

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ ЗАРАЖЕННОСТИ
СЕМЯН КАПУСТЫ ВОЗБУДИТЕЛЕМ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Е.С. МАЗУРИН, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ,
АН. ИГНАТОВ*, Ю.А. ВАРИЦЕВ**

(Лаборатория защиты растений)

Для диагностики зараженности семян капусты сосудистым бактериозом методом ИФА оптимизировали протокол подготовки проб. Наибольшую экстракцию клеток патогена обеспечило встряхивание семян в фосфатно-солевом буферер Н 7,2 в течение 30 мин с предварительной ультразвуковой обработкой. Показано, что ИФА может быть использован для обнаружения партий семян с уровнем зараженности выше 2 %.

Ключевые слова: болезни капусты, бактериальные болезни растений, сосудистый бактериоз, иммуноферментный анализ.

Сосудистый бактериоз, вызываемый *Xanthomonas campestris pv. campestris* (Хсс), относится к числу наиболее распространенных заболеваний капустных культур в мире [19]. Исследования, проведенные в Тимирязевской академии, показали, что заражение растений в фазе рассады, приводило к снижению массы кочанов на 24-37% [5] в зависимости от устойчивости сортов. Потери при хранении кочанов позднеспелых гибридов капусты, пораженных сосудистым бактериозом, в течение 7 мес хранения были в 2-3 раза больше по сравнению со здоровыми кочанами. Одной из причин снижения лежкости пораженных кочанов являлось повышение их восприимчивости к слизистому бактериозу [5].

К основным источникам инфекции относятся семена, растительные остатки и зараженные сорные растения семейства капустных [18]. Показано,

что сроки сохранения возбудителя в растительных остатках в условиях Московской обл. составляли не более 493-551 дней в зависимости от глубины заделки в почву [6]. В ряде работ было доказано, что поражение возбудителем сосудистого бактериоза дикорастущих и сорных растений семейства капустные может быть не связано с инфицированием капусты. Патоген изолировался с сорных растений, которые находились на расстоянии 32 км от ближайших посадок капусты [12], в то время как распространение бактерий естественным путем (дождь и ветер) от очага инфекции составляло не более 20 м [18]. Штаммы, выделенные из дикорастущих капустных, существенно отличались от бактерий, поражающих культурные растения [11].

Поэтому наиболее важным источником инфекции возбудителя являются зараженные семена [10, 16]. Испол-

* Центр «Биоинженерия» РАН

** ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха РАСХН

зование для посева здорового семенного материала является одним из необходимых элементов системы защиты капусты от сосудистого бактериоза. При разработке и использовании методов диагностики зараженности семян необходимо учитывать предел чувствительности, т.е. минимальный достоверно определяемый уровень зараженности.

В полевом исследовании путем посева семян с разным уровнем зараженности было показано, что наличие 3–5 зараженных семян на 10 тыс. шт. достаточно, чтобы вызвать существенное заражение в поле. Развитие болезни в поле отсутствовало лишь при наличии одного зараженного семени на 10 тыс. семян [17].

В этой связи необходимо чтобы размер пробы семян для анализа и чувствительность используемого метода диагностики позволили выявлять партии семян с зараженностью более 0,03%. В настоящее время существует несколько методов диагностики зараженности семян: проращивание с визуальным наблюдением симптомов, выделение патогена на селективные питательные среды, серологический и молекулярно-генетический методы.

Среди вариантов серологического метода для целей диагностики семенной инфекции использовался вариант двойного сэндвича антител (KAS-ELISA) иммуноферментного анализа (ИФА) [3] и реакция иммунофлуоресценции (РИФ) [1, 4, 13]. Настоящая работа посвящена усовершенствованию использования KAS-ELISA — варианта ИФА (далее просто ИФА) для диагностики возбудителя сосудистого бактериоза в семенах капусты. При этом для достижения поставленной цели решали следующие задачи: 1) оптимизация методики подготовки проб для ИФА, 2) определение чувствительности оптимизированного варианта ИФА при диагностике зараженности партий семян капусты.

В работе были использованы 34 штамма Хсс, выделенных из пораженных растений в различных областях Российской Федерации, Белоруссии или полученные из коллекции ВНИИ фитопатологии РАСХН. Для получения поликлональных антител использовали три изолята: Хсс Bel-5, Kasch-2 и Bun-2, выделенные в 2006 г. соответственно в Белоруссии, Серпуховском и Дмитровском районах Московской обл. Иммунизацию кроликов проводили суспензиями живых бактериальных клеток. Схема иммунизации состояла из подкожной инъекции смеси 1 мл бактериальной суспензии с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда и четырех внутривенных инъекций бактериальной суспензией. Концентрация бактерий составляла 10^9 клеток в 1 мл [13]. Взятие крови проводили через 10 дней после последней иммунизации. Полученные антисыворотки консервировали, добавляя мертиолят (0,2 мг/мл) и хранили при 4°C.

Титр полученных антисывороток определяли методом непрямого ИФА с использованием ослиных антител против глобулинов кролика, меченных пероксидазой производства НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалея (г. Москва). Иммуноглобулины выделяли на хроматографической колонке, заполненной аффинным сорбентом — А-белком *Staphylococcus aureus*, иммобилизованным на сефарозе [8] на базе биотехнологического центра ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха.

Конъюгат иммуноглобулинов и пероксидазы хрена получали методом периодатного окисления. Для стабилизации основания Шиффа конъюгат обрабатывали боргидридом натрия [14]. Определяли оптимальную рабочую концентрацию антител и конъюгата для каждой из полученных сывороток.

Для постановки ИФА использовали методику, адаптированную для тести-

рования бактерий [1]. В качестве субстрата использовали смесь 0,04% о-фенилендиамина с 0,05% перекисью водорода в 0,05 М фосфатно-цитратном буфере рН 5,0. Иммунологические свойства полученных антисывороток определяли в реакции двойной иммунодиффузии в агаре [2], используя штаммы Хсс. В качестве отрицательного контроля использовали штаммы Psl398 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* и Cmml233 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Оптическую плотность продукта ферментативной реакции в ИФА измеряли с помощью вертикального микропланшетного фотометра (Bio-Rad, модель 680) при длине волны 490 нм.

Заражение семян капусты F₁ Малахит проводили в условиях вакуума (-1,01 бар, 1 мин) суспензией Хсс в концентрации 10⁹ кл/мл, из расчета 100 мкл суспензии на 1000 семян. Зараженные семена хранили при 4°C.

Для количественной оценки зараженности семян готовили партии семян с преформированной зараженностью — 0%, 10, 50, 70, 100% в 3-кратной повторности. Семена помещали в колбы с охлажденным стерильным физраствором (0,9% NaCl) с добавлением твина-20 (20 мкл/10 мл) из расчета 10 мл физраствора на 1000 семян. Выдерживали 15 мин при 4°C, встряхивали на шейкере 15 мин при 210 об/мин. Отбирали 1 мл экстракта и хранили при -20°C до постановки ИФА.

Для сравнения чувствительности ИФА при диагностике патогена в буфере и семенном экстракте петлю суточной культуры Хсс суспендировали в 1000 мкл стерильного физраствора и готовили серию 10-кратных разведений, последовательно перенося 100 мкл предыдущего разведения к 900 мкл последующего. Далее в 3-кратной повторности проводили посев 100 мкл суспензии из каждой пробирки на среду УКС [13] в чашки Петри для подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ). Из этих же пробирок переноси-

ли 100 мкл бактериальной суспензии к 900 мкл экстракта здоровых семян. В результате получали экстракты семян с различным содержанием КОЕ патогена.

Для сравнения экстракционной способности различных растворов использовали дистиллированную воду, физраствор и фосфатно-солевой буфер (ФСБ) рН 7,2 [9]. Возбудителя экстрагировали из семян с 10%-й зараженностью на шейкере, как было описано выше.

Пробы экстракта объемом 1 мл отбирали через 1, 5, 15, 30, 45, 60 мин. В качестве контроля использовали пробы экстрактов здоровых семян, отобранных с аналогичными интервалами времени. Эксперимент проводили в 3-кратной повторности.

Для изучения влияния ультразвука и центрифугирования на экстракцию бактерий с семян капусты были сформированы два образца семян с зараженностью 10 и 30%, которые помещали в охлажденный ФСБ рН 7,2 и обрабатывали в ультразвуковой бане в течение 4 мин с интенсивностью ультразвука 35 кГц. Далее экстрагировали 30 мин согласно результатам предварительных экспериментов. В качестве контроля использовали экстракты без воздействия ультразвука. Отдельные варианты экстрактов центрифугировали при 14000g в течение 10 мин, отбирали супернатант, а осадок ресуспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера и далее использовали для постановки ИФА. Более высокие значения экстинкции в этом случае указывали на повышение экстрагируемости бактерий из семян.

Результаты и их обсуждение

Определение титра трех антисывороток в непрямом варианте ИФА показало в двух из них положительную реакцию в разведении — 1:10⁶, а антисыворотка, полученная против изолята Kasch-2, выделенного из Серпуховского района МО, давала положи-

тельную реакцию даже при разведении $1:4 \times 10^6$. На основании полученных данных делали вывод о том, что все сыворотки пригодны для постановки реакции двойной иммунодиффузии в агаре и выделения иммуноглобулинов, но антисыворотка против изолята Kasch-2 имеет более высокую концентрацию специфичных антител.

Результаты реакций двойной иммунодиффузии в агаре с антигенами 34 штаммов Хсс показали, что только антисыворотка к изоляту Kasch-2 реагировала со всеми штаммами коллекции. Поэтому данная антисыворотка была использована в дальнейшей работе по серологической диагностике зараженности семян Хсс.

Совместное титрование концентрации иммуноглобулинов и конъюгата, полученных из сыворотки против штамма Kasch-2, показало, что максимальные показатели оптической плотности продукта ИФА были получены при концентрации иммуноглобулинов 2 мкг/мл и разведении конъюгата 1:2000.

Результаты постановки ИФА с экстрактами семян с различной степенью зараженности представлены на рис. 1.

Результаты данного эксперимента показали, что при росте зараженности семян в интервале 0-32% наблюдался экспоненциальный рост оптической плотности продукта ферментативной реакции ИФА. При зараженности свыше 32% такой зависимости не наблюдалось. В связи с этим оптимизацию методики подготовки проб в дальнейшем проводили на партиях семян с зараженностью в указанном выше интервале.

Семенной экстракт является довольно агрессивной химической и биологической средой с высоким содержанием сапротрофной микробиоты. В нашей работе проводили сравнение чувствительности ИФА в воде и семенном экстракте. Сопоставление кривых зависимости оптической плотности продукта ИФА от содержания числа КОЕ патогена в буфере ФСБ pH 7,2 и се-



Рис. 1. Зависимость оптической плотности продукта ИФА от зараженности семян капуцсты возбудителем сосудистого бактериоза

менном экстракте показало их значительную схожесть (рис. 2.).

Пороги достоверности результатов в этих двух средах оказались практически одинаковы. Метод позволял обнаружить $3,7 \times 10^2$ КОЕ/мл.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о высокой специфичности полученных нами иммуноглобулинов, т.е. не наблюдалось повышение «фона» реакции за счет взаимодействия отдельных иммуноглобулинов и антигенов сапротрофной микробиоты семенного экстракта. Не было также обнаружено ингибирующего действия семенного экстракта на результаты ИФА.

С целью оптимизации протокола выделения бактерий из семян сравнивали экстрагирующую способность разных растворов и буферов. Результаты этого эксперимента представлены в таблице 1.

Было установлено достоверное влияние обоих изучаемых факторов: времени экстракции и экстрагирующего раствора на оптическую плотность про-

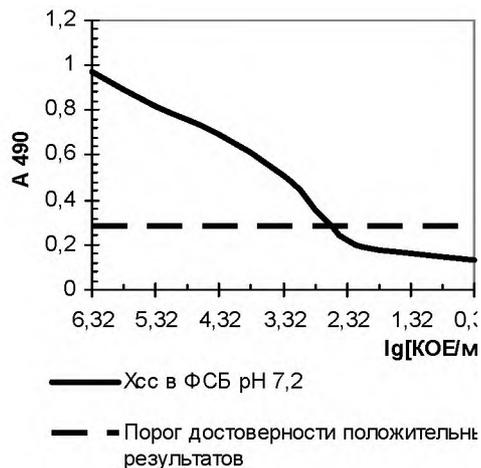
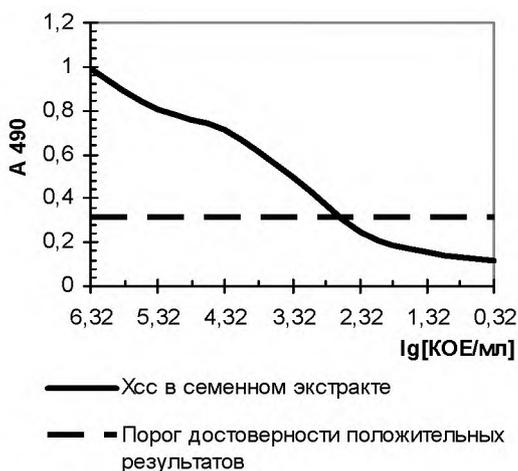


Рис. 2. Чувствительность ИФА при диагностике возбудителя сосудистого бактериоза в ФСБ pH 7,2 и семенном экстракте

Таблица 1

Экстракционная способность ФСБ pH 7,2, физраствора и дистиллированной воды

Вариант растворов (фактор А)	Время экстракции, мин (фактор Б)						В среднем по фактору А НСР ₀₅ = 0,030
	1	5	15	30	45	60	
Дист. вода	0,325	0,406	0,420	0,429	0,334	0,321	0,372
Физраствор	0,279	0,315	0,305	0,328	0,333	0,321	0,313
ФСБ pH=7,2	0,386	0,388	0,432	0,475	0,430	0,375	0,414
В среднем по фактору Б НСР ₀₅ =0,023	0,330	0,362	0,385	0,410	0,365	0,339	—

НСР₀₅ для частных различий 0,035

дукта ИФА. Наилучшая экстракция обеспечивалась при 30-минутной продолжительности встряхивания в ФСБ pH 7,2.

Экстракционная способность дистиллированной воды и физраствора были достоверно хуже. Так, через 30 мин экстракции были получены следующие значения экстинкции при A₄₉₀: ФСБ pH 7,2 — 0,475; физраствор — 0,328, дистиллированная вода — 0,429.

С целью повышения эффективности экстракции патогена использовали обработку ультразвуком и центрифугирование семенного экстракта при двух уровнях зараженности семян 10 и 30%. Результаты ИФА показали, что

оба испытанных приема достоверно увеличивали экстракцию бактерий по сравнению с контролем. В случае анализа партии семян с 30%-й зараженностью обработка ультразвуком давала лучшие результаты по сравнению с центрифугированием. При 10%-й зараженности семян между этими двумя методами не было существенных различий. Использование одновременно ультразвуковой обработки и центрифугирования не дало аддитивного эффекта по сравнению с одной ультразвуковой обработкой при обоих уровнях зараженности семян (табл. 2).

Исходя из полученных результатов оптимальным вариантом подготовки

Т а б л и ц а 2

Оптическая плотность продукта ИФА
в зависимости от различных методов
экстракции Хсс из семян капусты (490 нм)

Метод экстракции	Зараженность партии семян	
	10%	30%
Контроль — без ультразвука и центрифугирования	0,151	0,249
Ультразвук без центрифугирования	0,192	0,282
Центрифугирование без ультразвука	0,190	0,264
Ультразвук + центрифугирование	0,191	0,282
Порог достоверности результатов	0,097	0,097
НСРоб	0,021	0,014

пробы является экстракция семян в фосфатно-солевом буфере рН 7,2 с предварительной обработкой ультразвуком.

Экстракты партий семян с различными преформированными уровнями зараженности, полученные по оптимизированному протоколу пробоподготовки, испытывали в ИФА для выявления порога чувствительности при диагностике Хсс в семенах. Результаты показали, что минимально выявляемый уровень зараженности семян составлял около 2% (рис. 3).

Таким образом, ИФА может быть использован для обнаружения партий семян с высоким и средним уровнем зараженности Хсс (2%). Повысить чувствительность метода, вероятно, можно путем предварительного посева семенного экстракта в жидкую селективную питательную среду для избирательного размножения патогена, что было показано для *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* [15]. Чувствительность ИФА, показанная выше ($3,7 \times 10^2$ КОЕ/мл), близка к порогу определения бактерий прямым ПЦР анализом (порядка 10^2 КОЕ/мл) [7]. К преимуществам ИФА по сравнению с ПЦР относятся низ-

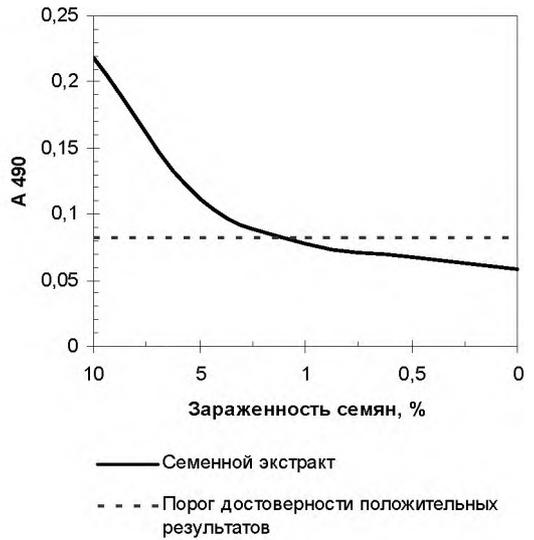


Рис. 3. Чувствительность ИФА на основе оптимизированного протокола экстракции при диагностике зараженности семян капусты сосудистым бактериозом

кая стоимость оборудования и расходных материалов.

Помимо этого выявленное в данной работе отсутствие общих антигенов у Хсс и сапротрофов, находящихся на семенах капусты, указывает на пригодность ИФА для быстрого уточнения видовой принадлежности колоний при высеве семенного экстракта на селективные питательные среды.

Выводы

1. Антисыворотка против изолята Kasch-2 реагировала со всеми испытанными штаммами возбудителя сосудистого бактериоза.

2. Оптимальным вариантом подготовки проб при анализе семенной инфекции является встряхивание семян 30 мин в фосфатно-солевом буфере рН 7,2 с предварительной ультразвуковой обработкой (35 кГц, 4 мин).

3. Усовершенствованный метод диагностики позволял выявлять партии семян с зараженностью свыше 2%.

Библиографический список

1. *Варицев Ю.А., Белов Г.Л., Усков А.И., Варицева Г.П., Завриев С.К., Аргшавя Н.В., Зайцев В.В.* Методические указания по диагностике возбудителей черной ножки (*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al.) и кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Koth.) Skartasson et Burk.) методами иммуноферментного анализа, иммунофлуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции. М.: ВНИИ картофельного хозяйства, 2003. — 2. *Воробьева Н.В.* Иммунодиффузия и иммуноэлектрофорез. М.: Научный мир, 2006. — 3. *Джалилов Ф.С.* Иммуноферментная диагностика зараженности семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза / / Сельскохозяйственная биология, 1987. N 5. С. 48-50. — 4. *Джалилов Ф.С.* Методы изучения бактериальных болезней растений. Методические указания для научно-исследовательской работы студентов. М.: МСХА, 1989. — 5. *Джалилов Ф.С., Монахов Г.Ф., Тивари Р.Д.* Вредоносность сосудистого бактериоза капусты // Известия ТСХА, 1989. Вып 3. С. 69-72. — 6. *Джалилов Ф.С., Тивари Р.Д.* Источники инфекции при сосудистом бактериозе капусты // Известия ТСХА, 1990. Вып 2. С. 101-105. — 7. *Джалилов Ф.С., Мазурин Е.С., Игнатов А.Н.* Усовершенствование методики диагностики зараженности семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза // Сборник трудов международной научно-практической конференции «Агротехнологии XXI века». М.: РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. 2007. С.73-75. — 8. *Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М.* Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. — 9. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда. М.: Мир,

1983. Т. 1 — 10. *Hunter J.E., Abam G.S., Becker R.F.* Observation on the source and spread of *Xanthomonas campestris* in an epidemic of black rot in New York // Plant Disease Reporter, 1975. V. 59. №5. P. 384-387. — 11. *Ignatov A., Sechler A., Schuenzel E. L., Agarkova I., Kliver B., Vidaver A. K., N. W. Schaad* Genetic Diversity in Populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Cruciferous Weeds in Central Coastal California // Phytopathology, 2007. V. 97. P.803-812. — 12. *Kohl J., Wdf J.* Alternaria brassicicola and Xanthomonas campestris pv. campestris in organic seed production of Brassicaceae: Epidemiology and seed infection. Plant Research International. Wageningen, September, 2005. — 13. *Lelliot R.A., Stead K.E.* Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. — Kxford etc.: Blackweell sci. publ, 1987. — 14. *Nakane P.K.* New developments in tissue enzyme-labeled immunoassays // Immunoassays: clinical laboratory techniques for the 1980s, Alan R, Liss Inc., New York, 1980. P.157-169. — 15. *Norman K., Alvarez A.* A rapid method for presumptive identification of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* and other xanthomonads // Plant Disease, 1989. V. 73. №8. P. 654-658 — 16. *Randhawa P., Schaad N.W.* Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds // Phytopathology, 1984. V. 68. P.249-252. — 17. *Schaad N.W., Sitterly W.R., Humaydan H.* Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers // Plant Disease, 1980. V. 64. №1. P.91-92. — 18. *Schaad N.W., Kianese J.C.* Cruciferous weeds sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers // Phytopathology, 1981. V. 71. № 11. P. 1215-1220. — 19. *Williams P.H.* Black rot: a continuing threat to world crucifers // Plant Disease, 1980. V. 64 № 8. P.736-742.

Рецензент — д. б. н. А.А. Соловьев

SUMMARY

Improved enzyme-linked immunosorbent assay (KAS-ELISA) for black rot pathogen in cabbage seeds was developed. Several protocols for probe preparation were tested and pathogen extraction by ultrasonic treatment followed by 30 min shaking in phosphate buffer at pH 7.2 was optimal. KAS-ELISA can be useful to determine infection level above 2% in seed lot.