

БИОТЕХНОЛОГИИ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Известия ТСХА. выпуск 1, 2007 год

УДК 635.64:631.531.011:632.35

ДИАГНОСТИКА ЗАРАЖЕННОСТИ СЕМЯН ТОМАТА ВОЗБУДИТЕЛЕМ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА МЕТОДОМ ПЦР

Ф.С. ДЖАЛИЛОВ¹, Г.И. КАРЛОВ², К.П. КОРНЕВ¹;
Е.В. МАТВЕЕВА³, А.Н. ИГНАТОВ^{3,4}, А.Н. КАРЛОВ¹

(¹Лаборатория защиты растений. ²Центр молекулярной биотехнологии.

³ВНИИ фитопатологии. ⁴Центр «Биоинженерия» РАН)

Для усовершенствования методов диагностики анализировали коллекцию штаммов возбудителя бактериального рака томата с помощью различных тестов. Из 2 модификаций теста на патогенность наилучшие результаты показало отрезание ножницами верхушки растения с последующим нанесением инокулюма на место среза. Все патогенные штаммы дали реакцию сверхчувствительности на *Mirabilis jalapa* и положительную реакцию с 3%-м КОН. ПЦР с использованием праймеров СММ5 и СММ6, поставленный с чистыми культурами *Clavibacter michiganensis subs p. michiganensis*, давал положительный результат лишь с 40,9 % патогенных штаммов. Показана необходимость дальнейшего поиска специфичных праймеров. Тестирование зараженности партий семян с использованием 2 методик ПЦР показало, что прямая ПЦР экстрактов из семян не давала положительный результат ни в одном из вариантов. БИО-ПЦР экстрактов из семян, выделенных из искусственно зараженных плодов, дала положительный результат в вариантах с посевом на полуселективную среду mSCM с последующим проведением ПЦР.

Бактериальный рак томата (возбудитель — бактерия *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Davis) Smith) (*Cmm*) относится к числу самых вредоносных болезней томата в регионах с высокой влажностью и в закрытом грунте [1]. В странах Европейского Союза возбудитель этого заболевания включен в список А2 опасных карантинных организмов.

Патоген передается с семенами и по данным [3] достаточно 1-5 зараженных семян на 10000 шт. для того, чтобы вызвать развитие болезни при благоприятных условиях. Высокую корреляцию ($R^2 = 0,9448$) между долей зараженных семян и встречаемостью заболевания отмечали и другие авторы [6]. Партии семян, зараженные менее чем 58 колониеобразующих единиц (КОЕ)

на 1 г семян, не давали зараженных растений даже в благоприятных температурных условиях. в то время как зараженность порядка 1000 КОЕ на 1 г семян приводила к поражению примерно 4% растений.

В этой связи большое значение имеет разработка чувствительных методов диагностики зараженности семян патогеном. В настоящее время для диагностики зараженности семян стандартный протокол включает экстракцию бактерий из партии семян размером до 10000 шт. и посев экстракта на полуселективную среду (CNS, mSCM, D₂ANX) [6]. *Cmm* сосуществует на семенах с многочисленными сапротрофными бактериями, сходными по морфологическим и физиологическим признакам и поэтому необходимо под-

тверждение идентичности колонии с помощью теста на патогенность заражением растений или другими диагностическими методами [2].

Среди инструментальных методов микробиологической диагностики в последние годы широко используется полимеразная цепная реакция [1,8]. Специфичный ПЦР-анализ имеет ряд достоинств и недостатков. К последним можно отнести чувствительность ДНК-полимеразы растительного и микробного происхождения к ингибиторам. Для снятия этих ограничений была предложена методика БИО-ПЦР [9], при которой экстракт семян, содержащий бактерии, предварительно высеивается на полуселективную среду, а для ПЦР используют смыв с чашек Петри через 1-3 сут.

Целью работы было усовершенствование диагностики методом ПЦР зараженности семян томата возбудителем бактериального рака.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: характеристика коллекции изолятов Стпго с помощью диагностических тестов; сравнение методик ПЦР и БИО-ПЦР по способности выявлять семенную инфекцию.

Материалы и методы

Объектом исследований были изоляты возбудителя бактериального рака томата из Российской коллекции фитопатогенных бактерий (ГНУ ВНИИ

фитопатологии РАСХН), выделенные из различных источников (табл. 1).

Изоляты возбудителя испытывали на патогенность на растениях томата сорта Белый налив и на способность вызывать сверхчувствительную реакцию (СВЧ). Тест на СВЧ проводили на растениях мирабилиса (*Mirabilis jalapa*), в межклеточное пространство листовой пластинки которого стерильным шприцем вводили бактериальную суспензию концентрацией $\sim 10^8$ клеток в 1 мл объемом 0,2 мл [5]. В случае положительной реакции через 2-3 сут отмечали появление некрозов в инфильтрованной ткани. Косвенную оценку реакции по Граму проводили с помощью 3% КОН [10].

Для проверки изолятов на патогенность опытные растения томата сорта Белый налив инокулировали бактериальной суспензией плотностью 10^9 клеток/мл 2 методами: уколом препаративной иглой, смоченной в бактериальной суспензии, в пазуху листа и отрезанием ножницами верхушки растения с последующим нанесением инокулома на место среза.

Учеты проводили через 15 — 25 дней после инокуляции. В случае использования патогенных изолятов отмечали увядание листьев с последующим увяданием всего растения. На стеблях пораженных растений делали продольные и поперечные разрезы стерильным скальпелем для учета некротизации сосудистой системы.

Т а б л и ц а 1

Реакция штаммов возбудителя бактериального рака томата в различных диагностических тестах

Штамм патогена	Число штаммов	СВЧ на мирабилисе	Тест на патогенность		Результат ПЦР
			уколом	с использованием ножниц	
Pst	1	—	—	—	—
Cms 1232	1	-	-	-	-
Fh 431-Fh438*	8	+	—	—	—
Cmm 1201-09**	9	+	+	+	+
Cmm 1210-30*, Cm78***	21	+	+	+	—

Примечание. * Выделены из пораженных семян; ** Выделены из пораженных растений томата F, Алькасар, АПК «Майский», Татарстан в 2006 г.; *** Выделен из пораженных растений томата, Германия.

Для получения зараженных семян растения сорта Белый налив выращивали в теплице. Проводили инокуляцию зеленых плодов бактериальной суспензией (0,5 мл суспензии плотностью 10^9 клеток в 1 мл в каждый плод) патогенным изолятом *Cmm* 1202. После полного созревания плоды отделяли от растений и выделяли семена методом ферментации. Также использовали предположительно зараженную партию семян томата, полученную из ВНИИ фитопатологии, а в качестве отрицательного контроля — свободную от патогена партию семян сорта Белый налив.

Для прямого ПЦР и БИО-ПЦР-анализа использовали праймеры СММ5 и СММ6, специфичные для гена *path-1*, локализованного на плазмиде бактерии, и контролирующего патогенность *Cmm* [4]. Для постановки ПЦР использовали амплификатор «Терцик» (ДНК Технологии, Москва). Для амплификации применяли следующий протокол: пре-денатурация ДНК — 1 цикл, 94°C, 5 мин; амплификация ДНК — 30 циклов, 94°C, 1 мин; 55°C — 1,5 мин; 72°C — 1 мин; финальный досинтез 72°C — 5 мин; хранение при 4°C — со.

Реакционная смесь (25 мкл) включала 20 пкМ каждого из праймеров СММ5 и СММ6, 2,5 мкл ПЦР буфера х 10 с 1,5 мкМ $MgCl_2$ (Силекс М, Москва), 200 пкМ смеси dNTP и 5 ед. Таq ДНК-полимеразы.

Для визуализации результатов амплификации использовали электрофорез в 1,5% агарозном геле.

Для анализа зараженности семян методом прямого и БИО-ПЦР получали экстракты из семян по следующей методике: 40 семян помещали в пробирку с 0,9 мл стерильного фосфатного буфера с добавлением Твин-20; затем пробирку на 15 мин помещали в холодильник при 4°C; в течение 15 мин встряхивали на вортексе для лучшего смыва бактериальных клеток с поверхности семян; полученную суспензию разводили 1:10 и 1:100 стерильным фос-

фатным буфером; из каждого разведения полученной суспензии по 0,1 мл с помощью пипетки и шпателя высевали на полуселективную для *Cmm* среду mSCM и неселективную YDC; оставшуюся суспензию отбирали в чистую пробирку, замораживали и использовали для прямого ПЦР; через 24 и 36 ч инкубации чашек при 28°C проводили смыв с поверхности среды стерильным фосфатным буфером и проводили ПЦР-анализ с праймерами СММ5, СММ6 (БИО-ПЦР). В качестве положительного контроля использовали суспензию бактериальных клеток патогенного штамма *Cmm* 1202.

Результаты и их обсуждение

Результаты проверки коллекции изолятов *Cmm* с помощью различных диагностических тестов приведены в табл. 1. В качестве отрицательного контроля были выбраны изоляты возбудителей бактериальной крапчатости томата (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pst*) и кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Cms*).

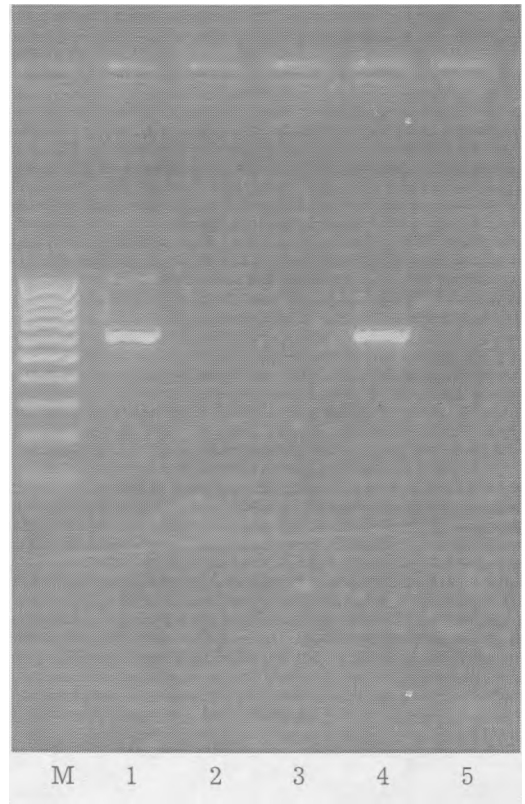
Как видно из табл. 1, при использовании изолятов, выбранных в качестве отрицательного контроля *Pst* и *Cms*, положительной реакции в диагностических тестах не наблюдалось. При использовании изолятов *Cmm* 1201-1231 наблюдалась положительная реакция в тестах окраски по Граму, СВЧ на микрабилизе, патогенность при 2 методах инокуляции. Результаты 2 методов инокуляции не различались. Поэтому сделан вывод о целесообразности использования инокуляции ножницами, так как в этом случае проявление симптомов заболевания наблюдалось на 10 — 14 дней раньше по сравнению с методом укола иглой.

В тесте прямой ПЦР с чистой культурой бактерий праймеры СММ5 и СММ6 давали положительную реакцию только с 40,9% патогенных изолятов *Cmm* и не давали реакции с непато-

генными коллекционными штаммами, что указывает на необходимость поиска специфичных праймеров для практической диагностики. Продукт амплификации имел размер около 614 пар оснований (рисунок).

Тестирование зараженности партий семян с использованием 2 методик ПЦР показало, что прямая ПЦР экстрактов из семян не давала положительный результат ни в одном из вариантов, что, очевидно, является следствием наличия в значительных концентрациях ингибиторов амплификации. БИО-ПЦР экстрактов из семян, выделенных из искусственно зараженных плодов, дала положительный результат в вариантах с посевом на полуселективную среду mSCM как за 1 сут, так и за 3 сут до смыва колоний с последующим проведением ПЦР (табл. 2). Использование для БИО-ПЦР неселективной среды YDC не дало положительного результата, вероятно, из-за значительного роста сапротрофной микробиоты, который привел к подавлению роста целевого патогена.

На основании полученных данных можно заключить, что предварительный посев экстрактов из семян на полуселективную среду повышает достоверность диагностики зараженности семян. Этот факт можно объяснить как размножением возбудителя на среде,



Электрофорез продуктов амплификации с праймерами СММ5 и СММ6: М — маркер размеров (100 Бр), 1 — ДНК штамма *Stm1202*, 2 — прямой ПЦР экстракта зараженных семян, 3 — прямой ПЦР экстракта здоровых семян, 4 — БИО-ПЦР экстракта зараженных семян, 5 — БИО-ПЦР экстракта здоровых семян

Т а б л и ц а 2

Эффективность различных методик ПЦР при диагностике зараженности семян томата

Модификация ПЦР	Образец семян*	Среда	Результат
ПЦР	1	—	—
	2	—	—
	3	—	—
Био — ПЦР (1 сут инкубирования)	1	mSCM	+
	2	mSCM	—
	3	mSCM	—
Био — ПЦР (3 сут инкубирования)	1	mSCM	+
	2	mSCM	—
	3	mSCM	—
Положительный контроль — чистая культура <i>Stm 1202</i>			+

П р и м е ч а н и я . * 1 — семена, выделенные из искусственно зараженных растений сорта Белый налив; 2 — предположительно зараженные семена; 3 — отрицательный контроль — здоровые семена сорта Белый налив.

так и способностью твердых питательных сред к сорбции веществ ингибиторов процесса амплификации ДНК.

Оптимизированный метод БИО-ПЦР обладает высокой чувствительностью. По данным [6], было возможно определить зараженность партии при наличии 0,02% зараженных семян с использованием стадии концентрирования.

Проведенные нами и другими учеными исследования показывают, что пока ни один из инструментальных методов не дает полного совпадения с результатами оценки патогенности. Так, при изучении 106 штаммов *Cmm* совпадение между оценкой патогенности и результатами ELISA составило 92% [2]. Использование ПЦР с праймерами CMM5-CMM6 показало совпадение для 75% штаммов, а ПЦР с праймерами CMM3 и CMM4 — 90% совпадения с оценкой патогенности.

Другим важным аспектом диагностики является существование в растении и на семенах непатогенных штаммов *Cmm*. Например, среди 59 штаммов, выделенных из 18 партий семян, принадлежность которых к *Cmm* была доказана реакцией с моноклональными антителами, биохимической диагностикой при помощи MicroLog™, гер-PCR с праймером BOXA1R и секвенированием гена 16S rRNA, 81% штаммов показал слабую патогенность или ее полное отсутствие для растения-хозяина [7].

Таким образом, в результате проведения диагностических тестов кол-

лекция изолятов возбудителя бактериального рака была разделена по признаку патогенности; праймеры CMM5 и CMM6 выявляли около 40% патогенных изолятов возбудителя бактериального рака томата; методика БИО-ПЦР с использованием полуселективной среды mSCM позволяла выявлять зараженность семян *C.michiganensis subsp. michiganensis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alvarez A.M. // Annual Review of Phytopathology. 2004. V.42. P. 339-366. —
2. Alvarez A.M. Validation of rapid diagnostic tests for the bacterial canker pathogen *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm). <http://www.stalabs.com/seminar/tomsem3.htm> —
3. Chang R.J., Ries S.H., Pataky J.K. // Phytopathology. 1992. V. 82. N 5. P. 533-560. — 4. Dreier J., Bempohl A., Eichenlaub R. // Phytopathology. 1995. V. 85. P. 462-468. — 5. Gitaitis R.D. // Plant Disease. 1990. V. 74. P. 58-60. — 6. Hadas R., Kritzman G., Klietman F. et al. // Plant Pathology. 2005. V.54. N 5. P.643-648. — 7. Kaneshiro W.S., Mizumoto C.Y., Alvarez A.M. // European Journal of Plant Pathology. 2006. V.116. N 1. P.45-56. — 8. Santos M. S., Cruz L., Norskov P., Rasmussen O.F. // Seed Science and Technology. 1997. V.25. N3. P. 581-584. — 9. Schaad N.W., Berthier-Schaad Y., Sechler A., Knorr D. // Plant Disease. 1999. Vol.83. N 12. P. 1095-1100. — 10. Suslov T.V., Schroth M.N., Isaka M. // Phytopathology. 1982. V. 72. N7. P. 917-918.

SUMMARY

A collection of strains of bacterial tomato canker stimulus was analyzed to improve diagnostic techniques by means of various tests. Out of two test modifications to pathogenicity, the best result showed snipping off tops of a plant, after which followed spreading inoculum on the cut plant part. All pathogenic cultures showed super-sensitivity reaction to Mirabilis jalapa and positive reaction in 3% KOH solution. PCR using primers CMM₅ and CMM₆ carried out with pure *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* cultures produced positive result only with 40,9% pathogenic strains. The necessity of a further search for specific primers has been grounded.