

甘薯青枯病潜症苗的快速检测

种藏文¹ 程由铨² 卢 同¹ 王长方¹ 李怡英² 吴 平²

(福建省农业科学院¹ 植保研究所,² 牧医研究所, 福州 350013)

摘要: 建立 6 株分泌抗甘薯青枯病菌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞。该单抗对甘薯青枯病菌以及可侵染甘薯的 7 个参试青枯病菌呈阳性反应; 与参试的其它假单胞杆菌、其它属的检测菌株及薯苗上的各种杂菌无交叉反应。ELISA 法测定培养液抗体滴度为 10^2 — 10^3 ; 腹水抗体滴度为 10^5 — 10^6 。检出抗原灵敏度为每 ml 11.5 μl 蛋白。杂交瘤细胞及其培养液抗体保存 3 年以上均保持原有特性。6 株单抗对我省分离的 3 个致病型的甘薯青枯病菌全部产生阳性反应, 覆盖面广。ELISA 间接法检测人工接种的潜症薯苗, 可准确地检出带菌, 检出率达 100%。对 119 份病田无症苗进行检测, 其中 51 份阳性反应, 68 份阴性反应。通过单抗检测与接种检测的比较试验, 说明单抗检测的敏感性和特异性都高于接种法, 同时快速简便。

关键词: 甘薯青枯病; 潜症苗; 单克隆抗体; 检测

Rapid Detection of *Pseudomonas solanacearum* in Sympton-latent Seedlings of Sweet Potato

Zhong Zangwen¹, Cheng Youquan², Lu Tong¹, Wang Changfang², Li Yiying and Wu Ping²

¹ Institute of Plant Protection, ² Institute of animal Husbandry and Veterinary medicine,

Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013)

Abstract: Six hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (McAbs) against the pathogen of *Pseudomonas solanacearum* from sweet potato have been produced. The McAbs showed positive reactions to 7 sweet-potato-infected strains, and negative to other bacteria of *Pseudomonas* and genus else, and various bacteria infected seedlings of sweet potato detected in the test. The ELISA titers of the culture supernatants and the ascites antibodies were respectively 10^2 — 10^3 and 10^5 — 10^6 . The sensitivity of antigen detected was 11.5 μg/ml (protein concentration). The original characters of the hybridoma cell and culture supernatants antibodies could be kept over three years. Six antibodies showed positive to all of 3 pathogenicity types of *Pseudomonas solanacearum* from sweet potato in Fujian province. The inoculated samples could be detected out by the indirect ELISA at the rate of 100%. In 119 portions of symptomlatent seedlings collected from field cases, 51 and 68 were respectively positive and negative. To compare with the antibody and inoculation detection, the result showed the sensitivity and specificity of antibody detection were more height than that of inoculation detection, and more rapid and handy.

Key Words: *Pseudomonas solanacearum* of sweet potato; Sympton-latent seedlings; monoclonal antibody; detection

甘薯青枯病(*Pseudomonas solanacearum*)是国内检疫病害之一, 是危害甘薯的一种重要病害,

在南方主要薯区为害严重。带菌薯苗是传病的主要途径，种苗检疫是控制病害蔓延的重要措施。但目前尚缺快速、准确的检疫手段。为了满足生产上大批调苗的检疫需求，我们于1987年，研究应用单抗技术，建立了甘薯青枯病潜症苗的速检方法，并应用于检测田间无症苗。结果证明，该法快速，灵敏、准确、特异性强，具有推广应用价值。

1 材料与方法

1.1 免疫原制备 从新鲜病样中分离纯化甘薯蔓青枯病菌株，置室温无菌水保存^[6,9]。免疫前生TTC培养平板上^[7]划线纯化，挑取单菌落在牛肉琼脂斜面上培养36—48 h，以每ml 10¹⁰个菌细胞的菌悬液免疫。用于免疫的菌株是87001（永泰）、88019（连江）、88001（罗源）、88043（福清）和89112（泉州）。

1.2 试验菌株 甘薯青枯病菌共123株，分别来自福建、浙江和广东3省，经致病力测定分属3个菌系群。姜青枯病菌、烟草青枯病菌、花生青枯病菌、辣椒青枯病菌、茄子青枯病菌、番茄青枯病菌、马铃薯青枯病菌、烟草角斑病菌、黄瓜细菌性角斑病菌、水稻细菌性条斑病菌、水稻白叶枯病菌、柑桔溃疡病菌、辣椒斑点病菌、菜豆细菌性疫病菌、大白菜软腐病菌、桃树根癌肿病菌、马铃薯环腐病菌以及甘薯上分离的杂菌。

1.3 单克隆抗体的制备 选择6—8周龄的BALB/C小白鼠，腹腔注射纯化菌悬液3次后，取其脾细胞和鼠骨髓瘤细胞（SP₂/O）进行杂交融合^[2,8]，获得杂交瘤细胞，以间接ELISA法检测筛选与参试青枯病菌产生阳性反应，而与健康薯苗及其它试验菌株呈阴性反应的杂交瘤细胞。有限稀释法克隆化后，获得稳定分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株。腹腔注射杂交瘤细胞产生腹水，以硫酸铵沉淀法进行提纯，制备腹水单克隆抗体。

1.4 人工接种潜症苗制备及检测

1.4.1 供试薯苗：将感病品种惠红早薯苗假植在盆钵中，每盆各播2株，待苗成活后供接种用。

1.4.2 接种：采用剪叶法^[3]、茎注射法接种，菌悬液浓度为每毫升6—9亿个菌细胞，设清水接种对照。

1.4.3 采样：从接种后第2天开始，取1号钵中1株苗检测（另1株留作症状观察），第3天取2号钵中1株苗检测，直至第5天或第6天出现症状为止。

1.4.4 样苗处理：用自来水将薯苗冲洗干净，剪碎后用0.1M、pH9.5的碳酸缓冲液浸泡30—60 min，用滤纸过滤去渣，滤液即为待检样液。

1.4.5 检测：采用酶联免疫吸附试验（ELISA）间接法^[2,4,5]。试验均设病原菌阳性对照和健康薯苗阴性对照。检测结果用DG-3021型酶联免疫检测仪读版（λ=490nm）。以无抗原对照孔调零，P/N≥2.0为阳性反应；P/N<2.0为阴性反应（P为待测样品OD值，N为健康样品OD值）。

1.5 病田无症状苗检测及接苗试验

1.5.1 样品来源：从本省永泰、长乐、闽清、连江、罗源和福州等县（市）不同病虫、不同品种上采集无症状薯苗119份。其中1989年52份，1990年67份。单抗检测方法与人工接种

潜症苗检测法相同。

1.5.2 病田无症苗浸出液接苗试验：将样苗剪碎，无菌水浸泡 1h，8000r/min 离心 20min 取浓缩液剪叶接种在感病品种惠红早薯苗上。以健康薯苗浸出液和纯菌悬液接种，分别作为阴性和阳性对照。一周后观察发病情况。

2 结果和分析

2.1 杂交瘤细胞选育结果 分别用 5 株甘薯青枯病菌株免疫 BALB/C 小白鼠，进行 3 次杂交融合，共接种 2424 个培养孔，平均融合率为 90%，阳性率为 15%，经筛选分泌特异性抗体的杂交瘤细胞占 5.5%，建立了 6 个特异性杂交瘤细胞株，分别命名为 PSB20、PSB24、PSB28、PSB44、PSB46、PSB56（见表 1）。

2.2 杂交瘤细胞株及单克隆抗体特性 按 Hurre 法检查了 5 株杂交瘤细胞和鼠骨髓瘤 (SP₂/O) 细胞的染色体数分别为 98—104 条和 60—70 条。经琼脂双扩散试验检测 6 株单抗的免疫球蛋白亚类分属 IgG₁ 和 IgM。细胞培养液的 ELISA 滴度为 10²—10³，腹水的 ELISA 滴度为 10⁵—10⁶（表 2）。杂交瘤细胞株置氮罐保存 3 年后，仍保持原有特性。

表 1 杂交瘤细胞选育结果

Table 1. Results of election and production of hybridoma cell lines

融合序号 No. of fusion	免疫原菌号及来源 Jimmunogens and source	融合率 % Fusion rate	阳性率 % Positive rate	特异性杂交瘤细胞建株 Specific hybridoma cell lines	
				PSB20	PSB24
1	87001 水泰	86	4	PSB20	PSB24
2	88019 连江	94	26	PSB28	
	88001 罗源				PSB46
	88043 福清	90	15	PSB44	
3	88001 罗源			PSB56	
	89112 泉州				
合计(Total)		90	15	6	

表 2 甘薯青枯病单克隆抗体特性

Table 2. Characteristics of McAbs against P. solanacearum from sweet potato

单克隆抗体 McAb	ELISA 滴度(ELISA titer)		免疫球蛋白 亚类 Subclass of Ig
	培养液 Cultural supernatant	腹水 Ascitic fluid	
PSB20	10 ²	—	...
PSB24	10 ³	10 ⁶	IgG ₁
PSB28	10 ³	10 ⁶	IgM
PSB44	10 ²	—	IgG ₁
PSB46	10 ²	10 ⁵	IgM
PSB56	10 ²	—	...

以比浊法和紫外分光光度计测定相结合确定纯菌悬液的蛋白浓度，以 ELISA 间接法测定单抗灵敏度为每 ml 11.5 μg 蛋白（菌悬液浓度约为每 ml 10³ 个菌细胞）。

该单抗对假单胞杆菌属的参试青枯菌株呈阳性反应，对其它参试菌株以及甘薯上分离的杂菌均呈阴性反应（表 3）。将辣椒、茄子、烟草、姜、花生、番茄和马铃薯等 7 种青枯病菌分别接种甘薯苗产生明显甘薯青枯病症状，且从病斑中分离出青枯病菌，再回接于甘薯苗上出现症状，说明这 7 种青枯病菌均可侵染甘薯。这一结果表明所建的单抗具有极强的特异性。用该单抗对来自福建、广东、浙江 3 省不同地区的分属 3 个菌系群的 123 个菌株检测结果均呈阳性反应见（表 3），所不同的是反应强弱不一，可见此单抗覆盖面广。

2.3 人工接种潜症苗测定 感病品种惠红早薯苗从接种后第 2 天的薯苗中即可检出带菌，且带菌量日渐增多。接清水对照的健康薯苗均呈阴性反应。三次重复试验结果相同（表 4）。试验结果表明，该方法可准确地检测潜症苗带菌情况。检出率达 100%。

表3 甘薯青枯病菌单克隆抗体特异性测定(ELISA试验)

Table 3. Determination of specific reactivity of McAb to *Pseudomonas solanacearum* from sweet potato

病原菌名称 Name of pathogen	单克隆抗体反应 Reaction of MaAb	病原菌名称 Name of pathogen	单克隆抗体反应 Reaction of McAb
甘薯青枯病菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	水稻细菌性条斑病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzicola</i>	-
姜青枯病菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	水稻白叶枯病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	-
烟草青枯病菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	柑桔溃疡病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	-
花生青枯病菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	辣椒斑点病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i>	-
辣椒青枯病菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	菜豆细菌性疫病菌 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseolus</i>	-
茄子青枯病菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	桃树根癌肿病菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-
番茄青枯病菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	马铃薯环腐病菌 <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>sepedonium</i>	-
马铃薯青枯病菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	+	大白菜软腐病菌 <i>Erwinia carotovora</i> Var. <i>carotovora</i>	-
烟草角斑病菌 <i>Pseudomonas angulata</i>	-	甘薯苗分离杂菌 Other pathogenic bacteria isolated from sweet potato seedling	-
黄瓜细菌性角斑病菌 <i>Pseudomonas Syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	-		

注：“+”为阳性反应，“-”为阴性反应。Note: “+”positive “-”negative

2.4 病田无症苗的检测与接苗试验比较 119份病田无症苗经单抗检测，其中呈阳性反应51份，阴性反应68份（表5）。用12份单抗检测呈阳性反应的无症苗浸出液接种薯苗，有10份发病，3份单抗检测阴性反应的无症苗浸出液接种薯苗均无发病（表6）。由此可见，单抗检测为阳性反应的接苗不一定发病。而单抗检测为阴性反应的接苗均不发病。这一结果表明，单抗检测法的灵敏度高于接苗法。同时表明单抗检测薯苗方法的准确性。

表4 室内人工接种潜症苗测定(ELISA) OD 值

Table 4. Determination of Symptom-latent Seedlings

试验序号 Test No.	检测时间 Time (天 day)	检测样品 (samples)		
		Huihong early接 菌潜症苗	接清水健 康苗 (对照)	病原菌 (对照)
		The seedlings spont-inoculation	Negative control	Positive control
1	2	0.28	0.00	1.24
	3	0.32	0.05	1.30
	4	0.49	0.08	1.20
	5	0.52	0.00	1.11
2	2	0.37	0.05	1.16
	3	0.44	0.09	1.09
	4	0.55	0.00	1.14
	5	0.79	0.10	1.24
3	2	0.43	0.06	1.49
	3
	4	0.49	0.09	1.43

注: P/N≥2.0 为阳性反应; P/N<2.0 为阴性反应。

Note: P/N≥2.0 positive; P/N<2.0 negative.

表5 病田无症状薯苗检测结果

Table 5. Results of determination of symptomless seedlings

薯苗来源 Geeding source	检测份数 Test number	ELISA 试验检测结果 Results by ELISA	
		阳性反应 Positive	阴性反应 Negative
永泰	61	31	30
福州	36	9	27
长乐	6	3	3
闽清	4	3	1
连江	4	1	3
罗源	8	4	4
总计 (Total)	119	51	68

表 6 病田无症状薯苗单抗测定与接种试验比较

Table 6. Comparison of results of symptomless by ELISA and by inoculation

样苗来源及品种名称 Source and name of seedlings	ELISA 试验结果 (OD 值) Results by ELISA (Value for OD)		接种试验结果 Results by inoculation
永泰城关 86	0.06-		无出现症状 Symptomless
永泰城关 惠红早	0.04-		无出现症状 Symptomless
永泰城关 胜利百号	0.02-		无出现症状 Symptomless
永泰温泉 禹北白	0.91+		出现典型症状 Abvious symptom
永泰温泉 惠红早	0.33+		无明显症状 Not abvious symptom
永泰温泉 86	1.29+		出现典型症状 Abvious symptom
永泰大坂 86	0.79+		出现典型症状 Abvious symptom
永泰温泉 禹北白	0.57+		出现症状 Symptom
永泰大汤 禹北白	0.60+		出现症状 Symptom
永泰大肠 86	0.67+		出现症状 Symptom
永泰马豆园 惠红早	0.59+		出现症状 Symptom
永泰新郎店 禹北白	0.60+		出现症状 Symptom
永泰澡堂 胜利 8 号	0.75+		出现典型症状 Abvious symptom
永泰大汤 惠红早	0.54+		无明显症状 Not abvious symptom
永泰大坂 禹北白	0.75+		出现典型症状 Abvious symptom
健康薯苗	0.08-		无症状 Symptomless
甘薯青枯病菌	1.34++		出现典型症状 Abvious symptom

注: P/N ≥ 2.0 为阳性 “+”; P/N < 2.0 为阴性 “-”;

Note: P/N ≥ 2.0 positive; P/N < 2.0 negative

3 讨 论

几年来我们共建了 6 株分泌抗甘薯青枯病菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。其所分泌的抗体分别用于检测病原菌, 病薯苗和人工接种潜症苗, 其检出率达 100%。而与健康薯苗及其它甘薯病害苗无任何交叉反应, ELISA 法检测健康薯苗的 OD 值 ($\lambda=492\text{nm}$) 一般在 0.1 以下, 在此 OD 值范围内肉眼即可清晰分辨阴、阳性 (阴性无色, 阳性微红色至红色)。这表明本试验所制备的单克隆抗体具有极强的特异性, 用于甘薯苗检测准确性高。制备具特异性强的单克隆抗体关键在于纯化免疫原和选择杂交瘤细胞的筛选范围, 我们用甘薯的健康组织、植物病原细菌的有关菌株及甘薯苗上分离的杂菌进行筛选获得了与其它病原菌及健康组织不产生交叉反应的杂交瘤细胞。

所制备的甘薯青枯病菌单克隆抗体除与甘薯青枯病菌呈阳性反应外, 还与烟草、茄子、姜、花生、番茄、辣椒和马铃薯等 7 种青枯病菌呈阳性反应。将上述 7 种青枯病菌分别接种薯苗上, 均出现甘薯青枯病症状, 并分离出青枯病菌, 1987—1989 年此试验重复了 3 次, 均得到

表7 甘薯青枯病菌接种在不同寄主植物上的反应

Table 7. Reaction of the different hosts inoculated with the pathogens from sweet potato

甘薯青枯病菌 Pathogen	致病类型 Pathogenic type	接种反应 Reaction of the hosts inoculated						
		茄子 Eggpane	姜 Ginger	花生 Peanut	蕃茄 Tomato	辣椒 Redpepper	烟草 Tobacco	马铃薯 Potato
Ba 31	强 Strong	S	S	S	S	S	S	M
Ba 32	中 Medium	S	S	S	S	S	S	M
Ba 33	弱 Weak	S	M	M	S	S	S	W

注：S——强侵染；M——中度侵染；W——弱侵染。

Note: S——strong infection, M——medium infection; W——weak infection

相同结果。说明这7各青枯病菌均可侵染甘薯。将甘薯青枯病菌分别接种以上7种寄主，在各种寄主上也相应地出现明显青枯症状（表7）。这一试验结果和任欣正^[1]等将甘薯青枯病菌划分为小种1是一致的。在上述研究的基础上，我们正在利用甘薯青枯病单克隆抗体进一步研究青枯病菌的血清型。

参 考 文 献

- [1] 任欣正等. 1981. 不同寄主植物青枯菌菌株的比较研究. 植物病理学报, 11 (4) : 1-7
- [2] 种藏文, 程由铨等. 1990. 水稻细菌性条斑病菌单克隆抗体的制备及特性. 福建省农科院学报, 5 (2) : 7-11
- [3] 张联顺等. 1985. 甘薯新品种闽抗329的抗瘟性研究. 植物保护, (5) : 8-9
- [4] 张成良等. 1982. 酶联免疫吸附法(ELISA)检测豆类种传病毒的研究. 植物保护学报, 9 (1) : 9-14
- [5] [日]久原重松. 1980. 植物检疫, 34 : 129
- [6] Kelman, A. & Person, I. H. 1961. Strains of *Pseudomonas solanacearum* differing in pathogenicity to tobacco and peanut. *Phytopath.* 51 : 158-161
- [7] Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopath* 44 : 693-695
- [8] Lee L. F. et al. 1983. I. Immunol. 130 : 1003
- [9] Kelman, A. 1956. Factors influencing viability and variation in cultures of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopath.* 46 : 1677