

Валидация ПЦР-тестов с наборами российского производства для выявления *Ralstonia solanacearum sensu lato* в растительных экстрактах

Н.В. ДРЕНОВА¹, И.М. ИГНАТЬЕВА²,
М.О. КОНДРАТЬЕВ³, Е.Ю. ШНЕЙДЕР⁴

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

¹ ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru

² ORCID 0000-0003-1047-0105,
e-mail: babiraignirmi@yandex.ru

³ e-mail: affut24@rambler.ru

⁴ e-mail: seunch@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Проведена оценка применимости (валидация) двух тестов на основе полимеразной цепной реакции в реальном времени и теста в формате FLASH с коммерческими наборами для выделения ДНК и для амплификации производства российских компаний ООО «АгроДиагностика» и ООО «Синтол», а также с использованием отечественных амплификаторов для выявления генетического материала комплекса возбудителей карантинного заболевания бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum sensu lato* в растительном экстракте картофеля и роз. Аналитическая чувствительность тестов для большинства штаммов составила 10^2 – 10^3 КОЕ/мл. Повторяемость и воспроизводимость тестов на основе ПЦР в реальном времени зависели от используемого прибора. Значения рабочих критериев до 100% получены на детектирующем амплификаторе «ДТ-лайт» производства компании ООО «ДНК-Технология». На основании результатов испытаний наборы ООО «АгроДиагностика» могут быть рекомендованы для проведения универсальных отборочных тестов при выполнении лабораторных исследований образцов подкарантинной продукции на выявление возбудителей видового комплекса. Тест с набором ООО «Синтол», специфичный к *R. solanacearum* расы 3 биовара 2, может быть использован для подтверждения положительного результата отборочного теста или в качестве отборочного при исследовании образцов из зон распространения *R. solanacearum* расы 3 биовара 2, а также для дифференциальной диагностики этой группы.

Ключевые слова. Картофель, роза, бурая гниль картофеля, диагностика, валидация, карантин.

Validation of PCR tests with Russian kits for the detection of *Ralstonia solanacearum sensu lato* in plant extracts

N.V. DRENOVA¹, I.M. IGNATIEVA²,
M.O. KONDRATIEV³, YE.YU. SHNEYDER⁴

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

¹ ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru

² ORCID 0000-0003-1047-0105,
e-mail: babiraignirmi@yandex.ru

³ e-mail: affut24@rambler.ru

⁴ e-mail: seunch@mail.ru

ABSTRACT

The validation of two tests based on qPCR and a FLASH test with commercial kits for DNA isolation and amplification produced by Russian companies AgroDiagnostika and Syntol was assessed, as well as using Russian amplifiers for identification of the genetic material of a complex of causative agents of the quarantine disease, brown rot and bacterial wilt *Ralstonia solanacearum sensu lato*, in extract of potatoes and roses. The analytical sensitivity of tests for most strains was 10^2 – 10^3 CFU/ml. The repeatability and reproducibility of RT-PCR tests depended on the instrument used. The values of the working criteria up to 100% were obtained on a qPCR machine DT-light manufactured by DNA-Technology. Based on the test results, AgroDiagnostika kits can be recommended for carrying out universal screening tests during laboratory studies of regulated products samples to identify pathogens of the species complex. The test with the Syntol kit, specific to *R. solanacearum* race 3 biovar 2, can be used to confirm a positive result of the screening test or as a screening test when examining samples from the spread areas of *R. solanacearum* race 3 biovar 2, as well as for differential diagnosis this group.

Key words. Potatoes, rose, brown potato rot diagnostics, validation, quarantine.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta & Nishiuchi) – карантинный объект для территории Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Патоген, поражающий пасленовые культуры и арахис в Азии, на юге США и в Южной Америке, был известен с конца XIX века и в настоящее время распространился практически по всему миру от экваториальных областей до широт Северной Европы и Патагонии (EPPO, 2004; EPPO Global Database, 2021). Бактерии поражают сосудистую систему, вызывая симптомы увядания и гибель широкого круга растений.

Для территории РФ и ЕАЭС в настоящее время наибольший риск представляет поражение картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и других пасленовых культур, однако список экономически значимых растений – хозяев патогена продолжает пополняться. Возбудитель был выявлен на свекле (*Beta vulgaris* L.) на Тайване (Lin et al., 2015), на розе (*Rosa* sp.) в Нидерландах (Tjou-Tam-Sin et al., 2017), на тыквенных культурах (Cucurbitaceae) в Японии (Horita et al., 2014), Китае (She et al., 2018) и на Мартинике (Wicker et al., 2007), на голубике (*Vaccinium corymbosum* L.) в США (Norman et al., 2018), на декоративных культурах, в т. ч. культивируемых в открытом грунте (EPPO Global Database, 2021).

Со времени описания микроорганизм был многократно реклассифицирован. В настоящее время на основе характеристик генома род *Ralstonia* отнесен к семейству Burkholderiaceae, включенному в класс Betaproteobacteria, тогда как до недавнего времени на основе морфолого-биохимических свойств группа *Ralstonia solanacearum sensu lato* входила в род *Pseudomonas*, на данный момент отнесенный к классу Gammaproteobacteria (EPPO Global Database, 2021).

Внутри группы штаммов на основе их биохимического и патогенного полиморфизма выделяют 5 биоваров (bv.) и 5 рас, не всегда коррелирующих между собой (Buddenhagen et al., 1962). Работы по классификации штаммов на основе генетического фингерпринтинга, секвенирования последовательностей гена 16S рРНК и межгенного участка 16-23S, последовательностей генов полигалактуроназы и эндоглюканазы позволили выделить 4 фило типа (I – штаммы азиатского происхождения, II – штаммы южноамериканского происхождения, III – штаммы, выявленные в высокогорных районах Африки, IV – штаммы из Индонезии, Японии и Австралии), объединяющие 23 секве вара. Поскольку генетическое сходство некоторых групп штаммов, оцениваемое методом ДНК-ДНК-гибридизации, зачастую было менее 70%, Fegan и Prior (2005) предложили рассматривать *R. solanacearum* как видовой комплекс.

В 2014 г. таксономия видовой группы *R. solanacearum sensu lato* была пересмотрена на основе комбинации геномных и протеомных характеристик (Safni et al., 2014). Видовой комплекс был разделен на 3 вида: *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. emend. Safni et al., *Ralstonia pseudosolanacearum* Safni et al. и *Ralstonia syzygii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al. Новое разделение видов совпадает с предыдущей классификацией фило типов:

INTRODUCTION

The causative agent of potato bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta & Nishiuchi) is a quarantine object for the territory of the Eurasian Economic Union (EAEU). The pathogen affecting Solanaceae crops and peanuts in Asia, the southern United States and South America has been known since the late 19th century and has now spread to almost the entire world from equatorial regions to latitudes in Northern Europe and Patagonia (EPPO, 2004; EPPO Global Database, 2021). Bacteria infect the vascular system, causing wilting symptoms and death of a wide range of plants.

For the territory of the Russian Federation and the EAEU, the greatest risk is currently posed by damage to potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and other Solanaceae crops, however, the list of economically important host plants of the pathogen continues to grow. The causative agent has been identified on beets (*Beta vulgaris* L.) in Taiwan (Lin et al., 2015), on roses (*Rosa* sp.) in the Netherlands (Tjou-Tam-Sin et al., 2017), on Cucurbitaceae crops in Japan (Horita et al., 2014), China (She et al., 2018) and in Martinique (Wicker et al., 2007), on blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) in the USA (Norman et al., 2018), on ornamental crops, including those cultivated in the open field (EPPO Global Database, 2021).

Since the description, the microorganism has been reclassified many times. Currently based on genome characteristics, the genus *Ralstonia* belongs to the family Burkholderiaceae, included in the class Betaproteobacteria, whereas until recently, on the basis of morphological and biochemical properties, the group *Ralstonia solanacearum sensu lato* was part of the genus *Pseudomonas*, currently referred to the class Gammaproteobacteria (EPPO Global Database, 2021).

Within the group of strains, on the basis of their biochemical and pathogenic polymorphism, 5 biovars (bv.) and 5 races are distinguished, which are not always intercorrelated (Buddenhagen et al., 1962). The work on the classification of strains based on genetic fingerprinting, sequencing of the 16S rRNA gene and 16-23S intergenic region sequences, polygalacturonase and endoglucanase gene sequences made it possible to identify 4 phylotypes (I – strains of Asian origin, II – strains of South American origin, III – strains identified in high-altitude regions of Africa, IV – strains from Indonesia, Japan and Australia), combining 23 sequenced strains. Since the genetic similarity of some groups of strains, assessed by DNA-DNA hybridization, was often less than 70%, Fegan and Prior (2005) proposed to consider *R. solanacearum* as a species complex.

In 2014, the taxonomy of the species complex *R. solanacearum sensu lato* was revised based on a combination of genomic and proteomic characteristics (Safni et al., 2014). The species complex was divided into 3 species: *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. emend. Safni et al., *Ralstonia pseudosolanacearum* Safni et al. and *Ralstonia syzygii* (Roberts et al.)

R. pseudosolanacearum (филотип I и III), *R. solanacearum* (филотип II) и *R. syzygii* (филотип IV) (Safni et al., 2014; EPPO, 2018; Ерохова, 2020). В соответствии с таксономическими изменениями группы, для корректировки Перечня карантинных объектов РФ, а позже и ЕАЭС, в 2018–2019 гг. был проведен анализ фитосанитарного риска новых видов для территории РФ. На основании литературных источников, а также проведенных авторами вегетационных опытов все 3 вида комплекса были признаны потенциально опасными для территории РФ и предложены к включению в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС (Шнейдер и др., 2021).

С помощью современных методов диагностики возбудитель бурой гнили впервые на территории РФ был выявлен Иркутским филиалом ФГБУ «ВНИИКР» в продовольственном картофеле из КНР в 2008 г.

Перехваты *R. solanacearum* в РФ были зафиксированы из следующих стран: Египет и КНР (с 2011 г. практически ежегодно), Индия (2011, 2015), Бангладеш (2014, 2015), Азербайджан (2017, 2021), Иран (2016, 2017, 2018), Грузия (2021). В 2016 г. в лабораторию Иркутского филиала от частного лица поступил образец бананов с симптомами «кровавой болезни». Исследования подтвердили присутствие возбудителя, относящегося к видовому комплексу *R. solanacearum sensu lato* и вызывающего «кровавую болезнь» в Индонезии и соседних островных государствах (<https://fsvps.gov.ru/fsvps/print/news/16317.html>). Риск проникновения различных видов комплекса на территорию ЕАЭС остается высоким, что требует обеспечения его надежного выявления в партиях подкарантинной продукции и при проведении обследования территории.

В 2018 г., в связи с реклассификацией видового комплекса *Ralstonia solanacearum sensu lato*, был выпущен обновленный Стандарт Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) РМ 7/21 (2) как для определения комплекса в целом, так и для дифференциальной диагностики штаммов, относящихся к вновь выделенным видам (EPPO, 2018). Российскими компаниями были разработаны готовые наборы для молекулярной диагностики возбудителя бурой гнили. Бактериологическая коллекция ФГБУ «ВНИИКР» была пополнена новыми коллекционными штаммами видового комплекса, близких видов, других патогенов картофеля, а также оригинальными изолятами, выделенными из лабораторных образцов. Таким образом, к настоящему времени возникла необходимость пересмотра используемых в аккредитованных лабораториях Россельхознадзора руководств по диагностике видов комплекса *R. solanacearum sensu lato*.

При исследовании образцов подкарантинной продукции на выявление микроорганизмов наиболее применимы тесты на основе полимеразной цепной реакции с флуоресцентной меткой (ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) или флуоресцентная амплификация с детекцией по конечной точке (FLASH)) (Завриев и др., 2007; Ребриков и др., 2009). Эти тесты сочетают потенциально высокие чувствительность, специфичность, скорость и производительность исполнения, а также универсальность оснащения лаборатории и производственных процессов, характерных для молекулярных

Vaneechoutte et al. The new division of species coincides with the previous classification of phylotypes: *R. pseudosolanacearum* (phylotype I and III), *R. solanacearum* (phylotype II) and *R. syzygii* (phylotype IV) (Safni et al., 2014; EPPO, 2018; Yerokhova, 2020). In accordance with the taxonomic changes of the group, in order to adjust the List of quarantine objects of the Russian Federation, and later the EAEU, in 2018–2019, a pest risk analysis of new species for the territory of the Russian Federation was carried out. Based on the literature, as well as the vegetation experiments carried out by the authors, all 3 species of the complex were recognized as potentially dangerous for the territory of the Russian Federation and were proposed for inclusion in the Common List of Quarantine Objects of the EAEU (Shneyder et al., 2021).

Using modern diagnostic methods, the causative agent of brown rot was first detected in the Russian Federation by the Irkutsk branch of FGBU “VNIICR” in food potatoes from the PRC in 2008.

R. solanacearum was reported in Russia from the following countries: Egypt and China (almost every year since 2011), India (2011, 2015), Bangladesh (2014, 2015), Azerbaijan (2017, 2021), Iran (2016, 2017, 2018), Georgia (2021). In 2016, the laboratory of the Irkutsk branch received a sample of bananas with symptoms of “blood disease” from an individual. The studies confirmed the presence of a pathogen belonging to the species complex *R. solanacearum sensu lato* and causing “blood disease” in Indonesia and neighboring island states (<https://fsvps.gov.ru/fsvps/print/news/16317.html>). The risk of introduction of various species of the complex into the territory of the EAEU remains high, which requires ensuring its reliable detection in batches of regulated products and during a survey of the territory.

In 2018, due to the reclassification of the species complex *Ralstonia solanacearum sensu lato*, an updated European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) PM 7/21 (2) Standard was released both for the definition of the complex as a whole and for the differential diagnosis of strains related to newly isolated species (EPPO, 2018). Russian companies developed ready-made kits for molecular diagnostics of the causative agent of brown rot. The bacteriological collection of the FGBU “VNIICR” was replenished with new collection strains of the species complex, related species, other potato pathogens, as well as original isolates isolated from laboratory samples. Thus, by now, it is necessary to revise the guidelines for diagnostics of the species of the complex *R. solanacearum sensu lato* used in the accredited laboratories of the Rosselkhoznadzor.

When examining samples of regulated products for the detection of microorganisms, tests based on a polymerase chain reaction with a fluorescent label (real-time PCR (RT-PCR) or fluorescent amplification-based specific hybridization (FLASH)) are most applicable (Zavriev et al., 2007; Rebrikov et al., 2009). These tests combine the potentially high sensitivity, specificity, speed and productivity of execution, as well as the versatility of laboratory equipment and

методов с пониженным риском контаминации продуктами амплификации по сравнению с классической ПЦР. Поэтому использование данных тестов для скрининга образцов в карантинных лабораториях остается приоритетным.

В соответствии с требованиями к тестам, используемым лабораториями, аккредитованными в соответствии со Стандартом ISO/IEC 17025 (Стандарт ISO/IEC 17025, 2017) и Стандартом ЕОКЗР РМ 7/98 (4) (EPPO, 2019) для лабораторий, специализирующихся на диагностике вредных организмов растений, необходимо использовать тесты, которые прошли процедуру оценки применимости (валидации) и признаны надежными и достоверными.

В связи с вышесказанным целью настоящего исследования стала оценка применимости тестов на основе ПЦР с флуоресцентной меткой с коммерческими наборами российских производителей для выявления (скрининга) генетического материала видов комплекса *R. solanacearum sensu lato* в растительных экстрактах для включения их в обновленные методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Испытания проводили на базе научно-методического отдела вирусологии и бактериологии и Испытательного лабораторного центра (ИЛЦ) ФГБУ «ВНИИКР» в соответствии с требованиями Стандарта ЕОКЗР РМ 7/98 (4) (EPPO, 2019).

Провели оценку применимости двух тестов на основе ПЦР-РВ с использованием следующих коммерческих наборов для амплификации: «*Ralstonia solanacearum*-РВ, раса 3 bv. 2 и раса 1 bv. 1» (ООО «Синтол») и «Буряя бактериальная гниль *Ralstonia solanacearum* Rt» (ООО «АгроДиагностика»), а также ревалидацию теста с набором «Буряя бактериальная гниль *Ralstonia solanacearum* F» в формате FLASH (ООО «АгроДиагностика»). Коммерческие наборы включают внутренний контроль амплификации (ВК), необходимый при работе с растительными экстрактами. Для выделения ДНК использовали коммерческий набор «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика»).

Амплификацию проводили в соответствии с инструкциями производителей наборов на оборудовании отечественного производства. Для теста в формате FLASH использовали термоциклер «Терцик» (ООО «ДНК-Технология»). Для тестов на основе ПЦР-РВ опыты по определению аналитической чувствительности (АЧ), аналитической специфичности (АС), селективности (С) и повторяемости (П) проводили на детектирующем амплификаторе «ДТ-лайт» (ООО «ДНК-Технология»). Для определения воспроизводимости (В) использовали приборы «ДТ-прайм» (ООО «ДНК-Технология») и «АНК-32» (ООО «Синтол»).

Опыты проводили с искусственно зараженными экстрактами растений-хозяев, полученными из смеси экстрактов, приготовленных согласно диагностическим стандартам (EPPO, 2004; СТО ВНИИКР 4.009-2013) при проведении исследования образцов в ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» и признанных чистыми. Экстракты с добавлением глицерина хранили при температуре -20°C . Основные опыты проводили с экстрактами клубней картофеля, селективность (С) определяли с использованием экстрактов роз и зеленых частей картофеля.

production processes, typical for molecular methods with a reduced risk of contamination by amplification products compared to classical PCR. Therefore, the use of these tests for screening of samples in quarantine laboratories remains a priority.

In accordance with the requirements for tests used by laboratories accredited in accordance with ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 17025, 2017) and EPPO Standard PM 7/98 (4) (EPPO, 2019) for laboratories specialized in the diagnosis of plant pests, it is necessary to use tests that have passed the procedure for assessing the applicability (validation) and are recognized as reliable.

Therefore, the purpose of this study was to assess the applicability of tests based on fluorescent label PCR with commercial kits of Russian manufacturers for the detection (screening) of the genetic material of the species complex *R. solanacearum sensu lato* in plant extracts for inclusion in the updated guidelines for the detection and identification of the pathogen.

MATERIALS AND METHODS

The tests were carried out on the basis of the Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology and the Testing Laboratory Center (TLC) of FGBU «VNIICR» in accordance with the requirements of EPPO Standard PM 7/98 (4) (EPPO, 2019).

The applicability of two RT-PCR-based tests using the following commercial amplification kits was evaluated: “*Ralstonia solanacearum*-RT, race 3 bv. 2 and race 1 bv. 1” (Syntol) and “Brown bacterial wilt *Ralstonia solanacearum* Rt” (AgroDiagnostika), as well as test revalidation with the kit “Brown bacterial wilt *Ralstonia solanacearum* F” in FLASH format (AgroDiagnostika). Commercial kits include an internal amplification control (IC) required when working with plant extracts. For DNA isolation, a commercial kit “Proba-GS” (AgroDiagnostika) was used.

Amplification was carried out in accordance with the instructions of the kit manufacturers using Russian equipment. For the test in FLASH format, a Tertsik thermal cycler (DNA-Technology) was used. For RT-PCR tests, experiments to determine analytical sensitivity (ASen), analytical specificity (AS), selectivity (S), and repeatability (R) were carried out on a qPCR machine DT-light (DNA-Technology). To determine reproducibility (Reprod), we used DT-Prime (DNA-Technology) and ANK-32 (Syntol) devices.

Experiments were carried out with artificially infected extracts of host plants obtained from a mixture of extracts prepared according to diagnostic standards (EPPO, 2004; STO VNIICR 4.009-2013) when examining samples at the TLC of FGBU «VNIICR» and recognized as pure. The extracts with the addition of glycerol were stored at -20°C . The main experiments were carried out with extracts of potato tubers; selectivity (S) was determined using extracts of roses and green parts of potatoes.

To determine ASen and AS, 6 strains from the French Collection of Microorganisms (CFBP) and 2 strains from the National Collection of Phytopathogenic Bacteria (NCPBP, Great Britain) belonging to the

Для определения АЧ и АС были использованы 6 штаммов из Французской коллекции микроорганизмов (CFBP) и 2 штамма из Национальной коллекции фитопатогенных бактерий (NCPBP, Великобритания), принадлежащие комплексу *R. solanacearum* s. l. (табл. 1, 2), в концентрации (10^1) 10^2 – 10^6 КОЕ/мл.

Кроме того, для оценки АС использовали штаммы из вышеуказанных коллекций, а также из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSM), коллекций Агентства безопасности продовольствия Финляндии (EVIRA), ФГБНУ ВНИИФ, ФГБУ «ВНИИКР» (VNIKR) и изоляты, выделенные авторами (DN). Использовали ДНК суспензий чистых культур *R. solanacearum* s. l., других штаммов, выделенных из растений картофеля, а также коллекционных штаммов бактерий сем. Burkholderiaceae, других семейств, а также патогенов, поражающих растения-хозяева. Для определения эндоспецифичности тестов на основе ПЦР-РВ были использованы 14 коллекционных штаммов видового комплекса *R. solanacearum* s. l. (табл. 1). Экзоспецифичность определяли с использованием 15 коллекционных штаммов, поражающих растения-хозяева: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (VNIKR 0139), *Dickeya chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* (DSM 4610), *D. dadantii* subsp. *dadantii* (DSM 18020), *D. dianthicola* (CFBP 3705), *D. solani* (DSM 28711), *D. zeae* (DSM 18068^T), *Dickeya* sp. (EVIRA DC 10, D-9 (VNIKR 0144), D-33 (VNIKR 0145), *D. fil.* (VNIKR 0146)), *Pectobacterium atrosepticum* (EVIRA ECA 2, DSM 18077^T, Pa393 (VNIKR 0143)), *P. wasabiae* (DSM 18074^T), *P. carotovorum* (DSM 30168^T), 7 штаммов сем. Burkholderiaceae: *Burkholderia cepacia* (CFBP 2227^T), *B. gladioli* pv. *gladioli* (CFBP 2427^{PT}), *B. graminis* (CFBP 6734^T), *B. plantarii* (CFBP 3997^T), *Paraburkholderia caryophylli* (CFBP 1370, CFBP 2429^T, CFBP 3819), а также 9 изолятов из пораженного картофеля: *Arthrobacter castelli* (VNIKR 0073 (ВНИИФ 1870)), VNIKR 0415, VNIKR 0416, DN 417, DN 418, DN 419-1, DN 419-2, DN 582, DN 583.

Дополнительно для определения АС были использованы данные предыдущих исследований. Для теста на основе ПЦР-РВ (ООО «Синтол») было проанализировано 16 нецелевых штаммов: *D. dianthicola* (D3B1, D3B2, D17), *D. dadanthii* (DFILL), *Dickeya* sp. (D33), *C. m.* subsp. *sepedonicus* (Cms 204, CMS1, CMS6889 (NCPBP 2137)), *C. m.* subsp. *michiganensis* (CM 4761 (CMM1), HE 11 (CMM2)), *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Sw4), *P. dispersa* (PD1), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (ICMP 9032, ICMP 9067); *Xanthomonas fragariae* (NCPBP 1469), *X. oryzae* pv. *oryzae* (NCPBP 3002) (Корнев, Копина, 2012).

Для определения эндоспецифичности теста в формате FLASH в предыдущих исследованиях (Дренова, Кузнецова, 2012) использовали более 40 изолятов *R. solanacearum* рас 1, 2 и 3, выделенных при проведении исследования образцов клубней картофеля из РФ, Египта, Индии и КНР в лаборатории бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», в Ленинградской и Краснодарской МВЛ, а также коллекционных штаммов. Коллекционные штаммы и основные изоляты приведены в таблице 1. Для определения экзоспецифичности использовали 31 нецелевой штамм: *Bacillus* sp., *C. m.* subsp. *sepedonicus* (Cms 204, CMS6889 (NCPBP 2137)), *C. m.* subsp. *michiganensis* (CM 4761 (CMM1), HE 11 (CMM2), Cmm Yu-1), *Dickeya chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* (DSM 4610), *D. c.* pv. *parthenii*

R. solanacearum s. l. (Tables 1, 2), at a concentration (10^1) 10^2 – 10^6 CFU/ml.

In addition, strains from the above collections, as well as from the German collection of microorganisms and cell cultures (DSM), collections of the Finnish Food Safety Agency (EVIRA), FGBNU «VNIIF», FGBU «VNIKR» and isolates obtained by the authors (DN). We used DNA of suspensions of pure cultures of *R. solanacearum* s. l., other strains isolated from potato plants, as well as collection strains of bacteria of the family Burkholderiaceae, other families, and host pathogens. To determine the endospecificity of RT-PCR-based tests, 14 collection strains of the species complex *R. solanacearum* s. l. were used (Table 1). Exospecificity was determined using 15 collection strains affecting host plants: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (VNIKR 0139), *Dickeya chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* (DSM 4610), *D. dadantii* subsp. *dadantii* (DSM 18020), *D. dianthicola* (CFBP 3705), *D. solani* (DSM 28711), *D. zeae* (DSM 18068^T), *Dickeya* sp. (EVIRA DC 10, D-9 (VNIKR 0144), D-33 (VNIKR 0145), *D. fil.* (VNIKR 0146)), *Pectobacterium atrosepticum* (EVIRA ECA 2, DSM 18077^T, Pa393 (VNIKR 0143)), *P. wasabiae* (DSM 18074^T), *P. carotovorum* (DSM 30168^T), 7 strains of the family Burkholderiaceae: *Burkholderia cepacia* (CFBP 2227^T), *B. gladioli* pv. *gladioli* (CFBP 2427^{PT}), *B. graminis* (CFBP 6734^T), *B. plantarii* (CFBP 3997^T), *Paraburkholderia caryophylli* (CFBP 1370, CFBP 2429^T, CFBP 3819), as well as 9 isolates from infected potatoes: *Arthrobacter castelli* (VNIKR 0073 (VNIIF 1870)), VNIKR 0415, VNIKR 0416, DN 417, DN 418, DN 419-1, DN 419-2, DN 582, DN 583.

Additionally, data from previous studies were used to determine AS. For the test based on RT-PCR (Syn- tol), 16 non-target strains were analyzed: *D. dianthicola* (D3B1, D3B2, D17), *D. dadanthii* (DFILL), *Dickeya* sp. (D33), *C. m.* subsp. *sepedonicus* (Cms 204, MCMS1, CMS6889 (NCPBP 2137)), *C. m.* subsp. *michiganensis* (CM 4761 (CMM1), HE 11 (CMM2)), *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Sw4), *P. dispersa* (PD1), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (ICMP 9032, ICMP 9067); *Xanthomonas fragariae* (NCPBP 1469), *X. oryzae* pv. *oryzae* (NCPBP 3002) (Kornev, Kopina, 2012).

To determine the endospecificity of the test in the FLASH format in previous studies (Drenova, Kuznetsova, 2012), more than 40 isolates of *R. solanacearum* races 1, 2, and 3 were used, isolated during the study of potato tuber samples from the Russian Federation, Egypt, India and China in the bacteriology laboratory of FGBU «VNIKR», in the Leningrad and Krasnodar Interregional Veterinary Laboratories, as well as collection strains. Collection strains and main isolates are shown in Table 1. To determine exospecificity, 31 non-target strains were used: *Bacillus* sp., *C. m.* subsp. *sepedonicus* (Cms 204, CMS6889 (NCPBP 2137)), *C. m.* subsp. *michiganensis* (CM 4761 (CMM1), HE 11 (CMM2), Cmm Yu-1), *Dickeya chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* (DSM 4610), *D. c.* pv. *parthenii* (NCPBP 516), *D. dianthicola* (D3B1, D3B2, D9, D17, D33), *Dickeya* sp. (D1, D8, D9B, D9Tr), *Micrococcus* sp., *Pantoea agglomerans* (DSM 1619, DSM 3493), *P. dispersa* (PD1), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (ICMP 9032,

(NCPPB 516), *D. dianthicola* (D3B1, D3B2, D9, D17, D33), *Dickeya* sp. (D1, D8, D9B, D9Tr), *Micrococcus* sp., *Pantoea agglomerans* (DSM 1619, DSM 3493), *P. dispersa* (PD1), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (ICMP 9032, ICMP 9067), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Bel-5, Dasch-1), *X. fragariae* (NCPPB 1469), *X. oryzae* (106, 6163, 8182), *X. oryzae* pv. *oryzae* (NCPPB 3002), *X. vesicatoria* (1111/B).

Опыты по определению С, П и В проводили с использованием штамма 0424 (*R. solanacearum* расы 3 bv. 2 CFBP 3857) в концентрации 5×10^2 КОЕ/мл в 6–10-кратной повторности.

Для приготовления искусственно зараженных экстрактов из суточных культур, выращенных на пептонно-дрожжевом глюкозном агаре (EPPO, 2004; СТО ВНИИКР 4.009-2013), готовили базовую суспензию с концентрацией 10^8 КОЕ/мл в 10-мМ фосфатном буфере (EPPO, 2004; СТО ВНИИКР 4.009-2013). Концентрацию густой суспензии определяли чашечным методом Коха (Егоров, 1995) и доводили до необходимого значения. Готовили растительные экстракты, зараженные возбудителями в необходимой концентрации.

Из экстрактов готовили образцы объемом 200 мкл. В качестве отрицательного контрольного образца выделения ДНК (ОКВ) использовали 200 мкл соответствующего чистого экстракта. На каждые 10 образцов использовали не менее одного ОКВ. В качестве положительного контрольного образца выделения (ПКВ) использовали 200 мкл зараженного экстракта с концентрацией 10^6 КОЕ/мл. Готовые экстракты и выделенную ДНК хранили при температуре -20°C .

Селективность (С) определяли путем сравнения значений В для разных субстратов. При этом недостоверные значения считали отрицательными как показатель влияния субстрата на эффективность теста. При определении В учитывали результаты опытов по определению АЧ, С и П. Недостоверные образцы тестировали повторно с разведением ДНК в воде для ПЦР (1 : 1). Положительные значения повторных тестов учитывали при определении П и В как критериев, отражающих диагностические возможности теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аналитическая специфичность (АС)

В ходе испытаний было показано, что тесты в формате ПЦР-РВ и FLASH с наборами ООО «Агро-Диагностика», содержащие идентичные олигонуклеотиды, позволяют выявлять генетический материал всех проанализированных штаммов и изолятов видового комплекса *R. solanacearum* s. l. Неспецифических реакций с нецелевыми штаммами не отмечено. Таким образом, АС тестов равна 100% (табл. 1).

Тест с набором ООО «Синтол» для выявления штаммов расы 3 bv. 2 и расы 1 bv. 1, в соответствии со спецификацией производителя, позволяет выявлять штаммы *R. solanacearum* расы 3 bv. 2. Кроме того, были получены слабые положительные реакции в одной из двух повторностей для суспензий чистых культур штамма 0421 (*R. syzygii* subsp. *indonesiensis* CFBP 7288) и типового штамма 0423 (*R. solanacearum* CFBP 2047^T), относящегося к bv. 1 не установленной расы (Ct 34,9 и 35,1 соответственно), что было оценено как отрицательный результат.

ICMP 9067), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Bel-5, Dasch-1), *X. fragariae* (NCPPB 1469), *X. oryzae* (106, 6163, 8182), *X. oryzae* pv. *oryzae* (NCPPB 3002), *X. vesicatoria* (1111/B).

Эксперименты по определению S, R и Reprod were carried out using strain 0424 (*R. solanacearum* race 3 bv. 2 CFBP 3857) at a concentration of 5×10^2 CFU/ml in 6–10 replicates.

To prepare artificially infected extracts from daily cultures grown on peptone-yeast glucose agar (EPPO, 2004; STO VNIKR 4.009-2013), a base suspension with a concentration of 10^8 CFU/ml in 10-mM phosphate buffer was prepared (EPPO, 2004; STO VNIKR 4.009-2013). The concentration of the thick suspension was determined by the Koch plate method (Egorov, 1995) and adjusted to the required value. Prepared plant extracts infected with pathogens in the required concentration.

Samples with a volume of 200 μL were prepared from the extracts. As a negative control sample of DNA extraction (NCS), 200 μL of the corresponding pure extract was used. For every 10 samples, at least one RCW was used. As a positive control sample of isolation (PCSI), we used 200 μL of contaminated extract with a concentration of 10^6 CFU/ml. The prepared extracts and isolated DNA were stored at -20°C .

Selectivity (S) was determined by comparing Reprod values for different substrates. In this case, unreliable values were considered negative as an indicator of the influence of the substrate on the effectiveness of the test. When determining Reprod, we took into account the results of experiments to determine ASen, S, and R. Invalid samples were retested with a dilution of DNA in water for PCR (1 : 1). Positive values of repeated tests were taken into account when determining R and Reprod as criteria reflecting the diagnostic capabilities of the test.

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical specificity (AS)

During the tests, it was shown that the tests in the RT-PCR and FLASH format with AgroDiagnostika kits containing identical oligonucleotides make it possible to identify the genetic material of all analyzed strains and isolates of the species complex *R. solanacearum* s. l. There were no nonspecific reactions with non-target strains. Thus, the AS of tests is 100% (Table 1).

Test with a Syntol kit for the detection of strains of race 3 bv. 2 and races 1 bv. 1, in accordance with the manufacturer's specification, allows the detection of strains of *R. solanacearum* race 3 bv. 2. In addition, weak positive reactions were obtained in one of two replicates for suspensions of pure cultures of strain 0421 (*R. syzygii* subsp. *indonesiensis* CFBP 7288) and species strain 0423 (*R. solanacearum* CFBP 2047^T), belonging to bv. 1 of unknown race (Ct 34.9 and 35.1, respectively), which was assessed as a negative result. In experiments to determine ASen with strains not belonging to the race 3 bv. 2, negative results were obtained for samples with a concentration of 10^2 – 10^6 CFU/ml (Table 1). There were no nonspecific reactions with non-target strains. Thus, our studies have shown

Таблица 1
Аналитическая специфичность тестов в форматах ПЦР-РВ и FLASH с отечественными коммерческими наборами для выявления видов комплекса *Ralstonia solanacearum sensu lato* в растительном экстракте

Штаммы видового комплекса <i>Ralstonia solanacearum sensu lato</i>										Результаты тестирования		
№ п/п	Номер в ВНИИКР	Номер в других коллекциях	Вид	Характеристика штамма	Растение-хозяин	Страна изоляции	Год изоляции	ПЦР-РВ, Ст		FLASH	«Агродиагностика» «Синтол»	
1	0005	FRs 5	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Египет	2011		+	+	x	17,9
2	0012	FRs 12	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Египет	2011		+	+	x	19,31
3	0021	FRs 21	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Индия	2011		+	+	x	18,07
4	0022	FRs 22	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Индия	2011		+	+	x	19,89
5	0023	FRs 23	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Индия	2011		+	+	x	16,83
6	0024	FRs 24	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Индия	2011		+	+	x	17,77
7	0030	FRs I-1	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Phyl. I, race 1, bv. 4	<i>S. tuberosum</i>	Китай	2011		+	17,3		–
8	0031	FRs I-2	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Phyl. I, race 1, bv. 4	<i>S. tuberosum</i>	Китай	2011		+	+	x	–
9–14	0033–38	MRS1–MRS6	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Россия	2011		+	+	x	x
15	0039	NCPPB 2315	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. I, race 2, bv. 1	<i>Musa</i> sp.	Перу	1970		+	17,1		–
16	0040	NCPPB 2316	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Австралия	1970		+	14,7		23,8 ³
17	0042	АОБС PPSCD 1071	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Венгрия	1999		+	21,3		16,6
18	0136	–	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Китай	2013		+	20,0		17,0
19	0209	–	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Бангладеш	2014		+	18,7		15,6
20	0249	–	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Россия	2015		x ¹	17,2		15,8
21	0303	–	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Азербайджан	2017		x	16,0		14,0
22	0421	CFBPR 7288	<i>R. syzygii</i> subsp. <i>indonesiensis</i>	Phyl. IV, sequevar 10	<i>S. lycopersicum</i>	Индонезия	1999		8,73 ²	31,0		34,8 ⁴
23	0422	CFBPR 6442	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Race 5, bv. 5	<i>Morus alba</i>	Китай	–		10,60	30,5		–
24	0423	CFBPR 2047 [†]	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, bv. 1	<i>S. lycopersicum</i>	США	1953		9,68	15,5		35,1 ⁴
25	0424	CFBPR 3857	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Нидерланды	1995		11,70	20,8		11,22
26	0425	CFBPR 1412	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 2, bv. 1	<i>Musa</i> sp.	Колумбия	1965		13,20	32,0		–
27	0499	CFBPR 6424	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Phyl. I, race 1, bv. 3	<i>S. lycopersicum</i>	Французская Гвинея	–		11,50	29,8 ³		–

¹ Исследования не проводились.

² Относительные единицы флуоресценции в сравнении с фоновыми образцами (ОФ).

³ Значение порогового цикла указано для концентрации 10⁶ КОЕ/мл.

⁴ Результаты получен в одной из двух повторностей для суспензий чистых культур с концентрацией около 10⁹ КОЕ/мл.

– положительный результат
 – отрицательный результат

Table 1
Analytical specificity of tests in RT-PCR and FLASH formats with Russian commercial kits to identify species of the *Ralstonia solanacearum sensu lato* complex in plant extract

Strains of *Ralstonia solanacearum sensu lato* complex species

№	Number in the VNIIR collection	Number in other collections	Species	Strain characteristics	Host Plant	Isolation country	Isolation year	Test results		
								FLASH	AgroDiagnostika	Syntol
1	0005	FRs 5	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Egypt	2011	+	x	17.9
2	0012	FRs 12	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Egypt	2011	+	x	19.31
3	0021	FRs 21	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	India	2011	+	x	18.07
4	0022	FRs 22	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	India	2011	+	x	19.89
5	0023	FRs 23	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	India	2011	+	x	16.83
6	0024	FRs 24	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	India	2011	+	x	17.77
7	0030	FRs I-1	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Phyl. I, race 1, bv. 4	<i>S. tuberosum</i>	China	2011	+	17.3	–
8	0031	FRs I-2	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Phyl. I, race 1, bv. 4	<i>S. tuberosum</i>	China	2011	+	x	–
9–14	0033–38	MRs1–MRs6	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Russia	2011	+	x	x
15	0039	NCPBP 2315	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. I, race 2, bv. 1	<i>Musa</i> sp.	Peru	1970	+	17.1	–
16	0040	NCPBP 2316	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Australia	1970	+	14.7	23.8 ³
17	0042	AOBC PPSCD 1071	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Hungary	1999	+	21.3	16.6
18	0136	–	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	China	2013	+	20.0	17.0
19	0209	–	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Bangladesh	2014	+	18.7	15.6
20	0249	–	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Russia	2015	x ¹	17.2	15.8
21	0303	–	<i>R. solanacearum</i>	Race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Azerbaijan	2017	x	16.0	14.0
22	0421	CFBP 7288	<i>R. syzygii</i> subsp. <i>indonesiensis</i>	Phyl. IV, sequevar 10	<i>S. lycopersicum</i>	Indonesia	1999	8.73 ²	31.0	34.8 ⁴
23	0422	CFBP 6442	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Race 5, bv. 5	<i>Morus alba</i>	China	–	10.60	30.5	–
24	0423	CFBP 2047 ^T	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, bv. 1	<i>S. lycopersicum</i>	USA	1953	9.68	15.5	35.1 ⁴
25	0424	CFBP 3857	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 3, bv. 2	<i>S. tuberosum</i>	Netherlands	1995	11.70	20.8	11.22
26	0425	CFBP 1412	<i>R. solanacearum</i>	Phyl. II, race 2, bv. 1	<i>Musa</i> sp.	Colombia	1965	13.20	32.0	–
27	0499	CFBP 6424	<i>R. pseudosolanacearum</i>	Phyl. I, race 1, bv. 3	<i>S. lycopersicum</i>	French Guiana	–	11.50	29.8 ³	–

¹ No studies have been carried out.

² The relative units of fluorescence versus background samples.

³ The cycle threshold value is indicated for a concentration of 10⁶ CFU/ml.

⁴ The result was obtained in one of two replicates for suspensions of pure cultures with a concentration of about 10⁹ CFU/ml.

– positive result
– negative result

Таблица 2

Аналитическая чувствительность тестов в формате ПЦР-РВ и FLASH с отечественными коммерческими наборами для выявления возбудителей видов комплекса *Ralstonia solanacearum sensu lato* в растительном экстракте¹

Table 2

Analytical sensitivity of RT-PCR and FLASH tests with Russian commercial kits for detecting pathogens of the *Ralstonia solanacearum sensu lato* species complex in plant extract¹

		Виды комплекса <i>Ralstonia solanacearum sensu lato</i> Species of <i>Ralstonia solanacearum sensu lato</i> complex																						
Конц., КОЕ/мл Conc, CFU/ml		<i>Ralstonia solanacearum</i>															<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>					<i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>indone-siensis</i>		
		раса 3 биовар 2 race 3 biovar 2										биовар 1 biovar 1					раса 5 биовар 5 race 5 biovar 5		раса 1 биовар 3 race 1 biovar 3					
Штамм Strain		0040 NCPBPB 2316					0424 CFBP 3857					0039 NCPBPB 2315		0423 CFBP 2047 [†]		0425 CFBP 1412		0422 CFBP 6442		0499 CFBP 6424			0421 CFBP 7288	
Тест Test		FLASH ²	Агрод РВ ² RT Agrod ²	Синтол РВ ² RT Syntol ²	Агрод РВ ³ RT Agrod ³	FLASH	Агрод РВ RT Agrod	Синтол РВ RT Syntol	FLASH ⁴	Агрод РВ ⁴ RT Agrod ⁴	Синтол РВ ⁴ RT Syntol ⁴	FLASH	Агрод РВ RT Agrod	FLASH	Агрод РВ RT Agrod	FLASH	Агрод РВ RT Agrod	FLASH	Агрод РВ RT Agrod	Агрод РВ ⁵ RT Agrod ⁵	FLASH	Агрод РВ RT Agrod		
10 ¹		1,03	x ⁶	x	38,9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
		0,99	–	–	39,5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
		4,67	41,8	32,1	39,2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
10 ²		6,35	36,3	31,5	36,3	1,12	–	–	0,95	–	–	3,00	36,2	0,99	–	1,15	–	1,08	–	1,06	–	–	0,97	–
		7,93	38,0	32,5	36,3	1,03	36,7	–	3,09	–	–	1,32	36,8	2,94	–	1,19	–	1,11	–	1,09	–	–	0,98	–
		4,46	36,2	32,4	36,6	4,93	37,9	33,4	4,05	36,8	–	5,75	36,4	4,36	39,0	1,09	37,8	4,07	38,5	1,15	–	–	1,03	–
10 ³		8,99	33,3	30,1	34,0	9,28	35,1	31,9	7,57	34,4	33,1	8,14	32,7	4,28	–	4,80	36,5	4,42	39,5	3,45	–	–	1,01	–
		10,10	33,2	30,1	34,3	9,14	35,3	32,7	2,72	34,3	32,0	7,67	33,1	5,78	35,9	4,96	36,2	6,32	36,4	6,40	–	–	1,10	–
		10,30	32,7	30,1	34,1	8,56	35,1	31,6	7,56	35,3	32,0	7,84	33,0	5,76	37,9	6,81	36,5	6,37	35,8	5,25	–	–	0,95	–
10 ⁴		10,20	29,8	27,2	35,6	10,70	31,3	29,4	9,19	30,8	29,6	10,0	29,8	6,26	32,2	9,70	33,3	6,89	34,7	2,72	–	–	5,94	36,5
		10,70	29,8	27,7	34,1	10,80	31,8	29,2	9,67	31,4	29,6	9,76	29,7	8,49	31,8	9,91	33,4	8,07	33,9	5,38	36,6	37,8	9,06	36,1
10 ⁶		11,60	23,8	20,8	26,9	11,70	25,0	22,3	9,42	24,8	23,1	9,84	23,0	9,68	25,7	13,20	26,3	10,60	26,4	11,50	29,8	31,6	8,73	30,2

¹ Для *R. solanacearum* bv. 1 (CFBP 2047^T), *R. pseudosolanacearum* (CFBP 6442) и *R. syzygii* (CFBP 7288) получены отрицательные результаты теста с набором ООО «Синтол» (не приведены).

² Для теста на основе FLASH данные представлены в относительных единицах флуоресценции относительно фоновых образцов; для ПЦР-РВ указан Ct.

³ Опыт проведен с независимо приготовленными образцами. ДНК каждой концентрации была выделена в 1-кратной повторности, амплификация – в 3-кратной. Для концентрации 10⁶ КОЕ/мл приведено среднее значение повторностей, для концентрации 10⁴ КОЕ/мл – крайние значения повторностей.

⁴ Повторная амплификация после хранения при –20 °С.

⁵ Повторное выделение ДНК из искусственно зараженных экстрактов, хранившихся при –20 °С.

⁶ Исследования не проводились.

– положительный результат
– отрицательный результат
– недостоверный результат

¹ For *R. solanacearum* bv. 1 (CFBP 2047^T), *R. pseudosolanacearum* (CFBP 6442) and *R. syzygii* (CFBP 7288) – negative test results with a Syntol kit (not shown).

² For the FLASH-based test, data are presented in relative fluorescence units relative to background samples; for RT-PCR, Ct is indicated.

³ The experiment was carried out with independently prepared samples. DNA of each concentration was isolated in 1-fold replication, amplification – in 3-fold. For a concentration of 10⁶ CFU/ml, the average value of replicates is given, for a concentration of 10⁴ CFU/ml – the extreme values of replicates.

⁴ Re-amplification after storage at –20 °С.

⁵ Re-isolation of DNA from artificially contaminated extracts stored at –20 °С.

⁶ No studies have been carried out.

– positive result
– negative result
– unreliable result

В опытах по определению АЧ со штаммами, не относящимися к расе 3 bv. 2, были получены отрицательные результаты для образцов с концентрацией 10^2 – 10^6 КОЕ/мл (табл. 1). Неспецифических реакций с нецелевыми штаммами не отмечено. Таким образом, в наших исследованиях показана высокая специфичность теста к *R. solanacearum* расы 3 bv. 2. Вопрос о заявленной производителем возможности выявлять *R. solanacearum* расы 1 bv. 1 с помощью данного теста не изучался.

Аналитическая чувствительность (АЧ)

В опытах по определению аналитической специфичности (АС) было отмечено, что для некоторых штаммов видового комплекса *R. solanacearum* s. l. значения порогового цикла существенно отличались от характерного показателя для суспензий чистых культур, составлявшего около 15–20, и находились на отметке от 30,5 до 32,0 (табл. 1). В связи с этим было выдвинуто предположение о возможной зависимости АЧ тестов от вида и/или штамма патогена, что ранее было описано для теста на основе LAMP по Lenarčič et al. (2014), включенного в Стандарт РМ 7/21 (2) (ЕРРО, 2018). Опыты были проведены с восьмью коллекционными штаммами видового комплекса. Результаты представлены в таблице 2.

Для штаммов *R. solanacearum* расы 3 bv. 2 АЧ всех испытываемых тестов была практически одинакова для каждого из штаммов, но различалась между штаммами. Так, для штамма 0040 (NCPPB 2316) АЧ составила 10^1 – 10^2 КОЕ/мл, тогда как для штамма 0424 (CFBP 3857) АЧ была на порядок ниже и составила 10^2 – 10^3 КОЕ/мл.

АЧ тестов с наборами производства ООО «АгроДиагностика» к трем штаммам *R. solanacearum* bv. 1 и *R. pseudosolanacearum* bv. 5 также составила 10^2 – 10^3 КОЕ/мл. Для штамма *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* АЧ не отличалась для обоих тестов, однако составила только 10^4 КОЕ/мл, что указывает на меньшее сродство тест-систем к данному штамму.

В отличие от штаммов, описанных выше, АЧ тестов с наборами производства ООО «АгроДиагностика» в разных форматах значительно отличалась для штамма 0499 *R. pseudosolanacearum* bv. 3 (CFBP 6424). АЧ теста в формате FLASH составила 10^3 КОЕ/мл, тогда как для ПЦР-РВ значение критерия, полученное при тестировании двух серий искусственно зараженных экстрактов, составило лишь 10^4 – 10^5 КОЕ/мл.

Отмечено, что для тестов со штаммами 0039 (NCPPB 2315) и 0040 (NCPPB 2316), полученными из Британской национальной коллекции фитопатогенных бактерий, АЧ была выше, чем с другими штаммами этих же групп. Так, для штамма 0039 положительные результаты тестов с наборами ООО «АгроДиагностика» в формате FLASH и ПЦР-РВ были получены соответственно для 67–100% образцов с низкой концентрацией – 10^2 КОЕ/мл. При этом для других штаммов положительные результаты при данной концентрации были получены для 33–67% и 0–33% образцов.

Особый интерес представляют результаты опытов по определению АЧ всех испытываемых тестов со штаммом 0040, составившей 10^1 – 10^2 КОЕ/мл, как указано выше.

Согласно расчетам, при выделении ДНК из 200 мкл экстракта с получением 100 мкл очищенной ДНК и при использовании для амплификации 5 мкл, единичные копии цели будут

а high specificity of the test for *R. solanacearum*, race 3 bv. 2. The question of the manufacturer's declared ability to detect *R. solanacearum* race 1 bv. 1 not studied with this test.

Analytical sensitivity (ASen)

In experiments to determine analytical specificity (AS), it was noted that for some strains of the species complex *R. solanacearum* s. l. the values of the threshold cycle significantly differed from the characteristic indicator for suspensions of pure cultures, which was about 15–20, and ranged from 30.5 to 32.0 (Table 1). In this regard, a hypothesis was put forward about the possible dependence of ASen tests on the species and/or strain of the pathogen, which was previously described for the LAMP-based test according to Lenarčič et al. (2014) included in Standard RM 7/21 (2) (EPPO, 2018). The experiments were carried out with eight collection strains of the species complex. The results are presented in Table 2.

For strains of *R. solanacearum* race 3 bv. 2, the ASen of all the tested tests was practically the same for each of the strains, but differed among the strains. Thus, for the 0040 (NCPPB 2316) strain, the ASen was 10^1 – 10^2 CFU/ml, while for the 0424 (CFBP 3857) strain, the ASen was quite lower and amounted to 10^2 – 10^3 CFU/ml.

ASen tests with AgroDiagnostika kits for three strains *R. solanacearum* bv. 1 and *R. pseudosolanacearum* bv. 5 was also 10^2 – 10^3 CFU/ml. For the strain *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* ASen did not differ for both tests, however, it was only 10^4 CFU/ml, which indicates a lower affinity of test systems for this strain.

Unlike the strains described above, the ASen tests with AgroDiagnostika kits in different formats differed significantly for the 0499 *R. pseudosolanacearum* bv. 3 (CFBP 6424). The ASen test in the FLASH format was 10^3 CFU/ml, while for RT-PCR the criterion value obtained when testing two series of artificially infected extracts was only 10^4 – 10^5 CFU/ml.

It was noted that for tests with strains 0039 (NCPPB 2315) and 0040 (NCPPB 2316) obtained from the British National Collection of Phytopathogenic Bacteria, the ASen was higher than with other strains of the same groups. Thus, for strain 0039, positive test results with AgroDiagnostika kits in FLASH and RT-PCR format were obtained, respectively, for 67–100% of samples with a low concentration – 10^2 CFU/ml. Moreover, for other strains, positive results at this concentration were obtained for 33–67% and 0–33% of the samples.

Of particular interest are the results of experiments to determine the ASen of all tested tests with strain 0040, which amounted to 10^1 – 10^2 CFU/ml, as indicated above.

According to calculations, when DNA is isolated from 200 µl of the extract to obtain 100 µl of purified DNA and when 5 µl is used for amplification, single copies of the target will react at a concentration of at least 2×10^2 CFU/ml, i. e., the ASen of an effective test is theoretically should be 10^2 – 10^3 CFU/ml. Such values of the working criterion were obtained for most of the strains in this study, as well as when validating tests with similar kits of these companies to identify the causative

попадать в реакцию при концентрации не менее 2×10^2 КОЕ/мл, т. е. АЧ эффективного теста теоретически должна составить 10^2 – 10^3 КОЕ/мл. Такие значения рабочего критерия получены для большинства штаммов в данном исследовании, а также при проведении валидации тестов с аналогичными наборами этих компаний для выявления возбудителя ожога плодовых культур *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. (Дренова, 2019).

Устойчивое превышение расчетного показателя АЧ указывает на копийность целевого фрагмента в образце, которое может быть вызвано прочным сцеплением клеток, приводящим к ошибке в определении концентрации искусственно зараженных экстрактов. Также возможно наличие копий цели в геноме клеток, например, в случае ее расположения в плазмидной ДНК.

Повторяемость (П), воспроизводимость (В) и селективность (С)

Для определения рабочих критериев повторяемости (П) и воспроизводимости (В) тестов с наборами ООО «АгроДиагностика», признанных в предыдущих опытах универсальными к штаммам видового комплекса *R. solanacearum* s. l., выбрали 3 штамма, относящихся к разным группам и показавших близкие значения АЧ (10^2 – 10^3 КОЕ/мл) (табл. 3, 4).

Повторяемость теста в формате FLASH для штамма 0422 (*R. pseudosolanacearum* CFBP 6442) варьировала от 20 до 90%. Воспроизводимость составила 47%. Для штамма 0423 (*R. solanacearum* bv. 1 CFBP 2047^T) значение П составило 80–100%, В – 93%. Рабочие критерии зависели от оператора и, возможно, от условий хранения образцов (табл. 3).

Повторяемость теста в формате ПЦР-РВ с набором ООО «АгроДиагностика» для штамма 0422 варьировала от 10 до 70%. Воспроизводимость составила 50%. Для штамма 0423 П составила 70–100%, В – 86%. Рабочие критерии зависели от оператора, прибора и, возможно, от условий хранения образцов (табл. 3).

Кроме того, рабочие критерии П, В и С для всех тестов были определены с использованием штамма 0424 *R. solanacearum* CFBP 3857 расы 3 bv. 2 (табл. 4, 5, 6).

Для теста в формате FLASH были получены высокие значения П – 90–100% и В – 95%. Для экстрактов роз значения П и В на уровне 100% были близки к значениям, полученным с экстрактами картофеля. Однако для экстрактов роз в одной из повторностей отмечены значительно более низкие значения ВК и недостоверный результат в одном из образцов, что указывает на возможные трудности при очистке ДНК из данного субстрата. Достоверно положительный результат получен в 92% образцов экстрактов роз (табл. 4).

Для теста на основе ПЦР-РВ с набором ООО «АгроДиагностика» для экстрактов клубней картофеля показана высокая П с использованием прибора «ДТ-лайт» (90–100%), однако для прибора «АНК-32» этот показатель составил лишь 30%. В опыте с экстрактами вегетативных частей картофеля значения П для разных приборов не отличались (90%), однако значения пороговых циклов (34,5–37,9 и 39,4–41,82 соответственно) также указывали на более высокую эффективность реакции на приборе «ДТ-лайт». Таким образом, значение В теста на приборе «ДТ-лайт» составило 93%,

agent of fireblight *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. (Дренова, 2019).

A persistent excess of the calculated ASen index indicates the copy number of the target fragment in the sample, which can be caused by strong adhesion of cells, leading to an error in determining the concentration of artificially infected extracts. It is also possible that copies of the target are present in the cell genome, for example, in the case of its location in plasmid DNA.

Repeatability (R), reproducibility (Reprod) and selectivity (S)

To determine the working criteria of repeatability (R) and reproducibility (Reprod) of tests with AgroDiagnostika kits recognized in previous experiments as universal to the strains of the species complex *R. solanacearum* s. l., chose 3 strains belonging to different groups and showing similar values of ASen (10^2 – 10^3 CFU/ml) (Tables 3, 4).

The repeatability of the FLASH test for strain 0422 (*R. pseudosolanacearum* CFBP 6442) varied from 20 to 90%. The reproducibility was 47%. For strain 0423 (*R. solanacearum* bv. 1 CFBP 2047^T), the R value was 80–100%, Reprod – 93%. The performance criteria depended on the operator and possibly on the storage conditions of the samples (Table 3).

The repeatability of the test in the RT-PCR format with AgroDiagnostika kit for the strain 0422 varied from 10 to 70%. The reproducibility was 50%. For strain 0423, R was 70–100%, Reprod – 86%. The performance criteria depended on the operator, the instrument, and possibly the storage conditions of the samples (Table 3).

In addition, the performance criteria R, Reprod and S for all the tests were determined using strain 0424 *R. solanacearum* CFBP 3857 race 3 bv. 2 (Tables 4, 5, 6).

For the test in FLASH format, high values of R – 90–100% and Reprod – 95% were obtained. For rose extracts, the R and Reprod values at the 100% level were close to the values obtained with potato extracts. However, for rose extracts in one of the replicates, significantly lower internal control of PCR (IC) values and an unreliable result in one of the samples were noted, which indicates possible difficulties in DNA purification from this substrate. A reliably positive result was obtained in 92% of the samples of rose extracts (Table 4).

For a test based on RT-PCR with an AgroDiagnostika kit for potato tuber extracts, a high R was shown using the DT-light machine (90–100%), but for the ANK-32 device this figure was only 30%. In the experiment with extracts of vegetative parts of potatoes, the R values for different devices did not differ (90%), however, the values of the threshold cycles (34.5–37.9 and 39.4–41.82, respectively) also indicated a higher reaction efficiency on the DT-light machine. Thus, the Reprod value of the test on the DT-light machine was 93%, and taking into account the experience on the ANK-32 amplifier – 62%. Selectivity in relation to rose extracts in comparison with extracts of tubers and vegetative parts of potatoes, as well as for the test in the FLASH

Таблица 3

Повторяемость и воспроизводимость тестов в формате FLASH и ПЦР-РВ с коммерческими наборами ООО «АгроДиагностика»

Table 3

Repeatability and reproducibility of FLASH and RT-PCR tests with commercial AgroDiagnostika kits

№ п/п №	FLASH, ОФ ¹ FLASH, RF ¹			ПЦР-РВ, Ct RT-PCR, Ct					
	Терцик Tertsik			ДТ-лайт DT-light			ДТ-прайм DT-prime		
	оператор 1 operator 1	оператор 2 operator 2		оператор 1 operator 1	оператор 2 operator 2				
	Повторность Repetition	1	2 ²	3 ²	1	2 ²	3 ²	2	3
0422 <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> CFBP 6442									
1	5,77	0,91	0,94	36,4	38,1	–	–	–	
2	4,80	1,63	3,56	–	–	–	39,2	39,0	
3	1,06	5,26	0,93	36,7	–	–	39,0	37,8	
4	5,43	4,41	1,53	38,7	37,2	37,9	38,6	–	
5	5,10	0,97	1,37	38,4	–	–	38,8	38,9	
6	4,35	3,39	3,67	–	–	–	39,5	38,9	
7	4,62	0,94	1,07	–	37,6	–	–	38,9	
8	3,33	0,98	0,98	38,7	38,0	–	38,8	–	
9	4,68	0,86	0,99	–	39,4	–	39,0	39,1	
10	5,08	0,93	1,01	–	–	–	–	37,7	
П R	90%	30%	20%	50%	50%	10%	70%	70%	
B Reprod	47%			36,7%			70%		
				50%					
0423 <i>Ralstonia solanacearum</i> bv. 1 CFBP 2047 ^T									
1	6,46	1,22	6,64	36,0	36,3	36,1	36,3	–	
2	5,49	6,12	5,55	36,7	37,8	39,8	–	39,0	
3	7,26	5,23	4,81	37,2	35,9	37,5	37,2	37,8	
4	8,18	6,72	6,95	36,5	–	–	38,6	–	
5	6,40	5,82	1,04	35,3	–	40,1	37,8	38,9	
6	3,65	6,56	4,23	37,4	37,5	36,6	38,7	38,9	
7	8,10	0,98	2,19	36,7	36,8	37,3	38,5	38,9	
8	2,06 ³	4,36	5,88	37,8	39,1	37,1	38,7	–	
9	4,64	2,85	1,37	38,8	40,6	–	–	39,1	
10	6,18	4,97	3,76	38,3	38,2	36,0	38,7	37,7	
П R	100%	80%	80%	100%	80%	80%	80%	70%	
B Reprod	93%			87%			75%		
				86%					

¹ ОФ – относительные единицы флуоресценции по сравнению с фоновыми образцами.

² Амплификация проведена после хранения выделенной ДНК при –20 °С.

³ Пограничный результат оценен как положительный, т. к. на практике такие образцы должны быть протестированы повторно с увеличением объема образца.

– положительный результат – отрицательный результат – пограничный результат

¹ RF – relative units of fluorescence compared to background samples.

² Amplification was carried out after storage of the isolated DNA at –20 °C.

³ The borderline result is assessed as positive, since in practice such samples must be retested with increasing sample volume.

– positive result – negative result – borderline result

Таблица 4
Селективность, повторяемость и воспроизводимость теста в формате FLASH с коммерческим набором ООО «АгроДиагностика»¹

Table 4
Selectivity, repeatability and reproducibility of the test in FLASH format with a commercial AgroDiagnostika kit¹

Растительный экстракт Plant extract	Результаты (относительные единицы флуоресценции, ОФ) Results (relative units of fluorescence, RF)							
	Клубни картофеля Potato tubers				Розы Roses			
	1		2		1		2	
Повторность Repetition	Цель Target	ВК IC	Цель Target	ВК IC	Цель Target	ВК IC	Цель Target	ВК IC
1	6,22	11,10	6,58	11,70	5,12	4,30	6,31	15,90
2	5,48	10,70	5,96	11,50	2,53	0,75	6,02	14,00
3	0,97	13,10	5,92	11,60	3,45 ²	0,92	7,20	14,30
4	6,79	11,0	4,44	11,40	5,91	0,82	6,49	13,90
5	6,80	12,0	5,15	12,40	6,78	2,32	7,13	10,80
6	5,68	11,20	6,60	12,10	4,58	0,79	6,97	10,50
7	5,95	11,30	5,94	12,10				
8	4,65	10,30	4,40	11,50				
9	4,13	12,50	5,99	12,50				
10	6,15	12,12	6,73	12,00				
П R	90%		100%		100%		100%	
С S	95%				92%			
В Reprod	95%				100%			
В общая Reprod total	97,5%							

¹ Для опытов использовали коллекционный штамм 0424 *R. solanacearum* CFBP 38572.

² Результат получен в дополнительной реакции с разведением ДНК образца в воде для ПЦР (1 : 1).

¹ Collection strain 0424 *R. solanacearum* CFBP 38572 was used for the experiments.

² The result was obtained in an additional reaction with a dilution of the DNA sample in water for PCR (1: 1).

а с учетом опыта на амплификаторе «АНК-32» – 62%. Селективность в отношении экстрактов роз в сравнении с экстрактами клубней и вегетативных частей картофеля, как и для теста в формате FLASH, проявилась в ингибировании ВК и получении недостоверных результатов (табл. 5, рис. «Протокол опыта по определению селективности теста ПЦР-РВ с набором ООО «АгроДиагностика»).

Для оценки влияния амплификатора на В и уточнения АЧ с использованием прибора «АНК-32», дополнительно провели опыт с ранее выделенной ДНК экстрактов, инокулированных разными штаммами возбудителя в более высокой концентрации – 10³ КОЕ/мл. Для амплификации использовали по 2 образца ДНК каждого штамма, показавших положительный результат на приборе «ДТ-лайт».

В пределах АЧ, составившей 10³ КОЕ/мл, П теста на приборе «АНК-32» составила 75%, В с учетом данных двух приборов – 87,5%. Значения пороговых циклов как цели, так и ВК образцов были значительно ниже на детектирующем амплификаторе

format, manifested itself in the inhibition of IC and obtaining unreliable results (Table 5, Fig. “Experimental protocol for determining the selectivity of the RT-PCR test with AgroDiagnostika kit”).

To assess the influence of the amplifier on Reprod and refine the ASen using the ANK-32, we additionally conducted an experiment with previously isolated DNA extracts inoculated with different strains of the pathogen at a higher concentration – 10³ CFU/ml. For amplification, 2 DNA samples of each strain were used, which showed a positive result on the DT-light.

Within the ASen, which amounted to 10³ CFU/ml, the R of the test on the ANK-32 was 75%, Reprod, taking into account these two devices – 87.5%. The values of the threshold cycles of both the target and the IC of the samples were significantly lower on the qPCR machine DT-light in comparison with ANK-32 (Table 6).

Таблица 5

Селективность, повторяемость и воспроизводимость теста ПЦР-РВ с коммерческим набором ООО «АгроДиагностика»¹

Table 5

Selectivity, repeatability and reproducibility of the RT-PCR test with a commercial AgroDiagnostika kit¹

Растительный экстракт Plant extract	Результаты, Ct Results, Ct									
	Клубни картофеля Potato tubers				Вер. части картофеля Veg. parts of potatoes			Розы Roses		
Прибор Device	ДТ-лайт DT-light		АНК-32 ANK-32		ДТ-лайт DT-light		АНК-32 ANK-32		ДТ-лайт DT-light	
Повторность Repetition	1	2	3	1	1	2	3	1 ²	2 ²	3
1	36,0	35,7	35,8	–	36,2	35,8	41,45	35,5	37,1	37,6
2	36,3	37,4	36,0	40,18	37,6	35,9	39,62	37,7	36,3 ³	36,9
3	36,3	36,1	35,4	–	36,6	36,7	39,40	37,3	38,1	35,7
4	37,0	38,5	36,9	39,96	38,5	37,2	40,07	38,5 ³	36,4	38,2
5	36,0	37,0	35,7	–	36,2	36,5	41,47	36,7	36,7	35,5
6	36,7	36,1	34,5	–	35,3	36,1	41,82	37,1	35,5	36,4
7	36,3	35,5	37,2	–	37,2	–	42,64			
8	37,5	35,1	36,2	–	35,7	–	40,48			
9	37,3	–	–	–	36,5	35,4	40,25			
10	37,9	36,4	35,5	40,15	35,9	35,5	–			
П R	100%	90%	90%	30%	100%	80%	90%	100%	100%	100%
С, В S, Reprod	93%			х	90%		х	88,7%		
В Reprod	62%				90%			100%		
В общая ДТ-лайт Reprod	95%									
В общая Reprod	88%									

¹ Для опытов использовали коллекционный штамм 0424 *R. solanacearum* CFBP 3857.

² Реакция ВК для большинства образцов отрицательна (см. рисунок).

³ Результат получен в дополнительной реакции с разведением ДНК образца в воде для ПЦР (1 : 1).

¹ Collection strain 0424 *R. solanacearum* CFBP 3857 was used for the experiments.

² The IC reaction is negative for most of the samples (see Fig.).

³ The result was obtained in an additional reaction with a dilution of the DNA sample in water for PCR (1: 1).

«ДТ-лайт» по сравнению с прибором «АНК-32» (табл. 6).

Для теста на основе ПЦР-РВ с набором ООО «Синтол» так же, как и для теста с набором ООО «АгроДиагностика», отмечено значительное влияние прибора на эффективность реакции в образцах клубней. Селективность в отношении экстрактов роз в сравнении с экстрактами клубней и вегетативных частей картофеля проявилась в нестабильности и более низких значениях П и В (табл. 7).

Рабочие критерии тестов на основе ПЦР с флуоресцентной меткой с отечественными коммерческими наборами для выявления ДНК видов комплекса *R. solanacearum* s. l. в растительном экстракте растений-хозяев представлены в таблице 8.

For a test based on RT-PCR with a Syntol kit, as well as for a test with an AgroDiagnostika kit, a significant effect of the device on the reaction efficiency in tuber samples was noted. Selectivity in relation to rose extracts in comparison with extracts of tubers and vegetative parts of potatoes manifested itself in instability and lower values of R and Reprod (Table 7).

Working criteria for tests based on PCR with a fluorescent label with Russian commercial kits for detecting DNA of species of the *R. solanacearum* s. l. in the plant extract of the host plants are presented in Table 8.

ВЫВОДЫ

1) Для тестов с наборами производства ООО «Агро-Диагностика» в формате FLASH и ПЦР-РВ установлены следующие значения рабочих критериев:

– аналитическая специфичность тестов – 100%;

– аналитическая чувствительность – 10^1 – 10^2 или 10^2 – 10^3 КОЕ/мл для штаммов *Ralstonia solanacearum* и *R. pseudosolanacearum* CFBP 6442 расы 5 bv. 5 и 10^4 КОЕ/мл для штамма *R. pseudosolanacearum* CFBP 6424 расы 1 bv. 3 и *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* CFBP 7288;

– селективность отмечена для экстракта роз в случае содержания повышенного количества растительных компонентов;

– повторяемость и воспроизводимость тестов в пределах аналитической чувствительности (5×10^2 КОЕ/мл) достигали 97,5 и 95% соответственно при использовании амплификаторов производства ООО «ДНК-Технология». Использование прибора «АНК-32» (ООО «Синтол») снижало чувствительность теста на порядок;

Таблица 6
Повторяемость и воспроизводимость теста в формате ПЦР-РВ с набором ООО «АгроДиагностика» для образцов с концентрацией 10^3 КОЕ/мл

Table 6
Repeatability and reproducibility of the test in the RT-PCR format with an AgroDiagnostika kit for samples with a concentration of 10^3 CFU/ml

Образец Sample	Результаты, Ct*			
Прибор Device	ДТ-лайт DT-light		АНК-32 ANK-32	
	Цель Target	ВК IC	Цель Target	ВК IC
0039 10 ³ -1	32,7	26,4	37,30	31,44
0039 10 ³ -2	33,1	26,5	37,84	31,53
0040 10 ³ -1	36,7	26,8	37,45	31,49
0040 10 ³ -2	35,1	26,5	37,62	31,41
0422 10 ³ -1	39,5	27,2	42,65	32,59
0422 10 ³ -2	36,4	27,4	39,56	31,28
0423 10 ³ -1	35,9	27,4	39,83	31,68
0423 10 ³ -2	37,9	26,6	–	31,57
0424 10 ³ -1	35,1	26,5	40,05	32,37
0424 10 ³ -2	35,3	26,5	39,52	31,71
0425 10 ³ -1	36,5	26,8	–	31,71
0425 10 ³ -2	36,2	26,2	–	31,85
П R	100%		75%	
В Reprod	87,5%			

* Приведены средние значения опытов по определению АЧ.

* The average values of the experiments to determine the ASen are given.

Номер лунки	Идентификатор пробики	Ct. Fam	Ct. Hex	Результат
A1	0424_век-част.-1	36,2	26,4	+
A2	424_век-част.-2	37,6	26,7	+
A3	424_век-част.-3	36,6	26,7	+
A4	0424_век-част.-4	38,5	26,8	+
A5	0424_век-част.-5	36,2	26,9	+
A6	0424_век-част.-6	35,3	26,6	+
A7	0424_век-част.-7	37,2	26,7	+
A8	424_век-част.-8	35,7	26,5	+
B1	0424_век-част.-9	36,5	26,5	+
B2	0424_век-част.-10	35,9	26,7	+
B3	ОКВ_век_части		26,7	–
B4	0424_розы-1	35,5		+
B5	0424_розы-2	37,7		+
B6	424_розы-3	37,3		+
B7	424_розы-4			нд
B8	0424_розы-5	36,7		+
C1	424_розы-6	37,1		+
C2	ОКВ_розы		29,5	–
C3	ПКВ_10_6	25,1	26,6	+
C4	ПКА	26,1	26,5	+
C5	ОКА		26,6	–

* Ручной (Пороговый) метод анализа (B.F) Threshold_FAM = 73,8 Threshold_HEX =

Рисунок. Протокол опыта по определению селективности теста ПЦР-РВ с набором ООО «АгроДиагностика»

Fig. Experimental protocol for determining the selectivity of the RT-PCR test with an AgroDiagnostika kit

SUMMARY

1) For tests with AgroDiagnostika kits in FLASH format and RT-PCR, the following values of working criteria are set:

– analytical specificity of tests – 100%;

– analytical sensitivity – 10^1 – 10^2 or 10^2 – 10^3 CFU/ml for the strains *Ralstonia solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* CFBP 6442 race 5 bv. 5 and 10^4 CFU/ml for the strain *R. pseudosolanacearum* CFBP 6424 race 1 bv. 3 and *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* CFBP 7288;

– selectivity was noted for rose extract in the case of the content of an increased amount of plant components;

– the repeatability and reproducibility of tests within the analytical sensitivity (5×10^2 CFU/ml) reached 97.5 and 95%, respectively, when using DNA-Technology amplifiers. The use of the ANK-32 device (Syntol) significantly reduced the sensitivity of the test;

– the test criteria did not differ in general, however, for the strain *R. pseudosolanacearum* CFBP 6424 race 1 bv. 3 the analytical sensitivity of the test in FLASH format reached 10^2 – 10^3 CFU/ml, the reproducibility of the test was slightly higher.

2) For a test based on RT-PCR with a Syntol kit, in accordance with the manufacturer's specification, endo-specificity is shown for *R. solanacearum* strains race 3 bv. 2. Exospecificity was 100%. Other performance criteria were slightly lower than those of the tests with the AgroDiagnostika kits:

– the repeatability and reproducibility within the analytical sensitivity (5×10^2 CFU/ml), determined using the qPCR machine DT-light by DNA-Technology, were 50–90% and 77%, respectively. When using the ANK-32 device, a decrease in the sensitivity of the test was also noted;

– analytical sensitivity was determined as 10^3 CFU/ml.

Таблица 7

Селективность, повторяемость и воспроизводимость теста ПЦР-РВ с коммерческим набором ООО «Синтол»*

Table 7

Selectivity, repeatability and reproducibility of the RT-PCR test with a commercial Syntol kit*

		Результаты, Ct Results, Ct												
Растительный экстракт Plant extract		Клубни картофеля Potato tubers				Вер. части картофеля Veg. parts of potato			Розы Roses					
Прибор Device		ДТ-лайт DT-light		АНК-32 ANK-32		ДТ-лайт DT-light		АНК-32 ANK-32		ДТ-лайт DT-light				
Повторность Repetition		1	2	3	1	1	3	2	1	2	3			
1		31,0	32,3	31,7	–	32,5	–	–	34,5	34,1	32,9			
2		31,8	–	32,2	–	33,7	32,7	36,88	–	34,4	31,5			
3		32,2	32,8	32,1	–	33,9	–	–	–	33,9	31,8			
4		–	32,9	32,2	–	33,8	32,8	38,1	–	33,6	–			
5		–	33,2	32,2	–	33,7	32,8	36,87	34,0	–	33,1			
6		31,8	–	32,3	34,24	33,5	32,6	37,63	33,8	34,1	33,5			
7		31,8	32,5	32,5	–	33,9	34,3	38,59						
8		–	32,5	–	–	–	32,3	–						
9		31,4	32,6	31,4	–	32,3	31,3	36,46						
10		32,0	33,0	32,2	34,96	33,4	–	35,63						
П R		70%	80%	90%	20%	90%	70%	80%				50%	83%	83%
С, В _{ДТ-лайт} S, Reprod _{DT-light}		80%			х	80%		х				72%		
В		65%				80%			72%					
В _{общая ДТ-лайт} Reprod _{total DT-light}		77%												
В _{общая} Reprod _{total}		71,6%												

* Для опытов использовали коллекционный штамм 0424 *Ralstonia solanacearum* CFBP 3857.

* Collection strain 0424 *Ralstonia solanacearum* CFBP 3857 was used for the experiments.

– критерии тестов в целом не отличались, однако для штамма *R. pseudosolanacearum* CFBP 6424 расы 1 bv. 3 аналитическая чувствительность теста в формате FLASH достигала 10^2 – 10^3 КОЕ/мл, воспроизводимость теста была несколько выше.

2) Для теста на основе ПЦР-РВ с набором ООО «Синтол» в соответствии со спецификацией производителя эндоспецифичность показана для штаммов *R. solanacearum* расы 3 bv. 2. Экзоспецифичность составила 100%. Прочие рабочие критерии были несколько ниже, чем у тестов с наборами ООО «АгроДиагностика»:

– повторяемость и воспроизводимость в пределах аналитической чувствительности (5×10^2 КОЕ/мл), определенные с использованием амплификатора «ДТ-лайт» ООО «ДНК-Технология», составили 50–90% и 77% соответственно. При использовании прибора «АНК-32» также отмечено снижение чувствительности теста;

– аналитическая чувствительность была определена как 10^3 КОЕ/мл.

CONCLUSION

Based on an assessment of the applicability of tests with commercial kits of Russian companies for DNA isolation Proba-GS, for amplification in FLASH format and RT-PCR of AgroDiagnostika and for amplification in RT-PCR format of Syntol for identifying the species of *Ralstonia solanacearum* complex *sensu lato* in plant extracts have been found suitable for routine testing of regulated products. Tests with AgroDiagnostika kits can be used as screening tests for samples of any origin. Test based on RT-PCR with a Syntol kit, specific to *R. solanacearum* race 3 bv. 2, can be used as a screening test in the study of products manufactured in the European Union, as well as for the differential diagnosis of *R. solanacearum* race 3 bv. 2.

Таблица 8

Сводная таблица рабочих критериев тестов на основе ПЦР с флуоресцентной меткой с отечественными коммерческими наборами

Table 8

Summary table of the working criteria of tests based on PCR with a fluorescent label with Russian commercial kits

Тест Test	Рабочие критерии для АЧ 5 x 10 ² КОЕ/мл Working criteria for ASen 5 x 10 ² CFU/ml						
	АЧ, КОЕ/мл ASen, CFU/ml	АС, % AS, %		Селект. Select.	Повтор., % Repet., %	Воспроизв., % Reprod., %	
		Эндо- Endo-	Экзо- Exo-			ДТ-лайт DT-light	Общая Total
FLASH	10 ² –10 ³	100	100	розы ¹ roses ¹	90–100	x	97,5
ПЦР-РВ «АгроДиагностика» RT-PCR AgroDiagnostika	10 ² –10 ³	100	100	розы ¹ roses ¹	(30 ²) 80–100	95	88
ПЦР-РВ «Синтол» RT-PCR Syntol	10 ³	<i>R. solanacearum</i> r. 3 bv. 2	100	розы roses	(20 ²) 50–90	77	71,6

¹ Селективность экстракта роз не оказывала влияния на В, требуется более тщательная подготовка суспензии и очистка ДНК.

² Для прибора «АНК-32».

¹ The selectivity of the rose extract did not affect Reprod; more careful preparation of the suspension and DNA purification are required.

² For ANK-32.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании оценки применимости тесты с коммерческими наборами российских компаний для выделения ДНК «Проба-ГС», для амплификации в формате FLASH и ПЦР-РВ ООО «АгроДиагностика» и для амплификации в формате ПЦР-РВ ООО «Синтол» для выявления видов комплекса *Ralstonia solanacearum sensu lato* в растительных экстрактах признаны пригодными для проведения рутинных исследований подкарантинной продукции. Тесты с наборами производства ООО «АгроДиагностика» могут быть использованы в качестве отборочных для исследования образцов любого происхождения. Тест на основе ПЦР-РВ с набором ООО «Синтол», специфичный к *R. solanacearum* расы 3 bv. 2, может быть использован в качестве отборочного при исследовании продукции, произведенной в Евросоюзе, а также для дифференциальной диагностики *R. solanacearum* расы 3 bv. 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дренова Н., 2019. Ожог плодовых культур в Российской Федерации и современные подходы к его диагностике. – Плодоводство и ягодоводство России, № 58: 131–137.
2. Дренова Н., Кузнецова А., 2012. Валидация метода FLASH-ПЦР для выявления возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. в картофельном экстракте. – ФГБУ «ВНИИР», Быково, 28 с.
3. Ерохова М., 2020. Новая классификация бактерии *Ralstonia solanacearum* – возбудителя бурой гнили картофеля. – Защита и карантин растений, № 12: 6.
4. Завриев С., Рязанцев Д., Кошкина Т., 2007. Эффективный экономический метод чувствительной диагностики и идентификации патогенов

REFERENCES

1. Drenova N. Fire blight in the Russian Federation and current approaches to its diagnostics [Ozhog plodovykh kultur v Rossiyskoy Federatsii i sovremennyye podkhody k yego diagnostike]. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 2019; 58: 131–137 (in Russian).
2. Drenova N., Kuznetsova A. Validation of the FLASH-PCR method for detecting the causative agent of brown bacterial rot of potatoes *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. in potato extract [Validatsiya metoda FLASH-PCR dlya vyavleniya vzbuditelya buroy bakterialnoy gnili kartofelya *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. v kartofelnom ekstrakte]. *FGBU "VNIIR", Bykovo*, 2012, 28 p. (in Russian).
3. Yerokhova M. New classification of the bacterium *Ralstonia solanacearum* – the causal agent of potato brown rot [Novaya klassifikatsiya bakterii *Ralstonia solanacearum* – vzbuditelya buroy gnili kartofelya]. *Plant Protection and Quarantine*, 2020; 12: 6 (in Russian).
4. Zavriev S., Ryazantsev D., Koshkina T. An efficient diagnostic method for the identification of potato viral pathogens [Effektivniy ekonomicheskiy metod chuvstvitelnoy diagnostiki i identifikatsii patogenov kartofelya]. *Potato growing in Russia: topical problems of science and practice: materials of the international congress "Potatoes. Russia – 2007"*, M. 2007; 100–103. ISBN 978-5-7367-0643-3 (in Russian).
5. Kornev K., Kopina M. Report on laboratory tests of the "Ralstonia solanacearum-RT" reagent kit to identify the causative agent of potato brown rot *Ralstonia solanacearum* race 3 bv. 2 by real-time polymerase

картофеля. – Картофелеводство России: актуальные проблемы науки и практики: материалы международного конгресса «Картофель. Россия – 2007», М.: 100–103. ISBN 978-5-7367-0643-3.

5. Корнев К., Копина М., 2012. Отчет о проведении лабораторных испытаний набора реагентов «*Ralstonia solanacearum*-PB» для выявления возбудителя бурой гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* раса 3 bv. 2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). – Быково, 18 с.

6. Ребриков Д., Саматов Г., Трофимов Д. и др. ПЦР в реальном времени. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009, 223 с. ISBN 978-5-9963-0086-0.

7. Егоров Н. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Учеб. пособие. 3-е изд., перераб. и доп. – М.: МГУ, 1995, 224 с.

8. Стандарт ISO/IEC 17025:2017 «Общие требования к компетенции испытательных и калибровочных лабораторий».

9. СТО ВНИИР 4.009-2013 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации».

10. Шнейдер Е., Дренова Н., Каримова Е., 2021. Карантинные для Российской Федерации бактериозы видов *Ralstonia*. – Фитосанитария. Карантин растений, 7 (3): 10–26.

11. Buddenhagen I., Sequeira L. & Kelman A., 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. – Phytopathology, 52: 726.

12. EPPO, 2004. PM 7/21 (1): *Ralstonia solanacearum*. Diagnostic protocols for regulated pests. – EPPO Bulletin, 34: 173–178.

13. EPPO, 2018. PM 7/21 (2): *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). – EPPO Bulletin, 48 (1): 32–63.

14. EPPO, 2019. PM 7/98 (4): Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. – EPPO Bulletin, 49 (3): 530–563.

15. Fegan M. & Prior P., 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. – American Phytopathological Society, St Paul, MN (US): 449–461.

16. Horita M., Tsuchiya K., Suga Y., Yano K., Waki T., Kurose D., Furuya N., 2014. Current classification of *Ralstonia solanacearum* and genetic diversity of the strains in Japan. – Journal of general plant pathology, 80 (6): 455–465.

17. Lenarčič R., Morisset D., Pirc M., Llop P., Ravnika M., Dreot T., 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. – PLoS ONE, 9 (4), e96027. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096027>.

18. Lin C., Chuang M., Wang J., 2015. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on chard in Taiwan. – Plant Disease, 99 (2): 282.

19. Norman D., Bocsanczy A., Harmon P., Harmon C., Khan A., 2018. First report of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* on blueberries (*Vaccinium corymbosum*) in Florida. – Plant Disease, 102 (2): 438.

20. Safni I., Cleenwerck I., De Vos P., Fegan M., Sly L., Kappler U., 2014. Polyphasic taxonomic revision

chain reaction (RT-PCR) [Otchet o provedenii laboratornykh ispytaniy nabora reagentov «*Ralstonia solanacearum*-RV» dlya vyyavleniya vozbuditelya buroy gnili kartofelya *Ralstonia solanacearum* rasa 3 bv. 2 metodom polimeraznoy tseпноy reaktsii v real'nom vremeni]. Bykovo, 2012; 18 p. (in Russian).

6. Rebrikov D., Samatov G., Trofimov D. et al. Real time PCR [PCR v realnom vremeni]. M., BINOM, Laboratoriya znaniy, 2009; 223 p. ISBN 978-5-9963-0086-0 (in Russian).

7. Egorov N. Guide to practical training in microbiology: Textbook. 3rd ed., Rev. and additional. M., MSU, 1995; 224 p. (in Russian).

8. Standard ISO/IEC 17025:2017 “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (in Russian).

9. STO VNIIR 4.009-2013 “The causative agent of brown bacterial rot of potatoes *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Detection and identification methods” (in Russian).

10. Shneyder E., Drenova N., Karimova E. *Ralstonia* spp. bacterioses quarantine for the Russian Federation. *Plant Health and Quarantine*, 2021; 7 (3): 10–26.

11. Buddenhagen I., Sequeira L. & Kelman A. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 1962; 52: 726.

12. EPPO. PM 7/21 (1): *Ralstonia solanacearum*. Diagnostic protocols for regulated pests. *EPPO Bulletin*, 2004; 34: 173–178.

13. EPPO. PM 7/21 (2): *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). 2018; *EPPO Bulletin*, 48 (1): 32–63.

14. EPPO. PM 7/98 (4): Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. 2019; *EPPO Bulletin*, 49 (3): 530–563.

15. Fegan M. & Prior P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. American Phytopathological Society, St Paul, MN (US), 2005; 449–461.

16. Horita M., Tsuchiya K., Suga Y., Yano K., Waki T., Kurose D., Furuya N. Current classification of *Ralstonia solanacearum* and genetic diversity of the strains in Japan. *Journal of general plant pathology*, 2014; 80 (6): 455–465.

17. Lenarčič R., Morisset D., Pirc M., Llop P., Ravnika M., Dreot T. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE*, 2014; 9 (4), e96027. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096027>.

18. Lin C., Chuang M., Wang J. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on chard in Taiwan. *Plant Disease*, 2015; 99 (2): 282.

19. Norman D., Bocsanczy A., Harmon P., Harmon C., Khan A. First report of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* on blueberries (*Vaccinium corymbosum*) in Florida. *Plant Disease*, 2018; 102 (2): 438.

20. Safni I., Cleenwerck I., De Vos P., Fegan M., Sly L., Kappler U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to

of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64: 3087–3103. URL: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.066712-0>.

21. She X., He Z., Li H., 2018. Genetic structure and phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* strains from diverse origins in Guangdong Province, China. – *Journal of Phytopathology*, 166 (3): 177–186.

22. Tjou-Tam-Sin N., van de Bilt J., Westenberg M., Bergsma-Vlami M., Korpershoek H., Vermunt A., Meekes E., Teunissen H., Van Vaerenbergh J., 2017. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in ornamental *Rosa* sp. – *Plant Disease*, 201 (2), 378 p.

23. Wicker E., Grassart L., Coranson-Beaudu R., Mian D., Guilbaud C., Fegan M., Prior P., 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. – *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (21): 6790–801. URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.00841-07>.

24. О потенциальных рисках, связанных с ввозом в страну бананов. Официальный сайт Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). – URL: <https://fsvps.gov.ru/fsvps/print/news/16317.html> (дата обращения: 10.09.2021).

25. EPPO Global Database. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 30.09.2021).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Дренова Наталия Васильевна, старший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru.

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

Кондратьев Максим Олегович, агроном научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: affut24@rambler.ru.

Шнейдер Елена Юрьевна, старший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: seunch@mail.ru.

emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014; 64: 3087–3103. URL: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.066712-0>.

21. She X., He Z., Li H. Genetic structure and phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* strains from diverse origins in Guangdong Province, China. *Journal of Phytopathology*, 2018; 166 (3): 177–186.

22. Tjou-Tam-Sin N., van de Bilt J., Westenberg M., Bergsma-Vlami M., Korpershoek H., Vermunt A., Meekes E., Teunissen H., Van Vaerenbergh J. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in ornamental *Rosa* sp. *Plant Disease*, 2017; 201 (2), 378 p.

23. Wicker E., Grassart L., Coranson-Beaudu R., Mian D., Guilbaud C., Fegan M., Prior P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007; 73 (21): 6790–801. URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.00841-07>.

24. About the potential risks associated with the import of bananas into the country. Official website of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoz nadzor). URL: <https://fsvps.gov.ru/fsvps/print/news/16317.html> (last accessed: 10.09.2021).

25. EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 30.09.2021).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nataliya Drenova, Senior Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru.

Irina Ignatieva, Researcher, Bacteriology and GMO Analysis Laboratory, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-1047-0105, e-mail: babiraignirmi@yandex.ru.

Maksim Kondratiev, Agronomist, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: affut24@rambler.ru.

Elena Shneyder, Senior Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: seunch@mail.ru.