

Научная статья
УДК 632.4:579.841.1:581.1/.5:57.085.2
DOI:10.36508/journal.2024.17.22.004

СЕЛЕКТИВНОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ПРОТОКОЛА ДИАГНОСТИКИ С ПОМОЩЬЮ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ НА *XANTHOMONAS EUVESICATORIA PV. ALLII*

Дмитрий Евгеньевич КУЧЕР, Назих Ясер РЕБУХ, Ньяша Джон КАВИЗА

Институт экологии Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, г. Москва, Россия

kucher-de@rudn.ru

Аннотация.

Проблема и цель. Бактериальный ожог, вызываемый патогеном *Xanthomonas euvesicatoria pv. allii*, является серьезной угрозой для сельского хозяйства, так как приводит к значительным потерям урожая луковых культур. Учитывая широкий спектр растений-хозяев среди рода *Allium* и значимость своевременного выявления патогена, целью исследования являлось изучение избирательности хозяина и воспроизводимости метода ПЦР для обнаружения *X. euvesicatoria pv. allii* среди различных видов *Allium* с использованием праймеров AVR и P1L.

Методология. Для исследования были отобраны семена пяти видов *Allium*: лука репчатого (*Allium cepa*), шнитт-лука (*Allium schoenoprasum*), лука душистого (*Allium ramosum*), лука-батуна (*Allium fistulosum*) и порея (*Allium porrum*). Штаммы бактерий *X. euvesicatoria pv. allii* (0377 и 0419) были использованы для инокуляции растительного материала. Затем проведены экстракция ДНК и qPCR для анализа распространенности патогена и воспроизводимости метода при различных концентрациях бактериальных суспензий.

Результаты. Оба штамма (0377 и 0419) продемонстрировали отсутствие выраженной специфичности к хозяину среди пяти видов *Allium*, независимо от концентрации бактерий. Воспроизводимость метода ПЦР с праймерами AVR и P1L оказалась высокой, с относительным стандартным отклонением менее 2% при повторных тестах, проведенных различными операторами и на разном оборудовании.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии узкой специфичности *X. euvesicatoria pv. allii* к растениям рода *Allium* и подтверждают высокую точность и воспроизводимость ПЦР-анализа для обнаружения патогена. Эти данные могут быть полезны для улучшения методов мониторинга и контроля распространения данного фитопатогена.

Ключевые слова: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, растения рода *Allium*, ПЦР, патогенность, избирательность, диагностика.

Original article

XANTHOMONAS EUVESICATORIA PV. ALLII HOST SELECTIVITY AND REPRODUCIBILITY OF THE QPCR DIAGNOSTIC PROTOCOL

Dmitry E. KUCHER, Nazih Yaser REBUKH, Nyasha John KAVIZA

Institute of Environmental Engineering, RUDN named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia

kucher-de@rudn.ru

Abstract.

Problem and purpose. Bacterial blight caused by the pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* poses a serious threat to agriculture, leading to significant yield losses in *Allium* crops. Given the broad host range among *Allium* species and the importance of timely pathogen detection, the aim of this study was to examine host selectivity and the reproducibility of the PCR method for detecting *X. euvesicatoria* pv. *allii* among various *Allium* species using AVR and PIL primers.

Methodology. Seeds of five *Allium* species—onion (*Allium cepa*), chives (*Allium schoenoprasum*), fragrant onion (*Allium ramosum*), Welsh onion (*Allium fistulosum*), and leek (*Allium porrum*)—were selected for study. Strains 0377 and 0419 of *X. euvesicatoria* pv. *allii* were used to inoculate plant material. DNA extraction and qPCR were performed to assess pathogen prevalence and the reproducibility of the method across various bacterial concentrations.

Results. Both strains (0377 and 0419) showed no distinct host specificity among the five *Allium* species, regardless of bacterial concentration. The PCR method demonstrated high reproducibility with AVR and PIL primers, with relative standard deviations below 2% across repeated tests by different operators and equipment.

Conclusion. The results indicate the lack of narrow host specificity of *X. euvesicatoria* pv. *allii* among *Allium* species and confirm the high accuracy and reproducibility of the PCR assay for pathogen detection. These findings can support improved monitoring and control methods for this phytopathogen's spread.

Key words: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, *Allium* species, PCR, pathogenicity, selectivity, diagnostics.

Введение

Xanthomonas euvesicatoria pv. *allii* - это граммотрицательная, облигатно аэробная, палочковидная бактерия с окислительным метаболизмом, положительная по каталазе, фитопатоген, образующая слизистые, гладкие, круглые, выпуклые и жёлтые колонии (Kadota et al., 2000; Roumagnac et al., 2004). Бактерия принадлежит к классу Gammaproteobacteria и имеет гетеротипные синонимы

Xanthomonas campestris pv. *allii* (Kadota et al., 2000) и *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (Kadota et al., 2000, Roumagnac et al., 2004).

Первое описание этой бактерии, патогенной для лука, как принадлежащей к роду *Xanthomonas* было сделано Альваресом и др. (1978) на Гавайях. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* первоначально была классифицирована как *X. campestris* pv. *allii* Кадотой и др. (2000), выделенной из растений лука-батуна (*Allium fistulosum*) в Японии на основе биохимических, физиологических и специфичных для хозяина тестов. В 2004 году Руманьяк и др., основываясь на полифазной характеристике с использованием молекулярных методов гибридизации ДНК-ДНК и анализа флуоресцентных амплифицированных фрагментов (FAFLP), а также на биохимических и фенотипических исследованиях, переклассифицировали вид как *X. axonopodis* pv. *allii*, отнеся его к группе *rep*-PCR 9.2 *X. axonopodis*. [1]

Бактериальная пятнистость, вызываемая *X. euvesicatoria* pv. *allii*, является прогрессирующим заболеванием в мире, приводящим к вспышкам в ряде стран-производителей, что вызывает озабоченность для овощеводства и требует дальнейших исследований этого возбудителя (Robène et al., 2015). Бактериальная пятнистость может привести к потерям урожайности лукович на 10-50%, хотя она и не вызывает симптомов на них, однако, инфекция листьев снижает фотосинтетическую активность и усвоение питательных веществ растением (Schwartz and Otto, 2000; Nunez et al., 2002). В связи с риском для производства лука, с 2009 года бактерия рассматривается Европейской и Средиземноморской организацией по защите растений (EPPO) как отсутствующий карантинный вредитель (категория A1) (EPPO, 2020).

Материалы и методы исследования

Для исследований избирательности хозяина были приобретены семена пяти видов рода *Allium*: лука репчатого (*Allium cepa*), лука скорода (*Allium schoenoprasum*), лука-батуна (*Allium fistulosum*), лука душистого (*Allium ramosum*) и лука-поррея (*Allium porrum*). Исследование было основано на изучении избирательности хозяина двух штаммов *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, а именно 0377 и 0419, которые относятся к коллекции бактерий Всероссийского центра карантина растений.

Подготовка растительного экстракта из семян.

Для каждой из видов была взята проба массой 5 граммов для упрощения процедуры. Пробы семян помещали в мешки для гомогенизации и добавляли в каждый из них по 25 мл PBS-буфера. Затем семена измельчали с помощью гомогенизатора Vagmixer (Interscience, Франция). Жидкость отделяли от измельчённых частиц семян с помощью фильтра мешка и собирали в центрифужные пробирки. Экстракт затем центрифугировали при 8000g в течение 15 минут при температуре 4°C для осаждения растительных клеток. Супернатант сливали, и к осадку добавляли 1 мл стерильного PBS-буфера, тем самым ресуспендируя его.

Инокуляция экстракта (растительных клеток) *X. euvesicatoria* pv. *allii*

Сохранённые колонии двух бактериальных штаммов *X. euvesicatoria* pv. *allii*, 0377 и 0419, помещали в 1 мл дистиллированной воды, образуя концентрированный бактериальный раствор, который использовали для приготовления исходных растворов. Для всех образцов проводили десятикратные серийные разведения бактериальных суспензий, таким образом инокулируя различные растительные экстракты двумя штаммами бактерий. Кроме того, были проведены десятикратные серийные разведения с дистиллированной водой для подсчета на питательных средах, что позволяло определить количество колониобразующих единиц (КОЕ) для каждого фактора разведения.

Экстракция ДНК.

Для каждой исходной пробы разведения брали по 3 повторности инокулированного экстракта объемом 200 мл для экстракции ДНК. Кроме того, в качестве отрицательных контролей для экстракции вместе с инокулированными образцами использовали пробы с дистиллированной водой. Для выделения ДНК из растительного экстракта применяли набор Probe GC, адаптированный для экстракции ДНК из растительного материала. Извлечённую ДНК помещали в новые, подписанные микротрубки для проведения ПЦР-тестов.

Оценка методом ПЦР

Перед проведением ПЦР-тестов учитывались результаты подсчёта колоний. Было решено использовать для ПЦР разведения с числом КОЕ в диапазоне 10^1 , 10^2 и 10^3 . Этот диапазон КОЕ соответствовал исходным разведениям 6, 5 и 4 соответственно. Таким образом, для каждого из двух тестируемых бактериальных штаммов каждой пробе семян соответствовали три разведения, повторенные трижды, что в сумме составляло 9 обработок на пробу и 90 записей для всего эксперимента. Для выявления бактерий в образцах использовали два праймера *X. euvesicatoria* pv. *allii* (Ха.а. AVR и X.a.a. PIL), и результаты использовались для определения избирательности хозяина бактерий среди пяти видов рода *Allium*. [2]

Определение воспроизводимости

Оценка воспроизводимости проводилась для определения способности ПЦР-анализа выявлять *X. euvesicatoria* pv. *allii* с использованием двух наборов праймеров AVR и PIL при семи концентрациях (от $7,2 \times 10^1$ до $7,2 \times 10^7$ КОЕ/мл) с привлечением трёх разных операторов и наборов оборудования, выполненных в трёх повторностях.

Результаты исследований и их обсуждение

Для подтверждения избирательности *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* по отношению к различным видам рода *Allium* были использованы два штамма (0377) и (0419), которыми заражались следующие виды: *A. cepa* (AC), *A. schoenoprasum* (AS), *A. fragrans* (AF), *A. ramosum* (AR) и *A. porrum* (AP). Заражённые растительные клетки анализировались с помощью количественной полимеразной цепной реакции для определения избирательности патогена среди пяти видов.

Избирательность хозяина для штамма 0419 на пяти видах Allium. Инокулят был приготовлен из штамма *X. euvesicatoria* pv. *allii* 0419 с тремя концентрациями, варьирующимися от 10^5 до 10^7 КОЕ/мл. Эти концентрации использовали для заражения клеток гомогенизированного растительного материала из пяти видов Allium, после чего проводили экстракцию ДНК. Уровень распространения патогена в разных видах оценивался методом qPCR (количественной полимеразной цепной реакции).

Таблица 1 – Результаты обнаружения патогена в пяти видах Allium (0419)

Вид	Штамм бактерии	Концентрация	Средний СТ цикл
<i>A. cepa</i>	D4	10^5	26,7
	D5	10^6	29,8
	D6	10^7	33,7
<i>A. schoenoprasum</i>	D4	10^5	26,4
	D5	10^6	29,1
	D6	10^7	32,8
<i>A. fragrans</i>	D4	10^5	25,8
	D5	10^6	28,9
	D6	10^7	31,7
<i>A. ramosum</i>	D4	10^5	27,0
	D5	10^6	30,8
	D6	10^7	33,3
<i>A. porrum</i>	D4	10^5	26,0
	D5	10^6	29,4
	D6	10^7	32,5

Как показано в таблице 1, штамм 0419 был протестирован на избирательность хозяина среди пяти видов Allium. Результаты показали отсутствие выраженной специфичности ($p > 0,05$) на каждом уровне концентрации бактерий, что служило моделью для различных степеней вирулентности. Этот результат согласуется с данными, представленными Ганжевенком и соавт. (2014), согласно которым *X. euvesicatoria* pv. *allii* характеризуется меньшей специфичностью по отношению к хозяину, чем типичный патовар *Xanthomonas*.

Избирательность хозяина для штамма 0377 на пяти видах Allium. Были подготовлены три концентрации инокулята *X. euvesicatoria* pv. *allii*, варьирующиеся от 10^5 до 10^7 КОЕ/мл. Эти концентрации использовались для заражения клеток гомогенизированного растительного материала пяти видов Allium, из которых затем извлекалась ДНК. Уровень распространения патогена в разных видах оценивался методом qPCR.

Таблица 2 — Уровни обнаружения штамма 0377 в инокулированных видах Allium по результатам анализа в режиме реального времени

Вид	Штамм бактерии	Концентрация	Средний СТ цикл
<i>A. cepa</i>	D4	105	27,1
	D5	106	31,1
	D6	107	33,2
<i>A. schoenoprasum</i>	D4	105	27,1
	D5	106	30,8
	D6	107	33,4
<i>A. fragrans</i>	D4	105	27,9
	D5	106	31,2
	D6	107	33,2
<i>A. ramosum</i>	D4	105	28,4
	D5	106	32,9
	D6	107	33,7
<i>A. porrum</i>	D4	105	28,7
	D5	106	32,0
	D6	107	33,8

Оценка штамма 0377 на предмет селективности к хозяину среди видов Allium показала ту же картину результатов, что и для штамма 0419, при этом не было выявлено выраженной специфичности к хозяину при каждой из концентраций, как показано в таблице 2.

Определение воспроизводимости ПЦР-анализа

Для определения воспроизводимости были подготовлены искусственно инокулированные экстракты с низким и средним уровнями инфекции в шести повторностях. Тестирование этой серии проводилось тремя операторами в различных лабораториях с использованием разного оборудования и в разное время.

Воспроизводимость ПЦР-анализа с использованием маркера AVR

Данные в таблице 3 показывают, что при оценке семи концентраций с использованием праймеров AVR воспроизводимость теста была высокой между операторами и оборудованием. Наименьшая изменчивость наблюдалась при самой высокой концентрации бактерий 10^7 КОЕ/мл, что подтверждается относительным стандартным отклонением 0,33%, тогда как концентрация 10^6 показала наибольшее относительное стандартное отклонение 1,62%. Кроме того, стандартное отклонение 0,05 и близость к среднему СТ циклу 15,37 демонстрируют высокую точность теста. В целом, с относительным стандартным отклонением менее 2% анализ показал хорошую воспроизводимость.

Таблица 3 — Вариативность между операторами и оборудованием при семи концентрациях бактерий

Концентрация	Операторы и оборудование	Значения СТ	Средний СТ	Стандартное отклонение	Относительно е стандартное
--------------	--------------------------	-------------	------------	------------------------	----------------------------

					отклонение
107	OE1	15,4	15,37	0,05	0,33%
	OE2	15,3			
	OE3	15,4			
106	OE1	19,4	19,13	0,31	1,62%
	OE2	18,7			
	OE3	19,3			
105	OE1	23,7	23,43	0,21	0,90%
	OE2	23,2			
	OE3	23,4			
104	OE1	28,2	27,77	0,33	1,19%
	OE2	27,7			
	OE3	27,4			
103	OE1	32,1	31,57	0,41	1,30%
	OE2	31,5			
	OE3	31,1			
102	OE1	34,9	34,53	0,39	1,13%
	OE2	34			
	OE3	34,7			
101	OE1	36,2	35,9	0,22	0,61%
	OE2	35,8			
	OE3	35,7			

Оценка воспроизводимости ПЦР-анализа с использованием маркеров P1L
Обнаружение бактерий с использованием праймеров P1L на каждой из 7 концентраций показало исключительно низкие вариации в повторных тестах между операторами и оборудованием, что указывает на высокую воспроизводимость. Наибольшая воспроизводимость была отмечена при концентрациях 10^2 и 10^1 КОЕ/мл, с относительным стандартным отклонением 0,55% и 0,59%, как показано в таблице 4. При наибольшем относительном стандартном отклонении 1,81% на концентрации 10^7 КОЕ/мл данные отражают, что ни точность, ни достоверность не были существенно затронуты различиями между операторами и используемым оборудованием. В целом, для обоих наборов праймеров AVR и P1L хорошая воспроизводимость теста среди операторов с их оборудованием демонстрирует, что рассчитанное относительное стандартное отклонение для концентраций, особенно низких (10^1 и 10^2 КОЕ/мл), свидетельствует о достижимой точности, с которой можно обнаружить патоген.[3]

Таблица 4 — Воспроизводимость теста при обнаружении бактерий на различных концентрациях, выраженная через относительное стандартное отклонение

Концентрация	Операторы и оборудование	Значения СТ	Средний СТ	Стандартное отклонение	Относительное стандартное отклонение
107	OE1	19,9	20,33	0,37	1,81%
	OE2	20,3			
	OE3	20,8			
106	OE1	29,3	29,73	0,37	1,24%
	OE2	29,7			
	OE3	30,2			
105	OE1	31,8	31,5	0,24	0,76%
	OE2	31,2			
	OE3	31,5			
104	OE1	32,5	32,4	0,22	0,68%
	OE2	32,6			
	OE3	32,1			
103	OE1	34,2	33,76	0,31	0,92%
	OE2	33,6			
	OE3	33,5			
102	OE1	34,4	34,5	0,19	0,55%
	OE2	34,4			
	OE3	34,7			
101	OE1	35,9	35,86	0,21	0,59%
	OE2	35,8			
	OE3	35,7			

Заключение

На основе результатов исследования систематики, патогенности и биологии бактерий было установлено, что штаммы *X. euvesicatoria* pv. *allii* не обладают выраженной специфичностью к различным видам рода *Allium*. Для праймеров AVR и P1L высокая воспроизводимость теста, с относительным стандартным отклонением менее 2% между операторами и их оборудованием, свидетельствует о достижимой точности, с которой может быть выявлен данный патоген.

Библиографический список

1. Константин, Е.С. Таксономический обзор штаммов *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* и их патогенности на ароидных растениях / Е.С. Константин: (дисс. на соиск. уч.ст. доктора наук. - Университет Гента, 2017. URL: https://www.researchgate.net/publication/318028782_Taxonomic_revision_of_Xanthomonas_axonopodis_pv_dieffenbachiae_strains_and_pathogenicity_on_Araceae_plants
2. Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений (ЕОКЗР). *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. Булла ЕОКЗР, 2016, 46, 429-443.
- 3.. Робен, И. Разработка и валидация количественного ПЦР-анализа в режиме реального времени для выявления *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* в семенах

лука./ И. Робен, М. Перре, Э. Джоуэн, А. Эскалон, М.В. Майо, А. Шабиран, А. Моро, А. Лоран, Ф. Чиролеу, О. Прувост //Журнал микробиологических методов, 2015,114.-С.78-86

References

1. Konstantin, E.S. *Taksonomicheskij obzor shtammov Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae i ih patogennosti na aroidnyh rasteniyah* / E.S. Konstantin: (diss. na soisk. uch.st. doktora nauk. - Universitet Genta, 2017. URL: https://www.researchgate.net/publication/318028782_Taxonomic_revision_of_Xanthomonas_axonopodis_pv_dieffenbachiae_strains_and_pathogenicity_on_Araceae_plants
2. *Evropejskaya i Sredizemnomorskaya organizaciya po karantinu i zashchite rastenij (EOKZR). Xanthomonas axonopodis pv. allii. Bulla EOKZR, 2016, 46, 429-443.*
3. *Roben, I. Razrabotka i validaciya kolichestvennogo PCR-analiza v rezhime real'nogo vremeni dlya vyyavleniya Xanthomonas axonopodis pv. allii v semenah luka./ I. Roben, M. Perre, E. Dzhouen, A. Eskalon, M.V. Majo, A. Shabiran, A. Moro, A. Loran, F. Chiroleu, O. Pruvost //Zhurnal mikrobiologicheskikh metodov, 2015,114.-S.78-86*