
ЗЕМЛЕДЕЛИЕ, РАСТЕНИЕВОДСТВО, ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

**Оценка применимости методов ПЦР
для диагностики бактериального рака томата**

Ирина Николаевна Писарева¹✉, Ольга Олеговна Белошапкина²

¹ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), Быково,
Московская область, Россия

²Российский государственный аграрный университет – МСХА
имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

✉ Автор, ответственный за переписку: iruru@yandex.ru

Аннотация

Бактериальный рак томата – вредоносное заболевание, распространенное на культуре томата. Особую вредоносность возбудитель болезни *Clavibacter michiganensis* (Smith; Davis et al.) Li et al. проявляет в защищенном грунте. Быстрое и точное выявление *C. michiganensis* в семенах томата при помощи современных методов диагностики позволит снизить риск распространения заболевания, повысить урожайность и качество продукции. Исследования выполнены в лаборатории научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР» в 2022–2023 гг. Цель исследований – оценка применимости трех ПЦР-тестов, предложенных в международных протоколах для диагностики возбудителя бактериального рака томата. В задачи работы входило определение основных критериев эффективности (аналитическая чувствительность и специфичность, селективность, воспроизводимость, повторяемость) праймерных систем. В работе использовались отечественные реактивы, что позволило снизить затраты и повысить доступность диагностики. ПЦР в соответствии с рекомендациями Sudarshana et al. и Bach et al. обладали высокой аналитической чувствительностью – 10^3 КОЕ/мл, а в соответствии с рекомендациями Oosterhof и Berendsen она составила 10^4 КОЕ/мл. Все праймерные системы показали 100%-ную специфичность без перекрестных реакций с другими штаммами. Селективность не выявлена. Повторяемость и воспроизводимость всех тестов составили 100% на уровне порога чувствительности. В результате оценки применимости трех праймерных систем метод ПЦР по Sudarshana et al. выбран как скрининговый для выявления бактериального рака томата в аналитических пробах из семян и вегетативных частей томата. Остальные ПЦР-тесты рекомендованы как подтверждающие тесты.

Ключевые слова

бактериоз томата, *Clavibacter michiganensis*, семенная инфекция, аналитическая чувствительность, специфичность, селективность, эффективность ПЦР

Благодарности

Исследования выполнены в рамках госзадания (рег. № 122041300071–9).

Для цитирования

Писарева И.Н., Белошапкина О.О. Оценка применимости методов ПЦР-РВ для диагностики бактериального рака томата // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2026. № 2. С. 84–104.

Applicability assessment of PCR methods for the diagnosis of bacterial canker in tomato

Irina N. Pisareva¹✉, Olga O. Beloshapkina²

¹All-Russian Plant Quarantine Center, Bykovo, Moscow Region, Russia

²Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
Moscow, Russia

✉Corresponding author: iruru@yandex.ru

Abstract

Bacterial canker of tomato is a harmful disease widespread in tomato crops. The pathogen *Clavibacter michiganensis* (Smith; Davis et al.) Li et al. exhibits particular virulence in protected ground conditions. Rapid and accurate detection of *C. michiganensis* in tomato seeds using modern diagnostic methods can help reduce the risk of disease spread and improve crop yield and product quality. The study was conducted at the Laboratory of the Research and Methodology Department of Bacteriology, All-Russian Plant Quarantine Center, in 2022–2023. The study aimed to assess the applicability of three PCR tests proposed in international protocols for diagnosing the bacterial canker in tomato. The objectives included determining the key performance criteria of primer systems: analytical sensitivity and specificity, selectivity, reproducibility, and repeatability. Domestic reagents were used in the study, which helped reduce costs and increase the accessibility of diagnostics. According to the protocols by Sudarshana et al. and Bach et al. the PCR tests demonstrated high analytical sensitivity of 10^3 CFU/mL, while according to the protocol by Oosterhof and Berendsen sensitivity was 10^4 CFU/mL. All primer systems demonstrated 100% specificity, with no cross-reactions observed with other strains. No selectivity was detected. The repeatability and reproducibility of all tests reached 100% at the sensitivity threshold level. Based on the assessment of the three primer systems, the PCR method described by Sudarshana et al. was selected as a screening tool for detecting bacterial tomato canker in analytical samples from seeds and vegetative parts of the plant. The remaining PCR tests are recommended as confirmatory assays.

Keywords

tomato bacteriosis, *Clavibacter michiganensis*, seed infection, analytical sensitivity, specificity, selectivity, PCR efficiency

Acknowledgments

The research was carried out within the framework of the state assignment (Reg. No. 122041300071–9).

For citation

Pisareva I.N., Beloshapkina O.O. Applicability assessment of PCR methods for the diagnosis of bacterial canker in tomato. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2026;(2):84–104.

Введение Introduction

Томат – одна из наиболее важных овощных культур в мире благодаря своим питательным свойствам, универсальности и экономической значимости. Плоды томата богаты такими минералами, как калий и магний, витаминами, особенно С и А, а также фитохимическими соединениями включая ликопин – мощный антиоксидант,

связанный со снижением риска развития некоторых видов рака и сердечно-сосудистых заболеваний у людей [1, 2].

Томат является объектом селекционных программ, посвященных устойчивости к болезням, повышению урожайности и улучшению качества плодов. Благодаря своей адаптивности к различным климатическим условиям эта культура занимает важное место в аграрном секторе многих стран, обеспечивая продовольственную безопасность и доходы фермеров [3, 4].

Clavibacter michiganensis (Smith; Davis et al.) Li et al. – возбудитель бактериального рака томата. Эта болезнь бактериальной этиологии, которая особую вредоносность проявляет в защищенном грунте [5]. В Российской Федерации *C. michiganensis* встречается во всех регионах выращивания томата. Бактериальный рак томата широко распространен по всему миру и наносит значительный ущерб сельскому хозяйству: потери урожая могут достигать до 93% за счет гибели растений, а средний вес плодов снижается до 50% [6, 7].

История открытия и таксономических изменений возбудителя бактериального рака томата началась с 1910 г. Впервые эта бактерия была обнаружена в США, в штате Мичиган, получив название *Bacterium michiganense* Smith. В 1934 г. было отмечено сходство возбудителя бактериального рака томата с коринебактериями, в связи с чем его переименовали в *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen. В последующие десятилетия, в 1977 г., в классификацию коринебактерий-фитопатогенов были введены патологические типы – патовары, и бактерия получила название *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (Smith) Dye & Kemp. По прошествии нескольких лет таксономический статус возбудителя бактериального рака вновь был пересмотрен: его классификация была изменена с уровня патовар на уровень подвид, и он получил название *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* Carlson и Vidaver. Основываясь на фенотипических признаках, в 1984 г. ученые предложили перевести подвиды *C. michiganense* в род *Clavibacter*. Ввиду этого возбудитель бактериального рака томата получил наименование *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* Davis et al. В 1996 г., в соответствии с правилами номенклатуры бактериальной таксономии, название было скорректировано на *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Young et al. На основании молекулярно-генетических исследований в 2018 г. была проведена реклассификация, и подвид *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* был повышен до уровня вида *C. michiganensis* (Smith; Davis et al.) Li et al. [8, 9].

C. michiganensis – это грамположительная бактерия, способная через естественные отверстия, раны или через зараженные семена проникать и колонизировать растения томата. Попав внутрь растения, фитопатоген размножается в сосудах ксилемы, образует биопленкоподобные структуры [10].

Особенностью, которая более века способствует широкому распространению *Clavibacter michiganensis* во всем мире, является его способность передаваться с семенами и долгое время находиться в латентном состоянии в рассаде томата [11, 12]. При этом *C. michiganensis* не только колонизирует поверхность семян, но и проникает под семенную оболочку, приводя впоследствии к системному заражению растений [13].

С середины XX в. интенсификация международной торговли семенами томата привела к распространению *C. michiganensis* как внутри континентов, так и между ними [14].

Основным растением-хозяином является томат (*Solanum lycopersicum*). Реже поражаются другие растения семейства Solanaceae: картофель (*Solanum tuberosum*), болгарский перец (*Capsicum annuum*), баклажан (*Solanum dulcamara*), а также некоторые сорные растения рода *Solanum*: паслен черный (*Solanum nigrum*), паслен Дугласа (*Solanum douglasii*) и паслен трехцветковый (*Solanum trifolium*). Было обнаружено, что резервуарами могут быть дурман обыкновенный (*Datura stramonium*), марь белая (*Chenopodium album*) и амарант запрокинутый (*Amaranthus retroflexus*) [14].

В результате обследования посадок томата открытого и защищенного грунта, проведенного в 2024 г., возбудитель бактериального рака томата *S. michiganensis* был выявлен в Астраханской, Волгоградской и Ростовской областях – в 29, 63 и 33% отобранных образцов соответственно [15].

Симптомы заболевания достаточно разнообразны. Они включают в себя хлоротичность, некроз краев и скручивание листовых пластинок (рис. 1а), замедление роста, продольные некрозы и язвы на стеблях, растрескивание стебля (рис. 1б), изменение окраски сосудов, увядание и появление пятен на созревающих плодах, что снижает качество плодов и урожайность растений, а при сильном заражении приводит к их гибели [12, 16-18].

Коммерческих сортов и гибридов томата, абсолютно устойчивых к *S. michiganensis*, не существует, но они отличаются по восприимчивости. Борьба с бактериальным раком томата заключается в основном в соблюдении рекомендуемой агротехники с обязательным уничтожением растительных остатков и других профилактических мероприятий, а также в обработке семян и зараженных растений различными препаратами, разрешенными в стране-производителе данной овощной продукции [18, 19]. Но самым главным условием предупреждения болезни является своевременное обнаружение фитопатогенных бактерий в семенах и выбраковка их, то есть устранение основного источника первичной инфекции, и использование здоровых семян и рассады [16, 20]. Согласно данным [21] при уровне зараженности 10^3 КОЕ на 1 г семян происходит поражение около 4% растений. Таким образом, необходимо использование методов выявления *S. michiganensis* с высокой аналитической чувствительностью (АЧ). Как правило, АЧ ПЦР-методов диагностики бактериальных фитопатогенов находится на уровне 10^2 - 10^3 КОЕ/мл.



Рис. 1. Симптомы бактериального рака томата:
а – хлороз, некроз и скручивание краев листовых пластинок (Астраханская область);
б – некроз и растрескивание стебля (Волгоградская область)

Figure 1. Symptoms of bacterial canker in tomato:
а – chlorosis, necrosis, and curling of leaf blade edges (Astrakhan Region),
б – necrosis and cracking of the stem (Volgograd Region)

В международной практике золотым стандартом обнаружения в семенном материале *C. michiganensis* является сочетание ПЦР-анализа и изоляция чистой культуры на питательные среды [14, 22]. Однако изоляция в последнее десятилетие признана малоэффективной ввиду способности *C. michiganensis* находиться в жизнеспособном, но не культивируемом состоянии. Таким образом, для диагностики *C. michiganensis* предпочтительны быстрые методы (такие, как ПЦР-тесты), поскольку их можно применять без предварительного культивирования штаммов [16].

Для проведения эффективной диагностики *C. michiganensis* необходима гармонизация методов с международными и региональными диагностическими протоколами. Поэтому в исследованиях мы выполнили оценку применимости трех ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени), рекомендованных международными организациями.

Международной федерацией по семеноводству (ISF) разработан протокол испытаний, включающий в себя процедуры выявления и идентификации возбудителя бактериального рака томата в семенном материале. В данном протоколе рекомендуются ПЦР-РВ в соответствии с разработками Oosterhof и Berendsen (2011) и ПЦР-РВ по Sudarshana et al. (2012) [22].

ПЦР-РВ по Oosterhof и Berendsen (2011) разработана на основе последовательности участка гена, кодирующего двухкомпонентную системную сенсорную киназу (PTSSK). Авторы отмечают высокую аналитическую чувствительность данного метода – 2×10^3 КОЕ/мл. При этой методике отмечено отсутствие как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов. Данную ПЦР-РВ также рекомендует использовать Европейская и Средиземноморская организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) [14].

Sudarshana et al. разработали ПЦР-РВ с праймерами MVS21F_R, подобранными для амплификации фрагмента *recA* – гена, кодирующего фермент, участвующий в процессах рекомбинации и репарации ДНК. Этот ген выбран в связи с более высокой вариабельностью по сравнению с 16S рРНК, что позволяет отличать *C. michiganensis* от других близкородственных бактерий, таким образом повышая специфичность теста [22].

В лабораторном руководстве по идентификации фитопатогенных бактерий для идентификации *C. michiganensis* предложена ПЦР-РВ в соответствии с Bach et al. Авторы разработали тест-системы для количественной оценки и дифференциации фитопатогенных видов рода *Clavibacter*. Праймеры FP_Cm/RP_Cm подобраны для участка межгенной последовательности оперона рРНК (ITS), общего для всех видов, перечисленных ниже: *C. sepedonicus*, *C. michiganensis*, *C. tessellarius*, *C. nebraskensis*, *C. insidiosus*. Специфичность метода достигается за счет зондов, разработанных для каждого патогенного вида рода *Clavibacter*. Авторами отмечена высокая специфичность тест-систем, однако информация об аналитической чувствительности отсутствует [23].

Цель исследований: оценка применимости трех ПЦР-РВ, предложенных в международных протоколах для диагностики возбудителя бактериального рака томата.

Методика исследований

Research method

Объектом исследований являлся возбудитель бактериального рака томата *C. michiganensis*.

Бактериальные штаммы. В работе использовали 4 штамма *C. michiganensis*: 0239 ВНИИКР (CFBR 2492), 0496 ВНИИКР, 0497 ВНИИКР, 0498 ВНИИКР)

и 41 штамм других видов бактерий из зарубежных коллекций: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* DSM30168, *Pectobacterium atrosepticum* DSM18077, *Xanthomonas campestris* pv. *raphanin* NCPPB1946, *Erwinia amylovora* CFBP1430, *Xanthomonas oryzae* NCPPB3002, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* NCPPB2137, *Xanthomonas translucens* DSM 18974, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* DSM 19128, *Xanthomonas vesicatoria* DSM 22252, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* DSM 18975, *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* DSM 19127, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* CFBP 2286, *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* CFBP 6107, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* CFBP 3418, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii* CFBP 1384, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* CFBP 2403, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* CFBP 1390, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* CFBP 2214, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* CFBP 2534, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* CFBP 2405, *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* CFBP 6369, *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis* CFBP 5141, *Ralstonia syzigii* CFBP 7288, *Ralstonia pseudosolanacearum* CFBP 6442, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* CFBP 2216, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* CFBP 1657, *Acidovorax avenae* CFBP 2425, *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* CFBP 3614, *Pantoea ananatis* pv. *ananatis* CFBP 3612, *Xanthomonas hyacinthi* CFBP 1156, *Paraburkholderia caryophylli* CFBP 1370, *Paraburkholderia andropogonis* CFBP 2421, *Pantoea agglomerans* DSM 8570, *Pantoea vagans* DSM 23078, *Paraburkholderia glumae* DSM 9512, *Pantoea ananatis* DSM 30080, *Rathayibacter tritici* DSM 7486, *Agrobacterium rubi* DSM 6772, *Xanthomonas citri* pv. *glycines* CFBP 2526, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* CFBP 2212, *Pseudomonas corrugate* CFBP 2431.

Определение аналитической чувствительности и специфичности ПЦР и выделение ДНК проводили по методике, описанной в статье «Определение аналитической чувствительности и специфичности методов ПЦР для диагностики черной бактериальной пятнистости томата» [5].

Определение эффективности ПЦР-РВ тестов. Эффективность ПЦР-РВ рассчитывали по формуле:

$$E = 10^{1/a},$$

где a – угловой коэффициент (slope).

Эффективность реакции выражали в процентах и считали приемлемой в диапазоне от 90 до 110% [24].

Определение селективности. Для оценки селективности ПЦР-тестов подготовили образцы экстрактов из вегетативных частей и семян томата. Затем экстракты искусственно заражали *S. michiganensis* (концентрация в данных образцах составляла от 10^5 до 10^3 КОЕ/мл). Каждый вариант готовили в трех повторностях. Также была приготовлена серия субстратов без содержания возбудителей болезней (отрицательный контроль).

Определение повторяемости. Для оценки повторяемости готовили образцы с концентрацией фитопатогенов на уровне аналитической чувствительности в 6 повторностях. Образцы исследовал один специалист, на одном оборудовании в течение одного рабочего дня.

Определение воспроизводимости. Для определения воспроизводимости готовили экстракты семян томата с низким и средним уровнем зараженности в шестикратной повторности. Исследование образцов проводили 3 специалиста на различном оборудовании в разное время.

Для удобства интерпретации результатов и контроля эффективности амплификации использовали следующий контроль ПЦР: K+ – положительный контрольный образец – ДНК целевого объекта; K-в (отрицательный контроль выделения) – стерильный

фосфатно-солевой раствор (PBS), используемый для подготовки аналитической пробы; К-ч (отрицательный контроль амплификации, или контроль чистой зоны) – ультрачистая вода.

ПЦР-РВ, использованные в работе:

- 1) по Oosterhof & Berendsen (2011);
- 2) по Sudarshana et al. (2012);
- 3) по Bach et al. (2003).

Последовательности олигонуклеотидов, использованные в работе, указаны в таблице 1.

В таблице 2 приводятся составы используемых реакционных смесей и условия амплификации.

Тестирование ПЦР-РВ проводили с использованием двух готовых смесей для ПЦР: 5x qPCRMix-HS (ООО «Евроген») и 5x Max^{CFE} TaqMix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.»).

Амплификацию и детекцию результатов проводили на термоциклере CFX96 («Bio-Rad», США). Для определения повторяемости и воспроизводимости дополнительно использовали амплификаторы детектирующие ДТпрайм и ДТлайт («ДНК-Технология», Россия).

Статистический анализ. Для оценки эффективности ПЦР-РВ был выполнен расчет среднего значения пороговых циклов (Ct) для различных разведений ДНК. Анализ данных проводился с использованием метода регрессионного анализа в программе MS Office Excel 2016. Для оценки качества уравнения регрессии рассчитывали коэффициент детерминации (R²), при этом значения R² выше 0,99 считались статистически значимыми.

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидов, использованные в работе

Table 1

Oligonucleotide sequences used in the study

Название	Последовательность олигонуклеотидов	Автор
RZ_ptssk 10	GGGGCCGAAGGTGCTG GTG	Oosterhof & Berendsen (2011)
RZ_ptssk 11	CGTCGCCCCCCCCGCTG	
Probe RZ_ptssk 12	TGGTCGTCCTCGGCG – BHQ1	
MVS21 F	CTAGTTGCTGAATCCACCCAG	Sudarshana et al. (2012)
MVS21 R	TACCGCTTGACTCTCGTTTC	
MVS21 P	CTGCCACCCGATGTTGTTGTTCC-BHQ1	
FP_Cm	TGTCGAGGGCATGTTGCACG	Bach et al. (2003)
RP_Cm	GGAGACAGAATTGACCAATGAT	
Cmm Probe 6FAM	TTCCGTCGTCCTGTTGTGGATG – BHQ1	

Составы реакционных смесей и условия амплификации

Reaction mixture compositions and amplification conditions

Компоненты	Объем (V), мкл		Рабочая концентрация	Условия амплификации	
	1*	2*		1*	2*
Ультрочистая вода	16,5	12,0	–	10 мин при 95°C; 45 циклов: 15 сек. при 95°C, 30 сек. при 60°C	10 мин при 95°C; 45 циклов: 20 сек. при 95°C, 1 мин при 66°C
5x ПЦР-буфер	5,0	5,0	1x		
Прямой праймер	0,5	1,0	10 pM/μl		
Обратный праймер	0,5	1,0	10 pM/μl		
Зонд	0,5	1,0	5 pM/μl		
ДНК образца	2,0	5,0	–		
Объем реакции	25,0	25,0	–		

*1 – для ПЦР в соответствии с Oosterhof & Berendsen и Sudarshana et al.; 2 – для ПЦР согласно Bach et al.

Результаты и их обсуждение

Results and discussion

Все методы, применяемые в повседневной лабораторной диагностике, характеризуются показателем аналитической чувствительности (АЧ), который определяет минимальное количество возбудителя, способное быть обнаруженным в исследуемой матрице. Для систем ПЦР допустимый порог обнаружения бактериальных фитопатогенов находится на уровне 10^2 - 10^3 КОЕ/мл. [25-27].

В таблицах 3-5 представлены результаты определения АЧ ПЦР-РВ, рекомендованных для диагностики *C. michiganensis*.

На основании полученных данных аналитическая чувствительность метода ПЦР-РВ по рекомендациям Oosterhof и Berendsen (2011) составила 10^4 КОЕ/мл. Такой уровень чувствительности подходит для подтверждения наличия *C. michiganensis* в образцах с высокой концентрацией патогена и для идентификации чистых культур. Однако данный тест не рекомендуется использовать в качестве скринингового метода для обнаружения *C. michiganensis* в аналитических пробах. Также стоит отметить, что при использовании обеих ПЦР-смесей порог чувствительности находился на одинаковом уровне.

Аналитическая чувствительность ПЦР-РВ для выявления *C. michiganensis* по Oosterhof & Berendsen, 2011

Table 3

Analytical sensitivity of the qPCR for detecting *C. michiganensis* according to Oosterhof & Berendsen, 2011

Концентрация КОЕ/мл	ПЦР-смеси/повторности (Ct)							
	5xqPCRmix-HS				5xMas ^{CFE} TaqMix-2025			
	1	2	3	Ct _{cp} / SD'	1	2	3	Ct _{cp} / SD'
10 ⁷	25,07	25,84	25,45	25,45 ±0,39	28,02	28,53	28,23	28,26 ±0,26
10 ⁶	28,76	28,18	28,53	28,49 ±0,29	31,44	32,09	31,71	31,75 ±0,33
10 ⁵	32,18	31,61	31,82	31,87 ±0,29	34,95	34,59	34,63	34,72 ±0,20
10 ⁴	35,71	38,53	36,02	36,75 ±1,54	38,17	39,06	38,27	38,50 ±0,49
10 ³	–	–	–	x	–	–	–	x
10 ²	–	–	–	x	–	–	–	x
10 ¹	–	–	–	x	–	–	–	x
10 ⁰	–	–	–	x	–	–	–	x
К+	+			x	+			x
К-в	–			x	–			x
К-ч	–			x	–			x

*SD – Standard Deviation (стандартное отклонение).

АЧ метода ПЦР-РВ по Sudarshana et al. (2012) составила 10³ КОЕ/мл, что на порядок выше чувствительности предыдущего теста. Использование разных ПЦР-смесей не повлияло на порог чувствительности теста. Эту праймерную систему можно рекомендовать как скрининговый метод при работе с аналитическими пробами томата.

Аналитическая чувствительность ПЦР-РВ для выявления *C. michiganensis* по Sudarshana et al., 2012

Table 4

Analytical sensitivity of the qPCR for detecting *C. michiganensis* according to Sudarshana et al., 2012

Концентрация КОЕ/мл	ПЦР-смеси/повторности (Ct)							
	5xqPCRmix-HS				5xMas ^{CFE} TaqMix-2025			
	1	2	3	Ct _{cp} /SD'	1	2	3	Ct _{cp} /SD'
10 ⁷	24,08	24,49	24,33	24,30 ±0,21	27,34	26,81	27,03	27,06 ±0,27
10 ⁶	27,98	27,57	27,64	27,73 ±0,22	29,97	30,07	30,05	30,03 ±0,05
10 ⁵	31,05	30,90	31,02	30,99 ±0,08	33,13	33,24	33,07	33,15 ±0,09
10 ⁴	34,49	34,31	34,35	34,38 ±0,09	36,63	36,68	36,51	36,61 ±0,09
10 ³	40,73	37,87	38,02	38,87 ±1,61	40,66	41,30	40,98	40,98 ±0,32
10 ²	–	–	–	x	–	–	–	x
10 ¹	–	–	–	x	–	–	–	x
10 ⁰	–	–	–	x	–	–	–	x
К+	+			x	+			x
К-в	–			x	–			x
К-ч	–			x	–			x

Чувствительность метода ПЦР-РВ по Bach et al. (2003) составила 10³ КОЕ/мл. Однако стоит отметить, что применение ПЦР-РВ по Bach et al. целесообразно только при использовании готовой смеси для ПЦР 5xMas^{CFE} TaqMix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.»). При применении другой готовой смеси для ПЦР 5xqPCRmix-HS 100% чувствительность теста отмечена при более высокой концентрации бактерий 10⁶ КОЕ/мл. Поэтому данный тест можно рекомендовать как подтверждающий выявление *C. michiganensis*.

Аналитическая чувствительность ПЦР-РВ для выявления *C. michiganensis* по Bach et al., 2003

Table 5

Analytical sensitivity of the qPCR for detecting *C. michiganensis* according to Bach et al., 2003

Концентрация КОЕ/мл	ПЦР-смеси/повторности (Ct)							
	5xqPCRMix-HS				5xMas ^{CFE} TaqMix-2025			
	1	2	3	Ct _{cp} /SD'	1	2	3	Ct _{cp} /SD'
10 ⁷	27,91	28,01	27,98	27,97 ±0,05	25,01	24,68	24,73	24,81 ±0,18
10 ⁶	31,89	30,81	31,52	31,41 ±0,55	28,11	28,36	28,27	28,25 ±0,13
10 ⁵	33,95	–	33,27	x	31,04	31,53	31,34	31,30 ±0,25
10 ⁴	–	–	–	x	34,93	34,22	34,47	34,54 ±0,36
10 ³	–	–	–	x	37,31	38,17	37,67	37,72 ±0,43
10 ²	–	–	–	x	–	–	–	x
10 ¹	–	–	–	x	–	–	–	x
10 ⁰	–	–	–	x	–	–	–	x
К+	+			x	+			x
К-в	–			x	–			x
К-ч	–			x	–			x

В исследованиях мы оценивали эффективность ПЦР при использовании двух готовых смесей для ПЦР: 5x qPCRMix-HS (ООО «Евроген») и 5x Mas^{CFE} TaqMix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.»). Оценка этого показателя позволяет существенно повысить правильность интерпретации результатов ПЦР-РВ [21]. Определяли эффективность для всех комбинаций, кроме ПЦР-РВ, по Bach et al. с использованием готовой смеси для ПЦР 5xqPCRMix-HS ввиду ее низкой чувствительности (табл. 5). Результаты определения эффективности амплификации ДНК, тестируемых праймерных систем представлены в таблице 6.

Результаты определения эффективности амплификации тестов ПЦР-РВ

Table 6

Results of amplification efficiency assessment for the qPCR tests

Показа-тели	по Oosterhof & Berendsen		по Sudarshana et al.		по Bach et al.	
	1'	2'	1'	2'	1'	2'
a	3,728	3,369	3,579	3,442	–	3,211
1/a	0,268	0,297	0,279	0,291	–	0,311
$10^{(1/a)}$	1,855	1,981	1,903	1,952	–	2,048
$[10^{(1/a)}]-1$	0,855	0,981	0,903	0,952	–	1,048
%	85,46	98,07	90,29	95,22	–	104,85
R ²	0,987	0,9981	0,9959	0,9936	–	0,9997

*ПЦР-смеси: 1-5xqPCRmix-HS; 2-5xMas^{CFE} TaqMix-2025.

На рисунке 2 представлен график зависимости значений пороговых циклов (Ct) от концентрации ДНК *C. michiganensis* в 4-х разведениях при постановке ПЦР-РВ по Oosterhof & Berendsen с использованием ПЦР-смеси 5xMas^{CFE} TaqMix-2025.

Анализ эффективности методов ПЦР показал, что ПЦР-РВ по Oosterhof & Berendsen можно рекомендовать с использованием 5xMas^{CFE} TaqMix-2025, так как эффективность с этой смесью была стабильно выше 90%. При постановке ПЦР-РВ по Sudarshana et al. эффективность была выше 90% при использовании обеих готовых смесей для ПЦР. ПЦР-РВ по Bach et al. можно рекомендовать только с использованием готовой смеси 5xMas^{CFE} TaqMix-2025 (эффективность – более 104%).

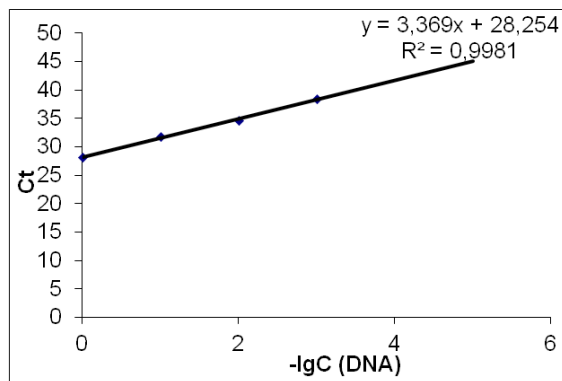


Рис. 2. График линейной регрессии распределения значений порогового цикла (Ct) в зависимости от концентрации ДНК в 4-х разведениях с праймерами и зондом RZ_ptssk 10_11_12

Figure 2. Linear regression plot of threshold cycle (Ct) values depending on DNA concentration in four dilutions with primers and probe RZ_ptssk 10_11_12

Также важным параметром молекулярно-генетических методов является специфичность, которая характеризует способность праймерной системы точно отличать целевой организм от нецелевых даже при их совместном наличии в исследуемой пробе. В таблице 7 представлены результаты оценки этой характеристики для протестированных методов.

В ходе исследований было установлено, что все праймерные системы обеспечивали 100%-ную специфичность к целевым штаммам бактерий. При этом не было обнаружено перекрестных реакций с другими штаммами.

Определение селективности является необходимым для установления влияния субстрата (матрицы) на эффективность ПЦР-теста.

В таблице 8 представлены результаты исследования селективности 3 методов выявления возбудителя бактериального рака томата.

Согласно полученным данным все тесты различали целевую ДНК патогена на уровне АЧ. Влияние субстрата (матрицы) на чувствительность ПЦР не выявлено.

Результаты исследований повторяемости и воспроизводимости ПЦР-тестов для выявления бактериального рака томата приведены в таблице 9.

Таблица 7

Специфичность ПЦР-РВ для выявления *C. michiganensis*

Table 7

Specificity of the qPCR for detecting *C. michiganensis*

Номер штамма*	ПЦР-тесты/результат/ значение Ct		
	по Oosterhof & Berendsen, 2011	по Sudarshana et al., 2012	по Bach et al., 2003
0239	+ (27,76)	+ (24,55)	+ (30,11)
0240	+ (28,13)	+ (24,83)	+ (32,58)
0496	+ (27,37)	+ (24,37)	+ (33,76)
0497	+ (28,14)	+ (24,17)	+ (32,79)
0498	+ (27,61)	+ (24,41)	+ (31,28)
К-в	–	–	–
К-ч	–	–	–

*В таблице указаны номера штаммов, для которых результаты ПЦР оказались положительными.

Селективность методов ПЦР для выявления бактериального рака томата

Table 8

Selectivity of PCR methods for detecting bacterial canker in tomato

ПЦР-тесты	Концентрация КОЕ/мл	Субстрат/повторности					
		экстракт семян томата			экстракт вегетативных частей томата		
		1	2	3	1	2	3
по Oosterhof & Berendsen, 2011	10 ⁵	32,20	31,96	32,02	32,27	32,18	32,64
	10 ⁴	35,86	36,03	36,17	35,97	35,48	36,14
	К-в	–			–		
	К-ч	–			–		
по Sudarshana et al., 2012	10 ⁴	34,54	34,47	34,73	34,58	34,76	34,62
	10 ³	37,92	38,03	38,17	38,26	38,37	38,04
	К-в	–			–		
	К-ч	–			–		
по Bach et al., 2003	10 ⁴	34,98	34,54	34,68	34,47	34,92	34,43
	10 ³	37,43	38,16	38,25	37,93	37,86	37,72
	К-в	–			–		
	К-ч	–			–		

При анализе результатов испытания ПЦР-тестов, проведенных одним специалистом, установлено, что повторяемость на уровне АЧ составила 100% для всех тестов ПЦР. При оценке результатов исследований, полученных тремя специалистами, отмечено, что воспроизводимость также составила 100% для всех методов.

**Повторяемость и воспроизводимость методов ПЦР
для выявления бактериального рака томата**

Table 9

**Repeatability and reproducibility of PCR methods
for detecting bacterial canker in tomato**

ПЦР-тесты	Повторности	1 специалист		2 специалист		3 специалист	
		Концентрация, КОЕ/мл					
		10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴
по Oosterhof & Berendsen, 2011	1	31,98	35,17	32,18	35,98	32,12	36,16
	2	32,14	36,56	32,35	36,76	32,23	36,78
	3	32,02	36,34	32,50	36,73	32,40	36,93
	4	32,27	36,49	32,88	36,04	32,47	36,56
	5	32,33	35,92	32,37	36,12	32,33	36,02
	6	32,04	36,36	32,12	35,85	32,76	36,06
	К-в	-		-		-	
	К-ч	-		-		-	
по Sudarshana et al., 2012	Повторности	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³
	1	34,36	37,52	33,68	37,94	33,56	37,05
	2	34,04	38,75	33,97	38,02	33,73	26,97
	3	34,15	38,46	34,15	37,87	33,98	37,82
	4	34,34	37,57	33,89	38,54	34,06	37,02
	5	34,07	37,27	34,78	37,77	34,12	37,69
	6	34,02	37,78	34,06	37,97	34,13	36,93
	К-в	-		-		-	
	К-ч	-		-		-	

ПЦР-тесты	Повторности	1 специалист		2 специалист		3 специалист	
		Концентрация, КОЕ/мл					
		10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴
по Bach et al., 2003	Повторности	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³
	1	34,03	37,22	34,18	38,33	34,55	37,76
	2	33,98	38,17	34,38	37,47	33,73	37,57
	3	34,16	38,08	34,27	38,29	33,78	37,84
	4	34,09	38,19	34,36	38,52	34,52	37,68
	5	34,14	37,27	34,34	38,37	34,48	37,77
	6	34,26	38,35	34,39	38,43	33,79	37,79
	К-в	–		–		–	
	К-ч	–		–		–	

Выводы Conclusions

1. Выявлено, что при обнаружении *C. michiganensis* методом ПЦР в реальном времени по рекомендациям Sudarshana et al. и Bach et al. наблюдается высокая аналитическая чувствительность – 10³ КОЕ/мл. Однако для использования ПЦР-РВ по Bach et al. требуется применение готовой реакционной смеси 5xMasCFE Taq-Mix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.»). АЧ ПЦР-РВ в соответствии с Oosterhof & Berendsen составила 10⁴ КОЕ/мл.

2. Оценка показателей эффективности метода ПЦР-РВ показала, что использование готовой смеси для ПЦР 5xMas^{CFE} TaqMix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.»), значительно повышало эффективность ПЦР, показатели которой для праймерных систем по Oosterhof & Berendsen, Sudarshana et al. и по Bach et al. составили 98,07; 95,22; 104,85% соответственно.

3. Обнаружено, что все праймерные системы обеспечивали полную специфичность к целевым штаммам патогена. При этом не было зарегистрировано перекрестных реакций с другими штаммами, применявшимися в исследованиях.

4. В процессе оценки селективности было выявлено, что все тесты различали целевую ДНК *C. michiganensis* на уровне АЧ. Таким образом, установлено отсутствие влияния субстрата (матрицы) на чувствительность ПЦР.

5. Повторяемость и воспроизводимость всех тестов составили 100% на уровне порога чувствительности.

6. В результате оценки применимости 3 тестов ПЦР-РВ с отечественными реагентами ПЦР в соответствии с Sudarshana et al. рекомендован как скрининговый метод для выявления возбудителя бактериального рака томата *C. michiganensis* в аналитических пробах из семян и вегетативных частей томата. Остальные ПЦР-РВ рекомендованы как подтверждающие выявление *C. michiganensis* тесты.

Список источников

1. Chaudhary P., Sharma A., Singh B., Nagpal A.K. Bioactivities of phytochemicals present in tomato. *Journal of Food Science and Technology*. 2018;55(8):2833-2849. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3221-z>
2. Wang C., Li M., Duan X., Abu-Izneid T. et al. Phytochemical and nutritional profiling of tomatoes; impact of processing on bioavailability- a comprehensive review. *Food Reviews International*. 2023;39(8):5986-6010. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2097692>
3. Ajaharuddin S.K.M.D., Lal M., Yadav A., Kumar N. et al. Breeding for resistance against pest and diseases in tomatoes: A review. *Journal of Scientific Research and Reports*. 2024;30(6):469-479. <https://doi.org/10.9734/jsrr/2024/v30i62063>
4. Chaudhary J., Khatri P., Singla P., Kumawat S. et al. Advances in omics approaches for abiotic stress tolerance in tomato. *Biology*. 2019;8(4):90-108. <https://doi.org/10.3390/biology8040090>
5. Белошапкина О.О., Писарева И.Н. Определение аналитической чувствительности и специфичности методов ПЦР для диагностики черной бактериальной пятнистости томата // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2024. № 3. С. 78–94. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2024-3-78-94>
6. Игнатов А.Н., Челидзе Г.Г., Воробьева К.С. Риски распространения в РФ новых вирусных и бактериальных болезней овощных культур через предприятия защищенного грунта // *Картофель и овощи*. 2019. № 4. С. 18–21. <https://doi.org/10.25630/PAV.2019.84.71.002>
7. Osdaghi E., Abachi H., Jacques M.A. *Clavibacter michiganensis* Reframed: The Story of How the Genomics Era Made a New Face for an Old Enemy. *Molecular Plant Pathology*. 2025;26:e70093. <https://doi.org/10.1111/mpp.70093>
8. Li X., Tambong J., Yuan K., Chen W. et al. Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018;68(1):234-240. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002492>
9. Osdaghi E., Abachi H., Jacques M.A. *Clavibacter michiganensis* Reframed: The Story of How the Genomics Era Made a New Face for an Old Enemy. *Molecular Plant Pathology*. 2025;26(5):e70093. <https://doi.org/10.1111/mpp.70093>
10. Morcia C., Piazza I., Ghizzoni R., Terzi V. et al. Molecular diagnostics in tomato: Chip digital PCR assays targeted to identify and quantify *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* in planta. *Horticulturae*. 2023;9(5):553-565. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050553>
11. Tripathi R., Vishunavat K., Tewari R. Morphological and molecular characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causing bacterial canker in tomatoes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2022;119:101833. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2022.101833>
12. Verma R.K., Roman-Reyna V., Raanan H., Coaker G. et al. Allelic variations in the *chpG* effector gene within *Clavibacter michiganensis* populations

- determine pathogen host range. *PLoS Pathogens*. 2024;20(7): e1012380. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012380>
13. Solano-Alvarez N., Valencia-Hernandez J.A., Rico-Garcia E., Torres-Pacheco I. et al. A novel isolate of *Bacillus cereus* promotes growth in tomato and inhibits *Clavibacter michiganensis* infection under greenhouse conditions. *Plants*. 2021;10(3):506. <https://doi.org/10.3390/plants10030506>
14. EPPO. PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPPO Bulletin*. 2016;46(2):202-225. <https://doi.org/10.1111/epp.12302>
15. Писарева И.Н., Белошапкина О.О., Селявкин С.Н., Шнейдер Е.Ю. О распространении бактериозов томата в регионах России // *Защита и карантин растений*. 2024. Т. 1. С. 61. EDN: HLOEBD
16. Chen X., Bai K., Lyu Q., Jiang N. et al. Role of penicillin-binding proteins in the viability, morphology, stress tolerance, and pathogenicity of *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*®. 2021;111(8):1301-1312. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0326-R>
17. Brochu A.S., Durrivage J., Torres D., Perez-Lopez E. Diet and injection, important recommendations to characterize *Clavibacter michiganensis*–tomato interactions. *Plant Health Progress*. 2023;24(4):475-481. <https://doi.org/10.1094/PHP-04-23-0040-RS>
18. Takishita Y., Souleimanov A., Bourguet C., Ohlund L.B. et al. *Pseudomonas entomophila* 23S produces a novel antagonistic compound against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a pathogen of tomato bacterial canker. *Applied Microbiology*. 2021;1(1):60-73. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1010006>
19. Li Y., Chen X., Xu X., Yu C. et al. Deletion of *pbpC* enhances bacterial pathogenicity on tomato by affecting biofilm formation, exopolysaccharides production, and exoenzyme activities in *Clavibacter michiganensis*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5324. <https://doi.org/10.3390/ijms24065324>
20. Peritore-Galve F.C., Tancos M.A., Smart C.D. Bacterial canker of tomato: revisiting a global and economically damaging seedborne pathogen. *Plant Disease*. 2021;105(6):1581-1595. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1732-FE>
21. Джалилов Ф.С., Карлов Г.И., Корнев К.П., Матвеева Е.В. и др. Диагностика зараженности семян томата возбудителем бактериального рака (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Davis (Smith) (Cmm)) методом ПЦР // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2007. № 1. С. 21–25. EDN: HZDUPJ
22. ISF (2022) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomato Seed. URL: https://worldseed.org/wp-content/uploads/2022/07/Protocol_Tomato_Cmm_v5_July-2022-002.pdf.
23. Fatmi M., Walcott R.R., Schaad N.V. *Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material (Second Edition)*. Minnesota: The American Phytopathological Society (APS), 2017:360.
24. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А. *ПЦР в реальном времени: Учебное пособие*. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 225 с. EDN: RAYMPL
25. Приходько С.И., Писарева И.Н., Корнев К.П. Оценка применимости молекулярных методов диагностики возбудителя бактериоза винограда (болезнь Пирса) *Xylella fastidiosa* Wells et al., используемых в международной и отечественной практике // *Садоводство и виноградарство*. 2022. № 1. С. 38–43. <https://doi.org/10.31676/0235-2591-2022-1-38-43>
26. Тараканов Р.И., Игнатъева И.М., Белошапкина О.О., Чебаненко С.И. и др. Выявление возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv.

glycinea в семенах методом ПЦР // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2024. № 1. С. 41–52. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2024-1-41-52>

27. Оболенский Р.Р., Словарева О.Ю., Дорофеева Л.В. Оценка применимости ПЦР-теста в режиме «реального времени» для идентификации возбудителя желтого слизистого бактериоза пшеницы *Rathayibacter tritici* // *Фитосанитария. Карантин растений*. 2025. № 1 (22). С. 26–39. <https://doi.org/10.69536/FKR.2025.85.45.003>

References

1. Chaudhary P., Sharma A., Singh B., Nagpal A.K. Bioactivities of phytochemicals present in tomato. *Journal of Food Science and Technology*. 2018;55(8):2833-2849. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3221-z>

2. Wang C., Li M., Duan X., Abu-Izneid T. et al. Phytochemical and nutritional profiling of tomatoes; impact of processing on bioavailability- a comprehensive review. *Food Reviews International*. 2023;39(8):5986-6010. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2097692>

3. Ajaharuddin S.K.M.D., Lal M., Yadav A., Kumar N. et al. Breeding for resistance against pest and diseases in tomatoes: A review. *Journal of Scientific Research and Reports*. 2024;30(6):469-479. <https://doi.org/10.9734/jsrr/2024/v30i62063>

4. Chaudhary J., Khatri P., Singla P., Kumawat S. et al. Advances in omics approaches for abiotic stress tolerance in tomato. *Biology*. 2019;8(4):90-108. <https://doi.org/10.3390/biology8040090>

5. Beloshapkina O.O., Pisareva I.N. Determination of the analytical sensitivity and specificity of PCR methods for the diagnosis of bacterial spot of tomato. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2024;(3):78-94. (In Russ.) <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2024-3-78-94>

6. Ignatov A.N., Chelidze G.G., Vorobyova K.S. Risks of spreading of new viral and bacterial diseases of vegetable crops in the Russian Federation through greenhouse production. *Potato and Vegetables*. 2019;(4):18-21. (In Russ.) <https://doi.org/10.25630/PAV.2019.84.71.002>

7. Osdaghi E., Abachi H., Jacques M.A. *Clavibacter michiganensis* Reframed: The Story of How the Genomics Era Made a New Face for an Old Enemy. *Molecular Plant Pathology*. 2025;26: e70093. <https://doi.org/10.1111/mpp.70093>

8. Li X., Tambong J., Yuan K., Chen W. et al. Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018;68(1):234-240. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002492>

9. Osdaghi E., Abachi H., Jacques M.A. *Clavibacter michiganensis* Reframed: The Story of How the Genomics Era Made a New Face for an Old Enemy. *Molecular Plant Pathology*. 2025;26(5): e70093. <https://doi.org/10.1111/mpp.70093>

10. Morcia C., Piazza I., Ghizzoni R., Terzi V. et al. Molecular diagnostics in tomato: Chip digital PCR assays targeted to identify and quantify *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* in planta. *Horticulturae*. 2023;9(5):553-565. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050553>

11. Tripathi R., Vishunavat K., Tewari R. Morphological and molecular characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causing bacterial canker in tomatoes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2022;119:101833. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2022.101833>

12. Verma R.K., Roman-Reyna V., Raanan H., Coaker G. et al. Allelic variations in the *chpG* effector gene within *Clavibacter michiganensis* populations

determine pathogen host range. *PLoS Pathogens*. 2024;20(7): e1012380. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012380>

13. Solano-Alvarez N., Valencia-Hernandez J.A., Rico-Garcia E., Torres-Pacheco I. et al. A novel isolate of *Bacillus cereus* promotes growth in tomato and inhibits *Clavibacter michiganensis* infection under greenhouse conditions. *Plants*. 2021;10(3):506. <https://doi.org/10.3390/plants10030506>

14. EPPO. PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPPO Bulletin*. 2016;46(2):202-225. <https://doi.org/10.1111/epp.12302>

15. Pisareva I.N., Beloshapkina O.O., Seliavkin S.N.1, Shneyder E.Y. On the spread of tomato bacteriosis in the regions of Russia. *Plant Health and Quarantine*. 2024;(S4-1(20)):61. (In Russ.)

16. Chen X., Bai K., Lyu Q., Jiang N. et al. Role of penicillin-binding proteins in the viability, morphology, stress tolerance, and pathogenicity of *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*®. 2021;111(8):1301-1312. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0326-R>

17. Brochu A.S., Durrivage J., Torres D., Perez-Lopez E. Diet and injection, important recommendations to characterize *Clavibacter michiganensis*–tomato interactions. *Plant Health Progress*. 2023;24(4):475-481. <https://doi.org/10.1094/PHP-04-23-0040-RS>

18. Takishita Y., Souleimanov A., Bourguet C., Ohlund L.B. et al. *Pseudomonas entomophila* 23S produces a novel antagonistic compound against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a pathogen of tomato bacterial canker. *Applied Microbiology*. 2021;1(1):60-73. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1010006>

19. Li Y., Chen X., Xu X., Yu C. et al. Deletion of *pbpC* enhances bacterial pathogenicity on tomato by affecting biofilm formation, exopolysaccharides production, and exoenzyme activities in *Clavibacter michiganensis*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5324. <https://doi.org/10.3390/ijms24065324>

20. Peritore-Galve F.C., Tancos M.A., Smart C.D. Bacterial canker of tomato: revisiting a global and economically damaging seedborne pathogen. *Plant Disease*. 2021;105(6):1581-1595. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1732-FE>

21. Dzhililov F.S., Karlov G.I., Kornev K.P., Matveeva E.V. et al. Diagnostics of tomato seeds infected with bacterial canker stimulus (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Davis (Smith) (Cmm)) by using PCR method. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2007;(1):21-25. (In Russ.)

22. ISF (2022) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomato Seed. URL: https://worldseed.org/wp-content/uploads/2022/07/Protocol_Tomato_Cmm_v5_July-2022-002.pdf

23. Fatmi M., Walcott R.R., Schaad N.V. *Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material (Second Edition)*. Minnesota: The American Phytopathological Society (APS), 2017:360.

24. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu., Semenov P.A. *Real-time PCR: a training manual*. Moscow, Russia: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2011:225. (In Russ.)

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

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

27. Obolensky R.R., Slovarova O.Yu., Dorofeeva L.V. Evaluation of the real-time PCR applicability for the identification of bacterial ear rot of wheat *Rathayibacter tritici*. *Plant Health and Quarantine*. 2025;(1(22)):26-39. (In Russ.) <https://doi.org/10.69536/FKR.2025.85.45.003>

Сведения об авторах

Ирина Николаевна Писарева, научный сотрудник научно-методического отдела бактериологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений»; 140150, Российская Федерация, Московская обл., м.о. Раменский, р.п. Быково, ул. Пограничная, 32; e-mail: iruru@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3084-0591>

Ольга Олеговна Белошопкина, д-р с.-х. наук, профессор, профессор кафедры защиты растений, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»; 127434, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: beloshapkina@rgau-msha.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8564-8142>

Information about the authors

Irina N. Pisareva, Research Associate at the Research and Methodology Department of Bacteriology, All-Russian Plant Quarantine Center; 32 Pogradichnaya St., Bykovo, Ramensky Municipal District, Moscow Region, 140150, Russian Federation; e-mail: iruru@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3084-0591>

Olga O. Beloshapkina, DSc (Ag), Professor, Professor at the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy; 49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127434, Russian Federation; e-mail: beloshapkina@rgau-msha.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8564-8142>