

МСФМ 27

Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов

ДП 14: *Xanthomonas fragariae*

Принят в 2016 году; опубликован в 2016 году

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Информация о вредном организме	3
2.	Таксономическая информация.....	3
3.	Выявление	3
3.1	Симптомы	4
3.2	Отбор образцов	5
3.3	Подготовка образцов	5
3.4	Скрининговые экспресс-тесты	6
3.5	Выделение	6
3.5.1	Метод выделения 1	6
3.5.2	Метод выделения 2	7
3.5.3	Интерпретация результатов выделения	7
3.6	Тест отделенного листа и биологическое обогащение	8
3.6.1	Тест отделенного листа	8
3.6.2	Интерпретация результатов теста отделенного листа.....	8
3.6.3	Выделение с обогащением <i>in planta</i>	9
3.6.4	Обогащение <i>in vitro</i> – ПЦР на основе теста отделенного листа.....	9
3.7	ИФА	9
3.7.1	Непрямой ИФА	9
3.7.2	"Сэндвич"-ИФА (DAS-ИФА)	10
3.7.3	Интерпретация результатов ИФА	10
3.8	Иммунофлюоресценция	10
3.8.1	Интерпретация результатов теста иммунофлюоресценции	11
3.9	ПЦР	12
3.9.1	Выделение ДНК	12
3.9.2	Мультиплексная ПЦР.....	13
3.9.2.1	Протокол Хартунга и Пулера (Hartung and Pooler, 1997).....	13
3.9.3	Вложенная ПЦР	13
3.9.3.1	Протокол Мольтманна и Циммермана (Moltmann and Zimmerman, 2005).....	13
3.9.3.2	Протокол Робертса и соавт. (Roberts <i>et al.</i> , 1996)	14

3.9.4	ПЦР в реальном времени	15
3.9.4.1	Протокол Веллера и соавт. (Weller <i>et al.</i> , 2007)	15
3.9.5	Интерпретация результатов ПЦР	15
3.9.5.1	Стандартная ПЦР	15
3.9.5.2	ПЦР в реальном времени	15
3.9.6	Контроли для молекулярных тестов	16
4.	Идентификация.....	17
4.1	Биохимические и физиологические тесты	17
4.1.1	Определение параметров метиловых эфиров жирных кислот	21
4.1.1.1	Интерпретация результатов профилирования МЭЖК.....	21
4.2	Серологические тесты	21
4.2.1	Иммунофлюоресценция	21
4.2.2	ИФА	21
4.3	Молекулярные тесты	22
4.3.1	ПЦР	22
4.3.2	REР-ПЦР.....	22
4.3.2.1	Интерпретация результатов REР-ПЦР	22
4.3.3	Анализ мультилокусного секвенирования	22
4.4	Тесты на патогенность	23
4.4.1	Общая процедура инокуляции.....	23
4.4.1.1	Интерпретация результатов теста на патогенность.....	23
4.4.2	Реакция гиперчувствительности	24
4.4.2.1	Интерпретация результатов РГ.....	24
5.	Данные.....	24
6.	Контактные адреса для дополнительной информации.....	24
7.	Благодарности.....	25
8.	Справочные материалы	25
9.	Рисунки	29

1. Информация о вредном организме

Xanthomonas fragariae (Kennedy and King, 1962) является возбудителем угловой пятнистости листьев земляники. Эта болезнь распространена главным образом в Северной Америке и была впервые описана в 1962 году в Соединенных Штатах (Kennedy and King, 1962; Hildebrand *et al.*, 1967; Maas *et al.*, 1995), однако впоследствии она обнаруживалась во многих регионах мира, где выращивается земляника, в том числе в Южной Америке и Европе (САБИ). Основным хозяином *X. fragariae* является *Fragaria* × *ananassa*, наиболее распространенный вид садовой земляники. Восприимчивость различных торговых сортов варьируется, и другие виды *Fragaria*, в том числе *F. chiloensis*, *F. virginiana* и *F. vesca*, равно как и *Potentilla fruticosa* и *P. glandulosa*, также чувствительны к данному возбудителю. Среди видов *Fragaria* иммунитетом обладает только *F. moschata* (Kennedy and King, 1962; Kennedy, 1965; Maas, 1998).

X. fragariae легко передается через рассаду, в которой, несмотря на отсутствие каких-либо симптомов, имеет место латентная инфекция. Источником первичного заражения являются инфицированные, хотя и без видимых симптомов, дочерние растения, развивающиеся из побегов (усов) инфицированной рассады, которая используется в качестве посадочного материала на полях для выращивания земляники. Хотя *X. fragariae* не относится к микроорганизмам, свободно живущим в почве, эта бактерия способна зимовать в почве вместе с ранее инфицированным посадочным материалом, сохраняя жизнеспособность в течение длительного времени (Maas, 1998). Другим источником первичного заражения являются остатки инфицированных листьев и розеток на усах, используемых для посадки.

Анализ штаммов *X. fragariae*, выделенных в различное время и в различных странах мира, свидетельствует о наличии определенной генетической и фенотипической вариабельности (Oppenorth *et al.*, 1996; Pooler *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1996). Было также отмечено, что штаммы *X. fragariae* различаются по степени патогенности (Maas *et al.*, 2000). Тем не менее патогенные штаммы данной бактерии в значительной степени сходны друг с другом, причем отсутствует корреляция между генотипами или фенотипами и географическим происхождением штамма. Таким образом, известные в настоящее время штаммы *X. fragariae* из различных регионов мира, по всей вероятности, представляют собой клональную популяцию. Раннее выявление *X. fragariae* в инфицированном, но бессимптомном посадочном материале для выращивания земляники имеет важнейшее значение для предотвращения распространения данного возбудителя и развития болезни.

2. Таксономическая информация

Название: *Xanthomonas fragariae* Kennedy и King, 1962

Синонимы: нет

Таксономическая позиция: Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae

Обычные названия: бактериальная угловая пятнистость листьев

Примечание: *Xanthomonas fragariae* Kennedy и King, 1962 входит в подраздел Proteobacteria (Stackebrandt *et al.*, 1988), Фенон 3 по Van den Mooter и Swings (1990), в группу 1 гомологии ДНК-ДНК по Rademaker *et al.* (2001) и в группу 1 ДНК по Rademaker *et al.* (2005).

3. Выявление

Диагноз бактериальной угловой пятнистости листьев земляники, вызываемой *X. fragariae*, основан на выявлении характерных симптомов, прямом или непрямом выделении возбудителя, применении серологических тестов (например, таких как непрямая иммунофлюоресценция

и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)) либо молекулярных методов. Разработан ряд диагностических тестов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), использующих различные мишени в геноме *X. fragariae* (Roberts *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2007; Vandroemme *et al.*, 2008; Turechek *et al.*, 2008; Vermunt and van Beuningen, 2008). Эти тесты можно использовать для подтверждения присутствия *X. fragariae* в рассаде с признаками болезни, и некоторые из них также позволяют выявлять латентную инфекцию, вызванную этой бактерией (Mahuku and Goodwin, 1997; Zimmerman *et al.*, 2004; Moltman and Zimmerman, 2005). В тех случаях, когда процесс прямого выделения *X. fragariae* протекает крайне медленно или подавлен, в целях предварительной диагностики можно использовать "тест отделенного листа" (detached leaf assay) (Civerolo *et al.*, 1997a). Методы, описанные в настоящем диагностическом протоколе, за исключением вложенной ПЦР, были валидированы в исследовании эффективности тестов, финансируемом из средств Европейского союза (SMT-4-СТ98-2252) (López *et al.*, 2005).

Прямое выделение *X. fragariae* затруднено даже при наличии характерных симптомов и бактериального экссудата, поскольку данный микроорганизм растет крайне медленно на искусственной питательной среде и легко вытесняется сапрофитическими бактериями (Hazel and Civerolo 1980; López, *et al.*, 1985; Schaad *et al.*, 2001; Saddler and Bradbury, 2005). Конкретные процедуры прямого выделения *X. fragariae* приведены в работе López *et al.* (2005). Селективное обогащение методом *in planta*, основанное на инокуляции отделенных листьев земляники водным экстрактом из растительных тканей с явными признаками или с подозрением на инфекцию, может способствовать последующему выделению *X. fragariae in vitro* (Civerolo *et al.*, 1997a).

Ниже представлены процедуры для выявления *X. fragariae* в явно пораженных и бессимптомных растениях.

В данном диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Использование названий реагентов, химикатов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые также могут быть подходящими. Представленные в протоколах процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

3.1 Симптомы

Вначале на нижней поверхности листьев появляются мелкие (диаметром 1–4 мм) угловые водянистые пятна (повреждения), ограниченные мельчайшими жилками. На ранних стадиях инфекции эти пятна едва видимы на поле и выглядят прозрачными, желтого цвета при осмотре на просвет. Повреждения увеличиваются в размере и сливаются, постепенно проявляясь на верхней поверхности листьев в виде угловых водянистых пятен, приобретающих красновато-бурый цвет (рис. 1). В условиях сырости или при повышенной относительной влажности воздуха из поврежденных участков выделяется вязкий бактериальный экссудат белого, молочного, кремового или желтоватого цвета (рис. 2). При высыхании экссудат превращается в чешуйчатую непрозрачную массу вначале беловатого цвета или с серебристым оттенком, которая затем становится бурой (Janse, 2005). По мере прогрессирования заболевания сливные красно-бурые пятна омертвевают. Некротизированные ткани могут отрываться от листа, и тогда пораженные листья выглядят увядшими или изъеденными. При дальнейшем прогрессировании инфекции часто формируются протяженные повреждения вдоль основных листовых жилок. На прогрессирующих стадиях заболевания ткани вокруг застарелых слившихся красно-бурых повреждений, как правило, выглядят хлоротичными (Kennedy and King, 1962; EPPO, 1997; Rat, 1993; Maas, 1998).

В противоположность угловой пятнистости листьев земляники, бактериальная гниль земляники, вызываемая *X. arboricola* (патовар *fragariae*), характеризуется следующими признаками: мелкие

красновато-бурые повреждения на нижней поверхности листьев, которые не пропитаны жидкостью и не просвечивают; красноватые пятна на верхней поверхности листьев; повреждения, сливающиеся в крупные сухие, бурые пятна, окруженные хлоротическим ореолом; крупные бурые У-образные повреждения вдоль краев листьев, центральной и других основных жилок (Janse *et al.*, 2001). Также при бактериальной гнили листьев не образуется бактериальный экссудат (Janse *et al.*, 2001). Развернутые стадии бактериальной угловой пятнистости листьев трудно дифференцировать от болезней, вызываемых грибами, таких как белая пятнистость (*Mycosphaerella fragariae*) и ожог листьев (*Diplocarpon earliana*) (Janse *et al.*, 2001).

При тяжелом течении инфекция, вызванная *X. fragariae*, может распространяться с листьев на розетку, на которой появляются отдельные водянистые участки (Hildebrand *et al.*, 1967). Тяжелая инфекция розетки может приводить к увяданию и, в итоге, к гибели растения. Листья, развившиеся из инфицированных розеток, нередко также заражены: повреждения локализуются вдоль жилок у основания листа. На поперечном разрезе розетки из сосудистых пучков может выделяться бактериальный экссудат.

В тяжелых случаях *X. fragariae* может поражать цветки, вызывая цветковую гниль, однако бактерия не обладает прямым инфицирующим эффектом в отношении плодов (Gubler *et al.*, 1999). Водянистые повреждения инфицированной ткани чашечки по внешнему виду аналогичны повреждениям листьев (рис. 3). Ткань ягоды вблизи значительно поврежденной чашечки может также стать водянистой.

X. fragariae может систематическим образом перемещаться в корни, розетки и усы без возникновения явных симптомов (Stefani *et al.*, 1989; Milholland *et al.*, 1996; Mahuku and Goodwin, 1997). Инфекция может приводить к появлению водянистых участков в основании молодых листьев, вслед за чем растение быстро увядает и гибнет. Этот тип инфекции встречается редко.

3.2 Отбор образцов

Для диагностики бактериальной угловой пятнистости на растениях с признаками заболевания предпочтительно использовать в качестве образцов листья с начальными водянистыми пятнами, поскольку из них удастся более эффективно выделять *X. fragariae*. В качестве альтернативы можно использовать листья с сухими пятнами и с наличием либо отсутствием экссудата. Необходимо также обследовать ткани розетки.

X. fragariae – это крайне медленно растущий микроорганизм, поэтому бактериологические и серологические тесты не пригодны для выявления немногочисленных бактерий в бессимптомных растениях. В такой ситуации рекомендуется отбирать несколько целых растений и вырезать небольшие участки ткани из листьев и их черешков, а также из розеток (ЕРРО, 2006). Этот материал можно затем использовать непосредственно для ПЦР-анализа (см. раздел 3.9).

Образцы после взятия не следует оставлять в условиях влажности. Их рекомендуется подсушивать, заворачивать в бумагу, помещать в полиэтиленовые пакеты и хранить в прохладном месте. Образцы следует транспортировать с применением теплоизолированных контейнеров, по прибытии на место хранить при температуре 4 °С и обрабатывать по возможности незамедлительно.

3.3 Подготовка образцов

Поверхности листьев и ткани стебля растений с признаками болезни можно продезинфицировать путем протирки 70%-ным этиловым спиртом. При наличии сосудистых симптомов рекомендуется удалить корни и листья, оставив для исследования розетку и черешки. Промойте образец водопроводной водой, чтобы удалить избыток почвы, и затем продезинфицируйте его, погрузив на 1 мин в 70%-ный этиловый спирт с последующим трехкратным прополаскиванием в стерильной дистиллированной воде. Для каждого образца поместите примерно 0,1 г листа или

ткани розетки и черешков в 9 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) (8 г NaCl, 0,2 г KCl, 2,9 г Na₂HPO₄·12H₂O, 0,2 г KH₂PO₄, дистиллированная вода – до 1 л; pH 7,2). Измельчите растительный материал и выдержите при комнатной температуре в течение 15 мин.

Для исследования бессимптомных растений возьмите методом случайного отбора образец массой 30 г, поместите его в 150 мл PBS и встряхивайте суспензию в течение 30 мин. Затем либо используйте для выявления бактерий непосредственно промывную жидкость, либо центрифугируйте ее при 10 000 g в течение 10 мин, после чего поместите образовавшийся осадок в стерильную дистиллированную воду до образования окончательного объема 5 мл. Дайте суспензии отстояться в течение 15 мин, затем соберите верхнюю прозрачную часть и приготовьте разведения (1:10 и 1:100), используя стерильную дистиллированную воду (ЕРРО, 2006). Полученные таким образом мацераты ткани образца используют для тестов ИФА, иммунофлюоресценции и ПЦР.

3.4 Скрининговые экспресс-тесты

Скрининговые экспресс-тесты помогают обнаружить *X. fragariae*. Поскольку бактерию крайне трудно выделить, для подтверждения наличия *X. fragariae* необходимо получить положительные результаты трех тестов (ИФА, иммунофлюоресценции и ПЦР). В качестве дополнительного теста для подтверждения наличия жизнеспособных бактерий *X. fragariae* применяют тест отделенного листа. Обычно отмечается высокая корреляция между результатами ИФА, ПЦР и теста отделенного листа (Civerolo *et al.*, 1997b).

3.5 Выделение

Прямое выделение *X. fragariae* затруднено даже при наличии характерных симптомов и бактериального экссудата, поскольку данный микроорганизм растет крайне медленно на искусственной питательной среде и легко вытесняется сапрофитическими бактериями. Два выделения рекомендуется применять два вида питательной среды. Выделение более успешно при использовании среды Уилбринка с нитратом (Wilbrink-N) (10 г сахарозы, 5 г протеозопептона (L85; Оксид¹), 0,5 г K₂HPO₄, 0,25 г MgSO₄·7H₂O, 0,25 г NaNO₃, 15 г очищенного агара, дистиллированная вода до 1 л; pH 7,0–7,2) (Koike, 1965). Менее эффективно, но все же рекомендуется выделение на среде YPGA (5 г дрожжевого экстракта, 5 г пептона Бакто (бактопептона)¹, 10 г глюкозы; 15 г очищенного агара, дистиллированная вода до 1 л; pH корректировать до 7,0–7,2; после автоклавирования добавить 5 мл циклогексимида, стерилизованного фильтрованием (основной раствор: 5 г циклогексимида на 100 мл абсолютного этилового спирта)). Для выделения более прихотливых бактерий можно использовать третью среду, SPA (20 г сахарозы, 5 г пептона Бакто¹, 0,5 г K₂HPO₄, 0,25 г MgSO₄·7H₂O, 15 г очищенного агара, дистиллированная вода до 1 л; pH 7,2–7,4) (Hayward, 1960). В любых средах рекомендуется использовать очищенный агар (Oxoid¹ или Difco¹), поскольку загрязняющие примеси, присутствующие в других коммерческих препаратах агара, могут ингибировать рост *X. fragariae*.

3.5.1 Метод выделения 1

При исследовании растений с признаками болезни отберите листья с первичными повреждениями и продезинфицируйте их поверхность путем протирания 70%-ным этиловым спиртом. Выделение

¹ В данном диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Использование названий реагентов, химикатов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые также могут быть подходящими. Представленные в протоколах процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

бактерий следует проводить из участков свежих водянистых повреждений или с краев более старых повреждений путем иссечения небольшого фрагмента ткани (0,5–1,0 см²) с помощью острого стерильного скальпеля.

Измельчите ткань в нескольких миллилитрах стерильной дистиллированной воды или PBS и выдержите смесь при комнатной температуре (20–25 °C) в течение 10–15 мин. Нанесите аликвоты (50–100 мкл) мацерата поврежденной ткани, а также разведения (1:10, 1:100, 1:1 000 и 1:10 000) на поверхность среды Wilbrink-N, YPGA и/или SPA. В целях верификации качества питательной среды и сравнения культуральных характеристик развивающихся колоний следует также поместить на среду такие же аликвоты клеточной взвеси *X. fragariae* (10⁴, 10⁵ и 10⁶ колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл). Инкубируйте чашки Петри при 25–27 °C в течение 7 дней, однако пометьте колонии, появляющиеся уже через 2–3 дня, поскольку это будут не *X. fragariae*, а другие микроорганизмы. Через 7–10 дней от начала инкубации при 25–27 °C оцените окончательные результаты бактериологического исследования.

Колонии *X. fragariae* на среде Wilbrink-N имеют вначале беловатый, а позднее бледно-желтый цвет, округлые очертания, слегка вогнутую, гладкую и слизистую поверхность. При выращивании на средах YPGA и SPA колонии характеризуются такими же морфологическими признаками, как и на Wilbrink-N, однако имеют более насыщенный желтый цвет.

3.5.2 Метод выделения 2

Вырежьте участки листьев с отчетливыми водянистыми угловыми повреждениями и промойте их в 50 мл водопроводной воды с добавлением нескольких капель детергента Твин-20. Выдержите фрагменты листа при комнатной температуре в течение 10 мин, затем ополосните дистиллированной водой и высушите с помощью салфеток. Можно также дезинфицировать фрагменты с применением 70%-ного этилового спирта в течение 5 с, с последующим высушиванием салфетками. Разрежьте фрагменты листа на более мелкие частицы (1–4 мм²) и поместите их в 5 мл 0,1 М PBS. Размешайте и выдержите при комнатной температуре в течение 30 мин, так чтобы *X. fragariae* перешли в супернатант. Разведите супернатант в пропорции 1:100 в 0,1 М PBS и добавьте аликвоты неразведенного и разведенного (1:100) образца объемом 20 мкл в отдельные лунки многолуночного предметного стекла для микроскопии. Зафиксируйте бактериальные клетки на стекле пламенем для последующего проведения иммунофлюоресцентного анализа (раздел 3.8). Поместите 200 мкл неразведенного супернатанта в микропробирку для последующего проведения ПЦР-анализа (раздел 3.9) и отдельно 1 мл неразведенного супернатанта – во вторую микропробирку, добавив глицерин до получения окончательной концентрации не менее 20%, и храните ее при температуре –20 °C или –80 °C для целей сравнения. Оставшуюся часть супернатанта можно использовать для посева на среду в разведенном виде, как это описано выше, и для инокуляции отделенных листьев земляники (раздел 3.6).

Выделять *X. fragariae* из ткани можно не только с помощью вышеописанных методов 1 и 2, но также путем посева аликвот свежего экссудата из поврежденных участков непосредственно на Wilbrink-N, YPGA, SPA или другие обычно применяемые питательные среды.

3.5.3 Интерпретация результатов выделения

Результат бактериологического исследования считается отрицательным, если через 7 дней ни на одной из трех сред не появляются бактериальные колонии с морфологическими признаками *X. fragariae* (при отсутствии ингибирования роста вследствие конкуренции или антагонизма) и в то же время на положительных контролях обнаруживаются типичные колонии *X. fragariae*.

Результат считается положительным, если предполагаемые колонии *X. fragariae* появляются по крайней мере на одной из использованных питательных сред.

Поскольку выделить культуры бактерии нередко не удается, то при положительных результатах тестов ИФА, иммунофлюоресценции и ПЦР образец следует предварительно, до окончательного определения (см. раздел 4), расценивать как положительный на *X. fragariae*. Наилучшие результаты выделения получают при использовании свежеприготовленных экстрактов образца из недавно возникших повреждений. Для более надежного выделения на питательной среде используют также обогащение *in planta*, описанное в разделе 3.6.

3.6 Тест отделенного листа и биологическое обогащение

3.6.1 Тест отделенного листа

Препарат тканевого образца (раздел 3.3) можно использовать для инокуляции отделенных листьев земляники, обработанных буфером для экстракции или дистиллированной водой (Civerolo *et al.*, 1997a). Используйте молодые (7–14 дней) листья земляники сортов, восприимчивых к *X. fragariae* (например, "Камароза", "Паджаро", "Сискейп", "Сельва", "Корона"), выращенной в теплице и свободной от *X. fragariae*. Качество листьев и их возраст – это важные характеристики для успешности теста.

С соблюдением правил асептики отделите от растения, выращенного в теплице, три листа (каждый с тремя лопастями), срежьте черешки у основания и немедленно поместите черешки в стеклянные пробирки, заполненные стерильной водой.

Приготовьте клеточную суспензию эталонного штамма *X. fragariae* (табл. 3), содержащую 10^5 – 10^6 КОЕ/мл в PBS или дистиллированной воде, для использования в качестве положительного контроля. В качестве отрицательного контроля применяют PBS или дистиллированную воду. Инфильтрируйте четыре участка на абаксиальной поверхности каждой лопасти листа (по два с каждой стороны основной жилки) с помощью шприца без иглы (пластиковый одноразовый шприц BD¹ 3 мл, с диаметром отверстия 2 мм).

Через 1 ч после инокуляции смойте избыток инокулята стерильной водой. Поместите листья и их черешки в пробирках во влажную камеру (относительная влажность 95–100%) и инкубируйте при 18–20 °C с 12-часовым фотопериодом в течение до 21 дня. Чтобы избежать ложноотрицательных результатов, в период инкубации необходимо точно соблюдать установленный температурный и световой режим. Инокулированные листья не должны иметь видимых повреждений, а признаки водянистости в местах инфильтрации инокулятом, как правило, исчезают в течение 24 ч.

Через несколько дней после инокуляции начинают появляться характерные симптомы (ангулярные водянистые повреждения темного цвета), аналогичные признакам естественно возникшей инфекции. Регистрируйте симптоматику каждые 2 дня в течение 14–21 дня.

3.6.2 Интерпретация результатов теста отделенного листа

Тест отделенного листа считается отрицательным, если ни в одной из точек инокуляции на листьях по прошествии 21 дня не возникает типичных для *X. fragariae* угловых пятен (темных и водянистых при осмотре в отраженном свете; прозрачных, желтых при осмотре на просвет) и/или хлоротических ореолов. В точках инокуляции, инфильтрированных отрицательным контролем, не должно возникать водянистых пятен, прозрачно-желтых при осмотре на просвет (Civerolo *et al.*, 1997a).

Тест отделенного листа считается положительным, если в точках инокуляции на листьях в течение 10–21 дней возникают типичные для *X. fragariae* угловые пятна (темные и водянистые при осмотре в отраженном свете; прозрачные, желтые при осмотре на просвет). Эти пятна должны выглядеть так же, как повреждения, развившиеся в точках инокуляции, инфильтрированных суспензией положительного контроля. В точках инокуляции, инфильтрированных отрицательным

контролем, не должно возникать водянистых пятен, прозрачно-желтых при осмотре на просвет (Civerolo *et al.*, 1997a).

3.6.3 Выделение с обогащением *in planta*

Отберите по одному отделенному листу из каждого образца через 48 ч после инокуляции для посева на питательную среду. Из каждого инокулированного участка отделенного листа вырежьте 10–12 кружков диаметром 0,5 см и размельчите их в 4,5 мл PBS. Приготовьте разведения, как для прямого выделения культуры (раздел 3.5) в PBS, и нанесите по 50 мкл каждого разведения на среду Wilbrink-N. Повторите посев троекратно. Инкубируйте чашки Петри при 25–27 °С и через 5–7 дней проверьте на предмет возникновения колоний, напоминающих *X. fragariae*.

3.6.4 Обогащение *in vitro* – ПЦР на основе теста отделенного листа

Используйте чашки Петри со средой Wilbrink-N с нанесенным экстрактом после обогащения *in planta*, как описано в разделе 3.6.3, после инкубации при 25–27 °С в течение 4 дней. Смойте колонии бактерий с поверхности среды в 3–5 мл PBS и используйте смыв для ПЦР-анализа (раздел 3.9). Этот метод является модификацией теста ПЦР с биообогащением, описанного Schaad *et al.* (1995).

3.7 ИФА

Специфичность ИФА с двумя коммерческими поликлональными анти-*X. fragariae* сыворотками была валидирована López *et al.* (2005). Rowhani *et al.* (1994) показали, что тест ИФА с применением поликлональных антител позволяет обнаружить 34 штамма *X. fragariae*, и антитела не демонстрируют перекрестного реагирования на другие близкородственные патогены и прочие бактерии, выделяемые из растений земляники. По данным Rowhani *et al.* (1994) и Civerolo *et al.* (1997b), чувствительность теста ИФА применительно к выявлению *X. fragariae* составила 10⁵ КОЕ/мл.

В качестве положительного и отрицательного контролей в каждом микротитровальном планшете используйте клеточные суспензии, приготовленные из чистых культур соответственно *X. fragariae* и штамма другой бактерии. Рекомендуется определять надлежащее рабочее разведение каждой поликлональной антисыворотки.

3.7.1 Непрямой ИФА

Смешайте по 210 мкл каждого исследуемого образца, клеточной суспензии, положительной на *X. fragariae* (примерно 10⁹ КОЕ/мл), клеточной суспензии, отрицательной на *X. fragariae* (примерно 10⁹ КОЕ/мл) и отрицательного контроля (взвесь здорового материала растения земляники) с 210 мкл покрывающего буфера (1,59 г Na₂CO₃, 2,93 г NaHCO₃, дистиллированная вода до 1 л) и добавьте 200 мкл смеси образца и буфера в каждую из двух лунок микротитровального планшета (PolySorp (Nunc¹) или аналог). Для получения отрицательного контроля из растительного материала размельчите примерно 0,1 г ткани здорового листа, черешка или розетки земляники в 0,9 мл PBS и добавьте 0,9 мл покрывающего буфера.

Оставьте планшет на ночь при температуре 4 °С. На следующий день троекратно промойте планшет с применением PBS, содержащего 0,05% Твин-20 (PBS-T) (8 г NaCl, 0,2 г KCl, 0,2 г Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 г KН₂PO₄, 500 мкл Твин-20, дистиллированная вода до 1 л). После промывания добавьте в каждую из тестовых лунок по 200 мкл блокирующего буфера (PBS, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) или обезжиренного сухого молока) и инкубируйте при 37 °С в течение 1 ч. Троекратно промойте планшет с помощью PBS-T.

В соответствии с инструкциями изготовителя приготовьте надлежащее рабочее разведение анти-*X. fragariae* сыворотки в PBS и добавьте по 200 мкл в каждую тестовую лунку. Инкубируйте при 37 °С в течение 2 ч, а затем троекратно промойте планшет с помощью PBS-T. Добавьте в каждую

лунку по 200 мкл конъюгата антител и фермента в надлежащем разведении в PBS, содержащем 0,2% БСА. Инкубируйте при 37 °С в течение 1 ч, а затем четыре раза промойте планшеты с помощью PBS-Т. Добавьте в каждую тестовую лунку по 200 мкл свежеприготовленного субстрата (1 мг паранитрофенилфосфата/мл субстратного буфера, рН 9,8). Выдержите в темноте при комнатной температуре в течение 15, 30 и 60 мин и считывайте уровень поглощения на 405 нм.

3.7.2 "Сэндвич"-ИФА (DAS-ИФА)

Для постановки ИФА методом двойных антител ("сэндвич") добавьте 200 мкл анти-*X. fragariae* сыворотки в надлежащем разведении в покрывающем буфере в каждую лунку на двух микротитровальных планшетах (PolySorp (Nunc¹) или аналог). Инкубируйте при 37 °С в течение 4 ч и затем троекратно промойте лунки с применением PBS-Т. Добавьте в каждую из двух лунок на каждом планшете по 200 мкл тканевого мацерата каждого образца, а также положительный и отрицательный контроль, как описано применительно к непрямому ИФА (раздел 3.7.1), и оставьте на ночь при 4 °С. На следующий день после троекратного промывания планшетов с помощью PBS-Т добавьте в каждую лунку по 200 мкл конъюгата антител и фермента в надлежащем разведении в PBS, содержащем 0,2% БСА. Инкубируйте при 37 °С в течение 3 ч. После четырехкратного промывания планшетов с применением PBS-Т добавьте в каждую тестовую лунку по 200 мкл свежеприготовленного субстрата (1 мг паранитрофенилфосфата/мл субстратного буфера, рН 9,8). Выдержите в темноте при комнатной температуре в течение 15, 30 и 60 мин и считывайте уровень поглощения на 405 нм.

3.7.3 Интерпретация результатов ИФА

Результат ИФА считается отрицательным, если средняя величина оптического поглощения двойных лунок, содержащих тканевой мацерат, $< 2 \times$ среднее поглощение лунок с отрицательным контролем, содержащим тканевой мацерат от здоровых растений земляники.

Результат ИФА считается положительным, если 1) средняя величина оптического поглощения двойных лунок $> 2 \times$ среднее поглощение лунок с отрицательным контролем, содержащим тканевой мацерат от здоровых растений земляники и 2) средняя величина оптического поглощения лунок с положительным контролем $> 2 \times$ среднее поглощение лунок с отрицательным контролем.

Отрицательные результаты ИФА для лунок с положительным контролем указывают на то, что тест был выполнен неверно и/или имела место деградация реагентов или истек срок их годности.

Положительные результаты ИФА для лунок с отрицательным контролем указывают на кросс-контаминацию или на неспецифическое связывание антител. В таких случаях следует повторить тест со свежим тканевым материалом или поставить тест, основанный на другом принципе.

3.8 Иммунофлюоресценция

Процедуры иммунофлюоресценции для выявления фитопатогенных бактерий описаны в работах De Boer (1990) и EPPO (2009). В продаже имеются три вида поликлональной анти-*X. fragariae* сыворотки (табл. 1), валидированные с использованием флюоресцеин-изотиоцианат (FITC)-конъюгированных кроличьих иммуноглобулинов (López *et al.*, 2005). Иммунофлюоресцентный анализ с использованием этих антител позволяет выявлять 10^3 – 10^4 КОЕ/мл *X. fragariae* в ткани земляники (Calzolari and Mazzucchi, 1989).

Исследуемые образцы состоят из разведений тканевых мацератов (1:10, 1:100 и 1:1000) и клеточных взвесей (10^6 КОЕ/мл) положительного *X. fragariae* и отрицательного не-*X. fragariae*

бактериального штамма в PBS или дистиллированной воде. Отрицательные контроли должны представлять собой экстракт из тканей здоровых растений.

Добавьте аликвоты (20 мкл) исследуемых образцов и взвесей положительных и отрицательных контролей в отдельные лунки многолуночного предметного стекла. Высушите препараты на воздухе и фиксируйте их пламенем или погружением в ацетон на 10 мин с последующим высушиванием на воздухе. Препараты можно хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, пока не потребуются. Разведите первичные антитела к *X. fragariae* в PBS, содержащем 10% обезжиренного сухого молока. Выберите минимальную концентрацию антител, дающую хорошее окрашивание при наличии до 100 положительных клеток в поле зрения при микроскопировании. Рекомендуется использовать два различных разведения антител для выявления перекрестных реакций с другими бактериями. Внесите по 20 мкл первичных антител в каждую лунку и инкубируйте препараты во влажной камере при комнатной температуре или при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30–60 мин. Промойте стекла в PBS и затем погрузите на 10 мин в тот же буфер. Разведите FITC-конъюгированные вторичные антитела в PBS (оптимальное разведение обычно варьируется от 1:20 до 1:200). Заполните лунки предметных стекол вторичными антителами и инкубируйте во влажной камере при комнатной температуре или при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30–60 мин. Повторите этап промывания, а затем высушите стекла на воздухе. Поместите покровные стекла на препараты с помощью заливочной среды (90 мл глицерина, 10 мл PBS) с добавлением 1 мг/мл парафенилендиамина и микроскопируйте препараты с применением масляной иммерсии при 500–1000-кратном увеличении. Подсчитайте флуоресцирующие клетки, имеющие тот же размер, что и клетки референтного штамма *X. fragariae* (López *et al.*, 2005).

3.8.1 Интерпретация результатов теста иммунофлуоресценции

Тест иммунофлуоресценции считается отрицательным, если флуоресцирующие в зеленом цвете клетки с характерной морфологией *X. fragariae* наблюдаются в лунках с положительным контролем, но не наблюдаются в лунках с исследуемым образцом и с отрицательным контролем.

Тест иммунофлуоресценции считается положительным, если флуоресцирующие в зеленом цвете клетки с характерной морфологией *X. fragariae* наблюдаются в лунках с положительным контролем и с исследуемым образцом, но не наблюдаются в лунках с отрицательным контролем.

Поскольку содержание 10^3 клеток/мл рассматривается как нижний предел для надежного определения методом флуоресценции, положительными считаются образцы с $>10^3$ клеток/мл (De Boer, 1990). При получении образцов с $<10^3$ клеток/мл результаты теста иммунофлуоресценции могут расцениваться как неопределенные. В таком случае следует проводить дальнейшее тестирование или повторно взять образец. Образцы с большим числом клеток, которые флуоресцируют не полностью или слабо по сравнению с положительным контролем, требуют дальнейшего тестирования с иными разведениями или другим источником антител.

Таблица 1. Поликлональные антитела к *Xanthomonas fragariae*, рекомендуемые в настоящее время для использования в серологических тестах

Источник	Рекомендуемое использование [†]
Neogen Europe ¹	Выявление методом иммунофлуоресценции или твердофазного иммуноферментного анализа с применением двойных антител ("сэндвич"-ИФА)
Plant Research International, Wageningen UR	Выявление методом иммунофлуоресценции
Bioreba AG ¹	Выявление методом твердофазного иммунофлуоресцентного анализа с применением двойных антител ("сэндвич"-ИФА)

[†] Валидировано в исследовании эффективности тестов, финансируемом из средств Европейского союза (SMT-4-CT98-2252) (López *et al.*, 2005).

3.9 ПЦР

Методы ПЦР, описанные в настоящем диагностическом протоколе, за исключением вложенной ПЦР, разработанной Zimmerman *et al.* (2004), были валидированы в исследовании эффективности тестов, финансируемом из средств Европейского союза (SMT-4-СТ98-2252) (López *et al.*, 2005). По имеющимся сообщениям, протоколы вложенной ПЦР повышают чувствительность вплоть до 100 раз по сравнению со стандартной ПЦР (Roberts *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 2004).

Протоколы выделения ДНК из растительных образцов и постановки ПЦР, описанные в работах Pooler *et al.* (1996) и Hartung and Pooler (1997), были валидированы (López *et al.*, 2005). По данным Stöger and Ruppitsch (2004), для выделения ДНК до амплификации при исследовании большого числа образцов листьев без признаков повреждений можно использовать модифицированный протокол с применением набора для ПЦР на растениях REDEExtract-N-Amp (Sigma¹). Имеются и другие коммерческие наборы для выделения ДНК, для вложенной ПЦР и ПЦР с использованием других праймеров (Roberts *et al.*, 1996); однако они еще не прошли валидацию (López *et al.*, 2005).

Описаны два теста ПЦР в реальном времени для выявления *X. fragariae* (Weller *et al.*, 2007; Vandroemme *et al.*, 2008) в тканях растения земляники. Метод ПЦР в реальном времени, разработанный Weller *et al.* (2007), позволяет дифференцировать *X. fragariae* и *X. arboricola*, патовар *fragariae*. Этот метод основан на применении праймеров гена *gyrB*, уникального для *X. fragariae*, и гена *pep*, уникального для *X. arboricola*, патовара *fragariae*. Метод ПЦР в реальном времени, разработанный Vandroemme *et al.* (2008), продуцирующий ампликон длиной 41 пару оснований (п.о.), основан на применении праймеров, полученных из ампликона длиной 550 п.о. из ПЦР, описанной Pooler *et al.* (1996). Оба метода потенциально полезны для выявления низких уровней *X. fragariae* при бессимптомном или латентном течении инфекции.

3.9.1 Выделение ДНК

Наилучшие результаты в ходе сравнительных межлабораторных испытаний, проведенных под эгидой Европейского союза (SMT-4-СТ98-2252), показала тест-система DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen¹), модифицированная для выделения ДНК микоплазмоподобного организма (МПО) (Lopez *et al.*, 2005).

Для выделения ДНК возьмите: 250 мкл тканевого мацерата исследуемого образца; аналогично приготовленный растительный материал от здорового растения земляники и стерильный PBS или воду высокой степени очистки в качестве отрицательных контролей; клеточную взвесь чистой культуры *X. fragariae* в качестве положительного контроля. Добавьте 250 мкл экстракционного буфера на основе цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) (50 мл 1 М трис-НСI, 50 мл 5 М этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 40,9 г NaCl, 5 г поливинилпирролидона (ПВП)-40, 12,5 г ЦТАБ, дистиллированной воды до 500 мл) и 4 мкл рибонуклеазы А (100 мг/мл), перемешайте путем осторожного пятикратного переворачивания и инкубируйте при 65 °С в течение 10 мин, периодически переворачивая пробирку. Затем следуйте инструкции изготовителя до этапа элюции ДНК.

Для высвобождения ДНК добавьте в колонку 100 мкл 10 мМ трис-НСI, pH 9 (подогретой до 65 °С) и центрифугируйте при $\geq 6\ 000\ g$ в течение 1 мин. Добавьте 100 мкл трис-НСI и повторите этап центрифугирования. Доведите раствор ДНК до объема 300 мкл с помощью буфера трис-ЭДТА (ТЭ) и добавьте 200 мкл 5 М аммония ацетата и 1 мл абсолютного этилового спирта. Тщательно перемешайте и инкубируйте при -20 °С в течение от 1 ч до суток. После инкубации центрифугируйте при 17 000 g в течение 10 мин. Удалите супернатант, промойте осадок, содержащий ДНК, в 1 мл абсолютного этилового спирта и вновь центрифугируйте при 16 000 g в течение 5 мин. Вновь удалите супернатант, промойте осадок, содержащий ДНК, в 500 мкл 80%-ного этилового спирта и центрифугируйте при 16 000 g в течение 5 мин. Удалите

супернатант. После высыхания осадка ресуспендируйте его в 50 мкл стерильной дистиллированной воды.

3.9.2 Мультиплексная ПЦР

3.9.2.1 Протокол Хартунга и Пулера (Hartung and Pooler, 1997)

Специфичность данного протокола была подтверждена в исследовании с 30 изолятами *X. fragariae*, 36 изолятами *X. campestris* (представляющего 19 патоваров) и 62 изолятами эпифитных бактерий, часто выделяемых из растений земляники. Среди всех изолятов только *X. fragariae* давали положительный результат. Данный протокол мультиплексной ПЦР позволяет выявить 10^3 КОЕ/мл в растительной ткани (Pooler *et al.*, 1996; Hartung and Pooler, 1997).

Pooler *et al.* (1996) описали следующие три набора праймеров:

241A: 5'-GCCCGACGCGAGTTGAATC-3'

241B: 5'-GCCCGACGCGCTACAGAC TC-3'

245A: 5'-CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3'

245B: 5'-CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3'

295A: 5'-CGT TCC TGGCCGATT AATAG-3'

295B: 5'-CGCGTTCCT GCG TTTTTCG-3'

ПЦР проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл буфера (PerkinElmer¹) (содержит 15 mM MgCl₂), 5,0 мкл дезоксирибонуклеотидтрифосфата (дНТФ) (1 mM), по 2,0 мкл (0,4 мкМ) каждого из шести праймеров, 0,5 мкл Taq-ДНК-полимеразы и 5,0 мкл образца ДНК. Параметры циклов ПЦР: первоначальный этап при температуре 95 °С в течение 15 мин; 35 циклов при 95 °С в течение 1 мин, при 57 °С в течение 1 мин и при 72 °С в течение 1 мин; завершающий этап элонгации при 72 °С в течение 7 мин. Продукты ПЦР анализируют путем электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с применением буфера на основе 0,5× трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) (EPPO, 2006).

Как было ранее описано (Pooler *et al.*, 1996; Hartung and Pooler, 1997), ПЦР-ампликоны, специфичные для *X. fragariae*, имеют длину 300, 550 и 615 п.о. Когда экстракт получен из растений, инфицированных *X. fragariae*, обычно присутствует ампликон 300 п.о., однако периодически могут появляться и другие ампликоны (550 и 615 п.о.).

Праймеры 245А и 245В можно использовать для стандартной ПЦР с использованием вышеописанной процедуры, и в таком случае будет получен ампликон длиной 300 п.о.

3.9.3 Вложенная ПЦР

Вложенная ПЦР, описанная Moltmann and Zimmerman (2005), с использованием праймеров, разработанных Pooler *et al.* (1996) и Zimmerman *et al.* (2004), рекомендуется для выявления *X. fragariae* в растениях земляники – как с признаками болезни, так и в бессимптомных (после заморозки или в свежих образцах). Альтернативный метод подтверждения – вложенная ПЦР, описанная Roberts *et al.* (1996).

3.9.3.1 Протокол Мольтманна и Циммермана (Moltmann and Zimmerman, 2005)

Специфичность данного протокола была подтверждена в исследовании с 14 изолятами *X. fragariae*, 30 изолятами *X. campestris* (представляющего 14 патоваров) и 17 изолятами неидентифицированных бактерий, присутствующих в листьях земляники. Кроме того, специфичность внешнего праймера была верифицирована Хартунгом и Пулером (Hartung and Pooler, 1997) (раздел 3.9.2.1). При тестировании изолятов перекрестных реакций не наблюдалось. Данная методика ПЦР была успешно применена для тестирования образцов, собранных в ходе

исследования растений земляники и завезенных растений (Moltmann and Zimmerman, 2005). Протокол позволяет выявить до 200 фг ДНК на одну реакцию и в 100 раз более чувствителен, чем стандартная ПЦР (Zimmerman *et al.*, 2004).

Поместите ткани листа, черешка и розетки (30–70 г) в 10–20 мл 0,01 М натрийфосфатного буфера (рН 7,2) на грамм ткани и оставьте на ночь при комнатной температуре. На следующий день выделите ДНК и анализируйте ее путем единичной и вложенной ПЦР по методике, описанной Zimmerman *et al.* (2004).

Праймеры:

245A: 5'-CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3'
245B: 5'-CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3'
245.5: 5'-GGTCCAGTGGAGATCCTGTG-3'
245.267: 5'-GTTTTTCGTTACGCTGAGTACTG-3'

ПЦР проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей буфер для ПЦР (10 мМ трис-НСl, 50 мМ КСl, 0,08% Nonidet P-40, 2,5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ каждого дНТФ, 0,2 мкМ каждого праймера и 0,5 мкл Taq ДНК-полимеразы. Параметры циклов ПЦР: первоначальный этап денатурации при температуре 94 °С в течение 4 мин; 35 циклов при 94 °С в течение 1 мин, при 68 °С в течение 1 мин и при 72 °С в течение 1 мин; завершающий этап элонгации при 72 °С в течение 7 мин. Для вложенной ПЦР: после амплификации ДНК с первым раундом праймеров (245А и 245В) используют 1 мкл продукта первой ПЦР в качестве матрицы для второй ПЦР с внутренними праймерами 245.5 и 245.267. Применяются такие же параметры циклов, за исключением температуры отжига для внутренних праймеров 245.5 и 245.267, которая составляет 62 °С. Продукты ПЦР анализируют путем электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле с применением буфера на основе 0,5× ТАЕ (EPPO, 2006).

Ампликоны ПЦР, специфичные для *X. fragariae*, имеют длину 300 п.о. в первом раунде ПЦР с использованием праймеров 245А и 245В и 286 п.о. во вложенной ПЦР с использованием внутренних праймеров 245.5 и 245.267. При высоких концентрациях матрицы иногда амплифицируется второй фрагмент длиной примерно 650 п.о.

3.9.3.2 Протокол Робертса и соавт. (Roberts *et al.*, 1996)

Специфичность данного протокола была подтверждена в исследовании с 30 изолятами *X. fragariae*, 17 изолятами *X. campestris* (представляющего 16 патоваров) и 9 изолятами непатогенных ксантомонад, выделенных из земляники. При тестировании изолятов перекрестных реакций не наблюдалось. Данный протокол вложенной ПЦР позволил выявлять вплоть до примерно 18 клеток *X. fragariae* в растительной ткани (Roberts *et al.*, 1996).

Roberts *et al.* (1996) описали следующие полувложенные праймеры:

XF9: 5'-TGGGCCATGCCGGTGGAACTGTGTGG-3'
XF11: 5'-TACCCAGCCGTCGCAGACGACCCGG-3'
XF12: 5'-TCCCAGCAACCCAGATCCG-3'

ПЦР проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей буфер для ПЦР (10 мМ трис-НСl, 50 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ каждого дНТФ, 0,2 мкМ каждого праймера и 0,5 мкл Taq-ДНК-полимеразы. Параметры циклов ПЦР: первоначальный этап денатурации при температуре 95 °С в течение 2 мин; 30 циклов при 95 °С в течение 30 с, при 65 °С в течение 30 с и при 72 °С в течение 45 с; завершающий этап элонгации при 72 °С в течение 5 мин. Для полувложенной ПЦР: после амплификации ДНК с первым раундом праймеров (XF9 и XF11) используют 3 мкл продукта первой ПЦР в качестве матрицы для второй ПЦР с праймерами XF9 и XF12. Применяются такие

же параметры циклов, как и для первого раунда, за исключением температуры отжига, которая составляет 58 °С. Продукты ПЦР анализируют путем электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с применением буфера на основе 0,5× TAE (EPP0, 2006).

Ампликоны ПЦР, специфичные для *X. fragariae*, имеют длину 537 п.о. в первом раунде ПЦР с использованием праймеров XF9 и XF11 и 458 п.о. – в полувлоченной ПЦР с использованием праймеров XF9 и XF12.

3.9.4 ПЦР в реальном времени

3.9.4.1 Протокол Веллера и соавт. (Weller *et al.*, 2007)

Специфичность данного протокола была подтверждена в исследовании с 10 изолятами *X. fragariae* и 24 изолятами *Xanthomonas* (группа из 12 видов и 17 патоваров). Среди всех изолятов только *X. fragariae* давали положительный результат. Данный протокол ПЦР в реальном времени позволил выявлять до 10³ КОЕ в ткани одной листовой пластинки (Weller *et al.*, 2007). Протокол был подвергнут дополнительной валидации в одной из лабораторий в Нидерландах; данные валидации имеются в базе данных по диагностической экспертизе ЕСОЗР (<http://dc.eppo.int/validationlist.php>).

Используются следующие праймеры на основе гена *gyrB* и пробы TaqMan, ковалентно маркированные на конце 5' сигнальным красителем JOE и на конце 3' – гасящим красителем TAMRA:

Xf *gyrB*-F: 5'-CCG CAG CGA CGC TGA TC -3'

Xf *gyrB*-R: 5'-ACG CCC ATT GGC AAC ACT TGA-3'

Xf *gyrB*-P: 5'-TCC GCA GGC ACA TGG GCG AAG AAT TC-3'

ПЦР проводят путем добавления 4 мкл матрицы ДНК к реакционной смеси, содержащей 1× TaqMan буфер А (Applied Biosystems¹), 5,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ дНТФ (Promega¹), 300 нМ каждого праймера, 100 нМ зонда и 0,63 ед AmpliTaq Gold ДНК-полимеразы (Applied Biosystems¹). Параметры циклов ПЦР: начальный этап активации 2 мин при 50 °С, затем 15 мин при 95 °С, затем 40 циклов по 10 с при 95 °С и 1 мин при 60 °С.

3.9.5 Интерпретация результатов ПЦР

3.9.5.1 Стандартная ПЦР

Тест ПЦР считается отрицательным, если ни одного из ампликонов ожидаемого размера, специфичных для *X. fragariae*, не обнаруживается ни в образцах, ни в отрицательных контролях, однако соответствующие ампликоны выявляются во всех положительных контролях.

Тест ПЦР считается положительным, если обнаруживается хотя бы один из ампликонов ожидаемого размера, специфичных для *X. fragariae*, при условии что он не амплифицируется ни из одного из отрицательных контролей.

Если ожидаемый ампликон продуцируется из положительного контроля, содержащего *X. fragariae* в воде, и при этом положительные контроли с *X. fragariae* в экстракте растения дают отрицательные результаты, можно подозревать ингибирование ПЦР. В таких случаях рекомендуется повторить ПЦР с разведениями экстракта 1:10, 1:100 и 1:1000 или повторить выделение ДНК.

3.9.5.2 ПЦР в реальном времени

ПЦР в режиме реального времени будет считаться достоверной только при наличии следующих условий:

- положительный контроль производит кривую амплификации со специфичными для патогенов праймерами;
- кривая амплификации не видна (т. е. значение порогового цикла (Ct) – 40) с отрицательным контролем экстракции и отрицательным контролем амплификации.

Если также используются *COX*-праймеры внутреннего контроля, то отрицательный контроль (если используется), положительный контроль и каждый из тестируемых образцов должны производить амплификационную кривую. Если образцы не приводят к амплификации с праймерами внутреннего контроля, это может свидетельствовать, например, о том, что выделение ДНК не удалось, что ДНК не была включена в реакционную смесь, что в выделенной нуклеиновой кислоте присутствуют соединения, подавляющие ПЦР, либо что ДНК деградировала.

Образец будет считаться положительным, если он производит типичную амплификационную кривую. Значение Ct следует верифицировать в каждой лаборатории при проведении теста в первый раз.

3.9.6 Контроли для молекулярных тестов

Для того чтобы результат анализа считался надежным, каждая серия выделения нуклеиновых кислот и амплификации нуклеиновой кислоты вредного организма-мишени или нуклеиновой кислоты-мишени должна сопровождаться постановкой надлежащих контролей, выбор которых зависит от типа использованного анализа и требуемого уровня достоверности. Для ПЦР положительный контроль нуклеиновой кислоты, внутренний контроль и отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы) являются тем минимумом, который следует использовать.

Положительные контроли следует приготавливать в зоне, отделенной от той, где будет проводиться исследование образцов.

Положительный контроль нуклеиновой кислоты. Данный контроль используется для отслеживания эффективности амплификации при проведении ПЦР. В этих целях можно использовать предварительно подготовленную (сохраненную) нуклеиновую кислоту, полногеномную ДНК или синтетическую контрольную панель (например, клонированный продукт ПЦР). В настоящем протоколе в качестве положительного контроля нуклеиновой кислоты рекомендуется использовать клетки чистой культуры *X. fragariae* (10^4 – 10^6 КОЕ/мл).

Внутренний контроль. Для стандартной ПЦР и ПЦР в реальном времени конститутивный ген (КГ, "ген домашнего хозяйства"), такой как *COX* (Weller *et al.*, 2000), рибосомный ген 16S (р)ДНК (Weisberg *et al.*, 1991) или *GADPH* (Mafra *et al.*, 2012), следует включать в протокол, чтобы предотвратить возможность ложноотрицательных результатов в связи с неудачей при выделении нуклеиновой кислоты из-за ее деградации или вследствие наличия ингибиторов ПЦР.

Отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы). Данный контроль необходим для стандартной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени, чтобы исключить ложноположительные результаты, обусловленные загрязнением во время приготовления реакционной смеси. Для этого на этапе амплификации добавляют воду для ПЦР, которую использовали при подготовке реакционной смеси, или стерильный PBS.

Положительный контроль выделения. Этот контроль используется для того, чтобы обеспечить достаточное для ПЦР-амплификации качество нуклеиновой кислоты, полученной от мишени. Нуклеиновую кислоту выделяют из зараженной ткани растения или из здоровой растительной ткани, в которую была внесена мишень в концентрации, считающейся нижним пределом выявления по протоколу.

Положительный контроль составляет примерно 1/10 от количества ткани листьев каждого растения, использованного для выделения ДНК. В настоящем протоколе в качестве положительного контроля рекомендуется использовать тканевые мацераты, в которые внесены клетки эталонного штамма *X. fragariae* в количестве 10^6 КОЕ/мл.

В ходе ПЦР (в особенности вложенной ПЦР) следует принять меры для предотвращения перекрестной контаминации, вызванной аэрозолями от положительного контроля или от положительных образцов. При необходимости использованный в лаборатории положительный контроль следует секвенировать, так чтобы полученную последовательность можно было легко сравнить с последовательностью, полученной от ПЦР-ампликонов правильного размера. Другим способом является изготовление синтетических положительных контролей с известной последовательностью, которую можно сравнить с ПЦР-ампликонами нужного размера.

Отрицательный контроль выделения. Этот контроль используют для отслеживания контаминации во время выделения нуклеиновых кислот и/или перекрестного взаимодействия с тканью растения-хозяина. Контроль состоит из нуклеиновой кислоты, которую выделяют из незараженной ткани растения-хозяина, а затем амплифицируют, либо из экстракта тканевого мацерата образца, ранее давшего отрицательные результаты при тестировании на *X. fragariae*. Рекомендуется ставить несколько контролей в тех случаях, когда ожидается большое количество положительных образцов.

4. Идентификация

Минимальные требования для идентификации заключаются в выделении культуры бактерии и получении положительного результата по каждому из трех методов выявления: 1) тест непрямой ИФА, ИФА методом двойных антител (раздел 3.7) или тест иммунофлюоресценции (раздел 3.8) с использованием поликлональных антител; 2) ПЦР (раздел 3.9); 3) тест на патогенность путем инокуляции растения земляники с целью проверки на предмет выполнения постулатов Коха (разделы 4.4 и 3.6). Для более детальной характеристики обнаруженного штамма можно проводить дополнительные тесты (раздел 4). Во всех тестах должны использоваться положительные и отрицательные контроли.

В случае латентной инфекции и при исследовании растений с отсутствием симптоматики необходимо после начального скрининг-теста выделить микроорганизм и идентифицировать его, в частности путем тестирования на патогенность в чистой культуре и на соблюдение постулатов Коха.

4.1 Биохимические и физиологические тесты

X. fragariae обладает культуральными характеристиками, свойственными всем ксантомоадам. Бактериальные клетки представляют собой грамотрицательные палочки с одним полярным жгутиком. Бактерии не восстанавливают нитраты, каталазный тест положительный, аспарагин не используется в качестве единственного источника углерода и азота (Bradbury, 1977; Bradbury, 1984; Schaad *et al.*, 2001). Слабое продуцирование кислот из углеводов. Колонии, выращенные на средах YPGA и Wilbrink-N, имеют слизистую, выгнутую и блестящую поверхность (Dye, 1962; van den Mooter and Swings 1990; Swings *et al.*, 1993; Schaad *et al.*, 2001). Виды, принадлежащие к *Xanthomonas*, легко отличить от представителей других родов аэробных грамотрицательных палочковидных и иных желтопигментированных бактерий по характерным признакам, приведенным в таблице 2 в соответствии с описанием, которое дали Schaad *et al.* (2001).

Таблица 2. Фенотипические признаки для дифференцирования *Xanthomonas* от *Pseudomonas* и желтопигментированных бактерий *Flavobacterium* и *Pantoea* (Schaad *et al.*, 2001)

Характеристики	<i>Xanthomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pantoea</i>
Наличие жгутика	1, полярный	>1, полярные	Отсутствует	Перитрих
Ксантоминадин	Да	Нет	Нет	Нет
Флюоресценция	Нет	Варьирует	Нет	Нет
Леван из сахарозы	Да	Варьирует	Нет	Нет
H ₂ S из цистеина	Да	Нет	Нет	Нет
Тест на оксидазу	Отрицательный или слабо-положительный	Варьирует	Положительный	Отрицательный
Ферментация	Нет	Нет	Нет	Да
Рост в 0,1%-ном растворе трифенилтетразолийхлорида (ТТХ)	Нет	Да	Да	Да

В таблице 3 приведены эталонные штаммы *X. fragariae*, имеющиеся в различных коллекциях, которые рекомендованы для использования в качестве положительных контролей в биохимических и физиологических тестах.

Таблица 3. Эталонные штаммы *Xanthomonas fragariae*

Штамм	Источник
ATCC 33239	Американская коллекция типовых культур, Манассас, Вирджиния, США
CFBP 2510	Французская коллекция фитопатогенных бактерий, Фитобактериологическая станция INRA, Анжер, Франция
ICMP 5715	Международная коллекция микроорганизмов растений, Окленд, Новая Зеландия
BCCM/LMG 708	Бельгийские координированные коллекции микроорганизмов / Коллекция лаборатории микробиологии и генетики микроорганизмов, Гент, Бельгия
NCPPV 1469	Национальная коллекция фитопатогенных бактерий, Центральная научная лаборатория, Йорк, Соединенное Королевство; Коллекция культур Службы защиты растений, Вагенинген, Нидерланды
NCPPV 1822	Национальная коллекция фитопатогенных бактерий, Центральная научная лаборатория, Йорк, Соединенное Королевство; Коллекция культур Службы защиты растений, Вагенинген, Нидерланды

В таблице 4 показаны наиболее полезные характеристики для дифференцирования *X. fragariae* от других видов *Xanthomonas* (Schaad *et al.*, 2001; Janse *et al.*, 2001; EPPO, 2006).

Таблица 4. Диагностические тесты для дифференцирования *Xanthomonas fragariae* от представителей "группы *Xanthomonas campestris*" и *Xanthomonas arboricola*, патовара *fragariae*

Тест	<i>X. fragariae</i>	<i>X. campestris</i>	<i>X. arboricola</i> , патовар <i>fragariae</i>
Рост при 35 °С	–	+	н/о
Рост в присутствии 2% NaCl	–	+	+
Гидролиз эскулина	–	+	+
Разжижение желатина	+	В	+
Расщепление белка	–	+	н/о
Гидролиз крахмала	+	В	+
Образование уреазы	–	–	–
Образование кислоты из:			
арабинозы	–	+	н/о
галактозы	–	+	+
трегалозы	–	+	н/о
целлобиозы	–	+	+

н/о – не определено; В – вариабельная реакция.
Источник: Janse et al. (2001) и EPPO (2006).

Можно выполнять биохимическую характеризацию выделенных штаммов с использованием коммерческих систем и идентифицировать *X. fragariae* путем получения набора специфичных характеристик на тест-полосках API 20 NE и API 50 CH (BioMérieux¹) (EPPO, 2006).

Применяя полоски API 20 NE¹, следуйте инструкциям изготовителя для приготовления суспензий из исследуемой культуры в возрасте 48 ч и культуры эталонного штамма, выращенных на среде Wilbrink-N, для последующего нанесения на полоски. Инкубируйте при 25–26 °С и считывайте результат через 48 и 96 ч. Результаты по ферментативной активности, полученные через 48 ч, и по усвоению субстрата – через 96 ч, сравнивают с соответствующими параметрами, характерными для *X. fragariae* (таблица 5).

Таблица 5. Реагирование *Xanthomonas fragariae* при контакте с полосками API 20 NE

Тест	Реакция (через 48 или 96 ч) [†]
Ферментация глюкозы	–
Аргинин	–
Уреаза	–
Эскулин	+
Желатин	+ (слабо)
Паранитрофенил-β-d-галактопиранозидаса (ПНПГ)	+
Ассимиляция следующих соединений:	
Глюкоза	+
Арабиноза	–
Манноза	+
Маннитол	–
N-ацетилглюкозамин	+
Мальтоза	–
Глюконат	–
Капрат	–
Адипат	–
Малат	+
Цитрат	–
Фенилацетат	–

[†] Исследованы общие реакции для 90% штаммов *X. fragariae* (López *et al.*, 2005).

Для использования тест-полосок API 50 CH¹ приготовьте суспензии бактериальных клеток с оптической плотностью ОП_{600 нм} = 1,0 в PBS. Добавьте 1 мл суспензии к 20 мл модифицированной среды С (0,5 г NH₄H₂PO₄, 0,5 г K₂HPO₄, 0,2 г MgSO₄, 5 г NaCl, 1 г дрожжевого экстракта, 70 мл бромтимолового синего (0,2%), дистиллированной воды до 1 л; pH 6,8) (Dye, 1962). Инокулируйте полоски в соответствии с инструкциями изготовителя. Инкубируйте при 25 °C в аэробных условиях и считывайте результат через 2, 3 и 6 дней. Усвоение различных углеводов проявляется желтым окрашиванием в лунках по истечении периода инкубации (табл. 6).

Таблица 6. Реагирование *Xanthomonas fragariae* при контакте с полосками API 50 CH

Тест [†]	Реакция (через 6 дней)
D-Арабиноза	Варьирует
Галактоза	+
D-Глюкоза	+
D-Фруктоза	+
D-Манноза	+
N-ацетилглюкозамин	+
Эскулин	+
Сахароза	+
Трегалоза	+
D-Ликсоза	+

L-Фукоза	+
----------	---

[†] *X. fragariae* не усваивает остающиеся сахара в тест-полосках API 50 CH (Lopez *et al.*, 2005).

4.1.1 Определение параметров метиловых эфиров жирных кислот

Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК), связанные с цитоплазматическими и внешними мембранами грамотрицательных бактерий, можно использовать для идентификации таких микроорганизмов (Sasser, 1990). В работе Dickstein *et al.* (2001) дан перечень специфических жирных кислот, используемых для определения рода грамотрицательных и грамположительных бактерий. Идентификация основана на сравнении типов и относительных количеств жирных кислот в профиле неизвестного штамма с профилями большого числа разнообразных штаммов, содержащихся в библиотечной базе данных (например, в библиотеке TSBA40). Для получения воспроизводимых результатов крайне важно, чтобы колонии бактерий выращивались при унифицированных условиях относительно времени, температуры и питательной среды. Штаммы *X. fragariae* содержат три основных типа жирных кислот: 16:1-омега-7 *цис*, 15:0 *антеизо* и 15:0 *изо*. Некоторые исследуемые штаммы обнаруживают высокую степень соответствия тому или иному библиотечному профилю, однако другие имеют отличающиеся жирнокислотные профили, которые не в полной мере совпадают с референтными. Исследования показали, что штаммам *X. fragariae* свойственно значительное разнообразие и их можно разделить по меньшей мере на четыре отдельные жирнокислотные группы (Roberts *et al.*, 1998). Для профилирования *X. fragariae* по параметрам МЭЖК рекомендуется применять метод, описанный Roberts *et al.* (1998). Исследуемые штаммы выращивают на триптиказо-соевом агаре при 24 °C в течение 48 ч, затем проводят процедуру экстракции жирных кислот и экстракт анализируют с использованием системы Sherlock для идентификации микроорганизмов (MIDI) (Ньюарк, Делавэр, Соединенные Штаты).

4.1.1.1 Интерпретация результатов профилирования МЭЖК

Тест профилирования МЭЖК считается положительным, если профиль исследуемого штамма идентичен профилю положительного контроля или эталонного штамма *X. fragariae*. Анализ жирных кислот доступен из MIDI и Национальной коллекции фитопатогенных бактерий растений (NCPPB) (Фера, Йорк, Соединенное Королевство). Состав и содержание основных МЭЖК в *X. fragariae* и *X. arboricola*, патоваре *fragariae*, приведены в работе Janse *et al.* (2001).

4.2 Серологические тесты

4.2.1 Иммунофлюоресценция

Иммунофлюоресценцию можно использовать для идентификации предполагаемых штаммов *X. fragariae*. Приготовьте суспензию, содержащую примерно 10⁶ клеток/мл, в PBS и выполните процедуру теста иммунофлюоресценции, описанную в разделе 3.8. При выполнении лишь двух идентификационных тестов для быстрой диагностики не используйте другой серологический тест в дополнение к данному.

4.2.2 ИФА

Непрямой ИФА-анализ и "сэндвич"-ИФА (описанные, соответственно, в разделах 3.7.1 и 3.7.2) можно использовать для идентификации предполагаемых штаммов *X. fragariae*, выделенных из растительного материала с подозрением на бактериальную угловую пятнистость листьев. При выполнении лишь двух идентификационных тестов для быстрой диагностики не используйте другой серологический тест в дополнение к данному.

4.3 Молекулярные тесты

4.3.1 ПЦР

Предполагаемые культуры *X. fragariae* можно идентифицировать с использованием протоколов ПЦР, описанных в разделе 3.9.

4.3.2 REP-ПЦР

Применение для идентификации штаммов *X. fragariae* протоколов ПЦР с повторяющимися экстрагенными палиндромными элементами (REP-ПЦР) описано в работах Orogenorth *et al.* (1996) и Pooler *et al.* (1996). Любой из двух протоколов можно применять для надежной идентификации исследуемых штаммов как *X. fragariae*.

В основе приведенного ниже протокола ПЦР лежат параметры реакционной смеси и условия амплификации, описанные Orogenorth *et al.* (1996).

Бактериальные штаммы для анализа берут из штриховых или индивидуальных колоний, выращенных на модифицированной среде для возбудителя болезни Пирса (5,0 г сахарозы, 2,5 г фитона (BD BBL¹), 10 г фитагеля (BD BBL¹); дистиллированной воды до 1 л, перед автоклавированием приведите pH к 7,5 с помощью 2 N HCl) (Orogenorth *et al.*, 1996). Можно использовать различные питательные среды, однако их следует предварительно стандартизировать.

Применяются следующие два набора праймеров:

REP1R-I: 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3'

REP2-I: 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'

ERIC1R: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'

ERIC2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC G-3'

Реакционный буфер содержит 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 6,7 мкМ ЭДТА, 30 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,17 мг БСА/мл, 10% (v/v) диметилсульфоксид, 1,2 мМ каждого дНТФ, по 62 пмоль каждого праймера и 2 ед Taq-ДНК-полимеразы. Бактерии из репрезентативной колонии исследуемого штамма переносят на кончике стерильной пипетки (10 мкл) или с использованием другого подходящего инструмента в пробирку для ПЦР, содержащую 25 мкл реакционной смеси. Параметры циклов ПЦР: 95 °С в течение 6 мин, затем 35 циклов при 94 °С в течение 1 мин, при 44 °С (REP-праймеры) или при 52 °С (ERIC-праймеры) в течение 1 мин и 65 °С в течение 8 мин. После циклов амплификации следует завершающий этап элонгации при 68 °С в течение 16 мин. Продукты амплификации (5–10 мкл) подвергают электрофорезу в 1,5%-ном (w/v) агарозном геле. Амплифицированные фрагменты ДНК визуализируют с помощью ультрафиолетового облучения после окраски бромистым этидием.

4.3.2.1 Интерпретация результатов REP-ПЦР

Исследуемые бактериальные штаммы идентифицируют как *X. fragariae*, если их геномные отпечатки такие же, как у генотипов REP и ERIC эталонных штаммов (Pooler *et al.*, 1996), амплифицированных в той же ПЦР и проведенных через тот же гель. Из различных штаммов *X. fragariae* можно получить небольшое число полиморфных ампликонов вследствие низких уровней геномной вариабельности.

4.3.3 Анализ мультилокусного секвенирования

Методика анализа мультилокусного секвенирования (MLSA) широко применяется для специфической идентификации ксантомонад (Parkinson *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2010; Hamza

et al., 2012) и может использоваться для идентификации *X. fragariae*, особенно в настоящее время, когда предварительно определена геномная последовательность (Vandroemme *et al.*, 2013). Следует, однако, отметить, что эта методика еще не валидирована применительно к *X. fragariae*. Конститутивные гены (например, *gyrB*, *rpoD*) амплифицируют, используя праймеры и условия ПЦР, описанные Almeida *et al.* (2010) и Hamza *et al.* (2012). Метод MLSA заключается в секвенировании множественных локусов (обычно 4–8 конститутивных генов) и сравнении полученных последовательностей со справочными последовательностями видов *Xanthomonas*, хранящимися в базах данных нуклеотидов, например таких, как База данных микроорганизмов, обнаруживаемых в растениях и окружающей среде (PAMDB) (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>) (Almeida *et al.*, 2010), Банк MLVA для генотипирования микробов (https://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA_bank/Genotyping/) и база данных Q-bank Bacteria (<http://www.q-bank.eu/Bacteria/>).

4.4 Тесты на патогенность

При необходимости идентичность бактериальных штаммов, предположительно принадлежащих к *X. fragariae*, следует подтверждать с помощью теста на патогенность. Штаммы, полученные путем выделения или обогащения, инокулируют в неотделенные листья восприимчивых растений земляники (или в отделенные листья, как описано в разделе 3.6). Описано несколько различных процедур: Hazel и Civerolo (1980), Civerolo *et al.* (1997a) и Hildebrand *et al.* (2005).

4.4.1 Общая процедура инокуляции

В качестве рекомендуемой процедуры инокуляции предлагается использовать свободные от *X. fragariae* растения земляники восприимчивых сортов (например, "Камароза", "Сискейп", "Сельва", "Корона", "Паджаро"). При возможности растения следует оставить на ночь в климатической камере при 20–25 °С с высокой относительной влажностью (>90%) и за 4 ч до инокуляции включить освещение для стимулирования открытия устьиц.

Приготовьте суспензии бактериальных клеток (10⁶ КОЕ/мл) в стерильной дистиллированной воде или в 10 мМ PBS. Нанесите инокулят каждого штамма на абаксиальные поверхности трех трехлопастных листьев на каждом из двух или трех растений с помощью распылителя низкого давления, краскопульта или аналогичного устройства (например, от DeVilbiss¹), так чтобы не вызвать пропитывания листа жидкостью. Развитие инфекции можно дополнительно стимулировать путем нарушения целостности листьев (например, прокалыванием абаксиальной поверхности иглой) перед нанесением инокулята, хотя делать это необязательно. После инокуляции инкубируйте растения в камере при 20–25 °С с высокой влажностью (>90%) и 12-14-часовым фотопериодом. В качестве положительного и отрицательного контролей служат, соответственно, клеточная взвесь эталонного штамма *X. fragariae* (приготовленная по той же процедуре, что и исследуемый штамм) и стерильная дистиллированная вода или 10 мМ PBS, которые следует инокулировать в отдельных лотках. Оценивайте развитие повреждений еженедельно в течение трех недель (21 дня) после инокуляции. Вновь выделите возбудитель из участков повреждений, как описано в разделе 3.5, и идентифицируйте его с помощью ИФА, иммунофлюоресценции или ПЦР.

4.4.1.1 Интерпретация результатов теста на патогенность

Если взвесь бактериальных клеток содержит *X. fragariae*, то в качестве первоначальных симптомов появятся темные водянистые (при осмотре в отраженном свете) повреждения на нижних поверхностях листьев. При осмотре на просвет эти повреждения выглядят прозрачными и окрашенными в желтый цвет. В последующем повреждения превращаются в омертвевшие пятна, окруженные желтым ореолом или участками краевого некроза. Такие же симптомы должны

появляться на листьях, инокулированных эталонным штаммом *X. fragariae* (положительный контроль).

Эти симптомы не должны появляться на листьях, инокулированных стерильной дистиллированной водой или 10 мМ PBS (отрицательный контроль).

4.4.2 Реакция гиперчувствительности

Реакция гиперчувствительности (РГ) в листьях табака может указывать на присутствие генов *hrp*, положительную реакцию вызывают также многие фитопатогенные бактерии. В качестве положительного контроля можно использовать, например, какой-либо штамм *Pseudomonas syringae* патовар *syringae*. Используйте имеющие более пяти листьев растения табака сортов "Самсун" или "Ксанти". Приготовьте бактериальные суспензии, содержащие 10^9 КОЕ/мл ($ОП_{600\text{ нм}} = 1,0$), в стерильной дистиллированной воде или в 10 мМ PBS, и введите суспензию в межклеточное пространство через абаксиальную поверхность взрослых листьев с помощью шприца с иглой калибра 25.

4.4.2.1 Интерпретация результатов РГ

Положительным результатом теста считается полное увядание и некроз инфильтрированной ткани в течение 24–48 ч после инокуляции. Большинство штаммов *X. fragariae* являются РГ-положительными. Однако некоторые могут быть РГ-отрицательными, особенно после хранения в течение некоторого времени. Аналогичные реакции не должны появляться на листьях, инокулированных стерильной дистиллированной водой или 10 мМ PBS (отрицательный контроль).

5. Данные

Данные и доказательства необходимо хранить в соответствии с положениями раздела 2.5 МСФМ 27 (*Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов*).

В тех случаях, когда результаты диагностики могут затрагивать интересы других договаривающихся сторон, в особенности при выявленных несоответствиях (МСФМ №13 (*Руководство по нотификации о несоответствии и экстренном действии*)), а также если вредитель обнаружен на данной территории впервые, следует не менее года хранить с соблюдением отслеживаемости нижеперечисленные данные, доказательства и дополнительные материалы: оригинальный образец, культура (культуры) вредного микроорганизма, консервированные или смонтированные на предметных стеклах препараты или материалы анализа (например, фотографии гелей, распечатки результатов ИФА, ПЦР-ампликоны).

6. Контактные адреса для дополнительной информации

Дополнительную информацию по данному протоколу можно получить, обратившись в следующие учреждения:

United States Department of Agriculture (USDA) [Департамент сельского хозяйства США], Agricultural Research Service (ARS) (панеэ), (Edwin L. Civerolo; e-mail: emciv@comcast.net).

Plant and Environmental Bacteriology [Отдел бактериологии растений и экологической бактериологии], Fera, Sand Hutton, York YO41 1LZ, United Kingdom (John Elphinstone; e-mail: john.elphinstone@fera.gsi.gov.uk).

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) [Центр защиты растений и биотехнологии, Валенсийский институт сельскохозяйственных исследований], Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (María M. López; e-mail: mlopez@ivia.es; tel.: +34 963 424000; fax: +34 963 424001).

Запрос на пересмотр диагностического протокола может быть направлен национальными организациями по карантину и защите растений (НОКЗР), региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) через Секретариат МККЗР (ippc@fao.org), который, в свою очередь, направит его в Техническую группу экспертов по диагностическим протоколам (ТГЭДП).

7. Благодарности

Автор первого проекта настоящего протокола: E.L. Civerolo (USDA ARS (ранее), США (см. предыдущий раздел)); редакторы: J. Elphinstone (Fera, Соединенное Королевство (см. предыдущий раздел)) и M.M. López (IVIA, Испания (см. предыдущий раздел)).

8. Справочные материалы

Настоящее приложение относится к международным стандартам по фитосанитарным мерам (МСФМ). МСФМ размещены на Международном фитосанитарном портале (МФП): <https://www.ippc.int/ru/core-activities/standards-setting/ispms>.

Almeida, N.F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C.R., Morris, C.E., Schaad, N.W., Schuenzel, E.L., Lacy, G.H., Sun, X., Jones, J.B., Castillo, J.A., Bull, C.T., Leman, S., Guttman, D.S., Setubal, J.C. & Vinatzer, B.A. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208–215.

Bradbury, J.F. 1977. *Xanthomonas fragariae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 558. Wallingford, UK, CABI.

Bradbury, J.F. 1984. *Xanthomonas*. In N.R. Krieg & J.G. Holt, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins.

CABI. n.d. *Crop protection compendium*. Wallingford, UK, CABI. Размещено по адресу: <http://www.cabi.org/cpc/> (дата последнего доступа 16 апреля 2016 г.).

Calzolari, A. & Mazzucchi, U. 1989. Attempts to detect *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Acta Horticulturae*, 265: 601–604.

Civerolo, E.L., Feliciano, A.J., Melvin, J.A. & Gubler, W.D. 1997a. A detached leaf bioassay for *Xanthomonas fragariae*. In A. Mahadevin, ed. *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 89–94. University of Madras, Madras, India.

Civerolo, E.L., Roberts, P., Feliciano, A.J., Melvin, J.A., Buchner, R.P., Jones, J.B. & Gubler, W.D. 1997b. Comparative detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants by detached leaf inoculation, ELISA and PCR. In A. Mahadevin, ed. *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 95–99. University of Madras, Madras, India.

De Boer, S.H. 1990. Immunofluorescence for bacteria. In R. Hampton, E. Ball & S. De Boer, eds. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A laboratory manual*, pp. 295–298. St Paul, MN, APS Press.

Dickstein, E.R., Jones, J.B. & Stead, D.E. 2001. Automated techniques. In N.W. Schaad, J.B. Jones & W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, pp. 343–358. St Paul, MN, APS Press.

Dye, D.W. 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. *New Zealand Journal of Science*, 5(4): 393–416.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1997. Data sheet on *Xanthomonas fragariae*. In EPPO/CABI (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott, & M. Holderness, eds), ed. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn, pp. 1124–1128. Wallingford, UK, CABI.

- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Diagnostic protocol for *Xanthomonas fragariae*. EPPO Standards PM 7/65. *EPPO Bulletin*, 36: 135–144.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. EPPO Standards PM 7/97 (1). *EPPO Bulletin*, 39: 413–416.
- Gubler, W.D., Feliciano, A.J., Bordas, A., Civerolo, E.L., Melvin, J. & Welch, N.** 1999. *X. fragariae* and *C. cladosporioides* cause strawberry blossom blight. *California Agriculture*, 53: 26–28.
- Hamza, A.A., Robene-Soustrade, I., Jouen, E., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Fisher-Le Saux, M., Gagnevin, L. & Pruvost, O.** 2012. Multilocus sequence analysis- and amplified fragment length polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3): 183–190.
- Hartung, J.S. & Pooler, M.R.** 1997. Immunocapture and multiplexed-PCR assay for *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease. *Acta Horticulturae*, 439: 821–828.
- Hayward, C.** 1960. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature*, 186: 405–406.
- Hazel, W.J. & Civerolo, E.L.** 1980. Procedures for growth and inoculation of *Xanthomonas fragariae*, causal organism of angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease*, 64: 178–181.
- Hildebrand, P.D., Braun, P.G., Renderos, W.E., Jamieson, A.R., McRae, K.B. & Binns, M.R.** 2005. A quantitative method for inoculating strawberry leaves with *Xanthomonas fragariae*, factors affecting infection, and cultivar reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27: 16–24.
- Hildebrand, D.C., Schroth, M.N. & Wilhelm, S.** 1967. Systemic invasion of strawberry by *Xanthomonas fragariae* causing vascular collapse. *Phytopathology*, 57: 1260–1261.
- Janse, J.D.** 2005. Examples of bacterial diseases of cultivated and wild plants – *Xanthomonas fragariae*. In: *Phytobacteriology: principles and practice*. Chapter 7. Wallingford, UK, CABI Publishing. Pp. 224–225.
- Janse, J.D., Ross, M.P., Gorkink, R.F.J., Derks, J.H.J., Swings, J. Janssens, D. & Scortichini, M.** 2001. Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria* (×) *ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathology*, 50: 653–665.
- Kennedy, B.W.** 1965. Infection of *Potentilla* by *Xanthomonas fragariae*. *Plant Disease Reporter*, 49: 491–492.
- Kennedy, B.W. & King, T.H.** 1962. Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. *Phytopathology*, 52: 873–875.
- Koike, H.** 1965. The aluminum-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology*, 55: 317–319.
- López, M.M., Aramburu, J.M., Cambra, M. & Borrás, V.** 1985. [Detection and identification of *Xanthomonas fragariae* in Spain.] *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agrícola*, 28: 245–259 (in Spanish).
- López, M.M., Dominguez, F., Morente, C., Salcedo, C.I., Olmos, A. & Civerolo, E.** 2005. *Diagnostic protocols for organisms harmful to plants: Diagnosis Xanthomonas fragariae*. SMT-4-CT98-2252.
- Maas, J.L., ed.** 1998. *Compendium of strawberry diseases*, 2nd edn. St Paul, MN, APS Press.
- Maas, J.L., Gouin-Behe, C., Hartung J.S. & Hokanson, S.C.** 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. *Horticultural Science*, 35: 128–131.
- Maas, J.L., Pooler, M. & Galletta, G.J.** 1995. Bacterial angular leafspot disease of strawberry: Present status and prospects for control. *Advances in Strawberry Research*, 14: 18–24.

- Mafra, V., Kubo, K.S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R.M., Boava, L.P., Rodrigues, C.M. & Machado, M.A.** 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS One*, 7(2), e31263.
- Mahuku, G.S. & Goodwin, P.H.** 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reaction (PCR). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 366–370.
- Milholland, R.D., Ritchie, D.F., Dayking, M.E. & Gutierrez, W.A.** 1996. Multiplication and translocation of *Xanthomonas fragariae* in strawberry. *Advances in Strawberry Research*, 15: 13–17.
- Moltmann, E. & Zimmermann, C.** 2005. Detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants by nested PCR. *EPPO Bulletin*, 35: 53–54.
- Opgenorth, D.C., Smart, C.D., Louws, F.J., de Bruijn, F.J. & Kirkpatrick, B.C.** 1996. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease*, 80: 868–873.
- Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J. & Stead, D.** 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12): 2881–2887.
- Pooler, M.R., Ritchie, D.F. & Hartung, J.S.** 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3121–3127.
- Rademaker, J.L.W., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. & De Bruijn, F.J.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 665–677.
- Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. & de Bruijn, F.J.** 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95: 1098–1111.
- Rat, B.** 1993. *Xanthomonas fragariae*: Causal agent of angular leaf spot of strawberry. In J.G. Swings & E.L. Civerolo, eds. *Xanthomonas*, pp. 69–70. London, Chapman and Hall.
- Roberts, P.D., Hodge, N.C., Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E., Berger, R.D. & Chase, A.R.** 1998. Relatedness of strains of *Xanthomonas fragariae* by restriction fragment length polymorphism, DNA-DNA reassociation, and fatty acid analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3961–3965.
- Roberts, P.D., Jones, J.B., Chandler, C.K., Stall, R.E. & Berger, R.D.** 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested PCR. *Plant Disease*, 80: 1283–1288.
- Rowhani, A., Feliciano, A.J., Lips, T. & Gubler, W.D.** 1994. Rapid identification of *Xanthomonas fragariae* in infected strawberry leaves by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 78: 248–250.
- Saddler, G.S. & Bradbury, J.F.** 2005. *Xanthomonas*. In G.M. Garrity, editor-in-chief; D.J. Brenner, N.R. Krieg & J.T. Stanley, eds Vol. 2. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn, Vol. 2, Part B, pp. 63–90. New York, Springer.
- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In Z. Klement, K. Rudolph & D.C. Sands, eds. *Methods in phytopathology*, pp. 200–204. Budapest, Akademiai Kiado.

- Schaad, N.W., Jones, J.B. & Lacy, G.H.** 2001. *Xanthomonas*. In N.W. Schaad, J.B. Jones & W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3rd edn, pp. 175–200. St Paul, MN, APS Press.
- Schaad, N.W., Tamaki, S., Hatziloukas, E. & Panopoulos, N.J.** 1995. A combined biological enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*, 85: 243–248.
- Stackebrandt, E., Murray, R.G.E. & Truper, H.G.** 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38: 321–325.
- Stefani, E., Mazzucchi, U. & Calzolari, A.** 1989. Evidence of endophytic movement of *Xanthomonas fragariae* Kenn. and King in strawberry. *Phytopathologia Mediterranea*, 28: 147–149.
- Stöger, A. & Ruppitsch, W.** 2004. A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 281–284.
- Swings, J., Vauterin, L. & Kersters, K.** 1993. The bacterium *Xanthomonas*. In J. Swings & E.L. Civerolo, eds. *Xanthomonas*, pp. 138–144. London, Chapman and Hall.
- Turechek, W.W., Hartung, J.S. & McCallister, J. 2008. Development and optimization of a real-time detection assay for *Xanthomonas fragariae* in strawberry crown tissue with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopathology*, 98(3): 359–368.
- Van den Mooter, M. & Swings, J.** 1990. Numerical analyses of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 348–369.
- Vandroemme, J., Baeyen, S., Van Vaerenbergh, J., De Vos, P. & Maes, M.** 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology*, 57(3): 438–444.
- Vandroemme, J., Cottyn, B., Baeyen, S., De Vos, P. & Maes, M.** 2013. Draft genome sequence of *Xanthomonas fragariae* reveals reductive evolution and distinct virulence-related gene content. *BMC Genomics*, 14(1), 829.
- Weisberg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, B.A. & Lane, D.J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697–703.
- Weller, S.A., Beresford-Jones, N.J., Hall, J., Thwaites, R., Parkinson, N. & Elphinstone, J.G.** 2007. Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 379–383.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7): 2853–2858.
- Zimmermann, C., Hinrichs-Gerger, J., Moltmann, E. & Buchenauer, H.** 2004. Nested PCR for detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111: 39–51.

9. Рисунки



Рисунок 1. Симптомы инфекции *Xanthomonas fragariae* на верхней (слева) и нижней (справа) поверхности листа.

Фотографии любезно предоставлены А. М. К. Шилдером, Университет шт. Мичиган, Ист-Лансинг, Мичиган, Соединенные Штаты.



Рисунок 2. Выделение бактериального экссудата *Xanthomonas fragariae* на нижней поверхности листа. Фотографии любезно предоставлены У. У. Туречеком, Департамент сельского хозяйства, Служба сельскохозяйственных исследований, Вашингтон, О.К., Соединенные Штаты.



Рисунок 3. Симптомы инфекции *Xanthomonas fragariae* на чашечке плода. Фотографии любезно предоставлены А. М. К. Шилдером, Университет шт. Мичиган, Ист-Лансинг, Мичиган, Соединенные Штаты.

История публикации

Не является официальной частью стандарта.

2004-11 КС добавил тему в программу работы.

2006-04 КФМ-1 добавила *Xanthomonas fragariae* (2004-012) в программу работы.

2014-01 Консультация с экспертами.

2015-06 КС через электронную систему принятия решений (e-decision) одобрил текст для проведения консультации с членами (2015_eSC_Nov_03).

2016-03 ТГЭДП через электронную систему принятия решений утвердила текст для передачи в КС для принятия (2016_eTPDP_Mar_05).

2016-06 КС через электронную систему принятия решений утвердил текст для 45-дневного периода нотификации (2016_eSC_Nov_01).

2016-08 КС утвердил ДП от лица КФМ (возражений не получено).

МСФМ 27. Приложение 14. *Xanthomonas fragariae* (2016). Рим, МККЗР, ФАО.

2017-01 Секретариат МККЗР исправил незначительную ошибку редакционного характера в разделе 8.

История публикации последний раз обновлена: 2017-01.