

УДК 632.35/.07:653.34

ДИАГНОСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

Ф. С. ДЖАЛИЛОВ
(Кафедра фитопатологии)

Материал и методы

Сосудистый бактериоз — широко распространенный и вредоносное заболевание капусты белокочанной. Его возбудитель — бактерия *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dows в основном передается с семенами. В связи с этим диагностике зараженности семян капусты необходимо уделять особое внимание.

В настоящее время зараженность семян определяют в основном после проращивания по визуальным симптомам на семядольных листочках. Этот метод имеет два существенных недостатка: во-первых, он громоздок и требует проращивания не менее 5—10 тыс. семян на каждый образец, во-вторых, ко времени учета (8—10 дней после посева) не у всех зараженных растений проявляются симптомы болезни, так как инфекция может находиться в скрытой форме [5].

При выращивании патогена из семян на питательной среде сложно проводить видовую идентификацию изолированных культур. К тому же эффективность метода бактериологического посева зависит от наличия сапрофитной микрофлоры. Поэтому тест на патогенность пока является единственным практически доступным методом. Однако при его использовании требуется 12—15 дней для формирования типичных симптомов на восприимчивых сортах капусты.

Для диагностики бактериальных болезней весьма перспективно применение серологических методов, так как они экономичны, обеспечивают получение результатов в течение короткого времени и последние не зависят от наличия сопутствующих микроорганизмов.

Иммунофлуоресценция (ИФ) является простым и быстрым тестом. Он используется при диагностике болезней человека [3] и животных [4]. Сущность метода состоит в следующем. В молекулы антител введены флуоресцирующие красители. При взаимодействии меченых антител с соответствующими антигенами последние начинают люминесцировать при облучении синими или ультрафиолетовыми лучами. ИФ в настоящее время применяется в прямом и непрямом вариантах. Прямая ИФ заключается в связывании антигена люминесцирующими антителами гомологичной сыворотки. При непрямой ИФ антиген обрабатывают немеченой диагностической сывороткой с последующим выявлением комплекса антиген — антитело люминесцирующей антивидовой сывороткой. Последний метод является более доступным, так как позволяет проводить диагностику ряда патогенных организмов с помощью одного конъюгата.

В задачу данного исследования входило изучение возможности применения непрямой ИФ для диагностики *X. campestris*.

Штаммы бактерий, использованные в работе, приведены в таблице. Штамм *X. campestris* В-56 был предоставлен нам Институтом защиты растений ГДР (г. Ашерслебен), В-57 — ВНИИ фитопатологии, В-58 — ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур. Штаммы *X. campestris* 8003, *X. malvacearum*, *X. phaseoli*, *X. phaseoli* var. *fuscans*, *X. vesicatoria*, *X. holcicola*, *X. necrosis*, *X. begonia* были получены из Музея живых культур Института микробиологии и вирусологии АН УССР (г. Киев). Остальные штаммы *X. campestris* выделены нами из пораженных кочанов капусты. Испытывали также 11 штаммов желтопигментных сапрофитных бактерий, схожих с *Erwinia herbicola*, выделенных нами из семян капусты.

Для получения иммунной сыворотки проводили иммунизацию кроликов живыми клетками *X. campestris* штамм А-17, смывами физиологическим раствором (0,85% NaCl) с 24-часовой культурой. Схема иммунизации включала 4 внутривенные инъекции с интервалом 5 дней. Количество вводимого антигена возрастало от 500 млн. до 2 млрд. клеток. Кровь брали на 13-й день после последней иммунизации. Качество полученной сыворотки проверяли в реакции агглютинации в пробирках по общепринятой методике [2].

Готовили суспензию клеток 24-часовой культуры *X. campestris* в 0,85% NaCl плотностью 10^8 — 10^9 клеток на 1 мл. На тщательно обезжиренных предметных стеклах делали мазки с помощью бактериологической петли и фиксировали их этанолом в течение 20 мин. На препараты наносили иммунную кроличью сыворотку, инкубировали во влажной камере 30 мин при комнатной температуре, промывали в течение 10 мин в нескольких порциях физиологического раствора, забуференного фосфатами (рН 7,4), быстро ополаскивали дистиллированной водой и высушивали. Затем наносили ослиную сыворотку против глобулинов кролика, меченой ФИТЦ производства Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, инкубировали 30 мин во влажной камере, промывали, как описано выше, и высушивали на воздухе. На поверхность мазка под покровное стекло наносили каплю глицерина с фосфатным буфером (9:1, рН 8,0). Препараты просматривали с помощью люминесцентного микроскопа «Люам Р-3» при $\times 720$. Для микроскопии использовали нефлуоресцирующее иммерсионное масло.

Интенсивность контурного свечения по периферии бактериальной клетки оценивали визуально по [4]. За положительный результат принимали умеренное зеленоватое свечение контура.

Реакция штаммов *X. campestris* и *X. spp.* с сывороткой, иммунной к *X. campestris* (непрямая ИФ)

Результаты

Вид и штамм бактерий	Разведение иммунной сыворотки						
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
<i>X. campestris</i> :							
A-7	+	+	+	+	-	-	-
A-15	+	+	+	+	+	+	-
A-17	+	+	+	+	+	+	-
B-17	+	+	+	+	+	-	-
B-19	+	+	+	+	+	-	-
B-20	+	+	+	+	+	+	-
B-21	+	+	+	+	+	+	-
B-23	+	+	+	+	+	+	-
B-24	+	+	+	+	-	-	-
B-56	+	+	+	+	+	-	-
B-57	+	+	+	+	+	-	-
B-58	+	+	+	+	+	+	-
8003 ^b	+	+	+	+	+	-	-
<i>X. malvacearum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. phaseoli</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>X. vesicatoria</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>X. holcicola</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. necrosis</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>X. begonia</i>	-	-	-	-	-	-	-

Полученная нами сыворотка, иммунная к *X. campestris*, имела титр 1:1600 в реакции агглютинации с гомологичным штаммом возбудителя. Проведенное в предварительных опытах титрование антикродильной сыворотки, меченой ФИТЦ, показало, что оптимальное рабочее разведение ее для окраски препаратов составляет 1:8.

Все испытанные штаммы *X. campestris* положительно реагировали с иммунной сывороткой (таблица). Титры реакции варьировали от 1:400 до 1:1600, что свидетельствует о серологической неоднородности штаммов *X. campestris*, на которую указано также в работе [6].

Виды *X. vesicatoria* и *X. phaseoli* var. *fuscans* давали с сывороткой перекрестные реакции с титром 1:200. Это подтверждает данные К. И. Бельтюковой [1] о наличии у этих видов общих с *X. campestris* антигенов.

Случаев положительной реакции ИФ желтопигментных сапрофитных бактерий, выделенных из семян, не отмечено.

Таким образом, реакция ИФ может быть успешно применена для диагностики возбудителя сосудистого бактериоза капусты. Данный метод при высокой чувствительности и специфичности позволяет получить результат за 2,5—3 ч.

В настоящее время ведется работа с целью использования метода ИФ для определения *X. campestris* в семенах без предварительного выделения патогена на питательную среду.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельтюкова К. И. Методика получения иммунных сывороток, условия их применения и некоторые результаты серодиагностики фитопатогенных бактерий.— Докл. ТСХА, 1964, вып. 107, с. 75—95.—
2. Бельтюкова К. И., Матышевская М. С., Куликовская М. Д., Сидоренко С. С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений.— Киев: Наукова думка, 1968.—
3. Михайлов И. Ф. Флуоресцирующие антитела и методы их применения.— М.: Медицина, 1968.— 4. Шесточенко М. А., Кузьмин Н. А. Люминесцентный анализ в ветеринарии.— М.: Колос, 1979.—
5. Bain D. C.— Phytopathology, 1955, vol. 45, N 1, p. 55—56.— 6. Schaad N. W.— Phytopathology, 1978, vol. 68, N 2, p. 249—252.

Статья поступила 3 июля 1985 г.

SUMMARY

The applicability of indirect immunofluorescent method by detection of the pathogen of cabbage vascular bacteriosis (black rot) was studied. A specificity of the method was demonstrated for 13 geographic strains of the pathogen. Cross-reactions with related bacterial species were observed only by low antiserum dilutions (less than 1:200).