



## Защита растений Plant protection

DOI: 10.22363/2312-797X-2022-17-4-473-483


УДК 579.64:632.911.2:632.3.01/08

Научная статья / Research article

### Идентификация *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* в зерне пшеницы методом ПЦР

М. Мувинги<sup>1</sup>  , О.Ю. Словарева<sup>2</sup> , М. Заргар<sup>1</sup> <sup>1</sup>Российский университет дружбы народов, г Москва, Российская Федерация<sup>2</sup>Всероссийский центр карантина растений,

р.п. Быково, Московская область, Российская Федерация

 mufaromvingi@gmail.com

**Аннотация.** Фитосанитарными требованиями крупнейших импортеров российского зерна — Египта, Турции, Бангладеша, Нигерии и Пакистана — регулируются возбудители бактериозов зерновых культур *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens*, что вызывает необходимость в разработке быстрых методов их диагностики. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), зарекомендовавший себя в испытательных лабораториях как самый быстрый и надежный, требует оптимальной подготовки тестируемого материала. Цель исследования — оптимизация процесса подготовки проб семян для последующего выявления и идентификации *P. fuscovaginae*, *P. syringae* и *X. translucens* методом ПЦР. Образцы зерна пшеницы замачивали в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 2 часов и заражали суспензиями культур *P. fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *coronafaciens* и *X. translucens* в различных концентрациях. Затем зараженные образцы зерна измельчали и подвергали двухэтапному центрифугированию. Из полученных аналитических проб выделяли ДНК и проводили видоспецифичную для каждого вида бактерий ПЦР. В результате установлено, что двухчасового замачивания семян и их обработки гомогенизатором достаточно, чтобы эффективно разрушить каждое зерно в пробе и обеспечить выход бактерий в жидкую часть пробы. Первое низкоскоростное центрифугирование позволило эффективно осадить измельченное зерно и удалить лишний крахмал из надосадочной жидкости. Высокоскоростное центрифугирование надосадочной жидкости позволило получить концентрированную микробиоту, содержащуюся в образце зерна. Использование набора для выделения ДНК «Проба-ГС», АгроДиа-

© Мувинги М., Словарева О.Ю., Заргар М., 2022

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

гностика (Россия) позволило получить ДНК достаточного качества для проведения ПЦР. С помощью набора *Pseudomonas fuscovaginae*-РВ, Синтол (Россия) и праймеров PsyF/PsyR и 4F1/4R 1 успешно обнаружена ДНК *P. fuscovaginae*, *P. syringae* и *X. translucens* соответственно в каждом из зараженных этими бактериями образце в концентрациях  $10^3$  КОЕ/мл. Отмечено отсутствие ингибирования ПЦР при использовании изложенных методов подготовки проб и тестирования. Метод удаления крахмала из проб для молекулярной диагностики фитопатогенов, насколько нам известно, использовался впервые. Применение использованных в работе методов позволит проводить диагностику значимых для экспорта зерна возбудителей бактериозов в течение одного дня.

**Ключевые слова:** экспорт зерна, фитосанитарные требования, карантин растений, полимеразная цепная реакция, ПЦР, бурая гниль, листовая оболочка, злаковые культуры, ореольный бактериоз, черный бактериоз, зерновые культуры, диагностика фитопатогенов

**Заявление о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**История статьи:** поступила в редакцию 20 мая 2022 г., принята к публикации 28 июня 2022 г.

**Для цитирования:** Муvingи М., Словарева О.Ю., Заргар М. Идентификация *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* в зерне пшеницы методом ПЦР // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2022. Т. 17. № 4. С. 473—483. doi: 10.22363/2312-797X-2022-17-4-473-483

## Identification of *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* in wheat seeds using PCR

Mufaro Muvingi<sup>1</sup>  , Olga Y. Slovareva<sup>2</sup> , Meisam Zargar<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>All-Russian Plant Quarantine Center, Moscow region, Russian Federation

\*mufaromuvingi@gmail.com

**Abstract.** The causative agents of grain crops bacteriosis viz. *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* are regulated by phytosanitary requirements of the largest importers of Russian grain — Egypt, Turkey, Bangladesh, Nigeria and Pakistan. Therefore, it requires the development of rapid methods for their diagnosis. The PCR method, which is the fastest and most reliable in testing laboratories, needs optimal preparation of the test material. The aim of the study was to optimize the process of preparing seed samples for subsequent detection and identification of *P. fuscovaginae*, *P. syringae* and *X. translucens* by PCR. Wheat grain samples were soaked in phosphate-buffered saline (PBS) for 2 hours and infected with suspensions of *P. fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *coronafaciens* and *X. translucens* at various concentrations. Then, the infected grain samples were crushed and subjected to two-stage centrifugation. DNA was isolated from the obtained analytical samples and species-specific PCR was performed for each bacterial species. It was found that a two-hour soaking of the seeds and their treatment with a homogenizer is sufficient to effectively destroy each grain in the sample and ensure the release of bacteria into the liquid part of the sample. The first low-speed centrifugation allowed the crushed grain to settle efficiently and remove excess starch from the supernatant. High-speed centrifugation of the supernatant made it possible to obtain a concentrated microbiota contained in the grain sample. To obtain DNA of sufficient quality for PCR test, the kit 'Proba-GS' (AgroDiagnostika, Russia) was used for DNA extraction. Using 'Pseudomonas fuscovaginae-RT' kit (Syntol, Russia) and PsyF/PsyR and 4F1/4R 1 primers, DNA of *P. fuscovaginae*, *P. syringae* and *X. translucens*, respectively, was successfully detected in each of the samples infected with these bacteria at concentrations of  $10^3$  CFU/ml. The absence of PCR inhibition was noted. The method of removing starch from samples for molecular diagnostics of phytopathogens was used for the first time. Application of these methods will allow diagnosing pathogens of bacterioses within one day.

**Keywords:** grain export, phytosanitary requirements, plant quarantine, polymerase chain reaction, PCR, brown leaf rot, leaf cover, cereal crops, halo bacteriosis, black bacteriosis, grain crops, diagnostics of phytopathogens

**Conflicts of interest.** The authors declared no conflicts of interest.

**Article history:** Received: 20 May 2022. Accepted: 28 June 2022.

**For citation:** Muvingi M, Slovareva OY, Zargar M. Identification of *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* in wheat seeds using PCR. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2022;17(4):473—483. (In Russ.). doi: 10.22363/2312-797X-2022-17-4-473-483

## Введение

В 2019—2020 гг. Россия экспортировала зерно по кодам ТН ВЭД 1001 (пшеница и меслин), 1002 (рожь), 1003 (ячмень), 1004 (овес) на сумму около 9,5 млрд долларов, что сделало ее крупнейшим экспортером пшеницы в мире [1]. Основными импортерами зерна из России были Саудовская Аравия, Египет, Турция, Бангладеш, Иран, Нигерия, Китай и Пакистан, из которых Турция импортировала 9, а Саудовская Аравия 3,2 млн тонн в 2020 г. [1]. Фитосанитарными требованиями указанных стран регулируются один или несколько возбудителей бактериозов зерновых культур, принадлежащих следующим видам: *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* [2, 3].

Основным источником распространения бактериозов зерновых культур являются зараженные семена [4], при этом симптомы заболевания в случае его наличия не позволяют идентифицировать возбудителя. Для осуществления фитосанитарного контроля бактериозов пробы от партий зерна подлежат лабораторной диагностике.

Известные в настоящее время методы диагностики *P. fuscovaginae* предполагают использование комбинации из 2 и более тестов, среди которых: выделение культуры бактерии на селективных и полуселективных средах, тест на патогенность, биохимические тесты, серотипирование, а также анализ профилией жирных кислот, исследование содержания общего белка в клетках, иммунодиагностика, иммунофлуоресценция и молекулярно-генетические тесты [5]. Для идентификации *P. syringae* отмечено несколько диагностических тестов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) [6]. Методы идентификации *X. translucens* основаны на структуре колоний, цвете, биохимическом анализе, патогенности и ПЦР [7].

Среди вышеперечисленных методов диагностики ПЦР является наиболее применимым в практике фитосанитарных лабораторий в связи с универсальностью и быстротой выполнения. Только использование тестов на основе ПЦР в сочетании с быстрым методом подготовки проб позволяет провести диагностику в течение суток. В то же время не описаны критерии использования ПЦР при диагностике *P. fuscovaginae*, *P. syringae* и *X. translucens* в тотальной ДНК, выделенной из семян. Тестирование ДНК из образца семян требует оптимального метода подготовки проб, проведенного в кратчайшие сроки. На сегодняшний день существует только описание

метода замачивания семян в течение 24 часов [8]. Однако *P. syringae* может находиться внутри семян, как было показано при исследовании зараженных семян гороха [9].

В связи с тем, что целевые бактерии могут находиться как на поверхности семян, так и внутри [10], методы промывки и экстракции менее эффективны, чем измельчение семян [8]. В то же время измельчение приводит к попаданию в образец большого количества крахмала, одного из ингибиторов ПЦР [11].

Совершенствование процесса лабораторной диагностики значимых для экспорта зерна видов бактерий — *P. fuscovaginae*, *P. syringae* и *X. translucens* — требует оптимизации метода подготовки проб, позволяющего сразу проводить ПЦР-тестирование.

**Цель исследования** — оптимизация процесса подготовки проб семян для последующего выявления и идентификации *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* методом ПЦР.

## Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись пробы зерна пшеницы, зараженные суспензиями бактерий *P. fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *coronafaciens* и *X. translucens* в определенных концентрациях. Исследование проводили в марте 2022 г.

Воздушно-сухое зерно пшеницы ссыпали в общую емкость и перемешивали для придания однородности пробам. С помощью электронных весов (АН-4200СЕ, Vibra, Япония) взвешивали лабораторные пробы, масса каждой из которых составляла  $25 \pm 0,2$  г. Лабораторные пробы помещали в пакеты для гомогенизации и добавляли 54 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) (PM 7/24 (4), ЕРРО, 2019). Пакеты с пробами в специальном штативе помещали на орбитальный шейкер (Unimax 2010, Heidolph, Германия) и устанавливали режим 2 ч, 100 об/мин. После запуска шейкера приступали к приготовлению бактериальных суспензий.

Для приготовления суспензий использовали 3-суточные чистые живые культуры *P. fuscovaginae* (штамм 0335 в коллекции ВНИИКР), *P. syringae* pv. *coronafaciens* (штамм 0440 в коллекции ВНИИКР) и 7-суточную чистую живую культуру *X. translucens* (штамм 0337 в коллекции ВНИИКР). Для штаммов 0440 и 0335 в исследовании использовали среду Кинга Б (PM 7/43 (1), ЕРРО, 2004), а для штамма 0337 — среду LB [12]. Суспензии бактерий готовили в микропробирках объемом 1,5 мл, используя стерильный PBS. Начальная суспензия бактерий по мутности визуально почти не отличалась от чистого PBS.

Концентрацию бактерий в суспензии определяли методом Коха [13], высевая с помощью шпателя Дригальского по 100 мкл 6, 7 и 8 разведений на 3 чашки Петри с соответствующей средой и проводя подсчет колоний спустя 7 суток выдерживания чашек при  $+25$  °С в инкубаторе (MIR-254, Panasonic Healthcare Co. Ltd., Япония). Приготовленные бактериальные суспензии сразу использовали для заражения лабораторных проб семян пшеницы.

В пакет с пробой добавляли 6 мл одного из разведений начальной суспензии — 2, 3, 4 или 5. Одну пробу семян оставили не зараженной в качестве отрицательного контрольного образца. По истечении 2 ч встряхивания проб на шейкере

проводили их обработку с помощью лабораторных гомогенизаторов (Bag Mixer 400SW, Interscience, Франция) при режиме 5 мин, скорость 4, ближнее к дверце гомогенизатора положение лопаток. После гомогенизации пробы встряхивали на шейкере в течение 15 мин. При режиме 100 об/мин, а после жидкую часть проб переливали в центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при режиме 5 мин, 1200 g, 4 °C (Allegra X-30R, Beckman Coulter, Дания). Затем надосадочную жидкость переносили в чистые центрифужные пробирки и центрифугировали при режиме 10 мин, 10000g, 4 °C. Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 1 мл PBS, встряхивали на вортексе и переносили полученную аналитическую пробу в микропробирку.

Выделение ДНК проводили сорбционным методом («Проба-ГС», АгроДиагностика, Россия), используя 200 мкл каждой аналитической пробы в двухкратной повторности, а также 200 мкл 3, 4, 5 и 6 разведений бактериальных суспензий в PBS. Диагностику бактерий в выделенной ДНК проводили с использованием видоспецифичных праймерных систем.

Для диагностики *P. fuscovaginae* в образцах ДНК использовали набор *Pseudomonas fuscovaginae*-PB, Синтол, Россия. Чтобы оценить наличие ингибирования ПЦР, указанным набором тестировали бактериальные суспензии штаммов 0440 и 0337 и зараженные данными штаммами экстракты. ПЦР проводили в соответствии с инструкцией производителя на детектирующем амплификаторе (ДТпрайм 5М6, ДНК-Технология, Россия).

Диагностику *P. syringae* pv. *coronafaciens* проводили с использованием праймеров PsyF/PsyR (длина ампликона 144 п.о.) [14]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала праймеры в конечной концентрации 0,16 микромоляр, мастер-микс 5x ScreenMix-HS (Евроген, Россия) и 2 мкл ДНК. Тестирование на наличие ДНК *X. translucens* проводили с помощью праймеров 4F1/4R 1 (длина ампликона 500 п.о.); состав реакционной смеси соответствовал составу, изложенному в источнике [15]. Программа амплификации для ПЦР с праймерами PsyF/PsyR и 4F1/4R 1: 5 мин при 95 °C, 40 циклов: 30 с при 95 °C, 30 с при 61 °C и 30 с при 72 °C; 7 мин при 72 °C (T100 Thermal Cycler, BioRad, США). Продукты ПЦР разгоняли в 1,5 % агарозном геле при режиме В — 130, мА — 165, Вт — 40, 50 мин (Эльф-4, ДНК-Технология, Россия). Результат ПЦР интерпретировали по электрофореграммам, снятым на геледокументирующей системе (BioRad, США).

Результат тестирования образца считали положительным, если присутствовала специфическая реакция для гена-мишени ПЦР в виде экспоненциальной кривой при использовании ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) или ампликона определенного размера при использовании классической ПЦР, отсутствовала специфическая реакция для отрицательного контроля и отмечалась реакция внутреннего положительного контроля (ВПК) для отрицательного контрольного образца (ОКО) — отсутствие ингибирования ПЦР. Результат тестирования образца считали отрицательным, если отсутствовала специфическая реакция ПЦР, отмечалась реакция ВПК и присутствовала специфическая реакция для положительного контрольного образца (ПКО). В остальных случаях результат ПЦР считали недостоверным.

## Результаты исследования и обсуждение

Обработка с помощью гомогенизатора при режиме 5 мин, скорость 4 пробы семян, выдержанной в PBS в течение 2 ч, привела к раздроблению каждого зерна в пробе и образованию муки крупного помола.

Полученный результат свидетельствует о том, что двухчасового замачивания семян и их обработки гомогенизатором при указанном режиме достаточно, чтобы эффективно разрушить каждое зерно в пробе и обеспечить тем самым выход бактерий в жидкую часть пробы. Используемый солевой буфер при этом является экстрагентом, позволяющим извлечь бактерии из оставшихся целыми частиц зерен в последующие 15 мин встряхивания на шейкере.

Первое низкооборотное центрифугирование при режиме 5 мин, 1200 g, 4 °C привело к образованию мучного осадка массой  $1 \pm 0,3$  г в каждом образце. Использование этапа низкооборотного центрифугирования позволило избавиться от большей части содержащегося в пробе крахмала, одного из возможных ингибиторов последующих ПЦР-тестов [11]. Центрифугирование надосадочной жидкости при режиме 10 мин, 10000g, 4 °C позволил получить концентрированную микробиоту, содержащуюся в пробе зерна, количество муки в полученном концентрате при этом было минимальным.

После выделения ДНК из полученных аналитических проб и ПЦР-тестирования оценивали эффективность используемого метода подготовки проб, опираясь на результат определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в тестируемых бактериальных суспензиях (табл. 1).

Таблица 1

### Результат определения числа колониеобразующих единиц, КОЕ/мл, в тестируемых бактериальных суспензиях спустя 7 суток после посева

Штамм	Разведение начальной суспензии				
	2	3	4	5	6
0335	$4,2 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$
0440	$3,7 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$
0337	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$

Table 1

### The number of colony-forming units (CFU/ml) in the tested bacterial suspensions 7 days after plating

Strain	Dilution of the initial suspension				
	2	3	4	5	6
0335	$4.2 \times 10^7$	$4.2 \times 10^6$	$4.2 \times 10^5$	$4.2 \times 10^4$	$4.2 \times 10^3$
0440	$3.7 \times 10^7$	$3.7 \times 10^6$	$3.7 \times 10^5$	$3.7 \times 10^4$	$3.7 \times 10^3$
0337	$1.5 \times 10^7$	$1.5 \times 10^6$	$1.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3$

Бактериальные суспензии 2-го, 3-го, 4-го и 5-го разведения использовали для инокуляции образцов семян PBS в соотношении 1:9, концентрации бактерий в контаминированных экстрактах семян перед центрифугированием соответствовали приведенным в табл. 1.

ПЦР-тестирование образцов, содержащих штамм 0335, показало присутствие *P. fuscovaginae* как в бактериальных суспензиях в PBS, так и в инфицированных образцах зерна пшеницы (табл. 2).

Таблица 2

**Результат тестирования образцов выделенной ДНК набором *Pseudomonas fuscovaginae*-PB (Синтол, Россия)**

Идентификатор пробирки	Ct, FAM	Ct, HEX	Результат
0335–10 <sup>6</sup> -PBS	27,0	34,0	+
0335–10 <sup>5</sup> -PBS	29,7	33,8	+
0335–10 <sup>4</sup> -PBS	30,8	34,1	+
0335–10 <sup>3</sup> -PBS	31,6	34,2	+
0335–10 <sup>6</sup> -Экстракт-1	25,4	34,2	+
0335–10 <sup>6</sup> -Экстракт-2	25,2	34,6	+
0335–10 <sup>5</sup> -Экстракт-1	29,2	34,3	+
0335–10 <sup>5</sup> -Экстракт-2	29,4	34,3	+
0335–10 <sup>4</sup> -Экстракт-1	32,3	34,3	+
0335–10 <sup>4</sup> -Экстракт-2	31,6	34,2	+
0335–10 <sup>3</sup> -Экстракт-1	34,3	34,5	+
0335–10 <sup>3</sup> -Экстракт-2	35,3	34,5	+
0335–10 <sup>7</sup> -PBS-ПКО	22,9	34,1	+
Экстракт-1-ОКО		34,4	–
Экстракт-2-ОКО		34,6	–
PBS-ОКО		34,6	–

Примечание. Ct – пороговый цикл ПЦР; FAM – канал детекции специфики ПЦР; HEX – канал детекции внутреннего положительного контроля ПЦР; + – положительно; – – отрицательно; PBS – фосфатно-солевой буфер; ПКО – положительный контрольный образец; ОКО – отрицательный контрольный образец

Table 2

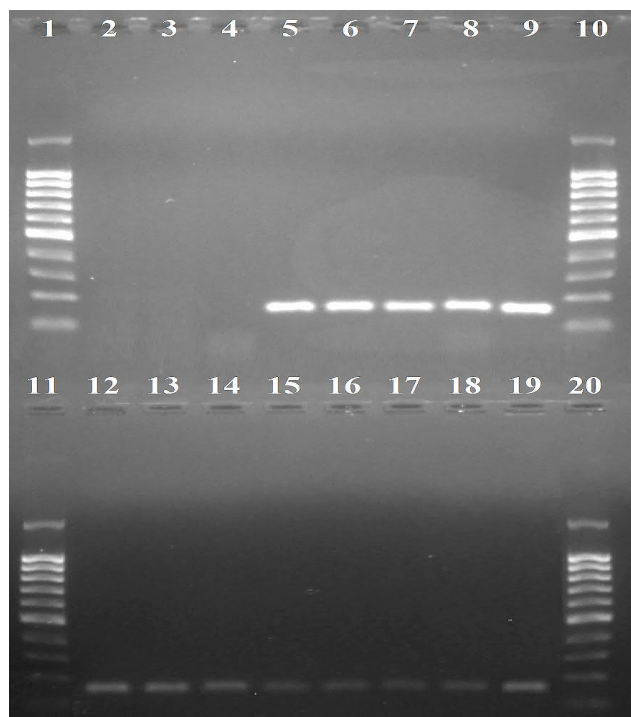
**The result of DNA-testing by 'Pseudomonas fuscovaginae-RT' kit (Sintol, Russia)**

Test-tube identification	Ct, FAM	Ct, HEX	Result
0335–10 <sup>6</sup> -PBS	27.0	34.0	+
0335–10 <sup>5</sup> -PBS	29.7	33.8	+
0335–10 <sup>4</sup> -PBS	30.8	34.1	+
0335–10 <sup>3</sup> -PBS	31.6	34.2	+
0335–10 <sup>6</sup> -Extract-1	25.4	34.2	+
0335–10 <sup>6</sup> -Extract-2	25.2	34.6	+
0335–10 <sup>5</sup> -Extract-1	29.2	34.3	+
0335–10 <sup>5</sup> -Extract-2	29.4	34.3	+
0335–10 <sup>4</sup> -Extract-1	32.3	34.3	+
0335–10 <sup>4</sup> -Extract 2	31.6	34.2	+
0335–10 <sup>3</sup> -Extract-1	34.3	34.5	+
0335–10 <sup>3</sup> -Extract-2	35.3	34.5	+
0335–10 <sup>7</sup> -PBS-PCS	22.9	34.1	+
Extract1-NCS		34.4	–
Extract2-NCS		34.6	–
PBS-NCS		34.6	–

Note: Ct – PCR threshold cycle; FAM – PCR specific detection channel; HEX – PCR internal positive control detection channel; «+» – positive; «-» – negative; PBS – phosphate-buffered saline; PCS – positive control sample; NCS – negative control sample.

Результат ПЦР-тестирования отрицательных контрольных образцов (незараженных проб зерна и PBS) был отрицательным. Недостоверные результаты отсутствовали.

В каждом из тестируемых образцов, зараженных штаммом 0440, бактерия *Pseudomonas syringae* была обнаружена (рис. 1).

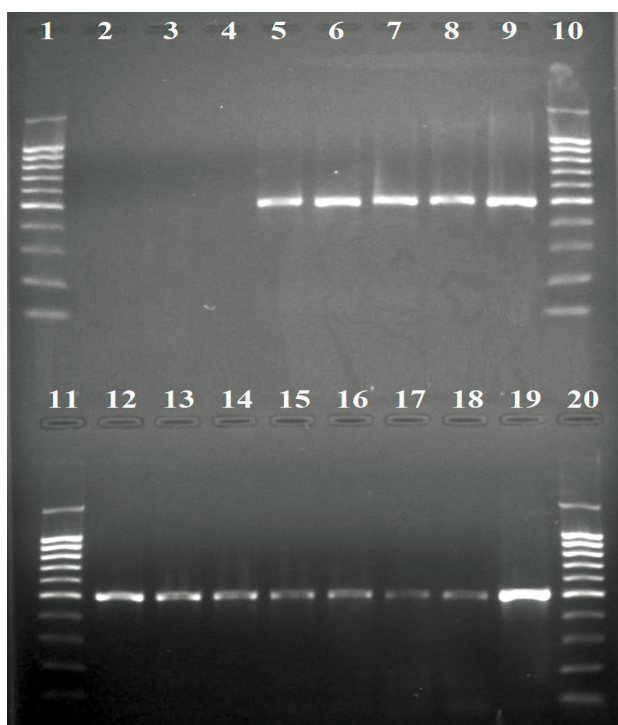


**Рис. 1.** Электрофореграмма результата ПЦР-тестирования образцов, зараженных штаммом 0440, на наличие *Pseudomonas syringae* с праймерами PsyF/PsyR: 1, 10, 11 и 20 – маркер длины ДНК; 2, 3 – отрицательный контрольный образец (экстракт); 4 – отрицательный контрольный образец (буфер); 5–8 – буфер, зараженный штаммом 0440 в концентрациях  $3,7 \cdot 10^6$ – $3,7 \cdot 10^3$  соответственно; 9, 12 – штамм 0440 в экстракте ( $3,7 \cdot 10^6$ ); 13, 14 – штамм 0440 в экстракте ( $3,7 \cdot 10^5$ ); 15, 16 – штамм 0440 в экстракте ( $3,7 \cdot 10^4$ ); 17, 18 – штамм 0440 в экстракте ( $3,7 \cdot 10^3$ ); 19 – положительный контрольный образец

**Fig. 1.** Electropherogram of PCR testing of samples infected with strain 0440 for the presence of *Pseudomonas syringae* with PsyF/PsyR primers: 1, 10, 11 and 20–100 bp DNA length marker; 2, 3 – Negative control sample (Extract); 4 – pure Phosphate buffered saline (PBS); 5, 8 – PBS infected with strain 0440 at concentrations of  $3.7 \times 10^6$ – $3.7 \times 10^3$  respectively; 9, 12 – strain 0440 in extract ( $3.7 \times 10^6$ ); 13, 14 – strain 0440 in extract ( $3.7 \times 10^5$ ); 15, 16 – strain 0440 in extract ( $3.7 \times 10^4$ ); 17, 18 – strain 0440 in extract ( $3.7 \times 10^3$ ); 19 – Positive control sample

ПЦР с ДНК отрицательных контрольных образцов при тестировании с праймерами PsyF/PsyR показала отрицательный результат. Недостоверные результаты отсутствовали. Аналогичный результат тестирования отрицательных контрольных образцов был получен в ПЦР с праймерами 4F1/4R 1 (рис. 2).





**Рис. 2.** Электрофореграмма результата ПЦР-тестирования образцов, зараженных штаммом 0337, на наличие *Xanthomonas translucens* с праймерами 4F1/4R 1: 1, 10, 11 и 20 – маркер длины ДНК; 2, 3 – отрицательный контрольный образец (экстракт); 4 – отрицательный контрольный образец (буфер); 5–8 – буфер, зараженный штаммом 0337 в концентрациях  $1,5 \cdot 10^6$ – $1,5 \cdot 10^3$  соответственно; 9, 12 – штамм 0337 в экстракте ( $1,5 \cdot 10^6$ ); 13, 14 – штамм 0337 в экстракте ( $1,5 \cdot 10^5$ ); 15, 16 – штамм 0337 в экстракте ( $1,5 \cdot 10^4$ ); 17, 18 – штамм 0337 в экстракте ( $1,5 \cdot 10^5$ ); 19 – положительный контрольный образец

**Fig. 2.** Electropherogram of PCR testing of samples infected with strain 0337 for the presence of *Xanthomonas translucens* with primers 4F1/4R 1: 1, 10, 11 and 20–100 bp DNA length marker; 2, 3 – Negative control sample (Extract); 4 – Pure Phosphate buffered saline (PBS); 5, 8 – PBS infected with strain 0337 at concentrations of  $1.5 \times 10^6$ – $1.5 \times 10^3$  respectively; 9, 12 – strain 0337 in extract ( $1.5 \times 10^6$ ); 13, 14 – strain 0337 in extract ( $1.5 \times 10^5$ ); 15, 16 – strain 0337 in extract ( $1.5 \times 10^4$ ); 17, 18 – strain 0337 in extract ( $1.5 \times 10^5$ ); 19 – Positive control sample

Для образцов, зараженных штаммом 0337, были получены положительные результаты при тестировании с праймерами 4F1/4R 1.

Ингибирование ПЦР при использовании набора *Pseudomonas fuscovaginae*-PB не наблюдалось ни для одного из протестированных образцов ДНК, выделенной из проб, зараженных штаммами 0335, 0337 и 0440. Данный результат показывает, что двойное центрифугирование при подготовке проб эффективно для удаления крахмала, оставшегося в пробе вследствие дробления семян. Нам известно об успешном использовании метода удаления ингибирующих веществ из растительного материала путем двухэтапного центрифугирования [15], но для удаления крахмала при подготовке проб зерна пшеницы к ПЦР-тестированию, по нашим

сведениям, он ранее не использовался. Полученный результат также позволяет сделать вывод о том, что ДНК была эффективно выделена набором «Проба-ГС», АгроДиагностика (Россия).

## Заключение

В результате исследования отмечено, что обработка с помощью гомогенизатора пробы семян, выдержанной в PBS в течение 2 ч, позволяет раздробить каждое зерно в пробе и обеспечить выход бактерий, если они присутствуют в семенах. Метод дробления очень эффективен при диагностике бактерий, передающихся семенами, так как обеспечивает исследование всей части семени, как в случае наличия бактерий на поверхности, так и внутри семян. Первое низкооборотное центрифугирование позволило эффективно осадить измельченное зерно и избавиться от большей части крахмала. Высокоскоростное центрифугирование надосадочной жидкости позволило получить концентрированную микробиоту, содержащуюся в образце зерна, с минимальным количеством муки. Использование набора для выделения ДНК «Проба-ГС», АгроДиагностика (Россия) позволило получить ДНК образцов достаточного для ПЦР-тестирования качества. С помощью набора *Pseudomonas fuscovaginae*-PB, Синтол (Россия) была успешно обнаружена ДНК *P. fuscovaginae* в каждом из зараженных этой бактерией образцов в пределах чувствительности теста  $10^3$  КОЕ/мл. Использование праймеров PsyF/PsyR и 4F1/4R 1 позволило обнаружить ДНК *P. syringae* и *X. translucens* соответственно в каждом из зараженных этими бактериями образце в концентрациях  $10^3$  КОЕ/мл. Отмечено отсутствие ингибирования ПЦР при использовании изложенных методов подготовки проб и тестирования. Метод удаления крахмала из проб для молекулярной диагностики фитопатогенов, насколько нам известно, использовался впервые. Применение использованных в работе методов позволит проводить диагностику значимых для экспорта зерна возбудителей бактериозов в течение одного дня.

## Библиографический список/ References

1. Agapkin AM, Makhotina IA. The grain market of Russia. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2021; 839(2):022023. doi: 10.1088/1755-1315/839/2/022023
2. Xie G, Cui Z, Tao Z, Qiu H, Liu H, Ibrahim M, Zhu B, Jin G, Sun G, Almoneafy A, Li B. Genome sequence of the rice pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* CB98818. *J Bacteriol.* 2012;194(19):5479–80. doi: 10.1128/JB.01273-12
3. Khojasteh M, Taghavi SM, Khodaygan P, Hamzehzarghani H, Chen G, Bragard C, Koebnik R, Osdaghi E. Molecular typing reveals high genetic diversity of *Xanthomonas translucens* strains infecting small-grain cereals in Iran. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(20): e01518—19. doi: 10.1128/AEM.01518-19
4. Tambong JT. Bacterial Pathogens of Wheat: Symptoms, Distribution, Identification, and Taxonomy. In: Ansari M. (ed.) *Wheat—Recent Advances*. IntechOpen; 2022. doi: 10.5772/intechopen.102855
5. González D, Corzo-Lopez M, Márquez OP, Cruz A, Martínez B, Martínez, Y. Characterization and diagnosis of *Pseudomonas fuscovaginae* Miyajima, Tanii and Akita, causal agent of the Brown Sheath Rot in rice. *Biotecnología Aplicada.* 2017;34(2):2101—2108.
6. An JH, Noh YH, Kim YE, Lee HI, Cha JS. Development of PCR and TaqMan PCR assays to detect *Pseudomonas coronafaciens*, a causal agent of halo blight of oats. *Plant Pathology.* 2015;31(1):25—32. doi: 10.5423/PPJ.OA.09.2014.0096

7. Iqbal MA, Ullah I, Shahbaz MU, Kamran M, Saleem K. Biochemical and molecular identification of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* causing bacterial leaf streak of wheat in Punjab, Pakistan. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2014;47(4):417–424. doi: 10.1080/03235408.2013.811030
8. Adorada DL, Stodart BJ, Pangga IB, Ash GJ. Implications of bacterial contaminated seed lots and endophytic colonization by *Pseudomonas fuscovaginae* on rice establishment. *Plant Pathology*. 2015;64(1):43–50. doi: 10.1111/ppa.12243
9. Verma A, Agrawal K. Location and histopathology of seed-borne bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* carried by pea seeds. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2018;6(1):20–22. doi: 10.7324/JABB.2018.60104
10. Valencia-Boñín AJ, Cisneros-Opez ME. A Review of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. *International Journal of Agronomy*. 2012;2012:692350. doi: 10.1155/2012/692350
11. Moon YJ, Lee SY, Oh SW. A Review of isothermal amplification methods and food-origin inhibitors against detecting food-borne pathogens. *Foods*. 2022;11(3):322. doi: 10.3390/foods11030322
12. Mizuno S, Sakurai T, Nabasama M, Kawakami K, Hiroe A, Taguchi S, Tsuge T. The influence of medium composition on the microbial secretory production of hydroxyalkanoate oligomers. *General Applied Microbiology*. 2021;67(4):134–141. doi: 10.2323/jgam.2020.09.002
13. Slovareva OY. Detection and identification of wheat and barley pathogens in the Russian Federation. *Microbiology Independent Research Journal*. 2020;7(1):13–23. doi: 10.18527/2500-2236-2020-7-1-13-23
14. Guilbaud C, Morris CE, Barakat M, Ortet P, Berge O. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. *FEMS Microbiology Ecology*. 2016;92(1):fiv146. doi: 10.1093/femsec/fiv146
15. Slovareva OY, Starikova EV, Muvingi M. Development of new PCR tests for diagnostics of the agent of bacterial leaf streak of wheat *Xanthomonas translucens*. *Plant Health and Quarantine*. 2021;2(6):37–49. (In Russ.).  
*Словарева О., Старикова Е., Муvingи М.* Разработка новых ПЦР-тестов для диагностики возбудителя черного бактериоза зерновых культур *Xanthomonas translucens* // Фитосанитария. Карантин растений. 2021. № 2(6). С. 37–49.

#### Об авторах:

*Муvingи Муфаро* — аспирант агробиотехнологического департамента аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; e-mail: mufaromuvingi@gmail.com

ORCID: 0000-0001-7700-1296

*Словарева Ольга Юрьевна* — кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела организации межлабораторных сравнительных испытаний, Всероссийский центр карантина растений, Российская Федерация, 140150, Московская область, г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32; e-mail: slovareva.olga@gmail.com

ORCID: 0000-0001-6022-5955

*Заргар Мейсам* — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент агробиотехнологического департамента аграрно-технологического института, Российский университет дружбы народов, Российская Федерация, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; e-mail: zargar-m@rudn.ru

ORCID: 0000-0002-5208-0861

#### About authors:

*Muvingi Mufaro* — PhD student, Agrobiotechnology Department, Agrarian and Technological Institute, Peoples' Friendship University of Russia, 8 Miklukho-Maklaya st., Moscow, 117198, Russian Federation, email: mufaromuvingi@gmail.com

ORCID: 0000-0001-7700-1296

*Slovareva Olga Yurievna* — Candidate of Science (Biology), Junior Researcher, Department of Organization of Interlaboratory Comparison Tests, All-Russian Plant Quarantine Center, 32 Pogranchnaya st., Bykovo vill., Ramenskoye, Moscow Region, 140150, Russian Federation, email: slovareva.olga@gmail.com

ORCID: 0000-0001-6022-5955

*Zargar Meisam* — Candidate of Science (Agriculture), Associate Professor, Agrobiotechnology Department, Agrarian and Technological Institute, Peoples' Friendship University of Russia, 8 Miklukho-Maklaya st., Moscow, 117198, Russian Federation, email: zargar-m@rudn.ru

ORCID: 0000-0002-5208-0861