

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Молекулярно-генетическое выявление и дифференциация возбудителей бактериальной полосатости листьев риса *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

М.А. Королева¹, С.А. Блинова^{1, 2}✉, А.А. Шварцев¹, В.Е. Курочкин³, Я.И. Алексеев^{1, 3}

¹ ООО «Синтол», Москва, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

³ Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ sofyablinova@yandex.ru

Аннотация. Бактерии рода *Xanthomonas* Dowson, 1939 поражают около 400 видов растений, в том числе важные сельскохозяйственные культуры. Бактериальная полосатость риса – одно из самых разрушительных заболеваний, вызвано бактериями вида *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang et al., 1957) Swings et al., 1990. Сильное сходство симптомов поражения с другим карантинным близкородственным патовариантом – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama, 1922) Swings et al., 1990, а также возможность совместного заражения делают визуальную идентификацию невозможной. Карантинный статус и высокая вредоносность патогена требуют высокоэффективного, быстрого и точного метода его диагностики. Целью исследования были разработка и апробация наборов реагентов для выявления бактерии *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, вызывающей бактериальную полосатость листьев риса, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), а также ПЦР с последующим секвенированием ампликонов. В работе изучены образцы ДНК *X. o. pv. oryzae* и *X. o. pv. oryzicola*, полученные из коллекции CIRN-CFBR (Франция). Для проверки аналитической чувствительности была создана конструкция на основе вектора pA12-T с целевой вставкой 290 п. н. Были подобраны и апробированы праймеры и зонд для специфической амплификации фрагмента гена *hpa1* методом ПЦР-РВ, позволяющие обнаруживать ДНК *X. o. pv. oryzicola*. Показана способность с помощью разработанных праймеров обнаруживать все штаммы *X. o. pv. oryzicola*, последовательности которых находились в базе данных GenBank NCBI на 11.11.2021. Аналитическая специфичность набора реагентов протестирована на выборке из ДНК, выделенных из 53 близкородственных и сопутствующих организмов, и составила на исследованной выборке 100 %. Ложноположительных и ложноотрицательных результатов не обнаружено. Проверка аналитической чувствительности показала, что стабильный специфичный сигнал ПЦР-РВ наблюдался при разведении контрольной плазмиды до 25 копий на реакцию. Работоспособность полученного набора реагентов была подтверждена тестированием на пяти приборах для ПЦР-РВ разных производителей, что дает возможность рекомендовать его для проведения диагностических и скрининговых исследований. Праймеры для секвенирования seqX.o.all были подобраны на последовательность кластера генов *hrp*, а именно на нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Hrp1. Секвенирование выбранного участка позволяет эффективно дифференцировать бактерии вида *X. oryzae*.

Ключевые слова: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; *Xanthomonas*; полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ; бактериальная полосатость риса; специфичность; чувствительность; видовая диагностика.

Для цитирования: Королева М.А., Блинова С.А., Шварцев А.А., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И. Молекулярно-генетическое выявление и дифференциация возбудителей бактериальной полосатости листьев риса *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(6):544-552. DOI 10.18699/VJGB-22-66

Molecular genetic detection and differentiation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, bacterial leaf streak agents of rice

M.L. Koroleva¹, S.A. Blinova^{1, 2}✉, A.A. Shvartsev¹, V.E. Kurochkin³, Ya.I. Alekseev^{1, 3}

¹ Limited Liability Company "Syntol", Moscow, Russia

² All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

³ Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Science, St. Petersburg, Russia

✉ sofyablinova@yandex.ru

Abstract. The genus *Xanthomonas* comprises phytopathogenic bacteria which infect about 400 host species, including a wide variety of economically important plants. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang et al., 1957) Swings et al., 1990 is the causal agent of bacterial leaf streak (BLS) being one of the most destructive bacterial diseases of rice. BLS symptoms are very similar to those of bacterial blight caused by closely related *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

X. o. pv. oryzae and *X. o. pv. oryzicola* and often occur in rice fields simultaneously, so separate leaves may show symptoms of both diseases. The quarantine status and high severity of the pathogen require a highly efficient, fast and precise diagnostic method. We have developed an assay for *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* detection using real-time polymerase chain reaction (qPCR) and PCR amplicon sequencing. The DNA samples of *X. o. pv. oryzae* and *X. o. pv. oryzicola* were obtained from the collection of CIRM-CFBR (France). To evaluate the analytical sensitivity of the assay, a vector construct based on the pAL2T plasmid was created through the insertion of *X. o. pv. oryzicola* target fragment (290 bp). Primers and a probe for qPCR were selected for the *hpa1* gene site. They allowed identifying all the strains the sequences of which had been loaded in the GenBank NCBI Nucleotide database before November 11, 2021. The SeqX.o.all sequencing primers were selected for the *hrp* gene cluster sequence, namely for the nucleotide sequence encoding the Hpa1 protein, the sequencing of which allows for efficient differentiation of *X. oryzae* species. The analytical specificity of the system was tested using the DNAs of 53 closely related and accompanying microorganisms and comprised 100 % with no false-positive or false-negative results registered. The system's analytical sensitivity was not less than 25 copies per PCR reaction. Its efficacy has been confirmed using five different qPCR detection systems from different manufacturers, so it can be recommended for diagnostic and screening studies.

Key words: *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*; *Xanthomonas*; polymerase chain reaction; qPCR; bacterial leaf streak; specificity; sensitivity; species diagnostics.

For citation: Koroleva M.L., Blinova S.A., Shvartsev A.A., Kurochkin V.E., Alekseev Ya.I. Molecular genetic detection and differentiation of *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*, bacterial leaf streak agents of rice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):544-552. DOI 10.18699/VJGB-22-66

Введение

Бактерии рода *Xanthomonas* Dowson, 1939 широко распространены во всем мире и могут поражать не менее 400 видов растений, в том числе большой спектр экономически важных сельскохозяйственных культур (Bogdanove et al., 2011; Ryan et al., 2011; Fang et al., 2019). На сегодняшний день подробно описано 27 видов рода *Xanthomonas*, многие из которых отличаются высокой степенью вирулентности и специфичности к определенным видам растений (Leyns et al., 1984; Ryan et al., 2011; An et al., 2020). Одно из самых разрушительных заболеваний риса – бактериальная полосатость листьев (bacterial leaf streak, BLS), вызываемая бактериями вида *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* (Fang et al., 1957), Swings et al., 1990 (Soto-Suárez et al., 2010).

Заражение бактериальной полосатостью листьев приводит к потере урожая от 8 до 32 %, что является серьезной проблемой, особенно для стран, возделывающих рис (Liu et al., 2014; Jiang et al., 2020). Убытки, вызванные этим заболеванием, могут поставить под угрозу глобальную продовольственную безопасность (Tang et al., 2000; Lang et al., 2014). Патоген *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* включен в список I карантинных вредных организмов, отсутствующих на территории Евразийского экономического союза, а также в перечень A1 Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) вредных организмов, которые ЕОКЗР рекомендует регулировать в качестве карантинных¹. Принято считать, что бактериальная полосатость листьев риса впервые обнаружена на Филиппинах в 1918 г., однако бактерия, вызывающая данное заболевание, была идентифицирована только в 1957 г. в Китае (Nino-Liu et al., 2006). В настоящее время область распространения заболевания ограничивается тропической и субтропической Азией, северной частью Австралии, а также частью западной Африки (EPPO, 2007; Xie et al., 2014; Jiang et al., 2020). На сегодняшний день на территории Российской Федерации

X. o. pv. oryzicola отсутствует, однако ранее были зафиксированы² случаи заражения на Юге и Дальнем Востоке (EPPO, 2007, 2018). Согласно данным службы отчетности ЕОКЗР (EPPO Reporting Service), уже к 1994 г. в России не было случаев заражения данной бактерией³.

Основным растением-хозяином *X. o. pv. oryzicola* является рис (*Oryza sativa* L., 1753), кроме того, бактерии поражают некоторые злаковые сорные растения и незначительное число других культивируемых злаков *Poaceae*: *Leersia* spp., *Leptochloa* spp., *Oryza* spp., *Paspalum scrobiculatum*, *Zizania*, *Zoysia* spp. (Ou, 1985; Saddler, Bradbury, 2005; EPPO, 2007). Основные пути распространения возбудителя заболевания – зараженный семенной материал, а также через механические повреждения. Помимо этого, перенос на небольшие расстояния происходит с ветром, дождем или водой для орошения, а также за счет контакта с зараженным растительным материалом (Mew et al., 1993).

Бактерии вида *X. o. pv. oryzicola* размножаются в субстоматальной полости, проникая в лист в основном через устьица, и поражают межклеточное пространство паренхимы, однако они не попадают в ксилему, их распространение ограничено апопластом ткани мезофилла (Nino-Liu et al., 2006; Triplett et al., 2011; Jacques et al., 2016). Ранний этап заражения характеризуется наличием небольших водянистых межжилковых штрихов, по мере развития симптомов на поверхности листьев может появиться бактериальный экссудат (Mew et al., 1993). Жилки действуют как барьеры для прохождения патогена, пораженные участки удлиняются, распространяясь по всей длине листа, и со временем могут сливаться. При сильном заражении симптомы бактериальной полосатости риса трудно отличимы от бактериального ожога, вызываемого близкородственным карантинным видом *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*; также визуальную идентификацию затрудняют благоприятные условия внешней среды, способ-

¹ EPPO for the EU under Contract 90/399003. Data Sheets on Quarantine Pests. https://gd.eppo.int/download/doc/530_ds_XANTOR_en [Дата обращения: 23.11.2021].

² Cabi Invasive Species Compendium. Datasheet *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* (bacterial leaf streak of rice). <https://www.cabi.org/isc/> [Дата обращения: 23.11.2021].

³ EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int> [Дата обращения: 23.11.2021].

ствующие развитию симптомов, и степень устойчивости сортов растений (Swings et al., 1990; Poulin et al., 2014). Оба варианта могут встречаться на рисовых полях одновременно, а на некоторых растениях обнаруживаются симптомы обоих заболеваний (Mew et al., 1993; Nino-Liu et al., 2006).

Цель настоящего исследования – разработка и апробация системы диагностики для специфического выявления фитопатогена *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, вызывающего заболевание бактериальной полосатости листьев риса, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), а также ПЦР с последующим секвенированием ампликонов.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе центра коллективного пользования «Биотехнология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии и ООО «Синтол». В качестве положительных контролей прохождения специфичной реакции использовали образцы ДНК *X. o. pv. oryzae* (2532 – типовой штамм из Индии) и *X. o. pv. oryzicola* (2286 – малайзийский патотип, на него получена черновая сборка полного генома) (Wilkins et al., 2015) из коллекции CIRM-CFBP (Франция). Географическое распространение *X. o. pv. oryzae* приурочено к странам Азии, Африки и Северной Америки, в то время как *X. o. pv. oryzicola* распространен только в Азии и Африке. При выборе целевых штаммов опирались на статистику импорта риса в Россию, по данным базы таможенной статистики, ключевой поставщик риса – Индия (31.7 % от общего импорта на 2018 г.), также лидирующие позиции занимают Таиланд, Пакистан и Казахстан⁴.

При дизайне олигонуклеотидов для качественного определения наличия ДНК *X. o. pv. oryzicola* использовали участок гена *hpaI* (Universal Protein Resource (UniProt) <https://www.uniprot.org/> [Дата обращения: 23.11.2021]). Как и многие другие грамотрицательные патогенные бактерии, *X. o. pv. oryzicola* обладает системой секреции III типа (type three secretion system, T3SS), отвечающей за инфицирование и доставку эффекторных белков в клетки растения-хозяина (Zhu et al., 2000; Furutani et al., 2003; Li et al., 2011). Система T3SS и секретлируемые ею компоненты связаны с запуском гиперчувствительного ответа (hypersensitive response, HR) у резистентных растений и растений, не являющихся основными хозяевами данного патогена. Она кодируется локусом гена гиперчувствительности и патогенности – *hrp* (Cho et al., 2008; Fan et al., 2017). Основной оперон состоит из более чем 20 генов на нескольких транскрипционных единицах, которые содержат гены *hrp*, *hrc* и *hpa* (Zou et al., 2006; Cho et al., 2008). Синтез олигонуклеотидов проведен и расходные материалы предоставлены компанией ООО «Синтол» (Москва, Россия).

При постановке классической ПЦР и ПЦР в режиме реального времени использовали реакционный буфер В-009 (ООО «Синтол») со следующими концентрациями компонентов: 3 мМ MgCl₂, 0.25 мМ dNTP и 2.5 е. а. по-

лимеразы с ингибирующими активностью фермента анти-телами (ООО «Синтол»). При дизайне олигонуклеотидов учитывали параметры: средняя температура отжига: 60–62 °С для праймеров и 64–67 °С – для зонда, наличие на 3'-GC-clamp.

Многopараметрический анализ свойств подобранных праймеров проверяли при помощи онлайн-приложений Thermofisher Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com>), Promega Biomath Calculator – Tm for Oligos Calculator (<https://worldwide.promega.com>), Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu>). В флуоресцентно-меченом зонде для ПЦР-РВ использовали краситель FAM, присоединенный к 5'-концу зонда. Гасителем флуоресценции послужил краситель RTQ-1, присоединенный к 3'-концу зонда. Концентрация праймеров в реакционной смеси составляла 800 нМ, зонда – 400 нМ. Повторяемость и воспроизводимость результатов ПЦР-РВ оценивали при проведении реакций на следующих приборах: АНК-М (ИАП РАН, Россия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США), CFX-96 (Bio-Rad, США), DTprime 5 («ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene 6000 (Qiagen, США). За положительный результат принимали образцы, уровень сигнала флуоресценции которых превышал пороговую линию (10 % от разницы модулей самого низкого и самого высокого сигнала).

Для установления аналитической чувствительности набора реагентов была создана конструкция на основе вектора pAL2-T («Евроген», Россия) с целевой вставкой *X. oryzae* pv. *oryzicola* размером 290 п. н. Лигирование проводили после очистки продукта ПЦР набором для выделения ДНК из реакционных смесей ColGen (ООО «Синтол»). При создании векторной конструкции использовали T4 ДНК-лигазный буфер (Thermo Fisher Scientific), фермент – T4 ДНК-лигаза (Thermo Fisher Scientific). Встраивание плазмидной ДНК в клетки бактерии *Escherichia coli* (Migula 1895) осуществляли химическим методом (тепловой шок). Наличие вектора проверяли методом ПЦР-колонии с использованием стандартных праймеров M13, с последующей визуализацией в 1.5 % агарозном геле. Выделение плазмидной ДНК осуществляли при помощи набора реагентов PlasGen (ООО «Синтол»). Полученная кольцевая плаزمиды была обработана рестриктазой *NotI* (Thermo Fisher Scientific). Концентрацию плазмиды измеряли на флуориметре Quantus (Promega Corporation, США). Для определения аналитической чувствительности разрабатываемого набора реагентов проводили ПЦР-РВ с серией разведений плазмиды с известной концентрацией в дву- и четырехкратной повторности. Аналитическую специфичность разработанной системы праймеров и зондов проверяли на ДНК 53 близкородственных и сопутствующих организмов (Аляпкина и др., 2018).

Биоинформатический анализ и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения UGENE («Унипро», Россия) и AliView (Швеция).

Для секвенирования ДНК *X. o. pv. oryzicola* была сконструирована пара праймеров seqX.o.all_F 5'-TCCTTGAACACACAATTCGGCGG-3' и seqX.o.all_R 5'-TGGAGAATCTCTCCGACGATA-3'. Температурный режим

⁴ Экспертно-аналитический центр агробизнеса. <https://ab-centre.ru/articles/analiz-importa-risa-v-rossiyu-v-2001-2019-gg->

Таблица 1. Последовательности праймеров и зонда, участок гена *hpa1* бактерии *X. o. pv. oryzae* и соответствующая им программа амплификации

Название	Последовательность	Программа амплификации
Sva3X.o.col.a_F	F 5'-ATTCGAGCCAGGGCRGCAATG-3'	5 мин при 95 °С
Sva3X.o.col.a_R	R 5'-ACCAAAGTCGCCCGCTGCT-3'	15 с при 95 °С
Sva3X.o.col.a_FAM	Pb 5'-(FAM) AATCAGCAGGCCGGAAGGAGAA (RTQ1)-3'	40 с при 60 °С
		50 циклов

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер; Pb – зонд.

программы амплификации для проведения классической ПЦР: первичная денатурация – 5 мин при 95 °С; циклическая – 15 с при 95 °С; отжиг – 40 с при 60 °С; циклическая элонгация – 30 с при 72 °С; количество циклов – 36; финальная элонгация – 5 мин при 72 °С. Секвенирование ДНК выполняли на генетическом анализаторе Нанофор 05 (ИАП РАН).

Результаты и обсуждение

Поиск последовательностей в GenBank NCBI выявил 208 нуклеотидных последовательностей рода *Xanthomonas*, из них 20 штаммов *X. o. pv. oryzae*. При анализе выравнивания последовательностей в AliView были подобраны олигонуклеотиды для ПЦР-РВ на консервативные для *X. o. pv. oryzae* участки целевого гена *hpa1* таким образом, чтобы места посадки праймеров были строго специфичны и позволяли обнаруживать все штаммы целевого объекта, последовательности ДНК которых были загружены в базу данных GenBank NCBI⁵ на 11.11.2021. В табл. 1 представлены последовательности праймеров и зондов для диагностики бактерии *X. o. pv. oryzae*.

Аналитическую специфичность набора реагентов проверяли на 53 образцах ДНК близкородственных и сопутствующих объектов, полученных из различных коллекций, в том числе 9 образцов ДНК бактерий видов рода *Xanthomonas*.

Образцы получены из коллекций:

- ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР») и подразделений Россельхознадзора: *Ralstonia solanacearum* 0023, 0027, 0029, 0030, *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 0140, 0028, 0244, *C. m.* subsp. *michiganensis* 0240, 0241, 0242, 0243, *X. o. pv. oryzae* 0227, *X. phaseoli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 0141, 0168, *P. atrosepticum* 0142, *Dickeya solani*, *Xylophilus ampelinus* 0124, *Pantoea stewartii*, *P. st.* subsp. *indologenes*, *P. agglomerans*, *Candidatus Liberibacter*, *Acidovorax citrullii*;
- CIRN-CFBP (Франция): *P. st.* subsp. *indologenes* CFBP 3614, *C. m.* subsp. *nebraskensis* CFBP 2405, CFBP 3491, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* CFBP 3418, *C. fl.* pv. *poinsettiae* CFBP 2403, *C. fl.* pv. *oortii* CFBP 1384, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* CFBP 2534;
- Института Лейбница DSMZ – Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур GmbH (Германия): *X. gardneri* DSM 19127, *X. perforans* DSM 18975, *P. wasabiae* DSM 18074, *X. euvesicatoria* DSM 19128,

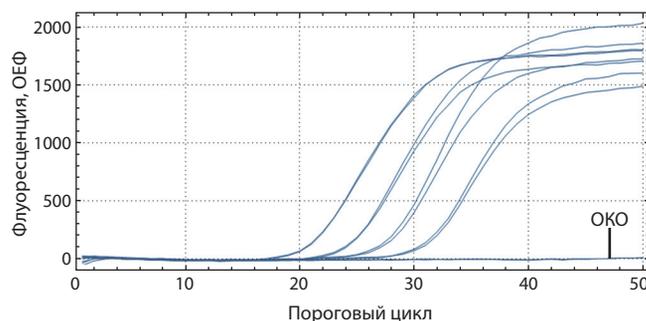


Рис. 1. Результаты ПЦР-РВ, серия разведений плазмиды с целевой вставкой ДНК *X. o. pv. oryzae* (0376), канал детекции FAM.

Интерфейс – CFX-96 (Bio-Rad); ОКО – отрицательный контрольный образец.

X. vesicatoria DSM 22252, *X. translucens* pv. *translucens* DSM 18974, *P. cacticida* DSM 21821, *P. betavascolorum* DSM 18076, *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae* DSM 18013, *D. d.* subsp. *dadantii* DSM 18020, *D. paradisiaca* DSM 18069, *D. chrysanthemi* DSM 4610, *D. zea* DSM 18068, *P. c.* subsp. *odoriferum* DSM 22556;

- внутренней коллекции ООО «Сингента» (Россия): *C. m.* subsp. *michiganensis*, *Agrobacteria* spp., *X. campestris* pv. *campestris*, *X. translucens* pv. *translucens*;
- Всероссийской коллекции микроорганизмов (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН г. Пущино, Московская область): *C. m.* subsp. *insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. m.* subsp. *nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, *Pseudomonas savastanoi* ВКМ В-1546;
- Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИ генетика, Москва): *C. albidum* ВКПМ В-1834.

Аналитическая специфичность праймеров и зонда в этой выборке близкородственных и сопутствующих организмов составила 100 %. Все образцы, содержащие ДНК *X. o. pv. oryzae*, дали положительный результат, что было подтверждено секвенированием. Ложноположительных результатов не выявлено, в том числе при внесении ДНК бактерии *X. o. pv. oryzae* – близкородственного патоварианта целевого объекта.

При проверке аналитической чувствительности исходная концентрация плазмиды с целевой вставкой *X. o. pv. oryzae* была 13 нг/мкл, что составило 3×10^9 копий/мкл. Для оценки аналитической чувствительности разрабатываемого набора проведена ПЦР-РВ с серией из семи разведений по следующей схеме: четыре 10-кратных разведения с соблюдением двойной повторности, начиная с

⁵ National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Дата обращения: 23.11.2021].

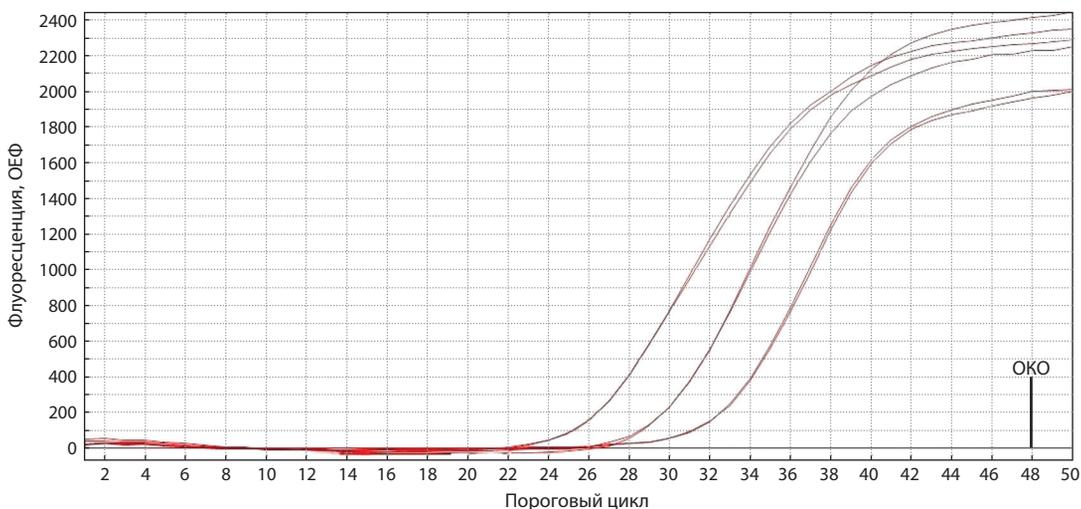


Рис. 2. Результаты ПЦР-РВ, серия разведений ДНК *X. o. pv. oryzae* (0376), канал детекции FAM. Интерфейс – АНК-М (ИАП РАН); ОКО – отрицательный контрольный образец.

Таблица 2. Результаты ПЦР-РВ на приборах пяти производителей при использовании набора реагентов для обнаружения участка гена *hpa1* бактерии *X. o. pv. oryzae*

Образцы, 10-кратное разведение	Пороговый цикл, Ct				
	АНК-М (ИАП РАН)	QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific)	CFX-96 (Bio-Rad)	DТprime 5 («ДНК-Технология»)	Rotor-Gene 6000 (Qiagen)
10 ⁻³	25.84	25.52	26.43	25.40	25.54
10 ⁻³	25.99	25.37	26.43	25.40	25.45
10 ⁻⁴	29.36	29.32	29.48	29.10	29.02
10 ⁻⁴	29.53	29.33	29.43	29.00	28.95
10 ⁻⁵	32.27	32.68	32.56	32.20	32.46
10 ⁻⁵	32.35	32.88	32.29	31.80	32.26
Отрицательный контроль	Отсутствует	Неопределенный	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Отрицательный контроль	Отсутствует	Неопределенный	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Наклон кинетической кривой, A	3.20	3.67	3.00	3.30	3.43
Коэффициент корреляции, R ²	0.998	0.999	0.998	0.997	1.000
Значение эффективности, E %	105	87	116	101	96

5-й серии разведений – в 4-кратной повторности (рис. 1). Концентрация плазмиды после первого разведения была 3×10^5 копий/мкл. Начиная с 150 копий плазмиды в реакцию все последующие серии разведений дополнительно титровали по схеме: 2×10^n , 5×10^n , 7×10^n в 4-кратной повторности. Для серии из семи 10-кратных разведений наклон кинетической кривой составил $A = -2.671$, коэффициент корреляции $R^2 = 0.989$. Стабильный специфичный сигнал ПЦР-РВ наблюдался при разведении до 25 копий плазмиды в реакции. Анализ чувствительности системы по 10-кратному разведению ДНК бактерии *X. o. pv. oryzae* показал более низкую чувствительность – до 43 копий ДНК на реакцию.

Разработанный набор реагентов был апробирован на пяти приборах для ПЦР-РВ зарубежного и российского производства (рис. 2, табл. 2). При проведении ПЦР-РВ

в качестве матрицы использовали серию 10-кратных разведений ДНК патогена. Наклон кинетической кривой составил $A = 3.00-3.67$, коэффициент корреляции $R^2 = 0.997-1.000$, эффективность ПЦР-РВ $E = 87-116\%$. Разница в пороговых значениях составила ± 1 цикл, что обусловлено конструктивными особенностями каждого прибора и алгоритмами расчета порогового цикла.

Для проверки пары праймеров seqX.o.all_F и seqX.o.all_R, позволяющих провести видовую диагностику методом секвенирования по Сенгеру, проведена классическая ПЦР, где в качестве матрицы использовались ДНК *X. o. pv. oryzae* (2532) и *X. o. pv. oryzae* (2286), а также смесь ДНК бактерий в соотношении 1:1 в качестве имитации совместного заражения.

Показательным участком, характеризующимся большим количеством нуклеотидных замен, при дифферен-

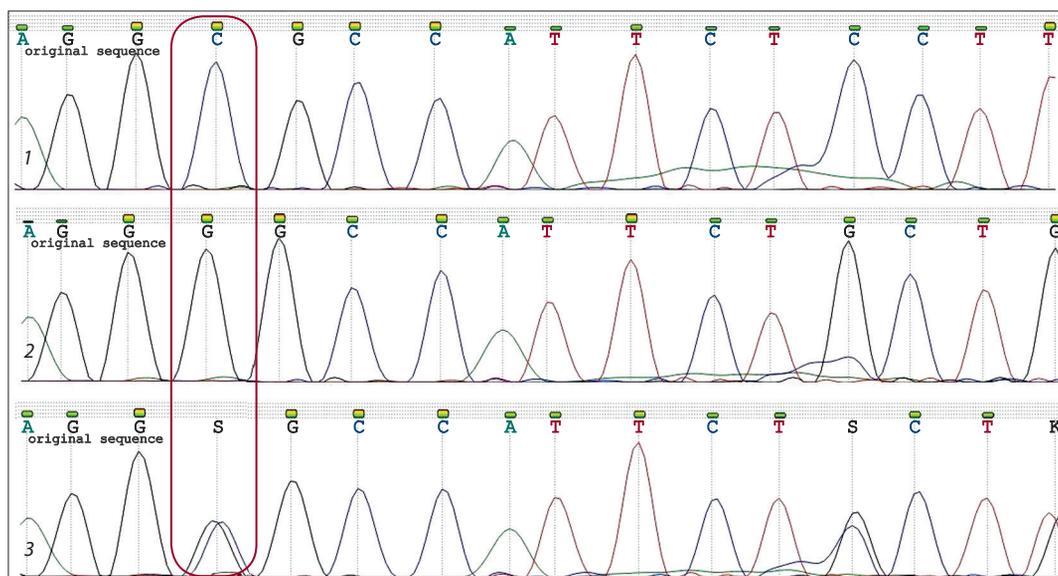


Рис. 3. Фрагменты последовательностей ДНК *X. oryzae* pv. *oryzicola* (1), *X. oryzae* pv. *oryzae* (2), смесь ДНК двух патовариантов (3), полученные в результате секвенирования с помощью пары праймеров seqX.o.all. Рамкой отмечено наложение пиков. Программное обеспечение – UGENE («Унипро»), версия 38.1.

циации двух близкородственных видов, является участок 2288483–2288778 п. н. относительно референсной последовательности CP050113.1 из баз данных NCBI GenBank. Сравнение нуклеотидных последовательностей *X. o.* pv. *oryzae*, *X. o.* pv. *oryzicola* и их смеси представлено на рис. 3, где наблюдается наложение пиков C/G, в отличие от результатов секвенирования каждого возбудителя отдельно: *X. o.* pv. *oryzae* (нуклеотид G), *X. o.* pv. *oryzicola* (нуклеотид C). Биоинформатический анализ полученных последовательностей подтверждает наличие ДНК как *X. o.* pv. *oryzae* и *X. o.* pv. *oryzicola*, так и сразу двух названных ранее организмов.

Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей при анализе сиквенсов смеси ДНК *X. o.* pv. *oryzae* и *X. o.* pv. *oryzicola* показало 19 нуклеотидных замен относительно референсного генома CP050113.1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain K2 chromosome, complete genome (см. табл. 3).

Помимо указанных в табл. 3 нуклеотидных замен, обнаружены трехнуклеотидная инсерция TGC у *X. o.* pv. *oryzicola* в положении 2288667 п. н. и трехнуклеотидная делеция *X. o.* pv. *oryzicola* относительно референсного генома *X. o.* pv. *oryzae*, положение 2288702 п. н. (рис. 4).

Специфичная посадка на *X. oryzae* разработанных праймеров для секвенирования позволяет выполнять анализ последовательностей патовариантов, определять совместное заражение двумя близкородственными бактериями, а также проводить их видовую идентификацию.

На основе полученных нуклеотидных последовательностей удалось подтвердить принадлежность культур к коллекционным штаммам относительно результатов из геномной базы данных. Выравнивание последовательностей базы данных позволяет выявить некоторое внутривидовое генетическое разнообразие штаммов *X. o.* pv. *oryzae*, место сбора которых – страны Африки. Генетическое разнооб-

Таблица 3. Выявляемые нуклеотидные замены в амплифицированном фрагменте при использовании праймеров для секвенирования seqX.o.all

№ п/п	Положение замены относительно референсного генома CP050113.1, п. н.	Тип замены	
		<i>X. o.</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>X. o.</i> pv. <i>oryzicola</i>
1	2288729	G	C
2	2288720	G	C
3	2288717	T	G
4	2288677	A	C
5	2288656	C	T
6	2288640	C	T
7	2288636	A	G
8	2288622	G	T
9	2288621	A	G
10	2288578	G	A
11	2288571	T	C
12	2288566	G	A
13	2288565	C	T
14	2288564	C	T
15	2288563	C	G
16	2288562	T	C
17	2288561	G	T
18	2288559	T	C
19	2288558	T	C

CP050113.1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain K2 chromosome. complete genome
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_1 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* + *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*
 _R_2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* + *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

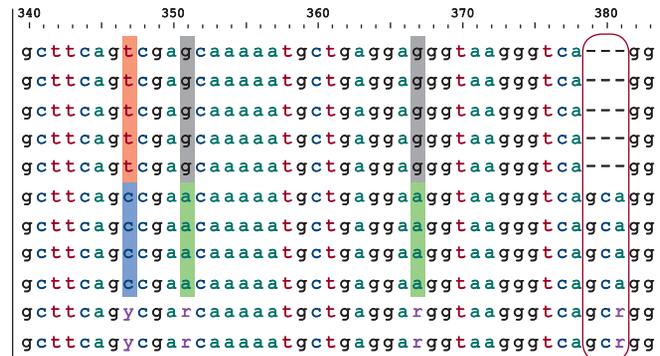


Рис. 4. Выравнивание последовательностей ДНК *X. o. pv. oryzae* и *X. o. pv. oryzicola* и смеси ДНК двух патовариантов, полученных в результате секвенирования с помощью праймеров seqX.o.all.

Рамкой отмечено место делеции. Выравнивания получены в программе AliView (Швеция), версия 1.27.

разии штаммов *X. o. pv. oryzicola* невелико, одна SNP на исследуемый участок кластера генов *hpaI*. Несмотря на генетический полиморфизм популяций бактериальных возбудителей болезней риса, сконструированные праймеры как для проведения секвенирования, так и для системы ПЦР-РВ позволяют определить все изоляты, вне зависимости от точки сбора материала, депонированные в базу данных Nucleotide NCBI.

Большинство процедур, описанных для обнаружения *X. o. pv. oryzae*, также применимо для *X. o. pv. oryzicola*. Идентификация бактерий группы *X. oryzae* начинается с отбора образцов с выраженными симптомами заражения и последующего высева на питательную среду. Этот метод не лишен недостатков: колонии обеих бактерий медленно растут на изолирующих средах; проблемой является и наличие доминирующих видов бактерий и микроорганизмов-антагонистов, что мешает наблюдению за колониями целевых бактерий. Разделение двух патовариантов *X. oryzae* возможно по фенотипическим признакам, симптомам индуцирования, серологическим тестам, электрофорезу белков в полиакриламидном геле (фингерпринтинг), фаготипированию (Vera Cruz et al., 1984; Benedict et al., 1989; EPPO, 2007).

Исследования на основе метода полиморфизма длин рестриционных фрагментов позволяют получить более полное представление о генетическом разнообразии изолятов и их происхождении (Gonzalez et al., 2007). Однако эти методы имеют ряд существенных недостатков, включая чувствительность, специфичность и трудоемкость, неприменимую в диагностических, поточных лабораториях, поэтому для идентификации бактерий рода *X. oryzae* широкое применение нашел метод ПЦР (Sakthivel et al., 2001).

В настоящее время все разнообразие диагностических систем предназначено для выявления вида *X. oryzae* в целом, и дальнейшее разделение на патоварианты происходит при помощи классической ПЦР с видоспецифичными праймерами на *X. o. pv. oryzae*, рекомендованными ЕОКЗР и ФГБУ «Всероссийский центр карантин растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), и с последующим секвенированием. Протоколом ЕОКЗР для идентификации *X. o. pv. oryzae* и *X. o. pv. oryzicola* рекомендуется применение праймеров ТХТ/ТХТ-4R (Sakthivel et al., 2001; EPPO,

2007; Lang et al., 2010). Для обнаружения ДНК *X. oryzae* методом ПЦР-РВ предложены праймеры, разработанные в ФГБУ «ВНИИКР» X.o.F/X.o.R, и зонд X.or.P (Егорова и др., 2014). Для разделения двух патовариантов возможно проведение ПЦР-РВ с использованием праймеров PF/PR и TaqMan-зонда, они предназначены исключительно для выявления *X. o. pv. oryzae* (Zhao et al., 2007).

В 2021 г. ФГБУ «ВНИИКР» проведены межлабораторные сравнительные испытания в области карантина растений по обнаружению бактериальной полосатости риса (21X00). В этом раунде участвовали 16 референтных центров и межобластных ветеринарных лабораторий, которые успешно прошли испытание по выявлению данного возбудителя с помощью разработанного нами набора реагентов для ПЦР-РВ «*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*-РВ».

Заключение

Система диагностики дает возможность выявлять возбудителя бактериальной полосатости листьев риса. Система представляет собой набор реагентов для полимеразной цепной реакции в реальном времени «*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*-РВ», а также праймеры seqX.o.all_F/R для классической ПЦР с последующим секвенированием, выявляющие оба патоварианта *X. oryzae* как при одиночном, так и при совместном заражении. Система диагностики дает возможность проводить полноценный скрининг подкарантинной продукции подтверждая полученный методом ПЦР-РВ результат секвенированием ДНК. Набор реагентов для ПЦР-РВ успешно апробирован на пяти приборах для ПЦР-РВ разных производителей, что позволяет рекомендовать данную тест-систему для диагностических и скрининговых анализов в исследовательских и диагностических лабораториях.

Список литературы / References

- Аляпкина Ю.С., Моисеева М.В., Ксенофонтова О.В., Алексеев Я.И. Разработка и валидация набора для мультиплексного ПЦР-РВ анализа регуляторных элементов (промотора SsuAra и терминатора E9) для обнаружения генетически модифицированных (ГМ) линий риса, сои, картофеля и других растений. *Изв. Тимирязев. с.-х. академии*. 2018;3:5-16. DOI 10.26897/0021-342X-2018-3-5-16.
 [Alyapkina Yu.S., Moiseeva M.V., Ksenofontova O.V., Alekseev Ya.I. Development and validation of multiplex real-time PCR

- test system for analyzing regulator elements (SsuAra promoter and E9 terminator) to detect genetically-modified strains of rape, soybeans, potatoes, and other plants. *Izvestiya Timiryazevskoy Selsk Khozyajstvennoy Akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2018;3:5-16. DOI 10.26897/0021-342X-2018-3-5-16. (in Russian)]
- Egorova M.S., Ignatov A.N., Mazurin E.S. Усовершенствование методов диагностики возбудителя бактериального ожога риса на основе ПЦР. *Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Агрономия и животноводство*. 2014;2:22-27. DOI 10.22363/2312-797X-2014-2-22-27.
- [Egorova M.S., Ignatov A.N., Mazurin E.S. Improvement of PCR-based methods for detecting bacterial blight of rice. *Vestnik Rossijskogo Universiteta Druzhy Narodov. Seriya Agronomiya i Zhivotnovodstvo = RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2014; 2:22-27. DOI 10.22363/2312-797X-2014-2-22-27. (in Russian)]
- An S.Q., Potnis N., Dow M., Vorhölter F.J., He Y.Q., Becker A., Teper D., Li Y., Wang N., Bleris L., Tang J.L. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2020;44(1):1-32. DOI 10.1093/femsre/fuz024.
- Benedict A.A., Alvarez A.M., Berestecky J., Imanaka W., Mizumoto C.Y., Pollard L.W., Mew T.W., Gonzalez C.F. Pathovar-specific monoclonal antibodies for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*. *Phytopathology*. 1989; 79(3):322-328. DOI 10.1094/Phyto-79-322.
- Bogdanove A.J., Koebnik R., Lu H., Furutani A., Angiuoli S.V., Patil P.B., ... Brendel V.P., Rabinowicz P.D., Leach J.E., White F.F., Salzberg S.L. Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *J. Bacteriol.* 2011;193(19):5450-5464. DOI 10.1128/JB.05262-11.
- Cho H.J., Park Y.J., Noh T.H., Kim Y.T., Kim J.G., Song E.S., Lee D.H., Lee B.M. Molecular analysis of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859. *Microb. Pathog.* 2008;44(6):473-483. DOI 10.1016/j.micpath.2007.12.002.
- EPPO. *Xanthomonas oryzae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2007; 37(3):543-553. DOI 10.1111/j.1365-2338.2007.01162.x.
- EPPO. Corrigendum. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2018;48(2):318. DOI 10.1111/epp.12474.
- Fan S., Tian F., Li J., Hutchins W., Chen H., Yang F., Yuan X., Cui Z., Yang C.H., He C. Identification of phenolic compounds that suppress the virulence of *Xanthomonas oryzae* on rice via the type III secretion system. *Mol. Plant. Pathol.* 2017;18(4):555-568. DOI 10.1111/mpp.12415.
- Fang Y., Wang H., Liu X., Xin D., Rao Y., Zhu B. Transcriptome analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* exposed to H₂O₂ reveals horizontal gene transfer contributes to its oxidative stress response. *PLoS One*. 2019;14(10):e0218844. DOI 10.1371/journal.pone.0218844.
- Furutani A., Tsuge S., Oku T., Tsuno K., Inoue Y., Ochiai H., Kaku H., Kubo Y. HpaI secretion via type III secretion system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Gen. Plant. Pathol.* 2003;69(4):271-275. DOI 10.1007/s10327-003-0042-2.
- Gonzalez C., Szurek B., Manceau C., Mathieu T., Séré Y., Verdier V. Molecular and pathotypic characterization of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007;20(5):534-546. DOI 10.1094/MPMI-20-5-0534.
- Jacques M.A., Arlat M., Boulanger A., Boureau T., Carrère S., Cesbron S., Chen N.W., Cociancich S., Darrasse A., Denancé N., Fischer-Le Saux M., Gagnevin L., Koebnik R., Lauber E., Noël L.D., Pieretti I., Portier P., Pruvost O., Rieux A., Robène I., Royer M., Szurek B., Verdier V., Vernière C. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016;54:163-187. DOI 10.1146/annurev-phyto-080615-100147.
- Jiang N., Yan J., Liang Y., Shi Y., He Z., Wu Y., Zeng Q., Liu X., Peng J. Resistance genes and their interactions with bacterial blight/leaf streak pathogens (*Xanthomonas oryzae*) in rice (*Oryza sativa* L.) – an updated review. *Rice*. 2020;13(1):3. DOI 10.1186/s12284-019-0358-y.
- Lang J.M., Hamilton J.P., Diaz M.G.Q., Van Sluys M.A., Burgos M.R.G., Vera Cruz C.M., Buell C.R., Tisserat N.A., Leach J.E. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant Dis.* 2010;94(3):311-319. DOI 10.1094/pdis-94-3-0311.
- Lang J.M., Langlois P., Nguyen M.H., Triplett L.R., Purdie L., Holton T.A., Djikeng A., Vera Cruz C.M., Verdier V., Leach J.E. Sensitive detection of *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* and *oryzicola* by loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;80(15):4519-4530. DOI 10.1128/AEM.00274-14.
- Leyns F., De Cleene M., Swings J.G., De Ley J. The host range of the genus *Xanthomonas*. *Bot. Rev.* 1984;50(3):308-356. DOI 10.1007/bf02862635.
- Li Y.R., Zou H.S., Che Y.Z., Cui Y.P., Guo W., Zou L.F., Chatterjee S., Biddle E.M., Yang C.H., Chen G.Y. A novel regulatory role of HrpD6 in regulating *hrp-hrc-hpa* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011;24(9):1086-1101. DOI 10.1094/MPMI-09-10-0205.
- Liu W., Liu J., Triplett L., Leach J.E., Wang G.L. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2014;52:213-241. DOI 10.1146/annurev-phyto-102313-045926.
- Mew T.W., Alvarez A.M., Leach J.E., Swings J. Focus on bacterial blight of rice. *Plant Dis.* 1993;77:5-12. DOI 10.1094/PD-77-0005.
- Nino-Liu D.O., Ronald P.C., Bogdanove A.J. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol. Plant Pathol.* 2006;7(5):303-324. DOI 10.1111/j.1364-3703.2006.00344.x.
- Ou S.H. Rice Diseases. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985;96-101.
- Poulin L., Grygiel P., Magne M., Gagnevin L., Rodriguez-R L.M., Forero Serna N., Zhao S., El Rafii M., Dao S., Tekete C., Wonn I., Koita O., Pruvost O., Verdier V., Vernière C., Koebnik R. New multilocus variable-number tandem-repeat analysis tool for surveillance and local epidemiology of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak of rice caused by *Xanthomonas oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;81(2):688-698. DOI 10.1128/aem.02768-14.
- Ryan R.P., Vorhölter F.J., Potnis N., Jones J.B., Van Sluys M.A., Bogdanove A.J., Dow J.M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011;9(5): 344-355. DOI 10.1038/nrmicro2558.
- Saddler G.S., Bradbury J.F. *Xanthomonadales ord. nov.* In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Boston: Springer, 2005;63-122. DOI 10.1007/0-387-28022-7_3.
- Sakthivel N., Mortensen C.N., Mathur S.B. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001;56(3-4):435-441. DOI 10.1007/s002530100641.
- Soto-Suárez M., Gonzalez C., Piégu B., Tohme J., Verdier V. Genomic comparison between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, using suppression-subtractive hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010;308(1):16-23. DOI 10.1111/j.1574-6968.2010.01985.x.
- Swings J., Van Den Mooter M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T.W., Kersters K. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990;40(3):309-311. DOI 10.1099/00207713-40-3-309.
- Tang D., Wu W., Li W., Lu H., Worland A.J. Mapping of QTLs conferring resistance to bacterial leaf streak in rice. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101:286-291. DOI 10.1007/s001220051481.

- Triplett L.R., Hamilton J.P., Buell C.R., Tisserat N.A., Verdier V., Zink F., Leach J.E. Genomic analysis of *Xanthomonas oryzae* isolates from rice grown in the United States reveals substantial divergence from known *X. oryzae* pathovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77(12):3930-3937. DOI 10.1128/AEM.00028-11.
- Vera Cruz C.M., Gossele F., Kersters K., Segers P., Van Den Mooter M., Swings J., De Ley J. Differentiation between *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* and the bacterial 'brown blotch' pathogen on rice by numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams. *J. Gen. Microbiol.* 1984;130(11):2983-2999. DOI 10.1099/00221287-130-11-2983.
- Wilkins K.E., Booher N.J., Wang L., Bogdanove A.J. TAL effectors and activation of predicted host targets distinguish Asian from African strains of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* while strict conservation suggests universal importance of five TAL effectors. *Front. Plant Sci.* 2015;6:536. DOI 10.3389/fpls.2015.00536.
- Xie X., Chen Z., Cao J., Guan H., Lin D., Li C., Lan T., Duan Y., Mao D., Wu W. Toward the positional cloning of qBlsr5a, a QTL underlying resistance to bacterial leaf streak, using overlapping sub-CSSLs in rice. *PLoS One.* 2014;9(4):e95751. DOI 10.1371/journal.pone.0095751.
- Zhao W.J., Zhu S.F., Liao X.L., Chen H.Y., Tan T.W. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in seeds using a specific TaqMan probe. *Mol. Biotechnol.* 2007;35(2):119-127. DOI 10.1007/BF02686106.
- Zhu W., MaGbanua M.M., White F.F. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* 2000;182(7):1844-1853. DOI 10.1128/JB.182.7.1844-1853.2000.
- Zou L.F., Wang X.P., Xiang Y., Zhang B., Li Y.R., Xiao Y.L., Wang J.S., Walmsley A.R., Chen G.Y. Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(9):6212-6224. DOI 10.1128/AEM.00511-06.

ORCID ID

M.L. Koroleva orcid.org/0000-0001-8746-6249
S.A. Blinova orcid.org/0000-0001-6782-8353
A.A. Shvartsev orcid.org/0000-0002-2786-9860
V.E. Kurochkin orcid.org/0000-0001-8743-9507
Ya. I. Alekseev orcid.org/0000-0002-1696-7684

Благодарности. Авторы выражают благодарность организациям и институтам, предоставившим образцы ДНК для проведения исследования: ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), подразделениям Россельхознадзора по защите и карантину растений, Институту Лейбница DSMZ – Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Французской коллекции микроорганизмов CIRM-CFBP, ООО «Сингента», Всероссийской коллекции микроорганизмов, Институту биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.01.2022. После доработки 28.03.2022. Принята к публикации 11.05.2022.