



# ДИАГНОСТИКА ОПАСНОЙ КАРАНТИННОЙ БАКТЕРИИ *Xylella fastidiosa* WELLS ET AL.



Приходько С.И., Писарева Ирина Николаевна, Корнев К.П.

Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР»), 140150, Россия, Московская область, Раменский район, г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32, [iruru@yandex.ru](mailto:iruru@yandex.ru)

## Введение:

*Xylella fastidiosa* является карантинным вредным организмом, отсутствующим на территории ЕАЭС и вызывает такие заболевания растений, имеющие экономическое значение как: бактериоз (болезнь Пирса) винограда, пестрый хлороз цитрусовых, болезнь «фони» персика, ожог листьев сливы, синдром быстрого усыхания оливковых деревьев, ожоги листьев миндаля, кофе, олеандра, пекана, черники и некоторых видов парковых деревьев. По данным EFSA в 2020 году количество поражаемых *X. fastidiosa* растений составило 595 различных видов. Экономический ущерб, связанный с заболеваниями, вызванными *X. fastidiosa*, ежегодно оценивается в миллионы долларов. Диагностика возбудителя бактериоза (болезнь Пирса) винограда в импортном посадочном материале имеет огромное значение для предупреждения интродукции фитопатогена на территорию РФ. Целью данных исследований является подбор, апробация и совершенствование существующих методов выявления и идентификации возбудителя бактериоза винограда (болезнь Пирса) из растительного материала.

## Материалы и методы исследования:

Для определения чувствительности тестов использовали 9 разведений тотальной ДНК, извлеченной из зараженных *X. fastidiosa* олив. Постановка опыта проводилась в 4-х кратной повторности. Для экстракции ДНК использовали готовый набор «ФитоСорб-Автомат-48» (ЗАО «Синтол»), выделение ДНК проводили на автоматической станции Freedom EVO (Tecan, Швейцария).

Авторами были испытаны и оптимизированы 5 тестов ПЦР «в реальном времени»: по Harper et al., 2010 (erratum 2013); по Francis et al., 2006; по Ouyang et al., 2013 (M); по Li et al., 2013; набор «Фитоскрин. *Xylella fastidiosa*-PB» (ЗАО «Синтол»), а также классический ПЦР-тест по Minsavage et al., 1994

## Результаты:

Было установлено, что все тесты одинаково эффективно выявляют возбудителя в четырех повторностях 5-го разведения (100%). Наиболее стабильные результаты показали диагностические системы по Harper et al., (2010) и Francis et al. (2006). Данные тесты детектировали ДНК возбудителя в 6-м разведении в 3-х повторностях из 4-х (75%).

Диагностическая система «Фитоскрин» детектировала ДНК патогена в двух повторностях 6-го разведения (50%). ПЦР-PB в соответствии с Ouyang et al. (2013 (M)) и Li et al. (2013) в 6-м разведении ДНК фитопатогена не выявили. На рисунке 1 показаны сравнительные данные пороговых циклов детекции ДНК *X. fastidiosa* в 5-ти разведениях всех испытанных ПЦР-PB.

Наименьшую чувствительность имеет классическая ПЦР в соответствии с Minsavage et al. (1994). Порогом выявления ДНК возбудителя болезни Пирса для данной тест-системы является 4-е разведение ДНК и при этом фрагменты четко визуализируются.

Для проверки специфичности тестов использовали ДНК чистых культур 51 штамма сапрофитных и фитопатогенных бактерий. Установлена высокая специфичность тестов ПЦР-PB. Испытание классической ПЦР по Minsavage et al., (1994) показало наличие кросс-реакции с штаммом *Acidovorax citruli* и амплификацию неспецифичного фрагмента с ДНК *Ralstonia piketti*, *Pseudomonas putida*, *Ochrobactrum sp.*, *Pseudomonas syringae pv. syringae*.

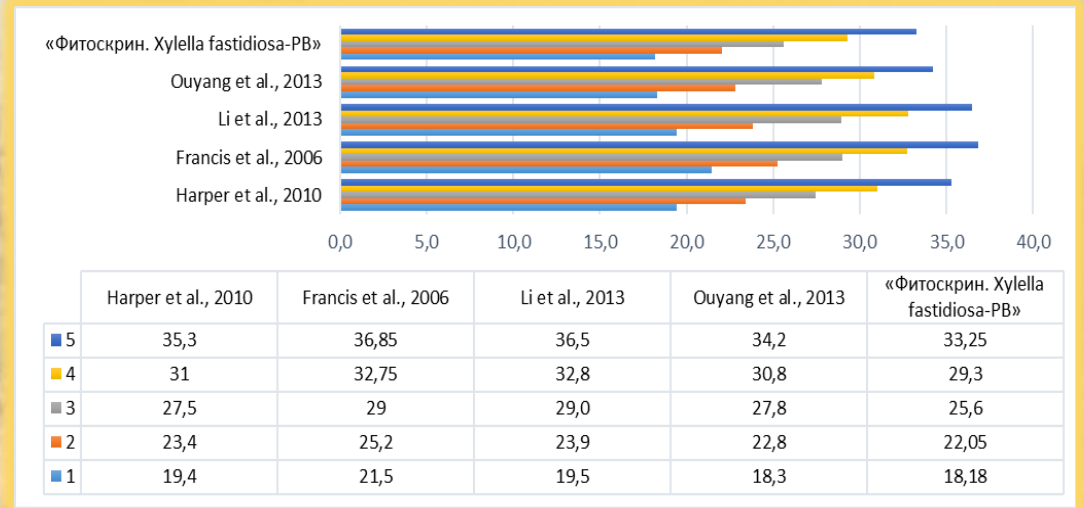


Рисунок 1. Сравнение чувствительности различных ПЦР-тестов для выявления *X. fastidiosa* по среднему значению порогового цикла в пяти разведениях ДНК.

## Заключение:

В ходе исследований определены наиболее эффективные методы для диагностики возбудителя - это «Фитоскрин. *Xylella fastidiosa*-PB» и ПЦР-PB в соответствии с Harper et al., (2010). Остальные тесты могут применяться в качестве подтверждающих в случае положительного результата или же при идентификации изолятов бактериальных культур.