

马铃薯环腐病菌鉴定检测技术研究进展

何云霞, 张儒喜, 白艳菊, 吕典秋, 胡林双, 于德才, 李学湛

(黑龙江省农科院植物脱毒苗木研究所, 哈尔滨 150086)

摘 要: 传统的马铃薯环腐病菌鉴定方法主要是革兰氏染色法、茄苗接种鉴定法以及根据菌体的各种特征特性进行鉴定; 应用血清学鉴定检测马铃薯环腐病菌方法主要是乳胶致敏试验 (AG)、凝胶双扩散试验 (DD)、间接荧光抗体染色试验 (IFAS) 以及酶联免疫吸附测定试验; 分子生物学方法检测马铃薯环腐病菌技术主要是应用 RFLP 分子标记、基因探针技术、核酸斑点杂交方法以及 ITS-PCR 方法。对于马铃薯环腐菌的鉴定检测不能单靠一种方法, 因为任何一种方法都有其缺点和局限性, 为得到真实、可靠的判定结果, 应将多种方法取得的结果结合起来进行最终判定, 因此针对马铃薯环腐菌鉴定检测建立一套完整的技术体系十分必要。

关键词: 马铃薯; 环腐病菌; 检测; 鉴定

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635 (2004) 03-0159-04

1 马铃薯环腐病菌鉴定检测技术研究的意义

马铃薯环腐病 (Potato Ring Rot) 是由环腐病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) 引起的一种危害输导系统的细菌性病害, 病害严重时可造成大幅度减产, 病害较轻时也影响马铃薯品质, 以带病种薯为主要传播途径, 世界上把它列为重要的进出口植物检疫对象, 要求种薯带病允许率 0%。马铃薯环腐病属于低温型细菌性病害, 主要发生在我国北方地区, 尤其在黑龙江省病害较重, 而黑龙江省又是全国重要的马铃薯种薯基地, 对于马铃薯环腐病的检测是衡量种薯质量的一项重要指标。马铃薯种薯中存在肉眼无法诊断的潜伏侵染, 这种潜伏侵染逐代累积逐渐表现症状造成危害, 这是马铃薯环腐病无法根除的根本原因。因此, 能够检测马铃薯种薯中微量环腐菌的能力和方法是十分必要的。寻找一种快速、准确、灵敏、可靠的分子检测马铃薯环腐病菌的方法, 对于保证马铃薯各级种薯、商品薯及其相关产品的质量, 提高其市场竞争力具有重要意义。

2 传统的马铃薯环腐病菌鉴定检测方法

2.1 革兰氏染色

革兰氏染色时碱性染料可以穿过细胞壁与细胞原生质的酸性成分起作用, 加碘以后形成复合体。革兰氏反应阳性的细菌, 它的细胞壁阻止脱色剂对复合体中染料

的提取, 所以不褪色, 镜检呈兰紫色; 革兰氏反应阴性的细菌, 由于细胞壁中含有较多的类脂物, 可以被脱色剂溶解, 因而染料可以被提取而褪色, 镜检呈粉红色。马铃薯环腐菌为革兰氏阳性菌, 革兰氏染色后镜检呈兰紫色。GB18133-2000《马铃薯脱毒种薯》^[1]中环腐病的检测仍沿用此方法, 但马铃薯上可能存在其它革兰氏阳性细菌, 这种方法还需对菌体形态特征进行观察, 对生理生化反应特性进行测定, 才能最终判定为环腐病菌。

2.2 依据症状观察、形态和生理生化反应特征鉴定

先依据发病寄主范围、发病部位、病区的症状等病原菌作初步判断; 然后对病原菌进行分离、培养和纯化, 观察菌落形态, 包括大小、质地、颜色等; 再对纯培养物进行染色和各种生理生化测定, 进一步对其作出判断。马铃薯环腐病菌是革兰氏阳性细菌, 革兰氏染色后呈紫色; 菌体形态以楔形菌占多数, 在 PDA 培养基上生长缓慢, 生长 3 d 的菌落直径小于 1 mm; 不还原硝酸盐, 不液化明胶, 不水解淀粉, 不产生硫化氢和吲哚, 氧化酶阴性, 过氧化氢酶阳性; 在 37℃ 温度下和 5% 氯化钠的培养基中不能生长, 葡萄糖氧化发酵阴性, 在乳糖、鼠李糖、丙三醇和柳醇为碳源的培养基中不产酸, 能水解七叶灵。谢云陆和何礼远 (1987)^[2]用此方法对我国不同马铃薯产区的环境菌株和国外的环境菌株进行了鉴定, 供试的 9 个菌株革兰氏染色都呈阳性, 以楔形菌占优势, 不能运动, 但经生理生化特征测定后其中有两个菌株与标准菌株不同。这种检测方法需要对病原菌进行分离和纯化, 试验的结果因培养温度、培养时间长短、培养基成分和确定阴性阳性的标准不同而变化, 稳定性差, 且费时费力, 不便于生产上的应用。

收稿日期: 2003-12-07

作者简介: 何云霞 (1971-), 女, 满族, 助理研究员, 黑龙江省农科院从事马铃薯病害检测技术的研究。

2.3 茄苗接种实验

以茄苗为接种植物, 品种为黑美(Black Beauty), 先在花盆里育苗, 当长出子叶后, 移植到盛有营养土的花盆中, 每盆一株, 在茄苗生长2~3周出现第三片真叶时, 即可用于接种。供试菌株在PDA培养基上于23℃下培养5 d, 用无菌水将菌苔洗下, 制成细菌悬浮液, 浓度约为 2×10^7 /mL, 用1 mL注射器装菌液, 用4号针头于茄苗真叶与子叶之间的茎部作针刺接种, 每株茄苗刺三次。将接种茄苗放于23℃温室中, 保持相对湿度70%以上及光照12 h。若供试菌株为环腐病菌株则接种茄苗在第7 d第一片真叶叶缘上就出现水浸状, 12 d后症状明显, 叶缘或叶脉间失水、萎蔫, 并褪绿, 22 d后病部失绿坏死, 叶片畸形。Lelliott和Sella(1976)^[13]用此方法成功地检测了环腐菌的潜伏侵染, 检出率为1%; 在此基础上, Zeler和谢云陆(1985)^[14]用此方法进行了环腐菌检测极限试验, 结果最佳检测范围为 2×10^4 – 2×10^6 bac/mL, 检测极限为 2×10^3 bac/mL。谢云陆和何礼远(1987)^[15]用此方法对我国的环腐菌菌株进行了鉴定, 结果表明该品种茄苗对我国环腐病菌菌株表现仍很敏感, 但此方法费时、费力, 实验周期长, 所以此方法只可作为一种辅助鉴别手段。

2.4 利用生物学鉴定系统来检测

生物学(BIOLOG)鉴定系统是一种快速、相对准确且标准化程度高的鉴定系统; 主要根据供试菌株的生理生化特性鉴定, 对95种碳源的利用情况, 将结果经计算机处理后并与数据库内已知的马铃薯环腐菌比较, 实现对待测菌的快速鉴定及检测, 准确率为98%左右, 但只能在种水平上进行检测。BIOLOG鉴定系统需对病原菌先进行分离, 并且需要包含众多病原菌信息的数据库作为分析平台, 所以在应用中具有一定的局限性。

3 血清学方法鉴定检测马铃薯环腐病菌

血清学反应是以抗体与其抗原的专一性识别与结合为基础, 它利用抗体与抗原产生的凝集反应、沉淀反应以及现代免疫标记的免疫荧光标记技术、酶免疫技术、放射免疫技术、免疫电泳技术等对目标菌作出快速有效的诊断与检测。

3.1 乳胶致敏试验(AG)、乌赫特朗尼氏凝胶双扩散试验(DD)、间接荧光抗体染色试验(IFAS)

乳胶致敏试验是使包被了抗体(或抗原)的胶乳微粒(一般为直径约1 μm的聚苯乙烯胶乳)与其相应的抗原(或抗体)发生反应, 使原来处于游离状态的微粒数量减少, 胶乳凝集程度为被测物浓度的函数, 被测物浓度越高, 则凝集反应越强, 游离微粒越少, 正向透光度增强、浊度变小。通过计数反应前后游离状态微粒的变化或浊度变化, 能对被测物进行定量分析。

乌赫特朗尼氏凝胶双扩散试验是在琼胶介质上测定沉淀反应, 利用抗原和抗体的组成成分在琼胶中的扩散率不同而互相分离后再产生沉淀, 双扩散就是抗原和抗体两个反应物都不固定在介质中, 都可在介质中扩散, 相遇并达到适宜的浓度比例时就产生沉淀, 将细菌的抗血清放在培养平面的中间孔中, 四周的孔放置细菌株系, 从细菌蛋白质沉淀带的形成来分析其血清学关系。

间接荧光抗体染色试验是先使测定的微生物与未标记的抗体起作用, 然后加荧光物标记的抗体。假如测定的微生物是同系的(能与抗体起作用), 外面就包一层抗体, 上面再包一层标记的抗体, 标记的抗体不会被水洗去, 微生物就表现荧光性。假如测定的微生物不是同系的, 它就不能与抗体结合, 所加的荧光抗体也不能固着在它的表面, 很容易被水洗去, 测定的微生物就不表现荧光性。S. A. Slack和Kelma(1979)^[16]应用以上三种血清学方法检测马铃薯环腐病菌进行了比较试验, 灵敏度依次为 2×10^7 bac/ml, 2×10^7 bac/ml, $10 \sim 10^3$ bac./ml; 通过DD法和IFAS法可以将侵染于茄苗、马铃薯和番茄植株中环腐菌检测出来; 通过AG法、DD法和IFAS法都可将侵染于马铃薯块茎中的环腐菌检测出来; 在应用其它5种不侵染马铃薯的植物病原细菌进行试验时只有AG法存在交叉反应; 在应用其它几种侵染马铃薯的植物病原细菌(例如软腐、黑胫等)进行试验时三种方法都呈阴性。从此试验的灵敏度和专化性可见IFAS法是最好的。然而De Boer和Copema(1980)^[17]又对IFAS法的再现性提出质疑, 在IFAS法中对于一个可靠的试验结果最佳的抗体稀释度是个问题, 抗体稀释度太高则抗原过量导致染色失败, 抗体稀释度太低将导致非专化性反应发生。

3.2 酶联免疫吸附测定试验

这种方法是将微量的酶与测定的抗原或抗体结合, 以提高抗原与抗体反应的灵敏度。先在聚苯乙烯板测定孔内用抗血清中的丙体球蛋白涂一层, 然后加测定样本, 抗原则被抗血清吸附, 将酶联抗体加在被吸附的抗原上, 这就是常用的“双抗体夹心法”, 酶联合的抗体, 其中的酶水解以后加入的基质使颜色发生变化, 最后经酶标仪测定结果。另一种酶联吸附法为间接法, 它是先用抗原包被聚苯乙烯板测定, 抗体与抗原结合, 酶标抗抗体与抗体结合, 最后酶与底物发生颜色变化。常用的酶是辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶, 碱性磷酸酶标记的抗体的专化性和特异性较好。谢云陆和何礼远(1987)^[12]成功地以环腐菌株NCPPB2140和HECI免疫家兔获得了效价1:2048的抗体血清, 并应用间接酶联法对环腐菌进行了检测, 结果表明该抗体对供试菌株具有高度专化性。

3.3 单克隆抗体在马铃薯环腐菌检测上的应用

免疫动物脾脏的淋巴细胞即B淋巴细胞能产生特异

性抗体,但在体外培养最多只能存活 10~20 d,而骨髓瘤细胞虽可在体外培养液中大量繁殖长期存活,但不具备分泌特异性免疫球蛋白的能力,将这两种细胞融合而产生的杂交瘤细胞,一方面具有骨髓瘤无限生长的能力,另一方面又继承了免疫 B 淋巴细胞的功能,携带特异信息,能大量地合成特异性抗体。由于每个免疫细胞只能对单一的抗原决定基产生特异性抗体,因此,这种免疫细胞通过克隆化成为单克隆细胞系,就能产生大量单一的高纯度抗体,这种抗体就叫单克隆抗体。De Boer 和 Mcnaughton(1986)^[8]将单克隆抗体技术与 IFAS 法结合起来进一步提高了 IFAS 检测环腐菌的灵敏度和专化性,检测范围扩大为 >500 cells / 显微视野到 1 cell / 样品。De Boer 和 Wiczorek(1988)^[9]又将单克隆抗体技术与 ELISA 法结合起来进行环腐菌检测。在前人的研究基础上高德香等(1993)^[10]在国内第一次制备出马铃薯环腐菌的单克隆抗体,并进行了 IFAS 试验和双抗体夹心法检测环腐菌,IFAS 法所能检测的最低浓度为 1×10^3 bac/ml,双抗体夹心法检测的最低浓度为 7.8×10^3 bac/ml。

事实上目前的血清学技术最大的缺点是存在与其它相近病菌的交叉反应或制备的抗血清不能和所有的待检测的某一种病菌的所有菌株杂交。另外,有些筛选出的单克隆或多克隆抗体在特异性和灵敏度上还有待提高。

4 分子生物学方法检测马铃薯环腐病菌

80 年代后,随着分子生物学技术在许多领域的发展和运用,尤其是 PCR 方法的应用及计算机辅助分析,细菌在种及种以下的分类及检测研究也深入到分子水平,因而大大提高了细菌检测的准确性和灵敏度,且简便快速。

4.1 RFLP 法在环腐菌检测上的应用

限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)是 1974 年由 Grodzicker 等创立的,也是出现最早,现在依然普遍采用的 DNA 标记。RFLP 是指一个物种的 DNA 被某种特定的限制性内切酶消化所产生的 DNA 片段长度的变异性,这种变异的产生或是由于单个碱基的突变所导致的限制性酶切位点的增加或消失,或是由于 DNA 序列插入、缺失、倒位、易位等变化所引起的结构重排所致。Lee 和 Barfoszyk(1996)^[11]报道,应用类似方法用 *Hae* III/*Hha* I 酶切环腐菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 的 CBR16F2-CBR16R2 的嵌套式 PCR 产物,可将 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 同其它密执安棒型杆菌亚种区别开来。RFLP 具有准确可靠等优点,但该技术存在操作烦琐、放射污染等缺点;而且细菌的基因组比较小,酶切位点较少,反映的多态性不丰富。目前细菌的分子检测中,主

要是通过克隆或亚克隆某些 RFLP 的片段,并以这些片段作为探针,通过 DNA 杂交达到对细菌的检测。

4.2 应用基因探针技术检测环腐病菌

基因探针技术是建立在探针与被测标本基因序列同源性的基础上,进行检验的一项分子遗传学技术,即用一小段已知的 DNA 去识别被检测的相应基因序列,以鉴定、定位和定量细菌的遗传信息,从而使基因探针成为检测病原细菌的一种特异试剂。在植物病原细菌中存在着一些属、种甚至亚种、变种间特异性的基因片段,这些片段可以用来制成分子探针特异性地检测细菌。Johansen 和 Rasmussen(1989)^[12]报道,从 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 的 DNA 中分离出三个特异性基因片段并制成探针,将其中一个 2.6 kb 的探针 Pst I 用 P_{32} 标记来检测 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*,检测极限为 0.5 ng 全 DNA,用生物素标记的探针的检测极限也是 0.5 ng 全 DNA,但经磺化处理的探针的灵敏度只有前两者的 1/3。大量的非同源 DNA 分子的存在大大影响着信号的产生,尤其是当同源 DNA 分子的含量低于 5% 时。

4.3 核酸斑点杂交法检测环腐菌

细菌的 rDNA 操纵子包括三个有功能的保守序列(16 S rDNA, 23 S rDNA, 5 S rDNA)和不同的 ITS 序列。现在根据 rDNA 的特征区别细菌的许多方法已被应用。用保守序列的引物(一般是通用引物)可以扩增出系统发育中不同的细菌核糖体基因片段。从有关核糖体数据库中,可以得到一些资料来设计特异性扩增的引物;或者通过扩增 rDNA 产物经测序后选择病原菌特异性的引物序列。Mriza 等(1993)^[13]报道,用 PCR 从 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 中扩增出一部分 16 S rDNA 序列,测序后发现,此序列包含两个重要的变异区,据此设计出一个特异性核酸探针,采用斑点杂交的方法来验证它的特异性。在严格的 60℃ 条件下此探针可以同供试的所有的 16 个 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 菌株发生杂交反应,而同样条件下没有与对照的 32 种其它植物病原细菌和腐生细菌发生杂交反应;55℃ 条件下此探针可以同其它相关密执安棒型杆菌种中的三个亚种发生杂交反应;40℃ 条件下可以同供试的 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 所有亚种菌株发生杂交反应,此条件下该探针可以作为具有种间特异性的探针使用。rDNA 作为一种靶目标可以非常灵敏地检测细菌,但辨别能力一般只能达到种或属的水平。

4.4 ITS-PCR 检测环腐病菌

ITS 是内源转录间隔区(Internal Transcribed Spacers)的英文缩写。它首先由 Gonzalez 在 1990 年提出,随后逐步发展起来的全新的分子标记。其优点在于:具有高拷

贝数;同时包含保守与变异序列;能根据保守序列中的变异位点设计特殊引物进行特异性扩增比较。虽然细菌的ITS总的说来是相对保守的,但其间有足够的变异位点可以用于鉴别性比较,而且其多拷贝数使鉴别性的扩增更加灵敏。ITS区域的PCR扩增产物经限制性酶切分析(REA)或DNA序列分析都可以加强其特异性。

获得ITS区域多态性特征大致有三种方法:最直接、最快速的方法是使用高度保守的侧面相接的引物进行PCR扩增,观察其产物的电泳后的带型;第二种是产物经内切酶消化后电泳,观察其带型;第三种是使用特异性的探针经souther杂交后获得其多态性。这些多态性都可以用于细菌进行检测、诊断和确定。Xiang Li和De Boer(1995)报道^[14],先对供试的密执安棒型杆菌种几个亚种包括*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*进行区域扩增,将所得片断测序,在这些基础上设计出(*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*)的特异性引物Sp1F和Sp5R,这对引物可从环腐菌基因组DNA中扩增出一个215bp的特异性片断,而其它具有共同表型的相关细菌都没有特异性片断产生,包括密执安棒型杆菌种中的其它亚种、从马铃薯组织中分离出来的血清学实验表现相关的细菌和其它未知的从马铃薯上分离出来的腐生菌。这种PCR方法比应用单克隆抗体的ELISA法和间接免疫荧光染色试验更加灵敏,ELISA法和间接免疫荧光染色试验结果呈阴性的样品经PCR检测后呈阳性。

5 发展方向

对于马铃薯环腐病菌的常规检测,血清学方法仍然不失为一种准确、快速、简易可行的鉴定方法,并且检测成本较低、可操作性强,但如何克服与其它相近病菌的交叉反应以及如何近一步提高血清学反应的特异性和灵敏度,是今后研究工作的重点,在此基础上进行检测试剂盒的组装,是产业化应用开发的方向。在分子水平上进行马铃薯环腐菌的检测前景广阔,尤其针对存在于样品中的潜伏侵染的检测,需要探讨研究的内容很广泛,例如马铃薯环腐菌分子检测的特异性引物的筛选,特异性片段的回收、测序、克隆,分子探针的制备,分子检测试剂盒的组装等等,但分子水平上进行检测的成本相对较高,对仪器设备、检测人员的专业技术水平等要求较高,因而实际推广应用难度较大。

马铃薯环腐病现在仍然是冷凉地区马铃薯生产上一种主要的细菌性病害,对于环腐菌的鉴定检测不能单单依靠一种方法,因为任何一种方法都有其缺点和局限性,为得到真实、可靠的判定结果,应将多种方法取得的结果结合起来进行最终判定,因此针对马铃薯环腐菌鉴定检测建立一套完整的技术体系十分必要。这个体系大致

应包括田间病症诊断、病原菌的分离、革兰氏染色、生理生化特征鉴定、茄苗接种鉴定和分子水平检测,这样才能对样品进行宏观和微观的综合评价,最后作出真实、客观的判定。

参 考 文 献

- [1] 崔荣昌,李芝芳,吴国林,等.马铃薯环腐病鉴定法[S]. GB1833-2000,马铃薯脱毒种薯,14-15.
- [2] 谢云陆,何礼远.马铃薯环腐病鉴定和检测技术的初步研究[J]. 植物病理学报,1987,17(4):22-24.
- [3] Lelliott R A, P W Sellar. The detection of latent ring rot[J]. Eppo Bull, 1976, 6(2): 101-106.
- [4] Zeller W, Y Xie. Studies on the diagnosis of bacterial ring rot of potatoes[J]. Phytopath Z, 1985, 112: 198-206.
- [5] 谢云陆,何礼远.马铃薯环腐病种薯检验技术程序[J]. 植物保护,1987,13(4):31-32.
- [6] Slack S A, A Kelmar. Comparison of three serodiagnostic assays for detection of *Corynebacterium sepedonicum*. Phytopathology, 1979, 69(2): 186-189.
- [7] De Boer S H, R J Copeman. Bacterial ring rot testing with the indirect fluorescent antibody staining procedure [J]. American Potato Journal, 1980, 57: 457-465.
- [8] De Boer S H, M E McNaughton. Evaluation of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detecting latent bacterial ring rot infections. American Potato Journal, 1986, 63: 533-543.
- [9] De Boer S H, A Wiczorek, A Kummer. An ELISA test for bacterial ring rot of potato with a new monoclonal antibody. Plant Dis, 1988, 72: 874-878.
- [10] 高德香,何礼远,谢云陆.马铃薯环腐病棒杆菌单克隆抗体的制备[J]. 植物病理学报,1993,23(1):11-16.
- [11] Lee I M, L M Bartoszyk. Nested RCR assays for ultrasensitive detection of potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology, 1996, 86: 96-102.
- [12] Johansen I E, O F Rasmussen. Specific identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by DNA-hybridization probes. Phytopathology, 1989, 79: 1019-1023.
- [13] Mirza, M S, J L W Rademaker, J D Janse, et al. Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Can J Microbiol, 1993, 39: 1029-1034.
- [14] Xiang L, S H De Boer. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology, 1995, 85: 837-842.