











Защита растений Plant protection

DOI 10.22363/2312-797X-2021-16-3-198-214

УДК 633.491:632.3:57.083

Научная статья / Research article


Разработка новых иммуноаналитических тест-систем для диагностики черной ножки картофеля, вызываемой бактериями *Dickeya* spp.

Ш. Разо^{1,2}  , П.А. Галушка³ , Ю.А. Варицев³ , А.В. Жердев¹ ,
И.В. Сафенкова¹ , Е.Н. Пакина² , Б.Б. Дзантиев¹ 

¹ФИЦ биотехнологии РАН, г. Москва, Российская Федерация

²Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация

³Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха,
Московская обл., п. Красково, Российская Федерация

 1042175063@rudn.ru

Аннотация. Черная ножка картофеля, вызываемая бактериями *Dickeya* spp., является одним из опаснейших бактериозов. Стремительное распространение заболевания на территории России требует новых эффективных диагностических инструментов своевременного выявления инфекции. Получены антисыворотки, специфичные к бактериям *Dickeya* spp. Для поликлональных антител, выделенных из антисывороток, показано высокое сродство к основным видам *Dickeya* spp. (*D. solani*, *D. dianthicola*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. paradisiaca*). На основании наиболее специфичных и аффинных антител разработаны иммуноферментная и иммунохроматографическая тест-системы. Для иммуноферментной тест-системы предел обнаружения *D. solani* составил $0,8 \times 10^5$ кл/мл, *D. dianthicola* — 2×10^4 . Для иммунохроматографической тест-системы, пригодной для применения во внелабораторных условиях, предел обнаружения *D. solani* равнялся 2×10^5 кл/мл, время анализа — 15 минут. При характеристике семенного материала картофеля иммунохроматографическая система подтвердила положительные результаты иммуноферментного тестирования в 75 %, а отрицательные — в 100 % случаев.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ, фитопатогены, черная ножка картофеля, *Dickeya* spp.

Заявление о конфликте интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0104–2019–0021).

© Разо Ш., Галушка П.А., Варицев Ю.А., Жердев А.В., Сафенкова И.В., Пакина Е.Н., Дзантиев Б.Б., 2021



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/1>

Авторы благодарят Н.В. Дренову (Всероссийский центр карантина растений, Московская обл., Россия) за помощь в работе с клеточными культурами.









История статьи:

Поступила в редакцию 16 июня 2021 г. Принята к публикации 23 августа 2021 г.

Для цитирования:

Разо Ш., Галушка П.А., Варицев Ю.А., Жердев А.В., Сафенкова И.В., Пакина Е.Н., Дзантиев Б.Б. Разработка новых иммуноаналитических тест-систем для диагностики черной ножки картофеля, вызываемой бактериями *Dickeya* spp. // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2021. Т. 16. № 3. С. 198—214. doi: 10.22363/2312-797X-2021-16-3-198-214


Development of new immunoanalytical test systems for diagnostics of potato blackleg caused by *Dickeya* spp. bacteria

Shyatesa C. Razo^{1,2}  , Pavel A. Galushka³ ,
Yuri A. Varitsev³ , Anatoly V. Zherdev¹ , Irina V. Safenkova¹ ,
Elena N. Pakina² , Boris B. Dzantiev¹ 

¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, *Moscow, Russian Federation*

²Agrarian and Technological Institute, RUDN University, *Moscow, Russian Federation*

³Russian Potato Research Center, *Moscow region, Russian Federation*

 1042175063@rudn.ru

Abstract. Potato blackleg caused by *Dickeya* spp. bacteria is one of the most important bacterial diseases of potatoes. The rapid spread of this disease in the territory of Russia requires new effective diagnostic tools for the timely detection of infection. To solve this problem, antisera specific to *Dickeya* spp. were obtained. Polyclonal antibodies isolated from antisera have shown high affinity for the main species of *Dickeya* spp. (*D. solani*, *D. dianthicola*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. paradisiaca*). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and lateral flow immunoassay (LFIA) test systems have been developed based on specific and high affinity antibodies that were obtained. For ELISA, the detection limit was 0.8×10^5 cells/mL for *D. solani* and 2×10^4 cells/mL for *D. dianthicola*. For LFIA, suitable for use in non-laboratory conditions, the detection limit of *D. solani* was 2×10^5 cells/mL and the analysis time was 15 minutes. When testing potato seed material, LFIA test system confirmed positive results of ELISA determination in 75 % of samples, and negative — in 100 % of samples.

Keywords: Enzyme linked immunosorbent assay, lateral flow immunoassay, phytopathogens, potato blackleg, *Dickeya* spp.

Conflicts of interest. The authors declared that they have no conflict of interest.

Acknowledgments. The authors are grateful to Drenova N.V. (Russian Plant Quarantine Center, Moscow Region, Russia) for help in working with cell cultures. The research was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. 0104–2019–0021).

Article history: Received: 16 June 2021. Accepted: 23 August 2021

For citation:

Razo SC, Galushka PA, Varitsev YA, Zherdev AV, Safenkova IV, Pakina EN, Dzantiev BB. Development of new immunoanalytical test systems for diagnostics of potato blackleg caused by *Dickeya* spp. bacteria. *RUDN*

Введение

Черная ножка картофеля, вызываемая бактериями *Dickeya* spp., — одно из опаснейших и агрессивно развивающихся заболеваний картофеля [1]. Данная болезнь может приводить к задержке роста, увяданию, хлорозу листьев, некрозу нескольких тканей, снижению урожайности, а иногда и к гибели растений [2]. Заболевание обнаружено на территории РФ сравнительно недавно, первые упоминания относятся к 2009 г. [3]. Однако уже к 2013 г. на *Dickeya* spp. приходилось до 28 % зараженного семенного материала при ПЦР тестировании [4] и до 24 % — при скрининге иммуноферментными системами [5]. Существует несколько факторов, которые вызывают рост распространенности болезней картофеля данной этиологии [6–8]. Прежде всего это климатический фактор — повышение температуры как следствие глобального потепления положительно влияет на рост и развитие бактерий *Dickeya* spp. Вторым фактором является популяционная устойчивость бактерий *Dickeya* spp. относительно других видов патогенов. Так, при анализе часто выявляются смешанные инфекции, включающие *Dickeya* spp. как один из компонентов комплексного бактериоза. И третий важнейший фактор — способность бактерий *Dickeya* spp. долгое время находиться в виде латентной инфекции, проявляясь лишь в определенных агроклиматических условиях. Скрытое инфицирование семенного картофеля является частой причиной распространения черной ножки во всем мире [9]. Таким образом, черная ножка картофеля, вызываемая бактериями *Dickeya* spp., является значительной угрозой для производства картофеля на территории РФ.

На сегодняшний день выбраковка зараженных растений на ранних этапах болезни — наиболее эффективный способ предотвратить или минимизировать урон от черной ножки. Для этого необходим постоянный мониторинг инфицирования семенного материала. Среди диагностических инструментов, решающих эту задачу, выделяют две группы методов. Первая группа основана на распознавании и дальнейшей амплификации ДНК фрагмента бактерии. Это прежде всего ПЦР-методы, описанные в [10] и представленные зарубежными и отечественными компаниями в виде коммерчески доступных тест-систем. Высокая чувствительность — основное преимущество ПЦР-методов, но их ограничение — строгие требования к лабораторному оборудованию и условиям проведения анализа. Вторую группу составляют иммунохимические методы, основанные на распознавании антигенных детерминант на поверхности бактериальных клеток. В этой категории наиболее распространенными и коммерчески доступными являются иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА). В обоих случаях распознавание бактерии происходит благодаря специфическим антителам, которые взаимодействуют с бактерией или фрагментами, содержащими ее антигенные детерминанты (полисахариды, белки). Как правило, чувствительность иммуноаналитических методов уступает ПЦР диагностике, но минимальный набор оборудования для ИФА — всего лишь термостат, холодильник и набор автоматических пипеток. Для ИХА оборудование не требуется, весь анализ занимает 10...15 минут

и может быть проведен в полевых условиях. Для детекции *Dickeya* spp. доступны коммерческие ИФА наборы зарубежных производителей Loewe и Agdia и ИФА набор, производимый Федеральным исследовательским центром картофеля им. А.Г. Лорха (ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха). Среди коммерчески доступных иммунохроматографических тест-полосок доминируют те же зарубежные компании; имеется единственный отечественный производитель (www.тест-картофель.рф), работающий в тесном научном сотрудничестве с ФИЦ Биотехнологии РАН и ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха. На сегодняшний день производство отечественных иммуноаналитических тест-систем по объемам уступает зарубежным конкурентам, что не позволяет проводить мониторинг инфицирования на регулярной основе на всех этапах производства картофеля. Одним из препятствий на пути к разработке новых иммунодиагностических систем является ограниченность иммунореагентов. Расширение иммунореагентной базы за счет появления новых специфичных антител будет способствовать разработке новых иммуноаналитических тест-систем.

Основная **цель исследования** — получение новых поликлональных антител, специфичных к *Dickeya* spp., и разработка на их основе иммуноаналитических тест-систем (ИФА, ИХА).

Материалы и методы исследования

Бактериальные изоляты. *D. solani* (DSM 28711), *D. dianthicola* (DSM 18054), *D. zea* (DSM 18068), *D. dadantii* subsp. *dadantii* (DSM 18020), *D. paradisiaca* (DSM 18069), *D. fangzhongdai* (DSM 101947), *D. chrysanthemi* (DSM 4610), *Pectobacterium atrosepticum* (DSM 18077) и *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (DSM 30168) получены из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Германия), хранение и культивирование полученных изолятов на территории РФ проводили во Всероссийском центре карантина растений (Московская обл., Россия). Изоляты *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms204, Cms M1, Cms M2) получены из Всероссийского центра карантина растений.

Реагенты. В работе использовали конъюгаты пероксидазы хрена с козьими антителами против иммуноглобулинов кролика (Имтек, Россия), Тритон X-100, Твин-20 (Химмед, Россия), бычий сывороточный альбумин (БСА), однокомпонентный субстратный раствор для пероксидазы, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ) и пероксид водорода (НВО Иммунотех, Россия), золотохлористоводородную кислоту (HAuCl_4), азид натрия (Sigma-Aldrich, США). Все использованные реагенты (соли, кислоты и растворители) были химической чистоты.

Для проведения иммуноферментного анализа использовали 96-луночные прозрачные микропланшеты (Corning Costar, США). Все растворы были приготовлены с использованием воды Milli-Q (Millipore, США).

В работе использовали иммунохроматографические мембраны, приобретенные в Advanced Microdevices (Индия): нитроцеллюлозные мембраны CNPC-12 μ , стекловолоконные мембраны для конъюгата (PT-R5), впитывающие мембраны для проб (GFB-R4) и конечные абсорбирующие мембраны (AP045).

Получение антисывороток и выделение поликлональных антител. Для получения антисывороток проводили иммунизацию кроликов породы шиншиллы 72-часовой культурой бактерий *D. solani* из расчета 10^9 клеток на инъекцию. При иммунизации с недельными интервалами использовали неполный адъювант Фрейнда, 1-я и 6-я инъекции — подкожные, со 2-й по 5-ю инъекции — внутримышечные. Забор крови проводили через 7...14 дней после последней инъекции. Иммуноглобулины класса G (IgG) выделяли из антисыворотки с помощью осаждения насыщенным раствором сульфата аммония и аффинной хроматографией на колонке с белком А-Сефароза CL-4B (Sigma-Aldrich, США).

Получение конъюгатов антител. Для ИФА антитела конъюгировали с пероксидазой хрена, используя перйодатный метод синтеза с модификациями, описанными в [11].

Для ИХА антитела конъюгировали с наночастицами золота (НЧЗ). Предварительно методом цитратного восстановления синтезировали НЧЗ с диаметром 20 нм [12]. Затем НЧЗ конъюгировали с антителами (IgG), специфичными к *D. solani*, методом физической адсорбции согласно протоколу, описанному в [13].

Приготовление экстракта клубней картофеля. Для анализа готовили экстракт по следующей технологии: из каждой партии клубней картофеля (200 клубней) вырезали конусы сосудистой ткани 3...5 мм в диаметре. Пробы помещали в колбу, экстрагировали бактерии в течение 16...24 ч стерильным 50 мМ фосфатным буфером (ФБС), pH 7,0, и удаляли фильтрацией крупные частицы. Полученный экстракт далее центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g, 4 °С, после удаления супернатанта осадок ресуспендировали в буфере для проб и использовали для анализа.

Характеристика сывороток и выделенных антител методом иммуноферментного анализа. Бактерии *D. solani* 28711 (1×10^8 кл./мл в ФБС) сорбировали в лунки микропланшета в течение 2 ч при 37 °С. Не связавшиеся реагенты удаляли трехкратной промывкой лунок ФБС с добавлением 0,05 % Тритон X-100 (ФБС-Т), используя Thermo Electron WellWash 4 MK2 (Thermo Scientific, США). После отмывки в лунки вносили антисыворотки (разбавление от 10^3 до 10^8 в ФБС-Т) или выделенные IgG (от 0,1 до 300 нг/мл в ФБС-Т) инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Микропланшет трижды отмывали ФБС-Т, после чего добавляли конъюгат пероксидазы с козьими антителами против иммуноглобулинов кролика (разведение коммерческого препарата 1:5000 в ФБС-Т), инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После отмывки в лунки микропланшета вносили 100 мкл субстратной смеси, содержащей ТМБ и H_2O_2 , и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (OP_{450}) с помощью планшетного спектрофотомера Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments, Австрия). Для обработки полученных данных использовали компьютерную программу Origin Pro 9.0 (Origin Lab, США). Титром антисыворотки считали ее разбавление, сигнал в ИФА для которого равен сумме среднего значения OP_{450} и трех стандартных отклонений для сыворотки не иммунизированного животного (отрицательный контроль).

Проведение сэндвич иммуноферментного анализа. ИФА на основе полученного конъюгата антител с пероксидазой проводили по методике, разработанной в ФИЦ

картофеля им. А.Г. Лорха для возбудителей бактериальных болезней картофеля и описанной в [11].

Получение иммунохроматографических тест-полосок. Иммунохроматографические тест-полоски собирали в сэндвич формате по схеме и протоколу, описанным в [14]. В тестовую зону наносили поликлональные антитела, специфичные к *D. solani* (1 мг/мл в ФБС с 5 % глицерина и 0,03 % NaN_3), в контрольную зону наносили стафилококковый белок А (0,5 мг/мл в ФБС с 5 % глицерина и 0,03 % NaN_3). Конъюгат НЧЗ с антителами наносили на стекловолоконную мембрану (ширина 5 мм) из расчета 1,6 мкл на мм. Мембраны сушили при 37 °С не менее 6 ч, после чего собирали мульти-мембранный композит, состоящий из впитывающей мембраны для пробы, мембраны с конъюгатом, нитроцеллюлозной мембраны и впитывающей мембраны. Для получения иммунохроматографических тест-полосок (ширина 3 мм) мульти-мембранный композит нарезали с использованием автоматической гильотины Index Cutter-1 (A-Point Technologies, США). Тест-полоски упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги, содержащие силикагель, и хранили при комнатной температуре.

Проведение иммунохроматографического анализа. Нижний край тест-полоски погружали непосредственно в анализируемую пробу (буфер или экстракт) и через 15 мин визуально оценивали результат. Появление двух окрашенных полос свидетельствовало о наличии инфекции в пробе; одна полоса в контрольной зоне означала отсутствие бактерий в пробе или их наличие, но в концентрации ниже предела обнаружения тест-полосок.

Результаты исследования и обсуждения

Характеристика полученных антисывороток и выделенных IgG. В результате иммунизации кроликов получены по четыре антисыворотки от двух кроликов, взятые через 7 и 14 дней после окончания инъекции. Специфичность и титр сывороток определяли методом непрямого ИФА. Результаты приведены на рис. 1. Из рис. 1, а видно, что титры полученных антисывороток отличаются незначительно, максимальный титр (1×10^7) показали две сыворотки (№ 1, 2). Неспецифический титр антисывороток относительно близкородственного патогена — бактерии *P. atrosepticum*, также вызывающей симптомы черной ножки, был на два порядка ниже специфического (рис. 1). При этом неспецифическое связывание антисывороток № 1 и 2 было ниже, чем антисывороток № 3 и 4. В соответствии с полученными результатами для дальнейшей работы IgG были выделены из антисывороток № 1 и 2.

Для выделенных из сывороток методом ИФА антител подтверждена высокая антиген-связывающая активность относительно бактерий *D. solani* (рис. 2). Антитела распознавали клетки *D. solani*, сорбированные в лунках микропланшета при концентрации 1 нг/мл и выше. Полученные концентрационные зависимости (рис. 2) говорят о присутствии в препарате выделенных IgG значительного количества высокоаффинных молекул. Оба выделенных препарата антител перспективны для разработки иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем. Для дальнейшей работы использовали антитела, выделенные из антисыворотки № 1.

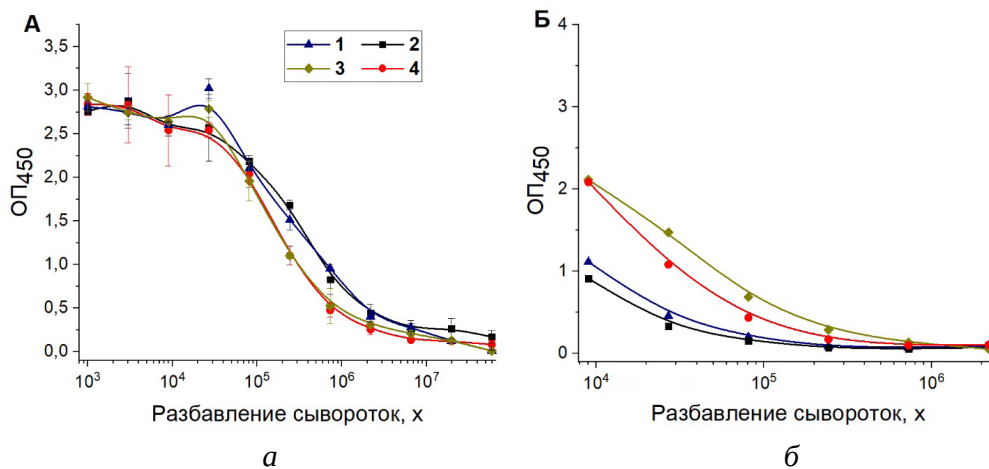


Рис. 1. Сравнение антисывороток, специфичных к *D. solani*, методом ИФА при сорбции на микропланшете бактерий *D. solani* (а) и *P. atrosepticum* (б): 1–4 – номера сывороток

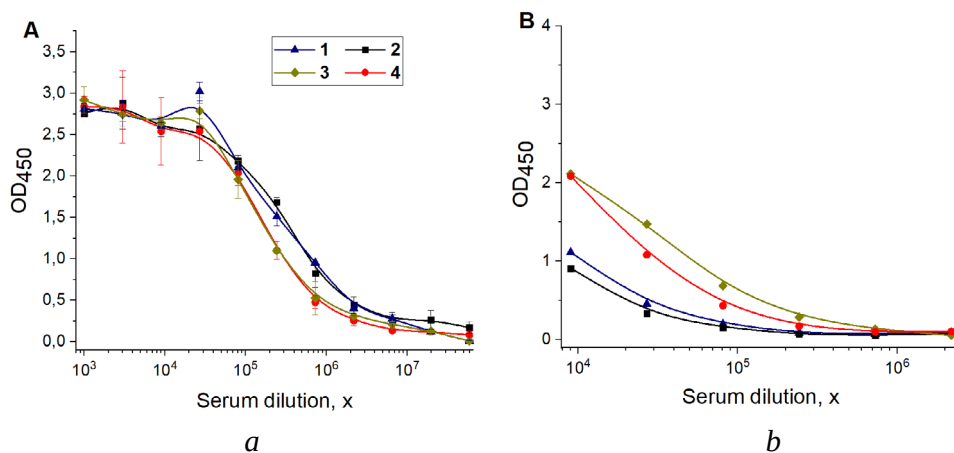


Fig. 1. Comparison of antisera specific to *D. solani* through ELISA, with absorption of *D. solani* bacteria (a) and *P. atrosepticum* (b) on a microplate: 1–4 – numbers of serum

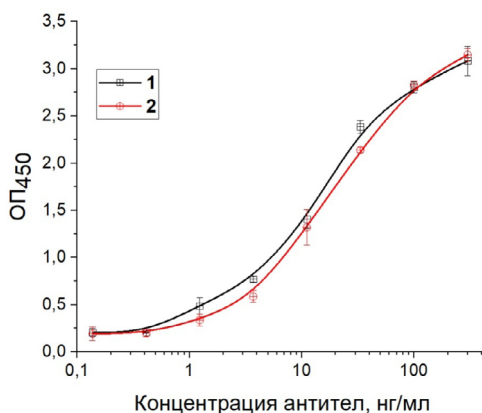


Рис. 2. Концентрационные зависимости антител, полученные методом ИФА, для клеток *D. solani*, сорбированных в лунках микропланшета в концентрации 1×10^8 кл./мл: 1, 2 – номера сывороток, из которых выделены антитела

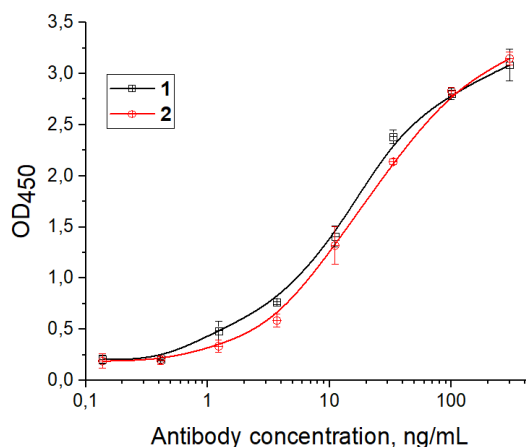


Fig. 2. Concentration dependences of antibodies specific to *D. solani* cells through ELISA, absorbed in a microplate at a concentration of 1×10^8 cells/mL: 1, 2 — numbers of serum, from which antibodies were purified

Применение полученных антител в иммуноаналитических тест-системах.

Сэндвич формат анализа — наиболее эффективное решение для иммунодетекции бактерий, являющихся поливалентными антигенами [14]. Поэтому мы использовали выделенные антитела в двух вариантах: 1) как захватывающие, сорбируя их в лунках иммуноферментного микропланшета и в тестовой зоне иммунохроматографической тест-полоски; 2) как проявляющие, выявляя бактерии конъюгатами антител с пероксидазой в ИФА и конъюгатами антител с НЧЗ в ИХА. В обеих тест-системах (иммуноферментной и иммунохроматографической) в присутствии бактерии формируется тройной комплекс [захватывающие антитела] — [бактерии] — [проявляющий конъюгат антител]. Обе системы тестировали с использованием панели коллекционных бактерий, включавшей 7 бактерий рода *Dickeya* и 16 бактерий, относящихся к растительным патогенам родов *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*. В результате ИФА и ИХА показали положительные результаты для всех бактерий рода *Dickeya* (табл. 1). Несмотря на то, что антитела были получены при иммунизации клетками *D. solani*, эффективность распознавания таких видов, как *D. dianthicola*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii* subsp. *dadantii*, *D. paradisiaca*, не уступала иммуногенному виду. Только для *D. zeaе* сигнал был в 7 раз слабее относительно других видов *Dickeya*. Более того, сравнение пределов обнаружения показало, что тест-система выявляет в 4 раза меньшее количество клеток (2×10^4 кл./мл) *D. dianthicola*, чем *D. solani* (рис. 3). Предел иммунохроматографического обнаружения клеток *D. solani* составил 2×10^5 кл./мл (рис. 4), что незначительно уступает иммуноферментной системе, однако соответствует требованиям ГОСТ [15] к чувствительности иммуноаналитических методов. При этом время анализа с использованием иммунохроматографической тест-системы — 15 мин, в отличие от 5–6 ч для иммуноферментной.

Таблица 1

Результаты тестирования чистых культур бактерий (1×10^7 кл./мл) ИФА и ИХА тест-системами

№	Коллекц. номер Института карантина растений	Бактерия	Тест-система		
			ИФА		ИХА
			ОП ₄₅₀	Результат	Результат
1	0039	<i>Ralstonia solanacearum</i> , паца 3, bv.2	0	–	–
2	0040	<i>Ralstonia solanacearum</i> , паца 3, bv.2	0	–	–
3	0141	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	0	–	–
4	0142	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	0	–	–
5	0143	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	0	–	–
6	0144	<i>Dickeya dianthicola</i>	2,41	+	+
7	0235	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Sepedonicus</i>	0	–	–
8	0239	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0	–	–
9	0240	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0	–	–
10	0222	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0	–	–
11	0223	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0	–	–
12	0327	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	0	–	–
13	0328	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	0	–	–
14	0329	<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	0	–	–
15	0330	<i>Pectobacterium cacticida</i>	0	–	–
16	0331	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	2,46	+	+
17	0332	<i>Dickeya dadantii</i> subsp. <i>Dadantii</i>	1,89	+	+
18	0333	<i>Dickeya paradisiaca</i>	2,16	+	–
19	0334	<i>Dickeya zeae</i>	0,28	+	+
20	0335	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	0	–	–
21	0336	<i>Dickeya dadantii</i> subsp. <i>dieffenbachiae</i>	2,19	+	+
22	0353	<i>Dickeya solani</i>	1,98	+	+

Table 1

Results of testing pure cultures of bacteria (1×10^7 cells/mL) through ELISA and LFIA test systems

№	Collection number of Russian Plant Quarantine Center	Bacterium	Test system		
			ELISA		LFIA
			OD ₄₅₀	Result	Result
1	0039	<i>Ralstonia solanacearum</i> , паца 3, bv.2	0	–	–
2	0040	<i>Ralstonia solanacearum</i> , паца 3, bv.2	0	–	–
3	0141	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	0	–	–
4	0142	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	0	–	–
5	0143	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	0	–	–
6	0144	<i>Dickeya dianthicola</i>	2.41	+	+
7	0235	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Sepedonicus</i>	0	–	–

№	Collection number of Russian Plant Quarantine Center	Bacterium	Test system		
			ELISA		LFIA
			OD ₄₅₀	Result	Result
8	0239	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0	–	–
9	0240	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0	–	–
10	0222	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0	–	–
11	0223	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0	–	–
12	0327	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	0	–	–
13	0328	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	0	–	–
14	0329	<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	0	–	–
15	0330	<i>Pectobacterium cacticida</i>	0	–	–
16	0331	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	2.46	+	+
17	0332	<i>Dickeya dadantii</i> subsp. <i>Dadantii</i>	1.89	+	+
18	0333	<i>Dickeya paradisiaca</i>	2.16	+	–
19	0334	<i>Dickeya zeae</i>	0.28	+	+
20	0335	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	0	–	–
21	0336	<i>Dickeya dadantii</i> subsp. <i>dieffenbachiae</i>	2.19	+	+
22	0353	<i>Dickeya solani</i>	1.98	+	+

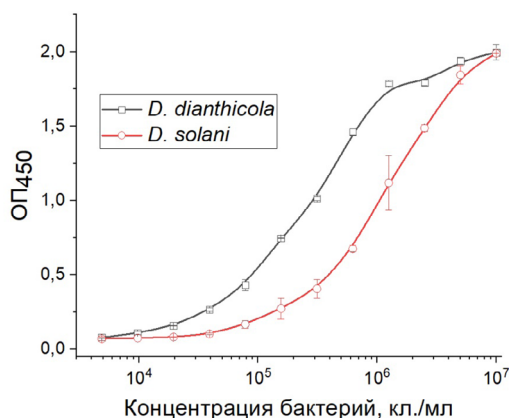


Рис. 3. Концентрационные зависимости иммуноферментного анализа проб, содержащих разное количество клеток *D. solani* и *D. dianthicola*

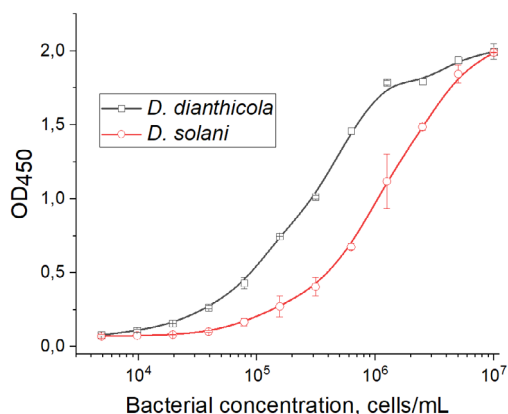


Fig 3. Concentration dependences obtained through ELISA from samples with different bacterial concentration of *D. solani* and *D. dianthicola*

Для всех бактерий, не относящихся к роду *Dickeya*, отсутствовали аналитические сигналы обеих тест-систем (см. табл. 1). Здоровый растительный материал (клубни, листья) также не давал фоновых сигналов. Таким образом, тест-системы на основе полученных поликлональных антител могут быть использованы для выявления инфекций, вызываемых бактериями *Dickeya* spp.

Тестирование клубневого материала. Партии семенного картофеля, полученные из разных регионов (Киргизия, Московская, Орловская, Брянская области), тестировали иммуноферментной и иммунохроматографической тест-системами для детекции *Dickeya* spp. (табл. 2). В результате из 43 проб (каждая из которых является суммарной для

партии от 40 до 200 клубней) иммуноферментной системой выявлено 24 зараженные пробы, для 19 проб инфекция не обнаружена. Иммунохроматографическая тест-система выявила меньшее количество зараженных проб — 18 положительных и 25 отрицательных. При этом иммунохроматографическая система подтвердила отрицательные пробы, определенные иммуноферментной системой, в 100 %, а положительные — в 75 % случаев. Отличия результатов можно объяснить тем, что чувствительность иммунохроматографической тест-системы ниже, чем иммуноферментной. Поэтому пробы с низким содержанием *Dickeya* spp. дали отрицательные результаты в ИХА.

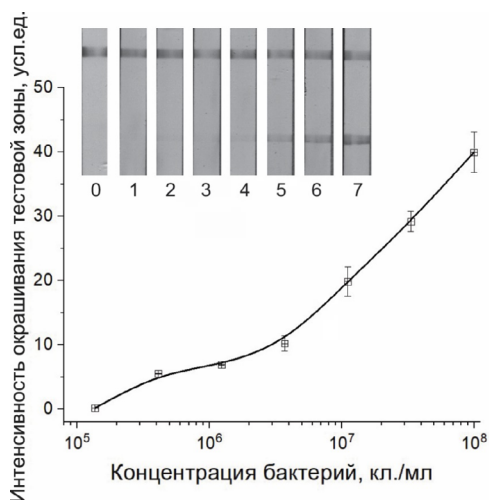


Рис. 4. Тест-полоски после анализа проб, содержащих разное количество клеток *D. solani*: 0 – отрицательный контроль; 1– $1,4 \times 10^5$; 2– $4,1 \times 10^5$; 3– $1,2 \times 10^6$; 4– $3,7 \times 10^6$; 5– $1,1 \times 10^7$; 6– $3,3 \times 10^7$; 7– 1×10^8 кл./мл и соответствующая зависимость интенсивности окрашивания тестовых зон от концентрации *D. solani*

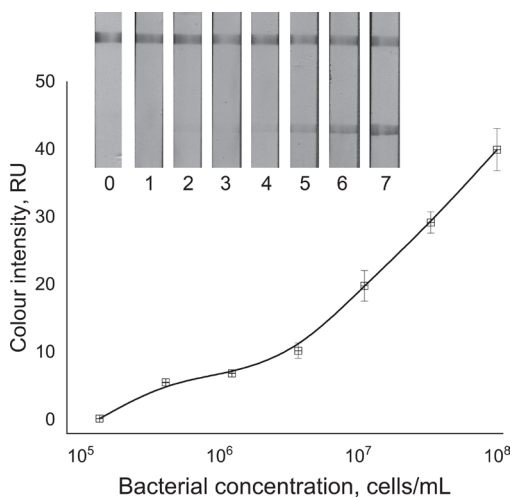


Fig. 4. Test strips after analysis of samples with different concentrations of *D. solani*: 0 – negative control; 1– 1.4×10^5 ; 2– 4.1×10^5 ; 3– 1.2×10^6 ; 4– 3.7×10^6 ; 5– 1.1×10^7 ; 6– 3.3×10^7 ; 7– 1×10^8 cells/mL and the corresponding dependence of the color intensity of the test zones on the concentration of *D. solani*

Результаты иммуноферментного и иммунохроматографического тестирования клубневого материала на зараженность бактериями *Dickeya spp.*

№ п/п	Проба*	ИФА		ИХА
		ОП450	Результат анализа	Результат анализа
1	Леди Клер, 3 репр.	0,062	-	-
2	Опал, 3 репр.	0,088	-	-
3	Опал, 3 репр.	0,113	-	-
4	Королёк, 2 репр.	0,073	-	-
5	Леди Клер, элита	1,289	+	+
6	Леди Клер, 1 репр.	0,057	-	-
7	Остин, 1 репр.	2,358	+	+
8	Королёк, 2 репр.	0,117	-	-
9	Норт, элита	0,073	-	-
10	Барс, элита	2,111	+	+
11	Опал, 3 репр.	2,635	+	+
12	Королёк, 2 репр.	0,155	-	-
13	Импала, ССЭ	2,308	+	+
14	Ривьера, ССЭ	0,095	-	-
15	Коллете, ССЭ	0,119	-	-
16	Удача, ППП	0,120	-	-
17	Коллете, ППП	2,493	+	+
18	Дезире, ППП	0,427	+	-
19	Фиолетовый, ППП	0,656	+	-
20	Фиолетовый, ССЭ	0,303	+	-
21	Арроу, ССЭ	0,070	-	-
22	Удача, ССЭ	0,276	+	-
23	Ред Скарлет, ППП	1,477	+	+
24	Импала, ППП	2,476	+	+
25	Ред Скарлет, ССЭ	0,092	-	-
26	Дезире, ССЭ	0,730	+	-
27	Ривьера, ППП	0,116	-	-
28	Гранд, ППП	0,439	+	+
29	Варяг, ППП	0,991	+	-
30	Кумач, ППП	2,395	+	+
31	Гулливер, ППП	0,092	-	-
32	Метеор, ППП	1,800	+	+
33	Ред Леди, элита	1,977	+	+
34	Королева Анна, элита	0,170	-	-
35	Ред Скарлет, РС-1	0,110	-	-
36	Санте, элита	0,092	-	-
37	Гала, 3 репр.	2,818	+	+
38	ВР-808, 2 репр.	2,281	+	+
39	Брук, 1 репр.	2,120	+	+
40	Леди Клер, 2 репр.	2,386	+	+
41	Леди Клер, 2 репр	0,789	+	+
42	Гала, 2 репр.	1,177	+	+
43	Накра, мини-клубни	0,064	-	-

*Пробы получены: 1–12 – из Киргизии; 13–32, 37–42 – из Московской области; 33–36 – из Орловской области; 43 – из Брянской области.

Table 2

Results of ELISA and LFIA testing of *Dickeya* spp. infection in potato tubers

№	Sample* Cultivar, reproduction	ELISA		LFIA
		OD450	Result	Result
1	Ledi Kler, 3 repr.	0.062	-	-
2	Opal, 3 repr.	0.088	-	-
3	Opal, 3 repr.	0.113	-	-
4	Korolek, 2 repr.	0.073	-	-
5	Ledi Kler, elite	1.289	+	+
6	Ledi Kler, 1 repr.	0.057	-	-
7	Ostin, 1 repr.	2.358	+	+
8	Korolek, 2 repr.	0.117	-	-
9	Nort, elite	0.073	-	-
10	Bars, elite	2.111	+	+
11	Opal, 3 repr.	2.635	+	+
12	Korolek, 2 repr.	0.155	-	-
13	Impala, SSE	2.308	+	+
14	Rivyera, SSE	0.095	-	-
15	Kollete, SSE	0.119	-	-
16	Udacha, FFR	0.120	-	-
17	Kollete, FFR	2.493	+	+
18	Dezire, FFR	0.427	+	-
19	Fioletovy, FFR	0.656	+	-
20	Fioletovy, SSE	0.303	+	-
21	Arrou, SSE	0.070	-	-
22	Udacha, SSE	0.276	+	-
23	Red Skarlet, FFR	1.477	+	+
24	Impala, FFR	2.476	+	+
25	Red Skarlet, SSE	0.092	-	-
26	Dezire, SSE	0.730	+	-
27	Rivyera, FFR	0.116	-	-
28	Grand, FFR	0.439	+	+
29	Varyag, FFR	0.991	+	-
30	Kumach, FFR	2.395	+	+
31	Gulliver, FFR	0.092	-	-
32	Meteor, FFR	1.800	+	+
33	Red Ledi, elite	1.977	+	+
34	Koroleva Anna, elite	0.170	-	-
35	Red Skarlet, A	0.110	-	-
36	Sante, elite	0.092	-	-
37	Gala, 3 repr.	2.818	+	+
38	VR-808, 2 repr.	2.281	+	+
39	Bruk, 1 repr.	2.120	+	+
40	Ledi Kler, 2 repr.	2.386	+	+
41	Ledi Kler, 2 repr	0.789	+	+
42	Gala, 2 repr.	1.177	+	+
43	Nakra, mini-tubers	0.064	-	-

*Samples received: 1–12 – from Kyrgyzstan; 13–32, 37–42 – from the Moscow region; 33–36 – from the Oryol region; 43 – from the Bryansk region.

Заключение

В результате иммунизации кроликов получены антисыворотки с высоким титром (максимальный титр — 1×10^7) к клеткам *D. solani*. Препараты поликлональных антител, выделенных из лучших сывороток, демонстрировали высокое сродство к иммуногенным бактериям. Характеристика иммуноферментной и иммунохроматографической сэндвич тест-систем, в которых выделенные антитела использовали и как захватывающие, и как проявляющие, показала специфичное распознавание основных видов *Dickeya* spp. При этом для бактерий *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* и *Pseudomonas* не наблюдались кросс-реакции, как и для здорового клубневого и листового материала картофеля. Иммунохроматографическая тест-система по чувствительности несколько уступает иммуноферментной, но экспрессность (15 мин) и простота проведения анализа позволяют рассматривать ее как средство быстрого внелабораторного контроля картофельного материала. Первые испытания при характеристике зараженности клубневого материала бактериями *Dickeya* spp. подтвердили эффективность нового препарата антител и показали высокую степень соответствия результатов иммуноферментного и иммунохроматографического тестирования. Представленные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшей характеристики и оптимизации тест-систем с целью их производства как средств массового тестирования в картофелеводстве.

Библиографический список

1. Toth I., Saddler G., Elphinstone J. Investigating the biology and appropriate control of *Dickeya* species affecting GB potatoes. Kenilworth: Potato Council, 2014. P. 87.
2. Shattock R. Compendium of potato diseases, Second edition. W.R. Stevenson // Plant Pathology. 2002. V. 51. P. 518—521.
3. Карлов А.Н., Зотов В.С., Пехтерева Е.Ш., Мамеева Е.В. *Dickeya dianthicola* — новый для России бактериальный патоген картофеля // Известия ТСХА. 2010. Т. 3. С. 134—141.
4. Игнатов А.Н., Егорова М.С., Ходыкина М.В. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России // Защита и карантин растений. 2015. № 5. С. 6—9.
5. Зайцев И.А., Варицев Ю.А., Лазарев А.М., Галушка П.А., Варицева Г.П. Мониторинг скрытых (латентных) форм распространения возбудителей черной ножки и кольцевой гнили картофеля в Российской Федерации // Сельскохозяйственные науки: научные приоритеты ученых. 2016. С. 39—56.
6. Gill E.D., Schaerer S., Dupuis B. Factors impacting blackleg development caused by *Dickeya* spp. in the field // European Journal of Plant Pathology. 2014. V. 140(2). P. 317—327.
7. Игнатов А.Н., Панычева Ю.С., Воронина М.В., Васильев Д.М., Джалилов Ф.С.-У. Динамика видового состава патогенов картофеля в Европейской части РФ // Картофель и овощи. 2019. Т. 9. С. 28—32. doi: 10.25630/PAV.2019.57.62.003
8. Ерохова М.Д., Кузнецова М.А. «Чёрная ножка» — опасное для отечественного картофелеводства заболевание // Аграрная наука. 2019. Т. 3. С. 44—48. doi: 10.32634/0869-8155-2019-326-3-44-48
9. Toth I.K., Wolf J.M. van der, Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsrer L., Elphinstone J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe // Plant Pathology. 2011. V. 60. № 3. P. 385–399. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x
10. Pritchard L., Humphris S., Saddler G.S., Parkinson N.M., Bertrand V., Elphinstone J.G., Toth I.K. Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences // Plant Pathology. 2013. V. 62. № 3. P. 587–596. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02678.x

11. Варицев Ю.А., Белов Г.Л., Усков А.И., Варицева Г.П., Завриев С.К., Аришава Н.В., Зайцев В.В. Методические указания по диагностике возбудителей черной ножки (*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al.) и кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. Et Kotth.) Skaptasson et Burk.) методами иммуноферментного анализа, иммунофлуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции. М.: ВНИИ картофельного хозяйства, 2003. 33 с.
12. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Physical Science*. 1973. V. 241(105). P. 20–22. doi: 10.1038/physci241020a0
13. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Жердев А.В., Блинцов А.Н., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. Разработка иммунохроматографических тест-систем для экспрессной детекции вирусов растений // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2009. Т. 45. № 2. С. 225–231. doi: 10.1134/S000368380902015X
14. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev YA., Byzova N.A., Drenova N.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of a lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Dickeya* species // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017. V. 409(7). P. 1915–1927. doi: 10.1007/s00216-016-0140-6
15. ГОСТ 33996–2016. Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества: Seed potatoes. Specifications and methods of determining the quality. М.: Стандартинформ, 2020.

References

1. Toth I, Saddler G, Elphinstone J. Investigating the biology and appropriate control of *Dickeya* species affecting GB potatoes. Kenilworth: Potato Council; 2014.
2. Stevenson WR, Loria R, Franc GD, Weingartner DP. (eds.) *Compendium of potato diseases*. 2nd edition. St Paul, Minnesota: APS Press; 2001.
3. Karlov AN, Zotov VS, Pekhtereva ES, Matveeva EV. *Dickeya dianthicola* is a new bacterial pathogen of potatoes for Russia. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2010; (3):134–141. (In Russ.).
4. Ignatov AN, Egorova MS, Khodykina MV. Spread of bacterial and phytoplasma diseases of plants in Russia. *Plant protection and quarantine*. 2015; (5):6–9. (In Russ.).
5. Zaitsev IA, Varitsev YA, Lazarev AM, Galushka PA, Varitseva GP. Monitoring of hidden (latent) forms of the spread of pathogens of black leg and ring rot of potatoes in the Russian Federation. In: *Agricultural sciences: scientific priorities of scientists*. Permian: Evensis publ.; 2016. p.39–56. (In Russ.).
6. Gill ED, Schaerer S, Dupuis B. Factors impacting blackleg development caused by *Dickeya* spp. in the field. *European Journal of Plant Pathology*. 2014; 140(2):317–327. doi: 10.1007/s10658-014-0465-y
7. Ignatov AN, Panycheva JS, Voronina MV, Vasiliev DM, Dzhililov FS. Dynamics of species composition of potato pathogens in the European part of the Russian Federation. *Potato and vegetables*. 2019; (9):28–32. (In Russ.). doi: 10.25630/PAV.2019.57.62.003
8. Yerokhova MD, Kuznetsova MA. Blackleg of potato is a dangerous disease for national potato growing. *Agrarian Science*. 2019; 3:44–48. (In Russ.). doi: 10.32634/0869-8155-2019-326-3-44-48
9. Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsror L, Elphinstone JG. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*. 2011; 60(3):385–399. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x
10. Pritchard L, Humphris S, Saddler GS, Parkinson NM, Bertrand V, Elphinstone JG, Toth IK. Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences. *Plant Pathology*. 2013; 62(3):587–596. doi: 10.1111/j.13653059.2012.02678.x
11. Varitsev YA, Belov GL, Uskov AI, Varitseva GP, Zavriev SK, Arshava NV et al. *Metodicheskie ukazaniya po diagnostike vozбудitelei chernoï nozhki (Erwinia carotovora (Jones) Bergey et al.) i kol'tsevoi gnili kartofelya (Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus (Spieck. Et Kotth.) Skaptasson et Burk.) metodami immunofermentnogo analiza, immuno fluores-tsentnoi mikroskopii i polimeraznoi tsepoi reaktsii* [Methodological guidelines for the diagnosis of causative agents of black leg (*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al.) and ring rot of potatoes (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. Et Kotth.) Skaptasson et Burk.) by enzyme-linked immunosorbent assay, immuno-microscopy and polymerase chain reaction]. Moscow: Russian Research Institute of Potato Economy publ.; 2003. (In Russ.).
12. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*. 1973; 241(105):20–22. doi: 10.1038/physci241020a0
13. Byzova NA, Safenkova IV, Chirkov SN, Zherdev AV, Blintsov AN, Dzantiev BB, Atabekov IG. Development of immunochromatographic test systems for express detection of plant viruses. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009; 45 (2): 204–209. doi: 10.1134/S000368380902015X

14. Safenkova IV, Zaitsev IA, Varitsev YA, Byzova NA, Drenova NV, Zherdev AV, Dzantiev BB. Development of a lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Dickeya* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017; 409(7):1915–1927. doi: 10.1007/s00216-016-0140-6

15. Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification. GOST 33996–2016. *Seed potatoes. Specifications and methods of determining the quality*. Moscow: Standartinform publ.; 2020. (In Russ.).

Об авторах:

Разо Шиагеса — аспирант, Аграрно-технологический институт, Российский университет дружбы народов, 117198, Российская Федерация, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2; Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33; e-mail: 1042175063@rudn.ru

ORCID: 0000-0002-4131-3797

Галушка Павел Андреевич — кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, 140051, Российская Федерация, Московская обл., п. Красково, ул. Лорха, д. 23; e-mail: pavel_galushka@mail.ru

ORCID: 0000-0003-4680-9684

Варицев Юрий Алексеевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, 140051, Российская Федерация, Московская обл., п. Красково, ул. Лорха, д. 23; e-mail: varyuriy@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-2329-7965

Жердев Анатолий Виталиевич — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33; e-mail: zherdev@inbi.ras.ru

ORCID: 0000-0003-3008-2839

Сафенкова Ирина Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33; e-mail: saf-iri@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-3621-4321

Пакина Елена Николаевна — кандидат биологических наук, доцент, директор, Агробиотехнологический департамент, Аграрно-технологический институт, Российский университет дружбы народов, 117198, Российская Федерация, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2; e-mail: e-pakina@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-1647-9138

Дзантиев Борис Борисович — доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией, Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33; e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

ORCID: 0000-0003-4008-4918

About authors:

Razo Shyatesa — PhD candidate, Agrarian and Technological Institute, RUDN University, 8/2 Miklukho-Maklaya st., Moscow, 117198, Russian Federation; A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 33 Leninsky Prospect, Moscow, 119071, Russian Federation; e-mail: 1042175063@rudn.ru

ORCID: 0000-0002-4131-3797

Galushka Pavel Andreevich — Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Russian Potato Research Center, 23 Lorkh st., Kraskovo, Moscow region, 140051, Russian Federation; e-mail: pavel_galushka@mail.ru

ORCID: 0000-0003-4680-9684

Varitsev Yuri Alekseevich — Candidate of Biological Sciences, Lead Senior Researcher, Russian Potato Research Center, 23 Lorkh st., Kraskovo, Moscow region, 140051, Russian Federation; e-mail: varyuriy@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-2329-7965

Zherdev Anatoly Vitalievich — Candidate of Biological Sciences, Lead Senior Researcher, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 33 Leninsky Prospect, Moscow, 119071, Russian Federation; e-mail: zherdev@inbi.ras.ru

ORCID: 0000–0003–3008–2839

Safenkova Irina Viktorovna — Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 33 Leninsky Prospect, Moscow, 119071, Russian Federation; e-mail: saf-iri@yandex.ru

ORCID: 0000–0002–3621–4321

Pakina Elena Nikolaevna — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Director of Department of Agrobiotechnology, Agrarian and Technological Institute, RUDN University, 8/2 Miklukho-Maklaya st., Moscow, 117198, Russian Federation; e-mail: e-pakina@yandex.ru

ORCID: 0000–0002–1647–9138

Dzantiev Boris Borisovich — Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of Laboratory, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 33 Leninsky Prospect, Moscow, 119071, Russian Federation; e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

ORCID: 0000–0003–4008–4918