

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТОДОВ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЧЕРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ТОМАТА

О.О. БЕЛОШАПКИНА¹, И.Н. ПИСАРЕВА²¹Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева²Всероссийский центр карантина растений)

Статья посвящена молекулярно-генетическим методам диагностики возбудителей черной бактериальной пятнистости томата – вредоносного бактериального заболевания томата и перца, распространенного преимущественно в открытом грунте в южных регионах. Исследования проведены на базе Всероссийского центра карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР») в 2022–2023 гг. В задачи работы входило определение аналитической чувствительности и специфичности молекулярно-генетических методов выявления и идентификации трех видов разных патологических типов бактерий рода *Xanthomonas* – возбудителей черной бактериальной пятнистости томата. Ввиду необходимости импортозамещения дорогостоящих реагентов испытания проводили с отечественными реактивами производства фирм ООО «Евроген» и ЗАО «Диалат». Приведены результаты эффективности ПЦР «в реальном времени» (ПЦР-РВ), анализ которых показал, что все тестируемые праймерные системы можно рекомендовать для выявления возбудителей бактериоза. При этом установлено, что ПЦР-РВ AFLP derived Taqman PCR и ХорD Taqman PCR обладают высокой аналитической чувствительностью (10^2 – 10^3 КОЕ/мл). Показано, что 3 из 4 праймерных систем в соответствии с методикой Koenraad et al. (2009) также обладают высоким уровнем чувствительности – 10^2 КОЕ/мл. Аналитическая чувствительность праймеров Bs-XpF/R для выявления *X. euvesicatoria* pv. *perforans* составила 10^4 КОЕ/мл, что достаточно для образцов с высокой концентрацией патогена и для идентификации чистой культуры бактерий. Все праймеры обладают 100%-ной специфичностью по отношению к целевым штаммам патогенов. Перекрестные реакции с другими штаммами не отмечены. Предлагаемая достоверная оперативная методика выявления возбудителей черной бактериальной пятнистости в семенах томата и перца в значительной степени снизит потери урожая и повысит экономическую эффективность производства отечественных овощей.

Ключевые слова: черная бактериальная пятнистость томата, *Xanthomonas* spp., выявление семенной инфекции, ПЦР «в реальном времени», аналитическая чувствительность, специфичность методов.

Введение

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) является одним из самых потребляемых овощей в мире [1]. По данным ФАО на 2022 г., томат в мире занимает первое место по площадям возделывания среди всех овощей: более 4,9 млн га с валовым сбором, превышающим 186 млн т. В России в промышленном секторе валовой сбор составил более 4,3 млн т (открытый грунт – 2,176 млн т, защищенный грунт – 2,212 млн т) [2].

В настоящее время производство томата невозможно без внедрения системы защиты этой культуры от болезней и вредителей как в открытом, так и в защищенном грунте. Среди болезней бактериальной этиологии наряду с бактериальным раком томата (*Clavibacter michiganensis* (Smith, Davis et al.), Li et al.) черная бактериальная пятнистость томата является наиболее вредоносной болезнью [3, 4].

Впервые черная бактериальная пятнистость томата обнаружена в Южной Африке в 1914 г., ее возбудитель был назван как *Bacterium vesicatorium*. Примерно в то же время симптомы той же болезни появились в США (было предложено название возбудителя – *Bacterium exitiosum*). Двумя годами позже болезнь впервые была описана на перце во Флориде. С тех пор это заболевание распространилось на все континенты, где выращивают томат и перец [5].

В течение многих лет менялась классификация бактерий, вызывающих черную бактериальную пятнистость томата. После ряда пересмотров несколько фенотипически и филогенетически различных бактериальных популяций (в итоге обозначенных как группы А-D) отнесли к *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Позже группы А и С были названы как *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* [6–7], группа В – как *X. vesicatoria*, а штаммы группы D – *X. gardneri* [8]. Новый вид *X. euvesicatoria* был предложен для обозначения штаммов группы А, а штаммы группы С – *X. perforans*. В 2010 г. патогены выделили в 4 различных вида: *X. Vesicatoria*; *X. Euvesicatoria*; *X. Perforans*; *X. gardneri* [9]. По результатам анализа мультилокусной последовательности видов *Xanthomonas* spp., классификация снова пересмотрена. В настоящее время микроорганизмы дифференцированы таким образом: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*; *Xanthomonas vesicatoria*; *Xanthomonas hortorum* pv. *Gardneri*; *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xanthomonas* spp.) [5].

Возбудители черной бактериальной пятнистости томата *Xanthomonas* spp. широко распространены в мире и наносят значительный экономический ущерб при выращивании томата. Пораженность рассады томата достигает 80–100%, потери плодов – 70% [10, 11]. В России бактериоз отмечен на Северном Кавказе, в Краснодарском и Алтайском краях, в Воронежской, Читинской, Волгоградской и других областях [12].

Широкое распространение *Xanthomonas* spp. в мире обусловлено тем, что возбудители болезни передаются семенами и с латентно зараженной рассадой [5].

Основная и эффективная мера борьбы – использование семян и рассады томата и перца, свободных от возбудителей черной бактериальной пятнистости томата [13].

Таким образом, своевременная и качественная диагностика *Xanthomonas* spp. на самых ранних стадиях развития растений является эффективным способом снижения потерь урожая и повышения экономической эффективности производства отечественных овощей.

Методы диагностики, применяемые в аккредитованных лабораториях, должны быть гармонизированы с методами, описанными в международных протоколах. Обязательным условием является также оценка применимости (валидация) этих методов.

В международной практике диагностики *Xanthomonas* spp. применяются следующие документы: протокол испытаний Международной федерации по семеноводству (ISF) («Method for the Detection of *Xanthomonas* spp. in Tomato seed») [14]; региональный стандарт ЕОКЗР РМ 7/110 (2) [15].

В обоих протоколах описаны ПЦР в «реальном времени» (ПЦР-РВ) для выявления и идентификации *Xanthomonas* spp.:

– AFLP derived Taqman PCR с праймерами и зондами для каждого вида (XEF/XER/XEFAM, XVF/XVR/XVFAM, XPF/XPR/XPFAM, XGF/XGR/XGFAM);

– ХорD Taqman PCR с праймерами XDF/R. Эти праймеры являются универсальными для всех четырех возбудителей болезней.

В стандарте ЕОКЗР для идентификации *Xanthomonas* spp. рекомендован ПЦР-тест, разработанный Koenraadt et al., с праймерами: Bs-XeF/Bs-XeR, BsXvF/Bs-XvR, Bs-XgF/Bs-XgR и Bs-XpF/Bs-XpR.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов классической ПЦР (Koenraadt et al., 2009).

Задачи исследований составило определение основных параметров оценки применимости (аналитическая чувствительность и специфичность) описанных выше методов и определение эффективности ПЦР-РВ.

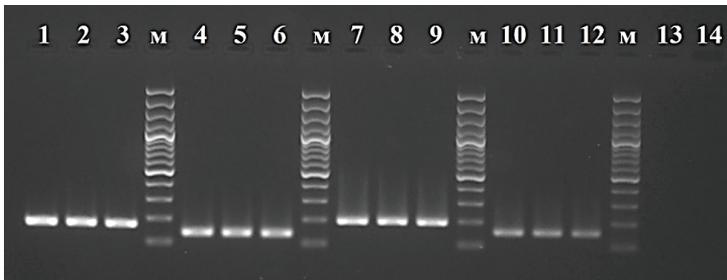


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР по Koenraadt et al. (2009):
 1–3 – *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (173 п.н.); 4–6 – *X. vesicatoria* (138 п.н.);
 7–9 – *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (197 п.н.); 10–12 – *X. hortorum* pv. *gardneri* (154 п.н.);
 13 – К-в – отрицательный контроль выделения;
 К ч – отрицательный контроль чистой зоны; М – маркер длин ДНК

Материал и методы исследований

Объектом исследований являлись возбудители черной бактериальной пятнистости томата *Xanthomonas* spp. Исследования проводили на базе научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР».

Бактериальные штаммы. В работе использовали 59 штаммов (табл. 1, 2) из DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур), CIRP-CFBR (Французская коллекция бактерий, ассоциированных с растениями), NCPPB (Национальная коллекция фитопатогенных бактерий, Великобритания) и коллекции ФГБУ «ВНИИКР».

Определение аналитической чувствительности и оценка эффективности ПЦР-РВ тестов. В соответствии со стандартом ЕОКЗР РМ 7/98 (4) для определения аналитической чувствительности (АЧ) использовали образцы с различным уровнем зараженности целевым организмом в трехкратной повторности.

Для определения АЧ праймерных систем и оценки эффективности (Е) ПЦР-РВ использовали 8 десятикратных разведений чистой культуры в экстракте семян томата. Подготовку аналитических проб из семян проводили методом гомогенизации [15]. Штаммы, используемые на данном этапе, представлены в таблице 1.

Эффективность ПЦР выражали в процентах и рассчитывали по формуле:

$$\{E = (10[1/a] - 1) \times 100\},$$

где a – угловой коэффициент (slope).

Эффективность реакции в диапазоне от 90 до 110% считали приемлемой [16].

Определение аналитической специфичности. При оценке специфичности, помимо целевых бактерий из DSMZ (табл. 1), использовали 55 штаммов, представленных в таблице 2. Из двух суточных чистых бактериальных культур готовили суспензии бактерий в концентрации 10^5 – 10^6 КОЕ/мл и выделяли из них ДНК.

Таблица 1

Штаммы, использованные для определения АЧ

№ п/п	Вид бактерии	№ в коллекции ВНИИКР	№ в коллекции DSMZ
1	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i>	0338	DSM 19128
2	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	0374	DSM 22252
3	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	0343	DSM 18975
4	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>gardneri</i>	0344	DSM 19127

Таблица 2

Штаммы, использованные для оценки специфичности ПЦР-тестов

№ п/п	№ в коллекции ВНИИКР	Вид бактерии	Примечание
1	0039	<i>Ralstonia solanacearum</i>	NCPPB2315
2	0044	<i>Erwinia billingiae</i>	<i>Malus domestica</i> , Воронежская обл.
3	0050	<i>Xilophilus ampelinus</i>	<i>Vitis vinifera</i> , Франция
4	0092	<i>Acidovorax citrulli</i>	<i>Citrullus lanatus</i> , США, IVIA CPB
5	0109	<i>Erwinia piriflorinigrans</i>	<i>Pyrus communis</i> , EUFRESCO
6	0120	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	<i>Zea mays</i> , Венгрия
7	0141	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	DSM30168
8	0142	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	DSM18077
9	0148	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	NCPPB1946
10	0149	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Венгрия
11	0172	<i>Erwinia amylovora</i>	CFBP1430
12	0222	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Венгрия
13	0226	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> , Московская обл.
14	0227	<i>Xanthomonas oryzae</i>	NCPPB3002
15	0239	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CFBP 2492
16	0311	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	NCPPB2137
17	0337	<i>Xanthomonas translucens</i>	DSM 18974

№ п/п	№ в коллекции ВНИИКР	Вид бактерии	Примечание
18	0345	<i>Xanthomonas fragariae</i>	NIB, Словения
19	0348	<i>Xanthomonas</i> sp.	NIB, Словения
20	0376	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	CFBP 2286
21	0377	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	CFBP 6107
22	0379	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	CFBP 3418
23	0380	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	CFBP 1384
24	0381	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	CFBP 2403
25	0382	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	CFBP 1390
26	0385	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	CFBP 2214
27	0386	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 2534
28	0389	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	CFBP 2405
29	0394	<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>Trifolium hybridum</i>
30	0405	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	5235 (Игнатов А.Н.)
31	0406	<i>Xanthomonas campestris</i>	phw 23 (Игнатов А.Н.)
32	0418	<i>Rhizobium radiobacter</i>	<i>Malus domestica</i>
33	0419	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	CFBP 6369
34	0420	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	CFBP 5141
35	0421	<i>Ralstonia syzigii</i>	CFBP 7288
36	0422	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>	CFBP 6442
37	0426	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	1963 (Тараканов Р.И.)
38	0438	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus</i>
39	0440	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	CFBP 2216
40	0441	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	CFBP 1657
41	0442	<i>Acidovorax avenae</i>	CFBP 2425
42	0443	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	CFBP 3614
43	0444	<i>Pantoea ananatis</i> pv. <i>ananatis</i>	CFBP 3612
44	0446	<i>Xanthomonas hyacinthi</i>	CFBP 1156
45	0447	<i>Paraburkholderia caryophylli</i>	CFBP 1370

№ п/п	№ в коллекции ВНИИКР	Вид бактерии	Примечание
46	0448	<i>Paraburkholderia andropogonis</i>	CFBP 2421
47	0454	<i>Pantoea agglomerans</i>	DSM 8570
48	0455	<i>Pantoea vagans</i>	DSM 23078
49	0460	<i>Paraburkholderia glumae</i>	DSM 9512
50	0463	<i>Pantoea ananatis</i>	DSM 30080
51	0468	<i>Rathayibacter tritici</i>	DSM 7486
52	0470	<i>Agrobacterium rubi</i>	DSM 6772
53	0473	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	CFBP 2526
54	0474	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CFBP 2212
55	0476	<i>Pseudomonas corrugata</i>	CFBP 2431

Выделение ДНК. Образцы суспензий бактерий в количестве 200 мкл использовали для выделения ДНК коммерческим набором «Проба ГС» (ООО «АгроДиагностика», Россия).

ПЦР-анализ. Для приготовления реакционной смеси на один образец использовали:

1) AFLP derived Taqman PCR: 15 мкл деионизированной воды (H₂O), 5 мкл мастер-микса 5X qPCRmix-HS производства фирмы ООО «Евроген» (Россия), по 1 мкл каждого праймера в концентрации 10 пкм и зонда в концентрации 5 пкм;

2) ХорD Taqman PCR: 16,5 мкл H₂O, 5 мкл мастер-микса 5X qPCRmix-HS производства фирмы ООО «Евроген» (Россия), по 0,5 мкл каждого праймера в концентрации 10 пкм и зонда в концентрации 5 пкм;

3) ПЦР по Koenraad et al. (17 мкл H₂O, 5 мкл мастер-микса 5X Mas^{DD} MIX-2025 производства фирмы ЗАО «Диалат» (Россия), по 0,5 мкл каждого праймера в концентрации 10 пкм и зонда в концентрации 5 пкм).

Во все реакционные смеси вносили ДНК образцов объемом 2 мкл. Последовательности олигонуклеотидов и условия амплификации, использованные в работе, указаны в таблице 3.

ПЦР-РВ проводили на приборе в модуле реакционном оптическом в составе термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот CFX96 («Bio-Rad», США). Для постановки классической ПЦР использовали термоциклер T100 («Bio-Rad», США).

Детекцию классической ПЦР проводили методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле. В качестве флуоресцентного красителя использовали бромистый этидий. Для определения размера продукта амплификации применяли маркер длин ДНК GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, США).

В каждую лунку геля вносили по 5 мкл продукта амплификации. Режим электрофореза: 1 ч при 115 В, 165 мА и 40 Вт. Результаты фиксировали с использованием гель-документирующей системы ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad», США).

Статистический анализ. Для определения эффективности ПЦР-РВ был произведен расчет среднего значения пороговых циклов (Ct) 5 или 6 разведений ДНК (в зависимости от чувствительности праймерной системы). Данные рассматривали с применением метода регрессионного анализа при помощи программы MS Office EXCEL 2016. Для проверки общего качества уравнения регрессии рассчитывали коэффициент детерминации (R^2). $R^2 > 0,99$ считали значимыми.

Таблица 3

Последовательности олигонуклеотидов, использованные в работе

Название	Последовательность олигонуклеотидов	Условия амплификации
XEF	CTCGCTCATCAAAGTGATAACGCC	10 мин при 95°C; 45 циклов: 10 с при 95°C, 15 с при 60°C
XER	GGGCTTGGCAGGAACGGC	
XEFAM	TCCGGCGAGGCAATGCGCTATAGCT – BHQ1	
XVF	GTGCCGTTGAAATACTTGCTAGCAG	
XVR	CACGCTACGGGCCGCAA	
XV FAM	TTCGCACCGCGGGCCCTGTTCT – BHQ1	
XPF	GTCGTGTTGATGGAGCGTTCCC	
XPR	CCGTCTGCTACACGACTTCCGA	
XPFAM	TCTCCCACACCGCGATAGGATTGACAGTAGA – BHQ1	
XGF	ACCTGCTCCACAACGCGCTC	
XGR	GCTTGAATCTGTTTTTTCATTGGGATG	
XGFAM	TCCCATCAATAGTTGCTGCGCTATAGCTTTTCT – BHQ1	
XDF	TCGACGGCACCTTCGACTACG	-/-
XDR	CTGGAGCTTGCTCCGCTTGG	
XDFAM	FAM–CCTCATCAGGGATCGTCTTGCCCAAGC–BHQ1	
BS-XeF	CATGAAGAACTCGGCGTATCG	10 мин при 94°C; 45 циклов: 30 с при 95°C, 30 с при 64°C, 30 с при 72°C; 10 мин при 72°C
BS-XeR	GTCGGACATAGTGGACACATAC	
BS-XvF	CCATGTGCCGTTGAAATACTTG	
BS-XvR	ACAAGAGATGTTGCTATGATTTGC	
BS-XpF	GTCGTGTTGATGGAGCGTTC	
BS-XpR	GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG	
BS-XgF	TCAGTGCTTAGTTCCTCATTGTC	
BS-XgR	TGACCGATAAAGACTGCGAAAG	

Результаты и их обсуждение

Выявление и идентификация бактериальных фитопатогенов представляют собой сложный многоэтапный процесс, включающий в себя подготовку аналитических проб из растительных образцов, выделение тотальной ДНК, ПЦР-анализ, изоляцию на питательные среды, тест на патогенность. В идеале для заключения о наличии бактериального возбудителя болезни необходимо соблюдение постулатов Коха. Однако в последние годы в рутинной диагностике ПЦР-анализ заменил классические методы выявления и идентификации. С одной стороны, благодаря методам ПЦР удалось значительно сократить сроки диагностики заболеваний растений, с другой стороны, повысились требования к качеству ПЦР-тестов: они должны быть достаточно чувствительными и специфичными.

Все лабораторные методы характеризуется таким показателем, как аналитическая чувствительность (АЧ). АЧ отражает то минимальное количество возбудителя болезни, которое обнаруживается данным методом в конкретном субстрате (матрице). Так, аналитическая чувствительность ПЦР-систем, используемых для диагностики бактериальных фитопатогенов, составляет 10^2 – 10^3 КОЕ/мл [17, 18].

В таблицах 4–7 представлены результаты испытания тестов ПЦР-РВ, рекомендованных для выявления *X. spp.*

Таблица 4

АЧ методов ПЦР-РВ для выявления *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

Концентрация, КОЕ/мл	ПЦР-тесты/повторности (Ct)							
	праймеры XEF/ XER				праймеры XDF/XDR			
	1	2	3	Ct сред.	1	2	3	Ct сред.
10^7	21,23	20,93	21,05	21,07	20,67	20,22	20,48	20,46
10^6	24,13	24,19	24,27	24,20	23,67	23,62	23,72	23,67
10^5	27,38	27,27	27,16	27,27	26,73	27,03	26,97	26,91
10^4	30,11	30,32	30,15	30,19	29,94	30,17	30,05	30,05
10^3	33,45	35,09	33,98	34,17	34,01	35,00	34,65	34,55
10^2	-	37,57	-	x	40,11	-	-	x
10^1	-	39,01	-	x	-	-	-	x
10^0	-	-	-	x	-	-	-	x
К+	+			x	+			x
К-в	-			x	-			x
К-ч	-			x	-			x

АЧ методов ПЦР-РВ для выявления *X. vesicatoria*

Концентрация, КОЕ/мл	ПЦР-тесты/повторности (Ct)							
	праймеры XVF/ XVR				праймеры XDF/XDR			
	1	2	3	Ct сред.	1	2	3	Ct сред.
10 ⁷	20,98	21,09	21,04	21,04	20,95	20,98	21,15	21,03
10 ⁶	24,30	24,26	24,15	24,24	24,21	24,41	24,43	24,35
10 ⁵	27,61	28,00	27,87	27,83	27,94	28,25	27,64	27,94
10 ⁴	31,72	31,28	31,56	31,52	32,18	32,05	31,53	31,92
10 ³	35,01	35,08	35,03	35,04	35,28	35,26	35,01	35,18
10 ²	41,20	37,81	38,45	38,82	39,09	-	-	-
10 ¹	-	-	-	x	-	-	-	x
10 ⁰	-	-	-	x	-	-	-	x
К+	+			x	+			x
К-в	-			x	-			x
К-ч	-			x	-			x

При анализе полученных данных установлено, что чувствительность методов ПЦР-РВ для выявления *X. euvesicatoria* рв. *euvesicatoria* составила 100% при концентрации бактерий 10³ КОЕ/мл.

Пороги обнаружения праймерных систем XVF/XVR и XDF/XDR, рекомендованных для выявления возбудителя черной бактериальной пятнистости томата *X. vesicatoria*, составили 10² КОЕ/мл и 10³ КОЕ/мл соответственно.

Установлено, что порог обнаружения возбудителя болезни *X. euvesicatoria* рв. *perforans* для двух ПЦР-РВ составил 10³ КОЕ/мл.

Согласно полученным данным порог обнаружения ПЦР-тестов позволил выявить возбудителя черной бактериальной пятнистости томата *X. hortorum* рв. *gardneri* в образцах с концентрацией бактерий 10² КОЕ/мл во всех сериях (повторностях).

Наряду с АЧ эффективность ПЦР также является важным параметром, характеризующим полимеразную цепную реакцию. Ее правильная оценка позволяет существенно повысить правильность интерпретации результатов ПЦР-РВ [16]. Расчеты результатов эффективности ПЦР-РВ представлены в таблице 8.

В качестве примера на рисунке 2 представлены графики зависимости Ct от концентрации *X. euvesicatoria* рв. *euvesicatoria* в 5 разведениях с праймерами XEF/XER.

АЧ методов ПЦР-РВ для выявления *X. euvesicatoria* pv. *perforans*

Концентрация, КОЕ/мл	ПЦР-тесты/повторности							
	праймеры XPF/ XPR				праймеры XDF/XDR			
	1	2	3	Ст сред.	1	2	3	Ст сред.
10 ⁷	22,19	23,31	22,97	22,82	21,55	21,98	21,77	21,77
10 ⁶	27,40	26,74	27,12	27,09	26,53	25,67	26,12	26,11
10 ⁵	29,80	29,78	29,65	29,74	29,08	29,04	29,15	29,09
10 ⁴	32,99	34,07	33,47	33,51	32,85	32,85	32,68	32,79
10 ³	36,83	37,55	37,02	37,13	36,43	35,91	36,12	36,15
10 ²	-	-	-	x	-	-	-	x
10 ¹	-	-	-	x	-	-	-	x
10 ⁰	-	-	-	x	-	-	-	x
К+	+			x	+			x
К-в	-			x	-			x
К-ч	-			x	-			x

Анализ результатов эффективности ПЦР показал, что все тестируемые праймерные системы можно рекомендовать для выявления возбудителей черной бактериальной пятнистости *Xanthomonas* spp.

Результаты определения АЧ классической ПЦР по Koenraad et al. представлены в таблице 9. Согласно полученным данным АЧ трех праймерных систем оказалась высокой и составила 10² КОЕ/мл, кроме Bs-XpF/R (АЧ – 10⁴ КОЕ/мл).

В таблице 10 представлены сводные данные по АЧ всех праймерных систем, тестируемых в данных исследованиях. Все тесты в формате ПЦР-РВ обладают высокой чувствительностью (10²–10³ КОЕ/мл) и могут быть рекомендованы как отборочные (скрининговые) методы. Три праймерные системы классической ПЦР по Koenraad et al. показали высокий уровень чувствительности – 10² КОЕ/мл. АЧ праймеров Bs-XpF/R для выявления *X. euvesicatoria* pv. *perforans* составила 10⁴ КОЕ/мл. Этот тест можно рекомендовать как подтверждающий для образцов с высокой концентрацией патогена или для идентификации чистой культуры.

Специфичность – важный критерий, показывающий способность праймерной системы достоверно отличать целевой организм от нецелевых, в том числе при их совместном нахождении в пробе. В таблице 11 представлены результаты проверки тест-систем на специфичность.

В ходе испытаний было показано, что все праймерные системы обладают 100%-ной специфичностью по отношению к целевым штаммам. Перекрестные реакции с другими штаммами не отмечены.

Таблица 7

АЧ методов ПЦР-РВ для выявления *X. hortorum* pv. *gardneri*

Концентрация, КОЕ/мл	ПЦР-тесты/повторности							
	праймеры XGF/ XGR				праймеры XDF/XDR			
	1	2	3	Ст сред.	1	2	3	Ст сред.
10 ⁷	19,15	19,04	19,17	19,12	19,50	19,84	19,74	19,69
10 ⁶	22,44	22,52	22,54	22,50	23,17	23,19	23,23	23,20
10 ⁵	25,99	25,99	25,86	25,94	26,51	26,57	26,48	26,52
10 ⁴	29,15	29,55	29,37	29,36	30,23	30,54	30,37	30,38
10 ³	34,43	33,08	33,85	33,79	33,93	33,28	33,72	33,64
10 ²	36,49	37,38	36,38	36,75	36,96	38,71	37,02	37,05
10 ¹	-	-	-	x	39,42	-	-	x
10 ⁰	-	-	-	x	-	-	-	x
К+	+			x	+			x
К-в	-			x	-			x
К-ч	-			x	-			x

Таблица 8

Результаты определения эффективности амплификации тестов ПЦР-РВ

Показатели	<i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i>		<i>X. vesicatoria</i>		<i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>		<i>X. hortorum</i> pv. <i>gardneri</i>	
	XEF/XER	XDF/XDR	XVF/XVR	XDF/XDR	XPF/XPR	XDF/XDR	XGF/XGR	XDF/XDR
a	3,219	3,456	3,571	3,587	3,504	3,544	3,584	3,485
1/a	0,311	0,289	0,28	0,279	0,285	0,282	0,279	0,287
10 ^(1/a)	2,045	1,947	1,906	1,900	1,929	1,915	1,901	1,936
[10 ^(1/a)]-1	1,045	0,947	0,906	0,900	0,929	0,915	0,901	0,936
%	104,5	94,7	90,6	90,0	92,9	91,5	90,1	93,6
R ²	0,9969	0,9946	0,999	0,999	0,9964	0,9972	0,998	0,9996

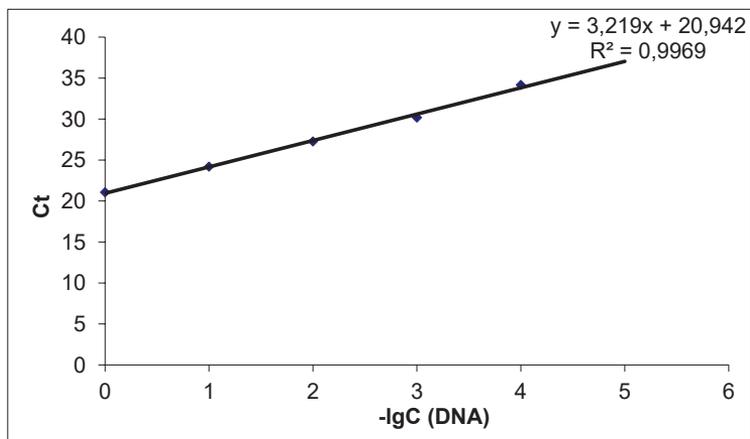


Рис. 2. График линейной регрессии распределения значений порогового цикла (Ct) в зависимости от концентрации ДНК в 5 разведениях с праймерами XEF/XER

Таблица 9

АЧ ПЦР по Koenraadt et al. (2009)

Концентрация, КОЕ/мл	ПЦР-тесты/повторности											
	Bs-XeF/R			Bs-XvF/R			Bs-XpF/R			XgF/R		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
10 ⁷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
10 ²	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
К+	+			+			+			+		
К-в	-			-			-			-		
К-ч	-			-			-			-		

Сводные данные по АЧ исследуемых ПЦР-тестов

Название штамма	ПЦР-тесты*								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i>	10 ³	10 ²	-	-	-	-	-	-	10 ³
<i>X. vesicatoria</i>	-	-	10 ²	10 ²	-	-	-	-	10 ³
<i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	-	-	-	-	10 ³	10 ⁴	-	-	10 ³
<i>X. hortorum</i> pv. <i>gardneri</i>	-	-	-	-	-	-	10 ²	10 ²	10 ²

*1 – XEF/XER; 2 – Bs-XeF/R; 3 – XVf/ XVR; 4 – Bs-XvF/R; 5 – XPF/ XPR; 6 – Bs-XpF/R; 7 – XGF/ XGR; 8 – Bs-XgF/R; 9 – XDF/XDR.

Таблица 11

Специфичность методов ПЦР для выявления *Xanthomonas* spp.

Номер штамма*	ПЦР-тесты								
	XEF/XER	Bs-XeF/R	XVf/XVR	Bs-XvF/R	XPF/XPR	Bs-XpF/R	XGF/XGR	Bs-XgF/R	XDF/XDR
0338	+	+	-	-	-	-	-	-	+
0343	-	-	-	-	+	+	-	-	+
0344	-	-	-	-	-	-	+	+	+
0374	-	-	+	+	-	-	-	-	+
0405	-	-	+	+	-	-	-	-	+

*В таблице приведены только номера штаммов, с ДНК которых получены положительные сигналы ПЦР.

Выводы

1. Установлено, что ПЦР-РВ AFLP derived Taqman PCR и XopD Taqman PCR обладают высокой аналитической чувствительностью (10²–10³ КОЕ/мл). Ввиду того, что праймерная система XopD Taqman PCR выявляет все 4 возбудителя черной бактериальной пятнистости томата, этот тест рекомендован как отборочный (скрининговый) метод. Четыре праймерные системы AFLP derived Taqman PCR рекомендованы для подтверждения, выявления и идентификации *Xanthomonas* spp.

2. Анализ результатов эффективности ПЦР-РВ показал, что все тестируемые праймерные системы можно рекомендовать для выявления возбудителей черной бактериальной пятнистости *Xanthomonas* spp., учитывая, что полученные значения находятся в диапазоне 90–110%.

3. Показано, что 3 из 4 праймерных систем по Koenraad et al. обладают высоким уровнем чувствительности – 10² КОЕ/мл. Эти тесты рекомендованы как

подтверждающие выявление. АЧ праймеров Bs-ХрF/R для выявления *X. euvesicatoria* рv. *perforans* составила 10⁴ КОЕ/мл. Этот тест рекомендован как подтверждающий для образцов с высокой концентрацией патогена и для идентификации чистой культуры.

4. В результате испытаний показано, что все праймерные системы обладают 100%-ной специфичностью по отношению к целевым штаммам. Перекрестные реакции с другими штаммами не отмечены.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания (рег. № 122041300071–9).

Библиографический список

1. Oliveira-Pinto P.R., Mariz-Ponte N., Sousa R.M.O., Torres A., Tavares F., Ribeiro A., Santos C. Satureja montana essential oil, zein nanoparticles and their combination as a biocontrol strategy to reduce bacterial spot disease on tomato plants // Horticulturae. – 2021. – № 7 (12). – Pp. 1–22.
2. FAO. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook. FAO: Rome, Italy, 2024.
3. Мотамеди Ш.А., Джалилов Ф.С.У. Влияние биопестицидов и индукторов устойчивости на развитие бактериальных болезней томата // Известия ТСХА. – 2011. – № 5. – С. 85–92.
4. Писарева И.Н., Яремко А.Б., Приходько С.И., Шнейдер Е.Ю. Испытание тест-системы для диагностики *Xanthomonas euvesicatoria* рv. *euvesicatoria* // Фитосанитария. Карантин растений. – 2022. – № 3 (11). – С. 29–36.
5. EPPO. *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper / Bull. OEPP. – 2013. – № 43 (1). – Pp. 7–20.
6. Jones J.B., Bouzar H., Stall R.E., Almira E.C., Roberts P., Bowen B.W., Sudberry J., Strickler P., Chun J. Systematic analysis of Xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2000. – № 50 (3). – Pp. 1211–1219.
7. Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J. Reclassification of *Xanthomonas* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1995. – № 45 (3). – Pp. 472–489.
8. Jones J.B., Lacy G.H., Bouzar H., Stall R.E., Schaad N.W. Reclassification of the *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper // Systematic Applied Microbiology. – 2004. – № 27 (6). – Pp. 755–762.
9. Bull C.T., De Boer S.H., Denny T.P., Firrao G., Fischer-Le Saux M., Saddler G.S., Scortichini M., Stead D.E., Takikawa Y. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007 // Journal of Plant Pathology. – 2010. – № 92 (3). – Pp. 551–592.
10. Ахатов А.К. Мир томата глазами фитопатолога. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2016. – 292 с.
11. Иванцова Е.А. Болезни томата в Нижневолжском регионе // Фермер Поволжья. – 2017. – № 2 (55). – С. 80–82.
12. Мотамеди Ш.А., Джалилов Ф.С.У., Карлов Г.И. Оценка активности бактерицидов с использованием генетически модифицированного штамма возбудителя черной бактериальной пятнистости томата // Известия ТСХА. – 2010. – № 2. – С. 52–58.
13. Fatmi M., Walcott R.R., Schaad N.V. Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. – Minnesota: The American Phytopathological Society (APS), 2017. – 360 p.

14. ISF (2017) Method for the detection of *Xanthomonas* spp. in Tomato seed. – [Электронный ресурс]. – URL: https://seedhealth.org/files/2017/05/Pepper_Xanthomonas_spp_Version-5-Nov_2013-ISF.pdf.

15. EPPO. *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper // Bull. OEPP. – 2023. – № 53. – Pp. 558–579.

16. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР «в реальном времени». – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 215 с.

17. Приходько С.И., Писарева И.Н., Корнев К.П. Оценка применимости молекулярных методов диагностики возбудителя бактериоза винограда (болезнь Пирса) *Xylella fastidiosa* Wells et al., используемых в международной и отечественной практике // Садоводство и виноградарство. – 2022. – № 1. – С. 38–43.

18. Тараканов Р.И., Игнатъева И.М., Белошاپкина О.О., Чебаненко С.И., Каратаева О.Г., Джалилов Ф.С. Выявление возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в семенах методом ПЦР // Известия ТСХА. – 2024. – № 1. – С. 41–52.

DETERMINATION OF THE ANALYTICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF PCR METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF BACTERIAL SPOT OF TOMATO

O.O. BELOSHAPKINA¹, I.N. PISAREVA²

(¹Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy;
²All-Russian Plant Quarantine Center)

*The work is devoted to molecular genetic methods for the diagnosis of pathogens of bacterial spot of tomato – a harmful bacterial disease of tomatoes and peppers, predominantly spread in the open ground in the southern regions. The research was conducted on the basis of the All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU “VNIKR”) in 2022–2023. The objective of the work was to determine the analytical sensitivity and specificity of molecular genetic methods for the detection and identification of three species of different pathological types of bacteria of the genus *Xanthomonas* – pathogens of bacterial spot of tomato. Due to the necessity of import substitution of expensive reagents, the tests were carried out with domestic reagents produced by OOO “Evrogen” and ZAO “Dialat”. The results of the effectiveness of real-time PCR (qPCR) are presented, the analysis of which showed that all tested primer systems can be recommended for the detection of bacteriosis pathogens. At the same time, qPCR AFLP derived Taqman PCR and XopD Taqman PCR were found to have high analytical sensitivity (10^2 – 10^3 CFU/ml). It has been shown that three out of four primer systems according to the methodology of Koenraad et al. (2009) also have a high sensitivity of 10^2 CFU/ml. The analytical sensitivity of the Bs-XpF/R primers for the detection of *X. euvesicatoria* pv. *perforans* was 10^4 CFU/ml, which is sufficient for samples with a high concentration of the pathogen and for the identification of a pure bacterial culture. All primers are 100% specific for the target strains of pathogens; no cross-reactions with other strains have been observed. The proposed reliable operational method for detecting pathogens of bacterial spot in tomato and pepper seeds will significantly reduce yield losses and increase the economic efficiency of domestic vegetable production.*

Keywords: bacterial spot of tomato, *Xanthomonas* spp., detection of seed infection, real-time PCR, analytical sensitivity, specificity of the methods.

References

1. Oliveira-Pinto P.R., Mariz-Ponte N., Sousa R.M.O., Torres A. et al. Satureja montana essential oil, zein nanoparticles and their combination as a biocontrol strategy to reduce bacterial spot disease on tomato plants. *Horticulturae*. 2021;7(12):1–22. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7120584>
2. FAO. *World Food and Agriculture: Statistical Yearbook*. FAO: Rome, Italy, 2024.
3. Motamedi Sh.A., Dzhililov F.S. The effect of biopesticides and resistance inducers on the development of bacterial diseases of tomatoes. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2011;(5):85–92. (In Russ.)
4. Pisareva I.N., Yaremko A.B., Prikhodko S.I., Shneyder E.Yu. Testing a test system for the diagnosis of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. *Plant Health and Quarantine*. 2022;3(11):29–36. (In Russ.)
5. *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *Bulletin OEPP EPPO Bulletin*. 2013;43. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12018>
6. Jones J.B., Bouzar H., Stall R.E., Almira E.C. et al. Systematic analysis of *Xanthomonads* (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000;50(3):1211–1219. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1211>
7. Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1995;45(3):472–489. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-472>
8. Jones J.B., Lacy G.H., Bouzar H., Stall R.E., Schaad N.W. Reclassification of the *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic Applied Microbiology*. 2004;27(6):755–762. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003104>
9. Bull C.T., De Boer S.H., Denny T.P., Firrao G. et al. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *Journal of Plant Pathology*. 2010;92(3):551–592. <https://doi.org/10.4454/jpp.v92i3.302>
10. Akhatov A.K. *World of tomatoes through a phytopathologist's eyes*. 3d ed., rev. and supp. Moscow, Russia: Tov-vo nauch. izdaniy KMK, 2016:292. (In Russ.)
11. Ivantsova E.A. Tomato diseases in the Lower Volga region. *Fermer. Povolzh'eo*. 2017;2(55):80–82. (In Russ.)
12. Motamedi Sh.A., Dzhililov F.S., Karlov G.I. Evaluation of bactericide activity using a genetically modified strain of the causative agent of bacterial spot of tomato. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2010;(2):52–58. (In Russ.)
13. Fatmi M., Walcott R.R., Schaad N.V. *Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material*. 2d ed. Minnesota: The American Phytopathological Society (APS), 2017:360.
14. ISF (2017) Method for the detection of *Xanthomonas* spp. in Tomato seed. [Electronic source] URL: https://worldseed.org/wp-content/uploads/2022/01/2017_Protocol_Tomato_Xanthomonas_spp_v5.pdf
15. *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *EPPO Global Database*. 2023;53:558–579. <https://gd.eppo.int/taxon/XANTVE/documents>
16. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. et al. *Real-time PCR*. Moscow, Russia: BINOM, Laboratoriya znaniy, 2009:215. (In Russ.)

17. Prikhodko S.I., Pisareva I.N., Kornev K.P. Detecting *Xylella fastidiosa*, a grape bacteriosis agent (Pierce disease) applicability evaluation of molecular methods used in international and domestic practice. *Horticulture and Viticulture*. 2022;1:38–43. (In Russ.) <https://doi.org/10.31676/0235-2591-2022-1-38-43>

18. Tarakanov R.I., Ignat'eva I.M., Beloshapkina O.O., Chebanenko S.I. et al. Detection of the soybean bacterial blight pathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in seeds by the PCR method. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2024;(1):41–52. (In Russ.) <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2024-1-41-52>

Сведения об авторах

Белошапкина Ольга Олеговна, д-р с.-х. наук, профессор, профессор кафедры защиты растений, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА К.А. Тимирязева»; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: beloshapkina@rgau-msha.ru; тел.: (499) 976–02–20

Писарева Ирина Николаевна, научный сотрудник научно-методического отдела бактериологии, ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»; 140150, Московская область, г.о. Раменский, р.п. Быково, ул. Пограничная, 32; e-mail: iruru@yandex.ru; тел.: (499) 707–22–27

Information about the authors

Olga O. Beloshapkina, DSc (Agr), Professor, Professor at the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: (499) 976–02–20; e-mail: beloshapkina@rgau-msha.ru)

Irina N. Pisareva, Researcher of Scientific and Methodological Department of Bacteriology, All-Russian Plant Quarantine Center (32 Pogranichnaya St., Bykovo, Ramensky, Moscow Oblast, 140150, Russian Federation; (499) 707–22–27; e-mail: iruru@yandex.ru)