

# 镰刀菌孢子免疫效应的观察

许玉兰 刘庆城

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京)

用免疫学方法识别和追踪某些高分子生物活性物质和各种微生物的工作, 已应用于生物学的许多领域。近年来, 国外报道用真菌碎片、真菌蛋白及菌丝匀浆做为抗原, 获得了具有特异性的抗血清, 可以作为这种真菌在土壤中存活情况的识别方法<sup>[1-5]</sup>, 但用真菌孢子做抗原的免疫方法还未见报道。

镰刀菌是土壤中常见的一属植物病原真菌, 我们用该菌的无性孢子做材料, 利用免疫学方法观察了它的抗原性及其抗血清对该菌系的识别能力。

## 材料和方法

1977年, 我们针对4株被疑为甘薯烂根病原的镰刀菌, 用孢子免疫法做了血清学上的比较。试验结果与形态观察结果相符合。为了验证这种免疫方法的可靠性, 我们从中国科学院微生物所引入10株镰刀菌, 进一步用孢子免疫法进行了观察比较。10株镰刀菌中有3个种和3个变种, 分属于李瑟组、美丽组和马特组(表1)。

表1 10株镰刀菌(*Fusarium*)的名称及来源

菌号	菌名	来源
01	茄病镰刀菌( <i>F. solani</i> )	苹果根腐病病株根部分离
02	茄病镰刀菌( <i>F. solani</i> )	皮肤手癣分离
03	茄病镰刀菌( <i>F. solani</i> )	污水中分离
04	茄病镰刀菌蓝色变种( <i>F. solani</i> var. <i>coerulicum</i> )	棕榈幼苗枯萎株分离
05	真马特镰刀菌( <i>F. eumartii</i> )	甘薯烂根病病株根部分离
06	尖孢镰刀菌芬芳变种( <i>F. oxysporum</i> var. <i>redolens</i> )	芒果树下土壤分离
07	尖孢镰刀菌( <i>F. oxysporum</i> )	杉木立枯病病株根部分离
08	尖孢镰刀菌( <i>F. oxysporum</i> )	桑苗枯萎病病株根部分离
09	串珠镰刀菌胶孢变种( <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i> )	甘薯烂根病病株根部分离
010	串珠镰刀菌( <i>F. moniliforme</i> )	水云杉枯萎病病株分离

将上述各菌接种于麦芽糖固体培养基上, 23℃ 下培养 7—10 天后, 用无菌生理盐水洗下孢子。用纱布滤去菌丝后的孢子悬液, 以无菌生理盐水调至透光率为 5% 的稀释液, 以家兔作耳静脉注射, 当抗血清效价滴度达到 1:3200 以上时采血<sup>[6]</sup>。用凝聚法测定抗血清效价时所用的孢子悬液要适当稀释。

结 果

一、镰刀菌孢子在抗血清中的效价表现

据观察, 当兔血清产生效价时, 血清中的孢子产生吸引现象, 使孢子成群集聚。在载玻片上用微量凝聚法观察, 视野中孢子疏密不匀, 成片状堆积(图 1); 而在无效价的血清中, 孢子分布均匀, 看不到成堆成片的凝聚现象(图 2)。

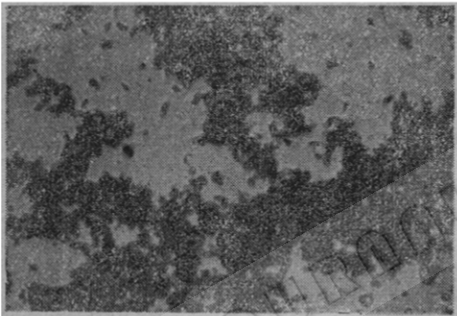


图 1 抗血清中 01 号镰刀菌孢子的凝聚现象 (10×15)



图 2 正常血清中 01 号镰刀菌孢子 (10×15)

二、镰刀菌孢子抗血清凝聚效价的判别

镰刀菌孢子个体较大, 能在悬液中迅速沉降。与细菌的凝聚反应不同, 真菌不能从悬液的混浊度判断抗血清的效价。但是在一定条件下 (30—40℃), 在 12—24 小时内, 孢子的凝聚作

用与抗血清效价呈正相关, 效价的高低决定着孢子沉淀层的形态特征, 而孢子沉淀层的外观特征是可以观察比较的。抗血清效价高时, 孢子凝聚成大小不等的聚合体, 在血清试管底部形成一个边沿不清, 面积大而薄的孢子沉淀层。反之, 孢子间凝聚作用微弱或者无吸引现象时, 孢子则在试管底部中央沉淀为一个边缘清晰的小圆点。经过多次观察, 孢子沉淀物外形的变化与抗血清效价的关系是明显而稳定的。通过对比, 可以按孢子沉淀物的形态特征, 将抗血清效价强弱分成 4 个等级, 以“0, +, ++, +++”表示 (图 3)。这样就可以对不同镰刀菌孢子的抗血清效价进行比较, 并判断抗血清对镰刀菌孢子的识别能力。

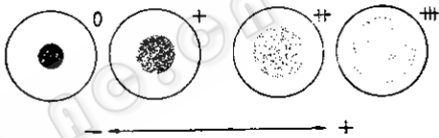


图 3 镰刀菌孢子在抗血清中凝聚反应模式

三、抗血清对镰刀菌的识别能力

用各镰刀菌的孢子分别制成透光度为 5% 的孢子悬液, 分别制得各自的抗血清。每种抗血清除了用抗原孢子测试其效价外, 还与其他非抗原的镰刀菌孢子作交叉测定(表 2)。结果可看出, 一种抗血清与几种镰刀菌孢子作交叉测定时, 其中以抗原孢子的效价最高。

表 2 7 株镰刀菌的孢子抗血清与孢子的相互交叉反应

效价 \ 抗血清号	01	03	04	05	06	09	10
被测菌号							
01	6,400	100	3,200	800	1,600	100	0
03	800	3,200	400	400	200	0	0
04	3,200	100	6,400	400	100	0	0
05	800		800	1,600	200	0	0
06	800	200	400	800	3,200	200	100
09	0	0	0	0	0	6,400	1,600
10	0	0	0	0	0	1,600	3,200

## 讨 论

1. 在镰刀菌孢子与抗血清的交叉试验中, 抗原孢子与本身的抗血清反应效价最高, 非抗原孢子和非特异性抗血清的效价表现均较低。因此, 可以认为镰刀菌孢子抗血清具有特异性, 对抗原孢子具有识别能力。

2. 在被测试的三组镰刀菌中, 美丽组(尖孢镰刀菌)与马特组(茄病镰刀菌)之间, 血清学关系比较密切, 而李瑟组(串珠镰刀菌)与上述两组镰刀菌之间血清学上几乎没有交叉反应, 这可能反映了这三组镰刀菌的亲缘关系。但镰刀菌易受环境条件影响, 变异性很大。孢子免疫方法能否准确的反映出镰刀菌种属间的亲缘关系, 并做为镰刀菌分类学上的一种方法, 还需做深入广泛的研究工作。

3. 与真菌菌丝体免疫法相比较, 用孢子作抗原方法简便, 不需要经过破碎、提取等处理。孢子抗原性较强, 获得效价滴度在 3200 以上的抗血清也不困难, 抗血清的效价也易于判别。缺点是对于形成孢子少或不能形成孢子的镰刀菌不适用。

## 参 考 文 献

- [1] 菊本敏雄: 植物防疫, **24**(8): 328—330, 1970。
- [2] Amos, R. E. and R. G. Burrell: *Phytopathol.*, **57**: 32—34, 1970。
- [3] Eren, J. and D. Pramer: *Soil Sci.*, **101**: 39—45, 1966。
- [4] Coos, R. D. and D. F. Summers: *Mycologia*, **56**: 701—707, 1964。
- [5] Marchant, R. and D. G. Smith: *Arch. Mikrobiol.*, **63**: 85—94, 1968。
- [6] 中国人民解放军59175部队编著: 《荧光显微术》, 上海科学技术情报研究所出版, 上海, 1975年。