

烟草野火病菌的快速检测^{*}

刘雅婷¹, 张世珩^{2*}, 李永忠³, 王绍坤⁴

(1 云南农业大学 农学与生物技术学院; 2 云南省植物病理重点实验室; 3 烟草学院, 云南 昆明 650201;

4 云南省烟草公司曲靖分公司, 云南 曲靖 655001)

[摘要] 对采自云南各大烟区的烟草野火病菌株进行了分离、鉴定, 用通过筛选致病力强的烟草野火病菌株为抗原, 制备了烟草野火病菌特异性的抗血清, 建立了一套快速检测烟草野火病菌的方法, 制备了 SPA-ELISA 反应试剂盒, 应用玻片凝集或协同凝集反应与 SPA-ELISA 反应试剂盒相结合的方法, 使检测真正做到了简便、快速、灵敏、准确。

[关键词] 烟草野火病; 烟草野火病菌; 快速检测; 间接-ELISA; SPA-ELISA; 凝集反应

[中图分类号] S435.72 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2002)06-0138-06

烟草野火病(wildfire of tobacco, 由 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 引起)是一种在烟草植株上普遍发生的毁灭性细菌病害。近年来, 由于地理条件及栽培制度的原因, 烟草野火病的发生有逐年加重的趋势, 特别是在云南省, 年发病面积达6万 hm^2 , 成为烤烟生产的主要病害之一。本研究以特异性抗血清为基础, 研制准确、灵敏的检测烟草野火病的血清学方法, 从而确定云南烟草野火病的初侵染源, 进一步科学地揭示烟草野火病的发生规律, 为生产服务, 使烟草野火病的危害降至最低。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 参试菌株

本试验所用菌株见表1。

1.2 抗血清的制备

1.2.1 免疫原的制备 (1) 制备抗血清的菌株:

Ps. sy. pv. *tabaci* Y₅ 菌株; *Ps. sy.* pv. *tabaci* X₃ 菌株。(2) 免疫原的种类及制备。全菌体免疫原的制备参考文献[1], 制备的抗血清命名为 PsY₅A, PsY₅B 和 PsX₃。胞外多糖(EPS)的制备参照文献[2], 并稍作改动, 制备的抗血清命名为 PsEY₅。

1.2.2 试验动物 健康新西兰大耳兔(雄兔), 体

重约2~5 kg。

1.2.3 免疫血清的制备 免疫血清的制备参见文献[3]。

1.3 抗血清效价、专化性、灵敏度测定

抗血清效价、专化性、灵敏度的测定方法见文献[1]。

1.4 检测方法

1.4.1 试验材料 抗血清: PsY₅A。

阳性对照: 由南京农业大学植保学院植检所提供的烟草野火病的标准菌株; 温室中接种发病的烟株种子、根、茎及根部土壤。

阴性对照: 健康烟草植株的种子、根、茎及根部土壤。

空白对照: 0.01 mol PBS 缓冲液。

1.4.2 检测方法 玻片凝集反应、协同凝集反应参考文献[3, 4]。

利用烟草野火病菌 Y₅ 菌株菌悬液, 制成不同浓度梯度, 分别参考文献[1]检测步骤, 根据反应强弱程度划分级别: 液体透明, 凝集颗粒粗大为“++++”, 凝集颗粒较大为“+++”, 凝集颗粒小为“++”, 液体不透明, 有凝集颗粒为“+”, 无凝集颗粒为“- -”, 见图1。

* [收稿日期] 2001-11-01

[基金项目] 云南省烟草公司基金项目(98A55)

[作者简介] 刘雅婷(1971-), 女, 湖南祁东人, 讲师, 硕士, 主要从事植物细菌性病害及生物技术研究。

* 通讯作者。

表 1 供试菌株及其来源

Table 1 Isolates and their sources

细菌名称 Name of pathogens	菌株 Isolate	来源 Source
烟草野火病菌 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	X1, X2, X3, X8, X10, X11 Q5, Q7, Q11, Q12, Q4, Q15 A野-1, A1, A2, A4, A3 安1, 安2, 安3 Z1, Z2, Z3, Z4 Y3, Y5, Y6, Y7, Y8, Y9, Y20, Y21, Y22, Y23, Y24 E1, E2, E3, E4	昆明市寻甸县 Xundian county, Kunming 曲靖地区沾益县 Zhanyi county, Qujing 昆明市安宁县 Anning county, Kunming 昆明市安宁县 Anning county, Kunming 昭通地区 Zhaotong prefecture 玉溪市红塔区延河 Hongta area, Yuxi 大理州洱源县 Eryuan county, Dali
丁香假单胞菌大豆致病变种 <i>Ps. sy. pv. glycina</i>	N2189	南京农业大学植保学院 The college of plant protection, Nanjing Agricultural University
丁香假单胞菌豆腐属致病变种 <i>Ps. sy. pv. pachyrhizus</i>	Pb7	云南省植物病理重点实验室 Phytopathology Laboratory of Yunnan Province
丁香假单胞菌桑致病变种 <i>Ps. sy. pv. mori</i>	<i>P. mori</i>	南京农业大学植保学院 The college of plant protection, Nanjing Agricultural University
黄瓜角斑病假单胞菌 <i>Ps. sy. pv. lachrymans</i>	PSL-8	南京农业大学植保学院 The college of plant protection, Nanjing Agricultural University
丁香假单胞菌女贞致病变种 <i>Ps. sy. pv. syringae</i>	Lig-17	南京农业大学植保学院 The college of plant protection, Nanjing Agricultural University
丁香假单胞菌番茄致病变种 <i>Ps. sy. pv. tomato</i>	N2844	南京农业大学植保学院 The college of plant protection, Nanjing Agricultural University
烟草青枯病菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	FJ; N9005; <i>P. s</i>	福建三明 Sanming area, Fujian
草生欧文氏菌 <i>Erwinia herbicola</i>	EH-1	南京农业大学植保学院 The college of plant protection, Nanjing Agricultural University



图 1 模式菌株菌悬液致敏金黄色葡萄球菌的协同凝集反应的级别 (4 倍显微照片)

从左至右: “++++”, “+++ ”, “++ ”, “+ ”, “- - ”

Fig. 1 Reaction grade of slide agglutination & coagglutination

from left to right: “++++”, “+++ ”, “++ ”, “+ ”, “- - ”

间接-ELISA 反应检测参考文献 [2, 5], SPA-ELISA 诊断试剂盒的研制参考文献 [5, 6]。

I 缓冲液及试剂配方。

(1) 0.05 mol/L pH9.6 包被缓冲液 (coating buffer, CB)。

1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃, 加蒸馏水至 1 000 mL。

(2) 0.01 mol/L pH7.4 磷酸缓冲液 (PBS)。

8.0 g NaCl, 2.9 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g KCl, 加蒸馏水至 1 000 mL。

(3) 1×PBST 洗涤液。Tween-20 0.5 mL, 加 0.01 mol/L pH7.4 PBS 至 1 000 mL。

(4) 底物缓冲液 (pH5.4)。A 液 (0.1 mol/L 柠檬酸) 2.22 mL, B 液 (0.1 mol/L Na₂HPO₄) 2.78 mL 加蒸馏水 10 mL。

(5) TMB 底物反应液。TMB (四甲基联苯胺, 10 mg/mL 以四甲基亚砷配制) 100 μL, 体积分数 0.65% H₂O₂ 25 μL 加底物缓冲液至 10 μL。

(6) A 蛋白纯品 (SPA) 及酶标 A 蛋白 (HRP-SPA)。

葡萄球菌A 蛋白 (SPA) 为华美生物工程公司产品, 工作质量浓度为 2 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以包被缓冲液先配成 1 mg/mL 母液, 4 贮存; 辣根过氧化物酶标记A 蛋白 (HRP-SPA) 为上海科欣生物技术研究产品, 工作浓度为 1 40。

II SPA-ELISA 工作流程参照文献 [2]。

2 结果与分析

2 1 抗血清效价的测定结果

用玻片凝集、试管凝集、奥氏双扩散 (ODD)、ELISA 几种方法测定抗血清效价, 结果见表 2。

表 2 不同免疫原制备的抗血清及其效价

Table 2 Potency of antisera immunized by different immunogen

免疫原 Immunogen	抗血清 Antisera	效价 Potency			
		玻片凝集 Slide agglutination	试管凝集 Tube agglutination	ODD	ELISA
Y ₅	PsY ₅ A	1 1 000	1 2 560	1 64	1 16 000
Y ₅	PsY ₅ B	1 1 000	1 1 280	1 32	1 8 000
X ₃	PsX ₃	1 1 000	1 1 280	1 32	1 8 000
EPS	PsEY ₅	1 50	1 20	1 4	1 2 000
Y ₅	IgM				
	PS ⁻				

注: 表中空格为阴性反应; IgM 为第 1 次免疫原注射 4 d 后所采血清; PS⁻ 为未注射免疫原时的阴性血清。
Note: The blank spaces are negative reaction; IgM is the sera collected after 4 d from the first immunization injection; PS⁻ is the negative sera collected before the first immunization injection

2 2 抗血清的专化性

2 2 1 用玻片凝集法测定的抗血清专化性 利用玻片凝集法测定了抗血清对不同细菌和菌株的专化

性, 结果见表 3。由表 3 可以看出, 本试验所制备的 4 个血清, 除与 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 有弱交叉反应外, 专化性较好。

表 3 玻片凝集法测定的抗血清专化性

Table 3 Specificity of antisera by slide agglutination

供试菌株 Isolate	PsY ₅ A	PsY ₅ B	PsX ₃	PsEY ₅	VF5	9005	P. C	PS ⁻
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> Y5	+++	+++	++	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> X3	++	++	+++	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> E3	++	++	++	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> Q4	++	++	++	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> Z1	++	++	++	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> A1	++	++	++	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 安1	++	++	++	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pachyrhizus</i>	-	-	-	-	+++	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>carophylli</i>	-	-	-	-	-	-	+++	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas tomato</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	-	-	-	-	-	+++	-	-
<i>Erwinia herbicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

2 2 2 利用ODD 法测定的抗血清专化性 利用ODD 法测定了各抗血清对不同菌株的专化性, 结果见表 4。由表 4 可见, 除 PS⁻ 外, 所有抗血清只与免疫原菌株发生阳性反应, 说明各种方法制备的抗血

清均可用ODD 法对烟草野火病进行检测, 同时也表明ODD 法的专化性极强。

2 3 抗血清的灵敏度

利用不同血清学检测方法对不同稀释度的目标

菌进行了检测, 各方法的灵敏度见表 5。由表 5 可见, ODD 法灵敏度最低, SPA -EL ISA 的灵敏度最高, 可以达到 10^3 , 以 EPS 为免疫原制备的抗血清质量不高。

表 4 ODD 法测定的抗血清专化性

供试菌株 Isolate		PsY5A	PsY5B	PsX3	PsEY5	VF5	9005	P. C	PS ⁻
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> Y5		+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> X3		-	-	+++	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> E3		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> Q4		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> Z1		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> A1		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 安1		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycina</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pachyrhizus</i>		-	-	-	-	+++	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>carophylli</i>		-	-	-	-	-	-	+++	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas tomat</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>		-	-	-	-	-	+++	-	-
<i>Erwinia herbicola</i>		-	-	-	-	-	-	-	-

表 5 不同检测方法的灵敏度比较

检测方法 Detection methods	抗血清 Antisera			
	PsY5A	PsY5B	PsX3	PsEY5
玻片凝集 Slide agglutination	10^5	10^6	10^6	
协同凝集 Coagglutination	10^5	10^5	10^5	
ODD	10^7	10^7	10^7	
间接-ELISA Indirect-ELISA	10^4	10^4	10^5	10^7
SPA-ELISA	10^3	10^3	10^4	10^7

注: 表中空格为阴性反应。
Note: The blank spaces are negative reaction.

2 4 样品检测

2 4 1 玻片凝集法 利用烟草野火病菌 Y5 菌株菌悬液, 制成不同浓度梯度, 根据反应强弱程度划

分级别 (图 1)。用 PsY5A, PsY5B, PsX3 和 PsEY5 抗血清对参试菌株和样品进行检测, 并与图 1 分级标准进行对比, 结果见表 6。

表 6 用玻片凝集反应检测菌株与样品的结果

样品 Isolate & sample	抗血清 Antisera			
	PsY5A	PsY5B	PsX3	PsEY5
Y5	++++	+++	+++	+
X3	+++	+++	+++	+
E3	+++	+++	+++	+
A2	+++	+++	++++	+
安1	+++	+++	+++	+
Q4	+++	+++	+++	+
Z1	+++	+++	+++	+
田间感病叶片 Diseased leave from fields	+++	+++	+++	++
温室接种发病叶片 Diseased leave by inoculation in the greenhouse	+++	+++	+++	++
健康烤烟叶片 Healthy tobacco leave	--	--	--	--

由表 6 可见, 所有血清均与野火病菌株及感病叶片发生阳性反应, 而与作为阴性对照的健康烟叶发生阴性反应。同时, 检测中发现, 用玻片凝集法检测土壤样品、种子、根残体时, 受样品本身的干

扰, 不易观察到结果, 因此, 该方法可以用于鉴别病原菌和叶片上的病斑, 而对检测土壤样品、种子、根残体不太实用。

2 4 2 协同凝集法 用 PsY₅A, PsY₅B, PsX₃ 和 PsEY₅ 4 种抗血清致敏的金黄色葡萄球菌, 对参试菌株和样品进行检测, 结果见表 7。检测中发现, 与

玻片凝集法相比, 协同凝集法在灵敏度上有很大提高, 但同样在检测土壤样品、种子、根残体时(检测时受样品干扰, 所以检测结果未在表中列出)受样品本身的干扰, 不易观察到结果, 因此, 该方法可以用于鉴别病原菌和叶片上的病斑, 而对于检测土壤样品、种子、根残体不太实用。

表 7 用协同凝集反应检测菌株与样品的结果

样品 Isolate & sample	不同抗血清致敏的金黄色葡萄球菌 <i>S. taphlococcus aureus</i> sensitized by the different antisera			
	PsY ₅ A	PsY ₅ B	PsX ₃	PsEY ₅
Y ₅	+	+	+	+
X ₃	+	+	+	+
E ₃	+	+	+	+
A ₂	+	+	+	+
安 ₁	+	+	+	+
Q ₄	+	+	+	+
Z ₁	+	+	+	+
田间感病叶片 Diseased leave from fields	+	+	+	+
温室接种发病叶片 Diseased leave by inculcation in the greenhouse	+	+	+	+
健康烤烟叶片 Healthy tobacco leave	-	-	-	-

2 4 3 EL ISA 检测烟草野火病菌 由表 8 可以看出, 本试验所用的两种酶联免疫吸附实验技术均能准确地检测到烟草野火病菌, 包括叶片中所存在的

病原菌, 证明这两种技术在用于烟草野火病菌的检测上获得了成功。

表 8 用酶联免疫吸附反应检测菌株与样品的结果

样品 Isolate & sample	PsY ₅ A					
	间接-EL ISA Indirect-EL ISA				SPA-EL ISA	
Y ₅	+	+	+	+	+	+
X ₃	+	+	+	+	+	+
E ₃	+	+	+	+	+	+
A ₂	+	+	+	+	+	+
安 ₁	+	+	+	+	+	+
Q ₄	+	+	+	+	+	+
Z ₁	+	+	+	+	+	+
田间感病叶片 Diseased leave from fields	+	+	+	+	+	+
温室接种发病叶片 Diseased leave by inculcation in the greenhouse	+	+	+	+	+	+
健康烤烟叶片 Healthy tobacco leave	-	-	-	-	-	-

3 结论与讨论

3 1 抗血清的制备

本研究利用烟草野火病菌提取不同免疫原, 对制备烟草野火病菌的特异性抗血清进行了初步的探索, 发现用戊二醛固定的全菌体作为抗原制备的抗血清效价高、专化性好。而用烟草野火病菌的胞外多糖 (EPS) 制备的抗血清效价相当低, 这可能是由于烟草野火病菌的胞外多糖分子质量过小, 免疫原

性不好。

3 2 各种检测技术

本研究应用了玻片凝集、协同凝集、试管凝集、奥氏双扩散 (ODD)、间接 EL ISA 和 SPA-EL ISA 6 种技术。值得注意的是, 在用血清学技术检测时, 必须设阴性、阳性、空白对照。研究结果表明, 各种技术均有优缺点, 适用的范围也各不相同。

3 3 烟草野火病快速检测体系的建立

根据以上几种技术的优缺点, 进行有机结合, 即

(1) 应用ODD 技术检测抗血清的效价、专化性以及菌株间的亲缘关系; (2) 用玻片凝集和协同凝集法检测未知菌菌体本身非常有效, 且快捷简便; (3) 应用酶联免疫检测种子、土壤和根围样品, 可以做到快速、准确、灵敏。特别是制成免疫试剂盒后, 实验就更为简便、快捷。

致谢: 本研究抗血清的制备在南京农业大学植检中心完成, 研究所用的参试菌株很大一部分是由许志刚教授提供的, 在此一并致谢。

[参考文献]

- [1] 刘雅婷. 云南烟草野火病的发生规律研究 [D]. 云南昆明: 云南农业大学, 2001.
- [2] 胡白石. 梨火疫病危险性分析 (PRA) 及检测技术研究 [D]. 江苏南京: 南京农业大学, 2000.
- [3] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京: 人民医学出版社, 2000. 99.
- [4] 刘宏迪, 谭洁, 吴晓军, 等. 水稻细菌性条斑病的快速诊断 [J]. 微生物通报, 1991, 18 (5): 265- 267.
- [5] Hampton R, Ball E, DeBoer S. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens [M]. USA: The American Phytopathological Society, 1990. 129- 143.
- [6] 李彬. 烟草花叶病毒 (TMV) 诊断试剂盒的制备 [D]. 江苏南京: 南京农业大学, 1998.

Studies on rapid detection of tobacco wildfire (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) in Yunnan

L IU Ya-tíng¹, ZHANG Shi-guang^{2*}, L I Yong-zhong³, WANG Shao-kun⁴

(1 Faculty of Agricultural Science and Technology; 2 Phytopathology Laboratory of Yunnan Province; 3 Faculty of Tobacco, Yunnan, Kunming 650201, China; 4 Qujing Tobacco Company, Yunnan Province, Qujing, Yunnan 655001, China)

Abstract: Strains of tobacco wildfire from Yunnan were isolated and identified. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* specific antiserum was obtained through screening the strong-virulent strains as antigen. Straphylococcal protein A-ELISA (SPA-ELISA) kits were developed successfully and this was the first time to establish the rapid detecting method of the pathogen. Detection techniques become easier, rapid, more sensitive and accurate, by combining SPA-ELISA with agglutination test (slide agglutination and coagglutination).

Key words: tobacco wildfire; *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*; rapid detection; indirect-ELISA; SPA-ELISA; agglutination