

На правах рукописи

КАРЛОВ АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ

ДИАГНОСТИКА ЧЕРНОЙ НОЖКИ КАРТОФЕЛЯ, ВЫЗЫВАЕМОЙ
БАКТЕРИЯМИ РОДА *DISKEYA* И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ
ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

Специальности: 06.01.07 – защита растений
03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории защиты растений Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Джалилов Февзи Сеид-Умерович

доктор биологических наук
Игнатов Александр Николаевич

Официальные оппоненты: доктор сельскохозяйственных наук
Сидоренко Олег Дмитриевич
кандидат биологических наук
Соболев Владимир Васильевич

Ведущая организация: Российский университет дружбы народов

Защита диссертации состоится «22» декабря 2011 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.04 при Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Адрес: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49. Ученый совет РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Автореферат разослан «15» ноября 2011 года и размещён в сети Интернет на сайте университета www.timacad.ru и направлен на сайт ВАК referat_vak@mov.gov.ru

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

А. Н.Смирнов

Актуальность проблемы. Картофель выращивают в 130 странах, где проживает 75% населения планеты. Это пятый по значению после пшеницы, кукурузы, риса и ячменя источник калорий в рационе современного человека. В среднем в мире производится более 325 миллионов тонн картофеля в год, большая часть производства приходится на страны Европы и Азии (около 80% мирового производства картофеля) (van der Zaag, Horton, 1983).

Доля России в мировом производстве этой культуры по посевным площадям и валовому сбору составляет около 10%. Экспорт картофеля оценивается на уровне 100 тыс. т. в год, а импорт 400 – 500 тыс. т. (более 1,5 % его валового производства) (Симаков и др., 2010). Так как Россия импортирует немалое количество картофеля, в том числе и семенного, возникает опасность ввоза и распространения с посадочным материалом возбудителей новых болезней. Прежде всего, это те болезни, возбудитель которых сохраняется непосредственно в семенах и в последующем является главным источником инфекции. В нашей стране эта опасность, также может увеличиться в связи с предстоящим вступлением в ВТО и как следствие увеличением потока посадочного материала, произведенного в других странах, зачастую с другим, чем в России набором возбудителей болезней. Среди болезней картофеля, важное место принадлежит бактериозам, которые распространены повсеместно и уносят от 10 до 25 % урожая, а в некоторых районах страны во влажные годы потери урожая могут достигать 50 % (Катаева, 1972). К числу наиболее распространенных и вредоносных бактериальных болезней картофеля относится черная ножка (Лазарев, Базлеева, 1994; Лазарев, 1985). Это заболевание вызывают три самостоятельных, но близкородственных вида пектолитических бактерий из семейства *Enterobacteriaceae*: *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum subsp. carotovorum* и *Erwinia chrysanthemi*, которые вызывают симптомы на растениях в период вегетации и на клубнях при хранении. Однако, сравнительно недавно в 1982 году вид *E. chrysanthemi*, был включен в список карантинных объектов для стран Европейского Союза и по ряду признаков выделен в новый род, который назвали *Dickeya*. Начиная с 2004 года, этот патоген стремительно стал распространяться по Европе, причиняя значительные экономические потери. Кроме того, появляются сведения об обнаружении нового, более агрессивного вида *D. solani* (Tsror et al., 2008, Slawiak et al., 2009). В Голландии в 2007 году экономический ущерб от этого заболевания составил 25 млн. евро. Многие страны закрыли свой рынок для картофеля, не имеющего сертификата на отсутствие *Dickeya*.

Очевидно, что патоген распространяется с посадочным материалом. Возбудитель болезни на клубнях чаще всего находится в латентной форме. Поэтому, большое значение для борьбы с этим новым заболеванием имеет

тестирование посадочного материала на зараженность. Достоверная диагностика является важным условием для предотвращения распространения заболевания. Наиболее перспективным является использование современных серологических и молекулярно – генетических методов, таких как ИФА (иммуноферментный анализ) и ПЦР (полимеразная цепная реакция). Необходимым условием для успешного применения молекулярно-генетических методов диагностики является изучение генетического полиморфизма видов и штаммов *Dickeya*. К началу выполнения настоящей работы отсутствовали сведения о распространении *Dickeya* на картофеле в Российской Федерации.

Цель и задачи исследований. Целью нашей работы являлось усовершенствование методов диагностики возбудителя черной ножки картофеля из рода *Dickeya* и изучение генетического полиморфизма российской коллекции штаммов патогена.

Для достижения этой цели планировалось решение следующих задач:

1. Выделение возбудителей черной ножки картофеля из рода *Dickeya*, создание коллекции штаммов, изучение их биохимических свойств и круга растений–хозяев.

2. Усовершенствование диагностики *Dickeya* spp. методами ИФА, ПЦР и ПЦР в реальном времени.

3. Изучение генетического полиморфизма коллекции штаммов *Dickeya*, выделенных из картофеля в России.

Научная новизна. Впервые в России выделены *D. dianthicola* и *D. solani* как возбудители черной ножки картофеля. Показано, что в список известных растений-хозяев *D. dianthicola* и *D. solani* следует включить табак и ирис. Впервые определены последовательности 7 генов для *D. solani*, выявлено, что наибольшее генетическое расстояние между *D. solani* и *D. dianthicola* имелось для генов *pelD*, *mdh* и *dnaX* что указывает на возможность использования их для разработки молекулярного маркера для *D. solani*.

Практическая значимость. Создана коллекция российских штаммов *D. solani* и *D. dianthicola* (15 штаммов). Разработан ИФА – диагностикум, позволяющий выявлять бактерии *D. dianthicola* в клубневом экстракте. Показана перспективность использования Био–ИФА с целью повышения чувствительности диагностики. Подобрана флуоресцентная проба, которая вместе с парой праймеров ADE1/ADE2 выявляет присутствие бактерий рода *Dickeya* методом ПЦР в реальном времени.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Международной научной конференции молодых ученых и специалистов РГАУ-

МСХА имени К.А. Тимирязева (г. Москва, 1 – 2 июня 2011г.) и на Научно-практической конференции, посвященной 145-летию РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева «Адаптация сельского хозяйства России к меняющимся погодным климатическим условиям» (7-10 декабря 2010 г.).

Публикации по теме диссертации.

По материалам диссертации опубликовано 3 работы, в том числе 2 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методов исследований, 4 глав экспериментальной части, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Объем работы составляет 129 страниц. В диссертации содержится 24 рисунка и 28 таблиц. Список использованной литературы содержит 140 источников, в том числе 129 иностранных авторов.

Автор искренне признателен ведущему научному сотруднику ВНИИКХ им. А.Г. Лорха к.б.н. Варицеву Ю.А., заведующему лабораторией молекулярных методов диагностики ВНИИКР к.б.н. Мазурину Е.С., научным сотрудникам ВНИИФ к.б.н. Пехтеревой Э.Ш. и Корневу К.П., научному сотруднику Института биохимии им. А.Н. Баха РАН Зотову В.С., руководителю Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, д.б.н. Карлову Г.И. и с.н.с. И.А.Фесенко за большую помощь в выполнении работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», ГК П2380, ГК 02.740.11.0286 и «Молодежного бизнес – инкубатора САО» по программе «Умник».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Обоснована актуальность темы исследования, сформулированы основная цель и задачи исследования.

Глава I. Обзор литературы

В этой главе рассмотрены биологические свойства и особенности патогенеза основных возбудителей черной ножки картофеля. Приведены сведения о видовом составе, круге растений-хозяев, распространении и вредоносности новых бактериальных патогенов картофеля *Dickeya dianthicola* и *D. solani*. Рассмотрены основные методы диагностики возбудителей.

Глава II. Методы и материалы

Работа была выполнена в 2008 – 2011 гг. в лаборатории защиты растений РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева. Отдельные эксперименты проводили в

Центре молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА, во ВНИИ фитопатологии, ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха, Всероссийском центре карантина растений (ВНИИКР).

Растительный материал для изоляции патогена был собран в различных областях РФ. Выделение бактерий проводили методом посева на картофельный агар (КА) или питательный бульон с дрожжевым экстрактом (NBY), а также использовали селективную для пектолитических бактерий среду Логана. Видовую идентификацию изолятов проводили по физиологическим признакам и с использованием ПЦР метода. Для этого, единичные колонии суточной культуры каждого изолята суспендировали в 100 мл стерильной дистиллированной воды и выделяли ДНК с использованием набора «Проба-ГС» («ДНК-Технология», Москва) согласно рекомендациям производителя. ПЦР проводили с праймерами ADE1/ADE2 специфичными к фрагменту гена *pelD* бактерий рода *Dickeya*. Стандартная реакционная смесь ПЦР содержала 75 мкМ Трис – HCl, pH 8,8; 20 мкМ (NH₄)₂SO₄; 0,01% Твин 20; 200 мкМ каждого dNTP; 20 пМ каждого праймера; 2 мкМ MgCl₂; 1 единицу Smar Tag ДНК полимеразы (Диалат, Москва) и 2 нг целевой ДНК. Окончательный объем смеси составлял 25 мкл. Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик» (ДНК – Технология, Москва) при следующих температурно – временных параметрах: начальная денатурация (95⁰С, 15 мин); последующие 35 циклов денатурация (95⁰С, 1,5 мин), отжиг (50⁰С, 60 сек) и элонгация (72⁰С, 1 мин); завершающая элонгация (72⁰С, 15 мин). После окончания амплификации 10 мкл амплифицированных продуктов разделяли в 1,5 % агарозном геле с бромистым этидием в буфере TBE 0,5X и документировали при помощи системы UVP (Великобритания). Выделенные и проанализированные штаммы *Dickeya* spp. хранили в 15%-ном глицерине при – 70⁰С и в стерильной воде при комнатной температуре в четырехкратной повторности.

Биохимический анализ штаммов проводили с использованием тест – системы стрип API 20E (производство bioMérieux, Франция). Для определения вирулентных свойств бактерий проводили инокуляцию 17 растений из различных семейств. Заражение растений проводили уколом в пазуху листа, в концентрации бактерий 10⁸ кл/мл. Антибактериальную активность фитобактериомицина по отношению к штамму D9 *D. dianthicola* оценивали *in vitro*. В стерильную 96-ти луночную планшету для ИФА вносили среду D-PEM, фитобактериомицин в различных концентрациях и бактерии в концентрации 10² кл/мл. Инкубацию проводили в течение 17 часов при температуре 27⁰С, регистрируя каждый час оптическую плотность суспензии бактерий.

Для получения иммуноглобулинов проводили иммунизацию кроликов породы «Шиншилла» бактериальной суспензией *D. dianthicola* штаммов D9 и

D17. Иммунизацию проводили по схеме, применяемой в отделе биотехнологии ГНУ ВНИИКХ для получения антисывороток к бактериальным антигенам. Титр полученных антисывороток определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием ослиных антител против глобулинов кролика, меченых пероксидазой производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалея (г. Москва). Конъюгаты получали с использованием периодатного метода. При постановке ИФА использовали методику, адаптированную для идентификации бактерий (Варицев и др., 2003). При постановке Био – ИФА перед внесением антигенов в лунки вносили селективную среду D – PEM, с последующим нанесением на ее поверхность 20 мкл минерального масла, с целью создания анаэробных условий. Оптическую плотность продуктов ферментативной реакции в ИФА измеряли с помощью вертикального микропланшетного фотометра (Bio-Rad, модель 680) при длине волны 450 нм. Реакцию двойной иммунодиффузии в агаре проводили по стандартной методике (Воробьева, 2006).

При проведении ПЦР в реальном времени использовали праймеры ADE1/ADE2 (Darrasse et al., 1994) и подобранную нами пробу ADE3. Реакцию проводили с использованием набора MasterMix (ООО «Диалат Лтд», Москва) и детектирующего амплификатора «iCycler iQ5» (Bio-Rad Laboratories, США). Температурно-временной профиль составлял: первый цикл: начальная денатурация – 96⁰С, 5 мин; последующие 35 циклов: денатурация – 95⁰С, 10 сек, отжиг – 57,7⁰С, 45 сек (анализ результатов в реальном времени на каждом цикле), элонгация 72⁰С – 1мин. Для повышения достоверности диагностики методом ПЦР в реальном времени, в процессе пробоподготовки использовали краситель пропидиум моноазид (PMA, Biotium Inc, Hayward, Калифорния, США, кат. номер 89139-058), способный связывать ДНК мертвых клеток бактерий после фотоактивации, тем самым препятствуя амплификации.

Для проведения анализа секвенирования и изучения генетического полиморфизма бактерий рода *Dickeya* была использована коллекция штаммов выделенных нами из различных областей России. Анализ штаммов методом мультилокусного секвенирования (MLST) проводили с использованием восьми различных генов. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом генетическом анализаторе DNA Analyser 3730 (фирмы Applied Biosystems) с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (фирмы Applied Biosystems), согласно рекомендациям производителя.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Straz, SPSS 15 и Statistica 5.5.

Глава III. Выделение и идентификация возбудителей черной ножки из рода *Dickeya*.

3.1. Выделение и идентификация штаммов возбудителей методом ПЦР со специфичными праймерами

Из растений, имеющих типичные симптомы черной ножки, полученных из различных областей РФ, было выделено более 500 бактериальных изолятов. На среде КА с генцианвиолетом ряд колоний имели вид сгустка бледно - белого цвета в центре с прозрачной слизистой каймой. В случае выделения на среду NBY колонии были плоскими и практически прозрачными. Имеющие такой внешний вид колонии отсевали на среду Логана с полипектатом натрия. Бактерии, образовавшие лунки в пектатном геле в основном принадлежали к роду *Pectobacterium*, но в результате проведения дальнейших тестов были также обнаружены колонии бактерий, принадлежавшие роду *Dickeya*.

В результате проведенного ПЦР анализа (рис. 1) со специфичными праймерами, было показано, что 15 изолятов, выделенных из клубней картофеля полученных из Московской, Воронежской и Нижегородской областей, принадлежат к роду *Dickeya*. Они были использованы для определения видовой принадлежности, а также проведения дальнейших экспериментов.

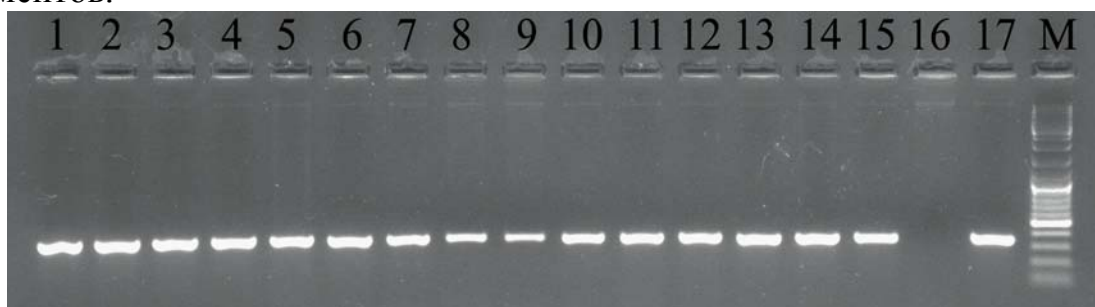


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов амплификации ДНК изолятов *Dickeya* spp. со специфичными праймерами ADE1; ADE2. 1 – 15 штаммы D9, D8, D17, D33, D1, D9Tr, D9B, DFil, D23₁, D23₂, D23₃, D23₄, D3B₁, D3B₂, D3B₃ соответственно, 16 – отрицательный контроль (Еса 393, *Pectobacterium atrosepticum*), 17 – положительный контроль (штамм 2116 *D. dianthicola*, коллекция Plant Research International, Нидерланды).

3.2. Биохимические свойства штаммов *Dickeya* spp. В результате проведенных реакций было установлено, что все используемые штаммы имели положительную реакцию на пектолитическую активность, β –галактозидазу, утилизацию цитрата, образование ацетоина. Отрицательная реакция у всех штаммов наблюдалась в реакции на окрашивание по Граму, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, образование сероводорода, уреазу. Все штаммы имели свойство образования кислоты из D-глюкозы, D-маннита, L-рамнозы, D-сахарозы, амигдалина, L-арабинозы. При постановке

реакции на аргининдигидролазу штаммы *D. dianthicola* D1, D9B, D17, 3B₂, D9, D9Tr, 3B₁, D33, в том числе и штамм *D. solani* D Fil имели отрицательную реакцию, а штаммы *D. dianthicola* D8 и 3B₃ реагировали положительно. В реакции на триптофандизаминазу положительный результат был установлен со штаммом D8, реакция с остальными штаммами была отрицательной. Штаммы *D. dianthicola* D17, D8, D9, 3B₂, D9, D9Tr, 3B₁, 3B₃, D33 образовывали индол, а штаммы *D. solani* D Fil и *D. dianthicola* D1, D9B – нет. Способность к гидролизу желатина наблюдалась у всех штаммов, кроме трех штаммов *D. dianthicola* D17, D33 и 3B₁. Четыре штамма *D. dianthicola* D9B, D17, D9Tr, D33 имели способность к образованию NO₂. Способностью к образованию кислоты из инозита обладали два штамма *D. dianthicola* D8 и D17, из D-сорбита три штамма *D. dianthicola* D1, D9B, D9Tr и штамм *D. solani* D Fil. Штаммы 3B₁, 3B₂, D9 образовывали кислоту из D-мелибиозы.

Таким образом, нами изучены основные физиологические свойства российской коллекции штаммов *D. dianthicola* и *D. solani*. Вариабельность штаммовых реакций не позволяют выделить физиологические тесты, которые можно надежно использовать для видовой идентификации. Основным методом для достижения этой цели является молекулярно-генетический метод.

3.3. Определение круга растений - хозяев *D. dianthicola* и *D. solani*

Искусственное заражение таких растений как гвоздика, георгин, ячмень, пшеница, клевер, лен, люпин, овес, вика, рапс, тритикале не дало каких либо видимых симптомов поражения как при заражении растений штаммами *D. dianthicola*, так и при заражении штаммом *D. solani*.

Растения ириса и картофеля поражались штаммами D9, D33, D Fil и Еса 393. На растениях картофеля через 4 – 5 дней в месте инокуляции формировалось темное расплывающееся по стеблю пятно. В случае заражения растений штаммом вида *D. solani* распространение патогена происходило намного интенсивнее. Растения ириса, во всех случаях заражения, за исключением контроля, в месте введения суспензии через 2 – 3 дня чернели с образованием бактериального экссудата. Растения томата и табака не поражались штаммом Еса 393, но поражались штаммами D9, D33, D Fil. На растениях томата при заражении штаммами *D. dianthicola* в том месте, где производили инокуляцию, растение ломалось и увядало. При заражении штаммом *D. solani* вследствие закупорки сосудов формировались воздушные корни. На растениях табака, при заражении штаммами D9, D33 и D Fil через 3 – 4 дня стебель темнел и терял тургор параллельно с распространением бактерий от места укола к его верхней части.

Полученные нами результаты позволяют включить в список известных растений-хозяев для *D. dianthicola* и *D. solani* табак и ирис. Это расширяет

наши представления о циркуляции патогена и показывает целесообразность пространственной изоляции картофеля от указанных выше видов растений.

3.4. Оценка антибактериального действия фитобактериомицина по отношению к бактериям рода *Dickeya*

Биопрепарат фитолавин, ВРК (действующее вещество - антибиотик фитобактериомицин, ФБМ) зарегистрирован на картофеле против черной ножки (возбудитель – *P. atrosepticum*). Представляло интерес оценить антибактериальную активность ФБМ (Бушкова, Лазарев, 1984) по отношению к *D. dianthicola*.

Культивирование бактерий *D. dianthicola* (штамм D9) в жидкой питательной среде D-РЕМ содержащей ФБМ в различных концентрациях позволило установить, что при концентрациях 160, 80 и 40 мг/л в течение всего времени инкубации (17 часов) оптическая плотность суспензии бактерий оставалась на уровне фоновых значений, то есть происходило сдерживание размножения бактериального патогена (рис. 2). При концентрациях менее 40 мг/л сдерживание роста бактерий происходило в меньшей степени, либо оптическая плотность не отличалась от контроля.

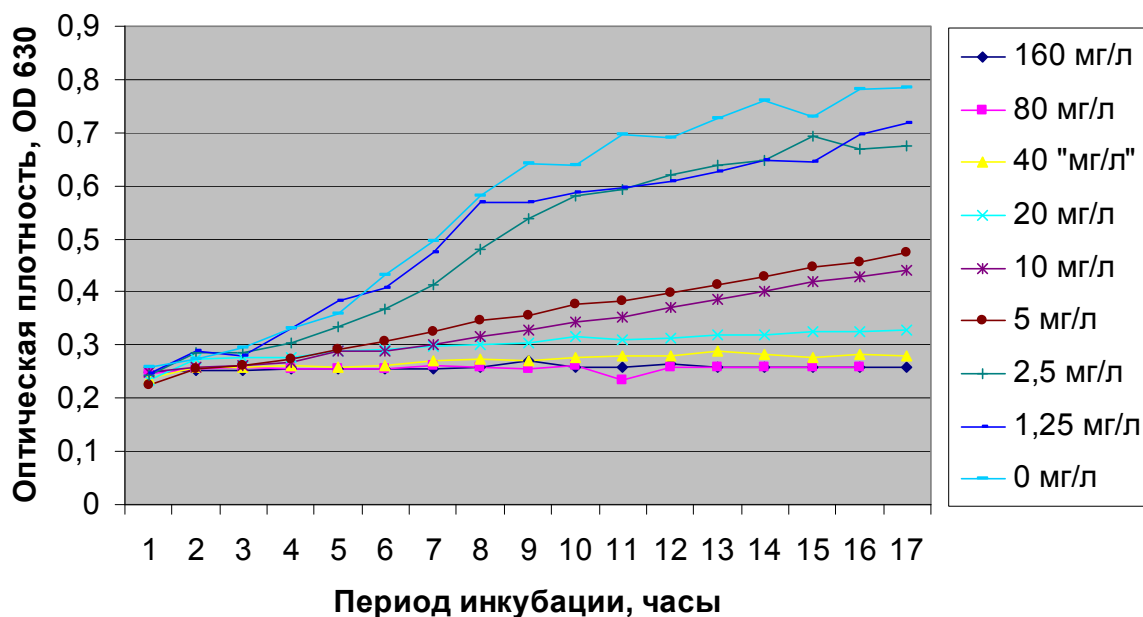


Рис. 2. Рост культуры *D. dianthicola*, штамм D9 в жидкой среде D-РЕМ при различных концентрациях фитобактериомицина

Полученные данные позволяют предполагать, что рекомендованный для защиты картофеля от *P. atrosepticum* препарат фитолавин, ВРК (д.в. – фитобактериомицин), будет также эффективен против новых патогенов черной ножки – *D. dianthicola* и *D. solani*. Это предположение, конечно, требует дальнейшей экспериментальной проверки в вегетационных и полевых опытах.

Глава IV. Диагностика возбудителя черной ножки *Dickeya* spp. серологическим методом.

4.1 Получение иммуноглобулинов гомологичных бактериальным штаммам *D. dianthicola* и создание на их основе ИФА – диагностикума.

В результате проведения серии подкожных и внутримышечных инъекций кроликам нами были получены иммуноглобулины и пероксидазные конъюгаты к штаммам *D. dianthicola* D9 и D17. Для использования иммуноглобулинов в целях практической диагностики оценивали реакцию двух видов антител в 4 концентрациях против 4 штаммов *Dickeya* в трех повторностях.

Иммуноглобулины к штамму D9 в среднем обеспечивали большую оптическую плотность продукта ИФА (о.п. – 0,999), по сравнению с антителами к штамму D17 (о.п. – 0,682).

В среднем оба диагностикума достоверно отделяли 4 штамма *D. dianthicola* от двух других видов фитопатогенных бактерий *C. michiganensis* sbsp. *sepedonicus* и *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* паразитирующих на картофеле. Между реакцией 4-х штаммов *Dickeya* имелись определенные различия, так при тестировании в качестве антигена штамма D17 оптическая плотность продукта ИФА была достоверно выше при использовании обоих видов антител, чем у трех других штаммов. Было показано, что оптимальной концентрацией иммуноглобулинов является 3 мкг/мл.

В другом эксперименте штаммы *D. dianthicola*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* тестировали в ИФА с диагностикумами к *D. dianthicola* и *P. atrosepticum*. Результаты ИФА показали, что *D. dianthicola*, *Pa* и *Pcc* являются серологически обособленными видами. Так, штаммы *D. Dianthicola* и *Pa* реагировали лишь с гомологичными диагностикумами и не давали перекрестных реакций. Штаммы *Pcc* не давали положительных результатов с двумя вышеназванными антителами (табл. 1).

Таким образом, было показано, что три различных возбудителя черной ножки картофеля могут быть легко различимы с помощью ИФА.

Порог чувствительности ИФА при диагностике *D. dianthicola* в буфере и в клубневом экстракте не различался и был на уровне $2 \times 10^4 - 10^5$ кл/мл. Это свидетельствовало о высокой специфичности иммуноглобулинов, т.е. не наблюдалось повышение «фона» реакции за счет взаимодействия иммуноглобулинов и антигенов сапротрофной микробиоты клубневого экстракта, а также об отсутствии в экстрактах клубней веществ ингибирующих протекание реакции. Полученные данные свидетельствуют о возможности диагностики *Dickeya* spp. методом ИФА непосредственно в клубневом экстракте не прибегая к трудоемкому процессу выделения бактерий в чистую культуру.

Таблица 1

Реакция возбудителей черной ножки картофеля с различными ИФА - диагностикумами (оптическая плотность продукта при 450 нм)

Вид	Штамм	ИФА – диагностикум к штамму				
		<i>D. dianthicola</i>		<i>P. atrosepticum</i>		
		D9	D17	Eca 393	Eca 31a	Eca 21
<i>D. dianthicola</i>	D9	0,832c	0,657b	0,026a	0,016 a	0,018 abc
	D8	0,871d	0,638b	0,021a	0,021 a	0,015 ab
	D17	0,759b	0,662b	0,020a	0,015 a	0,010 ab
	D33	0,827c	0,650b	0,025a	0,028 a	0,026 abc
<i>P. atrosepticum</i>	Eca 21	0,020 ^a	0,023a	0,300b	0,118 c	0,229 d
	Eca 393	0,030 ^a	0,020a	0,841c	0,300 d	0,546 e
	Eca 31 ^a	0,047 ^a	0,017a	0,320b	0,128 c	0,256 d
<i>P. carotovorum</i> <i>subsp. carotovorum</i>	P39	0,013 ^a	0,013a	0,008a	0,009 ab	0,009 a
	P3-2	0,038 ^a	0,023a	0,030a	0,053 a	0,010 ab
	P3-3	0,030 ^a	0,020a	0,026a	0,014 ab	0,015 ab
Отрицательный контроль - <i>C.m.sepedonicus</i>	Cms204	0,037a	0,019a	0,024a	0,034 ab	0,021 abc

Примечание: Между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами при сравнении в пределах столбцов нет статистически достоверных различий по критерию Дункана при 95%- м уровне вероятности.

Качественные антигенные различия между штаммами *D. dianthicola* и *D. solani* оценивали по характеру дуг преципитации в реакции двойной иммунодиффузии в агаре. Результаты показали практически во всех комбинациях антиген-антитело реакцию полной идентичности. Антитела к *D. dianthicola* давали реакцию с *D. solani*. Таким образом, в результате проведенных исследований наличие у патогенов серологических групп установлено не было.

4.2 Усовершенствование метода иммуноферментного анализа для диагностики клубневой инфекции *Dickeya spp.*

Использование БИО-ИФА показало, что, так же как и в варианте с обычным ИФА не наблюдалось различий оптической плотности продукта при внесении бактерий в буфере и клубневом экстракте. Чувствительность БИО-ИФА по сравнению с обычным вариантом «сэндвич-метода» была на 4 порядка выше (табл. 2).

Таким образом, использование БИО-ИФА позволяет значительно повысить чувствительность диагностики зараженности клубней картофеля возбудителями «черной ножки» из рода *Dickeya* непосредственно в экстракте клубней без предварительного выделения на питательные среды. Так как, инфекция в семенном материале чаще всего находится в латентной форме, использование данного метода позволит повысить достоверность результатов.

Таблица 2

Тестирование *D. dianthicola*, штамм D9 в ИФА

Концентрация патогена, кл/мл	Оптическая плотность продукта ИФА, 450 нм	
	Обычный ИФА	Био - ИФА
2×10^7	3,001 ^x	2,932 ^x
2×10^6	2,993 ^x	2,898 ^x
2×10^5	2,987 ^x	3,020 ^x
2×10^4	0,854 ^x	2,831 ^x
2×10^3	0,343	2,819 ^x
2×10^2	0,303	2,713 ^x
2×10^1	0,289	2,697 ^x
2×10^0	0,268	2,474 ^x
Фон/Среда	0,336	0,303
Отрицательный контроль		
Еса21	0,308	0,278
Отрицательный контроль		
Отрицательный контроль - Х.с. Dach 2	0,310	0,225
Порог достоверности положительных результатов ($X_{\text{сред. фона}} + 3E$)	0,477	0,696

Примечание: «^x» - значения выше порога достоверности положительных результатов

Глава V. Диагностика *D. dianthicola* методом ПЦР в реальном времени

5.1 Подбор праймеров и пробы, оптимизация условий проведения реакции

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры ADE1/ADE2 специфичные к фрагменту гена *pelD Dickeya spp.* и разработанную нами пробу ADE3. При оптимизации условий реакции было установлено, что оптимальной температурой отжига являлось значение, $57,7^{\circ}\text{C}$. Наилучшие результаты были получены при использовании концентрации пробы 5 пкмоль в расчете на одну реакцию.

В результате определения зависимости порогового значения цикла в ПЦР в реальном времени от концентрации клеток было показано, что с увеличением концентрации клеток *D. dianthicola* происходило уменьшение пороговых значений цикла (C_t). Полученные данные позволили построить калибровочную кривую зависимости C_t от концентрации клеток патогена (рис. 3).

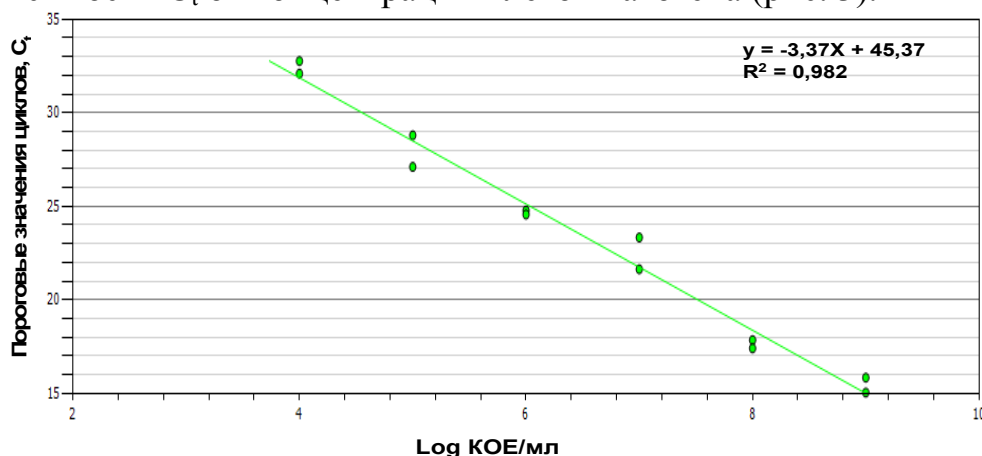


Рис. 3. Зависимость порогового значения цикла (C_t) от исходной концентрации клеток *D. dianthicola*

Эффективность предложенной диагностической системы ПЦР в реальном времени рассчитанная по формуле $E = 10^{1/a}$, где $1/a$ – показывает, на сколько порядков изменится количество ДНК за один цикл реакции (Ребриков Д.В., и др., 2009) составила 1,98, что свидетельствовало об увеличении количества копий ДНК за каждый цикл в 1,98 раза. Это является достаточно высоким значением и свидетельствует о перспективности данной тест-системы для практического применения.

Чувствительность и специфичность разработанной пробы ADE была оценена в тестах с ДНК бактерий различных видов рода *Dickeya* голландской коллекции, любезно предоставленных д-ром van der Volf (Plant Research International, Wageningen, the Netherlands) и штаммов *Pectobacterium spp.* используемых в качестве отрицательного контроля (Есс 3, Есс 36 и Еса 393).

Достоверное превышение фонового уровня флуоресценции происходило на 22-м цикле ПЦР реакции. При использовании ДНК 20 типовых штаммов рода *Dickeya* и штамма D9 *D. dianthicola*, наблюдалась родоспецифичная реакция.

В результате проведенного эксперимента показано, что проба ADE3 в сочетании с праймерами ADE1/ADE2 может быть использована для достоверного выявления бактерий рода *Dickeya*, а в дальнейшем для создания на ее основе диагностической системы для практического применения.

5.2 Изучение возможности повышения достоверности диагностики *Dickeya dianthicola*

При идентификации бактерий методом ПЦР, в случае положительной реакции выделение патогена в чистую культуру на питательную среду удается не всегда. Причиной таких «ложноположительных» результатов может быть ДНК мертвых клеток, которая амплифицируется в ПЦР также как и ДНК живых клеток. Это ограничивает применение ПЦР при проведении фитосанитарной экспертизы, требующей подтверждения жизнеспособности патогена.

Недавно для предотвращения амплификации ДНК мертвых клеток было предложено использование красителя пропидиум моноазида (РМА), способного к связыванию ДНК (Nocker et al., 2007). Это вещество, проникая лишь через поврежденные мембраны мертвых клеток, после обработки интенсивным светом связывает цепи ДНК ковалентной связью. Это делает затруднительным амплификацию ДНК при ПЦР в реальном времени, что выражается в увеличении значения порогового цикла C_t . Различия реакции живых и мертвых клеток в ПЦР в реальном времени выражают в $\Delta C_t = C_t$ мертвых клеток - C_t живых клеток (Kobayashi et al., 2010). Этот подход был апробирован для разделения живых и мертвых клеток *Listeria monocytogenes* (Rudi et al., 2005), *Salmonella enterica* (Nocker, Camper, 2006).

На первом этапе исследований живые и мертвые клетки бактерий при пробоподготовке до выделения ДНК подвергали воздействию различных концентраций РМА. Наибольшие значения ΔC_t (C_t мертвых клеток - C_t живых клеток) наблюдали при концентрациях РМА 25мМ и выше. Отсутствие достоверных различий между 25 мМ, 50 мМ и 100 мМ позволило выбрать концентрацию 25 мМ как оптимальную (табл. 3). Анализ ΔC_t при обработке РМА живых клеток, показал, что разница количества циклов в сравнении с контролем была не существенна.

Таблица 3

Изменение значений порогового цикла (ΔC_t) при использовании различных концентраций РМА

Концентрация РМА	ΔC_t (РМАмертв. – РМА жив.)	ΔC_t (РМАмертв. – ДМСО жив.)	РМА жив. – ДМСО жив.
5мМ	0,24 a	0 a	0,4 a
10мМ	5,71 b	2,67 b	0,4 a
25мМ	11,11 c	11,30 cd	1,07 a
50мМ	11,49 c	12,54 cd	1,94 a
100мМ	11,09 c	10,20 c	0,94 a

Испытание различной продолжительности фотоактивации (табл. 4), показало, что наибольшие значения ΔC_t были установлены при экспозиции 5 минут. Увеличение и уменьшение времени экспозиции приводило к снижению ΔC_t . Таким образом, экспозиция 5 минут может быть рекомендована для дальнейшего использования.

Таблица 4

Значения порогового цикла ΔC_t в ПЦР в реальном времени при тестировании живых и термоинактивированных клеток *D.dianthicola* при различных экспозициях фотоактивации РМА

Период фотоактивации РМА, мин	ΔC_t (РМАмертв.– ДМСО мертв.)	ΔC_t (РМАмертв. – ДМСО жив.)	ΔC_t (РМАмертв. – РМА жив.)
1,5	6,14a	5,58a	7,00a
5,0	9,58b	9,97b	12,06b
10,0	7,74a	8,94b	8,81a

Таким образом, показано, что при проведении ПЦР в реальном времени сравнение ΔC_t для обработанных и необработанных РМА в процессе пробоподготовки двух частей растительного образца позволяет установить наличие жизнеспособного возбудителя черной ножки картофеля *D. dianthicola*.

Глава VI. Генетический полиморфизм видов и штаммов *Dickeya*

В результате секвенирования были расшифрованы последовательности ДНК российской коллекции бактерий рода *Dickeya* по восьми изучаемым генам. Все последовательности были выровнены и проанализированы на сходство с использованием сервера BLAST.

При проведении филогенетического анализа всех штаммов Российской коллекции по изученным генам (ген аконитатгидралазы 1 (aconitate hydratase 1 - *acnA*), глицеральдегидфосфатдегидрогеназы А (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A - *gapA*), изоцитратдегидрогеназы (isocitrate dehydrogenase - *icdA*), малатдегидрогеназы (malate dehydrogenase - *mdh*), маннитолфосфатдегидрогеназы (mannitol-1-phosphate dehydrogenase - *mtID*), глюкозофосфатизомеразы (glucose-6-phosphate isomerase - *pgi*), ген Тау и гамма субъединиц ДНК полимеразы 3 (DNA polymerase III tau and gamma subunits - *dnaX*), ген пектатлиазы (pectate lyase - *pelD*)), было установлено, что все штаммы, кроме DsFil и Dd9L, тесно кластеризовались с представительными последовательностями известных штаммов *D. dianthicola*, в том числе со штаммом Ech600, ошибочно указанным в Генбанке как *D. dadantii*.

Анализ последовательностей фрагментов гена *dnaX* (рис. 4), показал, что штамм DsFil кластеризовался со штаммами группы “*solani*”, выделенными в Европе, а по последовательностям фрагментов других генов (для которых не было доступных последовательностей “*solani*”) – находился между *D. dianthicola* и *D. dadantii*.

Таким образом, мы впервые определили последовательности 7 генов для группы “*solani*”, которые могут быть использованы для разработки специфичных праймеров для ПЦР диагностики этого опасного вида бактерий.

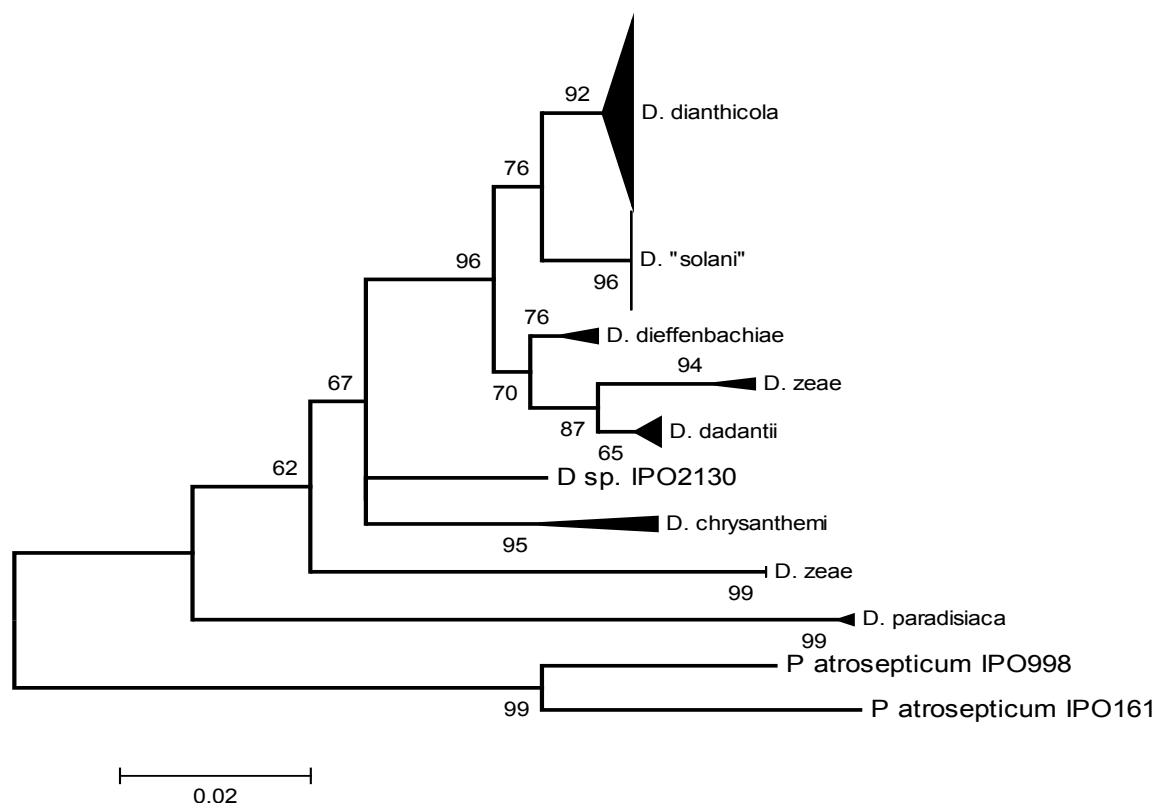


Рис. 4. Филогенетическое дерево для последовательностей 106 фрагментов гена *dnaX* показывающее все геномовиды рода *Dickeya*

Эволюционная история определена с помощью метода ближнего соседа (Saitou, Nei, 1987). Процент повторяющихся деревьев с совместной группировкой таксонов указан по результатам бутстреп анализа возле соответствующих узлов дерева (Felsenstein, 1985). Эволюционные расстояния определены при помощи метода максимального сложного правдоподобия (Maximum Composite Likelihood) (Tamura, Nei, Kumar, 2004). Филогенетический анализ проведен с помощью пакета программ MEGA4 (Tamura, Dudley, Nei, Kumar, 2007)

В зависимости от анализируемого гена группа “*solani*” с видами рода *Dickeya* имеет разное генетическое родство. Так, для генов *icdA*, *mdh*, *mtlD*, *pgi*, *pelD*, группа “*solani*” является сестринской для одной или более групп вида *D. dadantii*. Для генов *dnaX*, *ancA* группа “*solani*” является сестринской для вида *D. dianthicola*. Эти данные свидетельствуют о том, что группа “*solani*” могла появиться в результате горизонтального переноса части генов от штамма *D. dianthicola* к *D. dadantii* при совместном заражении картофеля. Наибольшее генетическое расстояние между группой “*solani*” и видами *D. dianthicola* и *D. dadantii* было найдено для фрагментов генов *pelD* (рис. 5), *mdh* (рис. 6) и *dnaX*, что указывает на эти гены, как на кандидаты для выбора молекулярного маркера группы “*solani*”.

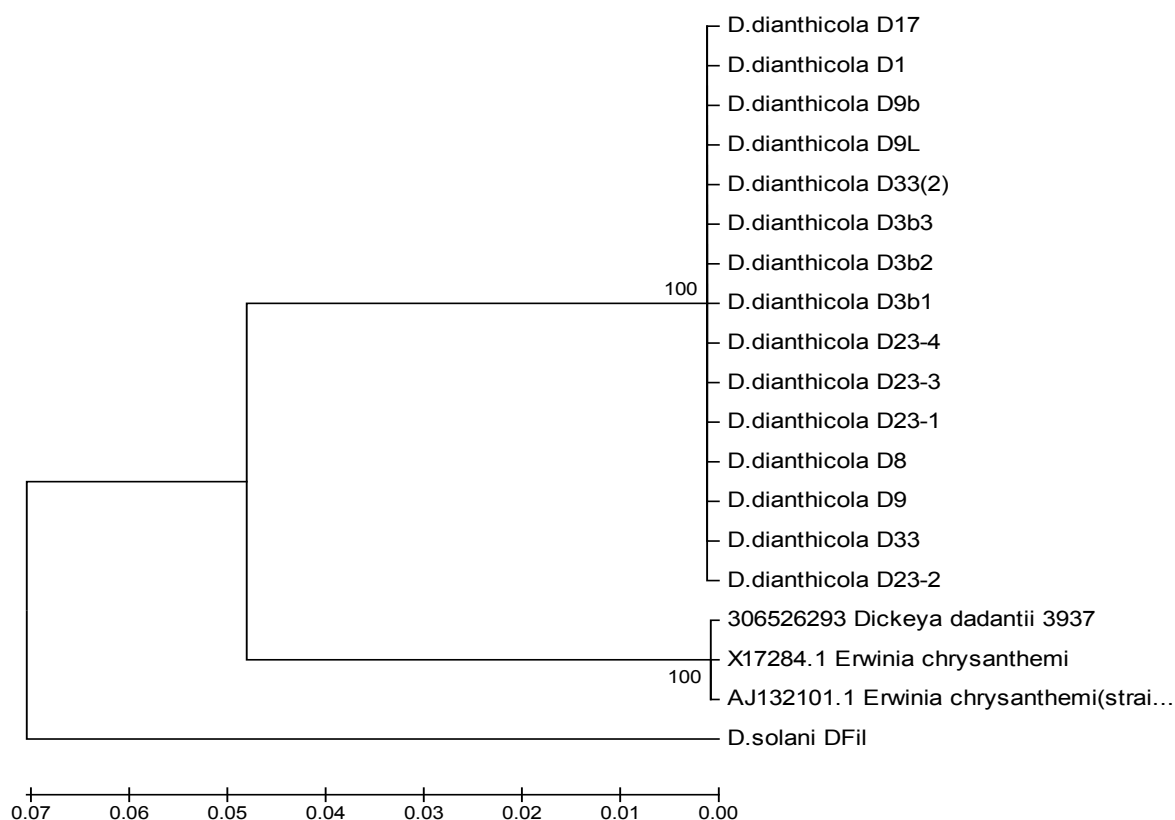


Рис. 5. Филогенетическое дерево для последовательностей 19 фрагментов гена *pelD*

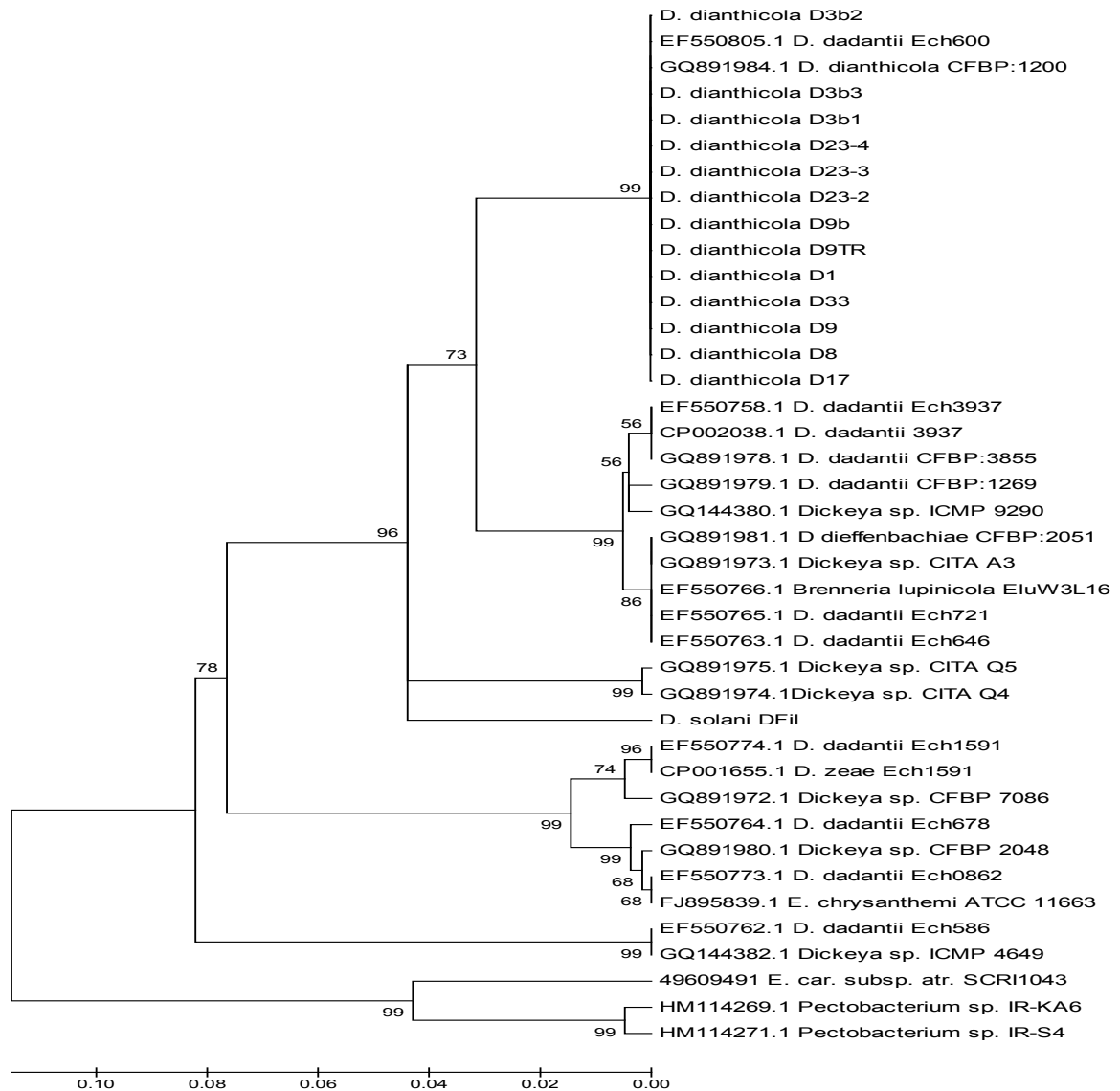


Рис. 6. Филогенетическое дерево для последовательностей 40 фрагментов гена *mdh*

Штаммы *D. dianthicola* отличались высоким внутривидовым генетическим сходством не только для Российской популяции, но и для всех последовательностей, помещенных в Генбанк. Показатель эволюционного (генетического) расстояния для данного вида находился в пределах от 0 до 0,004.

Штаммы *D. dadantii* имели внутривидовое генетическое расстояние от 0,002 до 0,100, соизмеримое с межвидовым расстоянием между *D. dianthicola* и *D. dadantii*. Эволюционные расстояния между этими двумя видами и группой “*solani*” находились в тех же пределах, подтверждая, таким образом, видовой статус данной группы.

Только некоторые последовательности изученных генов показали незначительное разнообразие среди штаммов *D. dianthicola* выделенных в России, с высоким сходством со штаммом Ech600 из батата, выделенным проф. Дикеем (Dickey) в США. Малое разнообразие среди штаммов этого вида позволяет сделать предположение о недавней интродукции патогена как клональной группы штаммов. Вероятнее всего, они распространялись с посадочным материалом картофеля без перехода на дополнительные растения-хозяева.

Малое значение коэффициента дифференциации для всех генов (от 0,197 до 0,300), кроме *pelD* (0,901) и *dnaX* (0,528) указывает на то, что видовая структура данного рода недостаточно определена, и в пределах одного вида, могут быть штаммы, имеющие эволюционное расстояние сопоставимое с межвидовым.

ВЫВОДЫ

1. В результате бактериологического анализа образцов картофеля пораженных черной ножкой из различных регионов нами впервые в РФ обнаружены фитопатогены *D. dianthicola* и *D. solani*.

2. Результаты искусственного заражения показали, что *D. dianthicola* и *D. solani* поражают помимо известных видов растений-хозяев (картофель, гвоздика, томат, цикорий, артишок, георгина, каланхоэ) табак и ирис. Это указывает на целесообразность пространственной изоляции картофеля от указанных выше видов растений.

3. Испытание биохимических свойств штаммов *D. dianthicola* и *D. solani* не позволило выделить тесты, пригодные для видовой идентификации.

4. Разработанный ИФА – диагностикум позволяет выявлять бактерии *D. dianthicola* в клубневом экстракте. Нижний порог чувствительности варьировал в случае обычного варианта ИФА в пределах от 10^5 до 2×10^4 кл/мл, а для Био-ИФА – достигал 2×10^0 кл/мл.

5. Подобрана флуоресцентная проба для проведения количественной оценки присутствия в анализируемом образце бактерий рода *Dickeya* методом ПЦР в реальном времени.

6. Использование при пробоподготовке вещества пропидиум моноазид (РМА) позволяет определять методом ПЦР в реальном времени наличие в образце жизнеспособного возбудителя *D. dianthicola*, что в дальнейшем может быть использовано для повышения достоверности практической ДНК-диагностики.

7. Анализ коллекции штаммов *Dickeya* по восьми различным генам, показал, что штаммы *D. dianthicola* имеют высокое генетическое сходство, как среди российской популяции, так и среди последовательностей размещенных в

Генбанке, что позволяет предположить преимущественное распространение патогена как гомогенной клональной группы с посадочным материалом картофеля.

8. Впервые были определены последовательности 7 генов для *D. solani*, которые могут быть использованы для разработки специфичных праймеров для ПЦР диагностики этого опасного вида бактерий.

9. Наибольшее генетическое расстояние между группами *D. solani* и *D. dianthicola*, *D. dadantii* выявлено для генов *pelD*, *mdh* и *dnaX* что указывает на возможность использования их для разработки молекулярного маркера «*D. solani*».

10. Фитобактериомицин в концентрациях свыше 40 мг/л при культивировании *in vitro* достоверно снижал оптическую плотность бактериальной суспензии *D. dianthicola* по отношению к контролю, что позволяет рекомендовать его для дальнейших вегетационных и полевых опытов с целью защиты картофеля от черной ножки, вызванной видами *Dickeya*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для оценки реальной распространенности в России возбудителей черной ножки картофеля *D. solani* и *D. dianthicola* необходим широкий мониторинг, для чего рекомендуется использовать ИФА-диагностикумы, ПЦР в реальном времени и секвенирование генов *pelD*, *mdh* и *dnaX*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Игнатов А.Н. Основные направления развития методов диагностики фитопатогенных микроорганизмов / Игнатов А.Н., Корнев К.П., Пунина Н.В., Мокрякова М.В., Мазурин Е.С., **Карлов А.Н.** // Доклады ТСХА, Рос. гос. аграр. ун-т - МСХА им. К.А. Тимирязева. Москва, 2009. Вып. 281. – С. 22-24.

2. **Карлов А. Н.** *Dickeya dianthicola* - новый для России бактериальный патоген картофеля / Карлов А.Н., Зотов В.С., Пехтерева Э.Ш., Матвеева Е.В., Джалилов Ф.С., Фесенко И.А., Карлов Г. И., Игнатов А.Н. // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 2010. Вып. 3.-С.134-141.

3. **Карлов А.Н.** Диагностика бактериального патогена картофеля *Dickeya dianthicola* / Карлов А.Н., Игнатов А.Н., Карлов Г.И., Пехтерева Э.Ш., Матвеева Е.В., Шаад Н.В., Варицев Ю.А., Джалилов Ф.С. // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 2011. Вып. 3.-С.38-48.