

УДК 632.911.2:632.913

**ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ МЕТОДОМ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА****М.А. Кузнецов<sup>1</sup>, А.А. Щербаков<sup>1</sup>, С.В. Иващенко<sup>1</sup>, О.С. Ларионова<sup>1</sup>, М.Н. Куреев<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова, Россия<sup>2</sup> ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Россия

Сосудистый бактериоз крестоцветных – широко распространённое заболевание сельскохозяйственных культур, поражающее до 90 % урожая и ведущее к его значительным потерям как на поле, так и – особенно – во время хранения [1]. Возбудителем является *Xanthomonas campestris* (*X. campestris*), широко распространённая в природе и являющаяся опасным фитопатогеном. Заражение растений происходит через корневую систему и поверхность листовых пластин посредством насекомых-вредителей и капель влаги [2]. Важной особенностью возбудителя является способность в неблагоприятных для него условиях вызывать инфекцию, протекающую без внешних признаков поражения растения или с незначительным поражением.

На сегодняшний день, эффективных методов борьбы с фитопатогеном не существует. Приемлемыми способами профилактики заражения и распространения заболевания на сегодняшний день считаются: соблюдение севооборота, выращивание устойчивых сортов и гибридов, использование доброкачественных семян и их протравливание перед высадкой в грунт. Большое значение имеет борьба с сорными растениями семейства крестоцветных, которые способствуют распространению возбудителя и чьи растительные остатки благоприятствуют накоплению возбудителя в почве [3]. Связано это, в том числе, с тем, что развитие инфекции способствует развитию других заболеваний, таких как кила, чёрная ножка и фузариозное увядание – что приводит к массовой гибели рассады и, как следствие, потерям урожая.

Важным является также осуществление санитарного контроля продукции, поступающей на хранение, и мест, где оно производится. Такие заболевания как слизистый бактериоз крестоцветных, точечный некроз, белая и серая гнили, сопутствующие вышеназванным инфекциям, способны приводить к порче более 70 % [4] собранного урожая, что приводит к большим экономическим потерям и ухудшает качество товара, поступающего в торговую сеть.

Следует отметить, что, согласно требованиям ГОСТ, предъявляемым к свежей белокочанной капусте [5], наличие признаков поражения перечисленными выше заболеваниями является недопустимым. Однако, визуальные методы контроля, предлагаемые для выявления этих признаков, недостаточны из-за возможности скрытого развития патогена.

Это делает актуальным вопрос о выборе метода выявления сосудистого бактериоза крестоцветных. Основными критериями, которым должен соответствовать метод, являются: точность, скорость выполнения анализа, малая трудоёмкость, минимальные требования к оснащению лаборатории и квалификации персонала.

Применение классических методик визуального обнаружения признаков заболевания и выделения возбудителя в чистую культуру с этой точки зрения нецелесообразно. Они имеют значительную трудоёмкость и требуют больших затрат времени. С учётом размеров выборки из каждой партии (не менее 15 образцов, согласно ГОСТ), это требует содержания при лаборатории большого штата сотрудников и соответствующих расходов – что, с учётом объёмов выращивания капусты белокочанной (837 тыс. тонн по данным 2018 года) [6], крайне нецелесообразно.

На сегодняшний день, наиболее эффективными являются молекулярно-генетические и серологические методы диагностики. Первые представлены различными вариантами и модификациями полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и достаточно широко распространены в лабораторной практике. Метод обладает высокой чувствительностью (порядка  $10^2$  КОЕ/мл) [7] и точностью (погрешность 0,01 %) и хорошо отработан на практике – в частности, для микроорганизмов вида *X. campestris* созданы библиотеки праймеров, позволяющие идентифицировать отдельные их подвиды и патовары [8, 9]. Однако, его серьёзными недостатками являются: дороговизна оборудования и расходных материалов, длительность проведения анализа и относительная сложность пробоподготовки.

Этих недостатков лишены серологические методы.

Наибольший интерес с этой точки зрения представляет метод дот-иммуноанализа (ДИА). Сущность метода заключается во взаимодействии меченых коллоидным золотом специфических антител к антигенам выявляемого возбудителя на нитроцеллюлозной подложке. Основными преимуществами метода являются: скорость выполнения анализа, простота постановки реакции, доступность и относительная дешевизна необходимых расходных материалов. Ярко выраженная цветовая реакция удобна для визуального учёта результатов – при качественном анализе, и для использования в автоматизированных системах – при количественном. Анализ проводится с использованием небольших количеств взаимодействующих веществ, что позволяет не только свести их расход к минимуму, но и проводить несколько исследований одновременно – что позволяет создавать тестовые системы с высокой эффективностью и, в совокупности с другими качествами, делает метод перспективным [10, 11].

Целью данной работы было изучение возможности диагностики возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных методом дот-иммуноанализа. В ходе работы решались задачи по получению гипериммунной сыворотки, содержащей соответствующие антитела, и определению её чувствительности.

Работа была выполнена на базе Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова и РосНИИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (г. Саратов).

Гипериммунную сыворотку получали подкожной иммунизацией кроликов препаратом дезинтегрированных клеточных мембран. Источником микробных клеток для получения препарата служила культура штамма *X. campestris* В-610. Адьювантом выступала химическая полиэлектролитная субстанция, состоящая из 0,05 %-й раствора полиазолидинамммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, в физиологическом растворе. Для проведения иммунизации использовали 1 мл смеси антигена и адьюванта в соотношении 1:1. Иммунизация проводилась семикратно, с интервалом между последующими иммунизациями в 2 недели, с предварительным отбором крови для определения титра специфических антител [12].

Для дот-иммуноанализа использовались препараты культуры возбудителя, экстракта растений капусты белокочанной (*Brassica oleracea*) сорта «Июньская» без признаков заболевания и экстрактов больных растений. Образцы приготавливались в 1 мл физиологического раствора и брались как в цельном виде, так и в разведениях 1:10 и 1:100.

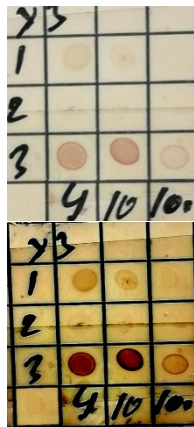
Приготовление маркера – коллоидного раствора золота с диаметром частиц 15–17 нм – осуществляют по методу Г. Френса [13]. Приготовление конъюгата коллоидного золота с белком А стафилококка проводилось методом простой физической адсорбции.

Для постановки дот-иммуноанализа использовали нитроцеллюлозную мембрану фирмы «Миллипор» типа НА с размером пор 0,45 мкм. На её поверхность наносили по 2 мкл исследуемых препаратов в различных разведениях, после чего производили подсушивание на воздухе. Далее, мембрану с нанесёнными на неё образцами помещали в 3 %-й раствор БСА для блокировки неспецифических сайтов связывания, после чего проводили отмывку в 0,05 %-м р-ре Твин 20 и трёхкратно ополаскивали деионизированной водой. Затем подложка помещалась в специфическую гипериммунную сыворотку, взятую в экспериментально установленном оптимальном разведении 1:100 и инкубировалась 30 мин. на шейкере при комнатной температуре. Далее, проводилась отмывка мембраны в растворе Твин 20 и двукратное ополаскивание деионизированной водой. Отмытую мембрану помещали в раствор конъюгата коллоидного золота с белком А и выдерживали до появления окраски.

Результаты дот-иммуноанализа фиксировались при помощи цифровой фототехники. Для улучшения считываемости результатов, снимки подвергались последующей обработке в фоторедакторе с изменением параметров яркости и контрастности.

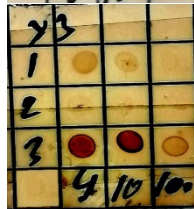
Анализ полученных результатов представлен на рисунке 1 и показывает, что антиген клеточной стенки возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных определяется в препаратах микробной культуры и поражённых тканей листьев капусты белокочанной сорта «Июньская» в разведениях 1:10 и 1:100, при этом реакция с гомогенатом здоровых растений отсутствует.

Также, обращает на себя внимание различие в интенсивности окраски образцов поражённых возбудителем растительных тканей и чистой микробной культуры. В частности, для уверенного обнаружения цветной реакции с чистой культурой потребовалось фотографирование подложки и последующая ретушь изображения с изменением настроек яркости и контрастности (рисунок 2). В свою очередь, реакция с препаратом заражённых растительных тканей заметна даже при минимально взятом разведении.



На рисунке: 1 – препарат культуры *X. campestris* В-610, 2 – препарат тканей здоровых растений, 3 – препарат тканей зараженных растений

Рисунок 1 – Испытание чувствительности и селективности диагностического препарата на основе антигена клеточной стенки *X. campestris* методом дот-иммуноанализа (до цифровой фоторетуши)



На рисунке: 1 – препарат культуры *X. campestris* В-610, 2 – препарат тканей здоровых растений, 3 – препарат тканей зараженных растений

Рисунок 2 – Испытание чувствительности и селективности диагностического препарата на основе антигена клеточной стенки *X. campestris* методом дот-иммуноанализа (после цифровой фоторетуши)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод дот-иммуноанализа обладает достаточной чувствительностью и может эффективно применяться для выявления возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных на растительных объектах. Это позволяет говорить о возможности создания индивидуальных и комплексных систем экспресс-тестов, пригодных для использования в том числе в полевых условиях и непосредственно в плодоовощных хранилищах. Как следствие, появляется возможность оперативно отслеживать качество продукции, как поступающей от производителя, так и подлежащей реализации, и надлежащим образом корректировать условия её хранения для минимизации возможных потерь, в том числе связанных с состоянием самих хранилищ. Также, это позволяет объективно и с большей эффективностью проводить сортировку плодоовощной продукции и выбраковку не соответствующих стандартам единиц – что может положительно сказаться на качестве продуктов питания, реализуемых через сеть розничной торговли. Дополнительным эффектом может стать ужесточение требований фитосанитарного контроля, в том числе предъявляемых к импортируемой и экспортируемой продукции, что – благодаря лучшему качеству товара – может создать для отечественного производителя конкурентное преимущество.

#### Литература

- Игнатов А.Н. Распространение возбудителей опасных бактериозов растений в Российской Федерации // Бактериальные и фитоплазменные болезни сельскохозяйственных растений. Защита картофеля: сб. тр. междунар. науч.-практич. конф. – Большие Вяземы: ВНИИ фитопатологии, 2014 г. № 2. С. 53–57.
- Козулин В.В. Углеводсодержащие биополимеры *Xanthomonas campestris* и их роль в фитопатогенных процессах: Автореф... дис. д-ра биол. наук. Саратов: СГАУ, 2009. – 21 с.
- Мазурин Е.С., Джалилов Ф.С., Игнатов А.Н. Диагностика зараженности семян капусты сосудистым бактериозом методом ИФА // Доклады ТСХА. 2009. Вып. 281. С. 24–26
- Попов Ф.А. Болезни капусты белокочанной в период хранения / Ф.А. Попов // Защита растений и карантин. – 2011. – № 9. – С. 25–28.
- ГОСТ 51809 – 2001 Капуста белокочанная свежая, реализуемая в розничной торговой сети. – М.: Стандартиформ, 2010. – 10 с.
- Плугов А.Г. Посевные площади и валовые сборы капусты в России. Итоги 2018 года [Электронный ресурс] / А.Г. Плугов // Экспертноаналитический центр агробизнеса. – Режим доступа: <https://abcenre.ru/news/posevnyue-ploschadi-i-valovyye-sborny-kapusty-v-rossii-itogi-2018-goda> (дата обращения 22.05.2020).
- Мазурин Е.С., Джалилов Ф.С., Игнатов А.Н., Варицев Ю.А. Усовершенствование диагностики зараженности семян капусты сосудистым бактериозом методом иммуноферментного анализа // Известия ТСХА. 2009. Вып. 1. С. 66–72
- Lema, M. Identification of Sources of Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica napus Crops / M. Lema, P. Soengas, P. Velasco, M. Francisco, M.E. Carrea // Plant Dis. – 2011. – V. 95. – P. 292–297. 101
- Lizyben, C. Characterisation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from South Africa using genomic DNA fingerprinting and pathogenicity tests / C. Lizyben, Cornelius C.B. // Eur J Plant Pathol. – 2012. – V. 133. – P. 811–818.
- Носкова О.А. Применение дот-иммуноанализа для выявления антигенов чумного микроба в посевном материале / О.А. Носкова, Т.Ю. Загоскина, Е.Н. Субычева // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014 – Вып.3. – С. 69–71.
- Полтавченко А.Г. Выбор системы детекции для мультиплексного дот-иммуноанализа антител / А.Г. Полтавченко, А.В. Ерш, Ю.А. Крупницкая // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016 – 61 (4) – С. 229–233.
- Кузнецов М.А., Щербаков А.А., Савина С.В., Скорляков В.М., Иващенко С.В., Муртаева В.С. Получение специфических антител к клеточным мембранам *Xanthomonas campestris* // Аграрный научный журнал. 2017. № 6, С. 46–49.
- Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspension // Nature Phys. Sci. 1973. Vol. 241. № 1. P. 20–22.