

KAVHIZA NYASHA JOHN

**ANALYSIS OF BIOLOGICAL PROPERTIES AND IMPROVEMENT OF
MOLECULAR GENETIC METHODS FOR DIAGNOSING THE PHYTOPATHOGEN
*XANTHOMONAS EUVESICATORIA PV. ALLII***

Specialty 4. 1. 3 Agrochemistry, agrosoil science, plant protection and quarantine

ABSTRACT

dissertation for a PhD degree
candidate of biological sciences

Moscow, 2024

The work was carried out at the Agricultural-Technological Institute of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba" of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and on the basis of the laboratory of bacteriology and GMO analysis F.S.B. I. "All-Russian Center for Plant Quarantine"

Scientific supervisor: **Zargar Meisam**, Doctor of Agricultural sciences, Associate Professor, Professor Department of Agrobiotechnology, ATI-RUDN

Official opponents: **Khyutti Alexander Valerievich**, Candidate of Biological Sciences, Head of the division of "Fungal, viral, mycoplasma and nematode Diseases of potato and vegetable crops" FGBNU All-Russian Research Institute of Plant Protection

Zeyruk Vladimir Nikolaevich, Doctor of Agricultural Sciences, Principal scientist, plant protection laboratory, FGBNU "Potato FIC named after A.G. Lorkh"

Leading organization: Caspian Agrarian Federal Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

The dissertation defense will take place on June 28, 2024 at ___ o'clock at a meeting of the dissertation council PDS 2021.002 at the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba" (RUDN) at the address: 117198, Miklukho-Maklaya str., 8, building 2 in hall 2.

The dissertation can be found in the library at the UNIBC (Scientific Library) of the Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN) at the address: 117198 st. Miklouho-Maklaya, 6 and on the website: <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba" (RUDN) at the address: 117198, st. Miklukho-Maklaya, 6.

Abstract sent out "___" _____ 2024

Acting Scientific Secretary

Dissertation Council PDS 2021.002

Doctor of Agricultural Sciences,

Associate Professor

Pakina Elena Nikolaevna

Concept outline of the research

Relevance of the topic: The introduction of new pathogens and strains of already existing pathogens give rise to the emergence of plant diseases. Such pathogens associated with emerging diseases are categorized as quarantine organisms. These organisms have an invasive action and are problematic as they have a tendency to spread before their threat to agriculture is recognized. This situation is further exacerbated by the lack of appropriate diagnostic technologies in the introductory phase, (Robene et al., 2015).

Bacterial blight of onion (BBO) caused by *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* (Kadota et al. 2000) is a plant disease that has high agronomic and economic implications on onion production. Though it is a foliar disease it results in stunted growth as well as undersized bulbs thus reducing yields by 50% or more (Gagnevin et al., 2014). The disease is quite severe during the juvenile vegetative stages of the plant. The bacterium gains entry into the plant through the stomata and rapidly multiplies especially during phases of high humidity (Nga et al., 2021). The seed-borne nature of this bacteria reduces seed marketability of the onion crop. To curb further introduction of *X. euvesicatoria* pv. *allii* into new territories and regions it has been designated as a quarantine pathogen on the EPPO A1 list of quarantine pathogens.

Management of BBO is primarily based on copper-based bactericides usually with ethylenebis dithiocarbamate (EDBC) group of fungicides. However, the existence of resistance genes in the genus *Xanthomonas* limits the effectiveness of this control method, (Richard et al., 2017; Richard et al., 2016; Behlau et al., 2011). In addition to the operon conferring resistance to cupric compounds, copper tolerance genes known as cop genes have also been discovered (Arguello et al., 2013; Marin et al., 2019). Moreover, heavy reliance on antibiotic compounds in crop production can lead to horizontal transmission of antibiotic resistance genes from phytopathogenic bacteria to human pathogens, (Nga et al., 2021).

Efforts are constantly being made to find sustainable ways of managing the bacterial blight of onion (BBO). Phuong et al. (2022) reported that 1% nanoemulsion formulations of an essential oil of *Piper aduncun* and *Cymbopogon nardus* and a strain of MRSNR 3.1 of *Bacillus thuringiensis* exhibited bactericidal properties effective in controlling *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Use of bacteriophages poses promising control method. Nga et al., (2021) promulgated that using phages specific to *X. euvesicatoria* pv. *allii* at concentrations 10^7 and 10^8 under field conditions in welsh onions (*A. fistulosum*) significantly suppresses disease symptoms comparable to oxolinic acid (Starner) a chemical bactericide.

The development of a robust, reliable and highly sensitive diagnostic protocol is indispensable to effective control of *X. euvesicatoria* pv. *allii*. PCR based detection and identification of *Xanthomonads* in plant material to be highly effective (Robene-Soustrade et al., 2006). Robene-Soustrade et al. (2010) developed a nested PCR assay based on the *avrRxv* gene and the pilus (*pilW* and *pilX*) assembly genes. When the PCR was tested for exclusivity in the *Xanthomonads*, the majority of the strains did not produce amplicons besides 9 strains from *X. axonopodis* subgroup 9.1 and 9.2 which are not pathogenic to onion. The rationale behind the development of this multiplex PCR protocol was to enable detection of genetically heterogenous strains of *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Research has also demonstrated enhanced sensitivity and specificity through the use of nested PCR. Prior to the development of this PCR assay pathogenicity tests usually coupled with molecular typing carried subsequent to pathogen isolation on selective media were the main identification methods (Picard et al., 2008; Gent et al., 2004). Such methods were inefficient as false negative results could be obtained at low concentrations of the bacteria. Moreover, the methods were time-consuming (Robene-Soustrade, 2010). To complement the conventional nested PCR a real-time PCR (RT-PCR) was developed so as to enable high

throughput testing adaptable for both quarantine and research purposes (Robene et al., 2015). Optimizing this RT-PCR can bring about improvements such as high specificity, sensitivity, rapidity, possibility of quantification and reduction of post-amplification handling.

The degree of development of the topic. The main means of *X. euvesicatoria* pv. *allii* transmission to new regions is through seed trade. Therefore, to effectively curb transboundary transmission of this quarantine pathogen molecular-based detection and identification techniques have to be developed and constantly optimized as a response to mutating pathogens. This therefore culminated in the analysis of the biological features of this pathogen as well as optimizing the molecular diagnostic method i.e. PCR. Moreover, important information about the bacteria's pathogenicity was also generated so as to improve ways of managing the pathogen.

Objective and specific tasks of the study- To analyze various biological properties and optimize molecular genetic methods for diagnosing the phytopathogen *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*

To achieve this goal the following tasks had to be completed:

- Collect and analyze information on the systematics, pathogenicity and biology of *X. euvesicatoria* pv. *allii*.
- To study the cultural properties and growth characteristics of *X. euvesicatoria* pv. *allii* on various nutrient media.
- Test and optimize existing diagnostic methods.
- Search for an alternative probe to the MGB probe.
- Assess the efficacy of DNA extraction methods on the PCR assay for *X. euvesicatoria* pv. *allii*

The scientific novelty of the work:

1. The study unraveled the correlation between the DNA isolation method and PCR assay performance. This led to the enhancement of the PCR assay as a result of identifying the optimum DNA extraction method.
2. The effect of *X. euvesicatoria* pv. *allii* in reducing the germination percentage and germination rate of onion seed was unraveled.
3. Testing the BHQ probe as an alternative to the MGB probe which is not available on the Russian market, showed compatibility with both AVR and PIL primers. Henceforth, the BHQ probe was designated as an effective substitute.
4. Exploring disease effects in-planta on various parts of onion plants grown from different propagation material under field conditions exhibited that the bacteria multiplied more vigorously and prolonged persistence in the bulb apex.
5. The study revealed the effect of temperature on the growth of *X. euvesicatoria* pv. *allii* onion extract media (OEM).

Theoretical and practical significance. The improved and optimized PCR based diagnostic protocol for *X. euvesicatoria* pv. *allii* is suitable for Russia as well as developing nations. All aspects of the PCR assay such as sensitivity, specificity, repeatability and reproducibility were evaluated and validated. The identification of an optimized bacterial DNA extraction method highly adaptable to the PCR significantly enhanced assay efficiency consequently enabling faster and more accurate pathogen detection and identification. Carrying out the study led to the obtainment of an alternative to the MGB probe by evaluating the suitability of the BHQ probe. The study further contributed to knowledge of the biology of the bacterium through the trials on host selectivity and pathogen cultural properties on various growth media. The identification of the bulb apex as the plant part with the most pronounced pathogen abundance and/or persistence, unraveled knowledge plant propagules that serve as potential sources of secondary inoculum and origins of epidemics. The research findings are vital to the operations carried out by plant quarantine agencies.

Main provisions submitted for defense:

1. Optimization of methods for identifying the causative agent of onion bacterial blight *X. euvesicatoria* pv. *allii*, a quarantine phytopathogen in the Russian Federation, including improved sample preparation methods, the use of selective culture media, DNA extraction, and real-time PCR with an alternative probe with the fluorescence quencher BHQ.
2. Multiplex diagnostic system for *X. euvesicatoria* pv. *allii* – real-time PCR method, recommended for analyzing onion seed samples infested with the causative agent of bacterial blight.
3. Reaction of viability and germination energy of seeds of some onion varieties to infection with *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Research methodology and methods. The methodology of the conducted research is based on scientific approaches of identification, morphometric features of phytopathogenic bacteria and pathogenesis of plant diseases they cause, study of literature sources, designation of the research goal and setting of tasks for its achievement, conducting laboratory experiments, comparative analysis of the obtained results. The studies were carried out according to generally accepted microbiological and molecular-genetic methods of diagnostics of phytopathogens

Approbation of research results. The result of the dissertation research was the publication of 7 articles, including 6 in scientific journals indexed in the SCOPUS database, and 1 in a journal included in the Higher Attestation Commission (HAC) list. The results of the dissertation work were presented at the following conferences: International scientific conference "Agrochemical support for digital farming." Russian State Agrarian University - Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev. 2019; INTERNATIONALSCIENTIFIC AND PRACTICAL CONFERENCE "CURRENT ISSUES OF BIOLOGY, BREEDING, TECHNOLOGY AND PROCESSING OF AGRICULTURAL CROPS", June 2022. Krasnodar, Russia; International scientific and practical conference "Agricultural Science-2023" (AgriScience2023). Russian State Agrarian University - Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva, 2023.

Personal contribution of the author. The candidate participated in setting the aim and specific objectives of the study; collected and analyzed the obtained material, processed and interpreted the data, as well as prepared publications in co-authorship.

Structure and volume of the dissertation. The dissertation constitutes an introduction, three chapters, conclusion, and references. It contains 136 pages, the information is presented together with 32 tables and 15 figures. The reference list comprises 149 sources.

Acknowledgments

The author thanks Svetlana Igorevna Prikhodko, researcher, deputy head of the Testing Laboratory Center (FGBU All-Russian Plant Quarantine Center (VNIIKR) for her assistance in research work on the topic of the dissertation.

The content of the dissertation

Introduction. This section unravels the object of carrying out the research as well as aspects such as relevancy and novelty.

Chapter 1. Literature Review

This chapter surveys various literature highlighting aspects known about the subject as well as identifying the knowledge gaps. This forms the foundation on which the research is based upon. The intricate relationships between the various aspects are explored, for instance the influence of genetic diversity on copper resistance and implications on the control of the pathogen. Distilling

the facts presented in various literature makes apparent the urgency of the need for a robust and efficient diagnostic protocol for *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Chapter 2. Materials and Methods

DNA extraction

The thrust of this experiment was to evaluate commercially available DNA extraction kits optimized for plant material and identify the most suitable for isolating *X. euvesicatoria* pv. *allii*. The three commercial extraction kits, Probe GS, Sorb GMO and FitoSorb used in the study have different mechanisms of DNA recovery i.e. magnetic beads, silica-based sorbent as well as glass and diatomaceous earth. Therefore, 200µl of seed extract inoculated with bacterial concentrations ranging from 10^1 to 10^7 in triplicate for each sample was taken for DNA extraction and consequently pathogen detection using PCR.

Determination of conventional nested PCR and real-time PCR Sensitivity

Both conventional PCR and real-time PCR (qPCR) assays for *X. euvesicatoria* pv. *allii* were assessed for sensitivity. Tenfold serial dilution was performed yielding 7 dilutions with concentrations ranging from 6.8×10^1 to 6.8×10^7 CFU/ml, where the first dilution D1 corresponded with the highest concentration and the last dilution D7 tallied with the lowest concentration. Onion seed samples were pulverized and homogenized, then infected with the different bacterial concentrations before bacterial detection with the PCR assays. Repetitive tests with triplicate replications of the experimental units were carried out.

Evaluating specificity of the PCR assays for *X. euvesicatoria* pv. *allii*

In the study 2 strains of the target bacterium *X. euvesicatoria* pv. *allii* namely 0377 and 0419 of the All-Russian Plant Quarantine Centre, originally sourced from France as CFBP 6107 and CFBP 6369 respectively were used for inclusivity tests. For exclusivity tests 97 other bacterial species were used. Investigations were conducted using conventional PCR and qPCR, employing the two markers AVR and PIL.

Determination of repeatability

To establish the degree of conformity of the PCR test results, a series of 10-fold dilutions of artificially infected extracts was studied in 6-fold repetition at the level of the threshold concentrations of the phytopathogen established during the sensitivity determination, by one person and on the same device, under the same conditions.

Determining reproducibility of the PCR assay

Reproducibility assessment was performed to determine the ability of the PCR assay to detect *X. euvesicatoria* pv. *allii* using 2 sets of primers AVR and PIL across 7 (7.2×10^1 - 7.2×10^7 CFU/ml) concentrations with 3 different operators and sets of equipment in triplicate. Repetitive trials were carried out and the data was pooled for analysis.

Germination Response Experiments- The experiment was arranged in a complete randomized design (CRD) replicated thrice and 12 commercial onion varieties (table 1) were procured. For each variety, 100 seeds in a petri dish were inoculated with 5ml of bacterial suspension at 3 concentrations of *X. euvesicatoria* pv. *allii* (10^4 ; 10^6 and 10^8 CFU ml⁻¹). Distilled water was used as a negative control. The petri dishes were then incubated at room temperature for 2 hours. Following the incubation period, the bacterial suspension was drained and the seeds were left to

dry at room temperature $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The dry inoculated seeds were then transferred to petri dishes lined at the bottom with 9cm filter paper. Distilled water was added to the petri dishes. The petri dishes were then placed in an incubator at 21°C under dark conditions. The seeds were incubated for 14 days and germination counts were done everyday.

Table 1 Commercial onion varieties that were used in the study

No.	Variety	Originator	Main features
1	Pierrot	Agrofirm Aelita	Welsh onion (<i>Allium fistulosum</i> L.)
2	Russian winter	FSBSI- Federal Research Center for Vegetable Production	Welsh onion (<i>Allium fistulosum</i> L.)
3	April	Far Eastern Experimental Station – VNIIR/CJSC LANS Company	Welsh onion (<i>Allium fistulosum</i> L.)
4	Karantansky	Agrofirm Aelita LLC/Heterosis Selection LLC	Leek (<i>Allium porrum</i> L.)
5	Summer breeze	Gavrish vegetable breeding company	Leek (<i>Allium porrum</i> L.)
6	Strigunovsky local	CJSC Research and Production Firm "RUSSIAN SEEDS"; Association for Seed Production of Vegetable Crops "SORTSEMOVOSCH"; Agrofirm Aelita LLC; FSBI "Federal Research Center of Vegetable Production"; Sativa LLC; Heterosis Selection LLC	Bulb onion (<i>Allium cepa</i> L.)
7	Carmen MS	Agrofirm Aelita LLC/Alt Semena	Bulb onion (<i>Allium cepa</i> L.)
8	Schtuttgarter Riesen	Samen Mauser Quedlinburg, Germany	Bulb onion (<i>Allium cepa</i> L.)
9	Myachkovsky 300	FSBI "Federal Research Center of Vegetable Production"; CJSC "LANS Company"; JSC "OZYORY"	Bulb onion (<i>Allium cepa</i> L.)
10	Danilovsky 301	Federal Research Center for Vegetable Production, Agrofirm Aelita LLC, LANS Company	Bulb onion (<i>Allium cepa</i> L.)

11	Chalcedony	Yuves 2000 LLC, Intersemya LLC, Agrofirm Poisk LLC, Heterosic Selection LLC	Bulb onion (<i>Allium cepa</i> L.)
12	Ellan	FSBEI HE "Kuban State Agrarian University Named after I.T. Trubilin"	Bulb onion (<i>Allium cepa</i> L.)

Source: compiled by the author.

Selectivity of two strains of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* on five members of the genus *Allium*

Seeds of five *Allium* species namely onion (*Allium cepa*), chives (*Allium schoenoprasum*), Welsh onion (*Allium fistulosum*), fragrant onion (*Allium ramosum*) and leek (*Allium porrum*) were procured for host selectivity studies. The research was premised upon exploring the host selectivity of 2 strains of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* specifically 0377 and 0419 which belong to the bacterial collection of the All-Russian Plant Quarantine Centre, originally sourced from France as CFBP 6107 and CFBP 6369. Bacterial inoculum with 3 concentrations ranging from 10^5 to 10^7 CFU/ml was prepared and used to infect cells of the homogenized plant material of the 5 *Allium* species from which DNA extraction was carried out. Subsequently level of pathogen proliferation in the different species was assessed by qPCR.

Pathogenicity trials and evaluation of BHQ probe as alternative to MGB

Three types of propagation material namely seed, onion sets and onion bulbs were (sown and planted) used to grow onions in the field. A bacterial inoculum of *X. euvesicatoria* pv. *allii* at concentration 7.4×10^7 CFU/ml was used to infect the plants. The leaves of the seedling plants were perforated by a pin and a cotton sab dipped in the bacteria suspension was gently rubbed on the leaf perforations. After a period of 4 months the plants were harvested and each of them was divided into 3 parts, in particular the leaves, the bulb apex and the roots. These 3 plant parts were assessed using qPCR, employing both the MGB probe and BHQ for comparative tests and to determine the presence of the bacteria as well as unravel the plant part in which they were most abundant.

Comparative media studies

To carry out media comparative studies, 3 candidate media, onion extract media (OEM), nutrient broth yeast (NBY) and yeast peptone glucose agar (YPGA) were prepared. Fifty microliters of bacterial suspension with a concentration of 6.6×10^2 was plated on the media, succeeded by incubation at 25°C for 5 days factoring in possible slow growth on the candidate media. At temperature 28°C recommended by media developers *X. euvesicatoria* pv. *allii* strain 0419 could not grow on OEM hence adjusted to 25°C.

Chapter 3. Results and Discussion

Determination of conventional nested PCR and real-time PCR Sensitivity

Bacterial dilutions 1 to 7 with concentrations ranging from 10^1 to 10^7 were tested with the PCR assays.

Sensitivity of nested PCR using AVR primers

Table 2 - Sensitivity of conventional PCR assay for *X. euvesicatoria* pv. *allii* across the 7 concentrations assessed, using AVR primers.

Suspension dilution	Bacterial concentration	Replications		
		1	2	3
SD1	10 ⁷	+	+	+
SD2	10 ⁶	+	+	+
SD3	10 ⁵	+	+	+
SD4	10 ⁴	+	+	+
SD5	10 ³	+	+	+
SD6	10 ²	+	+	+
SD7	10 ¹	+	+	–
K- Negative Control	dH ₂ O	–	–	–
CK- Negative Control- PCR zone	dH ₂ O		–	
K+ Positive Control	10 ⁸		+	

Source: compiled by the author.

As shown in table 2 the conventional PCR using AVR primers could detect bacteria from the first bacterial dilution to the 6th dilution, corresponding with concentrations 10⁷ to 10² CFU/ml. However, in the 7th dilution with concentration of 10¹ CFU/ml only 2 out of 3 replicates turned positive for the bacteria, hence detection at this level was considered as null.

Determination of nested PCR assay sensitivity using PIL primers

Table 3 Sensitivity of conventional PCR for *X. euvesicatoria* pv. *allii* using PIL primers.

Suspension dilution	Bacterial concentration	Replications		
		1	2	3
SD1	10 ⁷	+	+	+
SD2	10 ⁶	+	+	+
SD3	10 ⁵	+	+	+
SD4	10 ⁴	+	+	+
SD5	10 ³	+	+	+
SD6	10 ²	+	+	+
SD7	10 ¹	+	–	–
K- Negative Control	dH ₂ O	–	–	–
CK- Negative Control- PCR zone	dH ₂ O		–	
K+ Positive Control	10 ⁸		+	

Source: compiled by the author.

When the PIL primers were used the PCR assay could sufficiently detect the bacteria in dilutions 1-6 with corresponding concentrations of 10⁷-10² CFU/ml as shown in table 3. At the lowest concentration i.e. dilution 7, only one replicate tested for the bacteria, thus detection at this level was recorded as null.

Sensitivity of Duplex nested PCR as a function of AVR and PIL primers

Table 4- Sensitivity of duplex nested PCR assessed at each of the 7 concentrations

Suspension Dilution	Bacterial Concentration	Replications		
		1	2	3
SD1	10 ⁷	+	+	+
SD2	10 ⁶	+	+	+
SD3	10 ⁵	+	+	+
SD4	10 ⁴	+	+	+
SD5	10 ³	+	+	+
SD6	10 ²	+	+	+
SD7	10 ¹	+	-	-
K- Negative Control	dH ₂ O	-	-	-
CK- Negative Control- PCR zone	dH ₂ O	-		
K+ Positive Control	10 ⁸	+		

Source: compiled by the author.

The duplex nested PCR, combining both AVR and PIL primers had the same level of sensitivity as when the primers were used individually as highlighted in table 4. Therefore, at dilution 7 with lowest concentration 10¹ the PCR assay did not turn positive for all 3 replicates, thus recorded null at this level. Hence, the lowest concentration that could be detected was 10² corresponding to 6th bacterial dilution.

Sensitivity of Real-Time PCR assay for *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*

The real-time PCR (qPCR) assay for *X. euvesicatoria* pv. *allii* was also evaluated for sensitivity.

Sensitivity of qPCR using AVR primers

Table 5- Real-time PCR sensitivity across 7 bacterial dilutions from 1-7 correspondingly representing concentrations 10⁷ to 10¹ in descending order.

Bacterial Dilutions	Concentrations	Replications	CT Values	Averages
D1	10 ⁷	1.1	20,1	19.91
		1.2	19,1	
		1.3	20,5	
D2	10 ⁶	2.1	22,9	23.13
		2.2	22,2	
		2.3	24,3	
D3	10 ⁵	3.1	24,8	25.23
		3.2	24,9	
		3.3	26,0	
D4	10 ⁴	4.1	28,3	28.76
		4.2	28,6	
		4.3	29,4	
D5	10 ³	5.1	32,0	31.90
		5.2	31,9	

		5.3	31,8	
D6	10 ²	6.1	34,9	34.86
		6.2	34,8	
		6.3	34,9	
D7	10 ¹	7.1	36,2	36.06
		7.2	36,1	
		7.3	35,9	

Source: compiled by the author.

The RT-PCR using AVR primers could detect *X. euvesicatoria* pv. *allii* from the first dilution to the 7th with corresponding concentrations of 10⁷ and 10¹, table 5. Thus, the PCR assay demonstrated that it can detect the bacteria at low concentration of 6.8x10¹, having a CT value of 35.8.

Sensitivity of RT-PCR using PIL primers

Table 6- Real-time PCR sensitivity at each bacterial dilution/concentration using PIL primers

Bacterial Dilution	Concentrations	Replications	CT Values	Averages
D1	10 ⁷	1.1	18,8	20.13
		1.2	20,8	
		1.3	20,8	
D2	10 ⁶	2.1	20,9	22.73
		2.2	23,8	
		2.3	23,5	
D3	10 ⁵	3.1	25,6	25.47
		3.2	25,5	
		3.3	25,3	
D4	10 ⁴	4.1	28,7	28.73
		4.2	28,7	
		4.3	28,8	
D5	10 ³	5.1	32,1	31.63
		5.2	31,9	
		5.3	30,9	
D6	10 ²	6.1	34,5	35.00
		6.2	35,4	
		6.3	35,1	
D7	10 ¹	7.1	35,8	36.10
		7.2	36,3	
		7.3	36,2	

Source: compiled by the author.

Table 6 exhibits the sensitivity of RT-PCR using PIL markers with bacterial dilutions 1 to 7 constituent of corresponding concentrations 6.8x10⁷ CFU/ml descending to 6.8x10¹ CFU/ml respectively. The lowest concentration at which the PCR assay could detect bacteria was 10¹ CFU/ml with a CT value of 36.1.

Specificity of the PCR assay for *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*

Specificity of the duplex nested PCR

The *X. euvesicatoria* pv. *allii* strain (0419) tested positive to the assay, comparable to the control (strain 0377). For the exclusivity test the other 97 various bacterial strains were assessed and a *Xanthomonas* sp. (0373) was wrongly identified as *X. euvesicatoria* pv. *allii*. The remaining 96 bacteria tested negative to the assay. Therefore, the conventional duplex nested PCR assay had a fidelity or specificity of 99%.

Specificity of the Real-time PCR assay

In confirming the specificity of the used primers, AVR and PIL in the inclusivity tests, only the 2 target strains/isolates of *X. euvesicatoria* pv. *allii* tested positive when evaluated. The other 97 strains all tested negative to both AVR and PIL primers. Based on these findings the RT-PCR using either AVR or PIL markers had 100% specificity.

Determining the repeatability of the RT-PCR

The PCR assay was evaluated for repeatability using the AVR and PIL markers. Similar performance patterns were observed across the AVR and PIL markers whereby CT values were evenly distributed in the 3 lowest concentrations 6.6×10^1 to 6.6×10^3 CFU/ml. There was skewed distribution at concentrations 10^4 and 10^5 CFU/ml for PIL and AVR markers respectively. Despite the differences in CT value patterns, the assay could detect the bacteria in all 6 replications of the 7 concentrations (10^1 to 10^7) hence 100% repeatability.

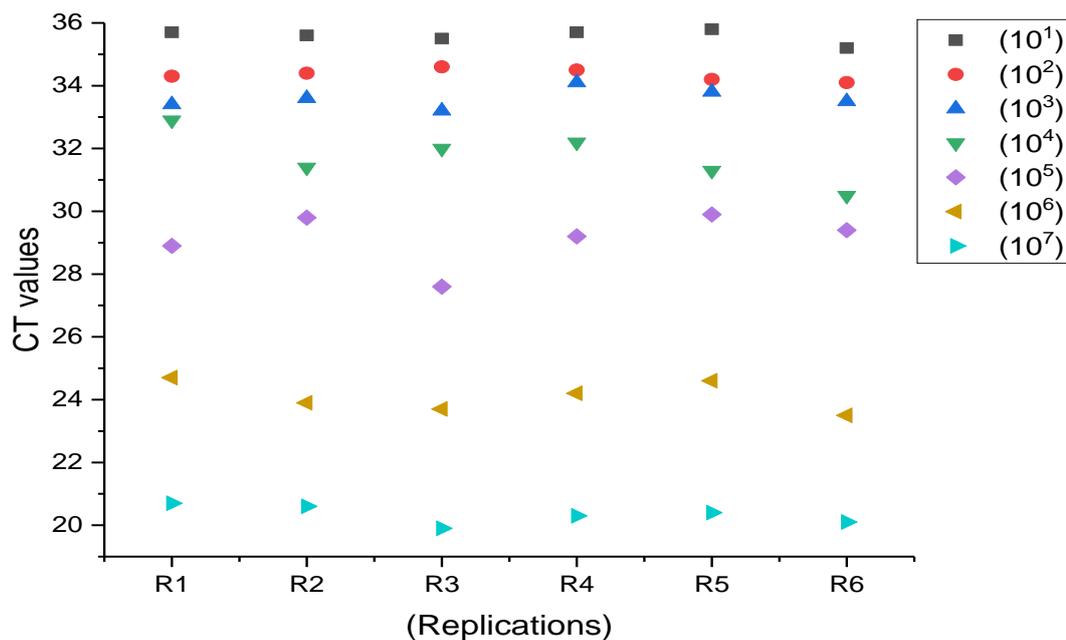


Fig. 1 Showing CT values for each replication of the bacterial concentrations when the bacterium was detected using AVR markers

Source: compiled by the author.

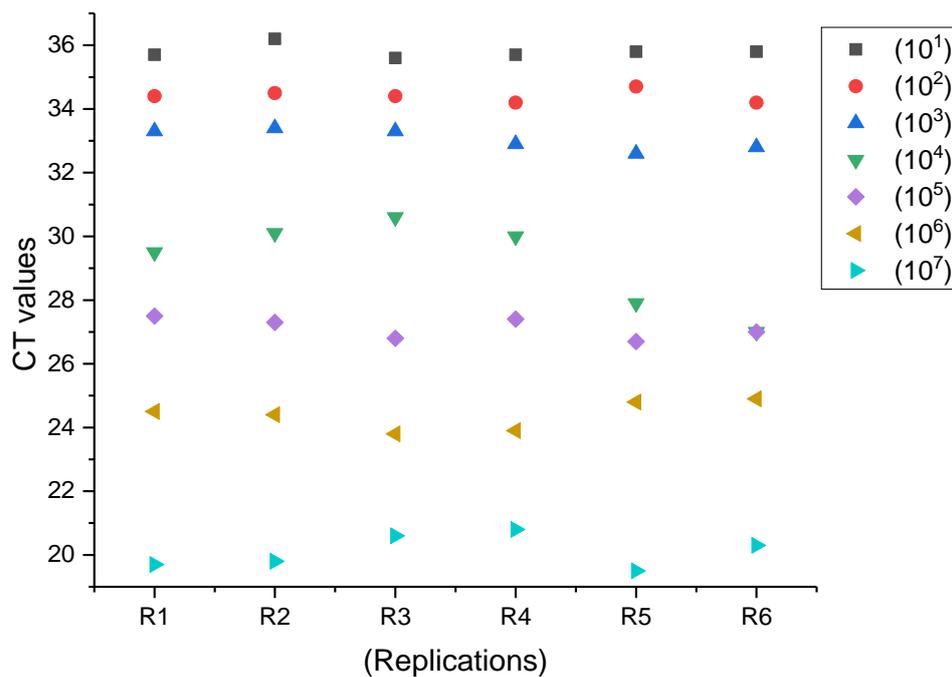


Fig. 2 Shows the patterns exhibited when the PIL markers were used to detect the bacteria across the replications of the 7 concentrations

Source: compiled by the author.

Determining reproducibility of the RT-PCR assay

Reproducibility of the PCR assay using the AVR marker

The data in table 7 below illustrates that for the 7 concentrations evaluated with the AVR primers the reproducibility of the assay was high between the operators and equipment used. Variability was lowest at the highest bacterial concentration 10^7 CFU/ml as evidenced by relative standard deviation of 0,33%, whereas the concentration 10^6 had the highest relative standard deviation of 1,62%. Moreover, with a standard deviation of 0,05 therefore high proximity to the mean CT cycle of 15,37 the test demonstrated high precision. Overall, with a relative standard deviation below 2% the assay exhibited good reproducibility.

Table 7- Variance between the operators and equipment used across the 7 bacterial concentrations

Concentration	Operators & equipment	CT Values	Mean CT	Standard Deviation	Relative Std. Dev.
10^7	OE1	15,4	15,37	0,05	0,33%
	OE2	15,3			
	OE3	15,4			
10^6	OE1	19,4	19,13	0,31	1,62%
	OE2	18,7			
	OE3	19,3			
10^5	OE1	23,7	23,43	0,21	0,90%
	OE2	23,2			
	OE3	23,4			

10 ⁴	OE1	28,2	27,77	0,33	1,19%
	OE2	27,7			
	OE3	27,4			
10 ³	OE1	32,1	31,57	0,41	1,30%
	OE2	31,5			
	OE3	31,1			
10 ²	OE1	34,9	34,53	0,39	1,13%
	OE2	34			
	OE3	34,7			
10 ¹	OE1	36,2	35,9	0,22	0,61%
	OE2	35,8			
	OE3	35,7			

Source: compiled by the author.

Reproducibility evaluation of the PCR using PIL markers

Detection of the bacteria with the PIL primers at each of the 7 concentrations revealed exceptionally low variations in repeat tests between the operators and equipment used, hence good reproducibility, table 8. Reproducibility was most eminent at the concentrations 10² and 10¹ CFU/ml as indicated by relative standard deviation of 0,55% and 0,59% in table 14. With a peak relative standard deviation of 1.81% at concentration 10⁷ CFU/ml the findings reflect that neither precision nor accuracy was significantly affected by the differences in operators and equipment used.

Table 8- Reproducibility of the assay in detecting the bacteria at varied concentrations as quantified by the relative standard deviation

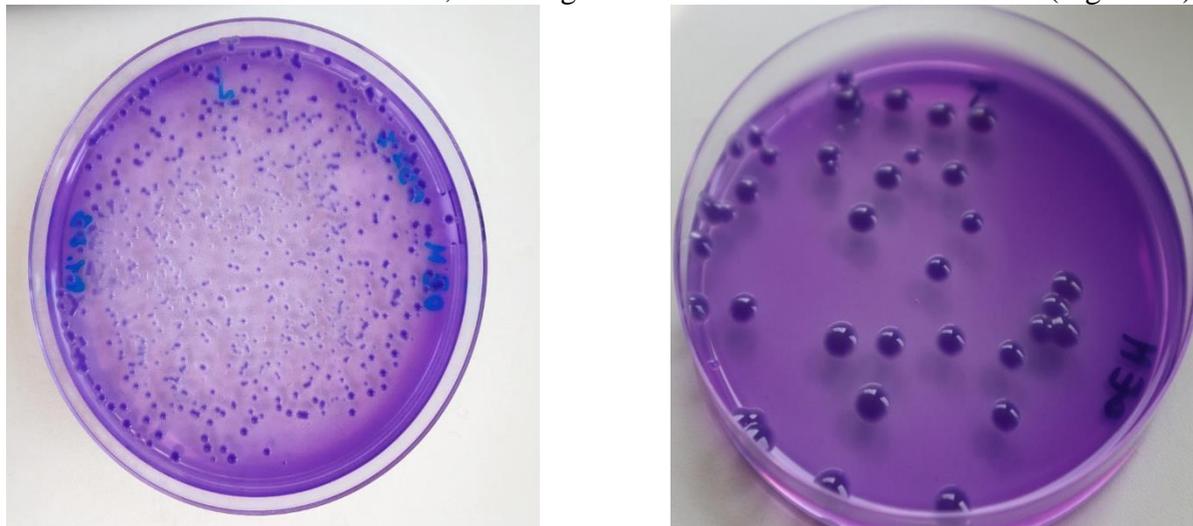
Concentration	Operators & equipment	CT Values	Mean CT	Standard Deviation	Relative Std. Dev.
10 ⁷	OE1	19,9	20,33	0,37	1,81%
	OE2	20,3			
	OE3	20,8			
10 ⁶	OE1	29,3	29,73	0,37	1,24%
	OE2	29,7			
	OE3	30,2			
10 ⁵	OE1	31,8	31,5	0,24	0,76%
	OE2	31,2			
	OE3	31,5			
10 ⁴	OE1	32,5	32,4	0,22	0,68%
	OE2	32,6			
	OE3	32,1			
10 ³	OE1	34,2	33,76	0,31	0,92%
	OE2	33,6			
	OE3	33,5			
10 ²	OE1	34,4	34,5	0,19	0,55%
	OE2	34,4			

	OE3	34,7			
	OE1	35,9			
10 ¹	OE2	35,6	35,86	0,21	0,59%
	OE3	36,1			

Source: compiled by the author.

Results of comparing the cultural properties of *X. euvesicatoria* pv. *allii* on various nutrient media.

In the course of the research work, culturing was carried out on 4 nutrient media (Fig. 3 – 5).



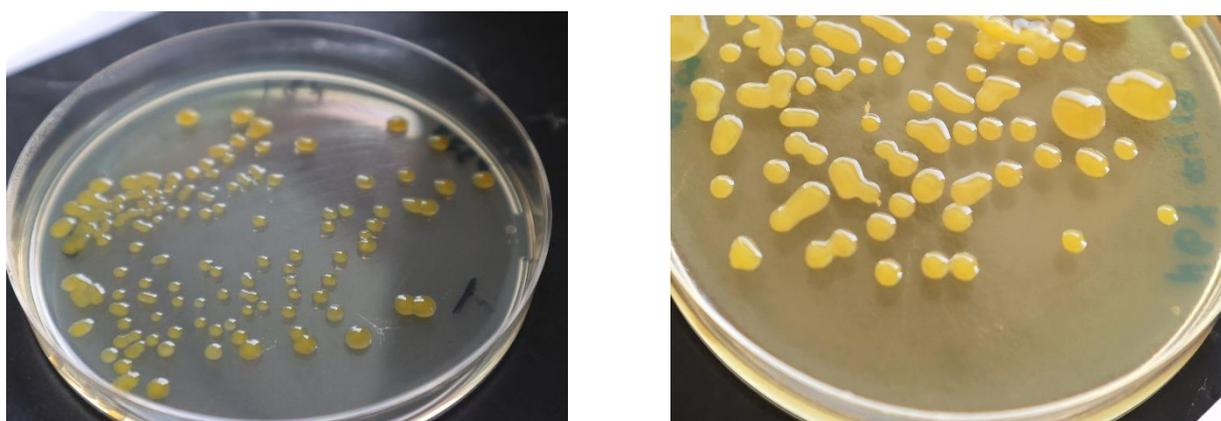
(a) Strain Xaa 0377

(b) Strain Xaa 0419

Fig. 3 Growth of *X. euvesicatoria* pv. *allii* strains on semi-selective OEM medium

Source: compiled by the author.

The colonies of strain Xaa 0377 were obtained on onion extract media (OEM) medium at both 25°C and 28°C plate incubation. The strain formed small white colonies of white colour, mucous with a smooth edge and a slightly raised centre. On the 5th day of culturing, the colonies acquired a dark-coloured centre, discolouring the medium.



(a) Strain Xaa 0377

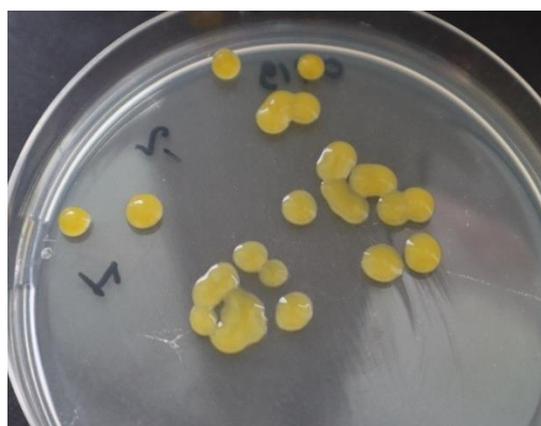
(b) Strain Xaa 0419

Fig. 4 Growth of *X. euvesicatoria* pv. *Allii* strains on NBY medium

Source: compiled by the author.



(a) Strain Xaa 0377



(b) Strain Xaa 0419

Fig. 5 Growth of *X. euvesicatoria* pv. *Allii* strains 0419 and 0377 on YPGA medium.

Source: compiled by the author.

On nutrient broth yeast (NBY) and YPGA media, *X. euvesicatoria* pv. *Allii* strains formed colonies of the same type: yellow mucous, with a raised top and a smooth edge. The colour of the colonies is yellow. On the 5th day of incubation, the colonies reached a size of ≥ 5 mm and merged. The growth of the strains on both nutrient media was observed to be equally intense.

***Xanthomonas euvesicatoria* pv. *Allii* host selectivity across different *Allium* species**

To ascertain host selectivity of the *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *Allii* across various *Allium* species, two strains (0377) and (0419) were used to infect 5 *Allium* spp. Namely *A. cepa* (AC), *A. schoenoprasum* (AS), *A. fragrans* (AF), *A. ramosum* (AR) and *A. porrum* (AP). The infected plant cells were assessed using RT-PCR to determine host selectivity of the pathogen amongst the 5 species.

Host selectivity of strain 419 across 5 *Allium* species

Table 9- Detection of the pathogen in 5 *Allium* spp inoculated with three concentrations of the bacteria in real-time PCR analysis.

Species	Bacterial Dilution	Concentration	Average CT cycle
<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

Source: compiled by the author.

Host selectivity of strain 0377 on 5 *Allium* species

Table 10- Detection levels of strain 0377 at 3 concentrations in the inoculated *Allium* species in real-time PCR analysis.

Species	Bacterial Dilution	Concentration	Average CT cycle
<i>A. cepa</i>	D4	10 ⁵	27,1
	D5	10 ⁶	31,1
	D6	10 ⁷	33,2
<i>A. schoenoprasum</i>	D4	10 ⁵	27,1
	D5	10 ⁶	30,8
	D6	10 ⁷	33,4
<i>A. fragrans</i>	D4	10 ⁵	27,9
	D5	10 ⁶	31,2
	D6	10 ⁷	33,2
<i>A. ramosum</i>	D4	10 ⁵	28,4
	D5	10 ⁶	32,9
	D6	10 ⁷	33,7
<i>A. porrum</i>	D4	10 ⁵	28,7
	D5	10 ⁶	32,0
	D6	10 ⁷	33,8

Source: compiled by the author.

When the strain 0419 was tested for host selectivity across the 5 *Allium* species the non-distinct host specificity as shown in table. The strain 0377 also similarly exhibited at each of the concentrations (dilutions) used.

The efficacy of DNA extraction methods on enhancement of the *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* PCR assay

The thrust of this study was to evaluate commercially available DNA extraction kits optimized for plant material and identify the most suitable for isolating *X. euvesicatoria* pv. *allii*. The three commercial extraction kits, Probe GS, Sorb GMO and FitoSorb used in the study.

Table 11- Mean Ct values and standard deviation at each bacterial concentration for the three extraction methods

Extraction Method	Avg. CT (mean±SD) with following dilutions of <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>						
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
Probe GS	17.9 ^a (±0.21)	20 ^a (±0.47)	24.5 ^a (±0.06)	27.3 ^a (±0.06)	30.8 ^a (±0.64)	34.2 (±0.45)	35.8 (±0.44)
Sorb-GMO	20.9 ^b (±0.80)	23.7 ^c (±0.26)	27.8 ^b (±1.33)	31.4 ^b (±1.59)	34.2 ^b (±0.78)	ND	ND

FitoSorb	19.6 ^b (±0.64)	22.6 ^b (±0.15)	25.9 ^{ab} (±0.69)	29.6 ^{ab} (±1.08)	32.9 ^b (±0.95)	ND	ND
----------	------------------------------	------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	------------------------------	----	----

§Different letters in the same column denote statistically significant differences

*ND, not determined, the average CT cycles were only calculated for samples which had three positive results out of three replicates.

Source: compiled by the author.

The Probe GS extraction kit effected the highest degree of sensitivity ($p < 0.05$) on the PCR assay and had the most consistent detection ability at all seven concentrations. At lower concentrations 10^2 CFU/ml and 10^1 CFU/ml, the other two methods Sorb GMO and FitoSorb could not attain 3 positive results per sample, hence the cut of thresholds at those concentrations were not determined, (ND) table 11.

3.9. Germination response of commercial onion varieties to inoculation with *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*

The object of carrying out this experiment was to investigate the effect of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* on the germination of onion seeds. As shown in fig 6 the highest inoculum concentration 10^8 had the highest impact on 3 varieties namely, Myachkovsky 300, Carmen MS and Chalcedony with germination energy of 3, 2 and 0 respectively.

Effect of bacterial concentration on germination energy

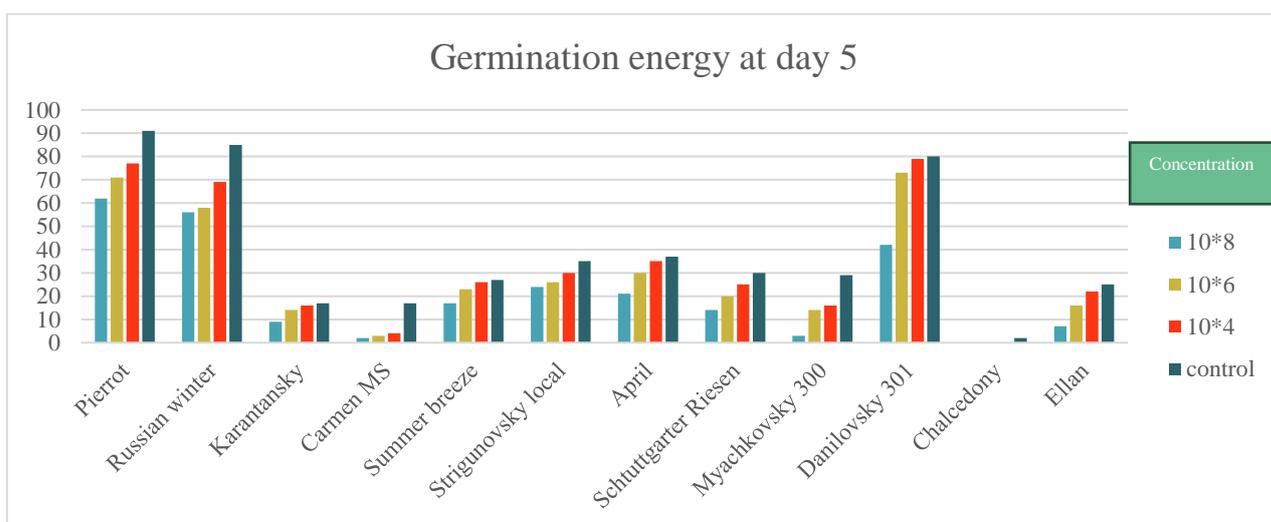


Fig 6. The chart shows germination energy at different concentrations on day 5 of recording

Source: compiled by the author.

Effect of inoculum concentration on onion seed germination

Table 12- Germination percentage of the onion varieties at day 14

Variety	Germination percentage per bacterial concentration- %			
	10^8	10^6	10^4	Control
Pierrot	80c	84bc	86b	96a
Russian winter	59d	66c	75b	92a
Karantansky	54b	56b	57b	83a

Carmen MS	4c	6bc	8b	45a
Summer breeze	55c	61b	68a	73a
Strigunovsky local	45b	48b	51b	87a
April	45c	51bc	55b	82a
Schtuttgartter Riesen	21c	52b	67a	69a
Myachkovsky 300	4d	22c	35b	85a
Danilovsky 301	50d	76c	83b	94a
Chalcedony	0b	0b	0b	8a
Ellan	23c	26c	46b	53a

Source: compiled by the author.

For most of the onion varieties there were variations in the level of germination inhibition across different concentrations, table 12. Therefore, the highest concentration 10^8 CFU/ml effected the highest level of inhibition, whilst 10^6 CFU/ml had moderate levels and the least inhibition observed in the least concentration 10^4 CFU/ml. In the variety Carmen-MS the pattern of germination inhibition shifted at day 14 of recording where the lowest germination percentage (4%) was observed in the highest bacterial concentration, though concentrations 10^6 and 10^4 CFU/ml were statistically similar ($p>0.05$).

Artificial infection under field conditions of onion (*A. cepa*) plants grown from 3 different propagation material (seed, onion sets and onion bulbs) as well as evaluation of BHQ probe as alternative to MGB.

Table 13- Detection of *X. euvesicatoria* pv. *allii* in different plant parts of onions propagated from seed, using PIL markers and the MGB probe.

Plant ID according to propagation method	CT values of plant parts assessed		
	Stem Disc	Bulb apex	Leaves
Sd1	34.12	30.58	32.10
Sd2	34.00	31.30	32.62
Sd3	30.74	27.57	30.36
Sd4	28.16	29.00	31.60
Sd5	33.72	27.38	33.46
Sd6	27.24	32.36	33.40
Sd7	26.22	24.38	29.23
Sd8	33.89	30.80	32.90
Sd9	34.15	32.71	31.25
Sd10	33.70	30.45	30.48
Sd11	35.32	34.43	31.75

Source: compiled by the author.

The 3 plant parts (leaves, bulb apex and stem disc) of the plant samples propagated from onion seed were assessed for pathogen presence and the results in table 13 were obtained. The bulb apex had low mean CT values in the majority of the samples except in sample Sd11 where the CT value 34.43 was higher than that of the leaf sample 31.75. The fact that the lowest CT value 24.38 recorded for all tested samples was for the bulb apex further consolidates the logic the concept that detection of the pathogen in this plant part was much more rapid in comparison with the other parts, for instance the stem disc which had the highest CT value 35.32. It can be reasoned that the other 2 plant parts namely the leaves and stem disc serve as habitats i.e. the phyllosphere (leaves) and rhizosphere to a lot more microorganisms that may have some inhibitory effects on the PCR assay as compared to the bulb apex which may have less inhibitory effect.

Table 14- Pathogen detection using PIL primers with BHQ probe in seed-raised inoculated plants

Plant ID according to propagation method	CT values of plant parts assessed		
	Stem disc	Bulb apex	Leaves
Sd1	30.34	28.51	33.62
Sd2	33.42	31.65	32.75
Sd3	33.57	28.42	30.14
Sd4	29.69	25.37	30.58
Sd5	32.37	27.78	31.46
Sd6	31.66	24.89	29.25
Sd7	33.28	25.66	28.71
Sd8	32.36	21.25	27.36
Sd9	34.31	30.17	33.86
Sd10	33.53	29.46	31.28
Sd11	33.54	26.24	31.61

Source: compiled by the author.

The use of the BHQ probe in combination with the PIL markers in assessing seed raised plant samples saw the CT values dropping across all the plant part samples as indicated in table 14, comparing with the use of the MGB probe in table 13. For instance, in the bulb apex samples with the majority of low CT values, the lowest value recorded was 21.25 which was lower than when the MGB probe was used with the PIL markers in table 13. Moreover, when the BHQ probe coupled with PIL primers, the highest CT value was 34.31 which was lower than when MGB probe was used 35.32 (table 13). Higher detection efficiency was therefore demonstrated for this plant part (stem disc) when the PIL markers were used in combination with the BHQ probe.

Conclusion

- Based on the results of the research on the collection of data on the systematics, pathogenicity, and biology of bacteria, it was observed that the *X. euvesicatoria* pv. *allii* strains do not have a distinct host specificity among the various *Allium* species. Additionally, when disease effects in-planta on various parts of the onion plants grown from different propagation material under field conditions it was discovered that the

bacteria multiplied vigorously and had prolonged persistence in the bulb apex as compared to the leaves and the stem-disc.

- The study on the cultural properties and growth characteristics of bacteria on different growth media demonstrated that on the OEM incubation temperature was an influential factor especially for *X. euvesicatoria* pv. *allii* strain 0419 which did not grow on the media at 28°C but produced colonies at 25°C. On the NBY and YPGA media, both strains were able to produce colonies, but strain 0419 showed somewhat restricted growth on YPGA compared to strain 0377.
- All technical aspects i.e. sensitivity, specificity, repeatability and repeatability of the qPCR as well as the conventional nested PCR were evaluated and validated. Sensitivity of the qPCR was determined and the lowest detection concentration was 6.8×10^1 CFU/ml whereas for the conventional nested PCR the least detectable concentration was 1.0×10^2 CFU/ml. The test had a specificity of 99% when the conventional PCR was assessed whilst the qPCR exhibited 100% specificity. For both AVR and PIL primers the good reproducibility, below 2% relative standard deviation exhibited by the test between operators with their respective equipment is indicative of the achievable accuracy by which the pathogen can be detected.
- The BHQ probe was evaluated in testing the presence of the bacteria in different parts of inoculated onion plants and was found to be effective when using both AVR and PIL primers. The BHQ probe is therefore recommended as an alternative to the MGB probe which is not available on the Russian market. The research findings proved that the bacterial concentrations used (10^4 ; 10^6 and 10^8 CFU/ml) significantly inhibited germination of the 12 onion varieties. However, for the most susceptible variety Chalcedony, there was no variation across concentrations ($p > 0.05$).
- The study confirmed that DNA isolation method influences the performance of the assay. The DNA extraction kit Probe GS enhanced PCR sensitivity such that the assay could detect the bacteria at the lowest concentration of 10^1 CFU/ml whilst the other 2 methods Sorb GMO and FitoSorb could only detect the bacteria at the lowest concentration of 10^3 CFU/ml. Therefore, Probe GS is recommended as the standard method of isolating DNA for *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

List of published works on the topic of the dissertation

Articles in publications indexed by Scopus

1. Kavhiza, N.J., Zargar, M., Prikhodko, S.I., Pakina, E.N. and Muvingi, M., 2023, June. Germination response of 12 onion varieties to inoculation with *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2777, No. 1). AIP Publishing.
2. Kavhiza, N.J., Zargar, M., Prikhodko, S.I. and Pakina, E.N., 2022. Comparison of three commercial DNA extraction kits for the enhancement of PCR assay sensitivity for *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. Journal of Applied Microbiology, 132(2), pp.1221-1226.
3. Kavhiza, N.J., Zargar, M., Prikhodko, S.I., Pakina, E.N., Murtazova, K.M.S. and Nakhaev, M.R., 2022. Improving crop productivity and ensuring food security through the adoption of genetically modified crops in sub-Saharan Africa. Agronomy, 12(2), p.439.
4. Saffa, M.D., Saqee, F.S., Norman, P.E., Kavhiza, N.J., Simbo, D., Zargar, M., Lyashko, M., Pakina, E. and Vvedensky, V., 2023. Influence of Field and Storage Diseases and Pests on Tuber Yield and Quality of Exotic and Local Yam (*Dioscorea spp.*) Genotypes. Horticulturae, 9(11), p.1183.
5. Arsene, M.M.J., Zangue, D.S.C., Ngoune, T.L., Nyasha, K. and Louis, K., 2021. Antagonistic effects of raffia sap with probiotics against pathogenic microorganisms.

Foods and Raw materials, 9(1), pp.24-31.

6. Saqee, F.S., Norman, P.E., Saffa, M.D., Kavhiza, N.J., Pakina, E., Zargar, M., Diakite, S., Stybayev, G., Baitelenova, A. and Kipshakbayeva, G., 2023. Impact of different types of green manure on pests and disease incidence and severity as well as growth and yield parameters of maize. *Heliyon*, 9(6).

Articles in publications recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Federation (VAK)

1. Кавиза Н.Д., Заргар М., Приходько С.И., Пакина Е.Н., Диаките С. Влияние *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* на прорастивание 12 сортов лука репчатого // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2023. Т. 18. № 2.

Scientific conferences attended

1. Kavhiza N.J. Evaluation of post-emergence herbicide programs for effective control of important broad-leaved weeds in spring wheat. Международной научной конференций "Агрехимическое обеспечение цифрового земледелия". Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева. 2019.
2. Kavhiza, N.J., Zargar, M., Prikhodko, S.I., Pakina, E.N. and Muvingi, M., 2023, June. Germination response of 12 onion varieties to inoculation with *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. INTERNATIONAL SCIENTIFIC AND PRACTICAL CONFERENCE "CURRENT ISSUES OF BIOLOGY, BREEDING, TECHNOLOGY AND PROCESSING OF AGRICULTURAL CROPS" (CIBTA2022) (To the 110th anniversary of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops). 1–2 June 2022. Krasnodar, Russia.
3. Kavhiza N.J. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* and its potential threat to global onion production: A review. Международную научно-практическую конференцию "Аграрная Наука-2023" (AgriScience2023). Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева. 2023.

КАВИЗА НЬЯША ДЖОН

**АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ
ФИТОПАТОГЕНА *XANTHOMONAS EUVESICATORIA PV. ALLII***

Специальность 4. 1. 3. Агрехимия, агропчоведение, защита и карантин растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва, 2024

Работа выполнена в Аграрно-технологическом институте Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и на базе лаборатории бактериологии и анализа ГМО ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»

Научный руководитель: **Заргар Мейсам**, доктор сельскохозяйственных наук, доцент, профессор Агробиотехнологического департамента, АТИ РУДН

Официальные оппоненты: **Хютти Александр Валерьевич**, кандидат биологических наук, заведующий сектором "Грибных, вирусных, микоплазменных и нематодных болезней картофеля и овощных культур" ФГБНУ Всероссийский НИИ защиты растений

Зейрук Владимир Николаевич, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, лабораторией защиты растений ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»

Ведущая организация: Прикаспийский аграрный федеральный научный центр Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «28» июня 2024 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8, корп.2, зал 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в УНИБЦ (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) по адресу: 117198 ул. Миклухо-Маклая, д. 6, и на сайте: <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН)
по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета ПДС 2021.002

доктор сельскохозяйственных наук
доцент

Пакина Елена Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Распространение новых возбудителей болезней растений, а также карантинных штаммов существующих патогенов представляет серьезную фитосанитарную угрозу поскольку они обладают инвазивным действием и имеют тенденцию быстро интродуцироваться в новых регионах еще до того, как будет осознана реальная угроза сельскому хозяйству. Ситуация усугубляется недостатками соответствующих диагностических технологий на начальном этапе эпифитотий (Robene et al., 2015).

Листевой ожог лука (ЛОЛ), вызываемый протеобактерией *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* (Kadota et al., 2000) - заболевание растений, которое имеет серьезные агрономические и экономические последствия для производства лука. Хотя это внекорневое заболевание, оно приводит к задержке роста растений и недоразвитости луковиц, что снижает урожайность на 50% и более (Gagnevin et al., 2014). Заболевание протекает довольно тяжело в период начальной фазы вегетации растений. Бактерия проникает в растение через устьица и быстро размножается, особенно в периоды высокой влажности (Nga et al., 2021). Передаваемая с семенным материалом, эта бактерия снижает товарность урожая семян лука. Для сдерживания дальнейшего распространения *X. euvesicatoria* pv. *allii* на новые территории и регионы патоген, был внесен в список карантинных объектов ЕРРО А1.

Борьба с листовым ожогом лука преимущественно ведется с помощью бактерицидов на основе меди, и препаратов группы дитиокарбамат этиленбиса. Однако широко-распространенное наличие генов резистентности к пестицидам у бактерий рода *Xanthomonas* ограничивает эффективность этого метода контроля (Richard et al., 2017; Richard et al., 2016; Behlau et al., 2011).

Использование бактериофагов представляет собой перспективный метод борьбы. Nga et al., (2021) заявили, что использование фагов, специфичных для *X. euvesicatoria* pv. *allii* в концентрациях 10^7 и 10^8 PFU/ml в полевых условиях на луке валлийском (*A. fistulosum*) значительно подавляет симптомы заболевания, сравнимо с химическим бактерицидом оксолиновой кислотой (Starner).

Для эффективного контроля *X. euvesicatoria* pv. *allii*, крайне важна разработка надежного и высокочувствительного диагностического протокола. Обнаружение и идентификация *Xanthomonas* в растительном материале на основе ПЦР является высокоэффективным методом (Robene-Soustrade et al., 2006). Robene-Soustrade et al. (2010) разработали ПЦР-анализ на основе целевого гена эффектора *avrRxv* и генов пилина (*pilW* и *pilX*). Когда ПЦР тестировали исключительно на бактериях рода *Xanthomonas*, большинство штаммов не продуцировали ампликоны, за исключением 9 штаммов из *X. axonopodis* подгрупп 9.1 и 9.2, которые не являются патогенными для лука. Обоснование разработки этого протокола мультиплексной ПЦР заключалось в том, чтобы обеспечить возможность обнаружения генетически гетерогенных штаммов *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Исследования также продемонстрировали повышенную чувствительность и специфичность за счет использования классической ПЦР.

До разработки этого ПЦР-анализа основными методами идентификации были тесты на патогенность, обычно в сочетании с молекулярным типированием, проводимым после выделения патогена на селективных средах (Picard et al., 2008; Gent et al., 2004). Такие методы были неэффективны, поскольку при низких концентрациях бактерий могли быть получены ложноотрицательные результаты. Более того, эти методы требовали длительного времени (Robene-Soustrade, 2010). В дополнение к обычной ПЦР была разработана ПЦР в реальном времени (РВ-PCR), позволяющая проводить высокопроизводительное

тестирование, адаптируемое как для обнаружения карантинных объектов, так и для исследовательских целей (Robene et al., 2015). Оптимизация ОТ-ПЦР может привести к улучшению показателей специфичности, чувствительности, быстроты анализа, и дает возможность количественного определения патогена, а также сокращает время на анализ результатов после амплификации.

Степень разработанности темы. Основной путь распространения *X. euvesicatoria* pv. *allii* в новые регионы происходит через международную торговлю семенами. Поэтому для эффективного сдерживания трансграничной передачи этого карантинного патогена необходимо разработать и постоянно оптимизировать методы молекулярного обнаружения и идентификации в ответ на эволюционирующие популяции патогена. В связи с этим крайне важно было провести анализ биологических особенностей этого патогена, а также оптимизировать метод молекулярной диагностики, то есть ПЦР. Кроме того, была получена важная информация о спектре вирулентности данного вида бактерий, что позволит существенно улучшить методы контроля данного патогена.

Цель и задачи исследования – Проанализировать различные биологические свойства и оптимизировать молекулярно-генетические методы диагностики фитопатогена *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- Собрать и проанализировать информацию о систематике, патогенности и биологии *X. euvesicatoria* pv. *allii*.
- Изучить культуральные свойства и особенности роста *X. euvesicatoria* pv. *allii* на различных питательных средах.
- Протестировать и оптимизировать существующие методы диагностики.
- Разработать альтернативный зонда (пробу) для MGB для ПЦР в реальном времени.
- Оценить эффективность методов выделения ДНК с помощью ПЦР-анализа на *X. euvesicatoria* pv. *allii*

Научная новизна работы:

В ходе исследования была выявлена достоверная корреляция между методом выделения ДНК и эффективностью ПЦР-анализа. Это привело к усовершенствованию ПЦР-анализа в результате определения оптимального метода извлечения ДНК.

1. Было обнаружено влияние *X. euvesicatoria* pv. *allii* на жизнеспособность и энергию прорастания семян лука.
2. Предложен и протестирован зонд ВНҚ (Black Hole Quencher®) в качестве альтернативы зонду MGB (Minor Groove Binder, Applied Biosystems TaqMan, USA), который недоступен на российском рынке, который показал совместимость как с праймерами AVR, так и с праймером P1L. Зонд ВНҚ был признан эффективной заменой для MGB.
3. Изучение воздействия болезней in-planta на различные части растений лука, выращенных из разного материала для размножения в полевых условиях, показало, что бактерии размножались более интенсивно и дольше сохранялись в верхушке луковицы.
4. В ходе исследования было выявлено влияние температуры на рост *X. euvesicatoria* pv. *allii* на среде на основе лукового экстракта (ОЕМ).

Теоретическая и практическая значимость. Усовершенствованный и оптимизированный диагностический ПЦР протокол для *X. euvesicatoria* pv. *allii* подходит как для использования в России, так и в других странах. Все показатели ПЦР-анализа, такие

как чувствительность, специфичность, повторяемость и воспроизводимость, были оценены и подтверждены. Оптимизация метода экстракции бактериальной ДНК, легко адаптируемого к протоколу ПЦР, значительно повысила эффективность анализа, что позволило быстрее и точнее обнаруживать, и идентифицировать патогены. Проведенные исследования привели к получению альтернативы зонду MGB путем замены на зонд ВНҚ. Исследование также расширило знания о биологии патогена

Исследования селективности к хозяину и культуральных свойств патогена на различных питательных средах расширило знания о биологии данной бактерии.

Идентификация верхушечной части луковицы как части растения с наибольшей концентрацией патогена и максимальной скоростью его размножения позволила определить источник вторичного заражения и потенциальный источник эпифитотии. Результаты исследования позволят существенно улучшить идентификацию данного карантинного объекта службами фитосанитарного надзора.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оптимизация методов идентификации возбудителя бактериоза лука *X. euvesicatoria* pv. *allii* – карантинного фитопатогена на территории РФ, включающая улучшенные методы пробоподготовки, применение селективных питательных сред, выделения ДНК, и ПЦР в реальном времени с альтернативным зондом с гасителем флуоресценции ВНҚ.

2. Система мультиплексной диагностики *X. euvesicatoria* pv. *allii* – методом ПЦР в реальном времени, рекомендуемая для анализа образцов семян лука на зараженность возбудителем бактериоза.

3. Реакция жизнеспособности и энергии прорастания семян некоторых сортов лука на заражение *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Методологию и методы исследования. Методология проведенных исследований основана на научных подходах выявления, морфометрических особенностей фитопатогенных бактерий и патогенеза вызываемых ими болезней растений, изучении литературных источников, обозначении цели исследований и постановки задач для ее достижения, проведении лабораторных опытов, сравнительном анализе полученных результатов. Исследования проводились по общепринятым микробиологическим и молекулярно-генетическим методикам диагностики фитопатогенов.

Апробация результатов работы. Итогом диссертационного исследования стала публикация 7 статей, в том числе 6 в научных журналах индексируемых в базе данных SCOPUS, и 1 в журнале, включенном в Перечень ВАК РФ. Результаты диссертационной работы были представлены на следующие мероприятия: Международная научная конференция "Агрехимическое обеспечение цифрового земледелия". Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева. 2019; INTERNATIONAL SCIENTIFIC AND PRACTICAL CONFERENCE "CURRENT ISSUES OF BIOLOGY, BREEDING, TECHNOLOGY AND PROCESSING OF AGRICULTURAL CROPS", June 2022. Krasnodar, Russia; Международная научно-практическая конференция "Аграрная Наука-2023" (AgriScience2023). Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2023.

Личный вклад автора. Кандидат участвовал в определении цели и конкретных задач исследования; собирал и анализировал полученный материал, обрабатывал и интерпретировал данные, а также готовил публикации лично и в соавторстве.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Он содержит 136 страниц, информация представлена вместе с 32 таблицами и 15 рисунками. Список литературы включает 149 источников.

Благодарности

Автор благодарит Приходько Светлану Игоревну, научного сотрудника, заместителя начальника Испытательного лабораторного центра (ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ВНИИКР)) за помощь в исследовательской работе по теме диссертации.

Содержание диссертации

Введение. В этом разделе раскрывается цель проведения исследования, а также такие аспекты, как актуальность и новизна.

Глава 1. Обзор литературы

В этой главе дается обзор литературных источников, освещающий известные аспекты объекта исследований, а также выявляются пробелы в знаниях. Это формирует фундамент, на котором базируется исследование. Изучаются сложные взаимосвязи между различными аспектами, например, влияние генетического разнообразия на устойчивость бактерии к меди и вытекающие из этого последствия для контроля патогена. Обобщение фактов, представленных в литературе, делает очевидной настоятельную необходимость в разработке точного и эффективного протоколе диагностики *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Глава 2. Материалы и методы

Выделение ДНК

Целью этого эксперимента была оценка коммерчески доступных наборов для извлечения ДНК, оптимизированных для растительного материала, и определение наиболее подходящих для выделения *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Три коммерческих набора для экстракции, Проба ГС, Сорб-ГМО и ФитоСорб, использованные в исследовании, имеют разные механизмы восстановления ДНК, т.е. магнитные шарики, сорбент на основе кремнезема, а также стекло и диатомовую землю. 200 мкл экстракта семян, инокулированных бактерией в диапазоне концентраций от 10^1 до 10^7 КОЕ/мл, в трех вариантах для каждого образца отбирали для извлечения ДНК и, следовательно, обнаружения патогена с помощью ПЦР.

Определение чувствительности классической ПЦР и ПЦР в реальном времени

Чувствительность оценивали как с помощью обычной ПЦР, так и с помощью ПЦР в реальном времени (qPCR) для *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Проводили десятикратное последовательное разведение с получением 7 разведений с концентрациями в диапазоне от $6,8 \times 10^1$ до $6,8 \times 10^7$ КОЕ/мл, где первое разведение D1 соответствовало наивысшей концентрации, а последнее разведение D7 соответствовало наименьшей концентрации. Образцы семян лука измельчали и гомогенизировали, затем инфицировали различными концентрациями бактерий перед обнаружением бактерий с помощью ПЦР-анализа. Были проведены повторные испытания с трехкратным воспроизведением экспериментальных установок.

Оценка специфичности ПЦР-анализов на *X. euvesicatoria* pv. *allii*

В исследовании для тестов на инклюзивность использовались 2 штамма целевой бактерии *X. euvesicatoria* pv. *allii*, а именно 0377 и 0419 Всероссийского центра карантина растений,

первоначально поставленные из Франции под обозначениями CFBR 6107 и CFBR 6369 соответственно. Для тестов на эксклюзивность были использованы 97 других видов бактерий. Исследования проводились с использованием обычных ПЦР и КПЦР с использованием двух маркеров AVR и PIL.

Определение повторяемости

Для установления степени соответствия результатов ПЦР-теста была исследована серия 10-кратных разведений искусственно инфицированных экстрактов в 6-кратном повторении на уровне пороговых концентраций фитопатогена, установленных при определении чувствительности.

Определение воспроизводимости ПЦР-анализа

Оценку воспроизводимости проводили для определения способности ПЦР-анализа обнаруживать *X. euvesicatoria* pv. *allii* с использованием 2 наборов праймеров AVR и PIL для 7 концентраций ($7,2 \times 10^1$ - $7,2 \times 10^7$ КОЕ/мл) с 3 разными операторами и наборами оборудования в трех повторностях.

Эксперименты с реакцией на прорастание- Эксперимент был организован по полной рандомизированной схеме (ПРС) с трехкратной повторностью на 12 коммерческих сортах лука (таблица 1). Для каждого сорта 100 семян в чашке Петри инокулировали 5 мл бактериальной суспензии в 3 концентрациях *X. euvesicatoria* pv. *allii* (10^4 ; 10^6 и 10^8 КОЕ/мл). В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду. Затем чашки Петри инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. По окончании инкубационного периода бактериальную суспензию сливали и семена оставляли высыхать при комнатной температуре $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Затем сухие инокулированные семена переносили в чашки Петри, выстланные на дне фильтровальной бумагой толщиной 9 см. В чашки Петри добавляли дистиллированную воду. Затем чашки Петри помещали в инкубатор при температуре $21 \text{ }^\circ\text{C}$ в темноте. Семена инкубировали в течение 14 дней и подсчет всхожести проводили каждый день.

Таблица 1- Районированные в РФ сорта лука, которые использовались в исследовании

№	Сорт	Оригинатор	Основные характеристики
1	Пьеро	Агрофирма Аэлита	Валийский лук (<i>Allium fistulosum</i> L.)
2	Русская зима	ФГБНУ Федеральный научный центр овощеводства	Валийский лук (<i>Allium fistulosum</i> L.)
3	Апрель	дальневосточной Опытной станции – ОАО "ВНИИР" /ЗАО Ланс компании	Валийский лук (<i>Allium fistulosum</i> L.)
4	Карантанский	Агрофирма Аэлита ООО/гетерозиса выбор ООО	Лук- порей (<i>Allium porrum</i> L.)
5	Летний бриз	Гавриш овощная селекционная компания,	Лук- порей (<i>Allium porrum</i> L.)
6	Стригуновский местный	ЗАО Научно-производственная фирма "российские семена"; Ассоциация по семеноводству овощных культур "Сортсемовощ"; Агрофирма Аэлита ООО; ФГБУ "Федеральный	Лук репчатый (<i>Allium cepa</i> L.)

		научный центр овощеводства"; Сатива ООО; гетерозис выбор ООО	
7	Кармен МС	Агрофирма Аэлита ООО/АЛТ семена	Лука репчатый (<i>Allium cepa</i> L.)
8	Штуттгартер Ризен	Самен Маузер Кведлинбург, Германия	Лук репчатый (<i>Allium cepa</i> L.)
9	Мячковский300	ФГБУ "Федеральный научный центр овощеводства"; ЗАО "Компания Ланс"; АО "Озеры"	Лук репчатый (<i>Allium cepa</i> L.)
10	Даниловский 301	Федерального научного центра овощеводства, Агрофирма Аэлита, ООО, Ланс компании	Лук репчатый (<i>Allium cepa</i> L.)
11	Халцедон	ООО «ЮВЕС 2000», ООО «ИНТЕРСЕМЯ», ООО «АГРОФИРМА ПОИСК», ООО «ГЕТЕРОЗИСНАЯ СЕЛЕКЦИЯ»	Лук репчатый (<i>Allium cepa</i> L.)
12	Эллан	он ФГБОУ "Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина"	Лук репчатый (<i>Allium cepa</i> L.)

Источник: составлено автором.

Селективность двух штаммов *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* в отношении пяти представителей рода *Allium*

Семена пяти видов лука, а именно лука репчатого (*Allium cepa*), зеленого лука (*Allium schoenoprasum*), валлийского лука (*Allium fistulosum*), душистого лука (*Allium ramosum*) и лука-порея (*Allium porrum*), были закуплены для исследований селективности патогена в отношении растения-хозяина. Исследовали два штамма *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*, - 0377 и 0419 из коллекции фитопатогенных бактерий Всероссийского центра карантина растений. Бактериальная суспензия с тремя концентрациями в диапазоне от 10^5 до 10^7 КОЕ/мл была использована для заражения клеток гомогенизированного растительного материала пяти видов *Allium*, из которых проводилось выделение ДНК. Результаты оценивались с помощью qPCR.

Испытания патогенности и оценка зонда ВНQ как альтернативы MGB

Для выращивания лука (сеянцы и саженцы) в поле использовались три типа материала для размножения: семена, лук-севок и луковичы. Бактериальный инокулюм *X. euvesicatoria* pv. *allii* в концентрации $7,4 \times 10^7$ КОЕ/мл использовали для заражения растений. Листья рассадных растений прокалывали иглой и ватным тампоном, смоченным в суспензии бактерий, протирали их поверхность. Через 4 месяца растения собирали и каждое из них делили на 3 части, в частности на листья, верхушка луковичы и корни. Зараженность этих трех частей растения были оценены с помощью количественной ПЦР с использованием зонда MGB и ВНQ для сравнительных тестов и определения присутствия бактерий, а также выявления части растения, в которой они были наиболее распространены.

Сравнительные исследования сред роста

Для проведения сравнительных исследований сред были приготовлены 3 среды-кандидата: среда с экстрактом лука (ОЕМ), питательные бульонные дрожжи (НВУ) и дрожжевой

пептонно-глюкозный агар (YPGA). Пятьдесят микролитров бактериальной суспензии с концентрацией $6,6 \times 10^2$ наносили на среду, после чего инкубировали при 25°C в течение 5 дней с учетом возможного медленного роста на среде-кандидате. При температуре 28°C , рекомендованной разработчиками питательной среды, *X. euvesicatoria* pv. *allii* штамм 0419 не смог расти, поэтому температурный режим корректировали до 25°C .

Глава 3. Результаты и обсуждение

Определение чувствительности классической ПЦР и ПЦР в реальном времени

Бактериальные разведения от 1 до 7 с концентрациями в диапазоне от 10^1 до 10^7 были протестированы с помощью ПЦР-анализа.

Чувствительность классической ПЦР с использованием AVR-праймеров

Таблица 2- Чувствительность классической ПЦР для идентификации *X. euvesicatoria* pv. *allii* в 7-ми концентрациях с использованием праймеров AVR.

Разведение	Концентрация бактерий	Повторности		
		1	2	3
SD1	10^7	+	+	+
SD2	10^6	+	+	+
SD3	10^5	+	+	+
SD4	10^4	+	+	+
SD5	10^3	+	+	+
SD6	10^2	+	+	+
SD7	10^1	+	+	-
К- отрицательный контроль	H ₂ O	-	-	-
ЧК- отрицательный контроль ПЦР в зоне	dH ₂ O	-		
К+ положительный контроль	10^8	+		

Источник: составлено автором.

Как показано в таблице 2, обычная ПЦР с использованием праймеров AVR позволяет обнаруживать бактерии от первого до 6-го^{-го} разведения бактерий, что соответствует концентрациям от 10^7 до 10^2 КОЕ/мл. Однако, в 7-й разбавлении концентрации 10^1 КОЕ/мл только в двух из трех повторностей тест оказался положительным на наличие бактерий, следовательно, обнаружение на этом уровне рассматривается как нулевое.

Определение чувствительности классической ПЦР с использованием праймеров P1L

Таблица 3- Чувствительность классической ПЦР для идентификации *X. euvesicatoria* pv. *allii* с использованием праймеров P1L.

Разведение	Концентрация бактерий	Повторности		
		1	2	3
SD1	10^7	+	+	+
SD2	10^6	+	+	+
SD3	10^5	+	+	+
SD4	10^4	+	+	+
SD5	10^3	+	+	+
SD6	10^2	+	+	+
SD7	10^1	+	-	-
К- отрицательный контроль	H ₂ O	-	-	-
ЧК- отрицательный контроль ПЦР в зоне	dH ₂ O	-		

К+ контроль	положительный	10 ⁸	+
-------------	---------------	-----------------	---

Источник: составлено автором.

При использовании праймеров P1L, ПЦР-анализ мог в достаточной степени выявлять бактерии в разведениях 1–6 с соответствующими концентрациями 10⁷–10² КОЕ/мл, как показано в таблице 3. При самой низкой концентрации, т.е. разведении 7, только в одной повторности была обнаружена бактерия, таким образом, обнаружение на этом уровне было зарегистрировано как нулевое.

Чувствительность дуплексной ПЦР в зависимости от праймеров AVR и P1L

Таблица 4- Чувствительность дуплексной ПЦР для идентификации *X. euvesicatoria* pv. *allii*

Разведение	Концентрация бактерий	Повторности		
		1	2	3
SD1	10 ⁷	+	+	+
SD2	10 ⁶	+	+	+
SD3	10 ⁵	+	+	+
SD4	10 ⁴	+	+	+
SD5	10 ³	+	+	+
SD6	10 ²	+	+	+
SD7	10 ¹	+	–	–
К- отрицательный контроль	H ₂ O	–	–	–
ЧК- отрицательный контроль ПЦР в зоне	dH ₂ O	–		
К+ контроль	положительный	10 ⁸ +		

Источник: составлено автором.

Дуплексная ПЦР, сочетающая праймеры AVR и P1L, имела тот же уровень чувствительности, что и при использовании праймеров по отдельности, как показано в таблице 4. Таким образом, при разведении 7 с самой низкой концентрацией 10¹ анализ ПЦР не оказался положительным для всех 3 повторов. Следовательно, самая низкая концентрация, которую можно было обнаружить, составляла 10², что соответствовало 6-му бактериальному разведению.

Чувствительность ПЦР-анализа в реальном времени на *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*

ПЦР в реальном времени (qPCR) анализ на *X. euvesicatoria* pv. *allii* также оценивали на чувствительность.

Чувствительность qПЦР с использованием AVR-праймеров

Таблица 5- Чувствительность ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) для идентификации *X. euvesicatoria* pv. *Allii* в концентрации от 10⁷ до 10¹.

Разведение	Концентрация	Повторность	Значения СТ	Среднее
D1	10 ⁷	7	1.1	20,1
		19.91	1.2	
		19,1	20,5	
D2	10 ⁶	2.1	22,9	23.13
		2.2	22,2	
		2.3	24,3	
		3.1	24,8	

D3	10 ⁵	3,2	24,9	25,23
		3,3	26,0	
D4	10 ⁴	4,1	28,3	28,76
		4,2	28,6	
		4,3	29,4	
D5	10 ³	5,1	32,0	31,90
		5,2	31,9	
		5,3	31,8	
D6	10 ²	6,1	34,9	34,86
		6,2	34,8	
		6,3	34,9	
D7	10 ¹	7,1	36,2	36,06
		7,2	36,1	
		7,3	35,9	

Источник: составлено автором.

ПЦР в реальном времени с использованием AVR-праймеров позволила обнаружить *X. euvesicatoria* pv. *allii* от первого разведения до 7-го с соответствующими концентрациями 10⁷ и 10¹ КОЕ/мл (таблица 5). Таким образом, данный анализ показал, что он может обнаруживать бактерии при низкой концентрации 6,8x10¹, имея значение Ct=35,8.

Чувствительность РВ-ПЦР с использованием праймеров РП

Таблица 6- Чувствительность РВ-ПЦР-анализа с использованием праймеров РП

Разведение	Концентрация	Повторность	Значение СТ	Средние
D1	10 ⁷	1.1	18,8	20.13
		1.2	20,8	
		1.3	20,8	
D2	10 ⁶	2.1	20,9	22,73
		2.2	23,8	
		2.3	23,5	
D3	10 ⁵	3.1	25,6	25,47
		3.2	25,5	
		3.3	25,3	
D4	10 ⁴	4.1	28,7	28.73
		4.2	28,7	
		4.3	28,8	
D5	10 ³	5.1	32,1	31.63
		5.2	31,9	
		5.3	30,9	
D6	10 ²	6.1	34,5	35,00
		6.2	35,4	
		6.3	35,1	
D7	10 ¹	7.1	35,8	36,10
		7.2	36,3	
		7.3	36,2	

Источник: составлено автором.

В таблице 6 представлена чувствительность РВ-ПЦР с использованием PIL-маркеров с бактериальными разведениями, составляющими соответствующие концентрации $6,8 \times 10^7$ КОЕ/мл, снижающиеся до $6,8 \times 10^1$ КОЕ/мл соответственно. Самая низкая концентрация, при которой с помощью ПЦР-анализа можно было обнаружить бактерии, составляла 10^1 КОЕ/мл при значении СТ 36,1.

Специфичность ПЦР-анализа на *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*

Специфичность дуплексной ПЦР

X. euvesicatoria pv. *allii* (штамм 0419) дал положительный результат анализа, сравнимый с контролем (штамм 0377). Для определения точности теста были оценены другие 97 различных бактериальных штаммов, при этом *Xanthomonas sp.* (штамм 0373) был ошибочно идентифицирован как *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Остальные 96 бактерий дали отрицательный результат анализа. Таким образом, традиционный дуплексный ПЦР имел специфичность 99%.

Специфичность ПЦР-анализа в реальном времени

При подтверждении специфичности используемых праймеров, AVR и PIL в тестах ПЦР-анализа в реальном времени, только 2 целевых штамма *X. euvesicatoria* pv. *allii* дали положительный результат при оценке. Все остальные 97 штаммов бактерий дали отрицательный результат как на праймеры AVR, так и на PIL. Результаты РВ-ПЦР с использованием маркеров AVR или PIL имели 100% специфичность.

Определение повторяемости РВ-ПЦР

ПЦР-анализ оценивали на повторяемость с использованием маркеров AVR и PIL. Аналогичные характеристики наблюдались для маркеров AVR и PIL, при этом значения СТ были равномерно распределены в 3 самых низких концентрациях от $6,6 \times 10^1$ до $6,6 \times 10^3$ КОЕ/мл. Наблюдалось асимметричное распределение при концентрациях 10^4 и 10^5 КОЕ/мл для маркеров PIL и AVR соответственно. Несмотря на различия в показателях КТ, анализ позволил обнаружить бактерии во всех 6 повторениях из 7 концентраций (от 10^1 до 10^7), что обеспечивает 100% повторяемость.

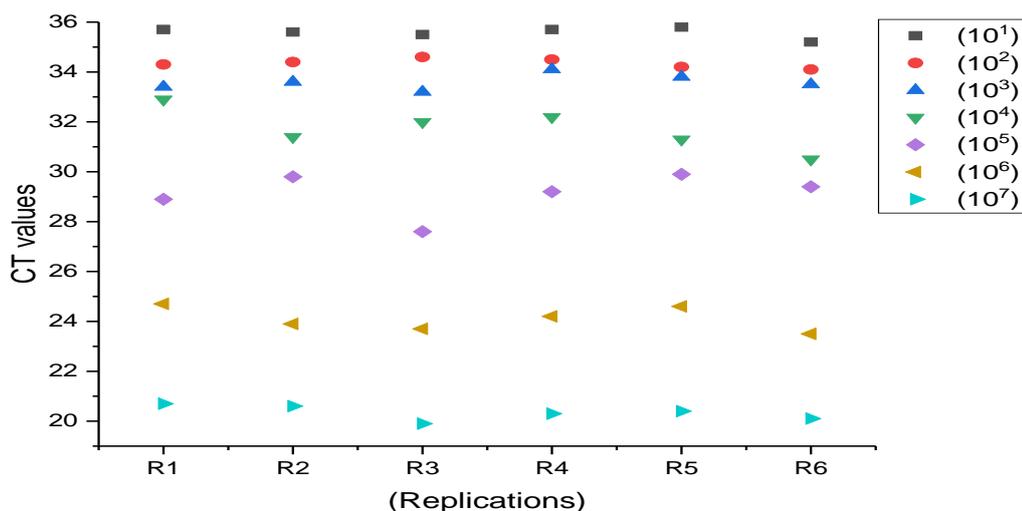


Рисунок 1, Значения СТ для каждой репликации бактериальных концентраций при использовании AVR-маркеров

Источник: составлено автором.

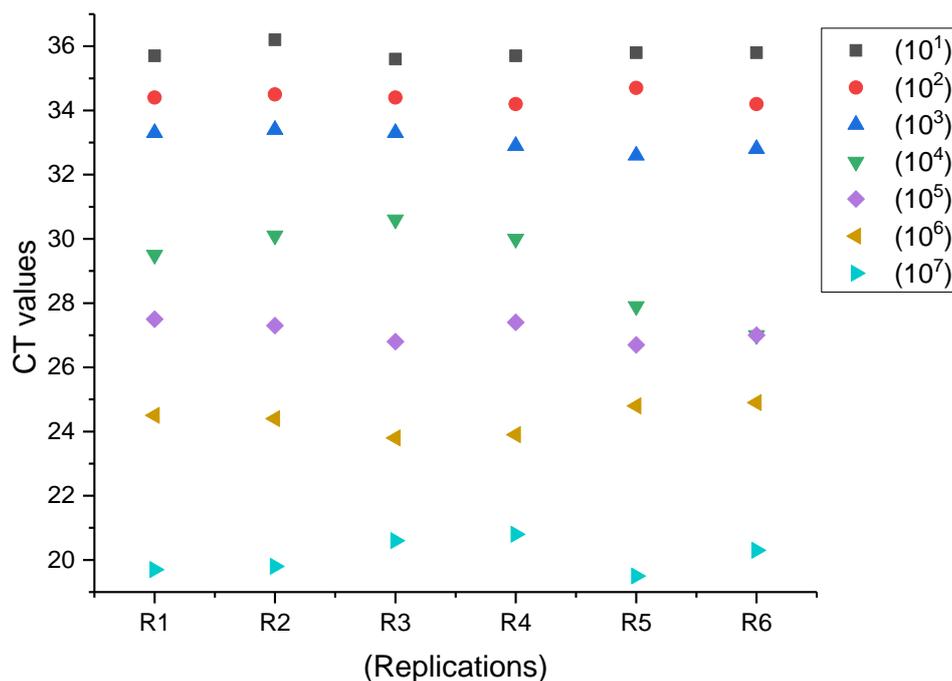


Рисунок 2 Значения СТ для каждой репликации бактериальных концентраций при использовании PIL -маркеров
 Источник: составлено автором.

Определение воспроизводимости анализа РВ-ПЦР

Воспроизводимость ПЦР-анализа с использованием AVR-маркера

Данные в таблице 7 иллюстрируют, что для 7 концентраций, оцененных с помощью праймеров AVR, воспроизводимость анализа была высокой у разных операторов и используемого оборудования. Вариабельность была наименьшей при самой высокой концентрации бактерий 10^7 КОЕ/мл, о чем свидетельствует относительное стандартное отклонение в 0,33%, тогда как концентрация 10^6 имела самое высокое относительное стандартное отклонение в 1,62%. Более того, при стандартном отклонении 0,05, следовательно, высокой близости к среднему циклу КТ, равному 15,37, тест продемонстрировал высокую точность. В целом, при относительном стандартном отклонении ниже 2% анализ продемонстрировал хорошую воспроизводимость.

Таблица 7- Воспроизводимость анализа с использованием AVR-маркера

концентрация	операторы & оборудование	СТ значение	средние СТ	стандартное отклонение	относительное стандартное отклонение
10^7	OE1	15,4	15,37	0,05	0,33%
	OE2	15,3			
	OE3	15,4			
10^6	OE1	19,4	19,13	0,31	1,62%
	OE2	18,7			
	OE3	19,3			
	OE1	23,7			

10 ⁵	OE2	23,2	23,43	0,21	0,90%
	OE3	23,4			
	OE1	28,2			
10 ⁴	OE2	27,7	27,77	0,33	1,19%
	OE3	27,4			
	OE1	32,1			
10 ³	OE2	31,5	31,57	0,41	1,30%
	OE3	31,1			
	OE1	34,9			
10 ²	OE2	34	34,53	0,39	1,13%
	OE3	34,7			
	OE1	36,2			
10 ¹	OE2	35,8	35,9	0,22	0,61%
	OE3	35,7			
	OE1	35,7			

Источник: составлено автором.

Оценка воспроизводимости ПЦР с использованием PIL-маркеров

Обнаружение бактерий с помощью праймеров PIL в каждой из 7 концентраций выявило исключительно низкие различия в повторных тестах между операторами и используемым оборудованием, следовательно, хорошую воспроизводимость (таблица 8). Воспроизводимость была наиболее выраженной при концентрациях 10² и 10¹ КОЕ/мл, на что указывает относительное стандартное отклонение 0,55% и 0,59%. При максимальном относительном стандартном отклонении 1,81% при концентрации 10⁷ КОЕ/мл полученные данные отражают, что различия в операторах и используемом оборудовании не оказали существенного влияния на точность анализа.

Таблица 8- Воспроизводимость анализа при обнаружении бактерий в различных концентрациях

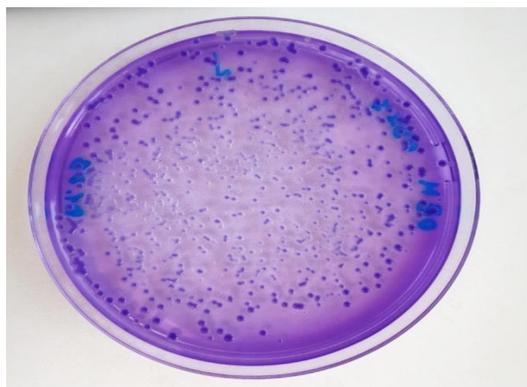
концентрация	операторы & оборудование	СТ значение	средние СТ	стандартное отклонение	относительное стандартное отклонение
10 ⁷	OE1	19,9	20,33	0,37	1,81%
	OE2	20,3			
	OE3	20,8			
10 ⁶	OE1	29,3	29,73	0,37	1,24%
	OE2	29,7			
	OE3	30,2			
10 ⁵	OE1	31,8	31,5	0,24	0,76%
	OE2	31,2			
	OE3	31,5			
10 ⁴	OE1	32,5	32,4	0,22	0,68%
	OE2	32,6			
	OE3	32,1			
10 ³	OE1	34,2	33,76	0,31	0,92%
	OE2	33,6			

	ОЕ3	33,5			
10 ²	ОЕ1	34,4	34,5	0,19	0,55%
	ОЕ2	34,4			
	ОЕ3	34,7			
10 ¹	ОЕ1	35,9	35,86	0,21	0,59%
	ОЕ2	35,6			
	ОЕ3	36,1			

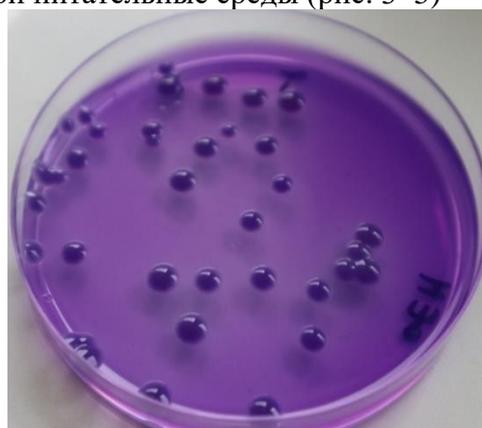
Источник: составлено автором.

Сравнительный анализ культуральных свойств *X. euvesicatoria* pv. *allii* на различных питательных средах.

Для культивирования бактерий использовали три питательные среды (рис. 3–5)



(b) Штамм Хаа 0377



(b) Штамм Хаа 0419

Рис. 3. Рост *X. euvesicatoria* pv. *allii* на полуселективной OEM-среде

Источник: составлено автором.

Колонии штамма Хаа 0377 культивировали на среде (ОЕМ) как при 25°C, так и при 28°C инкубации. Штамм образовывал небольшие белые колонии белого цвета, слизистые, с гладкими краями и слегка приподнятой серединкой. На 5-й день культивирования колонии приобрели темноокрашенный центр, обесцветив среду.



(a) Штамм Хаа 0377



(b) Штамм Хаа 0419

Рис. 4. Рост штаммов *X. euvesicatoria* pv. *allii* на среде NBY

Источник: составлено автором.



(a) Штамм Хаа 0377



(b) Штамм Хаа 0419

Рис. 5. Рост *X. euvesicatoria* pv. *allii* штаммы 0419 и 0377 на среде YPGA.

Источник: составлено автором.

На питательных средах NBY и YPGA *X. euvesicatoria* pv. *allii* образовывали колонии того же типа: желтые слизистые, с приподнятой вершиной и гладкими краями. Цвет колоний желтый. На 5-й день инкубации колонии достигли размера ≥ 5 мм и слились. Наблюдался одинаково интенсивный рост штаммов на обеих питательных средах.

Селективность по отношению к хозяину у *Xanthomonas euvesicatoria* pv на различных видах лука.

Чтобы установить селективность к хозяину *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* у различных видов лука, два штамма (0377) и (0419) были использованы для заражения пяти видов лука *Allium spp.*, а именно *A. cepa* (AC), *A. schoenoprasum* (AS), *A. fragrans* (AF), *A. ramosum* и *A. porrum* (AP). Инфицированные растительные клетки оценивали с помощью РВ-ПЦР для определения селективности патогена по отношению к хозяину среди 5 видов.

Селективность штамма 0419 по хозяину среди 5 видов *Allium*

Таблица 9- Результаты обнаружения возбудителя в 5 видах *Allium*, инокулированных тремя концентрациями бактерий, в ПЦР-анализе в реальном времени.

Виды лука	Бактериальная концентрация	Разведение	Среднее СТ
<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

Источник: составлено автором.

Селективность штамма 0377 по хозяину для 5 видов *Allium*

Таблица 10- Обнаружение штамма 0377 в 3-х концентрациях в инокулированных растениях разных видов рода *Allium* при ПЦР-анализе в реальном времени.

Виды лука	Бактериальная концентрация	Разведения	Среднее СТ
<i>A. cepa</i>	D4	10 ⁵	27,1
	D5	10 ⁶	31,1
	D6	10 ⁷	33,2
<i>A. schoenoprasum</i>	D4	10 ⁵	27,1
	D5	10 ⁶	30,8
	D6	10 ⁷	33,4
<i>A. fragrans</i>	D4	10 ⁵	27,9
	D5	10 ⁶	31,2
	D6	10 ⁷	33,2
<i>A. ramosum</i>	D4	10 ⁵	28,4
	D5	10 ⁶	32,9
	D6	10 ⁷	33,7
<i>A. porrum</i>	D4	10 ⁵	28,7
	D5	10 ⁶	32,0
	D6	10 ⁷	33,8

Источник: составлено автором.

При тестировании штамма 0419 на селективность по отношению к хозяину среди 5 видов *Allium*, обнаружена нерезкая специфичность к хозяину, как показано в таблице 9. Штамм 0377 также аналогичным образом проявлял себя при каждой из использованных концентраций (разведений).

Влияние методов экстракции ДНК на повышение эффективности ПЦР-анализа при идентификации *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*

Целью этого исследования была оценка коммерчески доступных наборов для извлечения ДНК, оптимизированных для растительного материала, и определение наиболее подходящих для выделения *X. euvesicatoria* pv. *allii*. Три коммерческих набора для экстракции, Проба ГС, Сорб ГМО и ФитоСорб, использованные в исследовании,

Таблица 11- Сравнительный анализ различных методов выделения ДНК

Метод выделения ДНК	Среднее значение СТ при различных разведениях <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>allii</i>						
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
Проба ГС	17,9 ^a (±0,21)	20 ^a (±0,47)	24,5 ^a (±0,06)	27,3 ^a (±0,06)	30,8 ^a (±0,64)	34,2 (±0,45)	35,8 (±0,44)

Сорб-ГМО	20.9 ^b (±0.80)	23.7 ^c (±0.26)	27.8 ^b (±1.33)	31.4 ^b (±1.59)	34.2 ^b (±0.78)	ND	ND
Фито-Сорб	19,6 ^b (±0,64)	22,6 ^b (±0,15)	25,9 ^{ab} (±0,69)	29,6 ^{ab} (±1,08)	32,9 ^b (±0,95)	ND	ND

§ Разные буквы в одном столбце обозначают статистически значимые различия

*ND, не определено, средние циклы СТ были рассчитаны только для образцов, которые имели три положительных результата из трех повторов

Источник: составлено автором.

Набор для извлечения Проба ГС показал наивысшую степень чувствительности ($p < 0,05$) в ПЦР-анализе и обладал наиболее стабильной способностью к обнаружению во всех семи концентрациях. При более низких концентрациях 10^2 КОЕ/мл и 10^1 КОЕ/мл два других метода сорбции ГМО и ФитоСорб не смогли достичь положительных результатов в трех повторах, следовательно, снижение пороговых значений при этих концентрациях не было определено, (ND) таблица 11.

Влияние *X. euvesicatoria* pv. *allii* на всхожесть лука

Целью проведения данного эксперимента было изучение влияния *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* на всхожесть семян лука. Как показано на рис. 6, самая высокая концентрация инокулюма 10^8 КОЕ/мл оказала наибольшее влияние на 3 сорта, а именно, на Мячковский 300, Кармен МС и Халцедон с энергией прорастания 3, 2 и 0 соответственно.

Влияние концентрации бактерий на энергию прорастания

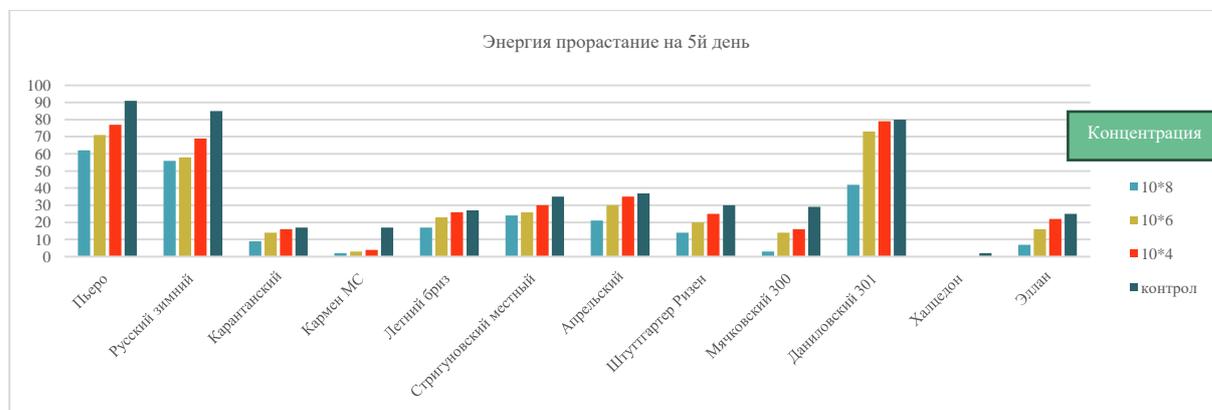


Рис 6. Энергия прорастания семян лука при различных концентрациях бактерий на 5-й день.

Источник: составлено автором.

Влияние концентрации инокулята на всхожесть семян лука

Таблица 12- Энергия прорастания семян лука на 14-й день опыта

Сорта лука	% всхожести при различной бактериальной концентрации			
	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	контроль
Пьеро	80 ^c	84 ^{bc}	86 ^b	96 ^a
Русская зима	59 ^d	66 ^c	75 ^b	92 ^a

Карантанский	54 ^b	56 ^b	57 ^b	83 ^a
Кармен МС	4 ^c	6 ^{bc}	8 ^b	45 ^a
Летний бриз	55 ^c	61 ^b	68 ^a	73 ^a
Стригуновский местный	45 ^b	48 ^b	51 ^b	87 ^a
Апрель	45 ^c	51 ^{bc}	55 ^b	82 ^a
Штуттгартер Ризен	21 ^c	52 ^b	67 ^a	69 ^a
Мячковский 300	4 ^d	22 ^c	35 ^b	85 ^a
Даниловский 301	50 ^d	76 ^c	83 ^b	94 ^a
Халцедон	0 ^b	0 ^b	0 ^b	8 ^a
Эллан	23 ^c	26 ^c	46 ^c	53 ^a

Источник: составлено автором.

У большинства сортов лука наблюдались различия в уровне подавления прорастания при различных бактериальных концентрациях (таблица 12). Самая высокая концентрация 10^8 КОЕ/мл вызвала самый высокий уровень ингибирования, в то время как у 10^6 КОЕ/мл были умеренные уровни, а минимальное ингибирование наблюдалось при наименьшей концентрации 10^4 КОЕ/мл. У сорта Кармен-МС картина подавления прорастания изменилась на 14-й день опыта, когда наименьший процент прорастания (4%) наблюдался при наибольшей концентрации бактерий, хотя концентрации 10^6 и 10^4 КОЕ/мл были статистически сходными ($p > 0,05$).

Искусственное заражение в полевых условиях растений лука репчатого (*A. cepa*), выращенных из 3-х различных материалов для размножения (семена, лук-севок и луковицы), а также оценка зонда ВНҚ как альтернативы МГВ.

Таблица 13- Обнаружение *X. euvesicatoria* pv. *allii* с использованием AVR праймеров и зонда МГВ в растениях лука, выращенных из инокулированных семян.

Идентификатор растения в соответствии с методом размножения	Значение СТ в различных частях растения		
	Стебель	Верхушка луковицы	Листья
Sd1	34.12	30.58	32.10
Sd2	34.00	31.30	32.62
Sd3	30.74	27.57	30.36
Sd4	28.16	29.00	31.60
Sd5	33.72	27.38	33.46
Sd6	27.24	32.36	33.40
Sd7	26.22	24.38	29.23
Sd8	33.89	30.80	32.90

Sd9	34.15	32.71	31.25
Sd10	33.70	30.45	30.48
Sd11	35.32	34.43	31.75

Источник: составлено автором.

Как видно из таблицы 13, верхушка луковицы имела низкие средние значения СТ в большинстве образцов, за исключением образца Sd11, где значение СТ 34,43 было выше, чем у образца листьев 31,75. Тот факт, что наименьшее значение СТ 24,38, зарегистрированное для всех тестируемых образцов, было для верхушки луковицы, еще больше подтверждает вывод о том, что обнаружение патогена в этой части растения было намного более быстрым по сравнению с другими частями растения, например, стеблем, где было отмечено самое высокое значение СТ 35,32. Можно предположить, что две другие части растения, а именно листья и стебель, служат средой обитания для гораздо большего количества микроорганизмов, которые могут оказывать некоторое ингибирующее действие на ПЦР-анализ, по сравнению с верхушкой луковицы, которая может оказывать меньшее ингибирующее действие.

Таблица 14- Обнаружение *X. euvesicatoria* pv. *allii* с использованием PИL праймеров и зонда ВНQ в растениях лука, выращенных из инокулированных семян.

Идентификатор растения в соответствии с методом размножения	Значение СТ в различных частях растения		
	Стебель	Верхушка луковицы	Листья
Sd1	30.34	28.51	33.62
Sd2	33.42	31.65	32.75
Sd3	33.57	28.42	30.14
Sd4	29.69	25.37	30.58
Sd5	32.37	27.78	31.46
Sd6	31.66	24.89	29.25
Sd7	33.28	25.66	28.71
Sd8	32.36	21.25	27.36
Sd9	34.31	30.17	33.86
Sd10	33.53	29.46	31.28
Sd11	33.54	26.24	31.61

Источник: составлено автором.

При использовании зонда ВНQ в сочетании с праймерами PИL значения СТ снизились во всех образцах частей растений, как указано в таблице 14, по сравнению с использованием зонда MGB (таблица 13). Так, в образцах верхушки луковицы с большинством низких значений СТ наименьшее зарегистрированное значение составило 21,25, что было ниже, чем при использовании зонда MGB. Более того, когда зонд ВНQ соединялся с праймерами PИL, наибольшее значение Ст составило 34,31, что было ниже, чем при использовании зонда

MGB 35,32 (таблица 13). Таким образом, более высокая эффективность обнаружения была продемонстрирована для стебля растения лука, когда маркеры P1L использовались в комбинации с зондом ВНQ.

Заключение

- Основываясь на результатах исследования по сбору данных о систематике, патогенности и биологии бактерий, было отмечено, что штаммы *X. euvesicatoria* pv. *allii* не обладают отчетливой специфичностью к хозяину среди различных видов рода *Allium*. Кроме того, при воздействии болезни *in planta* на различные части растений лука, выращенных из разного материала для размножения в полевых условиях, было обнаружено, что бактерии интенсивно размножались и дольше сохранялись в верхушке луковицы по сравнению с листьями и стеблем.
- Исследование культуральных свойств и характеристик роста бактерий на различных питательных средах показало, что температура инкубации OEM была влияющим фактором, особенно для *X. euvesicatoria* pv. *allii* штамм 0419, который не рос на питательных средах при 28°C, но образовывал колонии при 25°C. На средах NBY и YPGA оба штамма были способны продуцировать колонии, но штамм 0419 демонстрировал несколько ограниченный рост на YPGA по сравнению со штаммом 0377.
- Были оценены и валидированы все технические аспекты, т.е. чувствительность, специфичность, повторяемость ПЦР в реальном времени, а также классической ПЦР. При определении чувствительности ПЦР в реальном времени наименьшая обнаруживаемая концентрация составляла $6,8 \times 10^1$ КОЕ/мл, в то время как для классической ПЦР наименьшая обнаруживаемая концентрация составила $1,0 \times 10^2$ КОЕ/мл. Тест имел специфичность 99% при оценке обычной ПЦР, в то время как qPCR демонстрировал 100% специфичность. Как для праймеров AVR, так и для праймеров P1L хорошая воспроизводимость, ниже 2% относительного стандартного отклонения, показанная при тестировании операторами с их соответствующим оборудованием, указывает на достижимую точность, с которой можно обнаружить патоген.
- При оценке зонда ВНQ для обнаружения бактерий в различных частях инокулированных растений лука было установлено, что он эффективен при использовании праймеров AVR и P1L. Зонд ВНQ может быть рекомендован в качестве альтернативы зонду MGB (производитель которого ушел с Российского рынка). Результаты исследования показали, что используемые концентрации бактерий (10^4 ; 10^6 и 10^8 КОЕ/мл) значительно подавляли прорастание 12 сортов лука. Однако для наиболее восприимчивого сорта Халцедона не было выявлено различий по концентрациям ($p > 0,05$).
- Исследование подтвердило, что метод выделения ДНК влияет на эффективность ПЦР анализа. Набор для выделения ДНК «Проба ГС» повысил чувствительность ПЦР, так что анализ мог обнаруживать бактерии при самой низкой концентрации 10^1 КОЕ/мл, в то время как два других набора «ГМО» и «ФитоСорб» могли обнаруживать бактерии только при самой низкой концентрации 10^3 КОЕ/мл. Поэтому «Проба ГС» рекомендуется в качестве стандартного метода выделения ДНК для *X. euvesicatoria* pv. *allii*.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в изданиях, индексируемых Scopus

1. Kavhiza, N.J., Zargar, M., Prikhodko, S.I., Pakina, E.N. and Muvingi, M., 2023, June. Germination response of 12 onion varieties to inoculation with *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2777, No. 1). AIP Publishing.
2. Kavhiza, N.J., Zargar, M., Prikhodko, S.I. and Pakina, E.N., 2022. Comparison of three commercial DNA extraction kits for the enhancement of PCR assay sensitivity for *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. Journal of Applied Microbiology, 132(2), pp.1221-1226.
3. Kavhiza, N.J., Zargar, M., Prikhodko, S.I., Pakina, E.N., Murtazova, K.M.S. and Nakhaev, M.R., 2022. Improving crop productivity and ensuring food security through the adoption of genetically modified crops in sub-Saharan Africa. Agronomy, 12(2), p.439.
4. Saffa, M.D., Saqee, F.S., Norman, P.E., Kavhiza, N.J., Simbo, D., Zargar, M., Lyashko, M., Pakina, E. and Vvedensky, V., 2023. Influence of Field and Storage Diseases and Pests on Tuber Yield and Quality of Exotic and Local Yam (*Dioscorea spp.*) Genotypes. Horticulturae, 9(11), p.1183.
5. Arsene, M.M.J., Zangue, D.S.C., Ngoune, T.L., Nyasha, K. and Louis, K., 2021. Antagonistic effects of raffia sap with probiotics against pathogenic microorganisms. Foods and Raw materials, 9(1), pp.24-31.
6. Saqee, F.S., Norman, P.E., Saffa, M.D., Kavhiza, N.J., Pakina, E., Zargar, M., Diakite, S., Stybayev, G., Baitelenova, A. and Kipshakbayeva, G., 2023. Impact of different types of green manure on pests and disease incidence and severity as well as growth and yield parameters of maize. Heliyon, 9(6).

Статьи, опубликованные в Перечне ВАК РФ.

1. Кавиза Н.Д., Заргар М., Приходько С.И., Пакина Е.Н., Диаките С. Влияние *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* на проращивание 12 сортов лука репчатого // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2023. Т. 18. № 2.

Участие в научных конференциях

1. Кавиза Н.Д. Оценка программ послевсходовых гербицидов для эффективной борьбы с важными широколиственными сорняками в яровой пшенице. Международной научной конференций "Агрохимическое обеспечение цифрового земледелия". Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева. 2019.
2. Кавиза, Н.Д., Заргар М., Приходько С.И., Пакина, Е.Н. и Мувинги, М., 2023, июнь. Реакция прорастания 12 сортов лука на инокуляцию *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ "АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИИ, СЕЛЕКЦИИ, ТЕХНОЛОГИИ И ПЕРЕРАБОТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР" (СІВТА2022) (К 110-летию Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур им. В.С. Пустовойта). 1–2 Июня 2022 года. Краснодар, Россия.
3. Кавиза Н.Д. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* и его потенциальная угроза мировому производству лука: обзор. Международную научно-практическую конференцию "Аграрная Наука-2023" (AgriScience2023). Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева. 2023.

АННОТАЦИЯ

КАВИЗА НЬЯША ДЖОН

АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНА *XANTHOMONAS EUVESICATORIA PV. ALLII*

Листевой ожог лука, вызываемая *X. euvesicatoria* pv. *allii* — это болезнь, которая угрожает мировому производству лука, если ее не остановить. Возбудитель в основном передается через материал для размножения, особенно через семена, поскольку бактерии передаются через семена, а торговля семенами лука представляет собой огромную отрасль промышленности. Поэтому это требует необходимости в диагностических протоколах, которые могут быстро и точно обнаружить бактерии в вегетативных частях и семенах. В этом исследовании изучались различные биологические особенности бактерий, такие как патогенность, культуральные свойства на различных типах питательных сред, селективность хозяина, оптимальный метод экстракции ДНК, влияние на параметры прорастания видов-хозяев (*Allium cepa*) и оптимизация молекулярно-генетических методов диагностики. Когда 3 метода выделения ДНК (Проба ГС, Сорб ГМО, ФитоСорб) были оценены для определения влияния метода выделения ДНК на чувствительность, было обнаружено, что набор для экстракции Проба ГС оказывает благоприятное влияние на чувствительность ПЦР-анализа. Используя, Проба ГС, ПЦР-анализ мог обнаружить бактерии в самой низкой концентрации 3×10^1 , в то время как ФитоСорб и Сорб ГМО имели предел обнаружения 3×10^3 . Таким образом, Проба ГС был признан оптимальным методом выделения ДНК, адаптированным для *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. Специфичность обычной ПЦР составила 99%, а для ПЦР в реальном времени — 100%. При этом повторяемость ПЦР-анализа по точности обнаружения бактерии в 7 концентрациях составила 100%. Хотя точность была ниже при концентрациях 10^4 и 10^5 с праймерами AVR и 10^4 с P1L, это не повлияло на точность анализа при обнаружении патогена. Диагностический метод оказался высоко воспроизводимым, о чем свидетельствует низкое относительное стандартное отклонение, которое составляло от 0,33% до 1,62% для маркеров AVR и от 0,55% до 1,81% для маркеров P1L. При оценке эффекта *X. euvesicatoria* pv. *allii* при прорастании семян лука было обнаружено, что бактерия значительно снижает как процент всхожести, так и энергию прорастания. Более выраженное действие возбудитель оказал на 3 отдельных сорта: Кармен-МС, Мячковский 300 и Халцедон, у которых к 14-му дню оценки всхожесть снизилась более чем на 50%. Оценка штаммов *X. euvesicatoria* pv. *allii* 0377 и 0419 на селективность в отношении хозяина среди 5 видов *Allium*, которые показали, что штаммы обладают невыраженной специфичностью к хозяину. При культивировании на OEM штамм 0419 не мог образовывать колонии при температуре 28 °С, рекомендованной разработчиками среды, однако повышение температуры до 25 °С давало хорошо развитые колонии. Когда 3 части плана лука оценивали на наличие патогена, значения СТ указывали на более выраженное обилие и/или персистенцию патогена в верхушке луковицы. Более того, оценивая зонд ВНQ как альтернативу зонду МGB, он оказался высокоэффективным и превосходил МGB при оценке с помощью праймеров P1L в луке, размножаемом семенами.

ABSTRACT

KAVHIZA NYASHA JOHN

ANALYSIS OF BIOLOGICAL PROPERTIES AND IMPROVEMENT OF MOLECULAR GENETIC METHODS FOR DIAGNOSING THE PHYTOPATHOGEN *XANTHOMONAS EUVESICATORIA* PV. *ALLII*

Xanthomonas leaf blight of onion caused by *X. euvesicatoria* pv. *allii* is a disease that threatens global onion production if not curbed. The pathogen is mostly transmitted through propagation material, particularly seed since the bacteria is seed-borne and onion seed trade is a huge industry. This therefore warrants the need for diagnostic protocols that can rapidly accurately detect the bacteria in vegetative parts and seeds. This research explored various biological features of the bacteria such as pathogenicity, cultural properties on different types of growth media, host selectivity, optimal DNA extraction method, effect on host species (*Allium cepa*) germination parameters and optimizing molecular-genetic diagnostic methods. When 3 DNA extraction methods (Probe GS, FitoSorb and Sorb GMO) were assessed to determine the influence of the DNA isolation method on sensitivity it was discovered that the extraction kit Probe GS had a favorable effect on sensitivity of the PCR assay. Using the Probe GS, the PCR assay could detect bacteria at the lowest concentration 3×10^1 whilst both FitoSorb and Sorb GMO had a limit of detection of 3×10^3 . Therefore, Probe GS was identified as the most optimum DNA isolation method adapted for *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii*. The specificity for the conventional PCR was 99% and 100% for real-time PCR. Moreover, the repeatability of the PCR assay in the accuracy of detecting the bacterium at the 7 concentrations was 100%. Though precision was lower at concentrations 10^4 and 10^5 with the AVR primers and 10^4 with PIL, this did not affect the accuracy of the assay in detecting the pathogen. The diagnostic method proved to be highly reproducible as indicated by the low relative standard deviation which ranged from 0.33% to 1.62% with AVR markers and 0.55% to 1.81% with the PIL markers. In evaluating the effect of *X. euvesicatoria* pv. *allii* on onion seed germination it was discovered that the bacterium significantly reduces both germination percentage and germination energy. The pathogen had more pronounced effect on 3 varieties, Carmen-MS, Myachkovsky 300 and Chalcedony whose germination percentage was reduced by more than 50% by day 14 of assessment. Assessing the *X. euvesicatoria* pv. *allii* strains 0377 and 0419 for host selectivity across the 5 *Allium* species that the strains had non-distinct host-specificity. When cultured on OEM the strain 0419 could not produce colonies at 28 °C which is recommended by medium developers, however adjusting the temperature to 25 °C produced well-developed colonies. When the 3 onion plant parts were assessed for pathogen presence, the Ct values indicated more pronounced pathogen abundance and/or persistence in the bulb apex. Moreover, evaluating the BHQ probe as an alternative of the MGB probe, it proved to be highly competent and outperforming the MGB when assessed with PIL primers in seed-propagated onions.