

水稻细菌性条斑病原菌的快速诊断

刘宏迪 谭 洁 吴晓军 张志雍* 许志刚**

王春林** 钱菊梅*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 水稻细菌性条斑病是热带、亚热带地区水稻的一种严重病害。发病品种主要是籼稻, 尤其是籼型杂交稻为高。我国条斑病发生面积呈扩大趋势, 并能通过种子带菌传播, 已被列为检疫对象。利用富含 A 蛋白的金黄色葡萄球菌与水稻条斑菌的抗血清结合, 同待检样品进行协同凝集反应(coagglutination), 即能迅速准确地进行早期诊断。在实验室及田间对该方法的特异性准确性进行了研究, 并对青枯、白叶枯等的交叉及白叶枯的血清分型也进行了研究。

关键词 水稻条斑病菌; 金黄色葡萄球菌; 协同凝集反应

自 1918 年 Reinking 在菲律宾水稻上发现水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae*) 以来, 该菌在许多国家相继被发现, 1956 年方中达在我国水稻上发现。该菌造成的病害广泛分布在亚洲的中国、菲律宾、泰国、马来西

亚、印度、越南、柬埔寨等以及澳洲和少数西非

* 农业部植物检疫实验所, ** 南京农业大学植物保护系。

承蒙农业部全国植物保护总站, 各省植保站对此工作的帮助, 在此一并致谢。

国家。我国水稻产量占世界的三分之一,近些年来这种病害的流行已呈上升趋势,并引起了尚无此病发生的国家和地区的关注,纷纷提出了检疫要求。

我国海南、广东、广西、福建、湖南、湖北、江西、浙江、云南、贵州、四川等十余省(区)的南方稻区均有此病发生。鉴于此病的发病品种主要是杂交稻中的籼型杂交稻和籼稻。控制此病的进一步流行蔓延是当前我国水稻生产特别是杂交稻生产的一个关键性限制因素。但是对于这一病原,目前尚无一种比较可靠简便易行的检验方法。本文报道利用富含A蛋白的金黄色葡萄球菌包被细菌性条斑菌抗血清与检测样品中的该菌进行协同凝集反应,即可简便快速达到早期诊断的目的。此方法在医学上已常见,在细菌学上的应用首推Kronvall^[1],他在1973年就用于肺炎球菌的分型工作。而此方法用于植物病原细菌的检测尚未见报。

材料与方 法

(一) 菌种

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。

细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae*)：R2、R15、R28 为湖南、广东、福建水稻病区分离株。

实验室检测稻种为送检各省植保站提供。田间检测在海南岛南繁基地。

青枯、白叶枯病原菌由农业部植物检疫所和南京农业大学提供。

(二) 方法

1. 菌种的培养：在倒入培养基冷却后铺有玻璃纸的平皿中接种,37℃ 培养。

2. 抗血清的制备：用0.25%的戊二醛固定上述培养好的R2、R15、R28菌体,4℃ 冰箱48h, PBS缓冲液洗涤3次,用完全佐剂15% (W/V) 的菌悬液混匀,乳化后肌肉注射家兔,2周后耳静脉注射上述菌体3mg,4周采血测定效价。

3. 金黄色葡萄球菌的培养：将上述 Co-

wan I 株金黄色葡萄球菌接种于平皿上,挑取菌落后,先在牛肉汤和牛肉汤琼脂各传一代,再接种于酪蛋白琼脂培养基(胰酶消化酪蛋白17g,大豆胨3g,葡萄糖2.5g, K_2HPO_4 2.5g, NaCl 3g 水1000ml, pH7.3), 37℃ 培养18—24h。菌体用0.01mol/L PBS 含0.014mol/L NaCl 的缓冲液离心(4000r/min)洗涤3次备用。

4. 包被(致敏)菌的制备：用1ml蒸馏水溶化冻干菌或将湿菌体按10% (W/V) 制成菌悬液,然后加入抗血清0.1ml,充分摇匀置37℃ 水浴保温30—60分钟。再用含0.014mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液离心洗2次,最终加入上述缓冲液1ml即制成包被致敏试剂。

5. 待检稻谷的处理：5g 稻谷浸于10ml PBS 中,室温间断振摇2h以上。对照菌为试管斜面培养,用 PBS 做系列稀释。

6. 检测：取包被菌体试剂20 μ l 和待检样品及已知菌悬液(阳性和阴性对照)各20 μ l 置于载玻片上,用牙签或玻棒混匀,数分钟内即可观察到结果。阳性反应一旦有凝集即出现清晰可见的颗粒,极易判断结果。

如果有干扰,必要时可用不含A蛋白的金黄色葡萄球菌 Wood 46 株和以正常兔血清包被菌体为对照,以排除非特异性凝集造成的假象。阳性结果电镜观察方法同文献[2]。

结 果

(一) 培养菌的共凝集反应

检测不同稀释度试管斜面培养的R2、R15、R28,并以白叶枯病菌为系统阴性对照,结果见表1。

(二) 送检稻种的双盲检测

对我国发病地区数省植保站送检的样品检测结果如表2。

以上实验结果培养菌的阳性和湖南送检的阳性电镜观察见图版1。可见到金黄色葡萄球菌与水稻条斑病菌交联连接成凝集颗粒。这种快速形成的网状凝集颗粒肉眼即可观察。

(三) 海南岛南繁基地田间检测

表 1 培养菌的协同凝集结果

菌号	不 同 稀 释 度					
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
R2	++++	++++	++++	+++	++	+
R15	++++	++++	++++	+++	++	+
R28	++++	++++	++++	+++	++	+
白叶枯	—	—	—	—	—	—
青枯	—	—	—	—	—	—

液体透明,凝集颗粒粗大为“++++”;颗粒较大者为“+++”;颗粒小者为“++”;液体混浊,有可见凝集颗粒为“+”;无可见凝集颗粒为“-”

表 2 送检稻种协同凝集的双盲检测

样品来源	检测数	阳性数	阴性数	不符合数	符合率
湖南省	10	9	1	1	90%
各省混合	123	101	22	21	82.9%

共检测实地采样 249 个样品,同采样时肉眼观测的总符合率为 60%。分省符合率为 90% 和 50% 不等。上述检测为双盲法,因条件所限未能与培养结果进行对比。

(四) 水稻白叶枯病菌血清分型检测

用金黄色葡萄球菌包被三个血清型的抗血清,检测各血清型的代表株 2—3 株,并进行交叉反应,结果同许志刚教授对水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae*) 血清型的研究结果相同^[3]。所以用此方法进行血清分型是可行的。

(五) 对其它细菌性病原菌的检测

对青枯、环腐、柑桔溃疡等细菌性病原的检测,在实验室内培养菌进行检测已得到满意结果,并未见有非特异交叉,田间试验正在进行中。

讨 论

金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 是从金黄色葡萄球菌细胞壁中分离的蛋白成分。Cowan I 株的这种成分含量高。利用 A 蛋白的特性能够天然地和 IgG 的 F(c) 段结合,可作为吸附特导抗体的天然载体。吸附后载体上的抗体 IgG 的 F(a、b) 段,又能特异性地与待检细菌在反应时形成相互交联连接而呈现肉眼可直接观察的凝集现象。多用于对细菌的简易快速诊

断、定性、定群或分型^[4,5]。

此方法与抗原抗体反应一样,要求浓度要有一定的比例,同时抗体效价的高低又直接影响反应强度和速度。作为载体的金黄色葡萄球菌的浓度应控制在 5—10%(W/V)的浓度之间。用一般的粗制多抗即可包被 A 蛋白菌体,由于 A 蛋白仅与抗体中的 IgG 结合,而不能与 IgM 等结合,所以具有一种自纯化抗体的选择作用。但协同凝集试验的特异性是取决于制备的抗血清的特异性,反应的强弱又与血清效价成正比。因此,在制备抗血清时对其特异性和效价的高低是不容忽视的。

通过实验室和田间实验证明,在室内对送检的稻种进行双盲检测,其符合率在 80% 至 90% 之间。田间检测在海南岛南繁基地与人为田间观察发病率的符合率在 60% 左右(条件所限未能统计培养的符合率)。证实和田间检测中是一种省时、简单、快速易推广的方法。血清效价的提高即灵敏度的提高,以及免疫富集和进行死活菌的鉴别正在研究中。该方法对水稻条斑性细菌病害病原菌的检测,对检疫工作的更好施实,控制此病进一步流行蔓延具有一定的现实意义。

参 考 文 献

1. Kronvall GJ: *Med. Microbiol.*, 6: 187, 1973.
2. 刘宏迪等: *微生物学报*, 30(6): 455—463, 1990.
3. 许志刚等: *南京农业大学学报农业生物免疫技术专辑*, 增刊 4: 97—103, 1988.
4. 张颖语: *流行病学杂志*, 1: 111, 1980.
5. 陈延祚等: *中华微生物学和免疫学杂志*, 1: 251, 1981.