

УДК 653.342:632.35:635.342

ДОСТОВЕРНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ЗАРАЖЕННОСТИ СЕМЯН КАПУСТЫ СОСУДИСТЫМ БАКТЕРИОЗОМ

Ф.С.ДЖАЛИЛОВ

(Кафедра фитопатологии)

Приводятся результаты диагностики зараженности семян 58 партий белокочанной и цветной капусты сосудистым бактериозом иммуноферментным и иммунофлуоресцентным методами, а также выделением возбудителя на селективную питательную среду. Показана высокая достоверность отрицательного результата при иммунофлуоресценции и положительного результата при выделении патогена на селективную среду. Доказана вероятность как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов при иммуноферментном анализе. Для практической диагностики предложена экономичная двухступенчатая процедура анализа семенных экстрактов.

Сосудистый бактериоз относится к наиболее распространенным и опасным заболеваниям капусты. Изучение факторов вредности сосудистого бактериоза показало, что у зараженных растений заметно снижаются урожай кочанов, их пищевая ценность, а также семенная продуктивность. Поражение кочанов способствует росту восприимчивости к слизистому бактериозу, вследствие чего

ухудшается лежкость в период хранения [3].

Возбудитель заболевания — бактерия *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dows (X.c.c.) может передаваться с семенами. Даже слабая зараженность партий семян способна при благоприятных условиях вызвать эпифитотию.

Успешная борьба с заболеванием, на наш взгляд, невозможна

без разработки и внедрения в систему сертификации семян капусты чувствительных методов диагностики зараженности сосудистым бактериозом. При оценке пригодности различных методов диагностики семенной инфекции необходимо учитывать, что, применяя любой из существующих методов, нельзя быть уверенным, что при отрицательном результате анализа в исследуемых партиях семян нет ни одного зараженного семени. Важно, чтобы эти методы позволяли обнаруживать тот минимальный уровень зараженности, который при благоприятных условиях может привести к массовому развитию заболевания. Считается, что минимальный уровень диагностируемой зараженности должен составить 0,02—0,03%, так как посев партий семян с зараженностью 0,03% вызывает эпифитотийное развитие болезни, а при зараженности семян 0,01% заболевание в поле практически не обнаруживается [11].

Самым простым методом является учет визуальных симптомов на семядольных листочках при прорастивании семян [12]. Однако он имеет 2 существенных недостатка: во-первых, это его большая трудоемкость, поскольку требуется прорастивание не менее 5—10 тыс. семян в каждом образце для выявления потенциально опасного уровня зараженности (0,03%); во-вторых, симптомы на семядольных листочках могут не проявиться из-за наличия латентной инфекции [5] либо они могут маскироваться при поражении проростков грибами [4].

Микробиологическое выделение возбудителя из семян на обычных питательные среды малопригодно для целей практической диагностики, так как при этом требуется видовая идентификация колоний, а достоверность полученных результатов сильно зависит от соотношения между численностью клеток возбудителя и сапротрофной микрофлоры семян. Более употребителен метод селективного микробиологического анализа (СМА) с использованием специальных сред SX и NSCA, содержащих крахмал и циклогексимид. Селективность выделения возбудителя определяется свойствами X.c.c. гидролизовать крахмал и расти при концентрации циклогексимида в среде 250 мг/л [10].

Перспективным является также использование современных серологических методов: реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и иммуноферментного анализа (ИФА). Эти методы позволяют достаточно быстро получать результаты. Всего 10 мкл иммунной сыворотки и один рабочий день требуются для проведения анализа. Достоверность полученных результатов в значительной мере зависит от специфичности используемых антител [12].

Нами была проанализирована достоверность результатов диагностики зараженности партий семян при использовании методов СМА, РИФ и ИФА.

Методика

Объектом испытаний служили семена 58 партий белокачанной и цветной капусты, предоставлен-

ных подмосковными овощеводческими хозяйствами и НИИОХ.

Экстрагирование Х.с.с. из семян проводили следующим образом: 3000 семян капусты (15 г) помещали в колбу Эрленмейера, заливали 25 мл стерильного 0,01 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и встряхивали 5 мин на ротаторе. Жидкость отделяли от семян фильтрованием через марлю, центрифугировали при 12500 г в течение 15 мин, осадок растворяли в 2 мл ФСБ. Срок хранения полученной суспензии в случае СМА не более 48 ч при 4°C, а для РИФ и ИФА — не более 2 мес при -18°C.

При СМА 0,1 мл неразведенного семенного экстракта, а также разведенного 1:10 и 1:100 высевали в чашки Петри на поверхность среды NSCA [10] в 4-кратной повторности. Засеянные чашки выдерживали в термостате при 30°C в течение 2—3 сут. После периода инкубации чашки проверяли на присутствие мелких желтых слизистых колоний, окруженных светлой зоной гидролиза крахмала. Выборочную проверку принадлежности этих колоний к Х.с.с. осуществляли пересевом на косяки глюкозодрожжевой среды YDC [9] с последующим тестом на патогенность.

ИФА проводили на полистироловых микроплатах фирмы «Dunaptech» в «сэндвич»-варианте. Оптимальные условия для анализа (концентрация антител для сенсibilизации лунок, разведение коньюгата, время инкубации и др.) были отработаны при тестировании чистой культуры воз-

будителя и описаны нами ранее [2].

Для постановки непрямого варианта РИФ 20 мкл экстракта семян наносили на предметное стекло, высушивали и фиксировали в 70% этаноле. Затем препараты последовательно обрабатывали иммунной кроличьей сывороткой, специфичной к Х.с.с., и ослиной сывороткой против глобулинов кролика, меченной ФИТЦ. Условия постановки РИФ, специфичность и чувствительность метода были предварительно изучены с чистыми культурами различных штаммов патогена [1]. Препараты просматривали в флуоресцирующей системе микроскопа «Аксиофот».

Результаты

Итоги диагностики методами ИФА, РИФ и СМА 58 партий семян белокочанной и цветной капусты представлены в таблице.

Результаты анализа 58 партий семян капусты на зараженность сосудистым бактериозом

Реакция в СМА	Прореагировали в тестах			
	РИФ		ИФА	
	+	—	+	—

Положительная — 21	21	0	12	9
Отрицательная — 37	5	32	7	30

Из 26 партий семян, давших положительный результат в РИФ, в 21 партии был выделен возбудитель на селективную питательную среду. Соответствие положительных результатов составило

80,8%, вероятность ложноположительных результатов РИФ — 19,2%. Ложноположительный результат в РИФ может быть обусловлен наличием перекрестных реакций между сывороткой к Х.с.с. и сапротрофными бактериями, находящимися на семенах, хотя использование поликлональных антител снижает подобный риск по сравнению с моноклональными [7]. Другой возможной причиной ложноположительного результата является реакция с сывороткой мертвых клеток Х.с.с. Известно, что с увеличением срока хранения семян происходит сдвиг в бактериальной популяции патогена в сторону увеличения числа мертвых клеток [6]. В этом случае возможна положительная реакция мертвых клеток в РИФ, в то время как концентрация живых клеток возбудителя находится за пределами чувствительности СМА.

Что касается соответствия отрицательных результатов РИФ и СМА, то оно было полным, т.е. возбудитель не был выделен в чистую культуру из всех 32 партий семян, давших отрицательный результат в РИФ. Учитывая также ранее установленный факт, что все испытанные штаммы патогена положительно реагировали с поликлональной сывороткой, специфичной к Х.с.с. [1], можно полагать, что вероятность получения ложноотрицательных результатов в РИФ крайне низка.

ИФА дал положительный результат при анализе 19 партий, из которых возбудитель был выделен лишь в 12, соответствие 63,2%, а отрицательный резуль-

тат показали 39 партий, из которых Х.с.с. не был обнаружен при СМА в 30 партиях, соответствие 76,9%. Таким образом, ИФА дал 36,8% ложноположительных результатов и 23,1% ложноотрицательных, что значительно превышает подобные показатели у РИФ. Меньшую пригодность ИФА для практической диагностики, вероятно, можно объяснить его меньшей чувствительностью по сравнению с РИФ. Так, нижний предел чувствительности метода составляет $5 \cdot 10^5$ — $5 \cdot 10^6$ клеток/мл, а у РИФ 10^3 — 10^4 клеток/мл [12].

Метод СМА обладал 100% достоверностью положительных результатов. Все 295 желтых, гидролизующих крахмал колоний, выборочно изолированных со среды NSCA, вызывали в тесте на патогенность развитие типичных симптомов сосудистого бактериоза на листьях капусты. Достоверность отрицательных результатов СМА зависит как от концентрации клеток возбудителя в семенном экстракте, так и от соотношения в нем количества клеток патогена к количеству клеток сапротрофных видов. Чем больше сапротрофной микрофлоры находится на семенах капусты, тем меньше достоверность отрицательного результата СМА. Это связано с необходимостью разведения семенных экстрактов, а также с наличием на поверхности семян капусты бактерий, подавляющих образование колоний Х.с.с. на питательных средах.

Из 58 испытанных партий семян 21 партия дала положитель-

ный результат в РИФ и СМА и может быть отнесена к «зараженным», 32 партии дали отрицательный результат в РИФ и СМА и могут быть отнесены к «здоровым». Пять партий с положительным результатом в РИФ и отрицательным — в СМА могут считаться «предположительно зараженными».

Аналогичное исследование, проведенное в США, также выявило 6 партий семян сомнительной зараженности, давших положительный результат в РИФ и отрицательный в СМА. Для выявления истинной зараженности этих партий в двух штатах были проведены полевые опыты с высевом по 100 тыс. семян каждой партии. Полевая проверка выявила зараженность сосудистым бактериозом лишь в одном образце [12].

Известно, что выбор того или иного метода диагностики зараженности зависит от поставленной задачи. Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что если решается задача поиска «здоровых» партий семян, например, для посева без предварительного протравливания, то следует использовать РИФ, дающую высокую достоверность отрицательных результатов. В тех же случаях, когда при семенном контроле необходимо выявить «зараженные» партии, целесообразнее прибегать к СМА.

Учитывая, что метод СМА требует больше времени для проведения и более громоздок по сравнению с РИФ, наиболее экономичной представляется двухступенчатая процедура тестирования

зараженности, когда экстракты семян вначале анализируют с помощью РИФ. При этом образцы, показавшие отрицательную реакцию, считаются здоровыми, а давшие положительную реакцию подвергаются СМА. В случае положительного результата СМА партии семян относят к зараженным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джалилов Ф.С. Диагностика возбудителя сосудистого бактериоза капусты белокачанной иммунофлуоресцентным методом. — Изв. ТСХА, 1986, вып. 2, с. 139—140. — 2. Джалилов Ф.С. Иммуноферментная диагностика зараженности семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза. — С.-х. биол., 1987, № 5, с. 48—50. — 3. Джалилов Ф.С., Тивари Р.Д., Монахос Г.Ф. Вредоносность сосудистого бактериоза капусты. — Изв. ТСХА, 1989, вып. 3, с. 69—72. — 4. Иванюк В.Г., Сильванович Н.А. О методах определения устойчивости капусты к сосудистому бактериозу. — Селекция и семеноводство, 1991, № 4, с. 19—20. — 5. Bain D.C. — *Phytopathology*, 1955, vol. 45, № 1, p. 55—56. — 6. Bandyopadhyay S., Chattopadhyay S.B. — *Indian J. of mycological research*, 1986, vol. 24, № 1, p. 57—63. — 7. Franken A.A.J.M. — *Netherl. J. of Plant Pathol.*, 1992, vol. 98, № 2, p. 95—106. — 8. Franken A.A.J.M. — *Netherl. of Plant Pathol.*, 1992, vol. 98, № 3, p. 169—178. — 9. Lelliott R.A., Stead D.E. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.* — Oxford etc.: Black weel sci. publ., 1987. —

10. *Schaad N.W., Kendrick R.* — № 1, p.91—92. — 12. *Schaad N.W.* — *Plant Disease*, 1982, vol. 66, № 10, p.885—890.
Phytopathology, 1975, vol. 65, № 9, p. 1034—1036. — 11. *Schaad N.W., Sitterly W.R., Humaydan H.* — *Plant Disease*, 1980, vol. 64, *Статья поступила 15 июня 1994 г.*

SUMMARY

Results of diagnosing the contamination with vasobacteriosis in seed of 58 lots of cabbage and cauliffower using immunoenzyme and immunofluorescent methods, as well as by allocating the agent on selective nutrient medium are presented. High reliability of a negative result with immunofluorescence and of a positive result with allocating the pathogene on selective medium is shown. The probability of both false-negative and false-positive results with immunoenzyme analysis is proved. For practical diagnosing a cost-effective two-stage procedure of making analysis of seed extracts is suggested.