

Разработка новых ПЦР-тестов для диагностики возбудителя черного бактериоза зерновых культур *Xanthomonas translucens*

О.Ю. СЛОВАРЕВА¹, Е.В. СТАРИКОВА^{1,2},
М. МУВИНГИ³

¹ ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская область, Россия

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ «ФНКЦ ФХМ ФМБА России»), г. Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО «РУДН»), г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

² ORCID 0000-0001-6582-210X,
e-mail: hed.robin@gmail.com

³ ORCID 0000-0001-7700-1296,
e-mail: mufaromuvingi@gmail.com

АННОТАЦИЯ

С целью разработки ПЦР-тестов, позволяющих идентифицировать значимый для экспорта российской зерновой продукции фитопатоген *Xanthomonas translucens*, был произведен поиск подходящей ПЦР-мишени. В результате биоинформатического анализа аннотированных белков, соответствующих кодирующим последовательностям 10 геномных сборок целевой бактерии – *Xanthomonas translucens* – и 161 геномной сборки 25 других видов бактерий рода *Xanthomonas*, загруженным из NCBI GenBank в марте 2020 г., обнаружили 6 участков генома, специфичных для *Xanthomonas translucens* и подходящих для использования в качестве ПЦР-мишени. Нуклеотидные последовательности этих генов использовали для разработки праймеров.

Для найденных последовательностей разработано 12 пар праймеров – 1F8/1R8, 1F10/1R10, 2F6/2R6, 3F3/3R3, 3F5/3R5, 3F9/3R9, 4F1/4R1, 4F3/4R3, 5F3/5R3, 5F6/5R6, 6F6/6R6 и 6F10/6R10, видоспецифичность которых в ходе исследования апробирована с 35 штаммами бактерий рода *Xanthomonas*, включая *Xanthomonas translucens*. Анализ результатов проведенной ПЦР и выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР с помощью алгоритма BLAST на базе NCBI показал, что пары праймеров 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 и 6F10/6R10 являются пригодными для их применения в диагностике возбудителя черного бактериоза зерновых культур *Xanthomonas translucens*. Новые ПЦР-тесты могут стать

Development of new PCR tests for diagnostics of the agent of bacterial leaf streak of wheat *Xanthomonas translucens*

O.YU. SLOVAREVA¹, E.V. STARIKOVA^{1,2},
M. MUVINGI³

¹ FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

² FGBU "Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine Federal Medical Biological Agency" (FGBU "SRI PCM FMBA of Russia"), Moscow, Russia

³ FGAOU VO "Peoples' Friendship University of Russia" (FGAOU VO "RUDN"), Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

² ORCID 0000-0001-6582-210X,
e-mail: hed.robin@gmail.com

³ ORCID 0000-0001-7700-1296,
e-mail: mufaromuvingi@gmail.com

ABSTRACT

In order to develop PCR tests that allow identifying the phytopathogen *Xanthomonas translucens*, which is significant for the export of Russian grain products, a search was made for a suitable PCR target. As a result of bioinformatic analysis of annotated proteins corresponding to the coding sequences of 10 genomic assemblies of the target bacterium – *Xanthomonas translucens* – and 161 genomic assemblies of 25 other species of bacteria of the genus *Xanthomonas*, downloaded from NCBI GenBank in March 2020, 6 genome regions specific for *Xanthomonas translucens* and suitable for use as a PCR target. The nucleotide sequences of these genes were used to design primers.

For the discovered sequences, 12 pairs of primers were developed – 1F8/1R8, 1F10/1R10, 2F6/2R6, 3F3/3R3, 3F5/3R5, 3F9/3R9, 4F1/4R1, 4F3/4R3, 5F3/5R3, 5F6/5R6, 6F6/6R6 and 6F10/6R10, the species-specificity of which was tested in the course of the study with 35 strains of bacteria of the genus *Xanthomonas*, including *Xanthomonas translucens*. Analysis of the results of the PCR performed and the alignment of the obtained nucleotide sequences of the PCR products using the BLAST algorithm based on the NCBI showed that the primer pairs 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6, and 6F10/6R10 are suitable for their use in the diagnosis of the pathogen causing bacterial leaf

частью решения проблемы установления фитосанитарного состояния партий российской продукции зерна, а также позволят проводить обследование территорий Российской Федерации и досмотр партий подкарантинной продукции.

Ключевые слова. Экспорт зерна, карантин растений, фитосанитарные требования, ПЦР, диагностика бактериозов зерновых культур, биоинформатический геномный анализ, скрипт на Python, секвенирование.

ВВЕДЕНИЕ

Зерно и изготавливаемые из него продукты являются одними из основных источников питания населения в России (<https://rosstat.gov.ru>, 2021) и в мире (Каменева, 2018). В течение последних 10 лет Россия входит в тройку крупнейших мировых экспортеров продукции зерновых культур, в частности пшеницы и ячменя (<https://www.exportcenter.ru/>, 2021). Вместе с тем экспорт зерна является основной статьей продовольственного бизнеса в России (Slovareva, 2020). Импортеры российского зерна предъявляют к качеству ввозимой продукции ряд требований, в том числе к ее фитосанитарному состоянию. Карантинные перечни ряда стран – импортеров российской продукции зерновых культур содержат возбудителей бактериозов, в частности *Xanthomonas translucens*. Согласно литературным источникам, бактерии вида *X. translucens* распространены на территории Российской Федерации (Slovareva, 2020; <https://gd.eppo.int>, 2021). Вид *X. translucens* по отношению к растениям-хозяевам разделен на патовары, все патовары при этом являются серьезной угрозой для производства зерновых культур (Sapkota et al., 2020).

В требования стран-импортеров вошли 4 патовара (табл. 1) (http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966841778_phyto_vred_nigeria.pdf, 2021; http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966741302_phyto_requirements_egypt.pdf, 2021; <https://gd.eppo.int>, 2021).

X. translucens pv. *translucens*, возбудитель черного бактериоза ячменя, поражает, кроме ячменя, пшеницу и рожь, а также луговые злаковые травы.

X. translucens pv. *graminis*, возбудитель бактериального увядания зерновых культур, поражает злаки, включая пшеницу, рожь и ячмень.

X. translucens pv. *cerealis*, возбудитель черного бактериоза ржи, поражает пшеницу, рожь, ячмень и овес.

X. translucens pv. *undulosa*, возбудитель черного бактериоза пшеницы, поражает пшеницу и ячмень (Sharma et al., 2019; Ledman, 2020).

Объем экспорта российского зерна по коду ТН ВЭД 1001 (пшеница и меслин) в Египет составил за период 2018–2020 гг. в среднем 8 млн тонн в год, в Иорданию – 112 тыс. тонн, в Турцию – 6 млн тонн, в Марокко – 500 тыс. тонн, в Нигерию – 1,5 млн тонн. В Мексику поставлено 994 тыс. тонн зерна по

streak of wheat, *Xanthomonas translucens*. New PCR tests can become part of the solution to the problem of establishing the phytosanitary state of consignments of Russian grain products, and will also make it possible to inspect the territories of the Russian Federation and inspect consignments of regulated products.

Keywords. Grain export, plant quarantine, phytosanitary requirements, PCR, diagnostics of bacterial leaf streak of wheat, bioinformatic genomic analysis, Python script, sequencing.

INTRODUCTION

Grain and grain products are one of the main sources of nutrition for the population in Russia (<https://rosstat.gov.ru>, 2021) and in the world (Kameneva, 2018). Over the past 10 years, Russia has been one of the three largest world exporters of cereal products, in particular wheat and barley (<https://www.exportcenter.ru/>, 2021). At the same time, grain export is the main item of the food business in Russia (Slovareva, 2020). Importers of Russian grain impose a number of requirements on the quality of imported products, including their phytosanitary condition. Quarantine lists of some countries importing Russian grain products contain bacteriosis pathogens, in particular *Xanthomonas translucens*. According to academic papers, bacteria of the species *X. translucens* are widespread in the territory of the Russian Federation (Slovareva, 2020; <https://gd.eppo.int>, 2021). The species *X. translucens* in relation to host plants is divided into pathovars, while all pathovars are a serious threat to the production of grain crops (Sapkota et al., 2020).

The requirements of the importing countries include 4 pathovars (Table 1) (http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966841778_phyto_vred_nigeria.pdf, 2021; http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966741302_phyto_requirements_egypt.pdf, 2021; <https://gd.eppo.int>, 2021).

X. translucens pv. *translucens*, bacterial leaf streak of barley, apart from barley, infects wheat and rye, as well as meadow grasses.

X. translucens pv. *graminis*, bacterial wilt of grasses, infects cereals, including wheat, rye and barley.

X. translucens pv. *cerealis*, bacterial streak of grasses, infects wheat, rye, barley and oats.

X. translucens pv. *undulosa*, bacterial leaf streak of wheat, infects wheat and barley (Sharma et al., 2019; Ledman, 2020).

Over the period of 2018–2020, the export volume of Russian grain under the TN VED 1001 code (wheat and meslin) to Egypt amounted to 8 million tons per year, on average, to Jordan 112 thousand tons, to Turkey – 6 million tons, Morocco – 500 thousand tons, to Nigeria – 1.5 million tons. 994 thousand tons of grain were delivered to Mexico under the TN VED 1001 code in 2018 and 99 tons in 2019 (<https://rosstat.gov.ru>).

коду ТН ВЭД 1001 в 2018 г. и 99 тонн в 2019 г. (<https://rosstat.gov.ru>). Данные показывают, что Российская Федерация экспортирует зерно в страны, для которых отсутствие *X. translucens* в продукции является обязательным.

В то же время методики идентификации *X. translucens* отсутствуют, а методы идентификации сводятся либо к классическому микробиологическому анализу, не дающему возможность достоверно провести идентификацию даже до вида, либо к геномному анализу, требующему специализированного оборудования и навыков.

В связи с потребностью в обеспечении соответствия фитосанитарного состояния российской продукции зерновых культур требованиям стран-импортеров проведено исследование, целью которого являлась разработка методов ПЦР для идентификации *X. translucens*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Одной из основных и наиболее сложных задач при разработке диагностических методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) являлся поиск нуклеотидной последовательности,

The data show that the Russian Federation exports grain to countries for which the absence of *X. translucens* in production is mandatory.

At the same time, there are no identification methods for *X. translucens*, and identification methods are reduced either to classical microbiological analysis, which does not make it possible to reliably carry out identification even to a species, or to genomic analysis, which requires specialized equipment and skills.

Due to the need to ensure the compliance of the phytosanitary state of Russian grain products with the requirements of importing countries, a study was carried out to develop PCR methods for the identification of *X. translucens*.

MATERIALS AND METHODS

One of the main and most difficult tasks in the development of diagnostic methods based on polymerase chain reaction (PCR) was the search for a nucleotide sequence corresponding to a region of the *Xanthomonas translucens* genome and suitable for its use as a PCR target.

To search for targets, we used annotated proteins corresponding to the coding sequences of 10 genomic

Таблица 1

Фитосанитарный статус патогенов *Xanthomonas translucens* для стран – импортеров российской продукции зерновых культур

Название бактерии	Страна-импортер	Фитосанитарный статус
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>translucens</i>	Египет	Отсутствующий карантинный организм
	Чили	
	Иордания	Ограниченно распространенный карантинный организм
	Турция	
	Марокко	Карантинный организм
	Тунис	
	Нигерия	Запрещен к ввозу на территорию Нигерии
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i>	Южная Африка	Отсутствующий карантинный организм
	Бразилия	
	Израиль	Карантинный организм
	Египет	Включен в фитосанитарные требования Египта
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>cerealis</i>	Мексика	Карантинный организм
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	Нигерия	Карантинный организм

Table 1

Phytosanitary status of pathogens *Xanthomonas translucens* for countries importing Russian grain products

Name of bacteria	Importing country	Phytosanitary status
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>translucens</i>	Egypt	Absent quarantine organism
	Chile	
	Jordan	Limitedly present quarantine organism
	Turkey	
	Morocco	Quarantine organism
	Tunisia	
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i>	Nigeria	Prohibited from import into Nigeria
	South Africa	Absent quarantine organism
	Brazil	
	Israel	Quarantine organism
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>cerealis</i>	Egypt	Included in the phytosanitary requirements of Egypt
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>cerealis</i>	Mexico	Quarantine organism
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	Nigeria	Quarantine organism

Таблица 2

Геномные сборки штаммов *Xanthomonas translucens* из NCBI RefSeq, использованные для поиска мишеней

№ п/п	Использованные геномные сборки	Штамм	№ п/п	Использованные геномные сборки	Штамм
1	GCF_000313775.1	ART-Xtg29	6	GCF_001269865.1	CFBP 2053
2	GCF_000331775.1	DSM 18974	7	GCF_001282765.1	LMG728
3	GCF_000334075.1	DAR61454	8	GCF_001282805.1	LMG727
4	GCF_000807145.1	CFBP 2541	9	GCF_001282885.1	LMG730
5	GCF_001021935.1	Xtu 4699	10	GCF_001455815.1	XT123

Описание штаммов, указанных в таблице 2, доступно по ссылке: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.

Table 2

Genomic assemblies of *Xanthomonas translucens* strains from NCBI RefSeq used for target search

№	Genomic assemblies used	Strain	№	Genomic assemblies used	Strain
1	GCF_000313775.1	ART-Xtg29	6	GCF_001269865.1	CFBP 2053
2	GCF_000331775.1	DSM 18974	7	GCF_001282765.1	LMG728
3	GCF_000334075.1	DAR61454	8	GCF_001282805.1	LMG727
4	GCF_000807145.1	CFBP 2541	9	GCF_001282885.1	LMG730
5	GCF_001021935.1	Xtu 4699	10	GCF_001455815.1	XT123

The description of the strains indicated in Table 2 is available here: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.

соответствующей участку генома *Xanthomonas translucens* и подходящей для ее использования в качестве ПЦР-мишени.

Для поиска мишеней использовали аннотированные белки, соответствующие кодирующим последовательностям 10 геномных сборок целевой бактерии – *Xanthomonas translucens* (табл. 2) – и 161 геномной сборки 25 других (нецелевых) видов бактерий рода *Xanthomonas*, не принадлежащих виду *Xanthomonas translucens* (табл. 3), загруженным из NCBI GenBank в марте 2020 г.

Максимально доступную выборку геномных сборок *Xanthomonas translucens*, представленных в таблице 2, использовали для поиска участков генома, идентичного у всех сборок целевой бактерии. Выборку геномных сборок нецелевых бактерий рода *Xanthomonas* использовали для оценки уровня идентичности выбранных генов-мишеней для *Xanthomonas translucens* среди близкородственных бактерий.

Наборы белковых последовательностей для каждой из сборок помечали в соответствии с видом и штаммом и затем кластеризовали с помощью программы CD-HIT (version 4.1), производящей группировку последовательностей по заданному порогу идентичности с использованием коротких подпоследовательностей (k-mer). Заданный порог идентичности составил 70%. Заданный порог допустимой длины последовательности, группирующейся в кластер, составил не менее 80% от

assemblies of the target bacterium – *Xanthomonas translucens* (Table 2) – and 161 genomic assemblies of 25 other (non-target) species of bacteria of the genus *Xanthomonas*, not belonging to the species *Xanthomonas translucens* (Table 3) loaded from NCBI GenBank in March 2020.

The most available set of *Xanthomonas translucens* genomic assemblies presented in Table 2 was used to search for genome regions identical in all assemblies of the target bacterium. A set of genomic assemblies of non-target bacteria of the genus *Xanthomonas* was used to assess the level of identity of selected target genes for *Xanthomonas translucens* among closely related bacteria.

Sets of protein sequences for each of the assemblies were labeled according to the species and strain and then clustered using the CD-HIT program (version 4.1), which groups the sequences according to a given identity threshold using short subsequences (k-mer). The predetermined identity threshold was 70%. The specified threshold for the permissible length of a sequence grouped into a cluster was at least 80% of the longest sequence in a cluster. The used length of k-mer, based on the

incidence of which the degree of similarity of the two sequences in the alignment process is measured, was 5 amino acid residues.

Using a Python script, from the obtained sets of protein clusters, we identified those clusters that contained only protein sequences of *Xanthomonas translucens* and did not contain protein sequences of other analyzed bacterial species. Clusters of *Xanthomonas translucens* protein sequences not found in other analyzed species were compared with a database of known protein sequences (nr) using the BLASTP program to assess their specificity for *Xanthomonas translucens*. Proteins with high (>70% identity) similarity with proteins of other bacterial species not previously included in the analysis, as well as sequences less than 100 amino acid residues in length, were excluded from the analysis. Protein sequences that showed strong variability within the *Xanthomonas translucens* species were also excluded, as not suitable for the development of universal species markers.

Nucleotide sequences of the genes encoding proteins from clusters specific for *Xanthomonas translucens* were used to design primers.

The primers were selected using the Primer-BLAST program (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>, 2021). Among the parameters for the selection of

наиболее длинной последовательности кластера. Используемая длина k-мер, на основании совпадения которых измеряется степень сходства двух последовательностей в процессе выравнивания, составляла 5 аминокислотных остатков.

С использованием скрипта на языке Python из полученных наборов белковых кластеров идентифицировали те кластеры, которые содержали только белковые последовательности *Xanthomonas translucens* и не содержали белковые последовательности других анализируемых видов бактерий. Кластеры белковых последовательностей *Xanthomonas translucens*, не обнаруженных у других анализируемых видов, сравнивали с базой известных белковых последовательностей (nr) с помощью программы BLASTP для оценки их специфичности для *Xanthomonas translucens*. Из анализа исключали белки, имеющие высокое (>70% идентичности) сходство с белками других бактериальных видов, ранее не включенных в анализ, а также последовательности длиной менее 100 аминокислотных остатков. Также исключали белковые последовательности, показавшие сильную вариабельность в рамках вида *Xanthomonas translucens*, как не подходящие для разработки универсальных видовых маркеров.

Нуклеотидные последовательности генов, кодирующих белки из кластеров, специфичных для *Xanthomonas translucens*, использовали для разработки праймеров.

Праймеры подбирали с использованием программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>, 2021). Среди параметров для подбора праймеров следует отметить ограничение длины продукта амплификации 1000 п. о., что связано с методикой и оборудованием, используемыми в рамках данного исследования для последующего анализа полученного ПЦР-продукта. Праймеры синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия).

Апробацию праймеров проводили с ДНК бактериальных штаммов, принадлежащих роду *Xanthomonas*, в том числе *Xanthomonas translucens* (табл. 4).

Таблица 3

Виды бактерий рода *Xanthomonas* и количество их геномных сборок из NCBI RefSeq, использованных для поиска мишеней

№ п/п Вид	Количество сборок	№ п/п Вид	Количество сборок
1 <i>Xanthomonas albilineans</i>	10	14 <i>Xanthomonas hyacinthi</i>	2
2 <i>Xanthomonas axonopodis</i>	10	15 <i>Xanthomonas maltophilia</i>	10
3 <i>Xanthomonas arboricola</i>	10	16 <i>Xanthomonas melonis</i>	3
4 <i>Xanthomonas bromi</i>	2	17 <i>Xanthomonas oryzae</i>	10
5 <i>Xanthomonas campestris</i>	10	18 <i>Xanthomonas phaseoli</i>	10
6 <i>Xanthomonas cassavae</i>	1	19 <i>Xanthomonas pisi</i>	2
7 <i>Xanthomonas citri</i>	10	20 <i>Xanthomonas populi</i>	3
8 <i>Xanthomonas codiae</i>	1	21 <i>Xanthomonas prunicola</i>	3
9 <i>Xanthomonas cucurbitae</i>	2	22 <i>Xanthomonas sacchari</i>	7
10 <i>Xanthomonas dyei</i>	3	23 <i>Xanthomonas theicola</i>	2
11 <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	10	24 <i>Xanthomonas vasicola</i>	10
12 <i>Xanthomonas fragariae</i>	10	25 <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	10
13 <i>Xanthomonas hortorum</i>	10		

Table 3

Bacteria species of the genus *Xanthomonas* and the number of their genomic assemblies from NCBI RefSeq used to search for targets

№ Species	Number of assemblies	№ Species	Number of assemblies
1 <i>Xanthomonas albilineans</i>	10	14 <i>Xanthomonas hyacinthi</i>	2
2 <i>Xanthomonas axonopodis</i>	10	15 <i>Xanthomonas maltophilia</i>	10
3 <i>Xanthomonas arboricola</i>	10	16 <i>Xanthomonas melonis</i>	3
4 <i>Xanthomonas bromi</i>	2	17 <i>Xanthomonas oryzae</i>	10
5 <i>Xanthomonas campestris</i>	10	18 <i>Xanthomonas phaseoli</i>	10
6 <i>Xanthomonas cassavae</i>	1	19 <i>Xanthomonas pisi</i>	2
7 <i>Xanthomonas citri</i>	10	20 <i>Xanthomonas populi</i>	3
8 <i>Xanthomonas codiae</i>	1	21 <i>Xanthomonas prunicola</i>	3
9 <i>Xanthomonas cucurbitae</i>	2	22 <i>Xanthomonas sacchari</i>	7
10 <i>Xanthomonas dyei</i>	3	23 <i>Xanthomonas theicola</i>	2
11 <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	10	24 <i>Xanthomonas vasicola</i>	10
12 <i>Xanthomonas fragariae</i>	10	25 <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	10
13 <i>Xanthomonas hortorum</i>	10		

the primers, the limitation of the length of the amplification product to 1000 bp should be noted, which is associated with the technique and equipment used in this study for the subsequent analysis of the obtained PCR product. Primers were synthesized at "Evrogen" (Russia).

Таблица 4

Виды бактерий рода *Xanthomonas*, использованные для проверки специфичности методов ПЦР

№ п/п	Название бактерии	№ штамма в коллекции ФГБУ «ВНИИКР»	Происхождение, № штамма в других коллекциях (при наличии)
1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	0148	NCPPB 1946
2	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	0149	AOBC PPSCD
3	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0226	<i>Brassica oleracea</i>
4	<i>Xanthomonas oryzae</i>	0227	NCPPB 3002
5	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0228	<i>Brassica oleracea</i>
6	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0230	<i>Brassica oleracea</i>
7	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0232	<i>Brassica oleracea</i>
8	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0234	<i>Brassica oleracea</i>
9	<i>Xanthomonas translucens</i>	0337	DSMZ 18974
10	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	0338	DSMZ 19128
11	<i>Xanthomonas perforans</i>	0343	DSMZ 18975
12	<i>Xanthomonas gardneri</i>	0344	DSMZ 19127
13	<i>Xanthomonas fragariae</i>	0345	NIB Z125
14	<i>Xanthomonas fragariae</i>	0346	NIB Z126
15	<i>Xanthomonas fragariae</i>	0347	NIB Z127
16	<i>Xanthomonas</i> sp.	0348	NIB Z128
17	<i>Xanthomonas</i> sp.	0373	<i>Allium cepa</i>
18	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	0374	DSMZ 22252
19	<i>Xanthomonas</i> sp.	0375	<i>Vicia</i>
20	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	0376	CFBP 2286
21	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	0377	CFBP 6107
22	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	0386	CFBP 2534
23	<i>Xanthomonas</i> sp.	0394	<i>Trifolium</i>
24	<i>Xanthomonas</i> sp.	0399	<i>Phaseolus vulgaris</i>
25	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	0400	<i>Phaseolus vulgaris</i>
26	<i>Xanthomonas gardneri</i>	0404	<i>Solanum lycopersicum</i>
27	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	0405	<i>Solanum lycopersicum</i>
28	<i>Xanthomonas campestris</i>	0406	<i>Brassica oleracea</i>
29	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	0419	CFBP 6369
30	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	0420	CFBP 5141
31	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	0426	<i>Trifolium</i>
32	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	0427	<i>Phaseolus vulgaris</i>
33	<i>Xanthomonas hyacinthi</i>	0446	CFBP 1156
34	<i>Xanthomonas arboricola</i>	0473	DSMZ 50854
35	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	0483	CFBP 2526

DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Ассоциация Лейбница, Германия; AOBC PPSCD – коллекция фитопатогенов лаборатории бактериологии Сельскохозяйственной станции по защите растений и охране почв области Баранья, г. Печ, Венгрия; NCPPB – Национальная коллекция фитопатогенных бактерий, г. Йорк, Великобритания; CFBP – Международный центр микробных ресурсов (CIRM-CFBP); NIB – Национальный институт биологии, г. Любляна, Словения.

Table 4

Bacteria species of the genus *Xanthomonas* used to test the specificity of PCR methods

№	Name of bacteria	Strain № in the collection of FGBU "VNIKR"	Origin, strain № in other collections (if present)
1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	0148	NCPBP 1946
2	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	0149	AOBC PPSCD
3	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0226	<i>Brassica oleracea</i>
4	<i>Xanthomonas oryzae</i>	0227	NCPBP 3002
5	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0228	<i>Brassica oleracea</i>
6	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0230	<i>Brassica oleracea</i>
7	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0232	<i>Brassica oleracea</i>
8	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0234	<i>Brassica oleracea</i>
9	<i>Xanthomonas translucens</i>	0337	DSMZ 18974
10	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	0338	DSMZ 19128
11	<i>Xanthomonas perforans</i>	0343	DSMZ 18975
12	<i>Xanthomonas gardneri</i>	0344	DSMZ 19127
13	<i>Xanthomonas fragariae</i>	0345	NIB Z125
14	<i>Xanthomonas fragariae</i>	0346	NIB Z126
15	<i>Xanthomonas fragariae</i>	0347	NIB Z127
16	<i>Xanthomonas</i> sp.	0348	NIB Z128
17	<i>Xanthomonas</i> sp.	0373	<i>Allium cepa</i>
18	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	0374	DSMZ 22252
19	<i>Xanthomonas</i> sp.	0375	<i>Vicia</i>
20	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	0376	CFBP 2286
21	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	0377	CFBP 6107
22	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	0386	CFBP 2534
23	<i>Xanthomonas</i> sp.	0394	<i>Trifolium</i>
24	<i>Xanthomonas</i> sp.	0399	<i>Phaseolus vulgaris</i>
25	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	0400	<i>Phaseolus vulgaris</i>
26	<i>Xanthomonas gardneri</i>	0404	<i>Solanum lycopersicum</i>
27	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	0405	<i>Solanum lycopersicum</i>
28	<i>Xanthomonas campestris</i>	0406	<i>Brassica oleracea</i>
29	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	0419	CFBP 6369
30	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	0420	CFBP 5141
31	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	0426	<i>Trifolium</i>
32	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	0427	<i>Phaseolus vulgaris</i>
33	<i>Xanthomonas hyacinthi</i>	0446	CFBP 1156
34	<i>Xanthomonas arboricola</i>	0473	DSMZ 50854
35	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	0483	CFBP 2526

DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Leibniz Association, Germany; AOBC PPSCD – collection of phytopathogens of the bacteriology laboratory of the Agricultural Station for Plant Protection and Soil Protection, Baranja Region, Pecs, Hungary; NCPBP – National Collection of Phytopathogenic Bacteria, York, UK; CFBP – International Center for Microbial Resources (CIRM-CFBP); NIB – National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia.

Для апробации праймеров проводили амплификацию со следующим температурным режимом: начальная денатурация – 5 мин. при 95 °C; затем 40 циклов: 95 °C – 30 с., 60 °C – 30 с. и 72 °C – 60 с.; финальная элонгация – 7 мин. при 72 °C. Состав реакционной смеси: 75–100 нг бактериальной ДНК, прямой и обратный праймеры в конечной концентрации 0,4 микромоля, 5 мкл H₂O, 5 мкл мастер-микса ScreenMix-HS (производитель ЗАО «Евроген», Россия). Амплификацию проводили в 2-кратной повторности. Результаты ПЦР визуализировали в 1,5%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для ПЦР-продуктов длиной 200 п. о. и более определяли нуклеотидную последовательность на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit (Hall T., 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате кластеризации 667 416 белковых последовательностей, соответствующих генам из 171 геномной сборки 26 видов бактерий, получили 42 570 кластеров, содержащих от 1 до 343 аминокислотных последовательностей. Из них 55 кластеров включали в себя белки всех 10 проанализированных сборок *Xanthomonas translucens* и не включали в себя белки других видов. После фильтрации последовательностей по установленным критериям специфичности, длины и вариабельности (см. раздел «Материалы и методы») отобрали последовательности 6 генов (табл. 5).

Указанные последовательности использовали для разработки праймеров. Для каждой из 6 последовательностей подобрали от 1 до 3 пар праймеров. Всего подобрали 12 пар праймеров.

Результаты ПЦР, проведенной с каждой из пар праймеров для 35 бактерий рода *Xanthomonas*, заносили в таблицу 6. Результат ПЦР считали положительным при наличии продукта амплификации, размер которого соответствовал ожидаемому для штамма 0337 *Xanthomonas translucens* (положительный контроль); в этом случае в таблице указывали размер продукта амплификации. При наличии какого-либо продукта амплификации, размер которого отличался от контроля, в таблицу заносили приблизительную длину полученного фрагмента.

Результат ПЦР считали отрицательным (–) при отсутствии какого-либо продукта амплификации, включая неспецифичные продукты реакции и димеры.

Результат ПЦР считали недостоверным (n/a) при наличии неспецифичных продуктов реакции. При наличии ПЦР-продукта только одной длины в таблицу 6 заносили сведения о размере продукта.

В ходе работы со всеми 12 парами праймеров обнаруживались продукты ожидаемой длины при использовании в качестве матрицы ДНК штамма 0337 *Xanthomonas translucens*. Для всех 12 ПЦР-продуктов были определены нуклеотидные последовательности, которые были идентичны последовательностям *Xanthomonas translucens*, аннотированным в базе данных NCBI, на 94,29–99,81%, при ширине покрытия 95–99%. Праймеры 3F3/3R3, 3F5/3R5, 3F9/3R9, 4F3/4R3, 5F3/5R3 и 6F6/6R6 показали низкую специфичность. Для видовой идентификации *Xanthomonas translucens* показана возможность применения

The primers were tested with DNA of bacterial strains belonging to the genus *Xanthomonas*, including *Xanthomonas translucens* (Table 4).

To test the primers, amplification was carried out with the following temperature regime: initial denaturation – 5 min. at 95 °C; then 40 cycles: 95 °C – 30 sec., 60 °C – 30 sec. and 72 °C – 60 s.; final elongation – 7 min. at 72 °C. The composition of the reaction mixture: 75–100 ng of bacterial DNA, forward and reverse primers at a final concentration of 0.4 micromolar, 5 µl of H₂O, 5 µl of the ScreenMix-HS master mix (manufactured by “Evrogen”, Russia). Amplification was performed in duplicate. The PCR results were visualized on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. For PCR products with a length of 200 bp. and more, the nucleotide sequence was determined using the Applied Biosystems 3500 genetic analyzer. The analysis of nucleotide sequences was performed using the BioEdit program (Hall T., 1999).

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of clustering 667 416 protein sequences corresponding to genes from 171 genomic assemblies of 26 bacterial species, 42 570 clusters containing from 1 to 343 amino acid sequences were obtained. Of these, 55 clusters included proteins from all 10 analyzed assemblies of *Xanthomonas translucens* and did not include proteins from other species. After filtering the sequences according to the established criteria of specificity, length and variability (see the Materials and Methods section), the sequences of 6 genes were selected (Table 5).

These sequences were used to design primers. For each of the 6 sequences, from 1 to 3 pairs of primers were selected. A total of 12 pairs of primers were selected.

The results of PCR carried out with each of the primer pairs for 35 bacteria of the genus *Xanthomonas*, were entered in table 6. The result of PCR was considered positive in the presence of an amplification product, the size of which corresponded to that expected for strain 0337 *Xanthomonas translucens* (positive control); in this case, the table indicated the size of the amplification product. In the presence of any amplification product, the size of which differed from the control, the approximate length of the obtained fragment was entered in the table.

The PCR result was considered negative (–) in the absence of any amplification product, including non-specific reaction products and dimers.

The PCR result was considered unreliable (n/a) in the presence of nonspecific reaction products. In the presence of a PCR product of only one length, information about the size of the product was entered in Table 6.

In the course of work with all 12 pairs of primers, products of the expected length were formed using the DNA of strain 0337 *Xanthomonas translucens* as a template. For all 12 PCR products, nucleotide sequences were determined that were identical to the sequences of *Xanthomonas translucens*, annotated in the NCBI database, by 94.29–99.81%, with a coverage width of 95–99%. Primers 3F3/3R3, 3F5/3R5, 3F9/3R9, 4F3/4R3, 5F3/5R3, and 6F6/6R6 showed low specificity. For the species identification of *Xanthomonas translucens*,

праймеров 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 и 6F10/6R10 (см. рисунок). С данными праймерами с ДНК *Xanthomonas translucens* синтезируется 1 ПЦР-продукт ожидаемого размера. Но наличие ПЦР-продуктов, образующихся в ходе амплификации ДНК других видов организмов, хоть и отличающихся по размеру от *Xanthomonas translucens*, требует оптимизации условий ПЦР.

the possibility of using primers 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 and 6F10/6R10 has been shown (see figure). With these primers, 1 PCR product of the expected size is synthesized with *Xanthomonas translucens* DNA. But the presence of PCR products formed during the amplification of DNA from other species of organisms, although they differ in size from *Xanthomonas translucens*, requires optimization of the PCR conditions.

Таблица 5

Нуклеотидные последовательности генов, использованные для подбора праймеров

№ п/п	Последовательность NCBI Nucleotide	Координаты гена	Кодируемый белок	Аннотация кодируемого белка	Названия пар праймеров	Длина ПЦР-продукта, п. о.
1	NZ_FLTU01000142.1	6002-8863	WP_039956369.1	DUF5110 domain-containing protein	1F8/1R8	711
					1F10/1R10	379
2	FLTU01000085.1	5245-7368	WP_009581062.1	TonB-dependent siderophore receptor	2F6/2R6	759
3	NZ_FLTU01000009.1	c3500-2202	WP_039955267.1	nucleoside hydrolase	3F3/3R3	246
					3F5/3R5	209
					3F9/3R9	869
4	NZ_LHSI01000001.1	2522179-2523426	WP_009581060.1	ATP-grasp domain-containing protein	4F1/4R1	503
					4F3/4R3	904
5	NZ_ANGG01000457.1	10914-12119	WP_009598496.1	aldose 1-epimerase family protein	5F3/5R3	200
					5F6/5R6	424
6	NZ_ANGG01000136.1	c4667-3489	WP_009581057.1	MFS transporter	6F6/6R6	970
					6F10/6R10	663

Table 5

Nucleotide sequences of genes used for the selection of primers

№	Sequence NCBI Nucleotide	Gene coordinates	Encoded protein	Annotation of the encoded protein	Primer pair names	Length of the PCR product, bp
1	NZ_FLTU01000142.1	6002-8863	WP_039956369.1	DUF5110 domain-containing protein	1F8/1R8	711
					1F10/1R10	379
2	FLTU01000085.1	5245-7368	WP_009581062.1	TonB-dependent siderophore receptor	2F6/2R6	759
3	NZ_FLTU01000009.1	c3500-2202	WP_039955267.1	nucleoside hydrolase	3F3/3R3	246
					3F5/3R5	209
					3F9/3R9	869
4	NZ_LHSI01000001.1	2522179-2523426	WP_009581060.1	ATP-grasp domain-containing protein	4F1/4R1	503
					4F3/4R3	904
5	NZ_ANGG01000457.1	10914-12119	WP_009598496.1	aldose 1-epimerase family protein	5F3/5R3	200
					5F6/5R6	424
6	NZ_ANGG01000136.1	c4667-3489	WP_009581057.1	MFS transporter	6F6/6R6	970
					6F10/6R10	663

Таблица 6

Результаты ПЦР с 35 штаммами бактерий рода *Xanthomonas* для каждой пары праймеров

Штамм	Пара праймеров											
	1F8	1F10	2F6	3F3	3F5	3F9	4F1	4F3	5F3	5F6	6F6	6F10
	1R8	1R10	2R6	3R3	3R5	3R9	4R1	4R3	5R3	5R6	6R6	6R10
Результат ПЦР: размер фрагмента амплификации, п. о. (при наличии) / отрицательно (-) / недостоверно (n/a)												
0148	–	–	n/a	–	–	n/a	n/a	240	–	–	n/a	n/a
0149	–	–	n/a	–	–	n/a	–	–	–	–	n/a	–
0226	–	–	n/a	–	1120	1150	n/a	240	–	–	n/a	n/a
0227	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
0228	–	–	n/a	–	1120	1150	–	240	–	–	n/a	–
0230	–	–	n/a	–	1120	1150	–	240	–	–	n/a	n/a
0232	–	–	n/a	–	n/a	1150	–	240	–	–	n/a	n/a
0234	–	–	n/a	–	–	1150	–	240	–	–	n/a	n/a
0337	711	379	759	869	209	246	503	904	424	200	1050	663
0338	–	–	n/a	869	–	n/a	–	–	n/a	–	470	–
0343	–	n/a	n/a	869	1300	n/a	–	470	1220	–	470	–
0344	–	–	n/a	869	1300	n/a	–	470	n/a	–	470	–
0345	260	–	n/a	869	–	–	–	–	n/a	n/a	n/a	–
0346	260	–	n/a	869	–	–	–	–	n/a	n/a	n/a	–
0347	260	–	n/a	869	–	–	–	–	n/a	n/a	n/a	–
0348	260	–	n/a	869	–	n/a	–	–	n/a	n/a	n/a	–
0373	–	–	n/a	n/a	–	–	–	–	–	–	n/a	–
0374	–	n/a	n/a	800	–	–	–	n/a	–	–	–	n/a
0375	–	–	n/a	n/a	1120	–	–	–	n/a	–	–	n/a
0376	–	–	n/a	869	–	n/a	1200	n/a	1400	–	n/a	n/a
0377	–	–	n/a	869	–	n/a	n/a	n/a	n/a	–	n/a	n/a
0386	–	–	n/a	869	n/a	n/a	–	n/a	–	–	n/a	–
0394	–	–	n/a	n/a	400	n/a	–	n/a	1400	–	n/a	n/a
0399	–	–	n/a	869	–	n/a	n/a	–	1120	–	–	–
0400	–	–	n/a	869	n/a	n/a	–	–	1120	–	–	–
0404	–	–	n/a	–	–	–	–	–	–	–	n/a	–
0405	–	–	n/a	n/a	n/a	n/a	–	n/a	–	–	n/a	n/a
0406	–	–	n/a	n/a	n/a	1150	–	240	1120	–	n/a	–
0419	–	–	n/a	n/a	–	–	–	n/a	–	–	n/a	–
0420	–	–	n/a	869	1300	1150	–	n/a	1340	–	n/a	n/a
0426	–	–	n/a	–	–	–	–	–	–	–	n/a	–
0427	–	–	n/a	n/a	–	1150	–	–	–	n/a	n/a	–
0446	–	–	n/a	–	–	–	–	–	–	–	n/a	n/a
0473	–	–	n/a	n/a	–	n/a	n/a	n/a	1120	–	n/a	–
0483	–	n/a	n/a	n/a	–	n/a	–	–	–	–	n/a	–

Table 6

PCR results with 35 strains of bacteria of the genus *Xanthomonas* for each pair of primers

Strain	Pair of primers											
	1F8	1F10	2F6	3F3	3F5	3F9	4F1	4F3	5F3	5F6	6F6	6F10
	1R8	1R10	2R6	3R3	3R5	3R9	4R1	4R3	5R3	5R6	6R6	6R10
PCR result: size of the amplification fragment, bp (if any) / negative (-) / unreliable (n/a)												
0148	-	-	n/a	-	-	n/a	n/a	240	-	-	n/a	n/a
0149	-	-	n/a	-	-	n/a	-	-	-	-	n/a	-
0226	-	-	n/a	-	1120	1150	n/a	240	-	-	n/a	n/a
0227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0228	-	-	n/a	-	1120	1150	-	240	-	-	n/a	-
0230	-	-	n/a	-	1120	1150	-	240	-	-	n/a	n/a
0232	-	-	n/a	-	n/a	1150	-	240	-	-	n/a	n/a
0234	-	-	n/a	-	-	1150	-	240	-	-	n/a	n/a
0337	711	379	759	869	209	246	503	904	424	200	1050	663
0338	-	-	n/a	869	-	n/a	-	-	n/a	-	470	-
0343	-	n/a	n/a	869	1300	n/a	-	470	1220	-	470	-
0344	-	-	n/a	869	1300	n/a	-	470	n/a	-	470	-
0345	260	-	n/a	869	-	-	-	-	n/a	n/a	n/a	-
0346	260	-	n/a	869	-	-	-	-	n/a	n/a	n/a	-
0347	260	-	n/a	869	-	-	-	-	n/a	n/a	n/a	-
0348	260	-	n/a	869	-	n/a	-	-	n/a	n/a	n/a	-
0373	-	-	n/a	n/a	-	-	-	-	-	-	n/a	-
0374	-	n/a	n/a	800	-	-	-	n/a	-	-	-	n/a
0375	-	-	n/a	n/a	1120	-	-	-	n/a	-	-	n/a
0376	-	-	n/a	869	-	n/a	1200	n/a	1400	-	n/a	n/a
0377	-	-	n/a	869	-	n/a	n/a	n/a	n/a	-	n/a	n/a
0386	-	-	n/a	869	n/a	n/a	-	n/a	-	-	n/a	-
0394	-	-	n/a	n/a	400	n/a	-	n/a	1400	-	n/a	n/a
0399	-	-	n/a	869	-	n/a	n/a	-	1120	-	-	-
0400	-	-	n/a	869	n/a	n/a	-	-	1120	-	-	-
0404	-	-	n/a	-	-	-	-	-	-	-	n/a	-
0405	-	-	n/a	n/a	n/a	n/a	-	n/a	-	-	n/a	n/a
0406	-	-	n/a	n/a	n/a	1150	-	240	1120	-	n/a	-
0419	-	-	n/a	n/a	-	-	-	n/a	-	-	n/a	-
0420	-	-	n/a	869	1300	1150	-	n/a	1340	-	n/a	n/a
0426	-	-	n/a	-	-	-	-	-	-	-	n/a	-
0427	-	-	n/a	n/a	-	1150	-	-	-	n/a	n/a	-
0446	-	-	n/a	-	-	-	-	-	-	-	n/a	n/a
0473	-	-	n/a	n/a	-	n/a	n/a	n/a	1120	-	n/a	-
0483	-	n/a	n/a	n/a	-	n/a	-	-	-	-	n/a	-

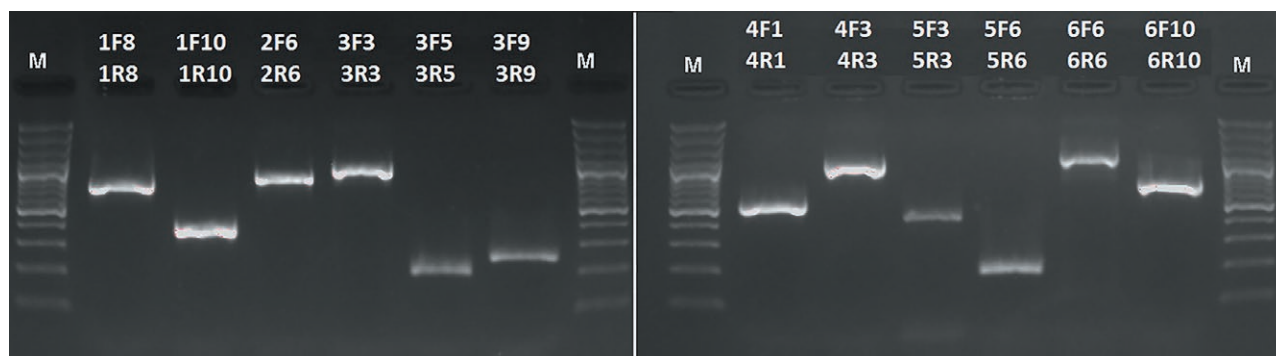


Рисунок. Электрофореграмма результатов ПЦР со штаммом 0337 *Xanthomonas translucens* для каждой использованной в исследовании пары праймеров. Использован маркер генетического веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ready-to-use, компания Thermo Fisher Scientific (США)

Figure. Electrophoretogram of PCR results with strain 0337 *Xanthomonas translucens* for each pair of primers used in the study. Genetic weight marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ready-to-use, Thermo Fisher Scientific (USA) used

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате поиска генетических маркеров для группы бактерий, вызывающих черный бактериоз зерновых культур, – патоваров *Xanthomonas translucens* – найдено 6 нуклеотидных последовательностей, специфичных для указанного вида. Для найденных последовательностей разработано 12 пар праймеров – 1F8/1R8, 1F10/1R10, 2F6/2R6, 3F3/3R3, 3F5/3R5, 3F9/3R9, 4F1/4R1, 4F3/4R3, 5F3/5R3, 5F6/5R6, 6F6/6R6 и 6F10/6R10, видоспецифичность которых в ходе исследования апробирована с 35 штаммами бактерий рода *Xanthomonas*, включая *Xanthomonas translucens*. Анализ результатов проведенной ПЦР и выравнивания полученных нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР с помощью алгоритма BLAST на базе NCBI показал, что пары праймеров 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 и 6F10/6R10 являются пригодными для их применения в диагностике возбудителя черного бактериоза зерновых культур *Xanthomonas translucens*. Новые ПЦР-тесты могут стать частью решения проблемы установления фитосанитарного состояния партий российской продукции зерна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каменева С., 2018. Статистическое исследование потребления продуктов питания населением разных стран. – Экономические исследования и разработки, № 6: 30–44.
2. Ledman K., Curland R., Ishimaru C., Dill-Macky R., 2020. *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* identified on common weedy grasses in naturally infected wheat fields in Minnesota. – Phytopathology. DOI: 10.1094/PHYTO-08-20-0337-R.
3. Sapkota S., Mergoum M., Liu Z., 2020. The translucens group of *Xanthomonas translucens*: Complicated and important pathogens causing bacterial leaf streak on cereals. – Mol Plant Pathol., 21 (3): 291–302. DOI: 10.1111/mpp.12909.
4. Sharma A., Sharma D., Verma S., 2019. Zinc binding proteome of a phytopathogen *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. – Royal Society Open Science, 6 (9): 190369. DOI: 10.1098/rsos.190369.
5. Slovareva O., 2020. Detection and identification of pathogens of bacterial diseases of wheat and barley in the Russian Federation. – MIR J, Vol. 7 (1): 13–23. DOI: 10.18527/2500-2236-2020-7-1-13-23.

CONCLUSION

As a result of the search for genetic markers for a group of bacteria causing bacterial leaf streak of wheat – pathovars *Xanthomonas translucens* – 6 nucleotide sequences specific for this species were found. For the sequences found, 12 pairs of primers were developed – 1F8/1R8, 1F10/1R10, 2F6/2R6, 3F3/3R3, 3F5/3R5, 3F9/3R9, 4F1/4R1, 4F3/4R3, 5F3/5R3, 5F6/5R6, 6F6/6R6 and 6F10/6R10, the species-specificity of which was tested in the course of the study with 35 strains of bacteria of the genus *Xanthomonas*, including *Xanthomonas translucens*. Analysis of the results of the performed PCR and alignment of the obtained nucleotide sequences of the PCR products using the BLAST algorithm based on the NCBI showed that the primer pairs 1F8/1R8, 1F10/1R10, 4F1/4R1, 5F6/5R6 and 6F10/6R10 are suitable for their use in the diagnosis of the pathogen of bacterial leaf streak of wheat *Xanthomonas translucens*. New PCR tests can become part of the solution to the problem of establishing the phytosanitary state of consignments of Russian grain products.

REFERENCES

1. Kameneva S. Statistical research of food consumption by the population of the different countries [Statisticheskoye issledovaniye potrebleniya produktov pitaniya naseleniyem raznykh stran]. *Economic development research journal*, 2018; 6: 30–44 (in Russian).
2. Ledman K., Curland R., Ishimaru C., Dill-Macky R., *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* identified on common weedy grasses in naturally infected wheat fields in Minnesota. *Phytopathology*. 2020. DOI: 10.1094/PHYTO-08-20-0337-R.
3. Sapkota S., Mergoum M., Liu Z. The translucens group of *Xanthomonas translucens*: Complicated and important pathogens causing bacterial leaf streak on cereals. *Mol Plant Pathol.*, 2020; 21 (3): 291–302. DOI: 10.1111/mpp.12909.
4. Sharma A., Sharma D., Verma S. Zinc binding proteome of a phytopathogen *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. *Royal Society Open Science*, 2019; 6 (9): 190369. DOI: 10.1098/rsos.190369.

6. Развитие российского экспорта. Российский экспортный центр. – URL: https://www.exportcenter.ru/international_markets/russian_exports/?sphrase_id=116943 (дата обращения: 04.02.2021).

7. Федеральная служба государственной статистики. – URL: <https://rosstat.gov.ru> (дата обращения: 03.03.2021).

8. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). – Ввоз. Вывоз. Транзит. Египет: Карантинные фитосанитарные требования к продукции растительного происхождения. – URL: http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966741302_phyto_requirements_egypt.pdf (дата обращения: 08.04.2021).

9. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). – Ввоз. Вывоз. Транзит. Список карантинных вредителей Нигерии. – URL: http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966841778_phyto_vred_nigeria.pdf (дата обращения: 08.04.2021).

10. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Global database. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 01.03.2021).

11. NCBI. Basic Local Alignment Search Tool: Nucleotide. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/> (дата обращения: 12.04.2021).

12. NCBI. Basic Local Alignment Search Tool. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> (дата обращения: 07.03.2021).

13. Hall T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41 (41): 95–98.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Словарева Ольга Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская область, Россия; *ORCID 0000-0001-6022-5955*, e-mail: slovareva.olga@gmail.com.

Старикова Елизавета Валентиновна, младший научный сотрудник лаборатории биоинформатики ФГБУ «ФНКЦ ФХМ ФМБА России», г. Москва, Россия; агроном лаборатории вирусологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская область, Россия; *ORCID 0000-0001-6582-210X*, e-mail: hed.robin@gmail.com.

Муvingи Муфаро, аспирант ФГАОУ ВО «РУДН», г. Москва, Россия; *ORCID 0000-0001-7700-1296*, e-mail: mufaromuvingi@gmail.com.

5. Slovareva O. Detection and identification of pathogens of bacterial diseases of wheat and barley in the Russian Federation. *MIR J*, 2020; 7 (1): 13–23. DOI: 10.18527/2500-2236-2020-7-1-13-23.

6. Development of Russian exports. Russian export center. URL: https://www.exportcenter.ru/international_markets/russian_exports/?sphrase_id=116943 (last accessed: 04.02.2021) (in Russian).

7. Federal State Statistics Service. URL: <https://rosstat.gov.ru> (last accessed: 03.03.2021) (in Russian).

8. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoz nadzor). Import. Export. Transit. Egypt: Quarantine Phytosanitary Requirements for Plant Products. URL: http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966741302_phyto_requirements_egypt.pdf (last accessed: 08.04.2021) (in Russian).

9. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoz nadzor). Import. Export. Transit. List of quarantine pests of Nigeria. URL: http://portal.fsvps.ru/sites/fsvps/documents/1485966841778_phyto_vred_nigeria.pdf (last accessed: 08.04.2021) (in Russian).

10. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Global database. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 01.03.2021).

11. NCBI. Basic Local Alignment Search Tool: Nucleotide. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/> (last accessed: 12.04.2021).

12. NCBI. Basic Local Alignment Search Tool. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> (last accessed: 07.03.2021).

13. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 1999; 41 (41): 95–98.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

Elizaveta Starikova, Junior Researcher, Bioinformatics Laboratory, FGBU “SRI PCM FMBA of Russia”, Moscow, Russia; Agronomist, Virology Laboratory, Laboratory Testing Center, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *ORCID 0000-0001-6582-210X*, e-mail: hed.robin@gmail.com.

Mufaro Muvingi, postgraduate student, FGAOU VO “RUDN”, Moscow, Russia; *ORCID 0000-0001-7700-1296*, e-mail: mufaromuvingi@gmail.com.