

ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *ACIDOVORAX CITRULLI* И ОПТИМИЗАЦИЯ СХЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

О.Ю. СЛОВАРЕВА¹, Г.Н. БОНДАРЕНКО^{1,2}, К.П. КОРНЕВ¹, С.И. ПРИХОДЬКО¹

(¹ ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»;

² Российский университет дружбы народов)

Фитопатогенная бактерия Acidovorax citrulli входит в карантинные перечни многих стран мира, в том числе в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза. Контроль проникновения и распространения карантинного организма на территорию России осуществляется, в том числе, путем проведения лабораторной диагностики. Диагностические методы должны обеспечивать не только качество, но и высокую скорость проведения тестирования здоровья продукции. Целью исследований стало применение новых методов выявления и идентификации A. citrulli, а также оптимизация схемы лабораторной диагностики. В ходе работы подготавливали и тестировали семена огурца с инфекционной нагрузкой. Тестирование проводили согласно оптимизированной диагностической схеме с применением не использовавшихся ранее в диагностике A. citrulli методов. На каждом этапе работы с образцами проводили учет затрачиваемого времени. Тестирование подготовленных зараженных семян на первом этапе проводили стандартным отборочным методом, а затем – ранее не применявшимся в диагностике A. citrulli методом ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P. Новый тест ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P показал стабильные результаты при тестировании каждого образца в ряду каждой повторности. Успешно применен ранее не использовавшийся в диагностике A. citrulli метод обогащения образца. Использование метода позволило в течение 2,5 сут. отделить образцы, в которых содержится живая целевая бактерия, от тех образцов, в которых присутствовала только ДНК A. citrulli. Успешно проведены изоляция и идентификация культуры A. citrulli из образцов после обогащения. На основании данных, полученных в результате исследований, оптимизирована схема выявления и идентификации возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур Acidovorax citrulli. Предлагаемая схема позволит сократить время проведения диагностики опасного карантинного организма с четырех недель до одной.

Ключевые слова: карантин растений, *Acidovorax citrulli*, ПЦР-РВ, метод обогащения образца, диагностика бактерий.

Введение

Возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* представляет угрозу сельскому хозяйству и, в частности, производству тыквенных культур [5]. Попав в благоприятные условия, фитопатоген может причинить существенный ущерб производству тыквенных культур, имеющих важное экономическое значение для России [15]. Производство продукции бахчевых осуществляется зачастую с использованием импортного посевного материала, который является главным способом распространения *A. citrulli* [1, 14].

Карантинная фитосанитарная служба России осуществляет ряд мер, направленных на предотвращение интродукции опасного вредного организма. Наиболее важным этапом принимаемых мер является лабораторная диагностика [2, 12, 16]. Методика выявления и идентификации, применяемая в испытательной лаборатории, должна обеспечивать не только качество установления фитосанитарного состояния подкарантинной

продукции, но и высокую скорость проведения исследования [5]. *A. citrulli* в силу своих генетических и биологических особенностей представляет собой сложнодиагностируемый объект [3, 8, 10, 11]. В связи с этим для идентификации *A. citrulli* применяют комплекс методов, каждый из которых требует определенных затрат труда, времени и ресурсов [13]. Существующие схемы диагностики *A. citrulli* в случае подозрения на наличие возбудителя в образце требуют затрат времени порядка четырех недель (проращивание семян, изоляция культуры, различные методы ПЦР, секвенирование), а также специализированной дорогостоящей техники (генетический анализатор) [7].

В связи с актуальностью проблемы проведено исследование, целью которого стало применение новых методов выявления и идентификации *A. citrulli*, а также оптимизация схемы лабораторной диагностики. Задачи исследования заключались в подготовке семян с инфекционной нагрузкой, в проведении с этими семенами тестирования стандартным отборочным методом, апробации ранее не применявшихся в диагностике *A. citrulli* методов ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P и обогащения образца, выделения и идентификации чистой культуры *A. citrulli* и в подсчете времени, требуемого для проведения лабораторного исследования: от момента поступления образца к исследователю до получения исследователем окончательного результата.

Материал и методы исследований

В работе использовали следующие штаммы *A. citrulli*: IVIA 3000 (из коллекции фитопатогенов Института сельскохозяйственных исследований, г. Валенсия, Испания) и DLS1456 (из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур, Германия).

Для получения семян с инфекционной нагрузкой подготавливали по 3 мл суспензии каждого штамма в концентрации 10^5 КОЕ/мл; измерение концентрации бактерий проводили при помощи прибора NanoDrop-2000 «Thermo Fisher Scientific» (США). После проведения измерений по 1,5 мл суспензии каждого штамма подвергали термической обработке при 96°C в течение 10 мин с использованием твердотельного термостата ТТ-1 (Гном) «ДНК-Технология» (Россия) и охлаждали до комнатной температуры.

Подготавливали 5 проб по 50 шт. семян огурца сорта Вязниковский 37, масса каждой пробы составила $1,14 \pm 0,07$ г. Пробы помещали в отдельные пластиковые кюветы. К первой пробе добавляли 1,2 мл суспензии штамма IVIA 3000, ко второй – 1,2 мл суспензии штамма IVIA 3000 после термической обработки, к третьей – 1,2 мл суспензии штамма DLS1456, к четвертой – 1,2 мл суспензии штамма DLS1456 после термической обработки, к пятой пробе добавляли 1,2 мл стерильного 0,5М раствора NaCl (отрицательный контроль). Во время добавления жидкостей внимательно следили за их равномерным распределением в пробах семян. Кюветы герметично упаковывали пищевой пленкой и оставляли при комнатной температуре до полного выпитывания жидкости семенами.

Подготавливали 20 проб по 95 шт. семян огурца сорта Вязниковский 37, масса каждой пробы составила $2,17 \pm 0,12$ г. Пробы помещали в отдельные пластиковые контейнеры. К каждой пробе семян добавляли по 5 шт. семян с инфекционной нагрузкой, создавая таким образом зараженные пробы семян (рис. 1).

К пробе из 50 семян с отрицательным контролем добавляли 50 сухих семян. Таким образом подготовили образцы семян для исследования. Последующие этапы проводили с подсчетом времени, необходимого для осуществления всех манипуляций с образцами.

В каждую пробу семян вносили 20 мл фосфатно-солевого буфера [4] и помещали контейнеры с пробами на шейкер при режиме 90 оборотов в 1 мин (об/мин).

Через 20 ч получившиеся экстракты отделяли от семян с помощью бумажных фильтров «Синяя лента», «Мелиор XXI» (Россия) и центрифугировали при режиме 4°C, 10000 g, 10 мин, используя центрифугу с охлаждением Allegra X-30R «Beckman Coulter» (Дания). Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 1 мл фосфатно-солевого буфера и интенсивно встряхивали на вортексе.

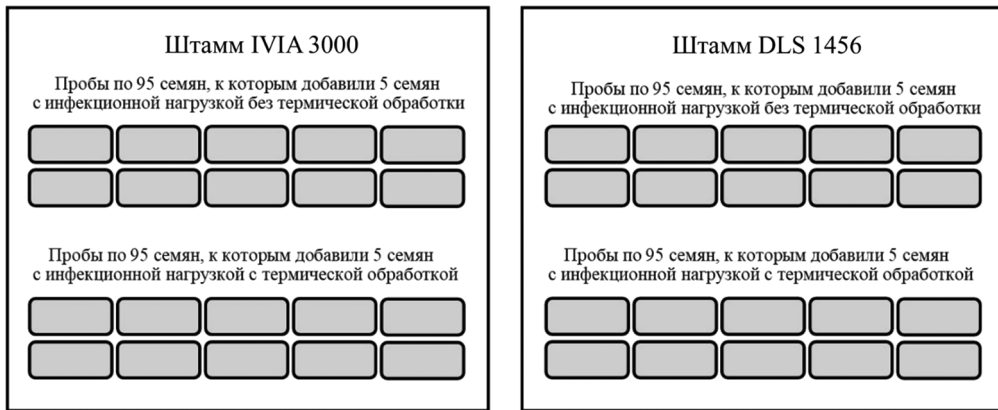


Рис. 1. Схема приготовления зараженных проб семян

По 200 мкл полученных таким образом аналитических проб использовали для выделения ДНК с помощью набора «М–СорбТуб-Автомат-48», «Синтол» (Россия). Методика выделения основана на лизисе ДНК изотиоцианатом гуанидина, сорбции ДНК на покрытых силикагелем магнитных частицах, стадии промывок и последующей элюции. Выделение ДНК проводили на автоматизированной станции Freedom Evo «Tecan» (Швейцария).

С образцами ДНК проводили отборочный тест ПЦР-РВ, используя набор реагентов для выявления ДНК возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол» (Россия) (далее – «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол») на амплификаторе, детектирующем ДТпрайм «ДНК-Технология» (Россия).

При получении положительного результата ПЦР проводили тестирование образцов ДНК подтверждающим методом. В качестве подтверждающих в настоящем исследовании использовали ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P [17] и SEQ ID3/4 [9]. На данном этапе исследования использовали только ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P. Состав реакционной смеси и условия для проведения подтверждающих ПЦР-тестов приведены в таблице 1.

С аналитическими пробами, тестирование ДНК которых подтверждающим методом ПЦР показало положительный результат, проводили обогащение образца согласно следующей методике: фрагмент плода кабачка массой 12–14 г помещали в стерильные чашки Петри, предварительно закрыв дно чашек фильтровальной бумагой для абсорбции лишней влаги. Каждый фрагмент плода инокулировали аналитическими пробами по 200 мкл пробы на каждый фрагмент, делая проколы в нескольких участках мякоти наконечником дозатора (пипетки) и нанося каплю суспензии в месте прокола. В качестве отрицательного контроля использовали аналитическую пробу, свободную от *A. citrulli*. Затем чашки Петри накрывали крышками, герметично упаковывали с использованием пищевой пленки и инкубировали при 37°C без освещения, используя инкубатор с охлаждением MIR-254 «Panasonic» (Sanyo) (Япония) в течение 2 сут.

**Состав реакционной смеси и условия
для проведения подтверждающих ПЦР-тестов**

ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P		ПЦР SEQ ID3/4	
Компонент	Количество	Компонент	Количество
Вода	12 мкл	Вода	14 мкл
Праймер PAS F, 10 пмоль/мкл	1 мкл	Праймер SEQ ID3, 10 пмоль/мкл	0,5 мкл
Праймер PAS R, 10 пмоль/мкл	1 мкл	Праймер SEQ ID4, 10 пмоль/мкл	0,5 мкл
Зонд PAS P, 5 пмоль/мкл	1 мкл	Мастер-микс 5x Mas ^{DD} TaqMIX-2025	5 мкл
Мастер-микс 5x qPCRmix-HS	5 мкл	ДНК	5 мкл
ДНК	5 мкл	Готовая смесь	25 мкл
Готовая смесь	25 мкл	Амплификация: 10 мин при 94°C, затем 35 циклов: 30 сек. при 94°C, 45 сек. при 56°C и 60 сек. при 72°C; затем 7 мин при 72°C.	
Амплификация: 5 мин при 95°C, затем 40 циклов: 10 сек. при 94°C, 30 сек. при 62°C и 20 сек. при 72°C			

Каждый фрагмент плода помещали в отдельные пластиковые контейнеры и добавляли по 30 мл фосфатно-солевого буфера. Контейнеры встряхивали на орбитальном шейкере Unimax 2010 «Heidolph» (Германия) при 18–22 °С и 130 об/мин в течение 5 мин. Получившиеся экстракты подвергали дальнейшей подготовке проб и выделению ДНК, используя те же методы и оборудование, что и для проб экстрактов семян.

Образцы ДНК тестировали подтверждающим методом ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P. Аналитические пробы, показавшие положительный результат (по 1 пробе от каждого ряда повторностей), высевали на питательную среду Кинг Б [6] для изоляции культуры *A. citrulli*. Посев проводили методом Дригальского [16] с растяжением на 3 чашки Петри, используя 20 мкл аналитической пробы. Чашки плотно оборачивали герметизирующей пленкой Parafilm и термостатировали в течение 48 ч при 37°C.

Отдельные колонии, выросшие на среде Кинг Б, отбирали с помощью стерильной бактериологической петли, приготавливали суспензии в стерильной дистиллированной воде и анализировали подтверждающим методом SEQ ID3/4.

Обработку результатов количественных ПЦР проводили, используя стандартные функции Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

В результате проведения с образцами ДНК, выделенной из семян с инфекционной нагрузкой, отборочного ПЦР-теста «*Acidovorax citrulli*-РВ» «Синтол» получены положительные результаты всех тестируемых образцов (10 повторностей каждого варианта), кроме отрицательного контроля (табл. 2).

Таблица 2

Результаты ПЦР-теста «*Acidovorax citrulli*-PB» «Синтол»

Варианты бактериальных суспензий, используемых для заражения тестируемых семян	Значение C_t , HCP_{005}	Результат
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> IVIA 3000 без термической обработки	30,8±0,4	обнаружено
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> IVIA 3000 с термической обработкой	30,6±0,5	обнаружено
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> DLS1456 без термической обработки	31,2±0,6	обнаружено
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> DLS1456 с термической обработкой	30,9±0,4	обнаружено
Отрицательный контроль	нет	не обнаружено

Примечание. C_t – значение порогового цикла ПЦР-PB, отражающее количество копий ПЦР-мишени в исходном образце ДНК.

Представленные в таблице 2 данные показывают, что разница в величине порогового цикла C_t отсутствует между вариантами штамма IVIA с термической обработкой и без нее. Также отсутствует разница в величине C_t между вариантами штамма DLS1456 с термической обработкой и без нее. Существенных отличий по данному показателю между штаммами не обнаружено.

Установлено, что на проведение подготовки 41 образца, выделение ДНК и тестирование методом ПЦР затрачено 28,5 ч. Проведенный с этими же образцами подтверждающий тест ПЦР-PB PAS F/R, PAS P также показал положительные результаты всех тестируемых образцов, кроме отрицательного контроля (табл. 3).

Таблица 3

Результаты подтверждающего теста ПЦР-PB PAS F/R, PAS P

Варианты бактериальных суспензий, используемых для заражения тестируемых семян	Значение C_t , HCP_{005}	Результат
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> IVIA 3000 без термической обработки	35,9±0,7	обнаружено
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> IVIA 3000 с термической обработкой	35,7±0,6	обнаружено
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> DLS1456 без термической обработки	36,5±0,8	обнаружено
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> DLS1456 с термической обработкой	35,6±0,8	обнаружено
Отрицательный контроль	нет	не обнаружено

Примечание. C_t – значение порогового цикла ПЦР-PB, отражающее количество копий ПЦР-мишени в исходном образце ДНК.

Представленные в таблице 3 данные показывают отсутствие различий между вариантами тестируемых образцов по показателю C_t . Метод ПЦР-PB показал стабильность результатов при тестировании 10 образцов в каждой повторности. На проведение подтверждающего ПЦР-теста затрачено 3 ч.

В связи с тем, что все образцы с инфекционной нагрузкой показали положительные результаты тестирования подтверждающим методом, все они были

использованы для проведения метода обогащения образца. Подготовка образцов к термостатированию заняла 2 ч. Термостатирование, согласно условиям применения метода, проводили в течение 2 сут. Подготовка проб обогащенных образцов, выделение ДНК и проведение ПЦР заняли 10 ч.

Проведенный с обогащенными образцами подтверждающий тест ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P показал положительные результаты только для образцов семян, содержащих суспензию без термической обработки. При этом существенных отличий в величине C_t между двумя штаммами не обнаружено (табл. 4).

Таблица 4

Результаты подтверждающего теста ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P

Варианты бактериальных суспензий, используемых для заражения тестируемых семян	Значение C_t , НСП ₀₀₅	Результат
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> IVIA 3000 без термической обработки	26,1±0,5	обнаружено
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> IVIA 3000 с термической обработкой	нет	не обнаружено
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> DLS1456 без термической обработки	27,4±0,7	обнаружено
Штамм <i>Acidovorax citrulli</i> DLS1456 с термической обработкой	нет	не обнаружено
Отрицательный контроль	нет	не обнаружено

Примечание. C_t – значение порогового цикла ПЦР-РВ, отражающее количество копий ПЦР-мишени в исходном образце ДНК.

Результаты, представленные в таблице 4, показывают, что ПЦР отрицательна с ДНК обогащенных образцов в вариантах с использованием суспензий штаммов после термической обработки. В то же время обогащенные образцы с использованием штаммов без термической обработки показали существенное изменение величины порогового цикла ПЦР-РВ: с 35,9±0,7 C_t на 26,1±0,5 C_t и с 36,5±0,8 C_t на 27,4±0,7 C_t . Уменьшение C_t показывает, что детекция прибором ПЦР-мишени произошла раньше, следовательно, число копий мишени в исходном образце ДНК увеличилось.

Такой результат свидетельствует о том, что клетки *A. citrulli* после термической обработки становятся нежизнеспособными, и после введения в фрагменты плода кабачка ДНК *A. citrulli* разрушается в течение 2 сут. при температуре 37°C. В то же время при аналогичных условиях живая культура патогена активно размножается, что приводит к существенному увеличению числа клеток бактерии, уменьшению C_t и позволяет успешно использовать для дальнейшей диагностики метод изоляции культуры фитопатогена на питательных средах.

Следует отметить, что уже на этапе проведения тестирования обогащенных образцов исследователь имеет представление о наличии или отсутствии живой бактерии *A. citrulli* в исследуемых образцах. На исполнение всех перечисленных выше исследований, даже при учете необходимости тестирования 41 образца, одним человеком затрачено около 4 сут. Данный показатель существенно превышает скорость проведения исследований по классической схеме.

В результате посева на среду Кинг Б проб, полученных после обогащения образцов, и инкубирования чашек Петри в течение 2 сут. получены отдельные колонии, морфология которых соответствовала *A. citrulli*: гладкие, округлые, кремовые, блестящие, нефлуоресцирующие колонии [1]. Идентификация полученных отдельных

колоний подтверждающим методом ПЦР SEQ ID3/4 показала их принадлежность виду *A. citrulli*. Культурально-морфологический метод с последующим подтверждением методом ПЦР занял 2,5 сут.

Результаты проведенных опытов позволили оптимизировать схему выявления и идентификации *A. citrulli* (далее – схема) (рис. 2).

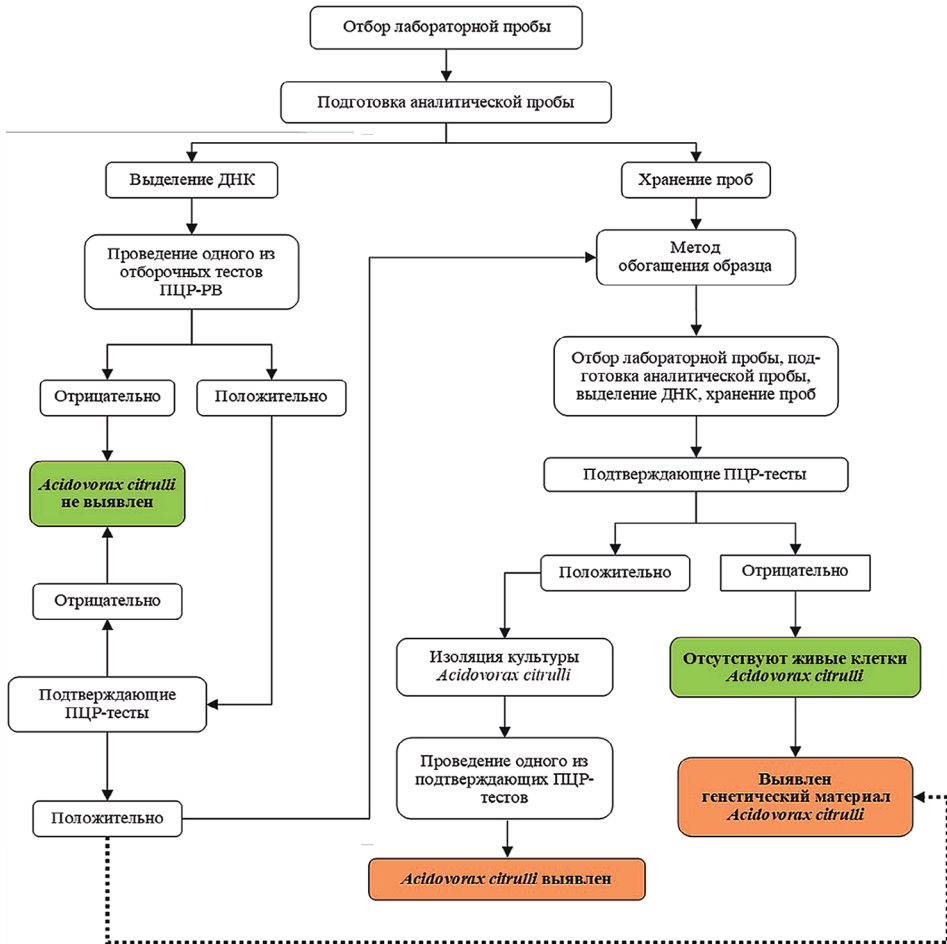


Рис. 2. Схема диагностики *Acidovorax citrulli*

Схема включает в себя последовательное выполнение таких этапов, как отбор лабораторной пробы, подготовка аналитической пробы, выделение ДНК, проведение отборочного теста, а затем, в случае подозрения на наличие *A. citrulli* в образце, – проведение подтверждающего теста, метода обогащения образца и еще одного подтверждающего теста. В случае положительного результата подтверждающего теста схема предполагает использование культурально-морфологического метода с последующей идентификацией отдельных колоний.

Выводы

В ходе исследования успешно подготовлены и протестированы семена с инфекционной нагрузкой. Тестирование проводили вначале стандартным отборочным методом, а затем – ранее не применявшимся в диагностике *A. citrulli* методом

ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P. Новый тест ПЦР-РВ PAS F/R, PAS P показал стабильные результаты при тестировании каждого образца в ряду каждой повторности. Успешно применен ранее не использовавшийся в диагностике *A. citrulli* метод обогащения образца. Использование метода позволило в течение 2,5 сут. отделить образцы, в которых содержится живая целевая бактерия, от тех образцов, в которых присутствовала только ДНК *A. citrulli*. Успешно проведены изоляция и идентификация культуры *A. citrulli* из образцов после обогащения.

На основании данных, полученных в результате исследований, оптимизирована схема выявления и идентификации возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli*. Предлагаемая схема позволит сократить время проведения диагностики опасного карантинного организма с четырех недель до одной.

Библиографический список

1. Bahar O. Bacterial fruit blotch: a threat to the cucurbit industry / O. Bahar, S. Burdman // *Isr. J. Plant Sci.* – 2010. – Vol. 58. – Pp. 19–31.
2. Boykin L.M. Tree lab: Portable genomics for early detection of plant viruses and pests in Sub-Saharan Africa / L.M. Boykin, P. Sseruwagi, T. Alicai, E. Ateka, I.U. Mohammed, J.L. Stanton, C. Kayuki, D. Mark, T. Fute, J. Erasto, H. Bachwenkizi, B. Muga, N. Mumo, J. Mwangi, P. Abidrabo, G. Okao-Okuja G. Omuut, J. Akol, H.B. Apio, F. Osingada, M.A. Kehoe, D. Eccles, A. Savill, S. Lamb, T. Kinene, C.B. Rawle, A. Muralidhar, K. Mayall, F. Tairo, J. Ndunguru // *Genes.* – 2019. – Vol. 10 (9). – № 632. – Pp. 1–13.
3. Choi O. Two genetically distinct groups of *Acidovorax citrulli* are present in watermelon-growing fields in Korea / O. Choi, S.K. Cho, B. Kang, J. Cho, J. Park, Y. Lee, J.J. Kim // *Agric. Life Sci.* – 2016. – Vol. 50. – Pp. 53–59.
4. Giovanardi D. Factors influencing the detection of *Acidovorax citrulli* in naturally contaminated cucurbitaceous seeds by PCR-based assays / D. Giovanardi, S.A. Sutton, E. Stefani, R.R. Walcott // *Seed Sci. Technol.* – 2018. – Vol. 46. – Pp. 93–106.
5. Islam M.R. Development of molecular markers for detection of *Acidovorax citrulli* strains causing bacterial fruit blotch disease in melon / M.R. Islam, M.R. Hossain, H.T. Kim, D.M.I. Jesse M. Abuyusuf, H.J. Jong, J.I. Park, I.S. Nou // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20 (11). – № 2715. – Pp. 1–16.
6. King E.O. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein / E.O. King, M.K. Ward, D.E. Raney // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* – 1954. – Vol. 44. – Pp. 301–307.
7. Lee H. Non-destructive evaluation of bacteria-infected watermelon seeds using visible/near-infrared hyperspectral imaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* – 2017. – Vol. 97 (4). – Pp. 1084–1092.
8. Melo L.A. Comparing *Acidovorax citrulli* strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and genetic diversity. / L.A. Melo, N.D. Tebaldi, A. Mehta, A.S.A. Marques // *Trop. Plant Pathol.* – 2014. – Vol. 39. – Pp. 154–162.
9. Schaad N.W. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax* / N.W. Schaad, W.Y. Song, E. Hatziloukas. US Patent. – 2000. – 6, 146, 834.
10. Song J.Y. Analysis of intraspecific genetic diversity in *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch on cucurbits in Korea / J.Y. Song, M.M. Oo, S.Y. Park, M.W. Seo S.-C. Lee, N.B. Jeon, M.H. Nam, Y.S. Lee, H.G. Kim, S.-K. Oh // *Korean J. Agric. Sci.* – 2018. – Vol. 45. – Pp. 575–582.
11. Song J.Y. Genetic characteristics of *Acidovorax citrulli* population causing bacterial fruit blotch against cucurbits in Korea / J.Y. Song, S.Y. Park, M.W. Seo, M.H. Nam, H.S. Lim, S.-C. Lee, Y.S. Lee, H.G. Kim // *Plant Dis.* – 2015. – Vol. 21. – Pp. 82–88.

12. *Walcott R.R.* Progress towards a commercial PCR-based assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Seed Sci / R.R. Walcott, A.C. Castro, A. Fessehaie, K. Ling // Technol.* – 2006. – Vol. 34. – Pp. 101–116.

13. *Yan L.* Rapid and sensitive detection of *Acidovorax citrulli* in cucurbit seeds by visual loop-mediated isothermal amplification assay / L. Yan, Y. Zhao, J. Zhou, S. Chen, S. Bai, Y. Tian, W. Gong, B. Hu // *Phytopathol.* – 2019. – Vol. 167. – Pp. 10–18.

14. *Yang R.* Complete assembly of the genome of an *Acidovorax citrulli* strain reveals a naturally occurring plasmid in this species / R. Yang, D.S. Garcia, F. Pérez Montaña G.M. Silva, M. Zhao, I. Jiménez Guerrero T. Rosenberg, G. Chen, I. Plaschkes, S. Morin, R. Walcott, S. Burdman // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10, № 1400. – Pp. 1–17.

15. *Каримова Е.В.* Фитопатогенные бактерии *Erwinia amylovora* и *Acidovorax citrulli* и анализ их фитосанитарного риска / Е.В. Каримова, Ю.А. Шнейдер, И.П. Смирнова, Е.Н. Пакина, Т.С. Астраханова // *Проблемы развития АПК региона.* – 2019. – № 4 (40). – С. 71–77.

16. *Лавренчук Л.С.* Микробиология: Практикум / Л.С. Лавренчук, А.А. Ермошин; Под ред. Е.В. Березиной. – Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 2019. – 107 с.

17. *Словарева О.Ю.* Использование методов биоинформатики в создании нового ПЦР-теста для диагностики возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* / О.Ю. Словарева, Е.В. Старикова // *Сборник тезисов докладов 20-й Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева (г. Москва, 27–29 октября 2020 г.).* – М., 2020. – С. 29–30.

APPLICATION OF NEW METHODS FOR DETECTING AND IDENTIFYING *ACIDOVORAX CITRULLI* AND OPTIMIZATION OF THE LABORATORY DIAGNOSTIC SCHEME

O.YU. SLOVAREVA¹, G.N. BONDARENKO^{1,2}, K.P. KORNEV¹, S.I. PRIKHODKO¹

(¹ All-Russian Plant Quarantine Center; ² RUDN University)

*The phytopathogenic bacterium *Acidovorax citrulli* is included in the quarantine lists of many countries, including the unified list of quarantine objects of the Eurasian Economic Union. The control of the introduction and spread of the quarantine organism into the territory of Russia is carried out through laboratory diagnostics. Diagnostic methods should ensure quality and the high speed of product health testing. The study aimed to use new methods for the detection and identification of *A. citrulli* and to optimize the laboratory diagnostic scheme. In the course of the work, cucumber seeds with an infectious load were prepared and tested. Testing was carried out according to an optimized diagnostic scheme using methods not previously used to diagnose *A. citrulli*. At each stage of work with samples, the time spent was recorded. The researchers tested the prepared infected seeds at the first stage using the standard qPCR method and then the qPCR method PAS F/R, PAS P, which had not previously been used to diagnose *A. citrulli*. The new qPCR test PAS F/R, PAS P showed stable results at testing each sample in a row of each replication. The sample enrichment method was successfully applied, not previously used in diagnosing *A. citrulli*. The use of the method made it possible to separate samples containing live target bacteria from those containing only *A. citrulli* DNA within 2.5 days. After enrichment, the isolation and identification of the *A. citrulli* culture from the samples were successfully carried out. Based on the data obtained as a result of this study, the scheme for detecting and identifying the causative agent of bacterial fruit blotch of cucurbits was optimized. The proposed scheme will reduce diagnosing a dangerous quarantine organism from four weeks to one week.*

Key words: plant quarantine, *Acidovorax citrulli*, qPCR test, method of sample enrichment, diagnosis of bacteria

References

1. Bahar O., Burdman S. Bacterial fruit blotch: a threat to the cucurbit industry. *Isr. J. Plant Sci.* 2010; 58: 19–31.
2. 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., Abidra-bo 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; 10 (9), 632: 1–13.
3. Choi O., Cho S.K., Kang B., Cho J., Park J., Lee Y., Kim J. Two genetically distinct groups of *Acidovorax citrulli* are present in watermelon-growing fields in Korea. *J. Agric. Life Sci.* 2016; 50: 53–59.
4. 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 Sci. Technol.* 2018; 46: 93–106.
5. 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; 20 (11), 2715: 1–16.
6. King E.O, Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1954; 44: 301–307.
7. Lee H., Kim M.S., Song Y.R., Oh C.S., Lim H.S., Lee W.H., Kang J.S., Cho B.K. Non-destructive evaluation of bacteria-infected watermelon seeds using visible/near-infrared hyperspectral imaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2017; 97 (4): 1084–1092.
8. Melo L.A., Tebaldi N.D., Mehta A., Marques A.S.A. Comparing *Acidovorax citrulli* strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and genetic diversity. *Trop. Plant Pathol.* 2014; 39: 154–162.
9. Schaad N.W., Song W.Y., Hatziloukas E. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. US Patent. 2000: 6, 146, 834.
10. Song J.Y., Oo M.M., Park S.Y., Seo M.W., Lee S.-C., Jeon N.B., Nam M.H., Lee Y.S., Kim H.G., Oh S.-K. Analysis of intraspecific genetic diversity in *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch on cucurbits in Korea. *Korean J. Agric. Sci.* 2018; 45: 575–582.
11. Song J.Y., Park S.Y., Seo M.W., Nam M.H., Lim H.S., Lee S.-C., Lee Y.S., Kim H.G. Genetic characteristics of *Acidovorax citrulli* population causing bacterial fruit blotch against cucurbits in Korea. *Plant Dis.* 2015; 21: 82–88.
12. Walcott R.R., Castro A.C., Fessehaie A., Ling K. Progress towards a commercial PCR-based assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Seed Sci. Technol.* 2006; 34: 101–116.
13. Yan L., Zhao Y., Zhou J., Chen S., Bai S., Tian Y., Gong W., Hu B. Rapid and sensitive detection of *Acidovorax citrulli* in cucurbit seeds by visual loop-mediated isothermal amplification assay. *Phytopathol.* 2019; 167: 10–18.
14. Yang R., Garcia D.S., Pérez Montaña 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; 10 (1400): 1–17.
15. Karimova E.V., Shneyder Yu.A., Smirnova I.P., Pakina E.N., Astrakhanova T.S. Fitopatogennye bakterii *Erwinia amylovora* i *Acidovorax citrulli* i analiz ikh fitosanitarnogo riska [Phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora* and *Acidovorax citrulli* and analysis of their pest risk]. *Problemy razvitiya APK regiona.* 2019; 4 (40): 71–77. (In Rus.)
16. Lavrenchuk L.S., Ermoshin A.A. Mikrobiologiya: Praktikum [Microbiology: Workshop]. Ekaterinburg: Izd-vo Ural. un-ta. 2019: 107. (In Rus.)

17. *Slovareva O.Yu., Starikova E.V.* Ispol'zovanie metodov bioinformatiki v sozdanii novogo PTRS-testa dlya diagnostiki vozbuditelya bakterial'noy pyatnistosti tykvennykh kul'tur *Acidovorax citrulli* [The creation of a new PCR test for the diagnosis of the causative agent of bacterial fruit blotch of cucurbits *Acidovorax citrulli* using bioinformatics methods]. Sbornik tezisov dokladov 20-y Vserossiyskoy konferentsii molodykh uchenykh, posvyashchennoy pamyati akademika RASKHN Georgiya Sergeevicha Muromtseva, 27–29 oktyabrya 2020. Moscow. 2020: 29–30. (In Rus.)

Словарева Ольга Юрьевна, младший научный сотрудник, ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (140150; Российская Федерация, Московская область, г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д.32; тел.: (903) 281–45–67; e-mail: slovareva.olga@gmail.com).

Бондаренко Галина Николаевна, старший научный сотрудник – начальник Испытательного лабораторного центра, канд. биол. наук, ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (140150, Российская Федерация, Московская область, г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д.32; старший преподаватель АТИ, Российский университет дружбы народов (117198, Российская Федерация, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6; тел.: (915) 044–57–59; e-mail: reseachergm@mail.ru).

Корнев Константин Павлович, заместитель директора, канд. биол. наук, ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (140150, Российская Федерация, Московская область, г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д.32; тел.: (926) 186–67–49; e-mail: konstantin.kornev@gmail.com).

Приходько Светлана Игоревна, научный сотрудник – заведующий лабораторией бактериологии, ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (140150, Российская Федерация, Московская область, г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32; тел.: (916) 719–62–23; e-mail: svetlana.prik@yandex.ru).

Olga Yu. Slovarova, Junior Research Associate, All-Russian Plant Quarantine Center (32 Pogranchnaya Str., settlement Bykovo, Ramenskoye, Moscow region (140150, Russian Federation; phone: (903) 281–45–67; E-mail: slovareva.olga@gmail.com).

Galina N. Bondarenko, PhD (Bio), Senior Research Associate, Head of the Testing Laboratory Center, All-Russian Plant Quarantine Center (32 Pogranchnaya Str., settlement Bykovo, Ramenskoye, Moscow region (140150, Russian Federation); Senior Lecturer at ATI, RUDN University (6 Miklukho-Maklaya Str., Moscow, Russian Federation; phone: (915) 044–57–59; E-mail: reseachergm@mail.ru).

Konstantin P. Kornev, PhD (Bio), Deputy Director, All-Russian Plant Quarantine Center (32 Pogranchnaya Str., settlement Bykovo, Ramenskoye, Moscow region (140150, Russian Federation; phone: (926) 186–67–49; E-mail: konstantin.kornev@gmail.com).

Svetlana I. Prikhodko, Research Associate, Head of the Laboratory of Bacteriology, All-Russian Plant Quarantine Center (32 Pogranchnaya Str., settlement Bykovo, Ramenskoye, Moscow region (140150, Russian Federation; phone: (916) 719–62–23; E-mail: svetlana.prik@yandex.ru).