

金黄色葡萄球菌与难养菌协同共凝集法检测苹果锈果病

刘宏迪 冯鲁昕 王祈楷*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

张金岐 张良院

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 昌黎)

用苹果锈果病难养菌 (*Fastidious bacteria*) 制备抗血清包被富含 A 蛋白的金黄色葡萄球菌。包被菌与苹果锈果病难养菌进行共凝集试验 (SA-test), 产生沉淀即谓协同共凝集反应 (Co-agglutination)。用此法检测了不同来源、不同品系及不同树龄的苹果、巴梨、鸭梨、二十世纪梨。对难养菌接种的实验树也进行了检测。病树样品表现明显的协同共凝集反应, 健树样品则无此反应。检测难养菌接种的实验树也证实了回接的成功。讨论了该方法作为苹果锈果病早期快速简便诊断的可靠性, 以及应用于生产实际中的可行性。

关键词 苹果锈果病; 难养菌; 协同共凝集

利用金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 中的 Cowan I 株细胞壁富含 A 蛋白的特点, 进行细菌-金黄色葡萄球菌协同共凝集试验 (bacteria-*Staphylococcus* co-agglutination test, 简称 SA-test) 始于 Kronal^[1] 的工作。1973 年他将此方法用于肺炎球菌的分型工作。此后相继应用于分枝杆菌、链球菌、沙门氏菌、肠道菌以及 b 型流感杆菌等十多种细菌的检测, 对于植物的病原细菌和难养菌 (*Fastidious bacteria*) 的检测尚未见报道。

苹果锈果病是我国苹果产区中危害严重的病害之一。1935 年日本学者大塚义雄首次报道了本病^[2]。长期以来大塚义雄、青木二郎以及国内刘福昌等均认为是病毒病^[3,4]。1982 年日本学者小金沢硕城提出可能是由类病毒侵染所造成的^[5-7]。国内陈炜等也报告是由类病毒侵染引起的^[8]。我们 1985 年从锈果发病株的苹果树和巴梨树的输导组织中发现了一种难养细菌, 健树中不含此菌, 用此菌回接苹果已获成功(植病学报, 另文发表)。用该菌

免疫家兔制备的抗血清包被金黄色葡萄球菌, 采用 SA-test 方法对不同产地来源、不同品系、不同树龄的苹果树及梨树进行了检测。经过三年实验证实, 来自病树的样品, 包括带菌不显症的梨树都表现出明显的协同共凝集反应, 而对照健树样品中则无反应, 对检测结果还进行了电镜观察。

为了进一步确定协同共凝集法的灵敏度, 我们还检测了回接试验的传病情况, 对不同嫁接接种天数传病的试验, 包括用病树的皮或芽嫁接接种的幼树带菌情况进行了检测。

材料和方法

(一) 材料

1. 检测的树种和品系:

见表 1、表 3。

2. 不同嫁接接种天数的试验:

1988 年 4 月中旬在果树实验园内定植

本文于 1989 年 12 月 22 日收到。

* 索取资料请与王祈楷联系, 本课题为国家自然科学基金资助项目。

刘秋芬参加部分工作。

二年生苹果成苗 100 株。从 5 月中旬开始至 7 月下旬止,按不同天数将病树的皮或树芽分别嫁接在上述成苗上。嫁接接种分 4 个不同天数组,分别为接种 65、45、25、15d,同时设取自健树的接材嫁接的对照组。每个处理组均嫁接 15 株成苗,在同一天对嫁接接种的成苗进行带菌率的检测。

3. 不同地区来源的样品:

从苹果产地河北省的昌黎、秦皇岛、南大寺、卢龙、晋县及辽宁省前所果树农场和山东省果树研究所的第四、五果园中,分别采集了不同品系的苹果、梨树的样品供检测。

(二) 方法

1. 苹果锈果病难养菌抗血清的制备:

从河北省昌黎果树研究所采集苹果锈果病树(印度品种)的 1—2 年生枝条,用真空减压法抽取病树输导组织液,经低速离心去掉杂质,上清液经超速离心,蔗糖密度梯度离心,于紫外 260nm 监测收集有紫外吸收并经电镜观察含有难养菌的分部作为免疫原,详细方法见张金岐等报道(林业科学,待发表)。

按常规方法免疫家兔两次,每次注射难养菌提纯物 4mg,最终得到 1:320 效价的苹果锈果病难养菌抗血清。

2. 待检测样品的制备:

① 苹果、梨多年生大树样品的制备:

取病、健苹果、梨树的一年生枝条各 5—8 根,用减压法分别抽得汁液各 10ml,装入透析袋,用聚乙二醇反渗析,浓缩 10—20 倍,4℃ 下保存备用。

② 不同天数嫁接接种的苹果成苗待测样品的制备:

随机从每组中取 4 株上述嫁接接种的苗并编号,用上述方法抽取汁液经反渗析浓缩 10 倍。对照组用上述同样方法从

健康接穗嫁接的成苗制备样品。冰箱内 4℃ 保存备用。

3. 抗血清包被金黄色葡萄球菌体:

将富含 A 蛋白的金黄色葡萄球菌体冷冻干粉(上海生物制品所产品或自行培养制备)悬浮 1ml 灭菌蒸馏水中,加入苹果锈果病难养菌抗血清 0.1ml,37℃ 水浴保温 1h,用 0.01mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2,内含 0.014mol/L NaCl)离心洗涤 3 次,重新悬浮于 1ml 上述缓冲液中,冰箱内 4℃ 保存备用。

4. 检测:

取包被抗血清的菌体悬液 20 μ l 置于载玻片上,再分别加入上述各待测样品 20 μ l 混匀,2—3 分钟后观察结果。另以健康树制备的样品和生理盐水加包被菌体悬液作为两组空白对照,进行协同共凝反应试验。

5. 电镜观察:

用火棉胶覆盖喷碳后的电镜铜网,分别浸沾上述协同共凝集试验中呈阳性反应即表现凝集现象的混合液,及健株样品呈阴性反应无凝集现象的混合液。室温下自然干燥,2% 磷钨酸 pH4.5 染色干燥后,电镜(日立-H600)观察。

结 果

(一) 难养菌与金黄色葡萄球菌协同共凝集检测

检测了发病的印度、国光、国庆等苹果品种和表现锈果的巴梨,都有明显的协同共凝集反应;不显任何症状的鸭梨和二十世纪梨也有明显的协同共凝集反应;用难养菌吸附接种并已发病的苹果苗有反应,无病的无反应(见表 1 及图版 1)。用锈果病树皮或芽嫁接接种不同天数的苹果成苗,在接种后 15—65d 观察均未显症,用协同共凝集法检测发现接种 45—65d 的成苗

表 1 菌体共凝集法检测锈果病难养菌

Table 1 SA-test for detecting fastidious bacterium of scar peel disease

1987--1988

样品来源 Samples taken from	反 应* Reaction		树龄(年) Age of trees (year)
	1987	1988	
苹果, 国光, 22 号病树 Apple, cultivar Guoguang, No. 22, diseased	+++	+++	15
苹果, 国光, 21 号病树 Apple, cultivar Guoguang, No. 21, diseased	+++	++	15
苹果, 印度, 病树 Apple, cultivar India, diseased	++	+	28
苹果, 国庆, 病树 Apple, cultivar Guoqing, diseased	+++	未检测 not done	20
梨, 巴厘, 病树 Pear, cultivar Bali, diseased	+++	+++	15
梨, 鸭梨, 不显症 Pear, cultivar Yali, without symptoms	+++	++	30
梨, 20 世纪梨, 不显症 Pear, cultivar 20th century, without symptoms	+++	++	30
苹果, 国光病树上健枝 Apple, a branch born fruits without symptoms from diseased Guoguang	±	未检测 not done	20
苹果, 国光病树上病枝 Apple, a branch born fruits with symptoms from diseased Guoguang	+	未检测 not done	20
苹果, 国光健树, CK3 Apple, CK3, healthy	-	-	20
苹果, 国光健树, CK5 Apple, CK5, healthy	-	-	20
苹果, 国光健树, CK8 Apple, CK8, healthy	-	-	20
难养菌接种苹果苗, 发病 Apple, sapling inoculated with fastidious bacteria, diseased	++		1
难养菌接种苹果苗, 未发病 Apple, sapling inoculated with fastidious bacteria, not diseased	-		1
<i>S. aureus</i> 菌体包被抗血清 + 生理盐水 <i>S. aureus</i> Cowan I cells coated with antiserum + saline	-	-	

* +: 共凝集阳性反应; 混浊。Positive reaction, turbid.

++: 反应明显; 呈颗粒状凝。Obvious positive, agglutinated into small clumps.

+++: 强阳性反应; 凝集成较大颗粒。Strong positive, agglutinated into big clumps.

±: 反应不明显。Not evident.

-: 无凝集反应。Negative reaction.

表2 菌体共凝集法检测不同嫁接接种时间苹果幼树带菌率
Table 2 SA-test for detecting incubatory carriers at apple saplings inoculated by means of grafting for different days

1988

嫁接日期 Grafting date	检测日期 Test date	嫁接天数 Duration of grafting (d)	幼树编号 Sapling No.	反应* Reaction	带菌率(%) Carrier percentage	备注** Note
5月23日 May 23 th	7月28日 July 28 th	65	1	+	100	皮接 bark grafting
			2	++		
			4	++		
			5	+		
			CK5	-		
			CK11	-		
6月13日 June 13 th	7月28日 July 28 th	45	1	-	50	芽接 bud grafting
			2	+++		
			3	-		
			4	+++		
			CK5	-		
7月3日 July 3 rd	7月28日 July 28 th	25	1	-	0	芽接 bud grafting
			4	-		
			6	-		
			7	-		
			CK11	-		
6月13日 June 13 th	7月28日 July 28 th	15	3	-	0	芽接 bud grafting
			6	-		
			7	-		
			CK5	-		
			CK19	-		
对照: <i>S. aureus</i> Cowan I 菌体包被抗血清+生理盐水 Check: <i>S. aureus</i> Cowan I Cells coated with antiserum + saline				-		

* 见表1脚注。See Table 1 footnote.

** 接穗采自22号病苹果树。Scions were taken from diseased apple No. 22.

虽未显症,却有明显的协同共凝集反应;而接种后15—25d的苗木则既不显症也无凝集反应(见表2)。对不同地区苹果和梨检测的结果,见表3。

(二) 电镜观察

SA-test 反应结果在电镜下可以看到:在苹果锈果病难养菌抗血清包被的金黄色葡萄球菌的胞壁外表有一层电子致密区,为菌体细胞壁A蛋白与抗血清IgG的Fc段形成的特异结合层,结合层中IgG的

F(a, b)段又与被检测样品中的难养菌抗原产生特异性的结合。抗血清与抗原的这种特异性结合,使得难养菌与金黄色葡萄球菌体连结在一起,形成网状大的协同共凝集颗粒。可以看出,有的是几个难养菌和单个金黄色葡萄球菌结合,有的是单个难养菌和几个金黄色葡萄球菌结合,但大多为多个难养菌与数个金黄色葡萄球菌交错重叠结合形成大的协同共凝集颗粒(见图版II)。

表 3 离体培养法对不同地区样品检测结果
Table 3 SA-test results on samples from different regions

1988—1989

样品来源 Samples from	样品种类 Kinds of samples	反应 Reaction	备注: 除特别注明者外, 菌株弱, 键不详 Note: Unless noted specially, it was not clear whether the trees were infected or not
河北省 Hebei Province	1988年11月2日测试, 果实均已采收完毕 Tested at Nov. 2, 1988, all the fruits had been harvested		
昌黎县列所 Changli Institute	苹果, 园光 16-2 Apple, var. Guoguang 16-2	-	
中三区 Middle area No. 3	苹果, 园光 6-2 Apple, var. Guoguang 6-2	-	
	苹果, 园光 7-13 Apple, var. Guoguang 7-13	-	
	苹果, 元帅 16-9 Apple, var. Yanshuai 16-9	++	
	苹果, 金冠 16-1 Apple, var. Jinguang 16-1	-	
	苹果, 印度 15-2 Apple, var. India 15-2	++	
东山区 East Hill area	苹果, 赤阳 7-6 Apple, var. Chiyang 7-6	-	
	苹果, 赤阳 9-10 Apple, var. Chiyang 9-10	+	
	苹果, 园光 3-9 Apple, var. Guoguang 3-9	+++	
	苹果, 园光 3-1 Apple, var. Guoguang 3-1	+++	
中十一区 Middle area No. 11	苹果, 红星 2-3 Apple, var. Hongxing 2-3	-	
	苹果, 红星 4-3 Apple, var. Hongxing 4-3	±	
	苹果, 红星 6-10 Apple, var. Hongxing 6-10	±	
滦县专区 Maize area	苹果, 金冠 7-5 Apple, var. Jinguang 7-5	±	
	苹果, 金冠 4-3 Apple, var. Jinguang 4-3	±	
南一区 South area No. 1	苹果, 红富士 1 Apple, var. Hongfushi 1	-	
	苹果, 红富士 2 Apple, var. Hongfushi 2	-	
	苹果, 红富士 3 Apple, var. Hongfushi 3	+++	
	苹果, 红富士 4 Apple, var. Hongfushi 4	++	
	苹果, 红富士 5 Apple, var. Hongfushi 5	++	
	苹果, 胜利 2 Apple, var. Shengli 2	+	
西二区 West area No. 2	苹果, 胜利 3 Apple, var. Shengli 3	+	
	苹果, 胜利 4 Apple, var. Shengli 4	-	
	苹果, 胜利 5 Apple, var. Shengli 5	++	
	苹果, 胜利 6 Apple, var. Shengli 6	-	
	苹果, 胜利 7 Apple, var. Shengli 7	+	
曹县阿头果园 Orchard of Hetou.	苹果, 园光 59 Apple, var. Guoguang 59	+	病树 Diseased
	苹果, 园光 60 Apple, var. Guoguang 60	++	病树 Diseased

表 3 (续)

样品来源 Samples from	样品种类 Kinds of samples	反应 Reaction	备注: 除特别注明者外, 植株病, 健不详 Note: Unless noted specially, it was not clear whether the trees were infected or not	
卢龙县马台子林场 Mataizi Tree Farm, Count Lulong	苹果, 国光	+	果实无症状 Without symptoms on the fruits	
	苹果, 国光	-	果实无症状 Without symptoms on the fruits	
	苹果, 国光 2	+	病树 Diseased	
	苹果, 国光 3	++	病树 Diseased	
	苹果, 国光 4	+	病树 Diseased	
	苹果, 国光 3 东	+	果实无症状 Without symptoms on the fruits	
	苹果, 国光 3 西	-	果实无症状 Without symptoms on the fruits	
	梨, 红肖梨	-	果实无症状 Without symptoms on the fruits	
	梨, 巴梨 1	+		
	梨, 巴梨 2	-		
	梨, 巴梨 3	-		
	梨, 巴梨 4	+		
	苹果, 金冠	-		
	苹果, 国光	+		
秦皇岛阳岭果园 Orchard of Shaoling, Qinhuangdao	梨, 三季梨	-		
	梨, 鸭梨	-		
	苹果, 元帅 4	+	病树 Diseased	
	苹果, 元帅 5	++	病树 Diseased	
	苹果, 鸡冠	+	病树 Diseased	
	苹果, 鸡冠	±	果实无症状 Without symptoms on the fruits	
	山东省 Shandong Province 山东果树研究所 Shandong Institute of Pomology 第四果园 Orchard No. 4	1989年4月24日测试, 随机取样 Tested at April 24, 1989, random sampling		
		苹果, 国光 1	++	
		苹果, 国光 2	++	
		苹果, 国光 3	+	
苹果, 国光 4		-		
苹果, 国光 5		+		
苹果, 元帅 1		+		
苹果, 元帅 2		+		
苹果, 元帅 3		++		
苹果, 元帅 4		-		
苹果, 元帅 5	-			

<p>第五果园 Orchard No. 5</p>	<p>苹果, 金冠 1 Apple, var. Jinguan 1 苹果, 金冠 2 Apple, var. Jinguan 2 苹果, 金冠 3 Apple, var. Jinguan 3 苹果, 金冠 4 Apple, var. Jinguan 4 苹果, 金冠 5 Apple, var. Jinguan 5 梨, 莱阳砀梨 Pear, var. Layangcili 梨, 博山砀梨 Pear, var. Boshancili</p>	<p>± — + + ± — — —</p>
<p>辽宁省 Liaoning Province 前所果树场二分场 Qiansuo Orchard Section No. 2</p>	<p>1989年4月21日测试, 随机取样 Tested at April 24, 1989, random sampling 梨, 巴梨 1 Pear, var. Bali 1 梨, 巴梨 2 Pear, var. Bali 2 梨, 巴梨 3 Pear, var. Bali 3 梨, 巴梨 4 Pear, var. Bali 4 梨, 巴梨 5 Pear, var. Bali 5 苹果, 国光 1 Apple, var. Guoguang 1 苹果, 国光 2 Apple, var. Guoguang 2 苹果, 国光 3 Apple, var. Guoguang 3 苹果, 国光 4 Apple, var. Guoguang 4 苹果, 国光 5 Apple, var. Guoguang 5 苹果, 国光 6 Apple, var. Guoguang 6 苹果, 红星 1 Apple, var. Hongxing 1 苹果, 红星 2 Apple, var. Hongxing 2 苹果, 红星 3 Apple, var. Hongxing 3 苹果, 红星 4 Apple, var. Hongxing 4 苹果, 红星 5 Apple, var. Hongxing 5 苹果, 红富士 1 Apple, var. Hongfushi 1 苹果, 红富士 2 Apple, var. Hongfushi 2 苹果, 红富士 3 Apple, var. Hongfushi 3 苹果, 红富士 4 Apple, var. Hongfushi 4 苹果, 红富士 5 Apple, var. Hongfushi 5 苹果, 嘎红 Apple, var. Wohong 苹果, 国光 Apple, var. Guoguang</p>	<p>— ± — — — + + — — — + — + — + + — — — + + — — ± — ++ ++</p>
<p>七分场 Section No. 7</p>	<p><i>S. aureus</i> Cowan 1 菌体包被抗血清+生理盐水 <i>S. aureus</i> Cowan 1 cells coated with antiserum+saline</p>	<p>— —</p>
<p>九分场 Section No. 9</p>	<p>病树 Diseased 病树 Diseased</p>	<p>— —</p>
<p>十二分场 Section No. 12</p>	<p>病树 Diseased 病树 Diseased</p>	<p>— —</p>

* 见表 1 脚注。

See table 1 footnote.

讨 论

金黄色葡萄球菌细胞壁中的 A 蛋白可以和多种哺乳动物 IgG 分子的 Fc 段相结合,这一天然结合的特性,已被越来越广泛地应用到各种免疫学检测方法中。将难养菌免疫家兔得到的抗血清包被金黄色葡萄球菌,其 IgG 分子的 Fc 段结合在菌体细胞壁外。当被检测样品中存在抗原苹果锈果病难养菌,即可特异性地结合形成协同凝集颗粒。此方法用于检测难养菌尚未见有报道。

我们从印度苹果锈果病病树中提取并纯化难养菌作为免疫原,免疫家兔制备抗血清,包被了金黄色葡萄球菌。用于检测不同品种、树龄的苹果树及显锈果病症的巴梨、不显症的鸭梨和“二十世纪”梨,并检测用苹果锈果病难养菌人工接种过的苹果树苗,除用以苹果锈果病难养菌直接吸附法接种的发病树苗外,还包括嫁接病穗法接种的显症树苗。此外,在检测嫁接病皮或病芽不同天数的带菌情况的实验中,都

得到了满意的结果。这些结果表明,难养菌是苹果锈果病的病原。同时也证实锈果病苹果植株与梨树中的难养菌有共同的血清型,进一步说明了梨树的带病现象与苹果锈果病的密切相关性。

鉴于苹果锈果病危害很大,至今还没有好的防治方法。此法快速简便,可以用于发病前的诊断,用以检测种苗和接穗,预防该病的传播,以及建立无病菌圃等,在生产上是很有实际意义的。

参 考 文 献

- [1] Kronvall, G.: *J. Med. Microbiol.*, **9**: 187, 1973.
- [2] 大塚义雄: 日本园艺学会杂志, **6**(1): 44-53, 1935.
- [3] 大塚义雄: 日本园艺学会杂志, **9**(3): 282-286, 1938.
- [4] 刘福昌等: 苹果锈果病, 科学出版社, 北京, 1958.
- [5] 小金泽硕城等: *Acta Horticulturae*, **130**: 193-197, 1982.
- [6] 小金泽硕城等: 果树试报 C, **10**: 49-60, 1983.
- [7] 小金泽硕城等: 日本植物病理学会报, **51**(2): 172-182, 1985.
- [8] 陈 炜等: 病毒学报, **2**(4): 366-371, 1986.

BACTERIA-STAPHYLOCOCCUS CO-AGGLUTINATION TEST (SA-TEST) FOR DETECTION OF FASTIDIOUS BACTERIA ASSOCIATED WITH APPLE SCAR PEEL DISEASE

Liu Hongdi Feng Luxin Wang Qikai*

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Zhang Jinqi Zhang Liangwan

(Institute of Pomology, Hebei Academy of Agronomy and Forestry, Changli)

SA-test was applied successfully in detection of fastidious bacteria associated with apple scar peel disease in apple and pear of various cultivars with or without symptoms. The affected apple saplings which had been infected by grafting or inoculated by infusion

with a suspension of the bacteria in question could also be detected successfully whether the symptoms appeared or not.

The usefulness of this test as a rapid diagnosis method in the orchard was discussed.

(SA-test)

Key words

Apple scar peel disease; Fastidious bacteria; *Staphylococcus* co-agglutination test

* Address reprint requests to: Prof. Wang Qikai, The Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing, 100080, China.

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

1. 对照; 2. 国光苹果病树 21 号; 3. 对照; 4. 国光苹果病树 22 号; 5. 对照; 6. 国庆苹果病树; 7. 对照; 8. 印度苹果病树; 9. 对照; 10. 巴梨病树; 11. 对照; 12. 鸭梨; 13. 对照; 14. 20 世纪梨。

图 版 II

难养菌与金黄色葡萄球菌共凝集反应的电镜照片: 1. 几个金黄色葡萄球菌与一个难养菌聚合 (50000×); 2. 一个金黄色葡萄球菌与二个难养菌聚合 (50000×); 3. 几个金黄色葡萄球菌与几个难养菌聚合 (30000×); 4. 几个金黄色葡萄球菌与几个难养菌聚合 (30000×)。

Plate I

1. Check; 2. Apple, var. Guoguang No. 21, diseased; 3. Check; 4. Apple, var. Guoguang No. 22, Diseased; 5. Check; 6. Apple, var. Guoqing diseased; 7. Check; 8. Apple, var India diseased; 9. Check; 10. Pear, var. Bali diseased; 11. Check; 12. Pear, var. Yali; 13. Check; 14. Pear, var. 20th century.

Plate II

Electron-micrograph of fastidious bacteria-*Staphylococcus* co-agglutination: 1. Several cells of *S. aureus* Cowan I agglutinated with a fastidious bacterium cell (FB); 2. A cell of *S. aureus* Cowan I agglutinated with 2 fastidious bacterium cells; 3. Several cells of *S. aureus* Cowan I agglutinated with several fastidious bacterium cells; 4. Several cells of *S. aureus* Cowan I agglutinated with several fastidious bacterium cells.

FB: 难养菌 Fastidious bacterium

S: 金黄色葡萄球菌 *S. aureus* Cowan I