

УДК 632.3.01/08:579.841.11

АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *PSEUDOMONAS CORRUGATA*

О. И. НИКОЛАЕВА, О. Н. НОСОВА

(Кафедра фитопатологии)

Сообщаются результаты серологических исследований, проведенных с целью получения антисыворотки к бактериям *Pseudomonas corrugata*. Установлено, что штаммы *P. corrugata* различаются по степени иммунологического родства.

В последние годы чрезвычайно возросла распространенность бактериальных болезней сельскохозяйственных культур. В настоящее время уже трудно представить себе какие-либо виды растений, которые не поражались бы бактериями. Возбудителем одного из таких заболеваний является *Pseudomonas corrugata* Roberts a. Scarlett [8]. Впервые оно было установлено исследователями в конце 50-х годов в Великобритании на тепличных растениях томата. К симптомам заболевания относятся: неспецифический хлороз и увядание листьев, побурение сердцевины стебля, образование глубоких трещин, чаще всего в нижней части стебля, и выступание беловато-мутных капелек в местах поражения. В 70-е годы развитие болезни в этой стране настолько усилилось, что она приобрела уже эпифитотийный характер.

У нас подобное заболевание было обнаружено в конце 80-х годов [4], а в настоящее время встречается почти во всех тепличных хозяйствах страны (в Кемеровской, Московской, Саратовской и других областях).

Исследования, проведенные авто-

рами этого сообщения, показали, что первые признаки бактериоза томата проявляются в период формирования плодов на 3-й кисти. Затем поражение паренхимы и сосудистой системы усиливается и через 2—3 нед после проявления первых симптомов большинство растений обычно погибает. Особенно быстрое распространение болезни у томатов наблюдалось при гидропонной культуре. Идентификация ряда штаммов проводилась нами по совокупности признаков: по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам возбудителя, а также по симптомам проявления болезни [3]. Полученные результаты соответствовали ранее описанным в ряде работ [5, 6, 8 и др.], что дало возможность отнести возбудителя некроза сердцевины стебля томата к *Pseudomonas corrugata* Roberts a. Scarlett. В данном сообщении приводятся результаты серологических исследований, проведенных с целью определения антигенных свойств и специфичности штаммов возбудителя.

Методика

Кролик иммунизировали сус-пензией живых клеток возбудителя

(штаммы 17, IV, 43) в физиологическом растворе. При этом использовали 2 схемы иммунизации: общепринятую [1], включающую 4 внутривенные инъекции с интервалом 5—6 дней при нарастающем количестве вводимого антигена, и схему, предложенную нами, комбинированную, включающую 7 инъекций. В этом случае первая иммунизация (антиген+адьювант) проводилась подкожно. В качестве адьюванта применяли Bayol F и Aglasec A фирмы «Seriva» в соотношении 85:15 (по объему). Последующие 6 инъекций в возрастающих дозах были внутривенными. Кровь брали утром до кормления животных путем надреза краевой вены уха лезвием бритвы. Обработывали ее по общепринятой методике [1].

Реиммунизацию осуществляли дополнительными инъекциями в брюшину кролика через 2—3 нед после последнего введения суспензии 3 раза: 2 раза по 1,5 млрд микробных клеток, 1 раз по 2,0 млрд. Интервалы между инъекциями — 1 нед.

Для изучения серологических свойств штаммов ставили макроскопическую реакцию агглютинации в пробирках и реакцию преципитации в агаровом геле в чашках Петри [1, 2, 7].

Результаты

При использовании 1-й (общепринятой) схемы иммунизации пос-

ле пробного взятия крови проводилась пробная оценка полученной антисыворотки методом макроскопической агглютинации. В результате было установлено, что данная схема не обеспечивает получение антисыворотки с высоким титром. Реакция с гомологичными сыворотками штаммов *P. corrugata* 17 и IV не прослеживалась, а штамма 43 — была слабо заметна и наблюдалась только при низких разведениях. Для повышения титра сыворотки мы провели реиммунизацию, однако желаемого результата, т. е. повышения титра сывороток, достигнуть не удалось (табл. 1). Очевидно, это можно объяснить тем, что антигены *P. corrugata* весьма слабые.

В связи с указанным нами была предпринята еще одна попытка получения сыворотки высокого титра с использованием адьюванта. Полученные результаты не удовлетворяли требованиям, предъявляемым к антисывороткам бактериальных препаратов, для которых высокая чувствительность реакции достигается только при титре антисыворотки не ниже 1:6400. В нашем случае наблюдалась четкая агглютинация с выпадением хлопьеидного осадка лишь при взаимодействии штамма 43 с гомологичной антисывороткой до разведения ее в 1600 раз. После оценки сыворотки провели реиммунизацию по предлагаемой нами методике.

Таблица 1

Результаты реакции агглютинации с гомологичными антисыворотками, полученные по 1-й схеме иммунизации после реиммунизации

| Штамм | Разведение антисыворотки (титр) | | | | | | | | | |
|----------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|----------|----------|
| | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 | 1:6400 | 1:12 800 | 1:25 600 |
| Р. с. 17 | 3+ | 2+ | 2+ | + | — | — | — | — | — | — |
| IV | 3+ | 3+ | 2+ | + | — | — | — | — | — | — |
| 43 | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | + | — | — | — | — | — |

Результаты реакции агглютинации с гомологичными антисыворотками, полученные по схеме 2-й иммунизации после реиммунизации

| Штамм | Разведение антисыворотки (титр) | | | | | | | | | |
|----------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|----------|----------|
| | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 | 1:6400 | 1:12 800 | 1:25 600 |
| Р. с. 17 | 3+ | 2+ | + | ± | — | — | — | — | — | — |
| IV | 3+ | 3+ | 2+ | + | ± | — | — | — | — | — |
| 43 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | + | ± | ± | — |

Из табл. 2 видно, что антисыворотка, полученная к штамму 43, представляет наибольший интерес для дальнейшей работы, так как дает реакцию агглютинации в пробирках в разведении до 1:12 800. Именно поэтому она и была применена нами для дальнейшей работы.

Используя сыворотку к штамму 43, мы провели реакцию с ней различных штаммов *P. corrugata* с целью изучения их антигенной специфичности и степени иммунологического родства методом преципитации в агаре (табл. 3).

Как видно из табл. 3, степень иммунологического родства штаммов *P. corrugata* различна. Напри-

мер, у штаммов 12, 34 и IV выявлено полное серологическое родство со штаммом 43, поскольку в этом случае при взаимодействии их с антисывороткой наблюдалась картина полной идентичности — слияние полос преципитации.

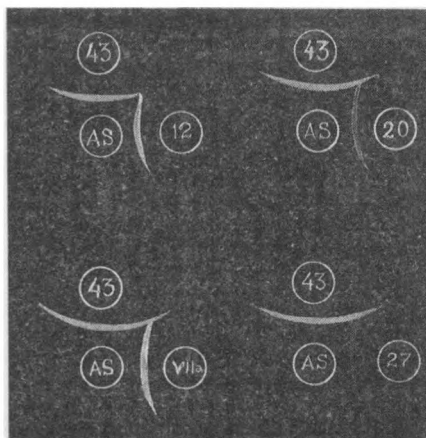
У штаммов 20, 40 и 145 также можно предположить серологическое родство, так как дуга штамма 43 не пересекает их дуги, однако последние расплывчаты, хотя и однородны (не образуют несколько зон), что указывает на различную скорость диффузии частиц, возможно, эти штаммы сходны со штаммом 43.

У штамма VIIa мы наблюдали

Таблица 3

Результаты реакции преципитации в агаре различных штаммов *P. corrugata* с сывороткой, иммунной к штамму 43 того же возбудителя

| Штамм, изолят | Происхождение (совхоз) | Результат реакции | Характеристика результатов | | |
|---------------|---------------------------------------|-------------------|----------------------------|----------------------|---------------------|
| | | | дуга | степень идентичности | проявление |
| 43 | «Белая Дача», г. Москва | + | Четкая | Полная | 1 зона преципитации |
| 12 (15) | Им. Горького, г. Москва | + | » | » | То же |
| 34 | Гомельская овощная фабрика, г. Гомель | + | » | » | » » |
| IV | «Белая Дача», г. Москва | + | » | » | » » |
| 20 | «Московский», Московская обл. | + | Нечеткая | » | » » |
| 40 | «Рига», г. Рига | + | » | » | » » |
| 145 | «Калтанский», Кемеровская обл. | + | » | » | » » |
| VIIa | «Белая Дача», г. Москва | + | Четкая | Частичная | » » |
| 27 | «Московский», Московская обл. | + | Нечеткая | » | » » |
| 53 | ГДР, Ин-т защиты растений | + | » | » | » » |
| 1518 | «Ленинградский», г. Ленинград | + | » | » | » » |
| 11 | «Красногорский», г. Киров | — | | | |



Степень иммунологического родства некоторых штаммов *P. corrugata*.

четкую линию, но дуга штамма 43 прошла дальше точки пересечения с линией штамма VIIa, образуя фигуру в виде шпоры. Это свидетельствует о том, что не все антитела, имеющиеся в антисыворотке к штамму 43, связаны с линией преципитации, которая возникает при реакции с антигеном штамма VIIa.

Дуга преципитации штамма 43 уходит дальше места пересечения с полосами реакции штаммов 27, 53, 1518, однако их дуги расплывчаты из-за неравномерной диффузии частиц.

И, наконец, в одном случае сыворотка к штамму 43 не прореагировала на бактериальную суспензию штамма 11.

На основании приведенных данных можно заключить, что полученной нами сывороткой к штамму 43 можно выявить практически все штаммы, однако картины диффузии в агаре различны из-за неполной

серологической однородности (рисунок).

Заключение

Результаты серологических исследований показали, что общепринятая схема иммунизации для получения антисыворотки к бактериям *P. corrugata* непригодна. Нами предложена и опробована комбинированная схема иммунизации с применением адъюванта и последующей реиммунизацией. При постановке реакции преципитации в агаре установлено, что штаммы *P. corrugata* различны по степени иммунологического родства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельтюкова К. И., Матышевская М. С., Куликовская М. Д., Сидоренко С. С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений.— Киев: Наукова думка, 1968.—
2. Израильский В. П. Руководство для изучения бактериальных болезней растений / Изд. 3-е, перераб. и доп.— М.: Колос, 1968.—
3. Носова О. Н. Некроз сердцевины стебля томата и обоснование приемов защиты.— Автореф. канд. дис.— М., 1990.—
4. Попкова К. В., Носова О. Н. Некроз сердцевины стебля томата.— Защита растений, 1989, № 7, с. 22.—
5. Флетчер Дж. Т. Борьба с болезнями растений в теплицах.— М.: ВО «Агропромиздат», 1987, с. 160—161.—
6. Naumann K.— Nachr. Bl. Pflanzenschutz DDR. Berlin, 1980, Jg. 34, H. 11, S. 227—231.—
7. Naumann K., Zielke R., Pistrick E. e. a.— Zbl. Mikrobiol., 1984, Bd. 139, S. 173—194.—
8. Scarlett C. M., Fletcher J. T., Roberts P., Lelliott R. A.— Ann. Arrol. Biol., 1978, vol. 88, N 1, p. 105—114.

Статья поступила 21 марта 1991 г.

SUMMARY

Results of serological investigations conducted for producing antiserum to *Pseudomonas corrugata* bacteria are presented. It has been found that *P. corrugata* strains differ in the extent of immunologic relationship.