

Е. Каримова
На правах рукописи

КАРИМОВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

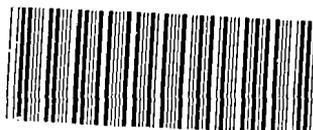
**ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFAI –
ПРОДУЦЕНТА L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ.**

03.02.03 – микробиология

Автореферат

21 СЕН 2016

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук



006652946

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре биохимии им. академика Березова Т.Т. Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ» г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор МИ РУДН

Смирнова Ирина Павловна

Официальные оппоненты:

Лауреат Государственной премии СССР,
доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры биотехнологии РХТУ
им. Д.И. Менделеева

Градова Нина Борисовна

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и
микробиологии им. почетного академика
Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ

Подборонов Виктор Михайлович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН).

Защита состоится « 19 » октября 2016 года в 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.39 в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАО ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6 и на сайте www.rudn.ru.
Автореферат размещен на сайте www.vak.ed.gov.ru.

Автореферат разослан « 4 » окт 2016 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



О.Б. Гигани

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Поиск средств для подавления фитопатогенных бактерий продолжает оставаться актуальной проблемой не только для микробиологии, сельского хозяйства, но и для экологии. Весьма перспективным в этом направлении является использование не химических, а биологических средств защиты, в частности продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Грибы рода *Trichoderma* являются одними из наиболее изучаемых в настоящее время. Это единственный род, каждый вид которого представлен в Генетическом Банке хотя бы одним геном, а многие виды представлены последовательностью двух или более генов (Алимова Ф.К., 2006).

Повышенный интерес к грибам рода *Trichoderma* также обусловлен изучением его ферментных систем. На кафедре биохимии Российского университета дружбы народов было установлено, что *Trichoderma harzianum* Rifai штамм F-180 является продуцентом фермента L-лизин- α -оксидазы (ЛО) (Смирнова И.П., Хадуев С.Х., 1984). Было показано, что данный фермент обладает противоопухолевой и противовирусной активностью (Жукова О.С., Хадуев С.Х., Добрынин Я. В., 1985, Смирнова И.П., Алексеев С.Б., и др., 1998, 2009). Впервые было доказано ингибирование L-лизин- α -оксидазой вирусов INSV и TRSV (Смирнова И.П., Шнейдер Ю.А., 2013, патенты РФ № 2475528, 2481392).

В последние годы на территории Российской Федерации отмечается увеличение случаев обнаружения заболеваний бактериальной природы среди других групп фитопатогенных микроорганизмов. Многие возбудители карантинных бактериальных болезней растений чаще всего могут быть завезены из-за рубежа при импорте семенного и посадочного материала. В связи с этим необходимо определить зоны возможного риска их распространения на территории Российской Федерации, совершенствовать методы выявления и идентификации возбудителей бактериальных заболеваний растений, также поиск возможных эффективных мер защиты и борьбы с фитопатогенными бактериями.

Влияние метаболитов гриба *Tr. harzianum* Rifai штамма F-180 в отношении ряда особо опасных (карантинных) возбудителей бактериальных болезней растений до настоящего времени не было исследовано. Изучение новых биологических свойств штамма-продуцента является необходимым и важным, так как представляет не только практический, но и большой теоретический интерес,

Работа является частью исследований, проводимых с *Tr. harzianum* Rifai F-180 на кафедре биохимии им. академика Березова Т.Т. МИ РУДН, выполняемых в рамках Государственных контрактов НИР/НИОК «Молекулярные основы патологических процессов и система их внутриклеточной регуляции; структура и биологическая

активность ферментов с антиопухолевой и антивирусной активностью» (тема №030522-1-274-1).

Цель работы: определить зоны возможного распространения особо опасных фитопатогенных бактерий на территории Российской Федерации, изучить методы их идентификации и влияние метаболитов *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 на данные бактерии.

Задачи исследования:

- провести анализ литературных данных и осуществить выбор особо опасных для Российской Федерации фитопатогенных бактерий;
- установить зоны возможного распространения выбранных бактерий на территории Российской Федерации с помощью метода Географических информационных систем (ГИС);
- изучить рост данных фитопатогенных микроорганизмов на средах разного состава, подобрать оптимальные условия их культивирования для проведения дальнейших исследований;
- усовершенствовать серологические методы выявления и идентификации (РНИФ и ИФА) бактерий;
- выбрать оптимальный метод выделения ДНК бактерий, а также усовершенствовать методики ПЦР для выявления и идентификации;
- исследовать влияние метаболитов гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 на особо опасные для РФ фитопатогенные бактерии;

Научная новизна

Впервые с помощью современного метода ГИС были определены зоны возможного распространения фитопатогенов *A. citrulli* и *E. amylovora* на территории Российской Федерации.

Подобраны оптимальные условия культивирования бактерии *A. citrulli*;

Впервые в Российской Федерации показана возможность выявления и идентификации бактерии *A. citrulli* методами РНИФ и ИФА.

Определена и успешно апробирована специфичная пара новых праймеров AC-1 F/R, которая может быть использована при проведении фитосанитарной экспертизы для выявления и идентификации возбудителя *A. citrulli*.

Впервые установлено наличие ингибирующих свойств культуральной жидкости (КЖ) *Tr. harzianum* Rifai F-180 при активности L-лизин- α -оксидазы (ЛЮ) 0,054 Е/мл в отношении особо опасных фитопатогенных бактерий *E. amylovora* и *A. citrulli*.

Практическая значимость работы:

- впервые определены территории РФ, подверженные опасности акклиматизации фитопатогенов *A. citrulli* и *E. amylovora* и установлены зоны их возможного распространения.

- подобраны оптимальные условия культивирования *A. citrulli*;
- усовершенствованы серологические методы выявления и идентификации *A. citrulli*: РНИФ и ИФА. Подобран оптимальный титр кроличьей сыворотки для постановки РНИФ. Сэндвич-метод ИФА (DAS ELISA) позволяет выявлять в исследуемом материале бактерии *A. citrulli* в количестве 10^4 КОЕ/мл.
- установлен оптимальный метод экстракции ДНК *A. citrulli* из чистых культур и зараженного растительного материала – при использовании набора «DNeasyKit» (Qiagen, США). Выделенные образцы ДНК были использованы при проведении классической ПЦР и ПЦР «в реальном времени»;
- определена и апробирована специфичная пара праймеров AC-1 F/R, которая может быть использована для выявления и идентификации бактерии *A. citrulli*;
- впервые доказано наличие ингибирующих свойств КЖ *Tr. harzianum* Rifai F-180 с активностью ЛО 0,054 Е/мл в отношении *E. amylovora* и *A. citrulli*.

Практическая значимость данной работы подтверждена: патентами на изобретения – патент РФ № 2493247 Смирнова И.П., Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А. Ингибитор возбудителя бактериального ожога плодовых культур (*Erwinia amylovora*) от 20.09.2013 г.;

- патент РФ № 2535983 Смирнова И.П., Каримова Е.В. Продуцент ингибитора возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур (*Acidovorax citrulli*), от 20.12.2014г.;
- разработкой методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* (Shaad et al.). УДК 57 (094), № госрегистрации 115081710028. Инв. № 67-2015 МР ВНИИКР, Москва 2015;
- подана заявка на патент: Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А., Смирнова И.П. Регистрационный № 2012105552/Набор праймеров для выявления возбудителя *Acidovorax citrulli* и способ выявления возбудителя *Acidovorax citrulli* от 18.02.2016.

Основные положения, выносимые на защиту:

- проведен анализ литературных данных с целью выбора особо опасных для Российской Федерации фитопатогенных бактерий: *E. amylovora* и *A. citrulli*. Установлены зоны их возможного распространения с помощью ГИС;
- подобраны оптимальная питательная среда и условия культивирования *A. citrulli*;
- адаптированы методы РНИФ, ИФА и ПЦР для выявления и идентификации фитопатогенной бактерии *A. citrulli*;
- впервые определена и успешно апробирована специфичная пара новых праймеров AC-1 F/R, которая может быть использована для выявления и идентификации возбудителя *A. citrulli* методом ПЦР;

– впервые установлено ингибирующее влияние продуктов метаболизма гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 на фитопатогенные бактерии *E. amylovora* и *A. citrulli* при активности ЛО 0,054 Е/мл и гомотогенного фермента ЛО с активностью 5,0 и 10,0 Е/мл.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на XVI, XVII, XVIII Научно-практических конференциях по медицинской микологии (Кашкинские чтения) (С.-Петербург, 2013, 2014, 2015); Международной научной конференции «Современные проблемы общей паразитологии» (Москва, 2012); Третьем всероссийском съезде по защите растений (С.-Петербург, 2013); Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии биологических средств защиты растений в производстве органической сельскохозяйственной продукции» (Краснодар, 2014) и Конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные исследования молодых ученых в биологии, защите растений и смежных отраслях» (Москва, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ. Из них 8 – статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикаций материалов докторских и кандидатских диссертаций. Получено два патента: № 2493247 от 20.09.2013 г., № 2535983 от 20.12.2014 г. Подана заявка на патент: регистрационный № 2012105552 от 18.02.2016 г. Разработаны методические рекомендации.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав результатов собственного исследования и их обсуждения, заключения, выводов, библиографического списка и приложения. Работа изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 28 таблиц, 27 рисунков, 5 приложений. Библиографический список используемой литературы включает 196 источников, из которых 135 зарубежных.

Личный вклад автора.

Диссертационная работа представляет собой законченный, самостоятельно выполненный труд автора. Все представленные в диссертации результаты получены лично Каримовой Е.В. на базе кафедры биохимии им. академика Берёзова Т.Т. МИ РУДН. Автором проанализированы отечественные и зарубежные литературные источники по теме диссертации, получены и обобщены результаты исследования. В работах, выполняемых в соавторстве, использованы результаты исследований с долей личного участия автора 75-95%.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Определение зон возможного распространения фитопатогенных бактерий *E. amylovora* и *A. citrulli* на территории Российской Федерации определяли с

помощью современного компьютерного метода географических информационных систем (ГИС) (Журкин И.Г., 2009).

В работе использована культуральная жидкость (КЖ) гриба *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 с исходной активностью ЛО 0,54 Е/мл, и гомогенный фермент L-лизин- α -оксидазы с исходной активностью ЛО 50,0 Е/мг, предоставленные проф. Смирновой И.П. (кафедра биохимии им. академика Берёзова Т.Т. МИРУДН).

В экспериментальной части была использована коллекция культур некоторых возбудителей особо опасных фитопатогенных бактерий родов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acidovorax* и *Ralstonia* (табл 1).

Таблица 1

Культуры бактерий, используемые в работе

№ п/п	Название бактериальной культуры	Источник коллекции	Зараженный растительный материал
1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»	<i>Cucumis sativus</i>
2	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>		<i>Cucumis sativus</i>
3	<i>Xanthomonas fragariae</i>	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria	<i>Fragaria cholonis</i> var. <i>ananasis</i>
4	<i>Erwinia amylovora</i> MOE1	ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»	<i>Malus domestica</i>
5	<i>Erwinia amylovora</i> VRE3		European Phytosanitary Research Coordination
6	<i>Pseudomonas syringae</i> var. <i>syringae</i> 1	ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»	<i>Prunus cerasus</i>
7	<i>Pseudomonas syringae</i> var. <i>syringae</i> 2		<i>Persica vulgaris</i>
8	<i>Pantoea stewartii</i>		<i>Zea mays</i>
9	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Institut Valencia D'Investigacions Agraries	<i>Solanum tuberosum</i>
10	<i>Acidovorax citrulli</i> 51		<i>Citrullus lanatus</i>
11	<i>Acidovorax citrulli</i> 2609		<i>Citrullus lanatus</i>
12	<i>Acidovorax citrulli</i> 2726		<i>Cucumis melo</i>
13	<i>Acidovorax citrulli</i> 3000		<i>Citrullus lanatus</i>

При подборе оптимальной среды и условий для культивирования были использованы жидкие и плотные питательные среды: King B, YDC, NBY, NA, EBV, mEVA, традиционные для фитопатологической экспертизы (Schaad N., 2001).

В опыте с жидкими питательными средами использовали 96-луночные планшеты (Helicon, Россия). В опытные лунки (ряды 2 – 11) вносили по 200 мкл изучаемой питательной среды и по 50 мкл суспензии бактерий с соответствующим разведением чистой культуры *A. citrulli* от 10^2 до 10^7 КОЕ/мл (табл. 2). В контрольные лунки (ряды 1 и 12) вносили стерильную питательную среду. В одном планшете одновременно изучали две питательные среды. Учет результатов проводили с помощью микропланшетного фотометра Thermo Scientific Multiscan Ascent (США).

Таблица 2

Схема опыта по подбору оптимальной питательной среды для культивирования
A. citrulli.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B	КОНТРОЛЬ	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	B					
C		10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	C					
D		10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	D					
E		10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	E					
F		10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	F					
G		10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	G					
H													
СРЕДА 1- или СРЕДА 3-или СРЕДА 5-							-СРЕДА 2 или СРЕДА 4 или СРЕДА 6						

* по вертикали – разведение чистой культуры *A. citrulli* (КОЕ/мл);

по горизонтали – повторности;

среда 1 – King B; среда 2 – YDC; среда 3 – NBY; среда 4 – NA; среда 5 – EBB; среда 6 – mEBA.

Искусственное заражение растительного материала бактерией *A. citrulli*

Для проверки патогенности культуры и отработки методов выявления и идентификации бактерии было проведено искусственное заражение растений *Cucumis sativus*, *C. melo*, *Cucurbita pepo*, *C. pepo var. giromontina*, а также зрелых плодов *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *C. pepo var. giromontina*, *C. pepo var. patisoniana*. Наличие или отсутствие типичных симптомов бактериоза учитывали через 14 дней после заражения.

Применение серологических методов для идентификации *A. citrulli*.

Для идентификации бактерии проводили непрямую реакцию иммунофлюоресценции (РНИФ) и иммуноферментный анализ (ИФА) с тест-системами фирмы Loewe (Германия) со свежеприготовленной суспензией чистой культуры четырех штаммов *A. citrulli* (№№51, 2609, 2726, 3000) в концентрации 10⁵ КОЕ/мл.

Применение ПЦР метода для идентификации *A. citrulli*.

Выделение ДНК бактерии *A. citrulli* проводили из чистой культуры и зараженного растительного материала с использованием коммерческих наборов: «НК-М-Сорб», «ДНК-Экстран-3», «ДНК-Экстран-4», «М-Сорб ТУБ Автомат» («Синтол», Россия), «Проба ГС» («АгроДиагностика», Россия), «DNeasyKit» (Qiagen, США), а также экспресс-метода кипячение (Васильев В.П. и др., 2008).

Для идентификации возбудителя *A. citrulli* методом ПЦР использовали универсальные праймеры 8UA, 519B, специфичные – AACF3, AACR2, а также подобранные в ходе исследования специфичные праймеры к разным участкам гена: AC-1 F/R AC-2 F/R, AC-3 F/R.

Изучение влияния метаболитов *Tr. harzianum* Rifai F-180 на фитопатогенные бактерии *E. amylovora* и *A. citrulli* проводили с использованием метода диффузии в агар на среде King B. Использована культуральная жидкость (КЖ) гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 с исходной активностью ЛО 0,54 Е/мл и фермент L-лизин-α-оксидаза с исходной активностью ЛО 50,0 Е/мл.

Повторность в опытах трехкратная. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с применением программ Statistica 7.0, PAST 3.0 и Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выбор особо опасных фитопатогенных бактерий в качестве объектов исследования

В результате анализа научной литературы зарубежных и отечественных авторов был сделан вывод, что среди бактериальных фитопатогенных микроорганизмов наиболее опасными для Российской Федерации в настоящее время являются бактерии *Erwinia amylovora* (Burrill 1882 и Winslow et al. 1920) и *Acidovorax citrulli* (Schaad et al, 2009)

Карантинная фитопатогенная бактерия *E. amylovora* представляет особую опасность для РФ в связи с большой протяженностью территории нашей страны, следовательно, наличием благоприятных климатических зон для развития возбудителя и произрастанием широкого круга растений, восприимчивых к данному заболеванию.

A. citrulli входит в Перечень вредных организмов, имеющих карантинное значение для стран ЕАЭС. В РФ данный микроорганизм не зарегистрирован и не изучен, отсутствуют методы его выявления и идентификации, следовательно, вероятность латентного проникновения в импортируемом материале на территорию страны очень высока.

С помощью метода ГИС на основании эоклиматических показателей, способствующих акклиматизации выбранных бактерий (средняя многолетняя температура зимнего периода, сумма активных температур, влажность, требование фитопатогена к условиям окружающей среды, наличие и ареал растений-хозяев) были установлены зоны возможного распространения и риска *E. amylovora* и *A. citrulli* на территории РФ.

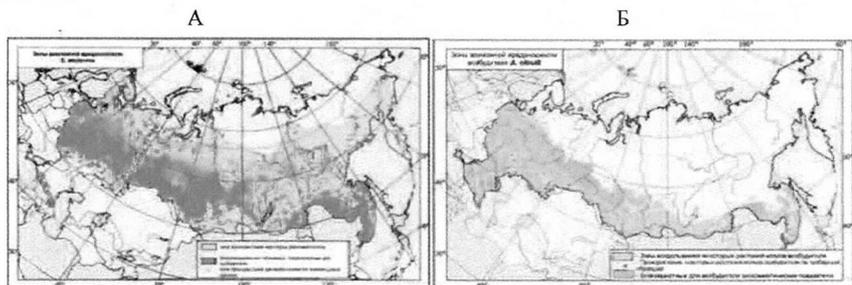


Рисунок 1. Прогнозируемые зоны распространения *E. amylovora* (А) и *A. citrulli* (Б) на территории Российской Федерации. Зеленым цветом показаны зоны произрастания некоторых растений-хозяев бактерий; оранжевым – благоприятные для данных бактерий эоклиматические показатели.

Изучение влияния метаболитов гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 на *E. amylovora*.

К настоящему времени в РФ разработаны, успешно применяются на практике и совершенствуются методы выявления и идентификации бактерии *E. amylovora*. Однако в мире до сих пор не разработано эффективной стратегии борьбы с данным фитопатогеном. Единственным надежным методом для предотвращения или замедления скорости распространения *E. amylovora* является применение строгих фитосанитарных мер, ликвидация зараженных растений и запрет выращивания восприимчивых к бактериозу растений в карантинной зоне в течение нескольких лет (Шнейдер Е.Ю., 2009).

В связи с этим в наших исследованиях с *E. amylovora* мы изучали влияние на данную бактерию продуктов метаболизма гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180.

На рисунках 2, 3 представлены результаты опытов по изучению влияния КЖ *Tr. harzianum* Rifai F-180 с разной активностью ЛО (0,54 – 0,054 Е/мл) на *E. amylovora*.

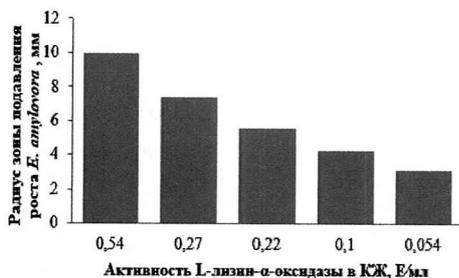


Рисунок 2. Зависимость радиуса зоны подавления роста *E. amylovora* на среде King B от разной активности ЛО в культуральной жидкости *Tr. harzianum* Rifai F-180.

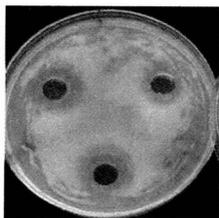


Рисунок 3. Влияние КЖ *Tr. harzianum* Rifai F-180 с разной активностью ЛО на рост бактерии *E. amylovora* на среде King B.

Результаты показывают, что КЖ *Tr. harzianum* Rifai F-180 с активностью ЛО 0,054 Е/мл подавляет рост бактерии *E. amylovora*.

Также представляло интерес исследовать влияние фермента L-лизин-α-оксидазы *Tr. harzianum* Rifai F-180 на *E. amylovora*. Изучение влияния разной концентрации фермента ЛО на рост фитопатогенной бактерии *E. amylovora* представлено на рисунке 4.

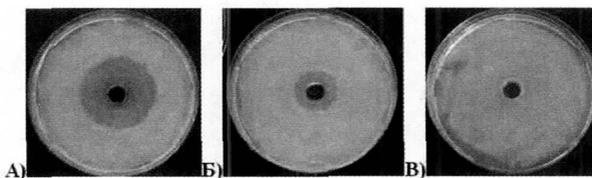


Рисунок 4. Влияние ЛО *Tr. harzianum* Rifai F-180 на рост *E. amylovora* на среде King B : А) активность ЛО 10,0 Е/мг, Б) активность ЛО 5,0 Е/мг, В) контроль.

Как видно из результатов, полученных в ходе исследования, метаболиты гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 обладают ингибирующим действием в отношении фитопатогенной бактерии *E. amylovora*.

Подбор питательной среды и оптимальных условий культивирования *A. citrulli*.

В связи с тем, что на территории Российской Федерации возбудитель *A. citrulli* не изучен, на первом этапе исследования были подобраны условия его культивирования. Активность роста *A. citrulli* в 96-луночных микропланшетах фиксировали с помощью микропланшетного фотометра (см. Материалы и методы).

В ходе данного исследования было установлено, что бактерия *A. citrulli* достаточно хорошо растет на средах King B, YDC, NBY, NA, EBB и mEBB. Результаты исследования представлены в таблице 3 и на рисунке 5.

Таблица 3

Динамика роста *A. citrulli* при температуре +37 °С
на средах разного состава (исходная концентрация бактерии 10⁷ КОЕ/мл)

Время (после начала опыта)	Значение экстинкции (среднее значение ± стандартная ошибка)					
	Жидкая питательная среда					
	YDC	King B	NA	NBY	EBB	mEBBA
6 ч.	0,0198 ± 0,0006	0,0092 ± 0,0002	0,0038 ± 0,0026	0,0046 ± 0,0002	0,0710 ± 0,0006	0,0092 ± 0,0002
12 ч.	0,2612 ± 0,0078	0,3858 ± 0,0823	0,3432 ± 0,0265	0,3124 ± 0,0368	0,1086 ± 0,0009	0,0500 ± 0,0006
18 ч.	0,3804 ± 0,0214	0,5638 ± 0,0846	0,4150 ± 0,0502	0,3702 ± 0,0565	0,1062 ± 0,0007	0,0468 ± 0,0009
24 ч.	0,5224 ± 0,0081	0,7556 ± 0,0767	0,5890 ± 0,0385	0,5058 ± 0,0319	0,1046 ± 0,0008	0,0436 ± 0,0006
30 ч.	0,5966 ± 0,0064	0,9730 ± 0,1339	0,6290 ± 0,0269	0,5944 ± 0,0663	0,1076 ± 0,0069	0,0386 ± 0,0040
36 ч.	0,6348 ± 0,0119	1,0576 ± 0,0758	0,6384 ± 0,0341	0,6232 ± 0,0742	0,1026 ± 0,0040	0,0318 ± 0,0014
42 ч.	0,7132 ± 0,0313	1,1186 ± 0,0676	0,6714 ± 0,0419	0,6250 ± 0,0618	0,0944 ± 0,0017	0,0268 ± 0,0006

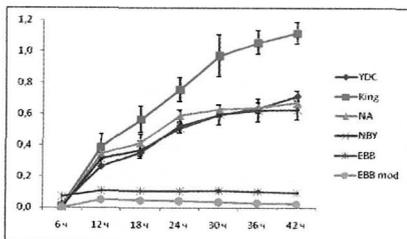


Рисунок 5. Рост бактериальной культуры *A. citrulli* в зависимости от питательной среды и времени культивирования при температуре +37 °С (исходная концентрация бактерий 10⁷ КОЕ/мл).

Ось абсцисс – время в часах; ось ординат – показания фотометра, значение экстинкции.

Как видно из представленных данных активный рост бактерии *A. citrulli* наблюдается при культивировании на среде King B при температуре +37°C и времени до 42ч.

Усовершенствование серологических и молекулярных методов выявления и идентификации *A. citrulli*

Применение РНИФ для выявления и идентификации *A. citrulli*.

Был отработан метод непрямой реакции иммунофлюоресценции (РНИФ) с одновременным подбором рабочей концентрации кроличьей иммунной сыворотки.

Для определения рабочей концентрации диагностической кроличьей иммунной сыворотки выпускаемой фирмой Loewe (Германия) предварительно были сделаны соответствующие разведения: 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000, 1/32000. Кроличья сыворотка меченная флуорохромом (конъюгат) была использована в стандартном разведении 1/200. РНИФ ставили по общепринятой схеме и выдерживали во влажной камере при температуре 25°C в течении 30 мин. Учет результатов проводили путем микрофотографирования препаратов с помощью микроскопа Axio Imager A1 (Zeiss, Германия) при увеличении 18110 раз.



1/1000

1/8000

Рисунок 6. *A. citrulli* под микроскопом Axio Imager A1 (Zeiss) при использовании изучаемых разведений кроличьей иммунной сыворотки, увеличение в 18110 раз.

Как видно из рисунка 6 бактерия *A. citrulli* была выявлена при использовании разведений сыворотки от 1/1000 до 1/8000. В данных образцах присутствовали палочковидные изогнутые клетки с эквивалентным положительному контролю

уровнем свечения, при этом в отрицательном контроле и большом разведении кроличьей иммунной сыворотки (1/16000, 1/32000) бактерии не выявлялись.

Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать вывод, что титром сыворотки для выявления и идентификации *A. citrulli* с помощью РНИФ является разведение 1/8000.

Применение ИФА для выявления и идентификации *A. citrulli*

При идентификации бактерий в настоящее время широко используют метод ИФА (Егоров А.М., 2007). С целью проверки чувствительности тест-системы (Loewe, Германия) методом сэндвич ИФА (DAS ELISA) было использовано серийное разведение бактерии *A. citrulli* от 10^1 до 10^8 КОЕ/мл. В эксперименте использовали четыре штамма (*A. citrulli* 51, *A. citrulli* 2609, *A. citrulli* 2726, *A. citrulli* 3000).

В результате исследования были получены данные, о том, что чувствительность данной тест-системы варьирует в зависимости от штамма бактерии. Так бактерия *A. citrulli* 51 была выявлена во всех используемых концентрациях бактериальных клеток, *A. citrulli* 2609 – 10^4 – 10^8 КОЕ/мл, *A. citrulli* 2726 – 10^3 – 10^8 КОЕ/мл, *A. citrulli* 3000 – 10^6 – 10^8 КОЕ/мл. Таким образом, в среднем чувствительность набора составила 10^4 КОЕ/мл. Такая чувствительность теста может оказаться недостаточной при выявлении зараженного растительного материала. Однако ИФА с помощью данного набора может использоваться как дополнительный метод подтверждения положительных образцов.

По результатам проверки специфичности было показано, что тест-система не реагировала с бактериями *P. syringae* pv. *lachrymans*, *X. campestris* pv. *cucurbitae*, *X. fragariae*, *E. amylovora* MOE1, *P. syringae* var. *syringae* 1, *P. syringae* var. *syringae* 2, *P. stewartii*, *R. solanacearum*, в то время как со всеми штаммами *A. citrulli* реакция была положительной.

В ходе отработки концентрации антител и объема вносимых растворов в лунку, было показано, что из использованных титров антител 1/200, 1/400, 1/600, 1/1000 лучшие результаты были отмечены при 1/200. Также было подтверждено, что внесение антител в объеме 200 мкл в лунку является оптимальным, при использовании уменьшенного объема внесения чувствительность набора снижается от 5 до 40%, в зависимости от штамма бактерии.

Применение ПЦР метода для идентификации *A. citrulli*

Для выявления и идентификации особо опасных фитопатогенных микроорганизмов очень важно использование высокоточных методов, способных гарантировать достоверность результатов. ПЦР является молекулярно-генетическим методом диагностики, который позволяет идентифицировать фитопатогены в растительном материале, обладает высокой специфичностью и чувствительностью,

значительно ускоряет время идентификации возбудителя, поэтому в последующих экспериментах был использован и оптимизирован метод ПЦР для *A. citrulli*.

Оптимизация методов выделения ДНК из чистой культуры *A. citrulli* и зараженного растительного материала

Выделение и очистка нуклеиновых кислот являются ключевым моментом при использовании метода ПЦР в диагностике бактерий. Качество, чистота и количество нуклеиновых кислот относятся к наиболее важным факторам ПЦР анализа, влияющим на результаты исследования (Ребриков Д.В, 2013).

Оптимальный метод выделения ДНК из чистой культуры *A. citrulli* определяли с помощью последующей постановки классической ПЦР и ПЦР «в реальном времени» с праймерами AACF3, AACR2 и зондом. При постановке классической ПЦР была использована серия 10-кратных последовательных разведений чистых культур четырех штаммов изучаемого возбудителя. ПЦР «в реальном времени» позволяет не только качественно, но и количественно оценить используемые методы выделения ДНК. По окончании ПЦР в режиме реального времени для каждого образца определялось значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекала линию порога (Threshold). Величина порогового цикла тесно связана с начальным количеством ДНК: чем больше ДНК было внесено в реакцию, тем раньше наступал пороговый цикл. Таким образом, при одинаковом внесении количества ДНК в исследуемый образец (5 мкл), можно судить о качестве его экстракции разными методами. В данном эксперименте проводили выделение ДНК в трехкратной повторности при одной концентрации бактериальных клеток четырех штаммов возбудителя *A. citrulli* – 10^5 КОЕ/мл.

Таблица 4

Сравнение чувствительности методов выделения ДНК из чистой культуры возбудителя *A. citrulli* методом ПЦР «в реальном времени»

Штаммы <i>A. citrulli</i>	Значение порогового цикла (Ct) при разных методах выделения ДНК						
	«НК-М-Сорб»	«Проба ГС»	«Кипячение»	«ДНК-Экстран-3»	«ДНК-Экстран-4»	«DNeasy Kit»	Tecan Freedom EVO
51	19,1 ± 0,29	18,3 ± 0,33	18,8 ± 0,13	22,0 ± 0,13	27,8 ± 0,20	14,6 ± 0,29	19,8 ± 0,11
2609	19,6 ± 0,07	18,1 ± 0,24	19,3 ± 0,33	21,3 ± 0,47	28,7 ± 0,31	15,6 ± 0,13	19,2 ± 0,11
2726	19,9 ± 0,24	17,9 ± 0,13	18,9 ± 0,49	20,9 ± 0,38	26,0 ± 0,58	16,6 ± 0,16	19,3 ± 0,18
3000	19,5 ± 0,13	18,3 ± 0,24	19,5 ± 0,36	20,7 ± 0,18	26,2 ± 0,60	15,8 ± 0,58	19,2 ± 0,49
К-	N/A*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Примечание: представлены средние значения

К- отрицательный контроль (H₂O)

N/A*– отсутствие сигнала флуоресценции

Из результатов, представленных в таблице 4 видно, что самое низкое значение порогового цикла (максимальная концентрация ДНК) имели образцы, выделенные с

помощью набора «DNeasyKit». Самое высокое значение порогового цикла (минимальная концентрация ДНК) имели образцы, пробоподготовка которых была проведена набором «ДНК-Экстран-4», что очевидно связано с меньшим количеством ДНК, которое было внесено в образец. Величина порогового цикла образцов, ДНК которых была экстрагирована методами «Проба ГС», кипячение, Tecan Freedom EVO, «НК-М-Сорб», и «ДНК-Экстран-3», была примерно одинакова. В целом результаты, полученные в ходе сравнения чувствительности методов выделения ДНК из чистой культуры всех штаммов *A. citrulli* методом ПЦР в «реальном времени», подтверждают достоверность результатов, полученных в опыте методом классической ПЦР, где самым чувствительным также оказался набор «DNeasyKit». При использовании данного набора возбудитель *A. citrulli* был обнаружен во всех трех повторностях, начиная с концентрации бактерий 10^2 КОЕ/мл.

Подбор специфичных праймеров, определение их чувствительности, специфичности и оптимизация условий ПЦР для выявления и идентификации *A. citrulli*.

Использование в диагностике универсальных праймеров к 16S рибосомальной РНК (таких как 8UA, 519B) не позволяет идентифицировать бактерию до вида. В связи с этим, а также для расширения возможности исследования при диагностике *A. citrulli* возникла необходимость в использовании специфических праймеров.

Для подбора специфических праймеров была использована нуклеотидная последовательность бактерии *A. citrulli* депонированная в ГенБанке Национального центра биотехнологической информации (NCBI) под номером HQ258979.1. В результате был подобран ряд праймеров к различным участкам генома бактерии.

AC-1 F; 5'-ATGGTGTGTTCTTCGGGACC-3';

AC-1 R; 5'-ATCGGCGATCTCTTCGTGTC-3';

AC-2 F; 5'-GCTCTGGCTACAAAAACGCC-3';

AC-2 R; 5'-GCTTTCGTAGGGTCTGGCAT-3';

AC-3 F; 5'-AGCCCTTCATTGACGGCTAC-3';

AC-3 R; 5'-TTGCATCTGCGTCTGGAGAG-3';

Праймеры AC-1 F/R были подобраны к участку гена ингибитора рибонуклеаз (ribonuclease inhibitor) с планируемым размером продукта 140 п.о.

Праймеры AC-2 F/R были подобраны к участку, кодирующему фермент транспозазу (transposase) с планируемым размером продукта 155 п.о.

Праймеры AC-3 F/R были также подобраны к участку, кодирующему фермент транспозазу, с планируемым размером продукта 680 п.о.

Далее была определена оптимальная температура отжига праймеров, затем проверена их подлинность, специфичность и чувствительность.

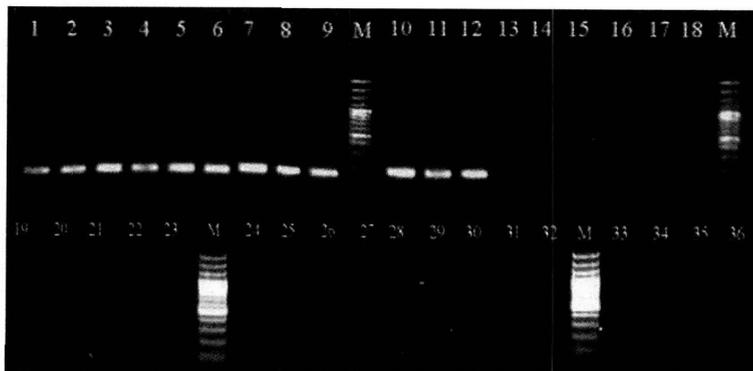


Рисунок 7. Электрофореграмма продуктов амплификации при проверке подлинности и отработке температуры отжига праймеров AC-1 F/R, AC-2 F/R, AC-3 F/R

- 1 – 6 – праймеры AC-1 F/R с положительным контролем;
- 7 – 12 – праймеры AC-2 F/R с положительным контролем;
- 13 – 18 – праймеры AC-3 F/R с положительным контролем;
- 19 – 24 – праймеры AC-1 F/R с отрицательным контролем;
- 25 – 30 – праймеры AC-2 F/R с отрицательным контролем;
- 31 – 36 – праймеры AC-3 F/R с отрицательным контролем;
- M – маркер длины продукта ПЦР.

При оптимизации температуры отжига для образцов были использованы следующие варианты температур:

№ образца	Температура отжига
1, 7, 13, 19, 25, 31	48°C
2, 8, 14, 20, 26, 32	51°C
3, 9, 15, 21, 27, 33	54°C
4, 10, 16, 22, 28, 34	57°C
5, 11, 17, 23, 29, 35	50°C
6, 12, 18, 24, 30, 36	63°C

Из рисунка 7 следует, что при диагностике возбудителя *A. citrulli* методом классической ПЦР с праймерами AC-1 F/R и AC-2 F/R температура отжига в пределах 48°C – 63°C позволяла амплифицировать искомый продукт размерами 140 и 155 п.о. соответственно. В ходе дальнейших исследований с данными парами праймеров была использована температура отжига 63°C. Праймеры AC-3 F/R оказались непригодны для диагностики возбудителя, поскольку в процессе амплификации специфичный продукт длиной 680 п.о. не образовался. В связи с этим данная группа праймеров не использовалась в дальнейших исследованиях.

На следующем этапе для каждой пары подобранных праймеров проводили оценку специфичности.

В серии опытов по изучению специфичности праймеров AC-2 F/R в процессе амплификации происходил синтез неспецифичной ДНК, поэтому данная пара праймеров непригодна для выявления и идентификации *A. citrulli*.

Из рисунка 8 следует, что образование неспецифических продуктов реакции при постановке ПЦР с праймерами AC-1 F/R, не наблюдалось. В результате реакции был получен продукт искомого размера 140 п.о. Данная пара праймеров также обладала высокой чувствительностью, что в ходе наших исследований позволяло обнаружить *A. citrulli* в концентрации до 10^2 КОЕ/мл (рис. 9).

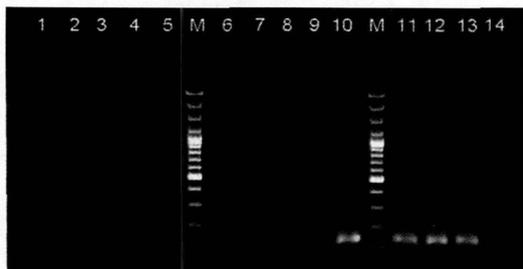


Рисунок 8. Проверка специфичности праймеров AC-1 F/R

- | | |
|--|--|
| 1. <i>Ps. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> | 9. <i>R. solanacearum</i> ; |
| 2. <i>X. campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i> | 10. <i>A. citrulli</i> 51; |
| 3. <i>X. fragariae</i> ; | 11. <i>A. citrulli</i> 2609; |
| 4. <i>E. amylovora</i> MOE1 ; | 12. <i>A. citrulli</i> 2726; |
| 5. <i>E. amylovora</i> VRE3 ; | 13. <i>A. citrulli</i> 3000; |
| 6. <i>Ps. syringae</i> var. <i>syringae</i> 1; | 14. Отрицательный контроль (H ₂ O); |
| 7. <i>Ps. syringae</i> var. <i>syringae</i> 2; | M – маркер длины продукта ПЦР. |
| 8. <i>P. stewartii</i> ; | |

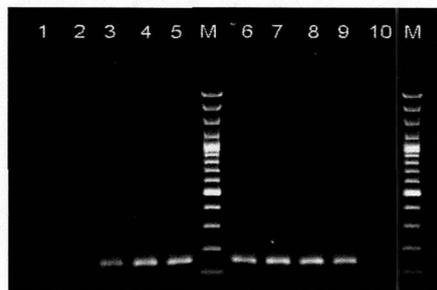


Рисунок 9. Электрофореграмма продуктов амплификации при проверке чувствительности праймеров AC-1 F/R.

- | | |
|-------------|--|
| 1. – 10^1 | 7. – 10^7 |
| 2. – 10^2 | 8. – 10^8 |
| 3. – 10^3 | 9. – 10^9 |
| 4. – 10^4 | 10. Отрицательный контроль (H ₂ O); |
| 5. – 10^5 | M – маркер длины продукта ПЦР. |
| 6. – 10^6 | |

В ходе опытов было показано, что только одна из подобранных пар праймеров – AC-1 F/R обладает высокой специфичностью и чувствительностью по отношению к *A. citrulli*. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования пары праймеров AC-1 F/R при проведении фитосанитарной экспертизы для выявления и идентификации *A. citrulli*, расширяет возможности специалистов и лабораторий при проведении диагностики данной бактерии.

Изучение влияния метаболитов гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 на *A. citrulli*.

Впервые изучено влияние КЖ *Tr. harzianum* Rifai F-180 на рост культуры *A. citrulli*. Результаты экспериментов представлены на рисунках 10 и 11.

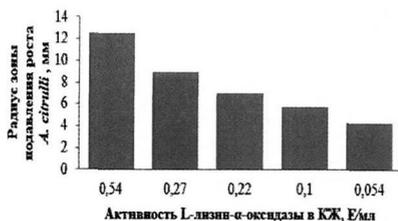


Рисунок 10. Зависимость радиуса зоны подавления роста *A. citrulli* на среде King B от активности ЛО в культуральной жидкости *Tr. harzianum* Rifai F-180.



Рисунок 11. Влияние КЖ *Tr. harzianum* Rifai F-180 с разной активностью ЛО на рост бактерии *A. citrulli* на среде King B.

При анализе полученных результатов, можно сделать вывод, что КЖ гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 с изучаемой активностью оказывает ингибирующее действие на фитопатогенную бактерию *A. citrulli*.

При сравнении результатов исследования, следует отметить, что КЖ *Tr. harzianum* Rifai F-180 с активностью ЛО в 0,054 Е/мл в отношении *A. citrulli* была выше, чем в отношении *E. amylovora*.

Изучение действия фермента L-лизин-α-оксидазы гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 показало, что фермент с активностью 10,0 и 5,0 Е/мг подавляет рост бактерии *A. citrulli*.

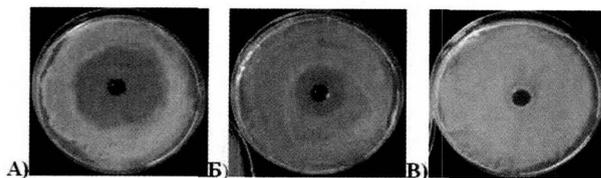


Рисунок 12. Влияние ЛО *Tr. harzianum* Rifai F-180 на рост *A. citrulli* на среде King B: А) активность ЛО 10,0 Е/мг, Б) активность ЛО 5,0 Е/мг, В) контроль.

Таким образом, основываясь на результатах проведенных исследований, можно сделать вывод о наличии ингибирующих свойств метаболитов гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 в отношении особо опасной фитопатогенной бактерии *A. citrulli*.

ВЫВОДЫ

1) Осуществлен выбор особо опасных для Российской Федерации фитопатогенных бактерий: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow and *Acidovorax citrulli* Schaad et al. Впервые с помощью ГИС определены возможные зоны их распространения и вредоносности на территории Российской Федерации.

2) Изучен рост культуры *A. citrulli* в динамике на средах разного состава. Оптимальными условиями для роста *A. citrulli* является среда King B при температуре 37°C и времени культивирования до 42ч.

3) Впервые в Российской Федерации применены серологические методы диагностики *A. citrulli*: РНИФ и сэндвич-метод ИФА (DAS ELISA). Оптимальная рабочая концентрация антител при проведении РНИФ – 1/8000. ИФА позволяет выявлять в исследуемом материале бактерии *A. citrulli* в количестве 10⁴ КОЕ/мл.

4) Исследованы разные методы выделения ДНК для постановки классической ПЦР и ПЦР «в реальном времени». Оптимальным методом выделения ДНК бактерии *A. citrulli* штаммов 51, 2609, 2726, 3000 из чистых культур и зараженного растительного материала является пробоподготовка с использованием набора «DNeasyKit».

5) Впервые подобрана и успешно апробирована специфичная пара праймеров AC-1 F/R для выявления и идентификации возбудителя *A. citrulli*:

AC-1 F; 5'-ATGGTGTGTTCTTCGGGACC-3';

AC-1 R; 5'-ATCGGCGATCTCTTCGTGTC-3';

6) Впервые доказано ингибирующее действие метаболитов гриба *Tr. harzianum* Rifai F-180 с активностью ЛО 0,054 Е/мл в отношении фитопатогенных бактерий *E. amylovora* и *A. citrulli*.

Практические рекомендации

1. Впервые с помощью ГИС составлены карты и определены территории Российской Федерации, подверженные опасности акклиматизации и распространения фитопатогенных бактерий *A. citrulli* и *E. amylovora*. Данные карты целесообразно использовать для проведения мероприятий по предупреждению распространения, защите и борьбе с этими фитопатогенными бактериозами.

2. При проведении фитосанитарной экспертизы для выявления и идентификации бактерии *A. citrulli* методом ПЦР рекомендуется использовать специфичную пару праймеров AC-1 F/R.

3. По результатам исследований Каримовой Е.В. в соавторстве с Шнейдер Е.Ю. были разработаны Методические рекомендации по выявлению и идентификации карантинных вредных организмов по теме: Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* (Shaad et al.). Удк 57 (094), № госрегистрации 115081710028. Инв. № 67-2015 МР ВНИИКР. Москва 2015.

4. Доказанное ингибирующее действие продуктов метаболизма *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 в отношении фитопатогенных бактерий – *E. amylovora* и *A. citrulli* открывает новые возможности применения штамма-продуцента L-лизин- α -оксидазы.

Используемые в автореферате сокращения

1. ГИС – географическая информационная система
2. ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
3. ЕАЭС – Евразийский экономический союз
4. ИФА – иммуноферментный анализ
5. КЖ – концентрат культуральной жидкости
6. КОЕ – колониеобразующая единица
7. ЛО – L-лизин- α -оксидаза
8. по – пары оснований
9. ПЦР – полимеразная цепная реакция
10. РНИФ – реакция непрямой иммунофлюоресценции
11. рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Каримова Е.В. Новое бактериальное заболевание тыквенных культур / Каримова Е.В. // Защита и Карантин растений. – 2012. - № 6. - С.35 – 36
2. Каримова Е.В. Возбудители бактериозов растений, включенные в сигнальный Список ЕОКЗР / Каримова Е.В., Александров И.Н., Шнейдер Е.Ю. // Защита и Карантин растений. – 2012. - № 12. - С. 27 – 32.
3. Каримова Е.В. Новые бактериальные болезни картофеля и тыквенных культур / Каримова Е.В., Александров И.Н., Шнейдер Е.Ю. // Сборнике материалов Международной научной конференции «Современные проблемы общей паразитологии». - Москва. - 2012. - С. 153 – 156.
4. Каримова Е.В. Возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* / Каримова Е.В., Смирнова И.П. // Карантин растений. Наука и практика. - 2013. - №1. - С. 14 – 22.
5. Каримова Е.В. Микроорганизмы, вызывающие карантинные для Российской Федерации бактериальные болезни растений / Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А., Заец В.Г., Смирнова И.П. // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: агрономия и животноводство. - 2013. - №2. - С. 27 -37.
6. Каримова Е.В. Изучение эффективности L-лизин- α -оксидазы и биологических пестицидов в отношении возбудителей бактериальных болезней / Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А., Смирнова И.П. // Проблемы медицинской микологии. - 2013. - Том 15. - № 2. - С. 82 – 83.
7. Каримова Е.В. Прогнозирование распространения возбудителя бактериального ожога плодовых культур / Каримова Е.В., Шнейдер Е.Ю., Смирнова И.П. // Защита и Карантин растений. - 2013. - № 9. - С. 40 – 43.
8. Каримова Е.В. Возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* и методы его диагностики / Каримова Е.В. Шнейдер Ю.А. Смирнова И.П. // Третий всероссийский съезд по защите растений. Сборник

Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем. С.-Петербург, 16-20 декабря 2013.-Том 2.-С.434 – 436.

9. Каримова Е.В. Использование современных технологий в прогнозировании распространения карантинных заболеваний (на примере *Erwinia amylovora*) /Каримова Е.В., Шнейдер Е.Ю., Смирнова И.П.// Карантин растений. Наука и практика.- 2013.- №4 (6).- С. 12 – 20.

10. Каримова Е.В. Изучение действия L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma harzianum* в отношении фитопатогенных микроорганизмов / Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А., Смирнова И.П., Березов Т.Т.// Проблемы медицинской микологии.- 2014.-Том 16.- №2.- С. 83.

11. Каримова Е.В. Действие метаболитов *Trichoderma harzianum* Rifai F180 в отношении фитопатогенных микроорганизмов / Каримова Е.В., Смирнова И.П., Шнейдер Ю.А. // Материалы Международной научно практической конференции «Инновационные технологии биологических средств защиты растений в производстве органической сельскохозяйственной продукции». Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем.- 2014.- вып.8.- Краснодар.-С. 235.

12. Каримова Е.В. Прогнозирование зон возможной вредоносности бактериальной пятнистости тыквенных культур / Каримова Е.В., Лозовая Е.Н.// Защита и Карантин растений.- 2015.-№4.-С. 39 – 41.

13. Шнейдер Ю.А. Ингибирующая способность L-лизин- α -оксидазы гриба *Trichoderma harzianum* Rifai и оценка при воздействии на фитопатогены / Шнейдер Ю.А., Смирнова И.П., Каримова Е.В., Приходько Ю.Н.// Проблемы медицинской микологии.- 2015.- Том 17.- №2.- С. 153 – 154.

14. Каримова Е.В. Изучение влияния L-лизин- α -оксидазы на возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli*. / Каримова Е.В., Смирнова И.П. //Russian agricultural science review.- 2015.-Том 6.- №6-2.-С. 34 – 35.

Методические рекомендации:

1. Шнейдер Е.Ю., Каримова Е.В. Отчет о научно-исследовательской работе. Разработка методических рекомендаций по выявлению и идентификации карантинных вредных организмов по теме: Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli* (Shaad et al.). Удк 57 (094), № госрегистрации 115081710028. Инв. № 67-2015 МР ВНИИКР. Москва 2015.

Патенты:

1. Смирнова И.П., Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А. Ингибитор возбудителя бактериального ожога плодовых культур (*Erwinia amylovora*) (патент РФ № 2493247) Публикация патента: Бюллетень Роспатента «Изобретения, полезные модели» №26. 20.09.2013

2. Смирнова И.П., Каримова Е.В. Продуцент ингибитора возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур (*Acidovorax citrulli*) Патент № 2535983 (Р.Ф; Изобретение), Бюллетень Роспатента «Изобретения, полезные модели» № 35, 20.12.2014г.

3. Заявка на патент: Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А., Смирнова И.П. Регистрационный № 2012105552/Набор праймеров для выявления возбудителя *Acidovorax citrulli* и способ выявления возбудителя *Acidovorax citrulli* от 18.02.2016.

Каримова Елена Владимировна (Российская Федерация)
Влияние метаболитов *Trichoderma harzianum* Rifai – продуцента
L-лизин- α -оксидазы на фитопатогенные микроорганизмы

На основании анализа литературных источников был осуществлен выбор особо опасных для РФ возбудителей бактериальных заболеваний растений, которыми являются *E. amylovora* и *A. citrulli*. Впервые определены территории РФ, подверженные опасности распространения данных патогенов. Проведено изучение условий культивирования *A. citrulli*, отработаны серологические и молекулярно-генетические методы его диагностики, разработана и успешно апробирована специфичная пара праймеров AC-1 F/R, которая может быть использована при проведении фитосанитарной экспертизы для выявления и идентификации данного фитопатогена. В работе проведено изучение действия метаболитов гриба *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 в отношении фитопатогенных бактерий. Установлено ингибирующее действие культуральной жидкости *Tr. harzianum* Rifai F-180 с активностью L-лизин- α -оксидазы 0,054 Е/мл в отношении *E. amylovora* и *A. citrulli*.

Karimova Elena V (Russian Federation)
Effect of metabolites of *Trichoderma harzianum* Rifai producing L-lysine- α -oxidase on
phytopathogenic microorganisms

Based on the analysis of the literature was carried out for the selection of highly dangerous bacterial diseases of plants for Russian Federation, these are *E. amylovora* and *A. citrulli*. For the first time defined the territory of the Russian Federation, endangered spread of these pathogens. The study of cultural properties of *A. citrulli*, worked serological and molecular genetic methods of diagnostics, developed and successfully tested a pair of specific primers - AC-1 F / R, that can be used during the phytosanitary expertise for the detection and identification of phytopathogen. In work carried out to study the action of metabolic products of *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 against phytopathogenic microorganisms. Established the inhibitory effect of culture fluid of *Tr. harzianum* Rifai F-180 with the activity of L-lysine- α -oxidase 0,054 U / ml against *E. amylovora* and *A. citrulli*.

Подписано в печать: 11.06.2016
Объем: 1,0 п.л.
Тираж 100 экз. Заказ № 693
Отпечатано в типографии «Реглет»
119526, г. Москва, пр-т Вернадского, д.39
(495)363-78-90; www.reglet.ru