

ПОДБОР ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ШТАММОВ *XANTHOMONAS ARBORICOLA*, ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЗЛАКОВЫХ И КАПУСТНЫХ КУЛЬТУР

Е.И. Кырова^{1*}, А.Н. Игнатов²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²Российский университет дружбы народов, Москва

* ответственный за переписку, e-mail: ekirova1911@yandex.ru

Группа бактерий рода *Xanthomonas*, вирулентных для пшеницы, ржи, ячменя, томата, подсолнечника и капустных культур, была выделена в России в 2001–2008 гг. Анализ физиологических признаков и мультилокусное секвенирование показали принадлежность бактерий к виду *Xanthomonas arboricola*. Сравнение генома, представительного для данной группы штамма 3004, выделенного из ячменя, но также вирулентного для подсолнечника, китайской капусты и грецкого ореха, продемонстрировало отсутствие следов транспортной системы третьего типа Т3SS и горизонтальный перенос ряда других генов вирулентности из отдаленно-родственных видов. Было предложено использовать гены транспортной системы четвертого типа Т4SS в качестве мишени для группоспецифического анализа этих патогенных штаммов. После проведения проверки, на основе фрагмента гена *virD4*, были разработаны праймерная пара и зонд для детекции в режиме ПЦР в реальном времени. Продукты амплификации были получены для всех штаммов *Xanthomonas arboricola* и не обнаружены у бактерий других видов ксантомонад и эпифитных бактерий, присутствующих на растениях-хозяевах. Разработанный диагностикум позволяет определять целевую группу *Xanthomonas arboricola* на пораженных растениях при прямом ПЦР или после периода роста на селективной питательной среде (био-ПЦР), и имеет чувствительность выше, чем у традиционного метода выделения бактерий на селективной питательной среде.

Ключевые слова: геномный анализ, гены вирулентности, подсолнечник, ПЦР в реальном времени, семенная инфекция

Поступила в редакцию: 10.03.2021

Принята к печати: 30.05.2021

Введение

Россия находится на третьем месте в мире по производству зерновых злаков (сем. *Poaceae*) и капустных культур (сем. *Brassicaceae*). Только в 2019 году было собрано 99.4 млн тонн зерновых, а также 363.4 тыс. тонн капустных культур (FAO, 2020). Несмотря на высокие валовые показатели, наблюдается потеря значительной части урожая от заболеваний различной этиологии в период вегетации и хранения. В последние годы отмечается увеличение вредоносности бактериальных болезней (Евсеев, Каракозов, 2021; Лазарев и др., 2017).

Бактериозами злаков, вызываемыми комплексом бактерий рода *Xanthomonas*, заражено до 50% площадей зерновых злаков в мире. При ранней эпифитотии потери урожая восприимчивых сортов могут достигать 40% (Кугова, Игнатов, 2019). Сосудистый бактериоз капустных, вызываемый *X. campestris*, широко распространен во всем мире, включая Россию. Известны случаи, когда раннее заражение капустных культур от инфицированных семян вызвало потери 90% потенциального урожая (Williams, 1980).

Начиная с 2000-х годов на территории РФ описано заражение растений обособленной группой штаммов *X. arboricola* (Игнатов и др., 2009; Игнатов и др., 2010). В рамках данного вида известны несколько специализированных и очень вредоносных патовариантов (патоваров): *X. arboricola* pv. *arracaciae*, *X. arboricola* pv. *celebensis*, *X. arboricola* pv. *corylina*, *X. arboricola* pv. *fragariae*,

X. arboricola pv. *guizotiae*, *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. arboricola* pv. *poinsetticola*, *X. arboricola* pv. *populi*, *X. arboricola* pv. *pruni* и *X. arboricola* pv. *zantedeschiae* (Vauterin et al., 1995; Fischer-Le Saux et al., 2015).

Атипичные штаммы *X. arboricola*, не принадлежащие к ранее известным патоварам, способны поражать широкий круг культур: злаки, томаты, подсолнечник, рапс и капусту, в добавление к традиционным растениям-хозяевам этого вида (грецкий орех, фундук, косточковые плодовые, земляника, бананы, тополь и др.) (Игнатов и др., 2010). Факторы, обуславливающие широкий круг поражаемых растений у некоторых групп штаммов до сих пор неизвестны. Об оценке реакции к *X. arboricola* среди различных сортов растений-хозяев в научной литературе не сообщается. Нет также сведений и об эффективных средствах химического и биологического контроля возбудителя.

Единственным эффективным методом снижения вредоносности патогена является своевременное выявление и выбраковка зараженного семенного и посадочного материала. Для выявления фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* методом ПЦР были предложены в качестве мишеней различные гены, как участвующие в патогенезе и принадлежащие системе секреции III типа (Т3SS), так и гены «домашнего хозяйства», например β-субъединицы ДНК-гиразы (*gyrB*) (Leite et al., 1994; Пунина, 2009; Егорова, 2014; Hasan et al., 2018).

Как показали предварительные исследования, широко используемые гены-мишени нельзя применять для ПЦР-детекции атипичных штаммов *X. arboricola*. В первую очередь это связано с отсутствием генов T3SS у данной группы (Ignatov et al., 2015; Мокрякова и др., 2010). Вторым ограничивающим фактором является недостаточное разнообразие и давление отбора на ген *gyrB* в эволюции ксантомонад (Кырова, 2014), что может привести к появлению ложных результатов при определении зараженности посевного материала. In silico ПЦР с праймерами, разработанными Егоровой и коллегами показал, что тест-система на основе гена *gyrB* позволяет выявить лишь 46% атипичных штаммов из исследуемой нами коллекции (s1, s2, s3, s4, Br1363, Br1364, Br1365, Br1366, ya3028, ya1265, ya3004, Bo1392, Bo1393, Bo1395).

Анализ генома штамма 3004, представляющего атипичную группу *X. arboricola* (Ignatov et al., 2015) позволил

выявить гены-мишени для детекции таких штаммов. Мы рассмотрели перспективную группу генов-мишеней, принадлежащих к системе секреции IV типа. Гены систем секреции достаточно консервативны, так как участвуют в процессах патогенеза. С другой стороны, они достаточно изменчивы в связи с их ролью во взаимодействии патоген-хозяин. Исходя из этого, можно сказать, что гены группы транспортных систем обладают достаточным уровнем полиморфизма для идентификации на различных уровнях – от вида до штамма. Специфичные ПЦР-праймеры на гены T4SS для фитопатогенных бактерий рода *Agrobacterium* (Haas et al, 1995; Bini et al, 2008) давно рекомендовали себя в качестве практического метода обнаружения и идентификации целевых патогенов. В данной работе мы описываем разработку протокола диагностики атипичных штаммов на основе гена *virD4*.

Материалы и методы

В работе была использована коллекция из 30 атипичных штаммов *X. arboricola*, собранных Игнатовым А.Н. (РУДН) и Пехтерева Э.Ш. (ГНУ-ВНИИ фитопатологии),

а также типовой штамм *X. arboricola* pv. *juglandis* ICMP 35 (табл. 1). В качестве контролей использовали ранее изученные штаммы видов *X. campestris*, *X. vesicatoria*, *X. oryzae*,

Таблица 1. Список штаммов, использованных в работе
Table 1. The list of strains used in the present study

Вид Species	Штамм Strain	Растение-хозяин Host Plant
Целевые штаммы Target strains		
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	ICMP 35	<i>Juglandis regia</i>
	s1	<i>Helianthus annuus</i>
	s2	
	s3	
	s4	
	Bo1392	<i>Brassica oleracea</i>
	Bo1393	
	Bo1395	
	Br1343	<i>Brassica napus</i>
	Br1344	
	Br1346	
	Br1347	
	Br1348	
	Br1349	
	Br1350	
	Br1351	
	Br1352	
	Br1353	
	Br1354	
Br1355		
Br1356		
Br1357		
Br1363		
Br1364		
Br1365		
Br1366		
ya1265	<i>Hordeum vulgare</i>	
ya3004		
ya3028		
To1577	<i>Solanum lycopersicum</i>	
To417		

Вид Species	Штамм Strain	Растение-хозяин Host Plant
Прочие фитопатогенные бактерии Other phytopathogenic bacteria		
<i>X. vesicatoria</i>	2360	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>X. axonopodis</i>	HRI924a	<i>Phaseoli vulgaris</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	NCPBB 528T	<i>Brassica oleracea</i>
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	NCPBB 3002	<i>Oryza sativa</i>
<i>X. hortorum</i>	NCPBB 939	<i>Hedera helix</i>
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	H2	<i>Daucus carota</i>
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	PB70	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1845	<i>Helianthus annuus</i>
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	1209	<i>Solanum lycopersicum</i>
Эпифитные и ризосферные бактерии Epiphyte and rhizosphere bacteria		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ko430	<i>Triticum aestivum</i>
<i>Bacillus cereus</i>	Bc462, Bc475	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sm213, Sm488, Sm1550	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ec467, Ec216	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	B525	-
<i>Serratia plymuthica</i>	Sp490	-
<i>Advenella mimigardefordensis</i>	A517	-
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	E451	-
<i>Serratia proteomaculans</i>	Spr401	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	Pa1239	-
<i>Pantoea vagans</i>	Pv1392	-

X. hortorum, *X. axonopodis* и штаммы других фитопатогенных бактерий (*Pseudomonas* spp., *Clavibacter* spp., *Dickeya* spp., *Pectobacterium* spp.), а также непатогенные эпифитные и ризосферные бактерии из коллекций РУДН, ВИЗР и РГАУ-МСХА – всего 24 штамма нецелевых видов.

Видовая принадлежность всех штаммов была определена секвенированием фрагментов гена *16S rRNA*, а для ксантомонад, дополнительно, мультилокусным секвенированием фрагментов 4 генов, входящих в стандартную схему мультилокусного генотипирования (Young et al., 2008). Все штаммы хранились в замороженном виде при -80°C и использовались для экспериментов после обязательной проверки чистоты и соответствия оригинальной культуре по морфологическим и основным физиологическим признакам рода *Xanthomonas* и вида *X. arboricola*.

Для выделения ДНК бактерии культивировали на питательной среде YDC (глюкоза – 10 г; дрожжевой экстракт – 10 г; CaCO_3 – 20 г; агар – 18 г; дистиллированная вода до 1 литра) при 28°C в течение 24–48 ч (Schaad et al., 2001).

ДНК выделяли из одной петли 48 ч бактериальной культуры или 100 мкл бактериальной суспензии в диапазоне концентраций от 2×10^8 до 2×10^{-1} КОЕ/мл с помощью набора «Фитосорб», кат. № РН-520 (ООО «Синтол», Москва) согласно рекомендациям производителя.

Для подбора гена-мишени использовались геномные последовательности *X. arboricola* штамма (шт.) 3004 (GenBank accession no. GCA_000585435), *X. arboricola* pv. *juglandis* шт. 417 (CP012251.1), *X. arboricola* шт. 17 (CP011256.1), *X. arboricola* pv. *pruni* шт. 15-088 (CP044334.1), *X. campestris* pv. *campestris* шт. ATCC 33913T (AE008922.1), *X. oryzae* pv. *oryzae* шт. ICMP3125 (CP031697.1), *X. vesicatoria* шт. ATCC 35937 (CP018725.1), *X. citri* pv. *citri* шт. 306 (AE008923.1), *X. hortorum* шт. B07-007 (CP016878.1), *X. fragariae* шт. PD885 (LT853882.1), *X. campestris* pv. *vesicatoria* шт. 85-10 (AM039952.1), *X. translucens* pv. *undulosa* шт. ICMP11055 (CP009750.1).

Выравнивание геномов осуществлялось с помощью алгоритма Blast Atlas на сервере GView (<https://server.gview.ca/>) и программного обеспечения Mauve 2.4.0, алгоритма progressiveMauve (Darling et al., 2010). Параметры были выставлены по умолчанию. Выравнивание алгоритмом progressiveMauve выполнялось в двух вариантах. Первый вариант проводился с использованием последовательностей геномов *X. arboricola* для выявления варибельных участков и уникальных последовательностей

– потенциальных генов-мишеней. Второй вариант представлял собой межвидовое сравнение для оценки специфичности выбранных регионов.

Число полиморфных позиций, филогенетически информативных позиций и коэффициент консервативности последовательностей рассчитывали в программе DnaSP6 (Rozas et al., 2017).

Праймеры для амплификации фрагментов генов *virB3*, *virB4* и *virB9*, а также праймеры и зонд для амплификации целевого фрагмента гена *virD4* были подобраны к варибельным участкам соответствующих генов с помощью алгоритма Primer BLAST, основанного на Primer 3 (Ye et al., 2012). Последовательности праймеров для гена *virD4*: *virD4_xa_f* (5'-CCG GAC ATC TTG ATC TTG GTT GCG T-3'), *virD4_xa_r* (3'-CTG ACG CTT CTG TTG TTG CGG CT-5') и *virD4_xa_z* (ROX –CAG CGC CTT GAC GTA GCG GTA G -BHQ2) были отобраны по результатам предварительных ПЦР - амплификаций классическим методом, с верификацией продуктов ПЦР - электрофорезом в агарозном геле и секвенированием фрагментов ожидаемой длины (данные не показаны). Длина продукта амплификации фрагмента гена *virD4* с праймерами *virD4_xa_f*/*virD4_xa_r* составляла 121 н.п.

Для постановки реакции была использована «2.5x реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (кат. № М-428 Синтол, Москва). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Для подбора наилучшего состава смеси проводили оптимизацию по концентрации MgCl_2 , прямого, обратного праймеров и флуоресцентного зонда. Концентрация остальных компонентов реакционной соответствовала рекомендациям производителя набора.

ПЦР-реакцию проводили на амплификаторе Real-time CFX96 Touch (BIO-RAD) с использованием предварительно оптимизированного температурно-временного профиля: 95°C – 5 мин, и последующие 35 циклов с профилем 95°C – 15 сек, 70°C – 40 сек.

Для определения чувствительности тест-системы готовили разведения суспензии бактериальных клеток в концентрации от 2×10^8 до 2×10^{-1} КОЕ/мл для последующего выделения ДНК и постановки реакции. Концентрацию бактерий проверяли методом высева 10-кратных стандартных разведений на чашки Петри с агаризованной средой YDC, и подсчетом числа колоний через 4 дня инкубации при 28°C .

Результаты

Проведенное нами для поиска гена-мишени множественное выравнивание геномов бактерий вида *X. arboricola* показало достаточно высокую синтению и степень сходства последовательностей для большей части генов. Варибельные участки, преимущественно, приходятся на обрывки контигов, гены метаболизма, межгенные регионы и гены T3SS и T4SS. Было отмечено наличие ряда уникальных последовательностей штамма *X. arboricola* 3004. К ним относились гены секретируемых белков, транспозаз, нуклеаз, протеаз, профаговые последовательности, гены, кодирующие белки VirE, FimV, RhsD, и большое число консервативных гипотетических пептидов. Было также подтверждено отсутствие у шт. 3004 кластера генов T3SS (рис. 1, 2), что делает невозможным их

использование для детекции штаммов, поражающих злаковые и капустные культуры на территории РФ.

На этапе проверки специфичности найденных уникальных по сравнению с другими геномами *X. arboricola* последовательностей шт. 3004, нами была отмечена высокая гомология данных участков хотя бы с одним из геномов других видов ксантомонад, в частности с видами *X. campestris* и *X. hortorum*, гомология соответствующих фрагментов генома штамма 3004 достигала 96%, а с *X. citri* – 99%. Данный факт может указывать на т.н. «мозаичность» генома в пределах рода *Xanthomonas* (Merda et al. 2017), которая накладывает серьезные ограничения на разрабатываемые тест-системы, т.к. ввиду высокой схожести последовательности потенциальных

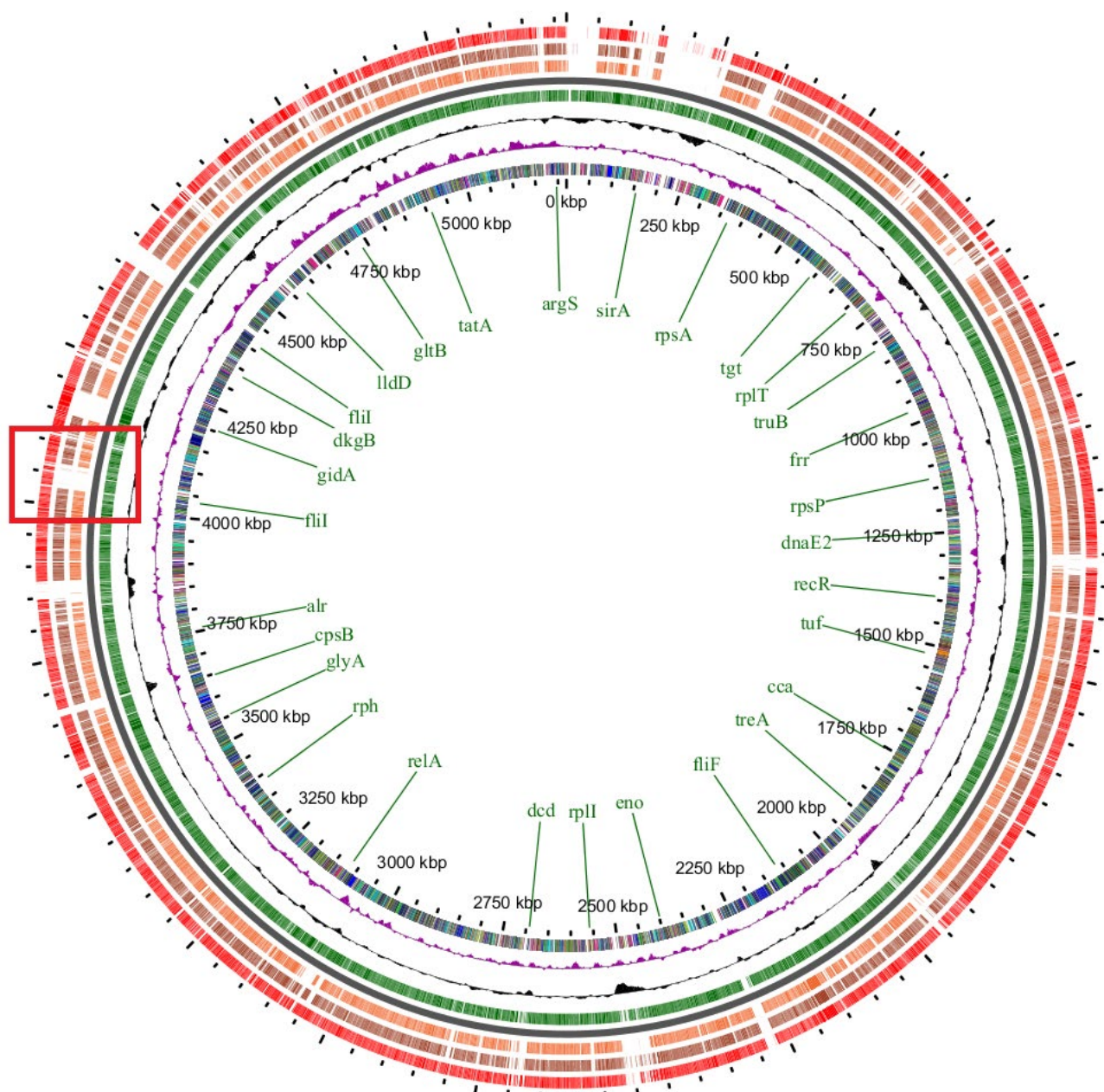


Рисунок 1. Анализ методом BLAST геномов штаммов *Xanthomonas arboricola*. Расположение геномов от центра к периферии в порядке: *X. arboricola* pv. *juglandis* str. 417, *X. arboricola* 3004, *X. arboricola* 17, *X. arboricola* pv. *pruni* str. 15-088. Прямоугольником выделена область кластера генов Т3SS. Кластер генов отсутствует у штаммов *X. arboricola* 17 и *X. arboricola* 3004

Figure 1. BLAST analysis of the genomes of *Xanthomonas arboricola* strains. Genomes are arranged from the center to the periphery in the following order: *X. arboricola* pv. *juglandis* str. 417, *X. arboricola* 3004, *X. arboricola* 17, *X. arboricola* pv. *pruni* str. 15-088. The T3SS gene cluster region is highlighted with a rectangle. The gene cluster is absent in *X. arboricola* 17 and *X. arboricola* 3004 strains

уникальных диагностических фрагментов с последовательностями родственных видов велика вероятность ложных результатов.

Среди найденных переменных участков выделяется по своей функциональной полноте кластер генов T4SS, расположенный на участке 547534–558304 н.п. генома шт. 3004 (рис. 2). Кластер генов T4SS консервативен по строению у различных видов ксантонад (Cesbron et al., 2015). Данные гены описаны в литературе и детально изучены у многих видов бактерий (Juhás et al., 2008). Система T4SS штамма 3004 содержит 10 *vir* генов и 15 генов, отвечающих за сборку пили для секреции *vir* белков. Каждый из генов обладает показателями изменчивости достаточными

для достижения необходимых уровней таксономического разрешения от вида до штамма (табл. 2), за исключением генов *virB6* и *virB5*, являющихся многокопийными.

На основании предварительной оценки ряда праймеров для амплификации генов *virD4*, *virB3*, *virB4*, и *virB9*, были отобраны праймеры для гена *virD4*, отличавшиеся высокой специфичностью и эффективностью ПЦР. В предыдущих исследованиях мы выявили разнородность штаммов *X. arboricola* выделенных как из одной культуры, так и из разных растений-хозяев. Высоко изменчивые гены не подходили для детекции генетически разнородной группы штаммов. При выравнивании последовательностей гена *virD4* у атипичных штаммов с последовательностями

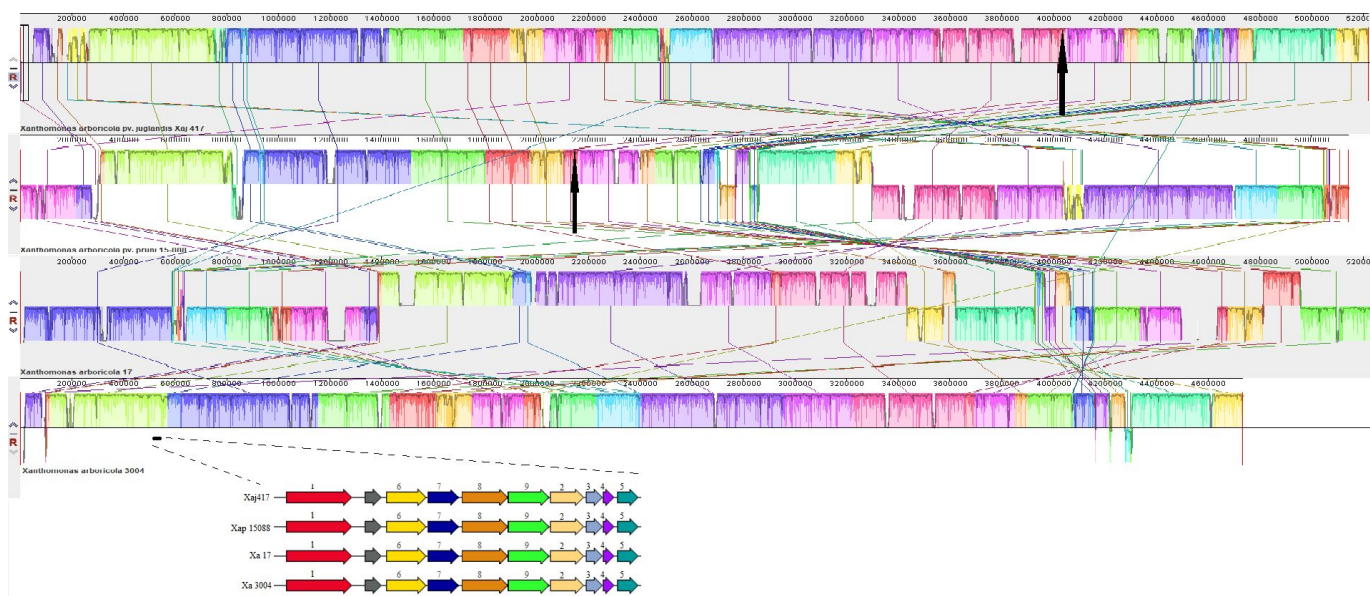


Рисунок 2. Полногеммное выравнивание геномов штаммов *Xanthomonas arboricola*, доступных в базах данных и *X. arboricola* шт. 3004. Кластер генов T4SS расположен на участке 556631–4186000 н.п. Структура кластера T4SS консервативна, гены обозначены цифрами: 1-*virD4*, 2-*virB1*, 3-*virB2*, 4-*virB3*, 5-*virB4*, 6-*virB8*, 7-*virB9*, 8-*virB10*, 9-*virB10*. Гены *virB5* и *virB6* находятся за пределами кластера и многокопийны. Местоположение кластера генов T3SS показано стрелками. У штаммов *X. arboricola* шт. 17 и *X. arboricola* шт. 3004 кластер T3SS не найден

Figure 2. Comprehensive genome alignment of *Xanthomonas arboricola* strains available in the databases and *X. arboricola* str. 3004. T4SS gene cluster is located at 556631 to 4186000 bp. The structure of the T4SS cluster is conserved; genes are numbered as follows: 1-*virD4*, 2-*virB1*, 3-*virB2*, 4-*virB3*, 5-*virB4*, 6-*virB8*, 7-*virB9*, 8-*virB10*, 9-*virB10*. *VirB5* and *virB6* genes are located outside the cluster and are multicopy. Location of the T3SS gene cluster is shown with arrows. T3SS genes were not found in *X. arboricola* str. 17 and *X. arboricola* str. 3004.

Таблица 2. Полиморфизм нуклеотидных последовательностей генов T4SS *Xanthomonas arboricola* и других представителей семейства Xanthomonadaceae

Показатель	Полиморфизм генов <i>vir</i> на уровне вида/рода								
	<i>virD4</i>	<i>virB1</i>	<i>virB2</i>	<i>virB3</i>	<i>virB4</i>	<i>virB8</i>	<i>virB9</i>	<i>virB10</i>	<i>virB11</i>
Число полиморфных позиций	145/518	369/347	139/262	89/104	645/930	196/554	213/419	322/518	282/722
Число филогенетически информативных позиций	90/496	239/484	103/126	57/91	257/868	73/451	61/248	21/490	111/661
Коэффициент консервативности последовательностей	0.913/ 0.676	0.560/ 0.422	0.422/ 0.321	0.603/ 0.574	0.735/ 0.613	0.727/ 0.165	0.704/ 0.453	0.711/ 0.455	0.728/ 0.276

Table 2. Polymorphism of the nucleotide sequences of T4SS genes in *Xanthomonas arboricola* and other members of the Xanthomonadaceae family

Indicator	Polymorphism of the <i>vir</i> genes at the species/genus level								
	<i>virD4</i>	<i>virB1</i>	<i>virB2</i>	<i>virB3</i>	<i>virB4</i>	<i>virB8</i>	<i>virB9</i>	<i>virB10</i>	<i>virB11</i>
Number of polymorphic sites	145/518	369/347	139/262	89/104	645/930	196/554	213/419	322/518	282/722
Number of phylogenetically informative sites	90/496	239/484	103/126	57/91	257/868	73/451	61/248	21/490	111/661
Sequence conservation coefficient	0.913/ 0.676	0.560/ 0.422	0.422/ 0.321	0.603/ 0.574	0.735/ 0.613	0.727/ 0.165	0.704/ 0.453	0.711/ 0.455	0.728/ 0.276

Xanthomonas spp., найденными в Генбанке, было отмечено, что этот ген сочетает в себе достаточную консервативность внутри вида и вариабельность между разными видами бактерий. Высокая внутривидовая консервативность, по-видимому, связана с его биологической функцией в патогенезе. Мутации в данном гене могут привести к полной потере функциональности T4SS (Souza et al., 2015). Данная особенность является достоинством при разработке

системы детекции видов с высокой частотой генетической изменчивости. Из-за своей предполагаемой роли в патогенезе, данный ген с меньшей долей вероятности будет вовлечён в эволюционные процессы.

После подбора последовательностей праймера и зонда нами были оптимизированы такие параметры для постановки реакции как температура отжига, концентрация праймеров и зонда, концентрация MgCl₂.

Подбор температуры отжига праймеров осуществляли с помощью градиента температур от 60 °С до 70 °С с шагом в 2 °С. Несмотря на более низкое значение порогового цикла Cq при температурах отжига от 60 °С до 68 °С включительно, при проведении анализа регистрировалось образование неспецифических продуктов амплификации.

Подбор оптимальной концентрации праймеров и зонда осуществляли в диапазоне от 9 до 4 pmol для каждого из компонентов. Экспериментально установлено следующее оптимальное соотношение концентраций: 9 pmol зонда и 7 pmol каждого праймера.

Количество MgCl₂ определялось в диапазоне от 0.5 µl до 1.5 µl с шагом в 0.25. Оптимальное количество было определено нами как 1 µl 25 mM раствора на 25мкл реакционной смеси. Несмотря на то, что наименьшее Ct регистрировалось при добавлении в реакционную смесь 0.5 µl MgCl₂, кривые имели не типичную, линейную форму (кривая-выброс). Такие результаты не могут быть учтены. При добавлении в реакционную смесь MgCl₂ более 1 µl наблюдалось ингибирование реакции после 6–8 циклов, следующих за пересечением пороговой линии.

Таким образом реакционная смесь имела следующий состав на конечный объем 25 µl: 10мкл 2.5x реакционного буфера, по 7 pmol каждого праймера, 9 pmol зонда, 1 µl 25 mM раствора MgCl₂.

Для оценки специфичности реакции были использованы виды бактерий, приведенные в таблице 4. Система отличается высокой специфичностью и не выявляет другие виды *Xanthomonas*, а также бактерии других родов (табл. 4, рис. 3).

Полученные результаты демонстрируют, что чувствительность разработанной системы-детекции потенциально может достигать 20 КОЕ/мл (табл. 5)

Следует отметить, что при 10-кратном повторении эксперимента по оценке чувствительности, в 2-х из 10-и повторений отмечалась нестабильность реакции, проявившаяся в отсутствии детекции при концентрации 2×10¹ КОЕ/мл. Таким образом, чувствительность можно оценить как 2×10² КОЕ/мл. В качестве одного из путей повышения чувствительности реакции возможно использование БЮ-PCR анализа.

Таблица 4. Оценка специфичности разработанной тест-системы на основе гена *virD4* of *Xanthomonas arboricola*
Table 4. Assessment of specificity of the test system based on *virD4* gene in *Xanthomonas arboricola*

Вид Species	Число штаммов Number of Strains	Среднее значение порогового цикла Cq Mean quantitation cycle Cq
Фитопатогенные виды Phytopathogenic species		
<i>X. arboricola</i>	31	20.7
<i>X. campestris</i>	1	N/A
<i>X. vesicatoria</i>	1	N/A
<i>X. oryzae</i>	1	N/A
<i>X. hortorum</i>	1	N/A
<i>X. axonopodis</i>	1	N/A
<i>C. michiganensis</i> sbsp. <i>sepedonicus</i> .	1	N/A
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1	N/A
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	1	N/A
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1	N/A
Эрпифитные и ризосферные виды Epiphyte and rhizosphere species		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	N/A
<i>Bacillus cereus</i>	2	N/A
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	N/A
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	N/A
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	1	N/A
<i>Serratia plymuthica</i>	1	N/A
<i>Advenella mimigardefordensis</i>	1	N/A
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	N/A
<i>Serratia proteomaculans</i>	1	N/A
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	N/A
<i>Pantoea vagans</i>	1	N/A

N/A – пороговый уровень не перейден до 35 цикла реакции.

N/A – threshold level is not reached before 35th reaction cycle.

Таблица 5. Оценка чувствительности и воспроизводимости разработанной тест-системы для детекции *Xanthomonas arboricola*

Концентрация суспензии клеток патогена	2×10 ⁸	2×10 ⁷	2×10 ⁶	2×10 ⁵	2×10 ⁴	2×10 ³	2×10 ²	2×10 ¹	2×10 ⁰	2×10 ⁻¹
Среднее значение порогового цикла Cq	15.20	16.77	17.56	23.29	26.04	27.37	28.89	31.78	N/A	N/A
Стандартное отклонение	1.24	0.2	0.33	0.49	0.5	0.41	0.63	13.44	N/A	N/A

Table 5. Sensitivity and repeatability of the developed test system for *Xanthomonas arboricola* detection

Concentration of the cell suspension of the pathogen	2×10 ⁸	2×10 ⁷	2×10 ⁶	2×10 ⁵	2×10 ⁴	2×10 ³	2×10 ²	2×10 ¹	2×10 ⁰	2×10 ⁻¹
Mean quantitation cycle Cq	15.20	16.77	17.56	23.29	26.04	27.37	28.89	31.78	N/A	N/A
Standard deviation	1.24	0.2	0.33	0.49	0.5	0.41	0.63	13.44	N/A	N/A

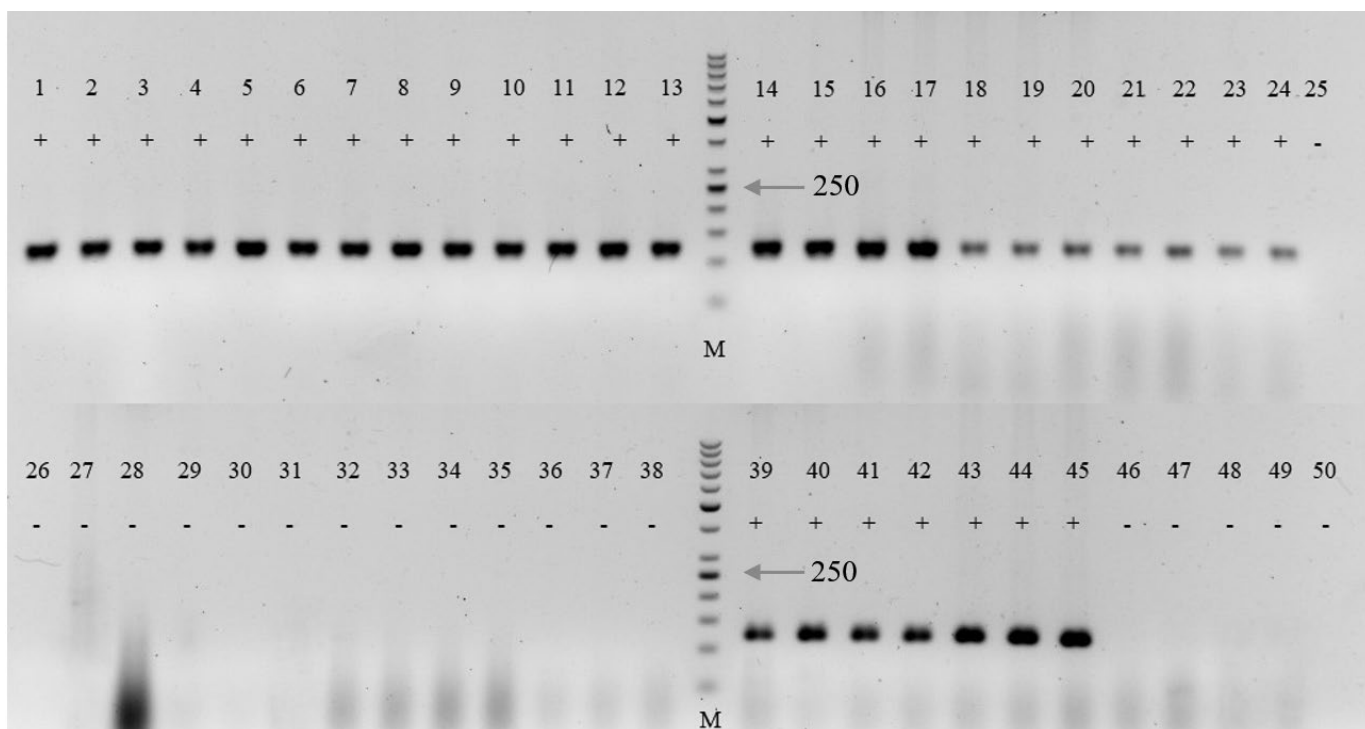


Рисунок 3. Детекция штаммов *Xanthomonas arboricola*, патогенных для злаковых и капустных культур. Размер диагностического фрагмента 121 н.п. М – маркер молекулярного веса 50bp «Fermentas», 1 – ICMP 35, 2 – s1, 3 – s2, 4 – s3, 5 – s4, 6 – Bo1392, 7 – Bo1393, 8 – Bo1395, 9 – Br1343, 10 – Br1344, 11 – Br1345, 12 – Br1346, 13 – Br1347, 14 – Br1348, 15 – Br1349, 16 – Br1350, 17 – Br1351, 18 – Br1352, 19 – Br1353, 20 – Br1354, 21 – Br1355, 22 – Br1356, 23 – Br1357, 24 – Br1363, 25 – Br1364, 26 – *X. campestris*, 27 – *X. vesicatoria*, 28 – *X. oryzae*, 29 – *X. hortorum*, 30 – *X. axonopodis*, 31 – *Clavibacter spp.*, 32 – *Pectobacterium spp.*, 33 – *Dickeya spp.*, 34 – *Pseudomonas spp.*, 35 – *Klebsiella spp.*, 36 – *Bacillus spp.*, 37 – *Stenotrophomonas spp.*, 38 – *Enterobacter spp.*, 39 – Br1365, 40 – Br1366, 41 – ya1265, 42 – ya3004, 43 – ya3028, 44 – To1577, 45 – To417, 46 – *Bradyrhizobium spp.*, 47 – *Serratia spp.*, 48 – *Advenella spp.*, 49 – *Pantoea spp.*, 50 – отрицательный контроль

Figure 3. Detection of *Xanthomonas arboricola* strains pathogenic to cereals and cabbage crops. The size of the diagnostic fragment is 121 n.p. M – molecular weight marker 50bp “Fermentas”, 1 – ICMP 35, 2 – s1, 3 – s2, 4 – s3, 5 – s4, 6 – Bo1392, 7 – Bo1393, 8 – Bo1395, 9 – Br1343, 10 – Br1344, 11 – Br1345, 12 – Br1346, 13 – Br1347, 14 – Br1348, 15 – Br1349, 16 – Br1350, 17 – Br1351, 18 – Br1352, 19 – Br1353, 20 – Br1354, 21 – Br1355, 22 – Br1356, 23 – Br1357, 24 – Br1363, 25 – Br1364, 26 – *X. campestris*, 27 – *X. vesicatoria*, 28 – *X. oryzae*, 29 – *X. hortorum*, 30 – *X. axonopodis*, 31 – *Clavibacter spp.*, 32 – *Pectobacterium spp.*, 33 – *Dickeya spp.*, 34 – *Pseudomonas spp.*, 35 – *Klebsiella spp.*, 36 – *Bacillus spp.*, 37 – *Stenotrophomonas spp.*, 38 – *Enterobacter spp.*, 39 – Br1365, 40 – Br1366, 41 – ya1265, 42 – ya3004, 43 – ya3028, 44 – To1577, 45 – To417, 46 – *Bradyrhizobium spp.*, 47 – *Serratia spp.*, 48 – *Advenella spp.*, 49 – *Pantoea spp.*, 50 – negative control

Обсуждение

На сегодняшний день существует не менее 50 протоколов определения бактерий рода *Xanthomonas*, основанных на методах классической ПЦР, RT-ПЦР и ВЮ-ПЦР (Егорова, 2015). Все системы детекции на основе метода ПЦР способны различать организмы на следующих уровнях: род, вид, патовариант и штамм. Вариабельность целевого гена является основой для его выбора. Первые системы детекции, основанные на последовательностях 16s рНК, не позволяли идентифицировать бактерии на уровне ниже вида в связи с низкой скоростью изменчивости данного гена (Moore et al., 1997). Затем было предложено использование последовательностей межгенного транскрибируемого региона 16S-23S рНК. Данный регион показывал значительную изменчивость в результате дрейфа генов (Garcia-Martínez et al., 1996; Tokajian et al., 2016). Он изменяется до 10 раз быстрее гена 16S рНК, что позволило использовать его для видовой идентификации бактерий (Rosato et al., 2002). В 1996 году было

предложено использовать для видовой идентификации гены «домашнего хозяйства». Широкое применение на практике в качестве гена-мишени получил ген *gyrB*. Последовательности данного гена были использованы в качестве филогенетического маркера, а также в качестве диагностического маркера на уровне рода и вида (Yamamoto et al., 1996; Yamamoto et al., 1999). Использование тест-систем на основе последовательностей гена *gyrB* позволило идентифицировать такие виды, как *X. fragariae*, *X. oryzae*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. translucens*, *X. axonopodis*, *X. citri* и *X. alfalfa* (Parkinson et al., 2007). Для выявления различных патовариантов *X. campestris* и некоторых других видов рода *Xanthomonas* также используются гены ТЗSS (Leite et al., 1994; Zaccardelli et al., 2007; Hasan et al., 2018). Для детекции *X. arboricola* pv. *pruni* были разработаны тест-системы на различные участки *hrp* генов (Park et al., 2010; Palacio-Bielsa et al., 2015). Кроме того, для выявления *X. arboricola* используют ряд генов-мишеней,

идентифицированных с помощью *in silico* подходов (ХА11, ХА16 и ХА18), и АВС-транспортеры (Palacio-Bielsa et al, 2011, Fernandes et al, 2017).

Атипичные штаммы *X. arboricola* представляют из себя сложную группу для диагностики, что связано с их генетическими особенностями. Аннотация генома шт. 3004 подтвердила отсутствие генов Т3SS, выявленное ранее при постановке реакции ПЦР с праймерами на консервативные участки данных генов и генов белков эффекторов. При множественном выравнивании с помощью алгоритма progressiveMauve генома шт. 3004 с 11-ю полностью секвенированными и аннотированными последовательностями геномов бактерий рода *Xanthomonas* наблюдалась высокая гомология многих участков генома шт. 3004 с таким же участком хотя бы у одного из 11 штаммов. Высокая гомология отдельных участков может способствовать появлению ложноположительного результата. Кроме того, штаммы группы *X. arboricola* 3004 достаточно генетически разнородны, что может быть связано с активными процессами приспособления к новому кругу растений-хозяев. При использовании мультилокусного генотипирования с использованием генов *gyrB*, *dnaK*, *rpoD*, *purA*, *nrdB*, *prpC*, *fabB*. согласно протоколам, разработанным Янгом и коллегами (Young et al., 2008), практически все штаммы четко не типизируются до патоварианта и вида, несмотря

на типичные для *X. arboricola* биохимические свойства (Кырова и др., 2014). Использование высоковариабельных генов для такой группы штаммов также приводит к появлению ложных результатов.

В качестве перспективных генов-мишеней для идентификации данной группы мы отмечаем гены системы секреции IV типа (Т4SS). На сегодняшний день в базах данных белковых и нуклеотидных последовательностей депонировано более тысячи последовательностей Т4SS бактерий рода *Xanthomonas*. Все они проявляют достаточно ограниченную гомологию друг с другом внутри видов (Souza et al., 2015). Ограниченная гомология таких генов была также отмечена и при анализе множественного выравнивания геномов бактерий рода *Xanthomonas*.

Разработанная нами тест-система на основе гена *virD4* Т4SS показала высокую специфичность и чувствительность. Мы также предполагаем, что выбранный при разработке тест-системы участок возможно использовать для систем-детекции на уровне вида и у других представителей рода *Xanthomonas*. Для детекции отдельных патовариантов *X. arboricola* мы предлагаем использовать гены *virB3*, *virB4* и *virB9*, показавшие при множественном выравнивании более высокий уровень вариабельности. Возможность их использования для атипичных штаммов *X. arboricola* требует дополнительного изучения.

Библиографический список (References)

- Евсеев ВВ, Каракотов СД (2021) Бактериозы зерновых культур в лесостепной зоне Зауралья, Южного Урала и Северного Казахстана. *Защита и карантин растений* (1):13–17
- Егорова МС, Игнатов АН, Мазурин ЕС (2014) Диагностика нового бактериального патогена злаковых культур *Xanthomonas arboricola* методом ПЦР «в реальном времени». *Защита картофеля* (2):39–42
- Егорова МС (2015) Видовое разнообразие и методы диагностики фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*, поражающих растения семейства Мятликовые (*Poaceae*): Дисс. ... к.б.н. Москва. 132 с.
- Игнатов АН, Пунина НВ, Матвеева ЕВ, Корнев КП и др (2009) Новые возбудители бактериозов и прогноз их распространения в России. *Защита и карантин растений* (4):38–40
- Игнатов АН, Пунина НВ, Матвеева ЕВ, Пехтерева ЭШ и др (2010) *Xanthomonas arboricola* – бактериальный патоген сельскохозяйственных культур в России. *Защита и карантин растений* (4):41–43
- Кырова ЕИ, Виноградова СВ, Игнатов АН (2014) Мультилокусное гентипирование *Xanthomonas arboricola* российской популяции. *Защита картофеля* (2):91–94
- Лазарев АМ, Мысник ЕН, Игнатов АН (2017) Ареал и зона вредоносности сосудистого бактериоза капусты. *Вестник защиты растений* 1(91):52–55
- Мокрякова МВ, Абдеева ИА, Пирузян ЭС, Шаад НВ и др (2010) Разнообразие генов-эффекторов у бактерий рода *Xanthomonas*. *Микробиология* 79(1):63–71
- Пунина НВ (2009) Оценка генетического разнообразия фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* и разработка молекулярных маркеров для их диагностики. Дисс. ... к.б.н. Москва. 188 с.
- Bini F, Kuczmog A, Putnoky P, Otten L et al (2008) Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis* 47(3):181–189
- Cesbron S, Briand M, Essakhi S, Gironde S et al (2015) Comparative genomics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas arboricola* unveil molecular and evolutionary events linked to pathoadaptation. *Front Plant Sci* 6:1126. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01126>
- Darling AE, Mau B, Perna NT (2010) progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS ONE* 5(6):e11147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
- Fernandes C, Albuquerque P, Sousa R, Cruz L et al (2017) Multiple DNA markers for identification of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates and its direct detection in plant samples. *Plant Dis* 101(6):858–865. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1481-RE>
- Fischer-Le Saux M, Bonneau S, Essakhi S, Manceau C et al (2015) Aggressive emerging pathovars of *Xanthomonas arboricola* represent widespread epidemic clones that are distinct from poorly pathogenic strains, as revealed by multilocus sequence typing. *Appl Environ Microbiol* (81):4651–4688. <https://doi.org/10.1128/AEM.00050-15>
- Garcia-Martinez J, Martinez-Murcia A, Anton AI, Rodriguez-Valera F (1996) Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. *J Bacteriol Res* 178(21):6374–6377. <https://doi.org/10.1128/jb.178.21.6374-6377.1996>
- Haas JH, Moore LW, Ream W, Manulis S (1995) Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl Environ Microbiol* 61(8):2879–2884.
- Hasan SZ, Hossain F, Zaoti ZF, Hasan F et al (2018) PCR amplification of DNA sequence related to the *hrpD* gene of

- Xanthomonas cucurbitae* in leaf spot disease of pumpkin and their antagonism by soil bacteria. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz* 51(5–6):252–266. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1460923>
- Ignatov AN, Кырова EI, Vinogradova SV, Kamionskaya et al (2015) Draft genome sequence of *Xanthomonas arboricola* strain 3004, a causal agent of bacterial disease on barley. *Genome Announc* 3(1):e01572-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01572-14>
- Juhas M, Crook DW, Hood DW (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol* 10(12):2377–2386. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01187.x>
- Кырова EI, Ignatov AN (2019) Diagnostics of phytopathogens of genus *Xanthomonas* infecting *Poaceae* plants. *Innovative in Agriculture*. 14–17
- Leite RP, Minsavage GV, Bonas U, Stall RE (1994) Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl Environ Microbiol* 60(4):1068–1077.
- Merda D, Briand M, Bosis E, Rousseau C et al (2017) Ancestral acquisitions, gene flow and multiple evolutionary trajectories of the type three secretion system and effectors in *Xanthomonas* plant pathogens. *Mol Ecol* 26(21):5939–5952. <https://doi.org/10.1111/mec.14343>
- Moore ER, Krüger AS, Hauben L, Seal SE et al (1997) 16S rRNA gene sequence analyses and inter-and intragenetic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol Lett* 151(2):145–153. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12563.x>
- Palacio-Bielsa A, Cubero J, Cambra MA, Collados R et al (2011) Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species. *Appl Environ Microbiol* 77(1):89–97. <https://doi.org/10.1128/AEM.01593-10>
- Palacio-Bielsa A, López-Soriano P, Bühlmann A, van Doorn J et al (2015) Evaluation of a real-time PCR and a loop-mediated isothermal amplification for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in plant tissue samples. *J Microbiol Methods* 112:36–39. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.005>
- Park SY, Lee YS, Koh YJ, Hur JS et al (2010) Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* by PCR using primers based on DNA sequences related to the *hrp* genes. *Sci J Microbiol* 48(5):554–558.
- Parkinson N, Aritua V, Heeney J, Cowie C et al (2007). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(12):2881–2887. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65220-0>
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S et al (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol Biol Evol* 34:3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press). 373p
- Souza DP, Oka GU, Alvarez-Martinez CE, Bisson-Filho AW et al (2015) Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nat Commun* 6(1):1–9.
- Tokajian S, Issa N, Salloum T, Ibrahim J et al (2016) 16S rRNA gene intergenic spacer region variability helps resolve closely related spingomonads. *Front Microbiol* 7:149. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00149>
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 45(3):472–489. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-472>
- Williams PH (1980) Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Dis* 64(8):736–742.
- Yamamoto S, Bouvet PJ, Harayama S (1999) Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol* 49(1):87–95. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-87>
- Yamamoto S, Harayama S (1996) Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Evol Microbiol* 46(2):506–511. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-506>
- Young JM, Park DC, Shearman HM, Fargier E (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* 31(5):366–377. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.004>
- Zaccardelli M, Campanile F, Spasiano A, Merighi M (2007) Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene *hrcC*. *Eur J Plant Pathol* 118(3):299–306. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9115-y>

Translation of Russian References

- Evseev VV, Karakotov SD (2021) [Bacterial diseases of cereal crops in the woodsteppe area of the Trans-Urals, Southern Urals and Northern Kazakhstan]. *Zashchita i karantin rasteniy* (1):13–17 (In Russian)
- Egorova MS, Ignatov AN, Mazurin ES (2014) [Real-time PCR detection of *Xanthomonas arboricola*, a new bacterial pathogen of cereal crops]. *Zashchita kartofelya* (2):39–42 (In Russian)
- Egorova MS (2015) [Species diversity and diagnostic methods of phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas* affecting plants of the *Poaceae* family] Moscow: Russian State Agrarian University, 132 p. (In Russian)
- Ignatov AN, Punina NV, Matveeva EV, Kornev KP et al (2009) [Novel bacterial pathogens and prediction of their spread in Russia]. *Zashchita i karantin rasteniy* (4):38–40 (In Russian)
- Ignatov AN, Punina NV, Matveeva EV, Pekhtereva ES et al (2010) [*Xanthomonas arboricola* – bacterial pathogen of crops in Russia]. *Zashchita i karantin rasteniy* (4):41–43 (In Russian)
- Кырова EI, Vinogradova SV, Ignatov AN (2014) [Multi-locus genotyping the Russian population of *Xanthomonas arboricola*]. *Zashchita kartofelya* (2):91–94 (In Russian)
- Lazarev AM, Mysnik EN, Ignatov AN (2017) [Spread and area of harmfulness of black of cabbage]. *Vestnik zashchity rasteniy* 1(91):52–55 (In Russian)

Mokryakova MV, Abdeeva IA, Piruzyan ES, Shaad NV et al (2010) [Diversity of effector genes in the genus *Xanthomonas*]. *Mikrobiologiya* 79(1):63–71 (In Russian)

Punina NV (2009) [Evaluation of genetic diversity of phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas* and development of molecular markers for their diagnostic]. Moscow. 188 p. (In Russian)

Plant Protection News, 2021, 104(2), p. 87–96

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-2-14962>

Full-text article

SELECTION OF TARGET GENES FOR PCR DIAGNOSTICS OF *XANTHOMONAS ARBORICOLA* VIRULENT FOR CEREALS AND BRASSICAS

E.I. Kyrova^{1*}, A.N. Ignatov²

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²Russian University of People's Friendship, Moscow, Russia

*corresponding author, e-mail: ekirova1911@yandex.ru

Plant pathogenic xanthomonads virulent to wheat, rye, barley, tomato, sunflower, and brassicas were isolated in Russia in 2001–2008. Physiological tests and multilocus sequence typing analysis confirmed their position within the *Xanthomonas arboricola* species. The obtained draft genome sequence of representative strain 3004 from barley plants, which is also virulent to sunflower, brassicas, and chestnut, demonstrated an absence of the Type 3 Secretion System T3SS and an evidence for the lateral gene transfer of some other virulence genes from distantly related bacteria. It was concluded that T4SS genes can be used as the target for group-specific PCR analysis of the emerging pathogen. It was proposed to use *virD4*, *virB3*, *virB4*, and *virB9* genes to design a detection system. After preliminary experiments with classic PCR for the chosen genes, primers and TaqMan(R) probe were designed to specifically amplify a 121 bp fragment of the *VirD4* gene. Amplification products were obtained for all target *Xanthomonas arboricola* strains and were not detected in other *Xanthomonas* species, or in other pathogenic or epiphytic bacteria occurring on these host plants. The assay readily detected *Xanthomonas arboricola* infection in diseased plants and from bacterial colonies isolated on semi-selective media, and was more sensitive and specific than traditional plating methods.

Keywords: genome analysis, virulence genes, sunflower, real time PCR, seedborne infection

Submitted: 10.03.2021

Accepted: 30.05.2021