

УДК 632.93

DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-89-94

Получение иммунореагентов для серологического определения возбудителей дитиленхозов сельскохозяйственных и декоративных культур

Константин Олегович Бутенко, Александр Александрович Шестеперов

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук», 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28, e-mail: k002@yandex.ru

Поступила в редакцию: 25.03.2019; принята в печать: 02.04.2019

Аннотация

Цель исследований: – получение иммунореагентов для определения двух видов паразитических нематод – *Ditylenchus destructor* и *D. dipsaci* (препаратов антигенов и антисывороток к ним).

Материалы и методы. Было проведено три иммунизации лабораторных животных (белые беспородные мыши) в дозе 20 мкг целевого белка на особь с интервалом 7–10 сут. Характеристика эффективного титра полученных антисывороток была выполнена методом дот-ИФА с использованием вторичных антител козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с щелочной фосфатазой. Для количественного определения специфичности полученных иммунореагентов использовали планшетный ИФА в непрямом формате.

Результаты и обсуждение. Полученные антисыворотки имеют специфичность по отношению к двум видам нематод *D. destructor* и *D. dipsaci*, а также к одному представителю непаразитических нематод *Rhabditis* sp. Специфичность получаемых антисывороток находится в пределах 82–97 %. Чувствительность антисывороток к гомогенатам стеблевых нематод растений *D. destructor* и *D. dipsaci* при титре антисывороток 1 : 3000 составляет 1 нг и 50 нг соответственно.

Ключевые слова: нематоды, растения, почва, картофель, дитиленхозы, эффективность, диагностика, специфичность.

Для цитирования: Бутенко К. О., Шестеперов А. А. Получение иммунореагентов для серологического определения возбудителей дитиленхозов сельскохозяйственных и декоративных культур // Российский паразитологический журнал. 2019. Т. 13. № 2. С. 89–94. DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-89-94.

© Бутенко К. О., Шестеперов А. А.

Obtaining Immuno Reagents for Serological Determination of Ditylenchosis Agents in Agricultural and Ornamental Plants

Konstantin O. Butenko, Alexander A. Shesteporov

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants – a branch of Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences", 28, B. Cheremushkinskaya street, Moscow, Russia, 117218, e-mail: k002@yandex.ru

Received on: 25.03.2019; accepted for printing on: 02.04.2019

Abstract

The purpose of the research is obtaining immuno reagents for determination of two types of parasitic nematodes *Ditylenchus destructor* and *D. dipsaci* (antigens and antisera for them).

Materials and methods. Three immunizations of laboratory animals (white scrub mice) have been carried out at a dose of 20 mcg of the target protein per animal at 7–10 day intervals. The efficient titer of the antisera obtained was described by the Dot-ELISA method using secondary goat anti-mouse immunoglobulins conjugated with alkaline phosphatase. For measuring a specificity of the obtained immuno reagents, an ELISA plate in an indirect format was used.

Results and discussion. The antisera obtained have a specificity for two types of nematodes *D. destructor* and *D. dipsaci*, and for one non-parasitic nematode *Rhabditis* sp. The specificity of the obtained antisera ranges from 82 to 97%. The sensitivity of antisera to homogenates of stem nematodes *D. destructor* and *D. dipsaci* of plants at the antiserum dilution 1 : 3000 is 1 ng and 50 ng accordingly.

Keywords: nematodes, plants, soil, potato, ditylenchosis, efficiency, diagnostics, specificity.

For citation: Butenko K. O., Shesteporov A. A. Obtaining Immuno Reagents for Serological Determination of Ditylenchosis Agents in Agricultural and Ornamental Plants. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal* = Russian Journal of Parasitology. 2019; 13 (2): 89–94. DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-89-94.

Введение

В последние годы показана высокая распространённость дитиленхозов сельскохозяйственных (картофель, земляника, лук, чеснок) и декоративных (флоксы) культур. Вредоносность дитиленхозов в растениеводстве по нашим и литературным данным достигает 30–70% в зависимости от природных и хозяйственно-экономических условий [1, 2, 7].

Согласно требованиям современного сельскохозяйственного производства и товарообмена, определены и действуют условия применения высокоточных средств определения возбудителей дитиленхозов на молекулярном уровне. Наиболее доступными для использования с обсуждаемой целью на сегодняшний день признаются методы иммуноферментного и иммунохроматографического анализа [3–5]. В то же время, есть основания считать,

что существующие методы молекулярной диагностики фитопаразитических нематод могут обладать ложной специфичностью в зависимости от вида определяемых нематод. Накопленные данные по молекулярной структуре организмов позволяют охарактеризовать получаемые антигены по их предполагаемой иммунной силе [6, 8–10].

Таким образом, получение иммунореагентов для серологических методов определения возбудителей дитиленхозов сельскохозяйственных и декоративных культур является возможным и необходимым для успешного контроля данных патогенов в современном сельском хозяйстве.

В задачи данной работы входило получение аналитических количеств антигенов для определения нематод *D. destructor* и *D. dipsaci* серологическими методами; хроматографи-

ческая очистка полученных антигенов путём деления их на фракции; получение антисывороток, специфичных к антигенным детерминантам белков нематод; оценка полученных иммунореагентов по степени специфичности и чувствительности.

Материалы и методы

Выделение и очистку гомогенатов видоспецифичных антигенов нематод *D. destructor* и *D. dipsaci* проводили по методике Виноградской [3].

В качестве основного антигена считали специфические белки исследуемых видов нематод, подобранные по литературе (интернет-каталог <http://www.uniprot.org/>). Для расчётов их концентраций в образцах использовали молекулярные характеристики данных белков (молекулярная масса, первичная последовательность, коэффициент молярной экстинкции).

Иммунизацию лабораторных животных – белых беспородных мышей и оценку полученных антисывороток осуществляли по принятым в практике молекулярной биологии протоколам [8]. Было проведено три иммунизации в дозе 20 мкг целевого белка на особь с интервалом 7–10 сут. Первая и вторая иммунизация были проведены с использованием адьюванта Фройнда, третья – без адьюванта.

Характеристика эффективного титра полученных антисывороток была выполнена методом дот-ИФА с использованием вторичных антител козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с щелочной фосфатазой.

Для количественного определения специфичности полученных иммунореагентов использовали планшетный ИФА в непрямом формате.

Сравнительную оценку полученных иммунореагентов для детекции возбудителей дитилленхозов растений на молекулярном уровне проводили с использованием методов нормальной статистики.

Результаты и обсуждение

1. Получение антигенов для определения нематод *D. destructor* и *D. dipsaci* серологическими методами.

Гомогенаты нематод *D. destructor* были выделены из культур, поддерживаемых на мицелии гриба *Alternaria solani*. Гомогенаты нематод *D. dipsaci* были выделены из заражённых растений флокса метельчатого.

Полученные количества гомогенатов нематод *D. destructor* и *D. dipsaci* в качестве антигенов для иммунизации лабораторных животных составляют соответственно 0,074 и 0,065 мг видоспецифического белка var-2 и ccos-1 в каждом конкретном случае (табл. 1).

Таблица 1

Количество гомогенатов паразитических нематод *D. destructor* и *D. dipsaci*

Гомогенат	Видоспецифический белок	Значение оптической плотности раствора при А 280, о. е.	Коэффициент молярной экстинкции	Концентрация белка в пробе, мг/мл
<i>D. destructor</i>	var-2	0,32	0,23	0,074
<i>D. dipsaci</i>	ccos-1	0,14	0,48	0,065

2. Оценка полученных иммунореагентов по степени специфичности и чувствительности.

Наибольший титр антисывороток в обоих случаях составил 1 : 3125.

Сравнение иммунохимической специфичности полученных антисывороток показало, что наибольшие перекрёстные реакции отмечаются по отношению к родственным видам нематод (рис. 1).

Сравнение результатов определения иммунохимической специфичности для определения требуемых видов нематод приведено в табл. 2.

Чувствительность антисывороток к гомогенатам стеблевых нематод растений *D. destructor* и *D. dipsaci* при титре антисывороток 1 : 3000 составляла 1 нг и 50 нг соответственно (рис. 2).

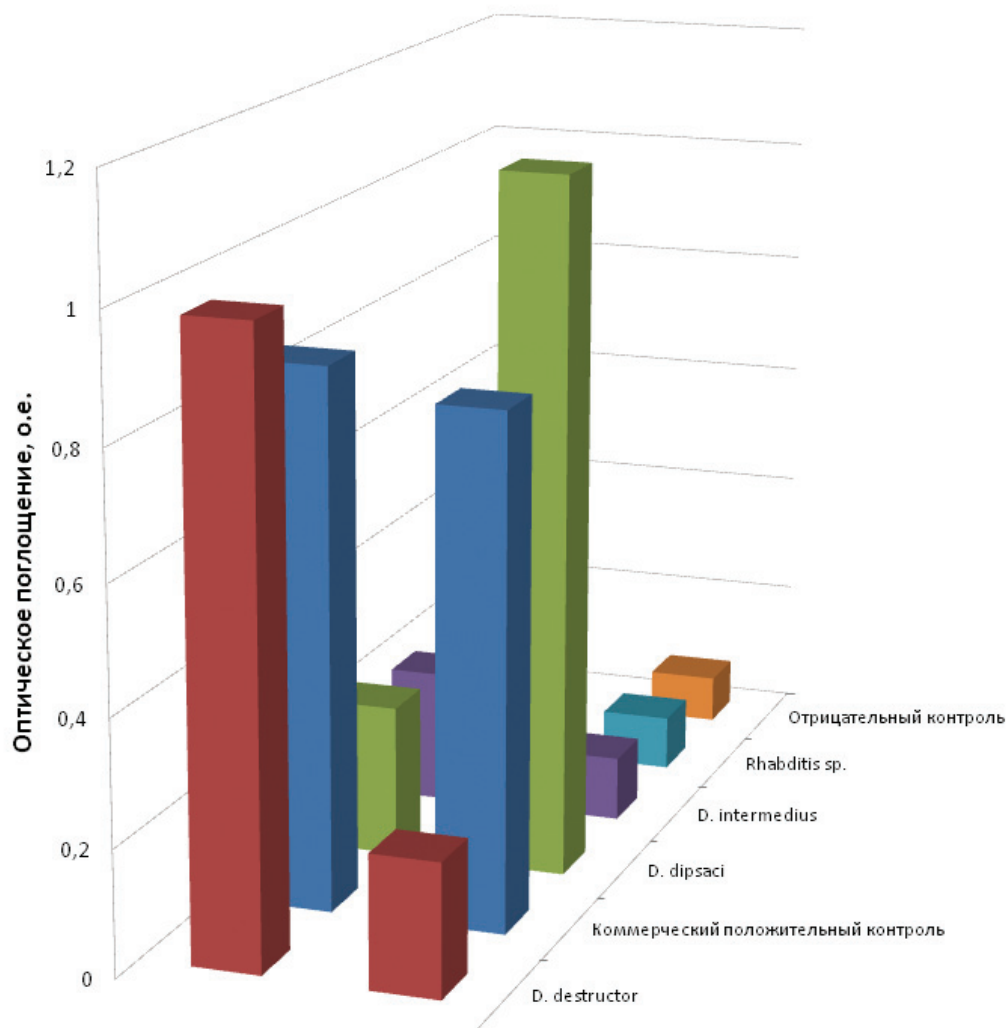


Рис. 1. Иммунохимическая специфичность антисывороток для определения видов нематод *D. destructor* (задний план) и *D. dipsaci* (передний план)

Таблица 2

Иммунохимическая специфичность антисывороток для определения видов нематод *D. destructor* и *D. dipsaci*

Вариант	Антисыворотка к <i>D. destructor</i>		Антисыворотка к <i>D. dipsaci</i>	
	Оптическая плотность, о. е.	Специфичность, %	Оптическая плотность, о.е.	Специфичность, %
<i>D. destructor</i>	0,981	100	0,211	100
Коммерческий положительный контроль	0,856	86	0,812	71
<i>D. dipsaci</i>	0,242	17	1,112	13
<i>D. intermedius</i>	0,214	14	0,103	3
<i>Rhabditis sp.</i>	0,131	4	0,087	1
Отрицательный контроль	0,093	0	0,076	0

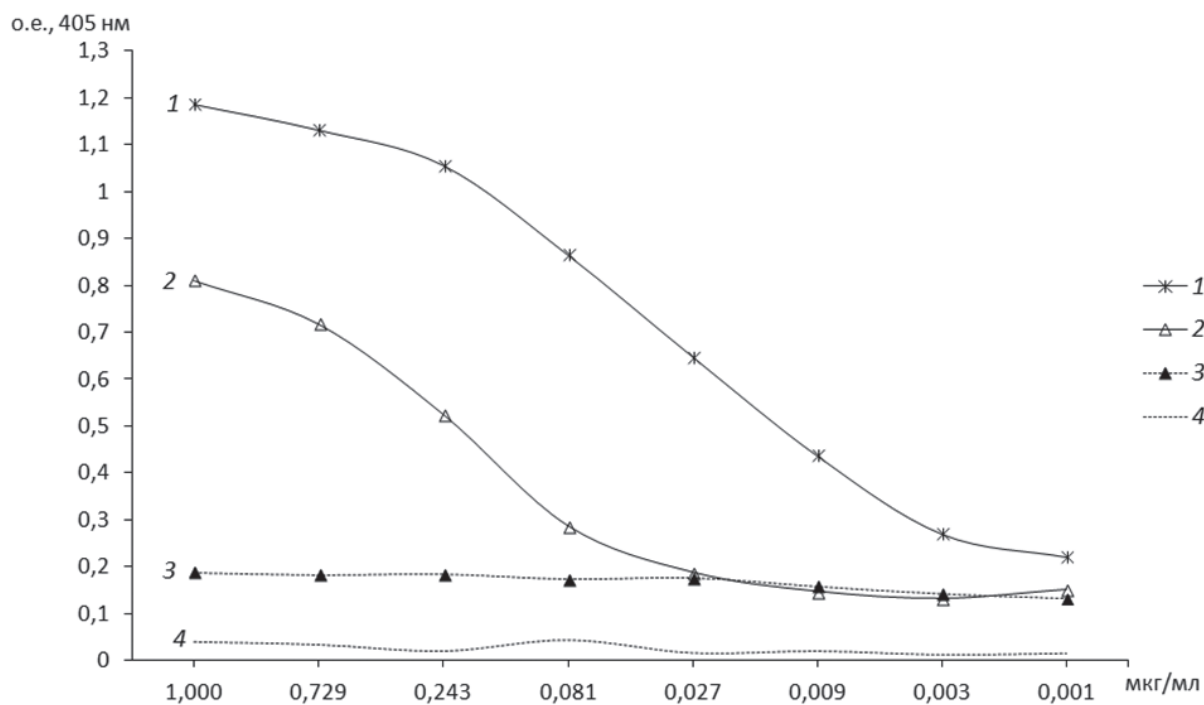


Рис. 2. Чувствительность антисыворотков к гомогенатам нематод *D. destructor* (1) и *D. dipsaci* (2) на фоне отрицательного контроля к ним (3, 4)

Заключение

Ликвидация потерь урожая сельскохозяйственных культур и товарности декоративных растений напрямую определяется возможностью непосредственного анализа видовой принадлежности патогена на молекулярном уровне. В случае дитиленхозов такой возможностью является использование серологических методов диагностики.

Получаемые с этой целью иммунореагенты обладают специфичностью 97% для детекции нематод *D. destructor* и 82% для детекции нематод *D. dipsaci*. Чувствительность получаемых иммунореагентов находится на уровне 1 нг/мл специфического белка нематод *D. destructor* и 50 нг/мл нематод *D. dipsaci*.

В результате получения иммунореагентов для серологических методов с целью определения возбудителей дитиленхозов сельскохозяйственных и декоративных культур можно существенно увеличить эффективность массовой диагностики данных заболеваний на молекулярном уровне.

Литература

1. Анисимов Б. В., Белов Г. Л., Варицев Ю. А., Еланский С. Н., Журомский Г. К., Завриев С. К., Зейрук В. Н., Иванюк В. Г., Кузнецова М. А., Пляхневич М. П., Пищенко К. А., Симаков Е. А., Склярова Н. П., Сташевски З., Усков А. И., Яшина И. М. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. М.: Картофелевод, 2009. 272 с.
2. Бутенко К. О., Шестенеров А. А. Особенности эпифитотического процесса при дитиленхозе картофеля, моркови и других растений // Тр. Всерос. ин-та гельминтол. 2005. Т. 41. – С. 113–123.
3. Виноградская Г. М. Серологическая диагностика дитиленхоза картофеля, вызываемого нематодой *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945: дис. ... канд. биол. наук. М., 1977. 128 с.
4. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
5. МСФМ 27. Диагностические протоколы. ДП 8: *Ditylenchus dipsaci* и *Ditylenchus destructor*. 2015.

6. Нематоды растений и почвы. Род Дитиленхус / отв. ред. В. Г. Губина. М.: Наука, 1982. 248 с.
7. Шестеперов А. А., Черкашин В. И., Бутенко К. О. Дитиленхоз картофеля и меры борьбы с ним (Рекомендации). М.: Росинформагротех, 2006. 72 с.
8. Ausubel F., Brent R. et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 2003; 4648.
9. *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. EPPO Bulletin. 2008; 38 (3): 363–373.
10. http://www.agroatlas.spb.ru/pests/Metadata/Meta_Ditylenchus_destructor_ru.htm.
3. Vinogradskaya G. M. Serologic diagnosis of ditylenchosis of potato caused by nematode *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945: dis. ... Ph. D, Biology. M., 1977; 128. (In Russ.)
4. Egorov A. M., Osipov A. P., Dzantiev B. B., Gavrilova E. M. Enzyme-linked immunoassay theory and practice. M.: Higher School, 1991; 288. (In Russ.)
5. International Standards for Phytosanitary Measures 27. Diagnostic Protocols. DP 8: *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor*. 2015.
6. Plant and Soil Nematodes. *Ditylenchus* / Responsible Editor V. G. Gubina. M.: Science, 1982; 248. (In Russ.)

References

1. Anisimov B. V., Belov G. L., Varitsev Yu. A., Elanskiy S. N., Zhuromskiy G. K., Zavriev S. K., Zeiruk V. N., Ivanyuk V. G., Kuznetsova M. A., Plyakhnevich M. P., Pshechenkov K. A., Simakov E. A., Sklyarova N. P., Stashevski Z., Uskov A. I., Yashina I. M. Protection of Potatoes against Diseases, Pests and Weeds. M.: Kartofelevod (Potatogrower), 2009; 272. (In Russ.)
2. Butenko K. O., Shesteperv A. A. Special aspects of an epiphytotic process at ditylenchosis of potato, carrot and other plants. *Trudy Vserossiyskogo in-ta gel'mintologii = Works of the All-Russia Institute of Helminthology*. 2005; 41: 113–123. (In Russ.)
7. Shesteperv A. A., Cherkashin V. I., Butenko K. O. Ditylenchosis of potato and its control (Recommendations). M.: Rosinformaagrotech, 2006; 72. (In Russ.)
8. Ausubel F., Brent R. et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 2003; 4648.
9. *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. EPPO Bulletin. 2008; 38 (3): 363–373.
10. http://www.agroatlas.spb.ru/pests/Metadata/Meta_Ditylenchus_destructor_ru.htm.