

*На правах рукописи*

**АБДОРРАХМАН МОТАМЕДИ ШАЛАМЗАРИ**

**ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИОЗОВ ТОМАТА И МЕРЫ ЗАЩИТЫ**

специальности **06.01.07** – защита растений

**03.01.06** – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена на кафедре защиты растений Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Джалилов Февзи Сеид-Умерович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Калашникова Елена Анатольевна**

кандидат биологических наук  
**Шумилина Дарья Владимировна**

**Ведущая организация:**

Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии

Защита состоится «01» декабря 2010 г. в 15-00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.04 при Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49. Факс (495) 976-24-92.

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

Автореферат разослан «28» октября 2010 г. и размещён на сайте университета [www.timacad.ru](http://www.timacad.ru)

Учёный секретарь  
диссертационного совета

А. Н. Смирнов

**Актуальность темы.** Томат является важнейшей овощной культурой. По данным ФАО площади под томатом составляли в 2008 году 4 млн. гектаров. Россия стоит на шестом месте в мире по площади возделывания – 142 тыс. га и на 11-м месте по валовому сбору плодов – 1,82 млн. тонн (Ахатов, 2010).

Эта культура поражается многочисленными болезнями, среди которых значительной вредоносностью обладают бактериозы. Бактериальный рак (возбудитель – *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Smith) Davis et al.) и черная бактериальная пятнистость (возбудитель – *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin et al.) широко распространены в России, как в открытом, так и в защищенном грунте.

При обследовании в некоторых теплицах Северо-Западного региона было поражено бактериальным раком 70-80% растений (Быкова и др., 1990). Во многих регионах России значительно распространена черная бактериальная пятнистость (Корнев и др., 2010). При массовом поражении растений бактериозами потери урожая часто превышают 30% (Лазарев, Быкова, 2003).

Одним из важнейших источников инфекции являются зараженные семена. Поэтому, разработка чувствительных и достоверных методов диагностики зараженности семян томата бактериозами имеет в настоящее время большую актуальность.

Для обнаружения семенной инфекции наиболее перспективным представляется использование молекулярно-генетических методов, в частности полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА).

Для борьбы с бактериозами предложен ряд биопрепаратов и индукторов устойчивости. Однако в настоящее время недостаточно достоверных сведений об их эффективности.

Многие элементы биологии возбудителей и патогенеза такие, как способность к выживанию в эпифитном состоянии на поверхности растений не являющихся хозяевами патогена, длительность выживания в почве, остаются малоизученными. Требуется совершенствование методика скрининга веществ, способных ограничить размножение возбудителей. Проведение этих экспериментов возможно с использованием маркированных штаммов. Наиболее пригодным для этой цели является маркирование возбудителя геном зеленого флуоресцентного протеина (green fluorescence protein, GFP), который флуоресцирует в зеленом диапазоне при облучении его синим светом. В настоящее время этот ген белка широко используется в клеточной и молекулярной биологии в качестве светящейся метки (Степаненко и др., 2007). Эффективность такого подхода неоднократно была показана на ряде фитопатогенных и симбиотических бактерий (Cheng, Walker, 1998; So et al., 2002).

**Цель и задачи исследований.** Целью работы являлось усовершенствование методов диагностики возбудителей бактериального рака и черной бактериальной пятнистости бактериозов и разработка приемов защиты.

Для достижения этой цели планировалось решение следующих задач:

1. Разработка эффективных и достоверных методов диагностики зараженности семян томата возбудителями бактериозов.

2. Создание штаммов возбудителя черной бактериальной пятнистости томата трансформированных геном GFP и их использование для оценки антибактериальной активности различных препаратов и уточнения источников инфекции возбудителя.

3. Сравнение эффективности различных современных препаратов против бактериального рака и черной бактериальной пятнистости.

**Научная новизна.** Для диагностики семенной инфекции разработана методика мультиплексной ПЦР, позволяющая выявлять в одной пробе возбудителей двух бактериозов томата.

Выявлены штаммовые различия возбудителей бактериозов томата по серологическим свойствам.

На основе генетически трансформированного штамма возбудителя черной бактериальной пятнистости с геном GFP разработаны методы оценки антибактериального действия препаратов и биологической эффективности протравителей, а также проведена оценка длительности сохранения патогена в почве и эпифитного выживания на поверхности растений.

**Практическая ценность работы.** Оптимизирована методика пробоподготовки при диагностике *X. vesicatoria* в семенах томата методом ИФА.

Показана высокая биологическая эффективность препарата бион в защите томата от черной бактериальной пятнистости, а также фитолавина, фитоплазмина и лариксина против бактериального рака.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Диагностика зараженности семян томата бактериозами на основе усовершенствованных методов ПЦР и ИФА.
2. Использование трансформированных штаммов *X. vesicatoria* с геном GFP для изучения патогенеза и оценки эффективности средств защиты.
3. Эффективность биопрепаратов и индукторов устойчивости в защите томата от бактериального рака и черной бактериальной пятнистости.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на семинаре «Защита растений в теплицах» («Гавриш», г. Москва, 24-27 мая 2010 г.) и на II Международной научно-практической

конференции «Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы» (Моск. обл., ВНИИССОК, 2-4 августа 2010 г.).

**Публикации по теме диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 2 работы, в том числе 1 статья в журнале, включенном в перечень журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав экспериментальной части, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Объем работы составляет 106 страниц. В диссертации содержится 18 рисунков и 28 таблиц. Список использованной литературы содержит 113 источников, в том числе 76 на иностранных языках.

Автор искренне признателен руководителю Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, к.б.н. Карлову Г.И.; директору Селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева, к.с.-х.н. Монахосу Г.Ф.; ведущему научному сотруднику Центра «Биоинженерия» РАН, д.б.н. Игнатову А.Н.; ведущему научному сотруднику ВНИИКХ им. А.Г. Лорха, к.б.н. Варицеву Ю.А.; заведующему лабораторией молекулярных методов ФГУ «ВНИИКР», к.б.н. Мазурину Е.С. за большую помощь в выполнении работы.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

### Глава I. Обзор литературы

В этой главе рассмотрены вопросы биологии возбудителей бактериального рака и черной бактериальной пятнистости томата, особенности патогенеза и вредоносности. Приведены сведения об основных методах диагностики и мерах борьбы с бактериозами томата. Описываются основы использования флуоресцентных маркеров для изучения патогенеза при инфекционных болезнях растений.

### Глава II. Материал и методы

Для изоляции *C. michiganensis subsp. michiganensis* и *X.vesicatoria* растительный материал промывали водой в течение 1 часа, после поверхностной стерилизации стерильным скальпелем вырезали пораженные участки ткани с захватом здоровых участков, суспензировали в стерильной воде и высевали на среду YDC (Lelliot, Stead, 1987), распределяя по поверхности при помощи шпателя Дригальского. Чашки помещали в термостат и инкубировали 48-96 часов при температуре +27<sup>0</sup>С. Типичные колонии отсеивали и проводили тест на патогенность. Часть коллекции возбудителей

бактериального рака и черной бактериальной пятнистости была предоставлена лабораторией бактериальных болезней растений ГНУ ВНИИ фитопатологии РАСХН. Всего в работе были использованы 35 штаммов *C. michiganensis subsp. michiganensis*, 16 штаммов *X. vesicatoria*, 2 штамма *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* (получены из ВНИИКХ), 2 штамма *E. coli*. Хранение коллекции бактерий проводили двумя способами: в стерильной воде при +4<sup>0</sup>С и в 15%-ном глицерине при -70<sup>0</sup>С.

Для оценки вирулентности коллекции *C. michiganensis subsp. michiganensis* и *X. vesicatoria* растения томата сорта Белый налив выращивали в зимней остекленной теплице при температуре +27...+32<sup>0</sup>С днем и +15<sup>0</sup>...+20<sup>0</sup>С ночью в пластиковых сосудах объемом 0,5 л заполненных торфяным питательным субстратом.

Инокуляцию растений бактериальным раком проводили в фазу 3-4 настоящих листьев методом укола в пазуху 1-го листа препаровальной иглой, предварительно смоченной суспензией клеток. Для приготовления инокулюма суточную культуру патогена, суспензировали в стерильном физрастворе, доводили концентрацию до 10<sup>8</sup> КОЕ/мл. Через 10-12 суток учитывали проявление типичных симптомов заболевания (некротизация сосудов, увядание).

Инокуляцию растений томата с. Белый налив черной бактериальной пятнистостью проводили в стадии 4-6 листьев опрыскиванием суспензией клеток *X. vesicatoria* плотностью 10<sup>8</sup> клеток/мл. Сутки до инокуляции и 1-3 суток после инокуляции опытные растения выдерживали в условиях высокой влажности в изоляторе из полиэтилена. Через 7-10 дней после инокуляции подсчитывали число некрозов на листьях.

Для опытов по оценке биологической эффективности против бактериозов томата были выбраны следующие препараты: фитолавин-300, фитоплазмин, лариксин, гамаир, нарцисс, бион.

Выделение ДНК бактерий проводили по методике описанной С.В. Цыганковой с соавторами (Tsygankova et al., 2004). В некоторых экспериментах ДНК бактерий выделяли с помощью набора «Проба-ГС» (производства «ДНК-технология») согласно инструкции производителя.

ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, Москва). Продукты амплификации разделяли в 1,5%-ном агарозном геле с буфером ТВЕ при напряженности поля 5 В/см. В качестве маркера молекулярного размера использовали «GeneRuler™ 100 п.н.» («Fermentas»).

Для иммунизации кроликов с целью получения иммуноглобулинов, постановки иммуноферментного анализа и иммунодиффузии в агаре использовали общепринятые методы (Варицев и др., 2003; Воробьева, 2006;

Мазурин, 2009; de Boer et al., 1979). Использовали также коммерческие наборы для диагностики *C.michiganensis subsp. michiganensis* на основе щелочной фосфатазы (“Neogen”).

Оптическую плотность продукта ферментативной реакции в ИФА измеряли с помощью вертикального микропланшетного фотометра (Bio-Rad, модель 680) при длине волны 490 и 450 нм для пероксидазных конъюгатов и 405 нм для конъюгатов на основе щелочной фосфатазы.

Заражение семян томата суспензиями *C.michiganensis subsp. michiganensis* и *X.vesicatoria* проводили в условиях вакуума (-1,01 бар, 1 мин) в концентрации  $10^9$  КОЕ/мл, из расчета 100 мкл бактериальной суспензии на 1000 семян. Зараженные семена хранили при  $+4^0$  С.

Генетическую трансформацию бактериальных патогенов с помощью плазмиды рНС60 с геном GFP проводили методами теплового шока, электропорации и трехродительского скрещивания.

Для электропорации использовали кюветы с расстоянием 0,1 см между электродами (BIO-RAD или Алмабион). Кюветы помещали в электропоратор Gene Pulser (BIO-RAD) и выбирали программу E1 (V = 1.8 kV) для *E. coli* либо E2 (V = 2.5 kV) для *C.michiganensis subsp. michiganensis* и *X. vesicatoria* согласно рекомендациям производителя. Выросшие колонии проверяли на способность к флуоресценции под флуоресцентным стереомикроскопом Stemy (Zeiss), с соответствующим набором фильтров. В дальнейшем колонии проверяли методом ПЦР со специфичными к виду патогена и гену GFP праймерами.

Лабораторные опыты проводили в 3-х кратной повторности, а вегетационные эксперименты – в 5-кратной. Статистическую обработку данных проводили методом дисперсионного анализа с использованием программы STRAZ, а также сравнением по критерию Дункана с помощью программы SPSS15.

### **Глава III. Усовершенствование молекулярно-генетического метода диагностики зараженности семян томата бактериозами**

Цель работы состояла в разработке мультиплексной тест-системы для одновременного выявления в одной пробе семенного экстракта двух возбудителей бактериозов томата.

Для постановки ПЦР использовали следующие пары праймеров: Cmm5/Cmm6, специфичные для гена path-1 *C.michiganensis subsp.michiganensis*, размер продукта амплификации 614 п.о. (Dreier et. al., 1995); 16 оригинальных пар праймеров, которые были подобраны нами на ранее описанные (Rijlaarsdam et al., 2004) специфичные для *C.michiganensis subsp.michiganensis* AFLP-фрагменты; 804F/1443R, специфичные к регуляторной области гена *tonB*

бактерий рода *Xanthomonas*, размер продукта амплификации 639 п.о. (Tsygankova et. al., 2004; Игнатов, 2006); rRNA349F/765R, специфичные для общего для фрагмента гена 16S рРНК широкого круга бактерий, размер продукта 458 п.о. (Мазурин и др., 2009).

Сравнение специфичности и чувствительности всех тестируемых для *S.michiganensis subsp.michiganensis* праймеров проводили по отношению к двум выбранным на основании результатов оценки генетического разнообразия штаммам возбудителя бактериального рака *Smm1202* и *Smm1203* (Ignatov et al., 2009). По результатам этой работы были отобраны праймеры *Smm5/6* и 10 пар предложенных нами праймеров. В связи с тем, что продукт амплифицируемый праймерами *Smm5/6* (614 п.о.) мало отличался от продукта с праймерами 804/1443 (639 п.о.) на *X. vesicatoria*, в дальнейшей работе *Smm5/6* не использовали.

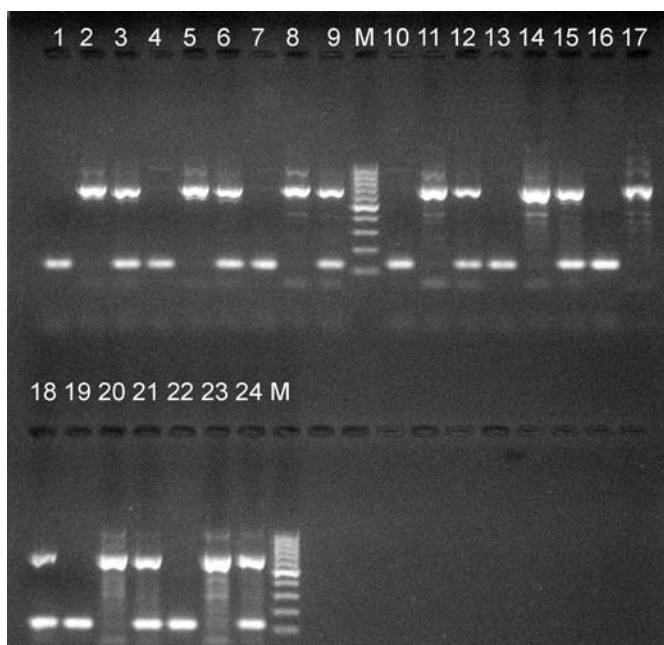


Рис. 1. Результаты мультиплексной диагностики возбудителя бактериального рака и черной бактериальной пятнистости томата. Дорожки: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 – ДНК *Smm1202* с праймерами D10F/R; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23 – ДНК *Xv 1111/V* с праймерами 804F/1443R; 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 – смесь ДНК *Smm1202* и *Xv 1111/V* со смесью праймеров D10F/R и 804F/1443R при различных температурах отжига праймеров. Дорожки: 1-3 – 61<sup>0</sup>С, 4-6 – 59<sup>0</sup>С, 7-9 – 57<sup>0</sup>С, 10-12 – 55<sup>0</sup>С, 13-15 – 53<sup>0</sup>С, 16-18 – 51<sup>0</sup>С, 19-21 – 49<sup>0</sup>С, 22-24 – 47<sup>0</sup>С, М-GeneRuler™ 100 п.о.

Специфичность других отобранных праймеров проверяли по отношению к возбудителю кольцевой гнили картофеля *S.michiganensis subsp.sepedonicus* (*Sms*). Многие праймеры специфичные к *S.michiganensis subsp.michiganensis* давали перекрестную реакцию. Только пары праймеров *Smm 5/6* и D10 F/R не реагировали со штаммами *Sms*. По показателям эффективности и



специфичности амплификации для создания мультиплексной системы была выбрана пара праймеров D10 F/R.

Для постановки дуплексной реакции использовали пары праймеров D10 F/R и 804F/1443R, в присутствии ДНК обоих видов патогена при различных температурах отжига праймеров (рис. 1). В отдельных экспериментах было показано, что максимальная температура отжига праймеров 804F/1443R составляла 61<sup>0</sup>С, а ее повышение приводило к исчезновению продукта ПЦР. Поэтому диапазон температур отжига был ниже 61<sup>0</sup>С. Совместное применение праймеров 804F/1443R и D10F/R позволило провести диагностику двух бактериальных патогенов в одной пробирке. Различия продуктов амплифицированных праймерами по молекулярной массе были существенными для того чтобы диагностировать как совместное присутствие патогенов, так и наличие одного из них. При этом температура отжига праймеров 61<sup>0</sup>С была оптимальной для реакции.

В последующем, в мультиплексную реакцию были добавлены праймеры rRNA349F/765R специфичные к фрагменту ДНК общему для всех видов бактерий в качестве внутреннего контроля. Результаты представлены на рис. 2.

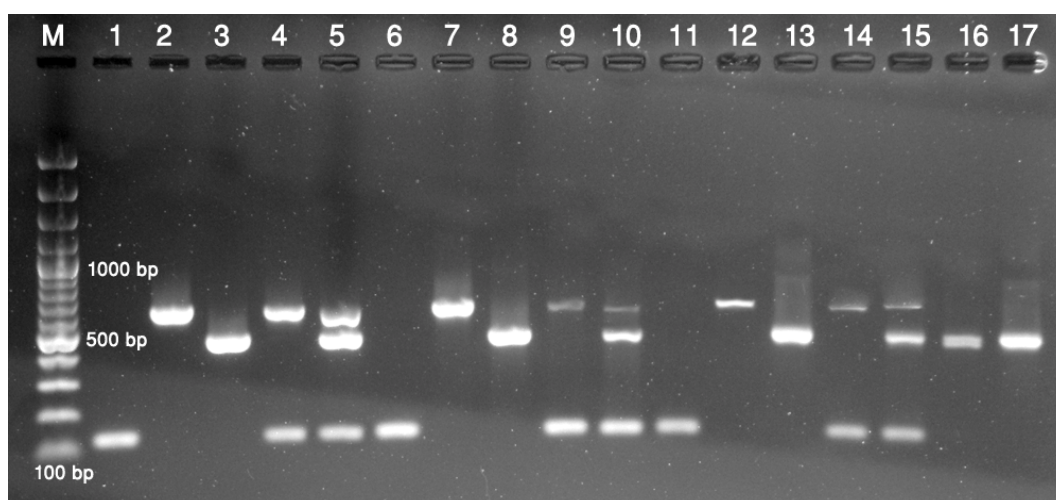


Рис.2. Результаты мультиплексной диагностики возбудителя бактериального рака и черной бактериальной пятнистости томата при совместном присутствии клеток бактерий (дорожки 1-5), ДНК (дорожки 6-10) и экстракта зараженных семян (дорожки 11-15). Дорожки: 1, 6 и 11 – праймеры D10F/R; 2, 7 и 12 – праймеры 804F/1443R; 3, 8 и 13 – праймеры rRNA349F/765R; 4, 9 и 14 – праймеры 804F/1443R+ D10F/R; 5, 10 и 15 – праймеры 804F/1443R+ D10F/R+rRNA349F/765R; 16 – контроль вода; 17 – экстракт здоровых семян. М - GeneRuler™ 100+ п.о. Fermentas.

Результаты показали, что мультиплексную ПЦР возможно проводить в присутствии внутреннего контроля и использовать для этого не только чистые культуры и выделенную из них ДНК, но и семенной экстракт.

Чувствительность диагностики проверяли на партиях семян томата различной степени зараженности *X. vesicatoria*. Нами было показано, что

оптимизированный метод диагностики позволял обнаружить партии семян с зараженностью 0,1%.

Таким образом, в результате проведения экспериментов нами была разработана мультиплексная тест-система для ПЦР диагностики возбудителей бактериального рака и черной бактериальной пятнистости в семенах томата, включающая внутренний контроль прохождения реакции.

#### **Глава IV. Диагностика зараженности семян томата бактериальным раком и черной бактериальной пятнистостью методом иммуноферментного анализа**

##### **4.1. Диагностика возбудителя бактериального рака серологическим методом**

Иммунизацией кроликов культурами *C.michiganensis subsp.michiganensis* штаммов Yu2 и Cmm 1202 не удалось получить удовлетворительного титра антител. При этом не наблюдалось положительных результатов в ИФА при титрах ниже  $10^9$  клеток/мл. В этой связи нами в дальнейшем использовался набор для ИФА-диагностики *C.michiganensis subsp.michiganensis* фирмы “Neogen” на основе щелочной фосфатазы.

Для оценки специфичности антител была поставлена реакция с суспензиями коллекции штаммов возбудителя в концентрации  $10^7$  клеток/мл.

Диагностикум реагировал со всей коллекцией штаммов возбудителя, т.е. уровень оптической плотности продуктов ИФА достоверно отличался от отрицательного контроля. Вместе с тем, между штаммами имелись количественные различия. Статистический анализ показал наличие серологических групп, которые различались по реакции с использованными в коммерческом наборе антителами.

С целью выявления чувствительности метода было проведено титрование чистой культуры в ИФА (табл. 1).

Показано, что тест-система давала положительный результат лишь при концентрации бактерий свыше  $10^6$  клеток/мл. Увеличение продолжительности реакции окисления субстрата с 1 часа до 24 часов не привело к повышению чувствительности ИФА-диагностики.

Для оценки чувствительности ИФА при диагностике семенной инфекции проводили инокуляцию семян. Путем смешивания здоровых и инокулированных семян формировали партии с зараженностью в 100%; 10%; 1%; 0,1% и 0,01% .

Оптическая плотность продукта ИФА при анализе семенных экстрактов партий с зараженностью 10% и 1% статистически достоверно отличались от отрицательного контроля (табл. 2). При тестировании партии семян 0,1%-ной зараженностью результат не отличался от фоновых значений.

Таблица 1

Оптическая плотность продукта ИФА ( $A_{405}$ ) при титровании чистой культуры *S.m.michiganensis*, штамм 1202

Варианты	Период после нанесения субстрата, час	
	1	24
Положительный контроль	1,515 b	3,488 a
$10^8$	1,835 a	2,296 b
$10^7$	0,583 c	1,908 c
$10^6$	0,308 d	0,678 d
$10^5$	0,115 e	0,167 e
$10^4$	0,083 e	0,093 e
$10^3$	0,078 e	0,085 e
Отрицательный контроль	0,102 e	0,220 e

Примечание. В таблицах 1, 2, 5 и 6 между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, нет статистически достоверных различий при 95%-м уровне вероятности.

Таблица 2

Оптическая плотность продукта ИФА ( $A_{405}$ ) при испытании партий семян томата с различной зараженностью возбудителем бактериального рака

Варианты	Период после нанесения субстрата, час	
	1	24
Положительный контроль	1,515 a	3,488 a
Зараженность 10%	0,503 b	1,061 b
Зараженность 1 %	0,219 c	0,769 c
Зараженность 0,1 %	0,118 d	0,294 d
Зараженность 0,01 %	0,106 d	0,191 d
Отрицательный контроль	0,102 d	0,220 d

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что методом ИФА можно было диагностировать партии семян с зараженностью возбудителем бактериального рака не менее 1%, т.е. при наличии не менее 1 зараженного семени среди 100 анализируемых.

**4.2. Диагностика возбудителя черной бактериальной пятнистости серологическим методом**

Из трех испытанных видов антител в реакции иммунодиффузии в агаре лишь сыворотка к штамму Dasch-2 давала положительную реакцию, т.е. дуги преципитации, с некоторыми штаммами патогена 56, 198, 435, 512, 5004, 1111, 1111/В.

Эта отмеченная неоднородность была подтверждена в испытании коллекции штаммов *X. vesicatoria* в реакции ИФА с диагностикумом к штамму Dasch-2. Штаммы можно было разделить на 6 статистически различимых групп. Реакция 8 штаммов не отличалась от контроля. Серологические штаммовые различия у *X.vesicatoria* имели качественный характер, а не количественный как в описанных выше экспериментах с *C.michiganensis subsp.michiganensis*. Наличие у возбудителя серологических групп необходимо учитывать при разработке ИФА-диагностикума для целей практической диагностики.

Порог чувствительности ИФА при выявлении штамма 1111/В *X. vesicatoria* в физрастворе и экстракте семян томата составлял  $4 \times 10^4$  клеток/мл.

Результаты двухфакторного эксперимента по оптимизации параметров экстракции *X. vesicatoria* из зараженных семян томата показали, что замачивание семян в фосфатно-солевом буфере при 4°C на 6 и 10 часов обеспечивало увеличение экстракции бактериального антигена из семян, по сравнению с экспозицией 2 часа и отсутствием замачивания (табл. 3). Так как между вариантами 6 и 10 часов нет существенных различий, то оптимальной следует считать экспозицию в 6 часов.

Таблица 3

Результаты испытания параметров экстракции *X. vesicatoria* из семян томата

Время встряхивания, мин, фактор А	Замачивание при 4°C, час, фактор В				Средние по фактору А НСР <sub>05</sub> -0,0097
	0	2	6	10	
0	0,088	0,183	0,204	0,189	0,166
15	0,176	0,178	0,197	0,203	0,189
40	0,160	0,186	0,191	0,188	0,181
Средние по фактору В НСР <sub>05</sub> -0,0084	0,141	0,182	0,197	0,193	

НСР<sub>05</sub> АВ - 0,0097; НСР<sub>05</sub> – для частных различий - 0,0168

По окончании экспозиции при 4°C семена встряхивали на шейкере при комнатной температуре. При этом наилучший результат обеспечила продолжительность встряхивания в 15 и 40 минут. И в этом случае, вследствие

отсутствия существенности различий между этими вариантами, оптимальным считали 15-ти минутное встряхивание.

С целью повышения эффективности экстракции патогена испытывали обработку ультразвуком и центрифугирование семенного экстракта.

Результаты ИФА показали, что обработка ультразвуком не обеспечивала статистически достоверного увеличения экстрагируемости патогена. Центрифугирование семенного экстракта перед постановкой ИФА снижало показатели экстинкции и поэтому также не может быть рекомендовано. Это наблюдаемое снижение интенсивности прохождения реакции при центрифугировании вероятно связано с тем, что часть антигенов находится в водорастворимой форме и они были потеряны при центрифугировании, т.е. оставались в супернатанте.

Таким образом, оптимальный вариант пробоподготовки заключался в выдерживании семян в фосфатно-солевом буфере 6 часов при 4°C с последующим встряхиванием на шейкере 15 мин.

## **Глава V. Изучение патогенеза бактериозов томата с использованием генетически модифицированных штаммов возбудителей с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP)**

### **5.1. Генетическая трансформация штаммов возбудителей бактериозов томата**

Из трех испытанных методов трансформации лишь при использовании метода электропорации были получены трансформированные колонии *X.vesicatoria* штамма 1111/В с экспрессией зеленого флуоресцентного белка.

Другие испытанные штаммы *X.vesicatoria* не дали положительного результата. Ни один из использованных методов трансформации (тепловой шок, электропорация, конъюгация) не дал положительного результата в случае штаммов возбудителя бактериального рака.

### **5.2. Изучение биологических свойств трансформированного штамма возбудителя черной бактериальной пятнистости**

Трансформированные бактерии дважды пересевали на среде LB с тетрациклином 20 мг/л. 11 изолированных колоний показали высокую интенсивность флуоресценции, их принадлежность к *X.vesicatoria*, наличие гена GFP была подтверждена методом ПЦР со специфичными к патогену и GFP праймерами.

Не было отмечено различий в патогенности исходного *X.vesicatoria* 1111/В и трансформированного *X.vesicatoria* 1111/В GFP штаммов. Через 40 дней после инокуляции с листьев инокулированных трансформированным штаммом отбирали образцы, которые гомогенизировали и высевали на среду

LB с тетрациклином. Сформировавшиеся колонии обладали флуоресценцией и давали специфичный для *X.vesicatoria* ПЦР-продукт с праймерами Xnth 804/1405.

Для выбора искусственной питательной среды, обеспечивающей наилучший рост трансгенного штамма и лучшую экспрессию GFP, сравнивали среды LB, Кинг В, модификация Кинг Б с содержанием глицерина 0.1% и пептона 0.2%, модификация King В с содержанием глицерина 0.1%, YD (YDC без карбоната кальция). Среда засеивали суспензией бактерий до конечной концентрации  $10^5$  клеток/мл и инкубировали на шейкере 200 об/мин при 27°C. Через 4, 8, 12, 16, 20, 24 и 48 часов отбирали пробы, в которых измеряли уровень флуоресценции с использованием флуориметра «Джин» (ДНК-Технология), оптическую плотность при длине волны 600 нм (OD 600) и концентрацию колониеобразующих единиц (КОЕ). В качестве контроля использовали бактериальную суспензию исходного (нетрансформированного) штамма.

Результаты показали, что из 8 испытанных питательных сред, среда Кинг Б в классической прописи обеспечивала наивысшую скорость роста культуры трансформированного штамма *X.vesicatoria* 1111/BGFP и наибольшие значения интенсивности флуоресценции GFP.

Было интересно сравнить уровень флуоресценции GFP у трансформированных штаммов *E.coli* и *X.vesicatoria*. Результаты показали, что в клетках *E. coli* уровень флуоресценции значительно превышал таковой у *X.vesicatoria*.

### **5.3. Оценка активности бактерицидов *in vitro* с использованием генетически модифицированного штамма возбудителя черной бактериальной пятнистости томата**

Отсутствие различий между исходным и трансформированным штаммами позволило нам использовать последний в качестве модели для оценки эффективности бактерицидов. В эксперименте был использован фитобактериомицин с активностью 3750 ЕА/мг (ООО "Фармбиомедсервис") – антибиотик, способный подавлять большинство фитопатогенных бактерий (Петрухина, Буянова, Буцевич, 1973).

В эксперименте колбы Эрленмейера на 100 мл с 30 мл жидкой среды Кинг Б с различной концентрацией фитобактериомицина 0, 1, 5, 10 и 20 мг/л засеивали *X.vesicatoria* 1111/BGFP в концентрации  $10^4$  КОЕ/мл. Через 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 и 72 часа отбирали 3 пробы по 1,5 мл с каждого варианта и измеряли OD 600 и интенсивность флуоресценции GFP.

Размножение тест-объекта и флуоресценция GFP существенно подавлялись при концентрации 1 мг/л и полностью подавлялись при концентрациях

антибиотика свыше 5 мг/л (табл. 15). Не было выявлено существенных различий по флуоресценции в вариантах 5, 10 и 20 мг/л.

Различия опытных вариантов с контролем (без антибиотика) по уровню флуоресценции были статистически достоверны уже через 4 часа культивирования (табл. 3).

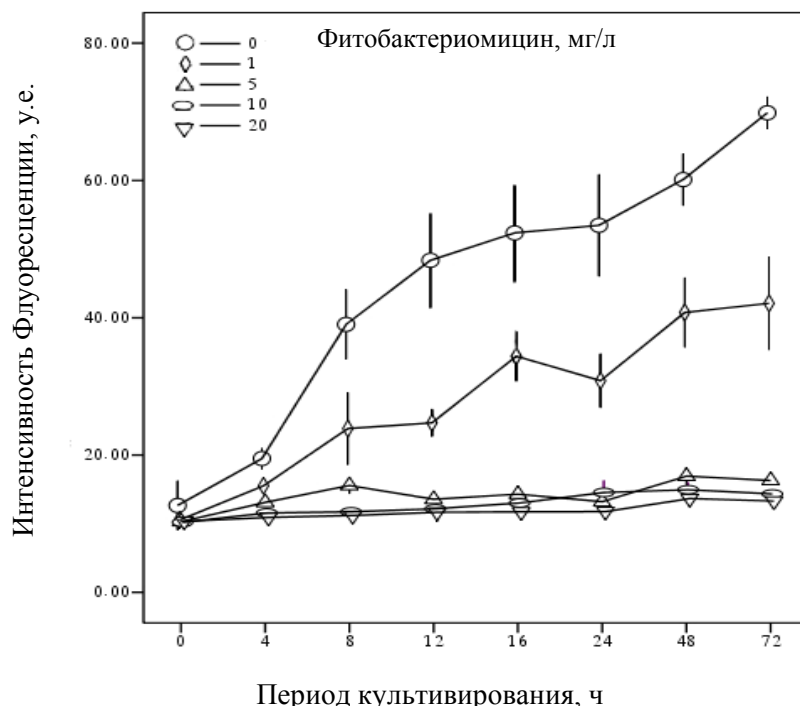


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции зеленого флуоресцентного белка при культивировании штамма *X.vesicatoria* 1111/BGFP на среде Кинг Б при различных концентрациях фитобактериомицина

Таким образом, нами показана принципиальная возможность экспресс - оценки активности бактерицидов *in vitro* путем измерения интенсивности флуоресценции GFP у трансформированного штамма фитопатогена. Метод может быть использован при лабораторном скрининге средств защиты растений от бактериальных болезней растений.

#### **5.4. Оценка биологической эффективности биопрепаратов при обработке семян томата инокулированных генетически модифицированным штаммом возбудителя черной бактериальной пятнистости**

Помимо оценки бактерицидной активности в условиях *in vitro*, нами была предпринята попытка использовать семена, инокулированные штаммом *X.vesicatoria* 1111/BGFP для сравнения биологической эффективности протравителей.

Семена томата инокулированные *X.vesicatoria* 1111/BGFP замачивали в 2%-ных суспензиях следующих биопрепаратов: фитоплазмин, фитолавин, гамаир. В положительном контроле – инокулированные семена замачивали в воде. В качестве отрицательного контроля использовали семена инокулированные исходным штаммом. В каждом варианте имелось 3 повторности по 100 семян в каждой. После окончания экспозиции семена подсушивали на фильтровальной бумаге и раскладывали на среду YDC с тетрациклином. Через 48 часов проводили учет под биноклем, где при ультрафиолетовом облучении отмечали семена, вокруг которых имелись флуоресцирующие колонии. Не было отмечено флуоресцирующих колоний при посеве инокулированных исходным штаммом семян.

Несколько флуоресцирующих колоний были изолированы и их принадлежность к *X.vesicatoria* и присутствие в них гена GFP были подтверждены результатами мультиплексной ПЦР.

Результаты показали, что из испытанных препаратов наибольшую эффективность показал фитолавин. При этой обработке лишь 10% обработанных семян дали на питательной среде колонии бактериального патогена (табл. 4). Не было существенных различий между фитолавином и гамаиром, а также между гамаиром и фитоплазмином. Однако между фитолавином и фитоплазмином различия были статистически достоверны.

Таблица 4

Зараженность томата, инокулированных *X. vesicatoria* 1111/BGFP, после протравливания (доля семян с флуоресцирующими колониями бактерий)

Препарат	Число повторностей	Статистические группы		
		1	2	3
Фитолавин	30	0.10		
Гамаир	30	0.23	0.23	
Фитоплазмин	30		0.40	
Контроль положительный	30			0.70

### 5.5. Изучение способности к эпифитному выживанию возбудителя черной бактериальной пятнистости томата (на примере трансформированного штамма)



С использованием флуоресцентной метки GFP мы провели оценку длительности возможного эпифитного выживания патогена на растениях-хозяевах и на видах растений, которые не являются хозяевами.

Среди таких растений были выбраны перец, томат (оба являются хозяевами для *X.vesicatoria*), баклажан, капуста и огурец (все не являются хозяевами). Растения в фазе 4-5 листьев опрыскивали суспензией бактериальных клеток *X. vesicatoria* 1111/BGFP в концентрации  $10^8$  клеток/мл. Опыт был проведен в 5 повторностях. Через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 недель фрагменты листьев прижимали к поверхности селективной среды (YDC с добавлением тетрациклина 20 мг/л). Выросшие колонии просматривали в бинокляре при облучении ультрафиолетовым светом на предмет флуоресценции, т.е. экспрессии гена GFP.

Полученные данные показывают, что в течение 3 недель патоген сохранялся на поверхности всех испытанных видов растений. Через 5 недель патоген дал лишь две колонии с отпечатка листа огурца.

При микробиологическом анализе через 6 недель не было обнаружено колоний бактерии-интродуцента. Таким образом, период эпифитного выживания возбудителя черной бактериальной пятнистости на листьях испытанных видов растений не превышает 5 недель. Причем виды-хозяева не обладали преимуществом по способности поддерживать эпифитную популяцию возбудителя по сравнению с не хозяевами.

#### **5.6. Изучение способности трансформированного штамма возбудителя черной бактериальной пятнистости к выживанию в почве**

Мы предположили, что маркирование возбудителя флуоресцентной меткой может дать новые данные о сроках выживания патогена в почве.

Для проведения эксперимента 100 мл бактериальной суспензии штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP в концентрации  $10^8$  КОЕ/мл добавляли к 10 кг почвы. Раз в месяц отбирали пробы почвы на различной глубине. Один грамм почвы каждого образца добавляли к 10 мл стерильной воды, хорошо смешивали, отстаивали 3 минуты, отбирали с поверхности 100 мкл и высевали в чашки Петри на среду YDC с добавлением тетрациклина (20 мг/л) и циклогексимида (200 мг/л) в 3 повторностях. Чашки Петри выдерживали 2-3 дня в термостате при 27°C и просматривали в ультрафиолете на наличие колоний с зеленой флуоресценцией.

При микробиологическом анализе через месяц после внесения бактерий колонии патогена были обнаружены во всех горизонтах почвы. Через 2 и 3 месяца после интродукции не было выявлено колоний патогена.

Таким образом, установлено, что срок выживания возбудителя черной бактериальной пятнистости в почве составляет менее 2 месяцев.

## ГЛАВА VI. ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ ПРИЕМОВ ЗАЩИТЫ ТОМАТА ОТ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА И ЧЕРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ

### 6.1. Испытание бактерицидного действия препаратов *in vitro*

Согласно описаниям производителей препараты нарцисс К, лариксин и бион вызывают у растения повышение неспецифической устойчивости к болезням. Для доказательства отсутствия прямого ингибирования возбудителей бактериозов томата проводили эксперимент *in vitro*. Для этого в питательную среду YDC добавляли выше указанные препараты в рекомендованных рабочих концентрациях. Испытывали бион в концентрации 100 мг/л, 200 мг/л, 300 мг/л, лариксин 150 мкл/л и нарцисс С 5 мл/л. Контрольный вариант – среда без добавления препаратов. Измеряли диаметр колоний патогенов на 5-е сутки.

Результаты показали, что ни один из испытанных препаратов не обладал бактерицидным действием по отношению к двум возбудителям бактериозов томата.

### 6.2. Испытание препаратов против черной бактериальной пятнистости

В условиях искусственного заражения проводили оценку эффективности биона (0,02%), нарцисса (0,5%), гамаира Ж (2%) и лариксина (0,015%) Результаты показали, что только 0,02%-ный бион статистически достоверно снижал развитие черной бактериальной пятнистости.

С целью определения оптимальной стратегии использования биона в экспериментах на фоне искусственного заражения оценивали его эффективность при различных сроках и способах применения.

Бион в концентрации 0,02% применяли за 2,4, 6 дней до инокуляции, одновременно с инокуляцией и через 2 дня после инокуляции. Использовали 2 метода внесения препарата: опрыскивание ручным опрыскивателем и полив под корень в норме 100 мл под 1 растение. Через 10 дней после инокуляции проводили учет пораженности путем подсчета числа некрозов на каждом растении.

Полученные результаты указывают на то, что при всех испытанных сроках применения, как при поливе, так и при опрыскивании бион обеспечивал достоверное снижение числа некрозов по сравнению с контролем (табл. 5).

Максимальная биологическая эффективность обеспечивалась при применении биона за 2-6 дней до инокуляции. Однако и использование препарата через 2 суток после инокуляции приводило к снижению в 2 раза числа некрозов, по сравнению с контролем. Сравнение опытных данных по фактору «способ применения» не выявил существенных различий между поливом и опрыскиванием по критерию Дункана. Наиболее практически пригодным методом является метод опрыскивания.

Таблица 5

Развитие черной бактериальной пятнистости томата на фоне искусственного заражения при различных способах применения 0,02%-ного биона (некрозов/лист)

Время обработки	Способ применения	
	опрыскивание	полив
2 дня до инокуляции	14,9 a	20,3 a
4 дня до инокуляции	12,3 a	19,6 a
6 дня до инокуляции	23,4 ab	18,4 a
Одновременно с инокуляцией	52,6 c	62,7 b
2 дня после инокуляции	40,8 bc	51,2 b
Контроль – без обработки	104,7 d	104,7 c

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о высокой биологической эффективности опрыскивания томата 0,02%-ным бионом против черной бактериальной пятнистости.

### **6.3. Оценка эффективности различных препаратов в защите томата от бактериального рака**

В системе защиты томата от бактериального рака наряду с профилактическими мероприятиями весьма перспективным представляется использование биологических препаратов на основе антибиотиков. Для этой цели мы испытывали фитолавин и фитоплазмин производства ООО «Фармбиомед».

Рассаду томата в стадии 3-4 листьев инокулировали уколом препаративной иглы, смоченной в бактериальной суспензии в пазуху 1-го и 2-го листа. Фитоплазмин (0,3%) и фитолавин (0,2%) вносили двумя методами: опрыскиванием и поливом. Испытывали 7 вариантов: однократный полив, двукратный полив, однократное опрыскивание, двукратное опрыскивание, однократные опрыскивание + полив, двукратные опрыскивание+полив, контроль (без обработки). Первое внесение препаратов проводили через день после инокуляции, а второе - через неделю. Расход рабочей жидкости препаратов при обоих методах внесения составлял 40 мл/растение. Учет пораженности растений проводили по 5-ти балльной шкале.

При всех вариантах обработок балл поражения растений был существенно ниже по сравнению с контролем (табл. 6). Для фитоплазмона наиболее эффективным были однократный и двукратный поливы. В варианте с фитолавином наиболее эффективным были двукратный полив + двукратное

опрыскивание. В наилучших вариантах биологическая эффективность обработок составляла 57-64%.

Таблица 6

Пораженность томата бактериальным раком при различных схемах применения биопрепаратов

Вариант	Фитолавин, 0,2%		Фитоплазмин, 0,3%	
	Балл поражения	Биологическая эффективность, %	Балл поражения	Биологическая эффективность, %
Опрыскивание 1х	2,74 d	21,81	2,26 ab	35,57
Опрыскивание 2х	2,09 bc	40,61	2,11 ab	39,93
Полив 1х	2,35 bc	36,24	1,48 a	57,72
Полив 2х	2,34 bc	33,23	1,49 a	57,39
Опрыскивание + полив 1х	1,78 ab	49,33	2,67 b	23,82
Опрыскивание + полив 2х	1,25 a	64,43	2,01 ab	42,62
Контроль – без обработки	3,51 e	-	3,51 c	-

В другом эксперименте оценивали эффективность ряда биопрепаратов и индукторов устойчивости в защите томата от бактериального рака.

Бион применяли за 3 дня до инокуляции, остальные препараты – за сутки до инокуляции.

Опрыскивание опытных растений лариксином и нарциссом приводило к достоверному снижению балла поражения бактериальным раком по сравнению с контролем (табл. 7).

Таблица 7

Балл поражения томата бактериальным раком

Вариант обработки	Статистические группы		
	1	2	3
Лариксин, 0,015%	1,15		
НарцисС, 0,5%	1,40	1,40	
Гамаир Ж, 2%		1,82	1,82
Бион, 0,02%			1,97
Контроль – без обработки			2,17

Наилучший результат показал лариксин (0,015%), снизивший средний балл поражения заболеванием на 47%. Интересно, что бион, показавший хорошие

результаты в борьбе с *X.vesicatoria*, не оказал достоверного влияния на поражение томата бактериальным раком.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана мультиплексная тест-система для чувствительной и специфичной диагностики возбудителей бактериального рака и черной бактериальной пятнистости в семенах томата методом ПЦР.

2. Штаммы возбудителей бактериозов томата различались по серологическим свойствам. Нижний порог чувствительности ИФА при диагностике возбудителя черной бактериальной пятнистости томата составлял  $4 \times 10^4$  клеток в 1 мл, а возбудителя бактериального рака –  $10^6$  клеток в 1 мл.

3. Оптимальным вариантом подготовки проб при анализе семенной инфекции являлось замачивание семян при 4°C на 6 часов в фосфатно-солевом буфере pH 7,2 с последующим встряхиванием на шейкере в течение 15 минут при комнатной температуре.

4. Методом электропорации с использованием плазмиды рНС60 содержащей ген GFP была проведена трансформация возбудителя черной бактериальной пятнистости томата. Генетически трансформированный штамм *X. vesicatoria* не отличался от исходного по скорости роста на искусственной питательной среде и патогенным свойствам.

5. Показана принципиальная возможность экспресс – оценки активности бактерицидов путем измерения интенсивности флуоресценции зеленого флуоресцентного белка у трансформированного штамма фитопатогена.

6. На основе оригинальной методики с использованием семян томата инокулированных трансформированным штаммом *X. vesicatoria* 1111/BGFP проведено сравнительное изучение биологической эффективности нескольких биопрепаратов при обработке семян. Наилучший результат показал фитолавин.

7. Период эпифитного выживания штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP на листьях томата, перца, баклажана, капусты и огурца не превышал 5 недель. Причем виды растений-хозяев не обладали преимуществом по способности поддерживать эпифитное сохранение по сравнению с нехозяевами. Срок выживания штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP в нестерильной почве составлял менее 2 месяцев.

8. Бион в концентрации 0,02% существенно снижал развитие на листьях томата черной бактериальной пятнистости. Максимальная биологическая эффективность (80-88%) достигалась при обработках за 2-6 дней до инокуляции. Методы внесения препарата (полив либо опрыскивание) не влияли на биологическую эффективность.

9. Биопрепараты фитолавин 0,2% и фитоплазмин 0,3% существенно снижали степень поражения растений бактериальным раком, как при опрыскивании, так и при поливе. Максимальный эффект у фитоплазмина установлен при поливе под корень, а у фитолавина при сочетаниях полива с опрыскиванием. В наилучших вариантах биологическая эффективность обработок составляла 57-64%.

10. Среди испытанных препаратов (нарцисс, лариксин, гамаир, бион) опрыскивание опытных растений 0,015%-ным лариксином и 0,5%-ным нарциссом приводило к достоверному снижению балла поражения бактериальным раком по сравнению с контролем. Лучшим вариантом было опрыскивание 0,015%-ным лариксином, биологическая эффективность обработки составила 47%.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для диагностики зараженности семян томата бактериозами рекомендуется использовать усовершенствованные методики мультиплексной ПЦР и пробоподготовки для ИФА.

2. При лабораторном скрининге препаратов против черной бактериальной пятнистости томата рекомендуется использовать штамм *X.vesicatoria* с геном GFP.

3. Опрыскивание томата 0,02%-ным бионом против черной бактериальной пятнистости рекомендуется включить в программу регистрационных испытаний.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Мотамеди Шаламзари А. Оценка активности бактерицидов с использованием генетически модифицированного штамма возбудителя черной бактериальной пятнистости томата / Мотамеди Шаламзари А., Джалилов Ф.С., Карлов Г.И. // Известия ТСХА. 2010. Вып.2. С.52-58.
2. Мотамеди Шаламзари А. Диагностика возбудителя черной бактериальной пятнистости в семенах томата методом иммуноферментного анализа / Мотамеди Шаламзари А., Мазурин Е.С., Джалилов Ф.С. // Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы. II Международная научно-практическая конференция (2-4 августа 2010 г.). М.: Изд-во ВНИИССОК, 2010. Т.2. С.404-409.