

# Испытание тест-системы для диагностики *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

И.Н. ПИСАРЕВА<sup>1</sup>, А.Б. ЯРЕМКО<sup>2</sup>,  
С.И. ПРИХОДЬКО<sup>3</sup>, Е.Ю. ШНЕЙДЕР<sup>4</sup>

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

<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-3084-0591, e-mail: iruru@yandex.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: an\_ya94@mail.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0002-1281-4410,  
e-mail: svetlana.prik@yandex.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0002-8198-363X, e-mail: seunch@mail.ru

## АННОТАЦИЯ

Черная бактериальная пятнистость томата широко распространена в мире и наносит значительный экономический ущерб при выращивании томата и перца. Диагностика осложнена тем, что заболевание вызывается четырьмя видами бактерий рода *Xanthomonas*. Основным путем распространения бактериоза на дальние расстояния являются семена. Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений (ЕОКЗР) включила группу возбудителей черной бактериальной пятнистости в Список А2 перечня карантинных объектов. Выявление и идентификация фитопатогенов на всех этапах производства томата и перца позволят вовремя принять меры по защите растений, что в значительной степени снизит потери урожая и повысит экономическую эффективность производства отечественных овощей. Существующие схемы диагностики болезни подразумевают большие трудозатраты и длительный срок проведения исследований, что неприемлемо в рутинной лабораторной диагностике. В статье представлены результаты исследований диагностики одного из возбудителей черной бактериальной пятнистости (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*). Для установления степени влияния растительной матрицы на конечные результаты исследований образцов нами был проведен ряд опытов по искусственному заражению *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* экстрактов вегетативных частей и семян томата. В ходе испытания методики подготовки проб с дальнейшим выделением ДНК и ПЦР-анализом искусственно зараженных образцов установлено, что ингибирования ПЦР не происходит. Аналитическая чувствительность тест-системы для диагностики *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* производства ООО «АгроДиагностика» составила 10<sup>3</sup> КОЕ/мл. Исследования проведены на базе ФГБУ «ВНИИКР».

**Ключевые слова.** Черная бактериальная пятнистость томата, фитопатоген, выявление и идентификация, ПЦР, аналитическая чувствительность, ингибиторы.

# Testing a test system for the diagnosis of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

I.N. PISAREVA<sup>1</sup>, A.B. YAREMKO<sup>2</sup>,  
S.I. PRIKHODKO<sup>3</sup>, E.YU. SHNEYDER<sup>4</sup>

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

<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-3084-0591, e-mail: iruru@yandex.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: an\_ya94@mail.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0002-1281-4410,  
e-mail: svetlana.prik@yandex.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0002-8198-363X, e-mail: seunch@mail.ru

## ABSTRACT

Bacterial spot of tomato is worldwide spread and causes significant economic damage in tomato and pepper cultivation. Diagnosis is complicated by the fact that the disease is caused by four types of bacteria of the genus *Xanthomonas*. Seeds are the main pathway for bacteriosis over long distances. The European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) has included a group of causative agents of black bacterial spot in List A2 of the List of Quarantine Objects. Detection and identification of phytopathogens at all stages of tomato and pepper cultivation will allow taking timely measures to protect plants, which will significantly reduce crop losses and increase the economic efficiency of domestic vegetable production. Existing schemes for diagnosing the disease imply large labor costs and a long period of research, which is unacceptable in routine laboratory diagnosis. The article presents the results of studies on the diagnosis of one of the pathogens of black bacterial spot (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*). To establish the degree of influence of the plant matrix on the final results of the samples study, we conducted a series of experiments on artificial infection with *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* of extracts of tomato vegetative parts and seeds. In the course of testing the sample preparation technique with further DNA isolation and PCR analysis of artificially infected samples, it was found that PCR inhibition does not occur. Analytical sensitivity of the diagnostic test system for *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* produced by AgroDiagnostics was 10<sup>3</sup> cfu/ml. The studies were carried out on the basis of FGBU "VNIKR".

**Key words.** Bacterial spot of tomato, phytopathogen, detection and identification, PCR, analytical sensitivity, inhibitors.

## ВВЕДЕНИЕ



условиях активной поддержки хозяйствующих субъектов государством, в последние годы происходит наращивание объемов производства томатов, что в первую очередь связано с политикой импортозамещения. Так, в Российской Федерации в 2016–2019 гг. валовой

сбор томатов, выращенных в открытом грунте, увеличился на 20,2% (с 1,73 до 2,08 млн т), в закрытом грунте – на 56,7% (с 0,60 до 0,94 млн т). На фоне пандемии коронавируса в 2020 г. валовой сбор томатов открытого и закрытого грунта относительно 2019 г. снизился на 3,3% и составил 2,92 млн т (Анализ рынка, 2021). Это произошло по причине ухудшения финансового положения овощеводческих компаний, поскольку себестоимость продукции выросла, а спрос на томаты сократился.

Однако российские производители овощей до сих пор находятся в зависимости от иностранного семенного материала. Семена томата ввозятся из Китая, Таиланда, США, Франции, Индии, Перу, Италии, Германии, Бразилии, Чехии и других стран (Шнейдер, 2020).

Томаты открытого грунта выращивают в регионах с теплым и влажным климатом, что является благоприятным условием для развития не только растений, но и фитопатогенных микроорганизмов. В данных условиях повышенную вредоносность проявляют бактериальные болезни, в частности черная бактериальная пятнистость томата. Пораженность рассады томатов достигает 80–100%, потери плодов – 70% (Ахатов, 2016; Иванцова, 2017).

Черная бактериальная пятнистость томата – заболевание пасленовых культур, которое встречается во всем мире (Roach et al., 2018; www.cabi.org/isc). Возбудителями болезни являются *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri* и *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xanthomonas* spp.) (gd.eppo.int). Основными растениями-хозяевами считаются томат *Solanum lycopersicum* и перец *Capsicum annuum* (Potnis et al., 2015). Симптомы проявляются на всех надземных частях растения: семядолях, листьях, черешках, стеблях и плодах томата и перца. На листьях сеянцев и молодых растений сначала появляются точечные водянистые пятна, которые со временем увеличиваются до 2 мм, центр пятен становится почти черным с желтым ореолом. Пятна на листьях взрослых растений располагаются по краям листовой пластинки. На черешках и стеблях пятна удлиненной формы, черного цвета. На зеленых плодах появляются темные выпуклые точки с водянистой каймой, позже пятна увеличиваются до 6–8 мм, западают и образуют язвочки. Ткань под пятнами у зрелых плодов гниет (Белошапкина и др., 2017; Иванцова, 2017).

Бактериоз передается семенами в виде поверхностной инфекции. Латентно зараженная рассада также является причиной распространения патогена (EPPO, 2013). Основная и эффективная мера борьбы – использование семян и рассады томатов, свободных от возбудителей болезни (Fatmi et al., 2017). Таким образом, своевременная и качественная диагностика возбудителей бактериальной пятнистости томата в семенах и рассаде может

## INTRODUCTION

In the context of active support of economic entities by the state, in recent years there has been an increase in tomato production, which is primarily due to the policy of import substitution.

So, in 2016–2019, in the Russian Federation the gross harvest of tomatoes grown in open ground increased by 20.2% (from 1.73 to 2.08 million tons), in protected ground – by 56.7% (from 0.60 to 0.94 million tons). Against the backdrop of the coronavirus pandemic in 2020, the gross harvest of open and protected ground tomatoes decreased by 3.3% compared to 2019 and amounted to 2.92 million tons (Market analysis, 2021). This happened due to the deterioration of the financial situation of vegetable growing companies, as the cost of production increased, and the demand for tomatoes decreased.

However, Russian vegetable producers are still dependent on foreign seed material. Tomato seeds are imported from China, Thailand, USA, France, India, Peru, Italy, Germany, Brazil, Czech Republic and other countries (Shneyder, 2020).

Open ground tomatoes are grown in regions with a warm and humid climate, which is a favorable condition for the development of not only plants, but also phytopathogenic microorganisms. Under these conditions, bacterial diseases, in particular bacterial spot of tomato, show increased harmfulness. Infection of tomato seedlings reaches 80–100%, fruit loss – 70% (Akhatov, 2016; Ivantsova, 2017).

Black spot of tomato is a disease of Solanaceae crops that occurs throughout the world (Roach et al., 2018; www.cabi.org/isc). The causative agents of the disease are *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri* and *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xanthomonas* spp.) (gd.eppo.int). The main host plants are considered to be tomatoes *Solanum lycopersicum* and peppers *Capsicum annuum* (Potnis et al., 2015). Symptoms appear on all above-ground parts of the plant: cotyledons, leaves, petioles, stems and fruits of tomato and pepper. On the leaves of seedlings and young plants, dotted watery spots first appear, which eventually increase to 2 mm, the center of the spots becomes almost black with a yellow halo. Spots on the leaves of adult plants are located along the edges of the leaf blade. On petioles and stems spots are elongated, black. Dark convex dots with a watery border appear on green fruits, later the spots increase to 6–8 mm, sink down and form ulcers. The tissue under spots in mature fruits rots (Beloshapkina et al., 2017; Ivantsova, 2017).

The bacteriosis is transmitted by seeds as a surface infection. Latently infected seedlings are also responsible for the spread of the pathogen (EPPO, 2013). The main and effective control measure is the use of pathogen-free tomato seeds and seedlings (Fatmi et al., 2017). Thus, timely and high-quality diagnostics of tomato bacterial spot pathogens in seeds and seedlings can help reduce crop losses and increase the economic efficiency of domestic vegetable production.

To date, in the international practice of diagnosing *Xanthomonas* spp. the following documents are applied:

способствовать снижению потерь урожая и повышению экономической эффективности производства отечественных овощей.

На сегодняшний день в международной практике диагностики *Xanthomonas* spp. применяются следующие документы: региональный стандарт ЕОКЗР РМ 7/110 (1) (EPPO, 2013), протокол испытаний Международной федерации по семеноводству (ISF) («Метод обнаружения *Xanthomonas* spp. в семенах томатов») (ISF, 2017).

В РМ 7/110 (1) предложена схема диагностики *Xanthomonas* spp. в вегетативных частях растений с симптомами заболевания и семенном материале томата. Стоит отметить, что данный подход недопустимо применять для диагностики скрытой формы заражения. В протоколе ISF предложена схема для выявления патогена только из семян. При этом обе лабораторные схемы предусматривают обязательную предварительную изоляцию бактерии на полуселективные питательные среды с последующим скринингом и идентификацией подозрительных колоний с помощью молекулярных методов.

Таким образом, главным недостатком предложенных схем выявления и идентификации *Xanthomonas* spp. является длительность проведения исследований: от момента получения растительных экстрактов до появления типичных колоний на питательных средах проходит около 5–10 дней.

С целью изучения возможности сокращения времени выявления и идентификации изучаемого бактериоза за счет прямого выделения ДНК из растительных образцов с последующей постановкой ПЦР (полимеразной цепной реакции), проведен опыт искусственного заражения экстрактов вегетативных частей и семян томата одним из возбудителей болезни.

Результаты опыта оценивали с помощью тест-системы для диагностики черной бактериальной пятнистости томата (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*) производства ООО «АгроДиагностика» (Россия). В состав коммерческого набора входит внутренний положительный контроль (ВПК), позволяющий оценить как работоспособность всех компонентов реакционной смеси, так и влияние растительной матрицы (т. е. находящихся в ней ингибиторов) на прохождение ПЦР. Поскольку тест-система разработана только для диагностики одного из четырех возбудителей болезни – *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, именно этот штамм использовали для искусственного заражения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Подготовка аналитических проб из вегетативных частей томата.* Для приготовления смешанного образца использовали сорта томатов Бейсужек и Вишня красная. Листья и стебли мелко нарезали кусочками (примерно 0,5 см). Готовили по 8 навесок двух вариантов – размером 1 г и 2 г. Навески помещали в стерильные пластиковые емкости объемом 120 мл и заливали 30 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS) (рис. 1).

Затем емкости переносили на орбитальный шейкер Unimax 2010 (Heidolph, Германия) на 1 час (режим – 200 об/мин) при комнатной температуре. Далее проводили фильтрацию через бумажный фильтр в центрифужные пробирки типа Oak Ridge (Nalgene, Thermo Fisher Scientific, США)

EPPO regional standard PM 7/110 (1) (EPPO, 2013), International Seed Federation (ISF) Test Report (Method for the detection of *Xanthomonas* spp. in tomato seed) (ISF, 2017).

PM 7/110 (1) suggests a diagnosis scheme for *Xanthomonas* spp. in vegetative parts of plants with symptoms of the disease and tomato seeds. It should be noted that this approach cannot be used to diagnose a latent form of infection. The ISF protocol proposes a scheme for pathogen detection from seeds only. At the same time, both laboratory schemes provide for mandatory preliminary isolation of the bacterium on semi-selective nutrient media, followed by screening and identification of suspicious colonies using molecular methods.

Thus, the main disadvantage of the proposed schemes for the detection and identification of *Xanthomonas* spp. is the duration of the research: from the moment of obtaining plant extracts to the appearance of typical colonies on nutrient media, it takes about 5–10 days.

In order to study the possibility of reducing the time of detection and identification of the studied bacteriosis due to direct isolation of DNA from plant samples with subsequent PCR (polymerase chain reaction), an experiment was carried out on artificial infection of extracts of tomato vegetative parts and seeds with one of the pathogens.

The results of the experiment were evaluated using a test system for the diagnosis of bacterial spot of tomato (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*) produced by AgroDiagnostics (Russia). The commercial kit includes an internal positive control (IPC), which allows to evaluate both the performance of all components of the reaction mixture and the effect of the plant matrix (i. e., the inhibitors contained in it) on the PCR. Since the test system is designed only for the diagnosis of one of the four pathogens – *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, this particular strain was used for artificial infection.

## MATERIALS AND METHODS

*Preparation of analytical samples from tomato vegetative parts.* To prepare a mixed sample, the Beysuzhek and Red Cherry tomato varieties were used. The leaves and stems were finely chopped into pieces (about 0.5 cm). We prepared 8 weightings of two variants, 1 g and 2 g in size. The weighed portions were placed in sterile plastic containers with a volume of 120 ml and filled with 30 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Fig. 1).

Then the containers were transferred to a Unimax 2010 orbital shaker (Heidolph, Germany) for 1 hour (200 rpm) at room temperature. Then, filtration was carried out through a paper filter into Oak Ridge centrifuge tubes (Nalgene, Thermo Fisher Scientific, USA) and centrifuged on an Allegra X-30 device (Beckman Coulter, USA) for 10 min at a speed of 10,000 rpm at 10 °C. The supernatant was carefully discarded. The precipitate was dissolved in 1 ml of sterile PBS by thorough vortexing. Thus, 8 ml of each extract variant was obtained.

*Artificial infection of tomato vegetative parts.* Artificial infection of pre-prepared extracts was carried out



и центрифугировали на приборе Allegra X-30 (Beckman Coulter, США) 10 мин со скоростью 10 000 об/мин при 10 °С. Супернатант аккуратно сливали. Осадок растворяли в 1 мл стерильного PBS путем тщательного встряхивания на vortexe. Таким образом получили по 8 мл каждого варианта экстракта.

**Искусственное заражение вегетативных частей томата.** Искусственное заражение заранее подготовленных экстрактов проводили бактериальной суспензией чистой культуры типового штамма *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (DSM 19128) (рис. 2) из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (The Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Готовили 8 последовательных 10-кратных разведений в двух вариантах экстракта и в стерильном фосфатно-солевом буфере.

Последовательное разведение в PBS использовали для количественного учета микроорганизмов. На плотную питательную среду – декстрозно-дрожжевой карбонатный агар (YDC) – высевали 5, 6 и 7-е разведения культуры в 2-кратной повторности по 100 мкл. После 72 часов инкубирования проводили подсчет колоний на чашках и определяли количество КОЕ/мл в нулевом и последующих разведениях по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

где M – количество клеток в 1 мл, а – среднее количество колоний, выросших после посева из данного разведения,  $10^n$  – коэффициент разведения, V – объем суспензии, использованной для посева (Нетрусов, 2005).

**Искусственное заражение семян.** Для приготовления смешанного образца семян использовали более 10 сортов (Пиноккио, Бычье сердце, Оранжевый Балконное чудо, Волгоградский и др.). Навеску семян размером 10 г помещали в пакет для гомогенизации, заливали 20 мл суспензии бактерий *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* в стерильном PBS ( $\approx 10^6$  КОЕ/мл) и размещали в шейкере-инкубаторе INNOVA 43 (New Brunswick, США) на 4 часа при 10 °С и режиме вращения 90 об/мин. Затем излишки суспензии сливали через бумажный фильтр и просушивали семена при комнатной температуре в течение 20 часов. Семена смешивали в соотношении зараженных семян к здоровым: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 100. В итоге получили 5 вариантов семян с разным уровнем зараженности: 100%, 10%, 5%, 1% и незараженные семена (отрицательный контроль).

**Подготовка аналитических проб из семян.** Подготовку проб пяти вариантов опыта проводили методом гомогенизации (EPPO, 2013).

**Выделение ДНК.** Зараженные экстракты в объеме 200 мкл использовали для выделения ДНК с помощью коммерческого набора «Проба-ГС»



Рис. 1. Подготовка аналитических проб из вегетативных частей томата (фото А.Б. Яремко)

Fig. 1. Preparation of analytical samples from tomato vegetative parts (photo by A.B. Yaremko)

with a bacterial suspension of a pure culture of the typical strain *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (DSM 19128) (Fig. 2) from The Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. There were 8 consecutive 10-fold dilutions in two versions of the extract and in sterile phosphate-buffered saline.

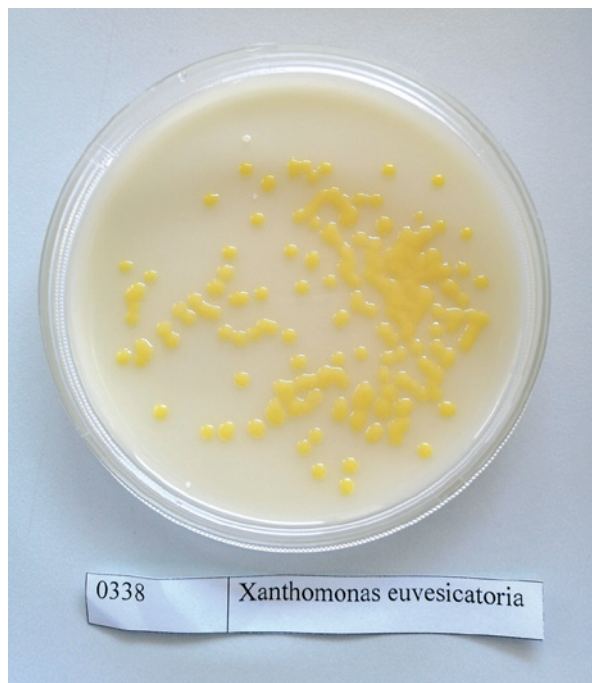


Рис. 2. Чистая культура *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* на среде YDC после 72 часов инкубации (фото И.Н. Писаревой)

Fig. 2. Pure culture of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* on YDC medium after 72 hours of incubation (photo by I.N. Pisareva)

(ООО «АгроДиагностика»). Метод основан на принципе лизиса тканей в растворе гуанидинтиоцианата (GuSCN) с адсорбцией тотальной ДНК на поверхности сорбента (диоксид кремния) и дальнейших 3-кратных промывок соответствующими растворами. Проводится согласно инструкции фирмы-производителя.

**ПЦР-анализ.** Для выявления и идентификации ДНК *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* использовали тест-систему в формате ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) производства ООО «АгроДиагностика». Условия ПЦР использовали согласно инструкции производителя.

Для постановки ПЦР-РВ использовали термоджиклер CFX96 C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Специфичную реакцию оценивали по каналу флуоресценции FAM, внутренний положительный контроль (ВПК) – по каналу HEX. При постановке ПЦР использовали 3-кратную повторность.

Serial dilution in PBS was used to quantify microorganisms. The 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, and 7<sup>th</sup> dilutions of the culture were sown on a dense nutrient medium, yeast dextrose carbonate agar (YDC), in 2-fold replication, 100 µl each. After 72 hours of incubation, colonies were counted on plates and the number of CFU/ml was determined in zero and subsequent dilutions according to the formula:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

where M is the number of cells in 1 ml, a – average number of colonies that grew after inoculation from a given dilution, 10<sup>n</sup> – dilution factor, V is the volume of the suspension used for sowing (Netrusov, 2005).

**Artificial infection of seeds.** For the preparation of a mixed seed sample, more than 10 varieties were used (Pinocchio, Bychye serdtse, Orange, Balkonnoe chudo, Volgogradsky, etc.). A 10 g sample of seeds was placed in a bag for homogenization, poured 20 ml of

**Таблица 1**

**Результаты испытания тест-системы на искусственно зараженных экстрактах вегетативных частей томата**

**Table 1**

**Examine results of the test system on artificially infected extracts of tomato vegetative parts**

Разведения Dilutions	Повторности Repetitions	Количество клеток Number of cells	Навеска 1 г Sample 1 g		Навеска 2 г Sample 2 g	
			Канал детекции, значение порогового цикла, Ct Detection channel, cycle threshold value, Ct			
			FAM	HEX	FAM	HEX
1	1	2,6 x 10 <sup>7</sup>	22,73	29,07	22,81	29,16
	2		22,88	28,63	22,86	28,85
	3		22,57	29,12	22,76	29,32
2	1	2,6 x 10 <sup>6</sup>	26,47	29,23	26,24	28,97
	2		26,33	29,45	26,16	29,42
	3		26,61	29,35	26,31	29,47
3	1	2,6 x 10 <sup>5</sup>	29,61	29,41	29,95	29,36
	2		29,94	29,92	29,77	29,77
	3		29,74	29,78	30,12	29,87
4	1	2,6 x 10 <sup>4</sup>	33,19	29,65	32,96	29,54
	2		33,10	29,83	32,97	30,01
	3		33,28	29,45	32,95	29,56
5	1	2,6 x 10 <sup>3</sup>	36,54	29,64	35,75	29,08
	2		36,19	29,33	36,03	29,69
	3		36,88	29,47	35,47	29,54
6	1	2,6 x 10 <sup>2</sup>	–	29,44	40,23	29,33
	2		39,66	29,67	–	29,03
	3		–	29,89	–	29,55
7	1	2,6 x 10 <sup>1</sup>	–	29,91	–	29,13
	2		–	29,78	–	29,08
	3		–	29,57	–	29,27
8	1	2,6 x 10 <sup>0</sup>	–	29,31	–	29,23
	2		–	29,73	–	29,30
	3		–	29,72	–	29,29

**Таблица 2**  
**Результаты испытания тест-системы**  
**при разных уровнях зараженности семян**  
**томата**

**Table 2**  
**Examine results of the test system**  
**at different infection levels of tomato seeds**

Зараженность, % Infection, %	Повторности Repetitions	Канал детекции, значение порого- вого цикла, Ct Detection channel, cycle threshold value, Ct	
		FAM	HEX
100	1	17,39	29,36
	2	17,12	29,27
	3	17,34	29,32
10	1	22,81	28,55
	2	22,98	28,68
	3	22,75	28,47
5	1	23,72	28,54
	2	24,03	28,14
	3	23,94	28,27
1	1	26,84	29,13
	2	26,97	29,22
	3	27,02	29,24
Отрицательный контроль Negative control	1	–	28,56
	2	–	28,48
	3	–	28,52

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проведено испытание произведенной ООО «АгроДиагностика» тест-системы для диагностики одного из возбудителей черной бактериальной пятнистости томата – *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. Данный комплект реагентов предназначен для постановки ПЦР-РВ. В реакционную смесь входит внутренний положительный контроль, что позволяет оценивать ингибирование ПЦР при прямом выделении ДНК бактерий из растительных экстрактов.

Для оценки чувствительности тест-системы был проведен количественный учет бактерий, используемых для заражения экстрактов вегетативных частей томата. Количество КОЕ в 1 мл нулевого разведения равно  $2,6 \times 10^8$ .

Результаты испытаний тест-системы производства ООО «АгроДиагностика» для выявления и идентификации ДНК *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, выделенной из искусственно зараженных экстрактов вегетативных частей и семян томата, представлены в таблицах 1–2.

Стабильные результаты детекции целевой ДНК (FAM) в обоих вариантах отмечены с 1-го по 5-е разведение. Таким образом, аналитическая чувствительность составила  $2,6 \times 10^3$ . Также отмечено, что ВПК (HEX) сработал во всех разведениях, что

a suspension of bacteria *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* in sterile PBS ( $\approx 10^6$  CFU/ml) and placed in an INNOVA 43 shaker-incubator (New Brunswick, USA) for 4 hours at 10 °C and a rotation mode of 90 rpm. Then, the excess suspension was poured through a paper filter and the seeds were dried at room temperature for 20 hours. The seeds were mixed in the ratio of infected seeds to healthy ones: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 100. As a result, 5 variants of seeds with different levels of infection were obtained: 100%, 10%, 5%, 1% and uninfected seeds (negative control).

*Preparation of analytical samples from seeds.* Preparation of samples of five variants of the experiment was carried out by the homogenization method (EPPO, 2013).

*DNA isolation.* Infected extracts in a volume of 200 µl were used for DNA isolation using the Proba-GS commercial kit (AgroDiagnostica, Russia). The method is based on the principle of tissue lysis in a guanidinium thiocyanate solution (GuSCN) with the adsorption of total DNA on the surface of the sorbent (silicon dioxide) and subsequent 3-fold washing with appropriate solutions. Carried out according to the manufacturer's instructions.

*PCR analysis.* For *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* DNA detection and identification, we used Real-Time PCR test system (RT-PCR) by AgroDiagnostica. PCR conditions were used according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR was performed using a CFX96 C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). The specific reaction was assessed by the FAM fluorescence channel, and the internal positive control (IPC) was assessed by the HEX channel. When setting up PCR, a 3-fold repetition was used.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this work, an AgroDiagnostica test system was examined for the diagnosis of one of the pathogens of bacterial spot of tomato – *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. This set of reagents is intended for RT-PCR. The reaction mixture includes an internal positive control, which makes it possible to evaluate PCR inhibition during direct isolation of bacterial DNA from plant extracts.

To assess the sensitivity of the test system, a quantitative account of the bacteria used to infect extracts of tomato vegetative parts was carried out. The number of CFU in 1 ml of zero dilution is  $2.6 \times 10^8$ .

Examine results of the AgroDiagnostica test system to detect and identify *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* DNA isolated from artificially infected extracts of tomato vegetative parts and seeds are presented in Tables 1–2.

Stable results of detection of the target DNA (FAM) in both variants were noted from the 1<sup>st</sup> to the 5<sup>th</sup> dilution. Thus, the analytical sensitivity was  $2.6 \times 10^3$ . It was also noted that HEX worked in all dilutions, indicating no PCR inhibition. At the same time, the value of the threshold cycle through the HPC channel (HEX) in both variants is approximately the same, which indicates the absence of the influence of the sample size on the PCR.



указывает на отсутствие ингибирования ПЦР. При этом значение порогового цикла по каналу ВПК (HEX) в обоих вариантах примерно одинаковое, что свидетельствует об отсутствии влияния размера навески на прохождение ПЦР.

Из таблицы 2 видно, что выявление *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* отмечено при всех уровнях зараженности семян. Внутренний контроль сработал во всех реакциях, что указывает на отсутствие ингибирования ПЦР.

Предварительно для выявления *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* в растительных экстрактах вегетативных частей и семян можно рекомендовать тест-системы производства ООО «АгроДиагностика» для диагностики этой бактерии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для сокращения времени диагностики *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* и установления степени влияния растительной матрицы на конечные результаты исследований образцов растений и семян томата нами были проведены опыты по искусственному заражению *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* экстрактов вегетативных частей и семян томата. В ходе испытания методики подготовки проб с дальнейшим выделением ДНК и ПЦР-анализом искусственно зараженных образцов установлено, что ингибирования ПЦР не происходит.

Проведенные исследования показали возможность использования тест-системы в формате ПЦР-РВ производства ООО «АгроДиагностика» для прямого выявления *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* из растительных экстрактов, однако, очевидным недостатком тест-системы является возможность диагностики только одного из четырех возбудителей болезни.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахатов А. Мир томата глазами фитопатолога. 3-е изд., испр. и доп. – М.: Тов-во науч. изданий «КМК», 2016, 292 с.
2. Белошапкина О. и др. Защита растений: фитопатология и энтомология. – Ростов н/Д: Феникс, 2017, 478 с.
3. Иванцова Е., 2017. Болезни томата в Нижневолжском регионе. – Фермер. Поволжье, № 2: 80–82.
4. Нетрусов А. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Академия, 2005, 571 с.
5. Шнейдер Е., Шнейдер Ю., 2020. Систематизация перечня и категоризация вредных организмов, связанных с импортированием, экспортированием и перемещением семян пасленовых культур. – НИР, ФГБУ «ВНИИКР», 147 с.
6. EPPO, 2013. PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. – Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 43 (1): 7–20.
7. Fatmi M., Walcott R., Schaad N. Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. – Minnesota: The American Phytopathological Society (APS), 2017, 360 p.
8. ISF, 2017. Method for the detection of *Xanthomonas* spp. in Tomato seed. – URL: [https://worldseed.org/wp-content/uploads/2022/01/2017\\_Protocol\\_Tomato\\_Xanthomonas\\_spp\\_v5.pdf](https://worldseed.org/wp-content/uploads/2022/01/2017_Protocol_Tomato_Xanthomonas_spp_v5.pdf) (дата обращения: 30.06.2022).

Table 2 shows that the detection of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* was noted at all levels of seed infection. The internal control worked in all reactions, indicating no PCR inhibition.

Preliminary for detection of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* in plant extracts of vegetative parts and seeds, AgroDiagnostica test systems can be recommended for the diagnosis of this bacterium.

## CONCLUSION

To reduce the diagnostic time for *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* and establishing the degree of influence of the plant matrix on the final results of studies of plant samples and tomato seeds, we conducted experiments on artificial infection of extracts of tomato vegetative parts and seeds with *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. In the course of testing the sample preparation technique with further DNA isolation and PCR analysis of artificially infected samples, it was found that PCR inhibition does not occur.

The conducted studies have shown the possibility of using the AgroDiagnostica test system in the PCR-RT format for direct detection of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* from plant extracts, however, the obvious disadvantage of the test system is the ability to diagnose only one of the four pathogens.

## REFERENCES

1. Akhatov A. The world of tomato through the eyes of a phytopathologist [Mir tomata glazami fitopatologa]. 3<sup>rd</sup> ed., rev. and additional. M.: Tov-in scientific. editions of KMK, 2016, 292 p. (in Russian).
2. Beloshapkina O. et al. Plant protection: phytopathology and entomology [Zashchita rasteniy: fitopatologiya i entomologiya]. Rostov n/a: Phoenix, 2017, 478 p. (in Russian).
3. Ivantsova E. Tomato diseases in the Lower Volga region [Bolezni tomata v Nizhnevolzhskom regione]. Farmer. Volga Region, 2017; 2: 80–82 (in Russian).
4. Netrusov A. et al. Workshop on microbiology [Praktikum po mikrobiologii]. M.: Academy, 2005, 571 p. (in Russian).
5. Shneyder E., Shneyder Yu. Systematization of the list and categorization of pests associated with the import, export and movement of seeds of Solanaceae crops [Sistematizatsiya perechnya i kategorizatsiya vrednykh organizmov, svyazannykh s importirovaniyem, eksportirovaniyem i peremeshcheniyem semyan paslenovykh kultur]. Research, FGBU «VNIIR», 2020, 147 p.
6. EPPO. PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2013; 43 (1): 7–20.
7. Fatmi M., Walcott R., Schaad N. Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. Minnesota: The American Phytopathological Society (APS), 2017, 360 p.
8. ISF, 2017. Method for the detection of *Xanthomonas* spp. in Tomato seed. URL: [https://worldseed.org/wp-content/uploads/2022/01/2017\\_Protocol\\_Tomato\\_Xanthomonas\\_spp\\_v5.pdf](https://worldseed.org/wp-content/uploads/2022/01/2017_Protocol_Tomato_Xanthomonas_spp_v5.pdf) (last accessed: 30.06.2022).

9. Potnis N., Timilsina S., Strayer A., Shantharaj D., Barak J., Paret M., Vallad G., Jones J., 2015. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. – *Molecular Plant Pathology*, 16 (9): 907–920.

10. Roach R., Mann R., Gambley C., Shivas R., Rodoni B., 2018. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. – *European Journal of Plant Pathology*, 150 (3): 595–608.

11. Анализ рынка томатов в России в 2016–2020 гг. Оценка влияния коронавируса и прогноз на 2021–2025 гг. [Электронный ресурс]. – URL: <https://businessstat.ru/catalog/id8248> (дата обращения: 30.09.2021).

12. CABI. Invasive Species Compendium. – URL: <https://www.cabi.org/isc> (дата обращения: 30.06.2022).

13. EPPO Global Database. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 30.06.2022).

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Писарева Ирина Николаевна**, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-3084-0591, e-mail: [iruru@yandex.ru](mailto:iruru@yandex.ru).

**Яремко Анастасия Богдановна**, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: [an\\_ya94@mail.ru](mailto:an_ya94@mail.ru).

**Приходько Светлана Игоревна**, научный сотрудник, заведующая лабораторией бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-1281-4410, e-mail: [svetlana.prik@yandex.ru](mailto:svetlana.prik@yandex.ru).

**Шнейдер Елена Юрьевна**, старший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-8198-363X, e-mail: [seunch94@mail.ru](mailto:seunch94@mail.ru).

9. Potnis N., Timilsina S., Strayer A., Shantharaj D., Barak J., Paret M., Vallad G., Jones J. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology*, 2015; 16 (9): 907–920.

10. Roach R., Mann R., Gambley C., Shivas R., Rodoni B. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 2018; 150 (3): 595–608.

11. Analysis of the tomato market in Russia in 2016–2020. Coronavirus impact assessment and forecast for 2021–2025 [Electronic resource]. URL: <https://businessstat.ru/catalog/id8248> (last accessed: 30.09.2021).

12. CABI. Invasive Species Compendium. URL: <https://www.cabi.org/isc> (last accessed: 30.06.2022).

13. EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 30.06.2022).

### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Irina Pisareva**, Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-3084-0591, e-mail: [iruru@yandex.ru](mailto:iruru@yandex.ru).

**Anastasia Yaremko**, Junior Researcher, Research Department of Molecular and Genetic Diagnosis Methods, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: [an\\_ya94@mail.ru](mailto:an_ya94@mail.ru).

**Svetlana Prikhodko**, Researcher, Head of Laboratory of Bacteriology and GMO Analysis, Testing Laboratory Center, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-1281-4410, e-mail: [svetlana.prik@yandex.ru](mailto:svetlana.prik@yandex.ru).

**Elena Shneyder**, Senior Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-8198-363X, e-mail: [seunch94@mail.ru](mailto:seunch94@mail.ru).