



УДК 579.64, 632.3

DOI 10.25230/conf12-2023-89-93

**ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИФА В ДИАГНОСТИКЕ
ВОЗБУДИТЕЛЯ УГЛОВАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ ФАСОЛИ
PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV. *PHASEOLICOLA***

Игнатъева И.М., Каримова Е.В.

Всероссийский центр карантина растений ФГБУ «ВНИИКР»
babiraignirmi@ya.ru

Возбудитель угловатой пятнистости фасоли *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* является опасным бактериальным фитопатогеном зернобобовых культур. Растущие урожаи сои и гороха в Российской Федерации и во всем мире требуют надежных диагностических методов выявления бактериоза. Цель исследования состояла в апробации метода иммуноферментного анализа (ИФА) и оценке показателя аналитической чувствительности



коммерческого набора, демонстрирующего свою эффективность при диагностике фитопатогена в мировой практике. После проверочных испытаний предложенный метод может быть использован в качестве одного из официальных подтверждающих тестов наличия живых клеток бактерий в растительном материале зернобобовых культур при диагностике в лабораториях сельскохозяйственного профиля.

Ключевые слова: *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, угловатая пятнистость фасоли, ИФА, аналитическая чувствительность.

Введение. Возбудитель угловатой пятнистости фасоли *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (далее *P. s. phaseolicola*) – вредоносный фитопатоген таких значимых для сельского хозяйства зернобобовых культур, как соя, горох, нут, фасоль. Даже низкие уровни первичной инфекции возбудителя угловатой пятнистости фасоли при подходящих погодных условиях из-за стремительного распространения могут привести к потере урожая вышеперечисленных культур [1]. Бактериальная инфекция сохраняется в семенах и пораженных растительных остатках до их разложения. В почве погибает быстро. В растение может проникать через устьица и ранки. Бактерии локализуются преимущественно между семенной кожурой и семядолями, а также на поверхности семян [2].

Импорт зерна бобовых на семенные цели – основной путь распространения заболевания. По данным EPPO Global Database, патоген *P. s. phaseolicola* включен в перечни карантинных вредных организмов в таких странах, как Бахрейн, Израиль, Китай, Парагвай и Уругвай [3]. По данным Centre for Agriculture and Biosciences International [4], возбудитель угловатой пятнистости фасоли присутствует в Российской Федерации, что может ограничить экспортный потенциал зернобобовых культур, в особенности сои и гороха.

Экспортные поставки семян сои в 2021/22 сельскохозяйственном году составили около 1,5 млн тонн. Российская соя большей частью экспортируется в Китай – его доля 85 %, почти в 4 раза увеличился экспорт в Турцию [5]. Россия является вторым в мире экспортером гороха после Канады, опережая такие страны, как США, Франция и Украина, и обеспечивая порядка 10-11 % всех мировых поставок этой культуры [6]. Экспорт гороха из России в 2021/22 сельскохозяйственном году увеличился на 65 % и составил рекордные 1,4 млн тонн. Продукция поднялась с седьмого на пятое место в ТОП-10 экспортируемых продуктов АПК. Доля в экспорте также стала рекордной – 2,8 %. На протяжении всего сезона – 2021/22 экспорт гороха опережал темпы предыдущего года [7]. На данное время ведутся фитосанитарные согласования по экспорту гороха в Китай.

Одним из способов контроля возбудителя угловатой пятнистости фасоли является использование сертифицированных, свободных от патогена семян. Выявление *P. s. phaseolicola* в экстрактах семян затруднено из-за наличия в них сапротрофных бактерий и требует правильного подхода к выбору диагностических протоколов [8–10]. Наряду с разработкой быстродействующих ПЦР-тестов актуальными остаются и серологические методы идентификации бактерий, преимуществом которых являются сроки исследований. Положительный результат исследования дает представление не только о наличии фитопатогена в растительных экстрактах, но и о жизнеспособности бактериальных клеток. В мировой практике ИФА используют в качестве серологического метода идентификации бактериальных фитопатогенов в экстрактах растений.

Целью данного исследования стала рекомендация внедрения метода ИФА в российский диагностический протокол. Для осуществления этой цели были поставлены следующие задачи: апробировать метод ИФА и оценить его аналитическую чувствительность.

Материалы и методы. В лаборатории бактериологии сотрудниками Всероссийского центра карантина растений была проведена апробация метода ИФА с использованием коммерческого набора Loewe (Biochemica GmbH, Германия). Испытания проводились на



микропланшетном фотометре «Multiscan FC» (Thermo Scientific, США). В качестве материала исследования использовали экстракты семян гороха с разным уровнем зараженности штаммом *P. s. phaseolicola* (CFBP 1390). Экстракцию семян проводили методом замачивания. Для этого навески семян помещали в подходящую емкость и заливали фосфатным буфером (PB) так, чтобы слой семян полностью покрывался буфером, и выдерживали в течение ночи при температуре от 4 до 8 °С. Жидкую часть переносили в центрифужную пробирку и концентрировали при 10000 об/мин и температуре от 4 до 10 °С в течение 10 мин. Супернатант осторожно удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS). Полученный семенной экстракт переносили в стерильную микропробирку типа «Эшпендорф».

Для определения показателя аналитической чувствительности (далее АЧ) метода ИФА приготавливали стандартную базовую суспензию *P. s. phaseolicola* с концентрацией патогена 10^7 КОЕ/мл. Получали серию десятикратных разведений (8 разведений с различным содержанием фитопатогена), последовательно перенося 100 мкл от предыдущего разведения к последующему – 900 мкл PBS. Далее проводили посев 100 мкл суспензии на чашках Петри на питательной среде для подсчета КОЕ.

После посева приготавливали экстракты гороха с различным уровнем зараженности. Для этого в отдельные пробирки переносили 900 мкл растительного экстракта и добавляли 100 мкл бактериальной суспензии, начиная с базовой с концентрацией 10^7 КОЕ/мл и далее последовательно, заканчивая концентрацией 10^0 КОЕ/мл. Всего получали восемь 10-кратных разведений в двукратной повторности. В качестве положительного контроля применяли бактериальную суспензию с базовой концентрацией 10^6 КОЕ/мл. В качестве отрицательного контроля использовали экстракт гороха, свободный от возбудителя бактериоза. Далее из каждого образца отбирали по 200 мкл для идентификации фитопатогена. После проведения ИФА и подсчета КОЕ определяли показатель АЧ метода ИФА.

Результаты и обсуждение. Диагностические тест-системы различаются по степени взаимодействия реактивов с растительными экстрактами. Для корректной работы диагностического набора необходимо перед первым его использованием проводить оптимизацию метода ИФА. Все результаты такого тестирования, проведенного в лаборатории бактериологии Всероссийского центра карантина растений, представлены в таблице.

Таблица. **Результаты оценки аналитической чувствительности метода ИФА**

Концентрация, КОЕ/мл, серия	Значения экстинкции образца	Интерпретация результатов выявления фитопатогена
0	$3 \cdot 10^7$	Выявлен
	$3 \cdot 10^7$	Выявлен
1	$3 \cdot 10^6$	Выявлен
	$3 \cdot 10^6$	Выявлен
2	$3 \cdot 10^5$	Выявлен
	$3 \cdot 10^5$	Выявлен
3	$3 \cdot 10^4$	Выявлен
	$3 \cdot 10^4$	Не выявлен
4	$3 \cdot 10^3$	Не выявлен
	$3 \cdot 10^3$	Не выявлен
5	$3 \cdot 10^2$	Не выявлен
	$3 \cdot 10^2$	Не выявлен
6	$3 \cdot 10^1$	Не выявлен
	$3 \cdot 10^1$	Не выявлен
7	$3 \cdot 10^0$	Не выявлен
	$3 \cdot 10^0$	Не выявлен
Положительный контроль	5,176	Выявлен
Отрицательный контроль	0,250	Не выявлен



Для определения АЧ метода ИФА были подготовлены образцы экстрактов гороха с различным уровнем зараженности. Результат интерпретировали согласно значению показателя экстинкции антисыворотки к возбудителю *P. s. phaseolicola*, используемой в наборе фирмы Loewe. Результат считали положительными при значении показателя экстинкции 3,000 и более. Результат определения АЧ метода ИФА приведен в таблице.

Пороговые значения экстинкции антисыворотки к возбудителю *P. s. phaseolicola*, используемой в наборе фирмы Loewe, были отмечены при содержании возбудителя 3×10^4 КОЕ/мл. Достоверные положительные результаты аналитической чувствительности метода были достигнуты для образцов, содержащих 10^5 КОЕ/мл *P. s. phaseolicola*. При таком показателе АЧ метода возможна ложноотрицательная интерпретация результата при низких показателях зараженности семян фитопатогеном. В результате апробации ИФА и оценки аналитической чувствительности, метод будет рекомендован в качестве подтверждающего метода выявления и идентификации фитопатогена в клетках растений зернобобовых культур.

Заключение. Оценивая результаты апробации метод ИФА, установлено, что тест можно включить в методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя угловатой пятнистости фасоли *P. s. phaseolicola* в качестве серологического метода, используя набор Loewe (Biochemica GmbH, Германия). При показателе аналитической чувствительности 10^5 КОЕ/мл ИФА будет рекомендован к включению в качестве подтверждающего метода при выявлении и идентификации чистых бактериальных культур возбудителя угловатой пятнистости фасоли, а также может быть использован для определения жизнеспособности клеток возбудителя патогена в экстрактах растительного материала зернобобовых культур в диагностических лабораториях сельскохозяйственного профиля.

Литература

1. Каримова Е.В., Игнатъева И.М. Бактериозы – возбудители болезней зернобобовых культур и разработка методов их диагностики // Карантин растений. Наука и практика. 2018. С. 28–40.
2. Игнатъева И.М., Каримова Е.В. Изучение бактериозов возбудителей болезней зернобобовых культур и разработка методов их диагностики // Современные подходы и методы в защите растений, сборник материалов конференции 12–14 ноября 2018, Екатеринбург. 2018. С. 194–198.
3. EPPO Global Database. Inter-African Phytosanitary Council (IAPSC). Categorization [Электронный ресурс] / EPPO. Электрон. текстовые данн. Режим доступа <https://gd.eppo.int/rppo/IAPSC/categorization> свободный (дата обращения 2021-02-10).
4. *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (halo blight (of beans)) [Электронный ресурс] / CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International). – Электрон. текстовые данн. – Режим доступа <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompndium.44987> платный (дата обращения: 2023-01-20).
5. FEEDLOT. Российский рынок сои в 2022 году: сокращение экспорта и падение цен [Электронный ресурс] / Ценовик. – 2022. – Режим доступа <https://www.tsenovik.ru/articles/obzory-i-prognozy/rossiyskiy-rynok-soi-v-2022-godu-sokrashchenie-eksporta-i-padenie-tsen/> свободный (дата обращения: 25.12.2022).
6. Горох: уверенный рост в Сибири [Электронный ресурс] / Председатель. – Режим доступа <https://predsedatel-apk.ru/rastenievodstvo/goroh-uverennyu-rost-v-sibiri> свободный (дата обращения: 20.07.2021).
7. Зерновые и зернобобовые, экспорт и импорт. Экспорт гороха из России в сезоне-2021/22 составил рекордные 1,4 млн т [Электронный ресурс] / ФГБУ «Центр Агроаналитики». – Режим доступа <https://specagro.ru/news/202208/eksport-gorokha-iz-rossii-v-2021-2022-selkhozgodu-sostavil-rekordnye-14-mln-t> свободный (дата обращения: 15.09.2022).



8. Игнатьева И.М., Каримова Е.В. Применение метода ПЦР-РВ для идентификации возбудителя угловатой пятнистости фасоли *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* в семенах зернобобовых культур // Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых, проводимой в рамках VII Международной конференции «Органическое сельское хозяйство и цели устойчивого развития», посвященной доктору сельскохозяйственных наук Корнею Ивановичу Довбану, Горки, 5 декабря 2019. 2019. С. 28–33.

9. Cho M.S., Jeon Y.H., Kang M.J., Ahn H.I., Baek H.-J., Na Y.W., Choi Y.M., Kim T.S., Park D.S. Sensitive and specific detection of phaseolotoxigenic and nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by TaqMan real-time PCR using site-specific recombinase gene sequences // *Microbiological Research*. 2010. V. 165. P. 565–572.

10. Kurowski C., Remeus P. M.7-023: Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on *Phaseolus vulgaris* (bean) // *International Rules for Seed Testing Annex to Chapter 7: Seed Health Methods: 7-023-2*. 2014.

**EVALUATION OF THE ELISA ANALYTICAL SENSITIVITY IN THE DIAGNOSIS
OF THE PATHOGEN OF THE ANGULAR LEAF SPOT OF BEAN
PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV. *PHASEOLICOLA***

Ignatieva I.M., Karimova E.V.
All-Russian Plant Quarantine Center

The pathogen of angular leaf spot of bean *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* is a dangerous bacterial phytopathogen of leguminous crops. Growing yields of soybean and pea in the Russian Federation and worldwide require reliable diagnosis methods to detect bacterial blight. The purpose of the research was to validate the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method and to evaluate the analytic sensitivity index of a commercial kit demonstrating its effectiveness in phytopathogen diagnostics in the world practice. After validation tests, the suggested method can be used as one of the official tests to confirm the presence of live bacterial cells in the plant material of leguminous crops during diagnostics in agricultural laboratories.

Key words: *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, angular leaf spot of bean, ELISA, analytical sensitivity.