Вестник Томского государственного университета. Биология. 2020. № 51. С. 25–45

УДК 579.64:632.3.01/.08
doi: 10.17223/19988591/51/2

О.Ю. Словарева[1, 2], К.П. Корнев[2]

[1] Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия
[2] Всероссийский центр карантина растений, рп. Быково, Россия

Определение аналитической специфичности методов ПЦР для идентификации *Acidovorax citrulli*

Возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур Acidovorax citrulli (Schaad et al.) – значимый объект в области карантина растений. Исследование посвящено определению аналитической специфичности (АС) молекулярно-генетических методов идентификации фитопатогена. ДНК 5 штаммов A. citrulli, а также 53 бактерий, не относящихся к A. citrulli, и ДНК из 106 образцов микробиоты тыквенных культур тестировали с помощью ПЦР-методов Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «Acidovorax citrulli-PB» «Синтол», Acidovorax citrulli-Rt «АгроДиагностика», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev. Для каждого метода оценивали АС, исходя из определения таких ее критериев, как инклюзивность (отсутствие ложноотрицательных результатов) и эксклюзивность (отсутствие ложноположительных результатов), выраженных в процентах. Метод оценивали как специфичный при значениях каждого из показателей 99% и более. Установлено, что ПЦР-РВ Acit 1 F/R, Acit 1-probe, набор реагентов для выявления ДНК возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур «Acidovorax citrulli-PB» «Синтол», комплект реагентов для диагностики бактериальной пятнистости тыквенных культур Acidovorax citrulli в формате Rt «АгроДиагностика» и ПЦР с праймерами AC158F/AC158R не являются специфичными в связи с низким значением эксклюзивности. При этом ПЦР с праймерами SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev – высокоспецифичные методы и могут применяться исследователями для идентификации A. citrulli. Все апробированные методы показали отсутствие ложноотрицательных результатов, что позволяет использовать их для выявления образцов, свободных от A. citrulli.

Ключевые слова: *ПЦР; карантин растений; диагностика фитопатогенов.*

Введение

Acidovorax citrulli (Schaad et al.) – это фитопатогенная бактерия – возбудителm бактериальной пятнистости тыквенных культур. Первые сообщения о фитопатогене появились в 1965 г., когда R.E. Webb & R.W. Goth [1] описали возбудителя, выделенного из рассады арбузов. Идентификацию и классификацию бактерии как *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* провел американский ученый N.W. Schaad в 1978 г. [2]. В 1992 г., основы-

ваясь на экспериментах по гибридизации ДНК, Willems et al. предложили перенести несколько видов фитопатогенных *Pseudomonas* в род *Acidovorax*. Таким образом, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* реклассифицировали как *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [3].

Бактерия патогенна в отношении следующих растений: семейство Cucurbitaceae: *Citrullus lanatus*, *Citrullus lanatus* var. *citroides*, *Cucumis melo*, *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, *Cucumis sativus*, *Cucumis anguria*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita pepo* subsp. *ovifera*, *Cucurbita pepo* var. *giromontia*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*; семейство *Piperaceae*: *Piper betle* [4, 5].

Вскоре после обнаружения бактерия проникла из США на территории стран Азии, Европы и Океании. Причину распространения связывают с международной торговлей семенами [2, 6]. В последние годы все больше отмечается повышение агрессивности фитопатогенных бактерий в отношении растений-хозяев [7–10], и *A. citrulli*, в зависимости от условий окружающей среды, может уничтожать от 5 до 100% урожая тыквенных культур [11].

Ввиду того, что *A. citrulli* может наносить существенный вред производству тыквенных культур, проникновение и распространение данного фитопатогена контролируется странами Европейской и средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР). Также *A. citrulli* пристально изучается учеными по всему миру. Однако, несмотря на предпринимаемые меры контроля, найден свежий отчет о выявлении данной бактерии в европейских странах [12]. Таким образом, не теряет свою актуальность потребность в разработке комплекса мер по контролю распространения возбудителей болезней растений [13], и, в частности, *A. citrulli;* центральным звеном такого комплекса является своевременная диагностика [14].

При выявлении возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур нецелесообразно руководствоваться наличием или отсутствием симптомов, так как болезнь может протекать в скрытой форме. Следует отметить, что зачастую инфекция не препятствует образованию семян, на которых симптомы заражения не проявляются [2, 14]. Поэтому основной этап обнаружения фитопатогена проходит в рамках лабораторной диагностики.

Согласно существующим нормативным документам, регламентирующим процедуру диагностики *A. citrulli* в Российской Федерации – Международный стандарт РМ7/127(1) [15] и МР 67-2015 ВНИИКР, идентификация патогена проводится в лаборатории с использованием методов на основе ПЦР, и именно результаты применения данных методов являются определяющими. В связи с этим к используемым методам предъявляют строгие требования по оценке их применимости. Такой критерий, как аналитическая специфичность (АС), показывающий способность теста достоверно отличать целевой организм от нецелевых, является неотъемлемой составляющей определения применимости диагностического метода, что отражено в Международном стандарте РМ 7/76 (5) об использовании диагностических протоколов [16]. Оценка АС молекулярно-генетических методов идентификации бактерий,

согласно Международному стандарту PM 7/98 (3), базируется на двух параметрах – инклюзивность (inclusivity) и эксклюзивность (exclusivity). Инклюзивность показывает способность метода идентифицировать штаммы целевой бактерии, представляющие все генетическое разнообразие, различное географическое происхождение и растения-хозяева. Эксклюзивность показывает способность метода отличать нецелевые бактерии, особенно те, которые могут находиться в ДНК-матрице образцов микробиоты растений-хозяев целевого микроорганизма [17].

Цель работы – оценка аналитической специфичности методов ПЦР для идентификации *A. citrulli.*

Материалы и методики исследования

Определение АС проводили со штаммами *A. citrulli*, бактериальными штаммами, не относящимися к виду *A. citrulli*, и образцами ДНК, выделенной из различных сортов и видов растений семейства Cucurbitaceae.

В данном исследовании оценивали АС методов ПЦР, видоспецифичных для *A. citrulli.* Ввиду того, что мишенями для ПЦР являлись различные участки генома *A. citrulli*, данную бактерию следует считать целевой. Способность метода ПЦР идентифицировать все штаммы целевой бактерии (отношение числа положительных результатов к общему числу проведенных тестов, выраженное в процентах) характеризует инклюзивность метода ПЦР [17].

Генетическое разнообразие *A. citrulli* в рамках исследования представлено изолятами, выделенными из растений *Citrullus lanatus* в США, Испании и Китая и позднее заложенными в Испанской коллекции фитопатогенов Института сельскохозяйственных исследований (IVIA), г. Валенсия, под номерами 51, 2609 и 3000 соответственно, а также штаммами DLS 1035 и DLS 1456 из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (далее – DSMZ).

Бактерии, не относящиеся к виду *A. citrulli*, участки генома которых не представляли собой мишень для ПЦР, считали нецелевыми согласно Международному стандарту PM 7/98 (3). Отношение числа отрицательных результатов к общему числу проведенных ПЦР-тестов, выраженное в процентах, полученное при тестировании нецелевых бактерий, характеризует эксклюзивность метода ПЦР. При этом чем большее количество нецелевых бактерий протестировано и чем больше их видовое разнообразие, тем выше достоверность определения эксклюзивности [17]. Для оценки АС использовали 19 штаммов, полученных из зарубежных коллекций, а также 28 бактериальных изолятов, выделенных в лаборатории бактериологии Всероссийского центра карантина растений (ВНИИКР) в различные периоды времени из различных видов растений и заложенных в коллекцию бактериологических культур ВНИИКР.

Таблица 1 [Table 1]

Используемые бактериальные изоляты
[Used bacterial isolates]

Бактерия [Bacterium]	№ штамма ВНИИКР [№ of strain of VNIIKR]	Дата выделения [Isolation date]	Растение [Plant]
Arthrobacter castelli	0073	30.04.2013	*Solanum lycopersicum*
Arthrobacter sp.	0341	16.01.2019	*Citrullus lanatus*
Arthrobacter sp.	0342	16.01.2019	*Cucurbita pepo* subsp. *ovifera*
Bacillus sp.	0320	08.10.2018	*Citrullus lanatus*
Burkholderia sp.	0287	06.05.2016	*Musa*
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*	0049	28.02.2013	*Brassica oleracea*
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*	0239	26.02.2015	*Solanum lycopersicum*
Enterobacter amnigenus	0047	08.07.2015	*Crataegus oxyacantha*
Erwinia billingiae	0044	30.11.2018	*Malus domestica*
Erwinia piriflorinigrans	0109	12.12.2013	*Pyrus communis*
Erwinia tasmaniensis	0078	29.11.2013	*Prunus persica*
Microbacterium phyllosphaerae	0340	16.01.2019	*Cucurbita pepo* subsp. *ovifera*
Microbacterium sp.	0300	17.03.2017	*Zea mays*
Ochrobactrum anthropic	0048	08.07.2015	*Pyrus communis*
Ochrobactrum sp.	0043	30.01.2013	*Pyrus communis*
Pantoea sp.	0409	17.10.2018	*Glycine max*
Pantoea stewartii subsp. *stewartii*	0120	15.07.2015	*Zea mays* var. *rugose*
Pseudomonas nitritireducens	0370	07.03.2018	*Glycine max*
Pseudomonas putida	0033	18.02.2013	*Trifolium pratense*
Pseudomonas syringae pv. *syringae*	0222	17.10.2014	*Prunus avium*
Rahnella aquantilis	0181	03.10. 2014	*Rosa*
Ralstonia pseudosolanacearum	0030	28.11.2017	*Solanum tuberosum*
Sphingomonas paucimobilis	0339	11.01.2019	*Cucurbita pepo* subsp. *ovifera*
Xanthomonas arboricola pv. *pruni*	0149	06.10.2014	*Prunus domestica*
Xanthomonas campestris pv. *campestris*	0226	20.10.2014	*Brassica oleracea*
Xanthomonas hortorum	0170	30.09.2013	*Pelargonium*
Xylella fastidiosa	0306	05.10.2017	*Olea europaea*
Xylophilus ampelinus	0050	18.02.2013	*Vitis vinifera*

Примечание: ВНИИКР – Всероссийский центр карантина растений.
[*Note*: VNIIKR - All-Russian Plant Quarantine Center].

Использовали следующие штаммы из зарубежных коллекций: *Acidovorax cattleya* NBC 430 (DSMZ), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* NCPPB 2137 (Национальная коллекция фитопатогенных бактерий (Великобритания), далее – NCPPB), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

CFBP 3418 (Коллекция связанных с растениями бактерий (Франция), далее – CFBP), *Dickeya solani* DSMZ 28711, *Erwinia amylovora* CFBP 1430, CFBP 3025, NCPPB 683T, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 2315, *Rathayibacter tritici* CFBP 1385, *Pantoea agglomerans* DSM 1619 (DSMZ), *Pectobacterium atrosepticum* DSM 18077 (DSMZ), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* DSM 30168 (DSMZ), *Pseudomonas congelans* ICMP 9032 (Международная коллекция микроорганизмов растений Новой Зеландии и Тихого океана ICMP), *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* CFBP 2214, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* CFBP 1390, *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* CFBP 6369, *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* NCPPB 1946, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* NCPPB 3002, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* CFBP 2286. Также использовали бактериальные изоляты из коллекции ВНИИКР (табл. 1).

Для оценки АС, руководствуясь Международным стандартом PM 7/98 (3), использовали максимально доступное количество бактерий, отличающихся видовой принадлежностью, географическим происхождением и периодом изоляции, выделенных не только из тыквенных культур, но и из других растений.

Выявление и идентификацию *A. citrulli* проводят, в основном, в образцах тыквенных культур. Чем большее количество потенциальных растений-хозяев протестировано, тем выше достоверность оценки АС [17]. В связи с этим для исследования отбирали максимально доступное количество различных образцов тыквенных культур, свободных от *A. citrull*; всего использовали 106 образцов, 30 из которых – вегетативные части растений, а 76 – семенной материал (табл. 2).

Процесс подготовки аналитических проб из растений заключался в следующем: от каждого образца растений отбирали 5–7 фрагментов стеблей и листьев и измельчали с помощью скальпеля. Навеску массой 2,5–3,0 г от полученной пробы помещали в пластмассовые емкости объемом 120 мл. Для взвешивания проб использовали весы лабораторные электронные AJH-4200CE «Vibra» (Япония). К каждой пробе добавляли 20 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) [18]. Емкости с пробами встряхивали на ротационном шейкере Unimax 2010 «Heidolph» (Германия) при режиме 200 оборотов в минуту (об/мин) в течение 45 минут. Затем жидкость из емкостей переливали в центрифужные пробирки объемом 50 мл, пропуская через бумажные фильтры «Синяя лента» с размером пор 3–5 микрометров. Пробирки центрифугировали в течение 15 минут при режиме 10000 g, 4 °C, используя высокоскоростную центрифугу Allegra X-30R «Beckman Coulter» (Дания). Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS.

Аналитические пробы семян подготавливали следующим образом: от каждого образца семян отбирали навеску массой 10 г, помещали в пластмассовую емкость и добавляли к каждой навеске 20 мл PBS. Емкости с пробами встряхивали на ротационном шейкере при режиме 90 об/мин в течение 24 часов. Затем жидкость из емкостей переливали в центрифужные пробир-

ки и центрифугировали в течение 10 минут при режиме 1200 g, 4 °С. Супернатант аккуратно переливали в чистые пробирки и повторно центрифугировали в течение 15 минут при режиме 10000 g, 4 °С. Затем супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл PBS.

ДНК из полученных аналитических проб выделяли с помощью набора «Проба-ГС» («АгроДиагностика», Россия).

Постановку ПЦР для каждого исследуемого образца ДНК, выделенной из аналитических проб тыквенных культур, а также из коллекционных штаммов бактерий и бактериальных изолятов, осуществляли в 3-кратной повторности по каждому из следующих методов:

1. ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) Acit 1 F/R, Acit 1-probe (Woudt et al, 2009) [15], где мишенью является участок IS1002, расположенный в последовательности генома штамма AAC00-1 *A. citrull*. Последовательности праймеров и зонда: Acit 1-F IS1002: 5'-GAG TCT CAC GAG GTT GTT-3', Acit 1-R IS1002: 5'-GAC CCT ACG AAA GCT CAG-3', Acit 1-probe IS1002: 5'-6FAM-TGC AGC CCT TCA TTG ACG G-BHQ1-3'. Праймеры и зонд произведены ООО «Евроген» (Россия). Кроме олигонуклеотидов, ПЦР-смесь содержала готовый ПЦР-буфер 5X Mas^{CFE}TaqMIX-2025 («Диалат», Россия) и готовую смесь для проведения внутреннего положительного контроля (ВПК) («Синтол», Россия). Для проведения ПЦР-РВ использовали амплификатор детектирующий ДТпрайм производства фирмы ООО «ДНК-Технология» (Россия).

2. Набор реагентов для выявления ДНК возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол» (Россия) (далее – *Acidovorax citrulli*-РВ «Синтол»). ПЦР проводили согласно инструкции производителя, используя амплификатор детектирующий ДТпрайм «ДНК-Технология» (Россия).

3. Комплект реагентов для диагностики бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* в формате Rt «АгроДиагностика» (Россия) (далее – *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика»). ПЦР проводили согласно инструкции производителя, используя амплификатор детектирующий ДТпрайм «ДНК-Технология» (Россия).

4. Классическая ПЦР с праймерами AC158F/AC158R (Cho et al., 2015) [19], где целевой последовательностью является YD-repeat protein. Размер ПЦР-продукта 158 н.п. Последовательности праймеров: AC158 F: 5'-CTT GGT GCT CCA TGC TCGA-3', AC158 R: 5'-GGC TTG GTT GCG AAT TCA CT-3'.

5. Классическая ПЦР с праймерами SEQ ID 3/4 (Schaad et al., 2000) [15], где мишенью служит участок рДНК внутреннего спейсерного региона. Размер продукта амплификации 450 н.п. Последовательности праймеров: SEQ ID NO3: 5'-GGA AGA ATT CGG TGC TAC CC-3', SEQ ID NO4: 5'-TCG TCA TTA CTG AAT TTC AAC A-3'.

6. Классическая ПЦР с праймерами PL1/PL2 (Zhong et al., 2015) [20], мишень – Aave_2768, ген pilL в последовательности генома штамма AAC00-1

A. citrull. Размер продукта амплификации 332 н.п. Последовательности праймеров: PL1 5’-GTC CGA GCG TAC GTT GAG-3’, PL2 5’-ACG GCA CCT GAC CCG TTG-3’.

7. Классическая ПЦР с праймерами G12AcFwd/G12AcRev (Zivanovic & Walcott, 2017) [21], мишень – Aave_2166, предполагаемый ген эффектора секреции 3-го типа. Размер продукта амплификации 291 н.п. Последовательности праймеров: G12AcFwd: 5’-CCGAAGAGATAACACTGCATC-3’, G12AcRev: 5’-ACG TAC TGC CGA TTT TTG C-3’.

Для приготовления всех смесей классических ПЦР использовали буфер 5X Mas^{DD}TaqMIX-2025 («Диалат», Россия). Праймеры произведены ООО «Евроген» (Россия). ПЦР проводили в амплификаторе T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Для детекции использовали метод электрофореза в 1,5% агарозном геле, результаты анализировали с помощью гельдокументирующей системы «BioRad» (США).

В качестве положительного контрольного образца (ПКО) для каждого метода ПЦР использовали ДНК *A. citrulli* в концентрации 10^6 генетических копий в 1 мл. Концентрацию определяли с помощью прибора для измерения концентрации нуклеиновых кислот NanoDrop-2000 («Thermo Fisher Scientific», США). В качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) использовали воду.

Результат теста ПЦР-РВ (Acit 1 F/R, Acit 1-probe, *Acidovorax citrulli*-РВ «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика») считали отрицательным, если накопление флуоресценции по каналу детекции специфичной реакции с ДНК образца и ОКО отсутствовало, а с ДНК ПКО показывало характерную экспоненциальную кривую; при этом накопление флуоресценции по каналу детекции ВПК показывало характерную экспоненциальную кривую в реакциях со всеми образцами ДНК. Результат теста ПЦР-РВ считали положительным, если накопление флуоресценции по каналу детекции специфичной реакции с ДНК образца и ПКО показывало характерную экспоненциальную кривую, а в ОКО реакция отсутствовала.

Результат классической ПЦР (AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2, G12AcFwd/G12AcRev) считали отрицательным, если продукт амплификации с ДНК образца и ОКО отсутствовал, а с ДНК ПКО амплификация привела к образованию характерного для метода продукта реакции (158 н.п. для AC158F/AC158R, 450 н.п. для SEQ ID 3/4, 332 н.п. для PL1/PL2 и 254 н.п. для G12AcFwd/G12AcRev). Результат классической ПЦР считали положительным, если амплификация с ДНК образца привела к образованию характерного для метода продукта реакции, а с ОКО продукт реакции отсутствовал.

Значение инклюзивности для каждого метода ПЦР определяли как отношение достоверных положительных результатов к общему числу проведенных реакций, выраженное в процентах (при тестировании образцов ДНК *A. citrulli*).

Значение эксклюзивности определяли как отношение достоверных отрицательных результатов к общему числу проведенных реакций, выраженное в процентах (при тестировании образцов ДНК бактерий, не относящихся к виду *A. citrulli*, а также при тестировании образцов ДНК из аналитических проб, свободных от *A. citrulli*).

Оценку аналитической специфичности присваивали каждому из методов, исходя из анализа параметров инклюзивности и эксклюзивности. Заключение о специфичности метода делали при значениях показателей инклюзивности и эксклюзивности 99% или выше.

Изоляцию бактерий проводили из аналитических проб тыквенных культур, показавших хотя бы один положительный результат при тестировании любым из приведенных выше методов ПЦР (см. табл. 2). Высевали по 100 мкл 100- и 1000-кратного разведений аналитических проб методом Дригальского [22] на чашки Петри с питательной средой Кинга Б [23]. Чашки Петри после посева плотно оборачивали герметизирующей пленкой Parafilm («Nuova Aptaca», Италия) и инкубировали в течение 72 часов при температуре 27 °С, используя инкубатор MIR-254 («Panasonic (Sanyo)», Япония).

Отдельные бактериальные колонии различных морфотипов всех выросших колоний пересевали на новые чашки Петри со средой Кинга Б, используя стерильную микробиологическую петлю. Чашки Петри, обернутые пленкой Parafilm, инкубировали при температуре 27 °С в течение 72 ч. Затем от каждого изолята с помощью бактериологической петли отбирали отдельные колонии и помещали в микропробирки с 200 мкл PBS. Таким образом, получали бактериальные суспензии, из которых выделяли ДНК при помощи автоматизированной станции Freedom Evo («Tecan», Швейцария) и наборов «М-СорбТуб-Автомат-48» («Синтол», Россия). Полученные образцы ДНК тестировали методом ПЦР-РВ Acit 1 F/R, Acit 1-probe. Образцы ДНК, выделенной из бактериальных изолятов, положительных в результате тестирования методом ПЦР-РВ Acit 1 F/R, Acit 1-probe, идентифицировали методом секвенирования. Для этого с ДНК бактериальных изолятов проводили ПЦР с праймерами 8UA/519B для участка 16S рРНК, размер продукта амплификации 500 н.п. Последовательности праймеров: 8UA: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', 519B: 5’-GTA TTA CCG CGG CKG CTG-3' производства фирмы ООО «Евроген» (Россия). Для приготовления реакционной смеси использовали на один образец: 14 мкл деионизированной воды, 5 мкл мастер-микса 5X Mas^{DD}TaqMIX-2025 производства фирмы ЗАО «Диалат» (Россия), по 2 мкл каждого праймера в концентрации 10 пкм. Затем в микропробирку вносили 2 мкл ДНК-матрицы образца. Программа амплификации: начальная денатурация 96 °С – 10 минут, затем 35 циклов 95 °С – 15 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; финальная элонгация 72 °С – 10 минут. Для амплификации использовали T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). ПЦР-продукты анализировали методом определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) по Сэнгеру [24], используя секвенатор AB-3500 («Applied Biosystems», США, Япония).

Таблица 2 [Table 2]

Результаты тестирования образцов ДНК из семян тыквенных культур методами ПЦР
[PCR results with DNA from plant material of cucurbit crops]

Культура [Crop]	Сорт / гибрид [Variety/ hybrid]	1	2	3	4	5	6	7
Citrullus lanatus	Кримстар F1 [Krimstar F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Кримсон Рекорд F1 [Krimson Rekord F1]	–	–	–	–	–	–	–
	АУ Продюсер F1 [AU Prodyuser F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Огонёк [Ogonek]	–	–	–	–	–	–	–
	Сахарный Малыш [Sugar Baby]	+	+	–	–	–	–	–
	Кримсон Свит [Crimson Sweet]	–	–	–	–	–	–	–
	Сибирские огни [Sibirskiye ogni]	+	+	+	–	–	–	–
	Холодок [Kholodok]	–	–	–	–	–	–	–
Cucumis melo	Золотистая [Zolotistaya]	–	–	–	–	–	–	–
	Колхозница [Kolkhoznitsa]	–	–	–	–	–	–	–
Cucurbita pepo var. *giromontia*	Искандер F1 [Iskander F1]	+	+	+	+	–	–	–
	Куанд [Kuand]	–	–	–	–	–	–	–
	Цукеша [Tsukesha]	+	+	+	–	–	–	–
	Якорь [Yakor`]	–	–	–	–	–	–	–
	Ролик [Rolik]	–	–	–	–	–	–	–
	Белоплодный [Beloplodnyy]	–	–	–	–	–	–	–
	Аэронавт [Aeronavt]	+	+	+	–	–	–	–
	Белогор F1 [Belogor F1]	+	+	+	+	–	–	–
	Изумруд [Izumrud]	–	–	–	–	–	–	–
	Анна [Anna]	–	–	–	–	–	–	–
	Кавили F1 [Kavili F1]	+	+	–	–	–	–	–
	Камили F1 [Kamili F1]	+	+	+	+	–	–	–
	Скворушка [Skvorushka]	+	+	–	–	–	–	–
	Бетси F1 [Betsy F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Квета Мс [Kveta Ms]	–	–	–	–	–	–	–
Cucurbita pepo subsp. *ovifera*	Зонтик [Zontik]	+	+	+	–	–	–	–
	НЛО оранжевый [NLO Oranzhevyy]	–	–	–	–	–	–	–
	Санни Делайт F1 [Sunny Delight F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Белые 13 [Belye 13]	–	–	–	–	–	–	–
Cucumis sativus	Форсаж F1 [Forsazh F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Ласточка F1 [Lastochka F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Вязниковский 37 [Vyaznikovskiy 37]	–	–	–	–	–	–	–
	Практик F1 [Praktik F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Голубчик F1 [Golubchik F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Феникс [Feniks]	–	–	–	–	–	–	–
	Феникс Плюс [Feniks Plyus]	–	–	–	–	–	–	–
	Дружок F1 [Druzhok F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Засолочный [Zasolochnyy]	–	–	–	–	–	–	–
	Конкурент [Konkurent]	–	–	–	–	–	–	–
	Родничок F1 [Rodnichok F1]	–	–	+	–	–	–	–
	Журавлёнок F1 [Zhuravlenok F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Дальневосточный 27 [Dal`nevostochnyy 27]	–	–	–	–	–	–	–
	Амур 1801 F1 [Amur 1801 F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Артист F1 [Artist F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Астерикс F1 [Asteriks F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Верные друзья F1 [Vernye druz`ya F1]	+	+	–	–	–	–	–
	Весёлая семейка F1 [Veselaya semeyka F1]	+	+	–	–	–	–	–
	Дачный посол F1 [Dachnyy posol F1]	+	+	+	–	–	–	–

Окончание табл. 2 [Table 2 (end)]

Культура [Crop]	Сорт / гибрид [Variety/ hybrid]	1	2	3	4	5	6	7
Cucumis sativus	Зозуля F1 [Zozulya F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Капитошка F1 [Kapitoshka F1]	+	+	+	–	–	–	–
	Конни F1 [Konni F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Крестьянка F1 [Krest'yanka F1]	+	+	+	–	–	–	–
	Любимец хозяйки F1 [Lyubimets khozyayki F1]	+	+	–	–	–	–	–
	Малыши-карандаши F1 [Malyshi-karandashi F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Мальчик с пальчик F1 [Mal`chik s pal`chik F1]	+	+	+	+	–	–	–
	Маша F1 [Masha F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Мульти-пульти F1 [Mul`ti-pul`ti F1]	+	+	–	–	–	–	–
	Пальчик [Pal`chik]	–	–	–	–	–	–	–
	Первачок F1 [Pervachok F1]	+	+	–	–	–	–	–
	Реванш F1 [Revansh F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Нежинский [Nezhinskiy]	–	–	–	–	–	–	–
	Спринтер F1 [Sprinter F1]	+	+	–	–	–	–	–
	Тополёк F1 [Topolek F1]	+	+	+	–	–	–	–
	Шустрец-молодец F1 [Shustrets-molodets F1]	–	–	–	–	–	–	–
	Экспресс F1 [Ekspress F1]	+	+	+	–	–	–	–
Cucurbita moschata	Витаминная [Vitaminnaya]	–	–	–	–	–	–	–
	Мраморная [Mramornaya]	–	–	–	–	–	–	–
Cucurbita maxima	Стофунтовая [Stofuntovaya]	–	–	–	–	–	–	–
	Зимняя Сладкая [Zimnyaya Sladkaya]	–	–	–	–	–	–	–
	Амазонка [Amazonka]	+	+	+	–	–	–	–
	Большой Макс [Bol`shoy Maks]	+	+	+	–	–	–	–
	Землячка [Zemlyachka]	+	+	–	–	–	–	–
	Марсельеза [Marsel`eza]	+	+	–	–	–	–	–
	Улыбка [Ulybka]	–	–	–	–	–	–	–
	Россиянка [Rossiyanka]	–	–	–	–	–	–	–
Cucurbita pepo	Грибовская кустовая 189 [Gribovskaya Kustovaya 189]	–	–	–	–	–	–	–

Примечание [Note]: 1 – Acit 1 F/R, Acit 1-probe; 2 – «*Acidovorax citrulli*-PB» “Sintol”; 3 – *Acidovorax citrulli*-Rt “AgroDiagnostika”; 4 – AC158F/AC158R; 5 – SEQ ID 3/4; 6 – PL1/PL2; 7 – G12AcFwd/G12AcRev; «+» положительный результат ПЦР [positive PCR result]; «–» отрицательный результат ПЦР [negative PCR result].

Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями геномов бактерий, размещенных в базе данных Национального центра биотехнологической информации NCBI.

Результаты исследования и обсуждение

Процесс диагностики фитопатогенов представляет собой совокупность последовательно применяемых методов, финальным этапом каждого из которых является интерпретация полученных данных. В случае получения положительных результатов применяемых тестов важное значение имеет установление точной причины этих результатов.

Тестирование 5 штаммов *A. citrulli* методами Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагности-

ка», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev позволило получить положительные результаты по каждому из данных методов в трех повторностях. Таким образом, изучаемые методы ПЦР позволяют идентифицировать штаммы *A. citrulli* различного происхождения в случае содержания их в образце в концентрации, достаточной для детекции. Полученные данные совпадают с результатами исследований разработчиков методов [15, 19–21].

В результате тестирования образцов ДНК, выделенных из вегетативных частей тыквенных культур, положительный результат в трех повторностях получен только для образца кабачка сорта Якорь при использовании метода «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол». В связи с тем, что одним из условий данного опыта являлось отсутствие *A. citrulli* в образцах тыквенных культур, аналитическую пробу кабачка Якорь использовали для изоляции бактерий с целью установления причины получения положительного результата тестирования методом «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол». Тестирование образцов ДНК, выделенных из семян, показало положительные результаты с различными образцами тыквенных культур (см. табл. 2).

Такие образцы, как сорт арбуза Сибирские огни, кабачок Искандер F1, Цукеша, Аэронавт и др., показали положительные результаты на всех трех тестах ПЦР-РВ – Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика». Однако образец арбуза Сахарный Малыш, кабачок Кавили F1 и Скворушка, патиссон Зонтик и др. показали положительные результаты только при тестировании методами Acit 1 F/R, Acit 1-probe и «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол», а образец огурца Родничок F1 оказался положительным только при тестировании методом *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика». Тестирование образцов ДНК из семян показало также наличие положительных результатов при детекции продуктов ПЦР AC158F/AC158R в агарозном геле (табл. 3, рис. 1). Продукты реакции с ДНК образцов семян кабачка Искандер F1, Белогор F1 и Камили F1, а также огурца Мальчик с пальчик, состояли из 158 н.п., что соответствует ПКО (см. рис. 1). Без дополнительных исследований установить причину получения положительных результатов невозможно, поэтому аналитические пробы семян, положительных в результате тестирования любым из изучаемых методов ПЦР, использовали для изоляции бактерий. Всего для изоляции использовали 27 аналитических проб семян.

Проведение изоляции бактерий из образца вегетативных частей кабачка сорта Якорь, а также из 27 образцов семян позволило выделить бактериальные культуры, колонии которых морфологически различались. Определить связь различий с тем, что выделенные бактерии относились к разным видам или являлись разными формами одного вида, не представлялось возможным только лишь на основании морфологических характеристик. Поэтому колонии всех полученных морфотипов отбирали для тестирования методом ПЦР-РВ Acit 1 F/R, Acit 1-probe для обнаружения тех изолятов, которые спо-

собны приводить к получению положительных результатов данного ПЦР-теста. Среди 89 отобранных и протестированных изолятов только 14 показали положительные результаты при тестировании методом ПЦР-РВ Acit 1 F/R, Acit 1-probe, поэтому ДНК только этих 14 образцов использовали для проведения ПЦР 8UA/519B. Продукты ПЦР 8UA/519B использовали для секвенирования и последующей идентификации путем сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями геномов бактерий, размещенных в NCBI. Для 10 из 14 полученных нуклеотидных последовательностей не обнаружено совпадений в NCBI. Для 4 из 14 нуклеотидных последовательностей совпадения в NCBI обнаружены, и изоляты, ДНК которых использовали для ПЦР 8UA/519B и последующего секвенирования, идентифицированы как *Microbacterium phyllosphaerae*, *Arthrobacter* sp. (2 изолята) и *Sphingomonas paucimobilis*. Данные изоляты показали положительную реакцию при тестировании методами Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол» и *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика». При тестировании методом AC158F/AC158R данные изоляты также оказались положительны (см. рис. 1). Кроме того, изолят, идентифицированный как *Microbacterium phyllosphaerae*, показал положительную реакцию при тестировании методами SEQ ID 3/4 и PL1/PL2 (см. рис. 2).

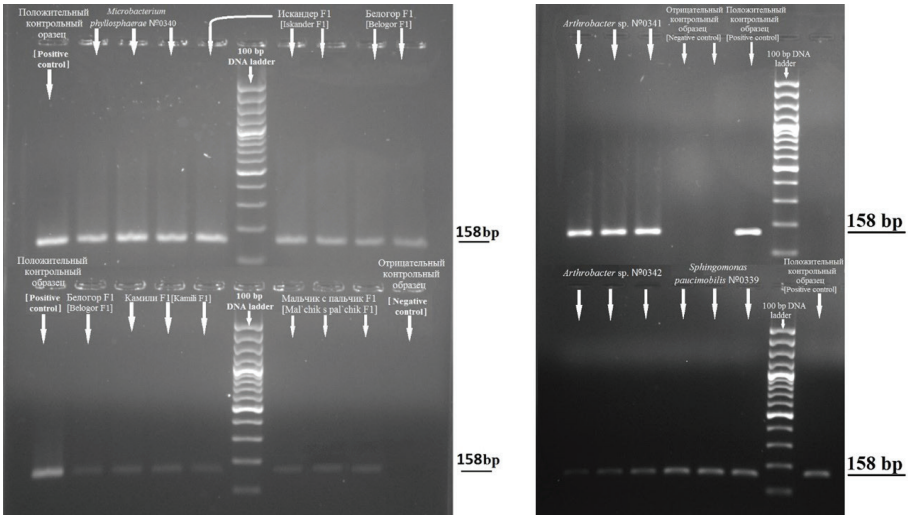

Рис. 1. Детекция продуктов ПЦР AC158F/AC158R с ДНК из семян тыквенных культур и бактериальными изолятами
[**Fig. 1.** Detection of PCR products of AC158F/AC158R with DNA from cucurbit seeds and bacterial isolates]

Изолят, идентифицированный как *Microbacterium phyllosphaerae*, депонировали в коллекции бактериологических культур ВНИИКР под номером 0340. Два изолята, идентифицированные как *Arthrobacter* sp., депонировали

в коллекции под номерами 0341 и 0342, *Sphingomonas paucimobilis* – № 0339. Таким образом, выделены и идентифицированы бактерии, потенциально являющиеся источниками ложноположительных результатов ПЦР-тестов Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4 и PL1/PL2. Данные, полученные путем тестирования штаммов 0339–0342, учтены при оценке АС.

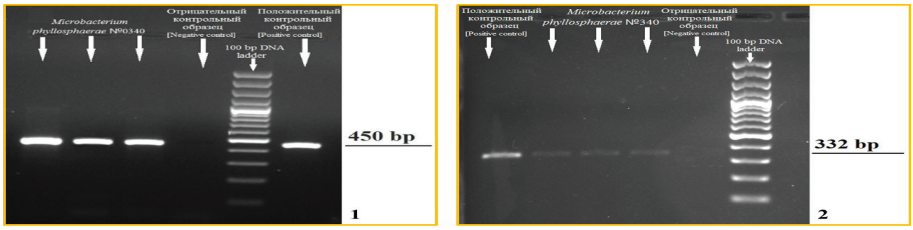

Рис. 2. Детекция продуктов ПЦР SEQ ID 3/4 (1) и ПЦР PL1/PL2 (2) с ДНК *Microbacterium phyllosphaerae*
[**Fig. 2.** Detection of PCR products of SEQ ID 3/4 (1) and PL1/PL2 (2) with *Microbacterium phyllosphaerae* DNA]

В рамках данного исследования тестирование других бактерий, не относящихся к виду *A. citrulli*, методами Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4 и PL1/PL2, показало отрицательные результаты. Метод G12AcFwd/G12AcRev показал положительные реакции только при тестировании штаммов *A. citrulli*, ложноположительные реакции отсутствовали.

Результаты тестирования штаммов *A. citrulli* методами ПЦР Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev использовали для определения значения инклюзивности (см. табл. 3). Все указанные методы ПЦР показали положительную реакцию с каждым из 5 тестируемых штаммов *A. citrulli.* Полученные данные позволяют сделать вывод об инклюзивности указанных методов ПЦР на уровне 100% и возможности их применения для идентификации *A. citrulli* ввиду отсутствия ложноотрицательных результатов.

Результаты тестирования бактериальных штаммов, не относящихся к виду *A. citrulli*, и образцов ДНК, выделенной из различных сортов и видов растений семейства Cucurbitaceae, использовали для определения значения эксклюзивности (табл. 4).

Установлено, что значение эксклюзивности методов Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика» и AC158F/AC158R ниже 99%, установленных в качестве критерия для признания метода специфичным; следовательно, указанные методы нельзя считать специфичными, несмотря на 100% инклюзивность. В то же время методы SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev являются спе-

цифичными (значение эксклюзивности более 99%, значение инклюзивности 100%).

Таблица 3 [Table 3]

Значения параметров оценки аналитической специфичности методов ПЦР
[The values of the parameters for assessing the analytical specificity of PCR methods]

Параметр оценки аналитической специфичности [Analytical specificity assessment parameter]	Метод ПЦР [PCR method]						
	1	2	3	4	5	6	7
Число достоверных положительных результатов при тестировании штаммов *Acidovorax citrulli* / Общее число протестированных штаммов *Acidovorax citrulli*, шт. [The number of true-positive results with *Acidovorax citrulli* strains / Total number of tested *Acidovorax citrulli* strains, pcs.]	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Инклюзивность [Inclusivity], %	100	100	100	100	100	100	100
Число достоверных отрицательных результатов при тестировании образцов, не содержащих ДНК *Acidovorax citrulli* / Общее число образцов, шт. [The number of true-negative results when testing samples that did not contain *Acidovorax citrulli* DNA / Total number of tested samples, pcs.]	124/153	122/153	133/153	145/153	152/153	152/153	153/153
Эксклюзивность [Exclusivity], %	81,0	79,7	86,9	94,8	99,3	99,3	100

Примечание [Note]: 1 – Acit 1 F/R, Acit 1-probe; 2 – «*Acidovorax citrulli*-РВ» "Sintol"; 3 – *Acidovorax citrulli*-Rt "AgroDiagnostika"; 4 – AC158F/AC158R; 5 – SEQ ID 3/4; 6 – PL1/PL2; 7 – G12AcFwd/G12AcRev.

Полученные результаты оценки АС позволяют сделать вывод о том, что ПЦР-РВ Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика» и ПЦР AC158F/AC158R могут использоваться в диагностике *A. citrulli* только в качестве отборочных методов. На основании положительных результатов тестирования образцов указанными методами нельзя делать заключение о наличии возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур в образце. В то же время ПЦР SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev могут быть применены в качестве подтверждающих методов диагностики *A. citrulli*.

Таким образом, в результате исследования проведена оценка аналитической специфичности существующих молекулярно-генетических методов идентификации возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.).

Заключение

В результате тестирования 5 штаммов *A. citrulli*, а также 47 бактериальных штаммов, не относящихся к виду *A. citrulli*, и 106 образцов ДНК, выделенной из различных сортов и видов растений семейства Cucurbitaceae, оценена аналитическая специфичность следующих молекулярно-генетических методов диагностики возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур: Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика», AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev. Установлено, что Acit 1 F/R, Acit 1-probe, «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол», *Acidovorax citrulli*-Rt «АгроДиагностика» и AC158F/AC158R могут использоваться в диагностике *A. citrulli* только в качестве отборочных методов ввиду низкой аналитической специфичности. На основании положительных результатов тестирования образцов указанными методами нельзя делать заключение о наличии возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур в образце. ПЦР SEQ ID 3/4, PL1/PL2 и G12AcFwd/G12AcRev могут быть применены в качестве подтверждающих методов диагностики *A. citrulli*.

Подобная полномасштабная оценка аналитической специфичности диагностических методов ПЦР для *A. citrulli* проведена впервые. Полученные данные позволят более достоверно проводить выявление и идентификацию *A. citrulli* в рамках работы испытательных лабораторий.

Литература

1. Webb R.E., Goth R.W. A seed-borne bacterium isolated from watermelon // Plant Disease Reporters. 1965. PP. 818–821.
2. Schaad N.W., Sowell G.Jr., Goth R.W., Colwell R.R., Webb R.E. *Pseudomonas pseudoalcalignes* subsp. *citrulli* // International Journal of Systematic Bacteriology. 1978. Vol. 28 (1). PP. 117–125.
3. Burdman S., Walcott R. *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry // Mol Plant Pathol. 2012. Vol. 13 (8). PP. 805–815. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00810
4. Deng W.L., Huang T.C., Tsai Y.C. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as the causal agent of bacterial leaf blight of betelvine in Taiwan // Plant Dis. 2010. Vol. 94 (8). P. 1065. doi: 10.1094/PDIS-94-8-1065A
5. Walcott R.R., Feng J., Gitaitis R.D. Chapter 26: Detection of *Acidovorax citrulli* in cucurbit seeds // Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material, second edition / Fatmi M., Walcott R.R., Schaad N.W., editors. 2016. PP. 179–187. doi: 10.1094/9780890545416.026
6. Yang R., Santos Garcia D., Pérez Montaño F., da Silva G.M., Zhao M., Jiménez Guerrero I., Rosenberg T., Chen G., Plaschkes I., Morin S., Walcott R., Burdman S. Complete assembly of the genome of an *Acidovorax citrulli* strain reveals a naturally occurring plasmid in this species // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10, № 1400. PP. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2019.01400
7. Cai L., Chen J., Liu Z., Wang H., Yang H., Ding W. Magnesium oxide nanoparticles: Effective agricultural antibacterial agent against *Ralstonia solanacearum* // Front. Microbiol. 2018. Vol. 9, № 790. PP. 1–19. doi: 10.3389/fmicb.2018.00790

8. Masum M.M.I., Siddiqa M.M., Ali K.A., Zhang Y., Abdallah Y., Ibrahim E., Qiu W., Yan C., Li B. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using phyllanthus emblica fruit extract and its inhibitory action against the pathogen *Acidovorax oryzae* strain RS-2 of rice bacterial brown stripe // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10, № 820. PP. 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2019.00820
9. Zarco-Tejada P.J., Camino C., Beck P.S.A, Calderon R., Hornero A., Hernández-Clemente R., Kattenborn T., Montes-Borrego M., Susca L., Morelli M., Gonzalez-Dugo V., North P.R.J., Landa B.B., Boscia D., Saponari M., Navas-Cortes J.A. Previsual symptoms of *Xylella fastidiosa* infection revealed in spectral plant-trait alterations // Nature Plants. 2018. Vol. 4 (7). PP. 432–439. doi: 10.1038/s41477-018-0189-7
10. Горобей И.М., Осипова Г.М. Проблема бактериозов растений и подходы к ее решению // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2017. № 47 (4). С. 94–102.
11. Islam M.R., Hossain M.R., Kim H.T., Jesse D.M.I., Abuyusuf M., Jong H.J., Park J.I., Nou I.S. Development of molecular markers for detection of *Acidovorax citrulli* strains causing bacterial fruit blotch disease in melon // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20 (11), № 2715. PP. 1–16. doi: 10.3390/ijms20112715
12. Cunty A., Audusseau C., Paillard S., Olivier V. First report of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch, on melon (*Cucumis melo*) in Guadeloupe (France) // Plant Disease. 2018. Vol. 103, № 5. P. 1017. doi: 10.1094/PDIS-10-18-1825-PDN
13. Kruse A., Fleites L.A., Heck M. Lessons from one fastidious bacterium to another: What can we learn about *Liberibacter* species from *Xylella fastidiosa* // Insects. 2019. Vol. 10 (9), № 300. PP. 1–23. doi: 10.3390/insects10090300
14. Boykin L.M., Sseruwagi P., Alicai T., Ateka E., Mohammed I.U., Stanton J.L., Kayuki C., Mark D., Fute T., Erasto J., Bachwenkizi H., Muga B., Mumo N., Mwangi J., Abidrabo P., Okao-Okuja G., Omuut G., Akol J., Apio H.B., Osingada F., Kehoe M.A., Eccles D., Savill A., Lamb S., Kinene T., Rawle C.B., Muralidhar A., Mayall K., Tairo F., Ndunguru J. Tree lab: Portable genomics for early detection of plant viruses and pests in Sub-Saharan Africa // Genes. 2019. Vol. 10 (9), № 632. PP. 1–13. doi: 10.3390/genes10090632
15. PM 7/127 (1) *Acidovorax citrulli* // EPPO Bulletin. 2016. № 46 (3). PP. 444–462. doi: 10.1111/epp.12330
16. PM 7/76 (5) Use of EPPO diagnostic standards // EPPO Bulletin. 2018. № 48 (3). PP. 373–377. doi: 10.1111/epp.12506
17. PM 7/98 (3) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity // EPPO Bulletin. 2018. № 48 (3). PP. 387–404. doi: 10.1111/epp.12508
18. Giovanardi D., Sutton S.A., Stefani E., Walcott R.R. Factors influencing the detection of *Acidovorax citrulli* in naturally contaminated cucurbitaceous seeds by PCR-based assays // Seed Science and Technology. 2018. Vol. 46, № 1. PP. 93–106. doi: 10.15258/sst.2018.46.1.09
19. Cho M.S., Park D.H., Ahn T., Park S.P. Rapid and specific detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using SYBR Green-based real-time PCR amplification of the YD-repeat protein gene // J. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 25 (9). PP. 1401–1409. doi: 10.4014/jmb.1502.02029
20. Zhong J., Lin Z.Y., Ma Y.M., Gao B.D., Liu H.Q., Zhao T.C., Schaad N.W. Rapid discrimination between groups I and II of *Acidovorax citrulli* using a primer pair specific to a pilL gene // Journal of Phytopathology. 2015. PP. 1–5. doi: 10.1111/jph.12435
21. Zivanovic M., Walcott R.R. Further characterization of genetically distinct groups of *Acidovorax citrulli* strains // Phytopathology. 2017. Vol. 107 (1). PP. 29–35. doi: 10.1094/PHYTO-06-16-0245-R
22. Лавренчук Л.С., Ермошин А.А. Микробиология : Практикум / под ред. Е.В. Березиной. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2019. 107 с.

23. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescing // Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1954. № 44. PP. 301–307.
24. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. 1975. Vol. 94. PP. 444–448.

Поступила в редакцию 20.01.2020 г.; повторно 29.04.2020 г., 11.08.2020 г.; принята 19.08.2020 г.; опубликована 25.09.2020 г.

Авторский коллектив:
Словарева Ольга Юрьевна – аспирант кафедры генетики, селекции и семеноводства, факультет агрономии и биотехнологии, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева (Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49); м.н.с. лаборатории бактериологии, Испытательный лабораторный центр, Всероссийский центр карантина растений (Россия, 140150, рп. Быково, ул. Пограничная, 32).
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-6022-5955
E-mail: slovareva.olga@gmail.com
Корнев Константин Павлович – канд. биол. наук, зам. директора, Всероссийский центр карантина растений (Россия, 140150, рп. Быково, ул. Пограничная, 32).
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0002-3490-1857
E-mail: konstantin.kornev@gmail.com

Для цитирования: Словарева О.Ю., Корнев К.П. Определение аналитической специфичности методов ПЦР для идентификации *Acidovorax citrulli* // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С.25–45. doi: 10.17223/19988591/51/2

For citation: Slovareva OY, Kornev KP. Determination of analytical specificity of PCR methods for *Acidovorax citrulli* identification. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:25-45. doi: 10.17223/19988591/51/2 In Russian, English Summary

Olga Y. Slovareva[1,2], Konstantin P. Kornev[2]

[1] Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation
[2] Federal State Organization "All-Russian Plant Quarantine Center", Bykovo, Moscow region, Russian Federation

Determination of analytical specificity of PCR methods for *Acidovorax citrulli* identification

Acidovorax citrulli (Schaad et al.), the causative agent of bacterial fruit blotch of cucurbits is a significant object in plant quarantine. The main stage in the detection of the phytopathogen in the framework of laboratory diagnostics is using molecular-genetic methods, like PCR, and it is the results of the application of these methods that are decisive. In this regard, the used PCR-methods impose strict requirements for assessing their applicability. Applicability criteria such as analytical specificity, showing the ability of a test to reliably distinguish a target organism from a non-target organism, is an integral component of the assessment applicability of a diagnostic method. Analytical specificity is evaluated based on the values of parameters such as inclusivity and exclusivity. Inclusivity shows the ability of the method to identify strains of the target bacterium, representing all genetic diversity, different geographical origin and host plants. Exclusivity shows the ability of the method to distinguish non-target bacteria, especially those that can be in the DNA of host plants. This study was conducted to determine the analytical specificity of the PCR-methods for identification of *A. citrulli*.

We detemined analytical specificity with 5 *A. citrulli* strains, 19 bacterial strains of other species from international collections, 28 other bacterial isolates (*See Table 1*) and 106 DNA samples isolated from various varieties and species of Cucurbitaceae plants. 30 samples were plant debris, and 76 were seed samples (*See Table 2*). The process of preparing analytical samples consisted in the extraction of microbiota from samples into phosphate-saline buffer and subsequent concentration using high-speed centrifuge. Then DNA was extracted from the samples. PCR for each sample was performed in triplicate for each of the following tests: qPCR Acit 1 F/R and Acit 1-probe according to Woudt et al [2009], commercial kits for qPCR by "Syntol" and "AgroDiagnostika" (Russia), PCR with primers AC158F/AC158R according to Cho et al. [2015], PCR SEQ ID 3/4 according to Schaad et al. [2000], PCR PL1/PL2 according to Zhong et al., 2015 and PCR G12AcFwd/G12AcRev according to Zivanovic & Walcott [2017]. The value of inclusivity for each PCR test was determined as the ratio of reliable positive results of the target to the total number of reactions, expressed as a percentage. The value of exclusivity was determined as the ratio of reliable negative results to the total number of reactions of non-target, expressed as a percentage. An assessment of analytical specificity was assigned to each of the test based on an analysis of the inclusivity and exclusivity parameters. The conclusion about the specificity of the tests was made with the values of inclusivity and exclusivity of 99% or higher. Isolation of bacteria was carried out from analytical samples of cucurbit crops that showed at least one positive result when tested by any of the above PCR methods (*See Table 3*). DNA from single colonies was used for PCR with primers 8UA/519B. For identification, we used the Sanger method for determining the nucleotide sequence, which were, then, compared with the sequences of bacterial genomes in the NCBI database.

The process of diagnosing phytopathogens is a combination of sequentially applied methods and tests, the final stage of each of which is the interpretation of the data. In the case of obtaining positive results of the applied tests, it is important to establish the exact cause of these results. During the study, PCR tests showed positive results with samples known to be free of the *A. citrulli* DNA. Agarose gel amplicon detection also revealed the presence of reaction products characteristic of *A. citrulli* (*See Fig. 1*). Also, isolated 89 bacterial cultures whose colonies were morphologically different. These isolates were selected for testing by the Acit 1 F/R, Acit 1-probe in order to detect those isolates that can lead to positive results. 14 isolates showed positive results. These isolates were used for PCR 8UA/519B. For 4 of the 14 nucleotide sequences, matches in the NCBI were detected, and isolates identified as *Microbacterium phyllosphaerae*, *Arthrobacter* sp. (2 isolates) and *Sphingomonas paucimobilis*. These isolates showed a positive reaction when tested using Acit 1 F/R, Acit 1-probe, "*Acidovorax citrulli*-RV" "Synthol" and *Acidovorax citrulli*-Rt "AgroDiagnostika". When tested using the AC158F/AC158R method, these isolates were also positive (*See Fig. 1*). In addition, the isolate identified as *Microbacterium phyllosphaerae* showed a positive reaction when tested by methods of SEQ ID 3/4 and PL1/PL2 (*See Fig. 2*). Thus, bacteria that are potentially sources of false-positive PCR tests were isolated and identified. Testing of other bacteria not belonging to the species *A. citrulli* showed negative results. The results of testing strains *A. citrulli* by Acit 1 F/R, Acit 1-probe, "*Acidovorax citrulli*-RV" "Synthol", *Acidovorax citrulli*-Rt "AgroDiagnostika", AC158F/AC158R, SEQ ID 3/4, PL1/PL2 and G12AcFwd/G12AcRev were used to determine the value of inclusivity (*See Table 4*). PCR methods showed a positive reaction with each of the 5 tested *A. citrulli* strains (100% inclusivity). Test results of bacterial strains not belonging to the species *A. citrulli* and DNA samples isolated from different varieties and species of Cucurbitaceae were used to determine the value of exclusivity (*See Table 3*). We found that the exclusivity values of the Acit 1 F/R, Acit 1-probe,

"*Acidovorax citrulli*-RV" "Synthol", *Acidovorax citrulli*-Rt "AgroDiagnostika" and AC158F/AC158R methods are below 99%, established as a criterion for recognizing the method as specific; therefore, these methods cannot be considered specific, despite 100% inclusivity. At the same time, the methods SEQ ID 3/4, PL1/PL2 and G12AcFwd/G12AcRev are specific (the value of exclusivity is more than 99%, the value of inclusivity is 100%). The results of the analytical specificity assessment allow us to conclude that Acit 1 F/R, Acit 1-probe, "*Acidovorax citrulli*-RV" "Synthol", *Acidovorax citrulli*-Rt "AgroDiagnostika", AC158F/AC158R can be used in diagnosing *A. citrulli* only as screening methods. Based on the positive results of testing the samples with the indicated methods, it is impossible to draw a conclusion about the presence of the pathogen in the sample. At the same time, PCR SEQ ID 3/4, PL1/PL2 and G12AcFwd/G12AcRev can be used as confirmatory diagnostic methods for *A. citrulli*. Thus, as a result of the study, we evaluated the analytical specificity of existing molecular-genetic methods for identifying *A. citrulli*. Such a full-scale assessment of the analytical specificity of diagnostic PCR methods for *A. citrulli* was carried out for the first time. The obtained data will allow testing laboratories to more reliably identify *A. citrulli*.

The paper contains 2 Figures, 3 Tables and 24 References.

Key words: PCR; plant quarantine; diagnostics of phytopathogens.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Webb RE, Goth RW. A seed-borne bacterium isolated from watermelon. *Plant Disease Reporters*. 1965;818-821.
2. Schaad NW, Sowell GJr, Goth RW, Colwell RR, Webb RE. *Pseudomonas pseudoalcalignes* subsp. *citrulli*. *Int J of Systematic Bacteriology*. 1978;28(1):117-125.
3. Burdman S, Walcott R. *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(8):805-815. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00810
4. Deng WL, Huang TC, Tsai YC. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as the causal agent of bacterial leaf blight of betelvine in Taiwan. *Plant Dis*. 2010;94(8):1065. doi: 10.1094/PDIS-94-8-1065A
5. Walcott RR, Feng J, Gitaitis RD. Chapter 26: Detection of *Acidovorax citrulli* in cucurbit seeds. In: *Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material, second edition*. Fatmi M, Walcott RR, Schaad NW, editors. 2016;179-187. doi: 10.1094/9780890545416.026
6. Yang R, Garcia DS, Pérez Montaño F, Mateus da Silva G, Zhao M, Jiménez Guerrero I, Rosenberg T, Chen G, Plaschkes I, Morin S, Walcott R, Burdman S. Complete assembly of the genome of an *Acidovorax citrulli* strain reveals a naturally occurring plasmid in this species. *Front. Microbiol*. 2019;10(1400):1-17. doi: 10.3389/fmicb.2019.01400
7. Cai L, Chen J, Liu Z, Wang H, Yang H, Ding W. Magnesium oxide nanoparticles: Effective agricultural antibacterial agent against *Ralstonia solanacearum*. *Front. Microbiol*. 2018;9(790):1-19. doi: 10.3389/fmicb.2018.00790
8. Masum MMI, Siddiqa MM, Ali KA, Zhang Y, Abdallah Y, Ibrahim E, Qiu W, Yan C, Li B. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using phyllanthus emblica fruit extract and its inhibitory action against the pathogen *Acidovorax oryzae* strain RS-2 of rice bacterial brown stripe. *Front. Microbiol*. 2019;10(820)1-18. doi: 10.3389/fmicb.2019.00820
9. Zarco-Tejada PJ, Camino C, Beck PSA, Calderon R, Hornero A, Hernández-Clemente R, Kattenborn T, Montes-Borrego M, Susca L, Morelli M, Gonzalez-Dugo V, North PRJ, Landa BB, Boscia D, Saponari M, Navas-Cortes JA. Previsual symptoms of *Xylella*

fastidiosa infection revealed in spectral plant-trait alterations. *Nature Plants*. 2018. 4(7):432-439. doi: 10.1038/s41477-018-0189-7
10. Gorobey IM, Osipova GM. The problem of bacterioses in plants and approaches to solving it. *Siberian Herald of Agricultural Science.* 2017;47(4):94-102. In Russian, English summary.
11. Islam MR, Hossain MR, Kim HT, Jesse DMI, Abuyusuf M, Jong HJ, Park JI, Nou IS. Development of molecular markers for detection of *Acidovorax citrulli* strains causing bacterial fruit blotch disease in melon. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(11).2715:1-16. doi: 10.3390/ijms20112715
12. Cunty A, Audusseau C, Paillard S, Olivier V. First report of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch, on melon (*Cucumis melo*) in Guadeloupe (France). *Plant Disease*. 2018;103(5):1017. doi: 10.1094/PDIS-10-18-1825-PDN
13. Kruse A, Fleites LA, Heck M. Lessons from one fastidious bacterium to another: What can we learn about *Liberibacter* species from *Xylella fastidiosa. Insects*. 2019;10(9).300:1-23. doi: 10.3390/insects10090300
14. Boykin LM, Sseruwagi P, Alicai T, Ateka E, Mohammed IU, Stanton JL, Kayuki C, Mark D, Fute T, Erasto J, Bachwenkizi H, Muga B, Mumo N, Mwangi J, Abidrabo P, Okao-Okuja G, Omuut G, Akol J, Apio HB, Osingada F, Kehoe MA, Eccles D, Savill A, Lamb S, Kinene T, Rawle CB, Muralidhar A, Mayall K, Tairo F, Ndunguru J. Tree lab: Portable genomics for early detection of plant viruses and pests in Sub-Saharan Africa. *Genes*. 2019;10(9).632:1-13. doi: 10.3390/genes10090632
15. PM 7/127 (1) *Acidovorax citrulli. EPPO Bulletin*. 2016;46(3):444-462. doi: 10.1111/epp.12330
16. PM 7/76 (5) Use of EPPO diagnostic standards. *EPPO Bulletin*. 2018;48(3):373-377. doi: 10.1111/epp.12506
17. PM 7/98 (3) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*. 2018;48(3):387-404. doi: 10.1111/epp.12508
18. Giovanardi D, Sutton SA, Stefani E, Walcott RR. Factors influencing the detection of *Acidovorax citrulli* in naturally contaminated cucurbitaceous seeds by PCR-based assays. *Seed Science and Technology*. 2018;46(1):93-106. doi: 10.15258/sst.2018.46.1.09
19. Cho MS, Park DH, Ahn T, Park SP. Rapid and specific detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using SYBR Green-based real-time PCR amplification of the YD-repeat protein gene. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2015;25(9):1401-1409. doi: 10.4014/jmb.1502.02029
20. Zhong J, Lin ZY, Ma YM, Gao BD, Liu HQ, Zhao TC, Schaad NW. Rapid discrimination between groups I and II of *Acidovorax citrulli* using a primer pair specific to a pilL gene. *J Phytopathology*. 2015;1-5. doi: 10.1111/jph.12435
21. Zivanovic M, Walcott RR. Further characterization of genetically distinct groups of *Acidovorax citrulli* strains. *Phytopathology*. 2017;107(1): 29-35. doi: 10.1094/PHYTO-06-16-0245-R
22. Lavrenchuk LS, Ermoshin AA. Mikrobiologiya: Praktikum [Microbiology: Workshop]. Berezina EV, editor. Yekaterinburg: Izdatel`stvo Ural`skogo universiteta Publ.; 2019. 107 p. In Russian
23. King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Laboratory and Clinical Medicine*. 1954;44:301-307.
24. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed syntesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94:444-448.

Received 20 January 2020; Revised 29 April 2020 and 11 August 2020;
Accepted 19 August 2020; Published 25 September 2020

Author info:
Slovareva Olga Y, Graduate Student, Department of Genetics, Breeding and Seed Production, Faculty of Agronomy and Biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 49 Timiryazevskaya Str., Moscow 127550, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Bacteriology, Testing Laboratory Center, All-Russian Plant Quarantine Center, 32 Pogranichnaya Str., Bykovo 140150, Russian Federation.
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0001-6022-5955
E-mail: slovareva.olga@gmail.com
Kornev Konstantin P, Cand. Sci. (Biol.), Deputy Director, All-Russian Plant Quarantine Center, 32 Pogranichnaya Str., Bykovo 140150, Russian Federation.
ORCID iD: https://orcid.org/0000-0002-3490-1857
E-mail: konstantin.kornev@gmail.com