

# 血清学玻片凝集试验在植物细菌病害鉴定上的应用

赖文姜 曾宪铭 陈俊英\* 范怀忠

(植保系)

## 提 要

血清学玻片凝集反应方法自从1962年Gehring和1965年Morton以及1977年Dickinson和Lucas分别展开了对青枯病(*pseudomonas solanacearum*)和柳树萎蔫病(*Erwinia Salicis*)鉴定以来,直到目前为止还只应用于这些病的鉴定。

本报告介绍的方法除了能用于青枯病鉴定之外还第一次成功地应用于水稻白叶枯病(*Xanthomonas oryzae*)和白菜软腐病(*Erwinia Carotovora* Var. *carotovora*)的鉴定。以植物病原细菌抗血清与其相对应的病株汁液进行玻片凝集反应试验,在10—20分钟内可以见到明显的凝集反应现象,而非对应的病株汁液进行试验则没有反应,方法简单而准确,对于这些细菌病的快速鉴定是非常有用的。

玻片凝集反应试验虽然已在某些植物病毒病的田间鉴定中广泛应用<sup>[4]</sup>,但在植物细菌病害方面的应用不多。早在六十年代, Morton<sup>[5]</sup>、Gehring<sup>[3]</sup>等用青枯菌抗血清与其相对应的病害汁液进行玻片凝集反应试验获得成功。但此法应用很少,发展很慢,直至七十年代除作物青枯病(*Ps. Solanacearum*)<sup>[2]</sup>外还只有柳树萎蔫病(*Erwinia Salicis*)<sup>[1]</sup>应用来进行快速鉴定。

由于细菌性病害的常规鉴定方法比较复杂,工作量较大,需要较长时间才能完成,既不能满足检疫工作的需要,也很不容易用来确诊在实验过程中出现的一些不典型症状的标样以及人工接种发“病”的大批寄主植物,很需要采用一种简单的快速鉴定方法,因此我们进行了本项试验研究。

## 一 材 料

### (一) 病原菌的分离和培养

用平板稀释法分离培养出番茄青枯菌、桑青枯菌、水稻白叶枯菌和十字花科蔬菜软

\* 蚕桑系

腐菌备用。

### (二) 抗原的制备

用番茄青枯菌和桑青枯菌分别针刺接种于番茄、桑、茄子、辣椒、马铃薯、烟草等10种植物上,也用水稻白叶枯菌、十字花科蔬菜软腐菌分别接种于水稻和十字花科蔬菜上,待出现明显症状后,取其新鲜病株组织液备用。并以不接种的健株组织液和病菌新鲜培养菌作对照。

### (三) 抗血清的制备

按常规方法,分别用番茄青枯菌、桑青枯菌、水稻白叶枯菌和十字花科蔬菜软腐菌的纯培养菌进行家兔免疫注射,制备出番茄青枯菌抗血清(滴定度为1:5000)、桑青枯菌抗血清(滴定度为1:5000)、水稻白叶枯菌抗血清(滴定度为1:5000)和十字花科蔬菜软腐菌抗血清(滴定度为1:1280)。然后把各种抗血清稀释至滴定度为1:500左右备用。并以健康家兔血清作对照。

## 二 方法和结果

### (一) 青枯病组织液玻片凝集反应试验

以滴定度为1:500的番茄青枯菌抗血清、桑青枯菌抗血清分别与人工接种发病后的10种作物共45株病株的组织浸出液或挤出液进行玻片凝集反应试验。具体操作方法:取一洁净戴玻片,滴上一滴生理盐水,用利刀片在维管束变色部切取1—8片(大小约 $3 \times 4$  mm)新鲜病组织放在该滴生理盐水中,等待片刻,使病原细菌充分涌出,至生理盐水出现明显混浊时移去病组织(或用手指压挤病组织的切口,把挤出液直接点滴在生理盐水上,至呈明显混浊为止),然后滴上一滴青枯菌抗血清(滴定度为1:500左右),并用接种环混和均匀,经5—20分钟用肉眼或放大10倍检查凝集反应情况。

试验结果(见表1)表明,无论番茄青枯菌抗血清或桑青枯菌抗血清都在5—20分钟内与人工接种的10种植物共45株病株的组织液(组织浸出液或挤出液)起明显的凝集反应,而作为对照的健株组织液则不起反应。此外,作为对照的健康家兔血清既不能与各病株组织液起凝集反应,也不能与健株组织液起凝集反应。

### (二) 几种细菌病的病株组织液的玻片血清凝集反应试验

以番茄青枯菌抗血清、桑青枯菌抗血清、水稻白叶枯菌抗血清、十字花科蔬菜软腐菌抗血清与其相对应的病株组织液进行玻片凝集反应(具体操作方法同上),并分别与其相对应的新鲜培养菌进行玻片凝集反应阳性对照试验。同时,还以健康植株组织液和健康家兔血清作阴性对照。

试验结果(见表2试验I部分)表明,上述病原菌抗血清都能与其相对应的抗原(病株组织液)起凝集反应。此外,我们还以这4个菌的新鲜培养菌进行凝集反应阳性对照试验,也获得同样结果。以健康组织液和健康家兔血清作对照试验没有反应。

### (三) 几种细菌病的病株组织液的玻片血清交叉凝集反应试验

以番茄青枯菌抗血清、桑青枯菌抗血清、水稻白叶枯菌抗血清、十字花科蔬菜软腐

表 1 感染青枯病的十种植物组织液的玻片凝集反应

试验次数	抗血清	桑		番茄		茄子		马铃薯		烟		辣椒		菜豆		豆角		蚕豆		丝瓜		瓜	
		病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)	病株组织液 (M)	健株组织液 (T)
一	桑青枯菌抗血清	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	番茄青枯菌抗血清	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	对照血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
二	桑青枯菌抗血清	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	番茄青枯菌抗血清	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	对照血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
三	桑青枯菌抗血清	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	番茄青枯菌抗血清	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	对照血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“T”表示用番茄青枯菌接种; “M”表示用桑青枯菌接种。

“+”表示有凝集反应; “-”表示无凝集反应。

表 2 植物细菌病组织液的玻片交叉血清凝集反应

试验次数	抗血清	病株组织液			培养物						健康株组织液				
		桑青枯病 组织液	番茄青枯病 组织液	十字花科蔬菜 软腐病组织液	水稻白叶枯病 组织液或菌液	桑青枯菌 培养物	番茄青枯菌 培养物	十字花科蔬菜 培养物	软腐菌培养物	水稻白叶枯菌 培养物	桑健株 组织液	番茄健株 组织液	十字花科蔬菜 健株组织液	水稻健株 组织液	
I	桑青枯菌抗血清	++	++			++					--				
	番茄青枯菌抗血清	++	++			++					--				
	软腐菌抗血清	++	++	++			++				--				
	水稻白叶枯菌抗血清	++	++		++				++		--			--	
	对照血清	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
II	桑青枯菌抗血清	++	++			++					--				
	番茄青枯菌抗血清	++	++			++					--				
	软腐菌抗血清	--	--	++			++				--				
	水稻白叶枯菌抗血清	--	--		++				++		--			--	
	对照血清	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	

“+++”表示重复试验三次均有凝集反应; “---”表示重复试验三次均无凝集反应。

菌抗血清分别与上述三种病害的病株组织液（或白叶枯病株的菌液）进行玻片交叉凝集反应试验，并分别与其相对应的病菌新鲜培养菌进行玻片交叉凝集反应对照试验。在此同时，还以健康植株组织液和健康家兔血清作阴性对照。

试验结果（见表 2 试验 II 部分）表明，上述各种病原菌只能与其相对应的病株组织液起凝集反应而不能与非对应的病株组织液起凝集反应。此外，以这 4 种菌的新鲜培养菌进行凝集反应对照试验也获得同样结果。以健康植株组织液和健康家兔血清作阴性对照试验没有反应。

### 三、结论

根据试验结果，我们认为利用血清学玻片凝集反应方法对作物青枯病、水稻白叶枯病、十字花科蔬菜软腐病进行田间鉴定是一种简单、快速而准确的方法。由于植物病原细菌的抗原性很好，它们的抗血清容易制备，所以我们认为这个方法很有发展前途，值得进一步研究和推广应用。

### 参 考 文 献

1. Dickinson, c.H. & J.A. Lucas, 1977, Plant pathology & plant pathogens. Blackwell Scientific.
2. Digat, B. and M. Cambra, 1976, Specificity of antigen in *Pseudomonas solanacearum* E. F. Sm. and application of serology for studying wilt. In proceedings of the first international planning conference and workshop on the ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. P. 37-57.
3. Gehring, F. 1962 On an occurrence of *P. solanacearum* in Egyptian imported Potatoes and on a simple serological demonstration method for this bacterium in heavily infected tuber material. Nachr Bl. dtsh flsch Dinst, Strettgart, 14. pp. 27-26 [R.A.M. 41(11): 671].
4. Kachalova (Mme Z.P.) 1962, Some results of the use of antisera of the Experimental station for plant protection--Lzv. Timiryazev. Sel. -khoze. Akad. 1962, 3 (46), pp. 214-220 [R.A.M. 42(4): 242]
5. Morton, D.T.P.D. Dukds, & S.F. Jenkin. Js. 1965, Serological identification of *Pseudomonas solanacearum* in four solanaceous host. Phytopathology 55, 1191-1193.

## A STUDY ON THE APPLICATION OF THE SEROLOGICAL SLIDE AGGLUTINATION TEST TO THE IDENTIFICATION OF BACTERIAL PLANT DISEASES

Lai Wen-Jiang      Zeng Xian-Ming  
Chan Choung-Ying      Faan Hwei-Chung

(Department of Plant Protection, SCAC)

### ABSTRACT

The serological slide agglutination test method has long been used only to identify the diseases caused by *Pseudomonas solanacearum* and *Erwinia salicis* since it was developed by Gehrning in 1962 and Morton in 1965 for the identification of the former diseases and by Dickinson and Lucas in 1977 for the identification of the latter ones. The method was first successfully applied to identify the diseases caused by *Xanthomonas oryzae* & *Erwinia carotovora* var *Carotovora* besides *Ps. solanacearum* in the present study. The plant sap of the disease portion was used for the test. The serological reaction completed within 10-20 minutes. Negative result was obtained whenever the specific antiserum was used to test against the sap of them non corresponding diseases plant. The method is simple but accurate and is considered to be very useful for a rapid identification of most bacterial diseases.