fig. 5).

The PCR results were confirmed by subsequent Sanger sequencing. The nucleotide sequence of all six analyzed strains showed 100% homology with the genomic region of *R. tritici* in NCBI BLAST (BLAST). As shown by Ugene analysis (Unipro UGENE software), the sequence amplified with primers Rt-5F/Rt-5R is located in the region 3200539-3201151 in NZ_CP015515.1 (*Rathayibacter tritici* strain NCPPB 1953 chromosome, complete genome). Thus, the region targeted by Rt-5F/Rt-5R PCR differs from the region targeted by the BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 primer systems and is present in all six *R. tritici* strains analyzed.

Calculation of inclusiveness in accordance with the methodology (ЕППО РМ 7/98 (3), 2018) showed that its value is the same for both tests and is 83.3%. The real-time PCR tests BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 do not allow identifying one of the six strains of the target object – *R. tritici*. In this regard, despite the high exclusivity (100%), both tested tests cannot be used in laboratory diagnostics, since in the case of their use the risk of false negative results is quite high and, as a result, the introduction of the quarantine pest into new territories.

No experiments to determine the ASen were performed in this study, since the BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 tests were determined to be inapplicable based on their AS assessment.

CONCLUSION

Currently, there are only two real-time PCR tests for identifying the quarantine bacterium, the causative agent of bacterial ear rot of wheat *R. tritici*: BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 (Postnikova et al., 2017). We assessed the applicability of these tests. The study materials were *R. tritici* strains: VNIKR-B-0837^T, VNIKR-B-1014, VNIKR-B-1015, VNIKR-B-1016, VNIKR-B-1017, VNIKR-B-1018, as well as 26 strains of bacteria of the genus *Rathayibacter*, including all existing species within

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент существует только два теста ПЦР-РВ для идентификации карантинной бактерии – возбудителя желтого слизистого бактериоза пшеницы *R. tritici*: BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 (Postnikova et al., 2017). Нами проведена оценка применимости указанных тестов. Материалами исследований являлись штаммы *R. tritici*: VNIKR-B-0837^T, VNIKR-B-1014, VNIKR-B-1015, VNIKR-B-1016, VNIKR-B-1017, VNIKR-B-1018, а также 26 штаммов бактерий рода *Rathayibacter*, включая все существующие виды внутри указанного рода: *R. toxicus*, *R. rathayi*, *R. iranicus*, *R. festucae*, *R. caricis*, *R. oskolensis*, *R. agropyri* и *R. tanacetum*. В результате оценки применимости тестов установлено, что значение инклюзивности – способности теста идентифицировать все многообразие штаммов бактерии внутри вида – для тестов BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 составляет 83,3%. Указанные тесты не позволяют идентифицировать один из шести штаммов *R. tritici*, а именно VNIKR-B-1015 (VKM Ac-2586; ICMP 2624; ICPB CT106; NCTC 6255). Значение эксклюзивности – способности теста отличать целевые штаммы от нецелевых – составило 100% для обоих тестов. Тесты ПЦР-РВ BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 и BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1, несмотря на их высокую эксклюзивность (100%), неприменимы для фитосанитарной диагностики, поскольку не позволяют идентифицировать все многообразие штаммов бактерии внутри вида, а использование этих тестов создает риск получения ложноотрицательных результатов диагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белашапкина О.О., Писарева И.Н. Определение аналитической чувствительности и специфичности методов ПЦР для диагностики черной бактериальной пятнистости томата // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2024. Т. 1. № 3. С. 78–94. doi: 10.26897/0021-342X-2024-3-78-94.
2. Воронов Е.В., Словарева О.Ю., Десятерик А.А., Кондратьев М.О., Игнатов А.Н. Идентификация возбудителя стеблевого меланоза пшеницы *Pseudomonas cichorii* методом ПЦР в режиме «реального времени» // Вестник защиты растений. 2024. Т. 107, № 3. С. 121–129. doi: 10.31993/2308-6459-2024-107-3-16657.
3. Доморацкая Д.А., Игнатъева И.М., Кононова Е.П. Разработка новых диагностических ПЦР-тестов для выявления возбудителя бактериального увядания *Clavibacter insidiosus* // Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве: Сборник докладов III Международной молодежной конференции, Обнинск, 23–24 октября 2024 года. – Издательство НИЦ «Курчатовский институт» – ВНИИРАЭ. 2024. С. 34–36.
4. Каракай М.В., Игнатъева И.М. Опыт внедрения методов ПЦР-диагностики при выявлении и идентификации возбудителя бактериального ожога фасоли *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* // Фитосанитария. Карантин растений. 2024. № S2-1(18). С. 14.
5. Оболенский Р.Р., Словарева О.Ю. Морфологические признаки *Rathayibacter tritici* на питательных

the specified genus: *R. toxicus*, *R. rathayi*, *R. iranicus*, *R. festucae*, *R. caricis*, *R. oskolensis*, *R. agropyri* and *R. tanacetum*. As a result of the assessment of the test applicability, it was found that the inclusiveness value – the ability of the test to identify the entire diversity of bacterial strains within a species – for the BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1 tests was 83.3%. These tests did not allow identification of one of the six *R. tritici* strains, namely VNIKR-B-1015 (VKM Ac-2586; ICMP 2624; ICPB CT106; NCTC 6255). The exclusivity value – the ability of the test to distinguish target strains from non-target ones – was 100% for both tests. The real-time PCR tests BTRITF1/BTRITR1/BTRITP1 and BTRITF2/BTRITR2/BTRITP1, despite their high exclusivity (100%), are not applicable for phytosanitary diagnosis, since they do not allow identifying the entire diversity of bacterial strains within a species, and the use of these tests creates the risk of obtaining false negative diagnostic results.

REFERENCES

1. Beloshapkina O.O., Pisareva I.N. Determination of the analytical sensitivity and specificity of PCR methods for the diagnosis of bacterial spot of tomato [Opredeleniye analiticheskoy chuvstvitel'nosti i spetsifichnosti metodov PTSR dlya diagnostiki chernoy bakterial'noy pyatnistosti tomata] // Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy. 2024; 1(3): 78–94. doi: 10.26897/0021-342X-2024-3-78-94. (In Russ.)
2. Voronov E.V., Slovareva O.Y., Desyaterik A.A., Kondratiev M.O., Ignatov A.N. Identification of stem melanosis of wheat (*Pseudomonas cichorii*) by the real-time PCR method // Plant Protection News (Vestnik Zashchity Rasteniy). 2024; 107(3): 121–129. doi: 10.31993/2308-6459-2024-107-3-16657. (In Russ.)
3. Domoratskaya D.A., Ignatyeva I.M., Kononova E.P. New diagnostic PCR-tests for bacterial wilt of lucerne *Clavibacter insidiosus* detection // genetic and radiation technologies in agriculture: Collection of reports of the III International youth conference, Obninsk, October 23–24, 2024. – Publishing house of the National Research Center “Kurchatov Institute” – VNIIRAE. 2024. P. 34–36. (In Russ.)
4. Karakay M.V., Ignatieva I.M. An experience of PCR diagnostics methods introduction in searching and identification of *Xanthomonas Axonopodis* pv. *Phaseoli*, the causative agent of common bacterial blight of bean // Plant Health and Quarantine. 2024; S2-1(18): 14. (In Russ.)
5. Obolensky R.R., Slovareva O.Y. *Rathayibacter tritici* morphological features on nutrient media NBY, YPGA and R2A // Plant Health and Quarantine. 2024; S2-1(18): 18. (In Russ.)
6. Prikhodko S.I., Pisareva I.N., Kornev K.P., Bondarenko G.N., Valeeva N.G., Radionovskaya Y.E. Isolation protocol trials for grapevine bacteriosis (Pierce's disease) agent *Xylella fastidiosa* Wells et al. during research monitoring of the Republic of Crimea. *Horticulture and viticulture*. 2021; (1):39-47. doi: 10.31676/0235-2591-2021-1-39-47. (In Russ.)

средах NBY, YPGA и R2A // Фитосанитария. Карантин растений. 2024. № S2-1(18). С. 18.

6. Приходько С.И., Писарева И.Н., Корнев К.П., Бондаренко Г.Н., Валеева Н.Г., Радионовская Я.Э. Апробация различных методик выделения возбудителя бактериоза винограда (болезнь Пирса) *Xylella fastidiosa* Wells et al. в ходе научно-исследовательского мониторинга в условиях Республики Крым // Садоводство и виноградарство. 2021. № 1. С. 39–47. doi: 10.31676/0235-2591-2021-1-39-47.

7. Словарева О.Ю. Анализ производства и экспорта российского зерна и составление перечня регулируемых фитосанитарными требованиями стран-импортеров возбудителей бактериозов зерновых культур // Аграрный вестник Северного Кавказа. 2023. № 3(51). С. 47–54. doi: 10.31279/2949-4796-2023-3-51-47-54.

8. Словарева О.Ю., Трунов В.В., Присяжная Н.В., Дорофеева Л.В. Новые актинобактерии рода *Rathayibacter* из агробиocenозов регионов Российской Федерации // Фитосанитария. Карантин растений. 2024. № S2-1(18). С. 23.

9. Словарева О.Ю., Корнев К.П. Определение аналитической специфичности методов ПЦР для идентификации *Acidovorax citrulli* // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2020. № 51. С. 25–45. doi: 10.17223/19988591/51/2.

10. Тараканов Р.И., Игнатъева И.М., Белoshapkina O.O., Чебаненко С.И., Каратаева О.Г., Джалилов Ф.С. Выявление возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в семенах методом ПЦР // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2024. № 1. – С. 41–52. doi: 10.26897/0021-342X-2024-1-41-52.

11. Шашков А.С., Тульская Е.М., Стрешинская Г.М., Дмитренко А.С., Потехина Н.В., Сенченкова С.Н., Пискунова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Рамноманнаны и теихуроновая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603T // Биохимия. 2020. Т. 85. № 3. С. 428–437. doi: 10.31857/S0320972520030124.

12. Обновленные фитосанитарные требования Бангладеша 2015 г. / Россельхознадзор. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. URL: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/fsvps-docs/ru/importExport/bangladesh/files/phyto_requirements_bangladesh.pdf (дата обращения: 10.01.2025).

13. Олиго Кальк: программа для расчета свойств олигонуклеотидов (праймеров). URL: <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html> (дата обращения: 03.04.2023).

14. Перечень вредных организмов карантинного значения для Республики Узбекистан / Россельхознадзор. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. URL: https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/files/ehksport-import/uzbekistan/aktualnyy_perechen_vrednyh_organizmov_karantinnogo_znacheniya_dlya_respubliki_uzbekistan.pdf.

15. Перечень вредных организмов, ввоз и распространение которых в Республике Молдова запрещен / Россельхознадзор. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. URL: https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/fsvps-docs/ru/importExport/moldova/files/entity_denied.pdf.

7. Slovareva O. Y. Production, export and import of cereals and compilation of a list of phytopathogenic bacteria associated with them // Agrarian Bulletin of the North Caucasus. 2023; 3(51): 47–54. doi: 10.31279/2949-4796-2023-3-51-47-54. (In Russ.)

8. Slovareva O.Y., Trunov V.V., Prisyazhnaya N.V., Dorofeeva L.V. New actinobacteria of the genus *Rathayibacter* from agrobiocenoses of regions of the Russian Federation // Plant Health and Quarantine. 2024; S2-1(18): 23. (In Russ.)

9. Slovareva O.Y., Kornev K.P. Determination of analytical specificity of PCR methods for *Acidovorax citrulli* identification. Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology. 2020; 51:25-45. doi: 10.17223/19988591/51/2. (In Russ.)

10. Tarakanov R.I., Ignatyeva I.M., Beloshapkina O.O., Chebanenko S.I., Karataeva O.G., Dzhililov F.S. Detection of the soybean bacterial blight pathogen *Pseudomonas Savastanoi* pv. *glycinea* in seeds by the PCR method // Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy. 2024; 1: 41–52. doi: 10.26897/0021-342X-2024-1-41-52. (In Russ.)

11. Shashkov A.S., Tulskeya E.M., Streshinskaya g.M., Dmitrenyuk A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Piskunova N.F., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Rhamnomannans and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac 1603^T // Biochemistry. 2020; 85(3): 428–437. doi: 10.31857/S0320972520030124. (In Russ.)

12. Updated phytosanitary requirements of Bangladesh 2015 / Rosselkhoz nadzor. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. URL: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/fsvps-docs/ru/importExport/bangladesh/files/phyto_requirements_bangladesh.pdf (last accessed: 10.01.2025).

13. Oligo Calc: a program for calculating the properties of oligonucleotides (primers). URL: <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html> (last accessed: 03.04.2023).

14. List of quarantine pests for the Republic of Uzbekistan / Rosselkhoz nadzor. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. URL: https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/files/ehksport-import/uzbekistan/aktualnyy_perechen_vrednyh_organizmov_karantinnogo_znacheniya_dlya_respubliki_uzbekistan.pdf.

15. List of pests prohibited for the import and distribution in the Republic of Moldova / Rosselkhoz nadzor. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. URL: https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/fsvps-docs/ru/importExport/moldova/files/entity_denied.pdf.

16. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 30, 2016 No. 158 “On approval of a Common list of quarantine pests of the Eurasian Economic Union” (with amendments and additions). URL: <https://base.garant.ru/71623912/>.

17. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 30, 2016 No. 157

16. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. N 158 «Об утверждении единого перечня карантинных объектов Евразийского экономического союза» (с изменениями и дополнениями). URL: <https://base.garant.ru/71623912/>.

17. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. N 157 «Об утверждении Единых карантинных фитосанитарных требований, предъявляемых к подкарантинной продукции и подкарантинным объектам на таможенной границе и на таможенной территории Евразийского экономического союза» (с изменениями и дополнениями). URL: (<https://fsvps.gov.ru/files/reshenie-soveta-evrazijskoj-jekonomich-6/>).

18. Baek K.Y., Lee H.H., Son G.J., Lee P.A., Roy N., Seo Y.S., Lee S.W. Specific and Sensitive Primers Developed by Comparative Genomics to Detect Bacterial Pathogens in Grains // The Plant Pathology Journal. 2018. Vol. 34(2). P. 104-112. doi: 10.5423/PPJ.OA.11.2017.0250.

19. EPPO. PM 7/76 (5) Use of EPPO diagnostic standards // EPPO Bulletin. – 2018. – Т. 48. – P. 373–377

20. Gupta P., Swarup G. Ear-cockle and yellow ear rot disease of wheat. II. Nematode bacterial association. Nematologia. 1972. Vol. 18. P. 320–324.

21. Ignatyeva I.M., Karimova E.V., Prikhodko S.I. Diagnostics of the bacterial blight pathogen of bean *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in plant and seed material of grain legumes using molecular genetics methods // AIP Conference Proceedings: 4th International Conference on Modern Synthetic Methodologies for Creating Drugs and Functional Materials, MOSM 2020, Yekaterinburg, 16-20 November 2020. Vol. 2388, Issue 1. – American Institute of Physics Inc.: American Institute of Physics Inc. 2021. P. 030014. doi: 10.1063/5.0068504.

22. Murray T.D., Schroeder B.K., Schneider W.L., Luster D.G., Sechler A., Rogers E.E., Subbotin S.A. *Rathayibacter toxicus*, Other *Rathayibacter* Species Inducing Bacterial Head Blight of Grasses, and the Potential for Livestock Poisonings // Phytopathology. 2017. Vol. 107(7). P. 804-815. doi: 10.1094/PHYTO-02-17-0047-RVW.

23. Muvingi M., Slovareva O.Y., Ruberts V.S., Igonin V.N. Detection and identification of *Rathayibacter tritici* in Russian grain crop survey // 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. doi: 10.48397/ARRIAB.2020.20.095.

24. Park J., Lee P.A., Lee H.H., Choi K., Lee S.W., Seo Y.S. Comparative Genome Analysis of *Rathayibacter tritici* NCPPB 1953 with *Rathayibacter toxicus* Strains Can Facilitate Studies on Mechanisms of Nematode Association and Host Infection // The Plant Pathology Journal. 2017. Vol. 33(4). P. 370-381. doi: 10.5423/PPJ.OA.01.2017.0017.

25. Paruthi I. J., Mohinder Singh M. S., Gupta D. C. Quantitative and qualitative losses in wheat grains due to 'earcockle' and 'tundu'. – 1987.

26. Postnikova E., Agarkova I.V., Schneider W.L., Sechler A.J., Riley I.T. CHAPTER 15: Detection of

“On approval of the Common Quarantine Phytosanitary Requirements for Regulated Articles and Quarantine Pests at the Customs Border and on the Customs Territory of the Eurasian Economic Union” (with amendments and additions). URL: (<https://fsvps.gov.ru/files/reshenie-soveta-evrazijskoj-jekonomich-6/>).

18. Baek K.Y., Lee H.H., Son G.J., Lee P.A., Roy N., Seo Y.S., Lee S.W. Specific and Sensitive Primers Developed by Comparative genomics to Detect Bacterial Pathogens in grains // The Plant Pathology Journal. 2018. Vol. 34(2). P. 104-112. doi: 10.5423/PPJ.OA.11.2017.0250.

19. EPPO. PM 7/76 (5) Use of EPPO diagnostic standards // EPPO Bulletin. – 2018. – Т. 48. – P. 373–377

20. Gupta P., Swarup G. Ear-cockle and yellow ear rot disease of wheat. II. Nematode bacterial association. Nematologia. 1972. Vol. 18. P. 320–324.

21. Ignatyeva I.M., Karimova E.V., Prikhodko S.I. Diagnostics of the bacterial blight pathogen of bean *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in plant and seed material of grain legumes using molecular genetics methods // AIP Conference Proceedings: 4th International Conference on Modern Synthetic Methodologies for Creating Drugs and Functional Materials, MOSM 2020, Yekaterinburg, 16-20 November 2020. Vol. 2388, Issue 1. – American Institute of Physics Inc.: American Institute of Physics Inc. 2021. P. 030014. doi: 10.1063/5.0068504.

22. Murray T.D., Schroeder B.K., Schneider W.L., Luster D.G., Sechler A., Rogers E.E., Subbotin S.A. *Rathayibacter toxicus*, Other *Rathayibacter* Species Inducing Bacterial Head Blight of grasses, and the Potential for Livestock Poisonings // Phytopathology. 2017. Vol. 107(7). P. 804-815. doi: 10.1094/PHYTO-02-17-0047-RVW.

23. Muvingi M., Slovareva O.Y., Ruberts V.S., Igonin V.N. Detection and identification of *Rathayibacter tritici* in Russian grain crop survey // Biotechnology in plant growing, 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 Budgetary Scientific Institution “All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology”. 2020. P. 158–159. doi: 10.48397/ARRIAB.2020.20.095.

24. Park J., Lee P.A., Lee H.H., Choi K., Lee S.W., Seo Y.S. Comparative genome Analysis of *Rathayibacter tritici* NCPPB 1953 with *Rathayibacter toxicus* Strains Can Facilitate Studies on Mechanisms of Nematode Association and Host Infection // The Plant Pathology Journal. 2017. Vol. 33(4). P. 370-381. doi: 10.5423/PPJ.OA.01.2017.0017.

25. Paruthi I. J., Mohinder Singh M. S., Gupta D. C. Quantitative and qualitative losses in wheat grains due to 'earcockle' and 'tundu'. – 1987.

26. Postnikova E., Agarkova I.V., Schneider W.L., Sechler A.J., Riley I.T. CHAPTER 15: Detection of *Rathayibacter* spp. in Seeds of Cereals and grasses // Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. – The American Phytopathological Society. 2017. P. 95-101.

Rathayibacter spp. in Seeds of Cereals and Grasses // Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. – The American Phytopathological Society. 2017. P. 95–101.

27. PM 7/60 (2) *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2016. № 46(2). P. 226–236.

28. PM 7/98 (3) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity // EPPO Bulletin. 2018. Vol. 48(3). P. 387–404. doi: 10.1111/epp.12508.

29. Reasoner D.J., Geldreich E.E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water // Applied and Environmental Microbiology. 1985. Vol. 49(1). P. 1–7. doi: 10.1128/aem.49.1.1-7.1985.

30. Sabet A.K. On the host range and systematic position of the bacteria responsible for the yellow slime diseases of wheat (*Triticum vulgare* Vill.) and cocksfoot grass (*L. Dactylis glomerata*) // Annals of Applied Biology. 1954. Vol. 41. P. 606–611.

31. Starodumova I.P., Dorofeeva L. V., Prisyazhnaya N.V., Tarlachkov S.V., Vasilenko O.V., Avtukh A.N., Ospennikov Y.V., Subbotin S.A., Evtushenko L.I. *Rathayibacter tanacetii* sp. nov., a Novel Actinobacterium from Tanacetum vulgare Infested by Foliar Nematode Aphelenchoides sp. // Current Microbiology. 2024. Vol. 81. P. 123. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03643-7>.

32. Zgurskaya H.I., Evtushenko L.I., Akimov V.N., Kalakoutskii L.V. *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranici* comb. nov., and six strains from annual grasses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1993. Vol. 43. P. 143–149. doi: 10.1099/00207713-43-1-143.

33. BLAST. Basic Local Alignment Search Tool [Electronic resource]. – Access mode: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (date of access: 05.12.2024).

34. *Rathayibacter tritici* strain NCPPB 1953 chromosome, complete genome / NCBI. The National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1056838566> (дата обращения 01.11.2024).

35. Unipro UGENE software / URL: <https://ugene.net/ru/download-all.html> (last accessed: 04.01.2025).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Оболенский Роман Романович, младший научный сотрудник научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; ORCID 0009-0001-5462-4199, e-mail: 7812romalist@mail.ru

Словарева Ольга Юрьевна, старший научный сотрудник – и. о. начальника научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-6022-5955, e-mail: slovareva.olga@gmail.com

Дорофеева Любовь Владимировна, старший научный сотрудник сектора актиномицетов ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН), Пущино, Россия; ORCID 0000-0002-9486-3389, e-mail: dekabr28@rambler.ru

27. PM 7/60 (2) *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2016. № 46(2). P. 226–236.

28. PM 7/98 (3) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity // EPPO Bulletin. 2018. Vol. 48(3). P. 387–404. doi: 10.1111/epp.12508.

29. Reasoner D.J., geldreich E.E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water // Applied and Environmental Microbiology. 1985. Vol. 49(1). P. 1–7. doi: 10.1128/aem.49.1.1-7.1985.

30. Sabet A.K. On the host range and systematic position of the bacteria responsible for the yellow slime diseases of wheat (*Triticum vulgare* Vill.) and cocksfoot grass (*L. Dactylis glomerata*) // Annals of Applied Biology. 1954. Vol. 41. P. 606–611.

31. Starodumova I.P., Dorofeeva L. V., Prisyazhnaya N.V., Tarlachkov S.V., Vasilenko O.V., Avtukh A.N., Ospennikov Y.V., Subbotin S.A., Evtushenko L.I. *Rathayibacter tanacetii* sp. nov., a Novel Actinobacterium from Tanacetum vulgare Infested by Foliar Nematode Aphelenchoides sp. // Current Microbiology. 2024. Vol. 81. P. 123. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03643-7>.

32. Zgurskaya H.I., Evtushenko L.I., Akimov V.N., Kalakoutskii L.V. *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranici* comb. nov., and six strains from annual grasses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1993. Vol. 43. P. 143–149. doi: 10.1099/00207713-43-1-143.

33. BLAST. Basic Local Alignment Search Tool [Electronic resource]. – Access mode: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (date of access: 05.12.2024).

34. *Rathayibacter tritici* strain NCPPB 1953 chromosome, complete genome / NCBI. The National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1056838566> (date of access 01.11.2024).

35. Unipro UGENE software / URL: <https://ugene.net/ru/download-all.html> (last accessed: 04.01.2025).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Roman Obolensky, Junior Researcher, Research and Methodology Department of Bacteriology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0009-0001-5462-4199, e-mail: 7812romalist@mail.ru

Olga Slovareva, Senior Researcher – Acting Head of Research and Methodology Department of Bacteriology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-6022-5955, e-mail: slovareva.olga@gmail.com

Liubov Dorofeeva, Senior Researcher, Actinomycetes Sector, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences” (G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences), Pushchino, Russia; ORCID 0000-0002-9486-3389, e-mail: dekabr28@rambler.ru