

间接 ELISA 法检测棉子携带黄萎病菌新方法

林玲¹, 陈志石¹, 龚伟荣², 张爱香¹, 顾甘雨¹, 顾本康¹

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014; 2. 江苏省植物保护站, 南京 210013)

摘要:以棉花黄萎病菌 Bp₂ 培养液中毒素蛋白免疫 BALB/C 小白鼠制备抗血清, 建立了可特异性检测棉花黄萎病菌的间接 ELISA 方法。所制备的毒蛋白抗血清效价为 1: 204800, 对毒蛋白的最低检测量达 7.81 μg · L⁻¹。可以与江苏省各地采集到的棉花黄萎病菌的培养液发生特异性反应, 而与其它致病菌培养液反应呈阴性。用该方法对 81 份江苏省抽样的棉子进行检测, 12 份呈阳性反应。取检测为阳性反应的这些棉子培养液针刺接种棉苗也全都发病。这些结果表明所建立的间接 ELISA 方法可用于棉子携带黄萎病菌的快速检测。

关键词:间接 ELISA; 棉子; 黄萎病菌; 毒素

中图分类号:S435.621 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2006)06-0327-05

Indirect ELISA Method for Detection of *Verticillium Dahliae* in Cottonseed

LIN Ling¹, CHEN Zhi-shi¹, GONG Wei-rong², ZHANG Ai-xiang¹, GU Gan-yu¹, GU Ben-kang¹

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Plant Protection Unit, Nanjing 210013, China)

Abstract: *Verticillium* wilt of cotton is a widespread and destructive disease that is caused by the fungus pathogen *Verticillium dahliae*. Except condign climate and lack of resistant varieties, one of the important reasons made the disease more and more serious is seed-borne pathogen. To establish an effective method to detect *Verticillium dahliae* in cottonseed, an indirect ELISA method was developed. The toxin of *Verticillium dahliae* strain Bp₂ was used as antigen to prepare polyclonal antiserum. An indirect ELISA method was developed using alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse antibody as secondary antibody according to standard ELISA procedures. If the value of P/N ≥ 2 , the sample was positive. P/N means the rate of OD₄₀₅ of sample and OD₄₀₅ of negative control. The titre of the antiserum was 1: 204800 and the toxin could be detected as low as 7.81 ng · mL⁻¹. All of *Verticillium dahliae* strains collected from different cities in Jiangsu Province performed positive reaction, and no cross-reactivity was observed among the isolates representing other species of fungi such as *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Magnaporthe grisea*. The *Verticillium dahliae* strain Bp₂ or T₉ was cultured after 1 day, the toxin could be detected in the culture solution. Any of these two strains was cultured after 3 days, the value of P/N was 9.05, 8.82, respectively, and this high value could remain 11 days. So *Verticillium dahliae* in cottonseed could be deduced by detecting the toxin with this developed indirect ELISA.

81 cottonseed samples were randomly chosen from different seed companies and were detected if there was *Verticillium dahliae* in them. 100 g cottonseeds from each sample were washed by glide. Coated cottonseeds were washed till the coating chemical was moved clearly. Then the cottonseeds were dried in room temperature and separated by five shares each. Each share was put in 150 mL Czapek medium and then cultured for three days. The culture medium was centrifuged for 30 min at 5000 r · min⁻¹, and the supernatant was tested using indirect

收稿日期:2005-11-08 作者简介:林玲(1973-),女,硕士,助理研究员,linling@jaas.ac.cn

基金项目:国家“十五”攻关项目(2001-BA509B05-02)、江苏省农业三项工程项目(SX(2004)098)

ELISA. 12 out of 81 cottonseed samples performed positive reaction. Cotton seedlings were infected *Verticillium* wilt by inoculated with the culture solution of the cottonseed samples that performed positive reaction. These results demonstrated that method of indirect ELISA could be used for quickly detection of *Verticillium dahliae* in cottonseeds.

Key words: indirect ELISA; cottonseed; *Verticillium dahliae*; toxin

棉花黄萎病 (*Verticillium* Wilt) 是棉花上的一种毁灭性病害, 最先在美国发现, 20 世纪 30 年代随美国棉种传入我国, 后扩散到河南、山东、新疆等 20 多个省(区、市), 1995 年再一次被列为全国植物检疫对象。自 20 世纪 90 年代后期, 江苏省棉花黄萎病的危害逐年加重, 特别是近两年该病在江苏省扩展蔓延迅速, 发生程度不断加重, 原因除了缺乏较强的抗耐性棉花品种、适宜的气候条件之外, 其中一个重要原因是种子带菌。由于棉花黄萎病菌在病田中存活时间长, 一旦扩散, 将给棉花生产带来毁灭性灾害。目前, 对棉花黄萎病菌的检测主要采用 PCR 方法及免疫技术^[1-2], 但多是针对培养好的黄萎病菌, 而对种子带菌的检测还远未实现。当前急需一套行之有效的棉子检测技术尤其是对“药物包衣”棉子的检测技术。本文以棉花黄萎病菌毒素制备抗血清, 建立了快速、灵敏的间接 ELISA 方法, 用于棉子黄萎病菌的检测。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

供试的菌株包括棉花黄萎病菌 Bp₂、T₉、02SY₃、02XZH₃、02GY₃、02YD₅、VD₈、02NJ₂、V₁₅₁、02FN₈、02DT₆、02XY₃、02CS₃ 以及棉花立枯病菌、棉花红腐病菌、小麦赤霉病菌、油菜菌核病菌和稻瘟病菌, 这些菌株都由江苏省农业科学院植物保护研究所提供。

1.2 抗原制备

参照 Koppel 等的方法^[3]。活化后的棉花黄萎病菌菌株 Bp₂ 接种于查彼克培养液中, 25℃ 振荡培养 16 d 后, 5000 r·min⁻¹, 离心 30 min, 取上清, 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 装入超滤离心管 (Millipore 公司, 截留分子量为 10000 Da) 中, 反复离心直到毒素蛋白浓缩达 0.1 mg·L⁻¹ 以上, 用生理盐水 4℃ 透析备用。

1.3 毒素抗血清的制备

将抗原与福氏不完全佐剂以 1: 1 混合充分乳化后, 按腹腔注射法共 4 次免疫 BALB/C 小白

鼠, 每次免疫间隔 3 周。眼球采血法采血, 获得毒素的抗血清。

1.4 间接 ELISA 方法的建立

参照 Bouterige 等的方法^[4], 略有改动。其测定程序为: 先将抗原用碳酸盐缓冲液稀释后, 取 100 μL 加至酶标板的反应孔中 37℃ 下孵育 2 h 或 4℃ 过夜后, 用 PBST 洗板 3 次, 然后加入 300 μL 封闭缓冲液 (含 1% 脱脂奶粉的 PBST) 37℃ 保温 1 h, PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100 μL 用封闭缓冲液稀释的抗血清于 37℃ 下保温 1 h, 再用 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 100 μL 用封闭缓冲液稀释 6000 倍的碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体 (IgG-AP) 于 37℃ 下保温 1 h, 再用 PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 100 μL 新配制的含 1 g·L⁻¹ 对硝基苯磷酸盐底物显色液 37℃ 下显色, 最后加入 50 μL 0.2 mol·L⁻¹ EDTA 终止反应。在酶标仪上测出 405 nm 处的 OD 值。ELISA 检测 P/N 值 (positive/negative) 计算公式: P/N = 样品平均 OD₄₀₅ 值 / 阴性对照平均 OD₄₀₅ 值。

1.5 毒素抗血清的鉴定

将毒素抗血清从 1: 6400 开始倍比稀释至 1: 819200, 以免疫前的健康血清为阴性对照, 按上述间接 ELISA 程序测定抗血清的效价。以 P/N ≥ 2 判为阳性。将毒素抗原从 2 mg·L⁻¹ 开始逐步稀释至 0.0039 mg·L⁻¹, 按上述间接 ELISA 程序检测灵敏度。以判为阳性的最大抗原稀释倍数作为检测灵敏度。以建立的间接 ELISA 方法测定抗血清与棉花黄萎病菌菌株 T₉、02SY₃、02XZH₃、02GY₃、02YD₅、VD₈、02NJ₂、V₁₅₁、02FN₈、02DT₆、02XY₃ 和 02CS₃ 以及棉花立枯病菌、棉花红腐病菌、小麦赤霉病菌、油菜菌核病菌、稻瘟病菌培养液的反应, 以确定抗血清的特异性。

1.6 培养滤液中毒素的测定

将活化的菌株 Bp₂ 和 T₉ 分别接种于查彼克培养液中, 25℃ 振荡培养, 分别在 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d、11 d 后取培养液, 按上述间接 ELISA 程序测定培养液中的毒素, 以未接菌的培养液为阴性对照。

1.7 棉子中毒素的测定

对江苏省植保站送检的 81 份怀疑带菌的棉子样品进行测定。其程序为:每份棉子样品分别取 100 g 置于网兜中,分开浸泡清洗。毛子用流水搓洗 2~3 次,药物包衣的棉子反复搓洗至药物包衣完全洗净,然后将种子于阴凉处晾干。将晾干的每份棉子样品平均分成 5 份分别加入 150 mL 含有适量氯霉素的查彼克培养液中,25℃ 振荡培养 3 d 后取培养液 5000 r·min⁻¹ 离心 30 min 后的上清液,按上述间接 ELISA 方法进行检测,以菌株 Bp₂ 的毒素抗原为阳性对照,未接菌的培养液为阴性对照。

1.8 带菌棉子培养液的针刺接种试验

将间接 ELISA 检测为阳性的棉子按照上述方法洗净晾干后,每份各称 100 g,分别装入 600 mL 含有适量氯霉素的 PDB 培养基中,阳性对照选用棉花黄萎病菌 Bp₂,25℃,150 r·min⁻¹,培养 6 d 后,2000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清液,用针刺接种的方法接种于 2 片真叶期的泗棉 3 号棉苗的茎基部^[5]。20 d 后劈杆调查发病率。

2 结果与分析

2.1 毒素抗血清的鉴定

毒素抗血清效价的测定结果见图 1,当毒素抗血清稀释至 1: 204800 时,测定的 OD₄₀₅ 值与阴性对照 OD 值之比(P/N) >2,而当抗血清稀释至 1: 409600 时,P/N <2,表明本研究制备的毒素抗血清的效价为 1: 204800。

抗血清特异性测定结果(表 1)表明,棉花黄萎病菌的美国标准菌株 T₉ 以及从江苏省各地采集的棉花黄萎病菌菌株的培养液均可与毒素抗血

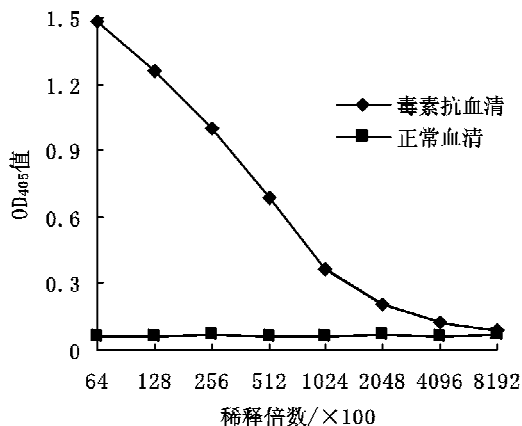


图 1 毒素抗血清效价测定

Fig.1 Titres of antiserum against toxin

清发生阳性反应,而抗血清与非黄萎病菌的培养液的反应呈阴性。由此可以认为该抗血清对棉花

黄萎病菌的培养液有较高的特异性,可用于毒素的检测。

间接 ELISA 检测灵敏度的测定结果见图 2,当毒素抗原稀释至 7.81 μg·L⁻¹ 时,测定的 OD₄₀₅ 值与阴性对照 OD 值之比(P/N) >2,而当毒素抗原稀释至 3.91 μg·L⁻¹ 时,P/N <2。因此,本研究建立的间接 ELISA 方法对毒素抗原的最低检测量达 7.81 μg·L⁻¹。

表 1 毒素抗血清特异性的测定

Table 1 Specialization of antiserum against toxin

菌株(采集地点)	OD ₄₀₅ 值	P/N 值	阳/阴性反应
T ₉ (美国)	1.668	21.95	阳
棉 02SY ₃ (江苏省泗阳县)	0.658	8.66	阳
02XZH ₃ (江苏省徐州市)	1.067	14.04	阳
花 02GY ₃ (江苏省灌云县)	0.428	5.63	阳
02YD ₅ (江苏省盐都市)	1.352	17.79	阳
黄 VD ₈ (江苏省南通市)	1.465	19.28	阳
02NJ ₂ (江苏省南京市)	0.682	8.97	阳
菱 V ₁₅₁ (江苏省南通市)	0.499	6.57	阳
病 02FN ₈ (江苏省阜宁县)	1.148	15.11	阳
02DT ₆ (江苏省东台市)	1.098	14.45	阳
菌 02XY ₃ (新洋试验站)	1.192	15.68	阳
02CS ₃ (江苏省常熟市)	1.661	21.86	阳
棉花立枯病菌	0.113	1.49	阴
棉花红腐病菌	0.110	1.45	阴
小麦赤霉病菌	0.086	1.13	阴
油菜菌核病菌	0.089	1.17	阴
稻瘟病菌	0.083	1.09	阴
阳性对照(抗原)	2.160	28.42	阳
阴性对照	0.076	--	--

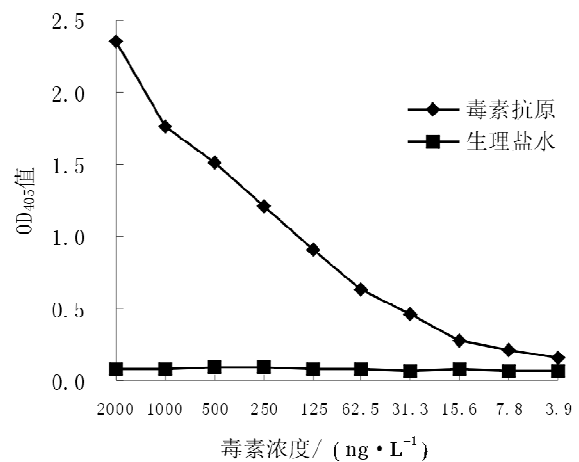


图 2 最低毒素抗原检测量的测定

Fig.2 Determination of minimum amount of the toxin antigen

2.2 培养滤液中毒素的测定

棉花黄萎病菌菌株 Bp₂ 和 T₉ 培养液中毒素的测定结果见图 3。菌株 Bp₂、T₉ 在培养 1 d 后就可从培养液中检测到毒素。在培养至 3 d 后,

OD₄₀₅值已分别达到 1.407、1.371, P/N 值分别为 9.05、8.82, 并且在 11 d 内都保持较高的 OD₄₀₅ 值。表明所建立的间接 ELISA 方法能够快速检测棉花黄萎病菌培养液中的毒素。

2.3 间接 ELISA 方法在棉子检测上的应用

对从江苏省棉花抽样的 81 份怀疑带菌的棉子用间接 ELISA 方法检测, 结果表明, 62 份包衣子中 4 份带菌, 17 份毛子中 8 份带菌, 2 份光子中没有检查出带菌。在带菌的棉子中, 也并不是每个三角瓶中(含 20 g 棉子)的培养液中都呈阳性反应, 如表 2 所示。对间接 ELISA 检测为阳性的 12 份棉子经针刺接种的方法接种于泗棉 3 号棉

表 2 检测出的带菌棉子举例

Table 2 Illustration of the cottonseed samples of positive reaction in indirect ELISA

棉子样品序号	OD ₄₀₅ 值	平均值	反应
1-21 (包衣子)	① 0.384 0.352 0.463 0.400		阴性
	② 0.488 0.502 0.593 0.528		阴性
	③ 0.744 0.777 0.932 0.818		阳性
	④ 0.813 0.816 0.958 0.862		阳性
	⑤ 0.219 0.213 0.224 0.219		阴性
阳性对照	1.478 1.447 1.571 1.499		
阴性对照	0.353 0.316 0.378 0.349		
2-4 (毛子)	① 0.561 0.574 0.587 0.574		阳性
	② 0.310 0.319 0.318 0.316		阴性
	③ 0.482 0.455 0.516 0.484		阴性
	④ 0.566 0.571 0.605 0.581		阳性
	⑤ 0.247 0.259 0.291 0.266		阴性
2-5 (毛子)	① 0.403 0.411 0.396 0.403		阴性
	② 0.606 0.589 0.567 0.587		阳性
	③ 0.607 0.581 0.565 0.584		阳性
	④ 0.446 0.437 0.426 0.436		阴性
	⑤ 0.485 0.532 0.459 0.492		阴性
阳性对照	1.055 1.030 0.974 1.020		
阴性对照	0.246 0.255 0.254 0.252		

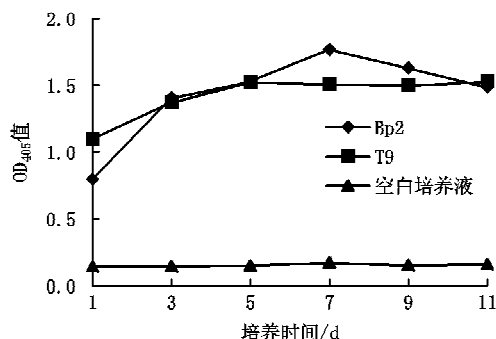


图 3 棉花黄萎病菌菌株 Bp₂、T₉ 培养液中毒素的测定
Fig.3 Detection of toxin in the culture of *Verticillium dahliae* strain Bp₂, T₉

苗的茎基部, 20 d 后劈秆调查都可使棉苗发病, 具体发病率如表 3 所示。

表 3 针刺接种泗棉 3 号棉苗的发病率

Table 3 The disease incidence of inoculated Simian 3 seedlings

棉子样品序号	发病率/%	棉子样品序号	发病率/%
1-8	70.00	2-13	58.33
1-21	50.00	2-14	63.64
2-1	63.64	2-15	30.00
2-4	54.55	2-16	45.45
2-5	41.67	3-13	60.00
2-8	41.67	阳性对照(BP ₂)	60.00
2-11	54.55	阴性对照(PDB)	0.00

3 讨论

棉花黄萎病主要是由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)引起的一种维管束萎蔫病害, 被列为检疫对象。棉花黄萎病菌的常规检测方法操作复杂、费时, 特异性也不高。直接利用菌体作抗原, 制备抗血清进行免疫检测, 又可能会出现抗血清效价偏低以及与其它具有相同抗原成分病原菌引起交叉反应的缺陷^[6]。棉花黄萎病菌产生的毒素蛋白是感病棉花品种致萎的主要原因^[7], 因此利用毒素制备抗血清就可以检测出棉花黄萎病菌。刘凤权等用毒素抗血清在病菌培养滤液、人工接种幼苗和大田病株中已能成功检测出黄萎病菌^[8], 另外, 齐俊生等的研究表明, 毒素抗血清具备一定生理型特异性, 用强致病力菌系 V₉₉₁ 毒素制备的抗血清对强致病力菌系毒素具有更强的结合力, 能够检测出强致病力落叶型菌系^[2], 但还没有利用毒素抗血清检测棉子携带黄萎病菌的报道。本文以棉花黄萎病菌 Bp₂ 培养液中毒素蛋白免疫 BALB/C 小白鼠制备抗血清, 建立了可特异性检测棉花黄萎病菌的间接 ELISA 方法。可用于棉子携带黄萎病菌的快速检测, 是目前用于检测棉花黄萎病菌的一种比较简单可行, 并且可信度较高的检测方法。

根据陈吉棣等的研究, 病铃内成熟种子的带菌率为 0.025%^[9], 本文对于棉子携带黄萎病菌的检测, 采取每个样品随机取棉子 100 g, 即 1200 粒左右, 培养时平均置于 5 个三角瓶中培养, 可能并不是每个三角瓶中都装有携带有黄萎病菌的棉子, 因此, 间接 ELISA 检测结果表现出有的三角瓶培养液呈阳性, 有的呈阴性。而在带菌棉子培养液的针刺接种试验中, 则采用 100 g 棉子置于同 1 个三角瓶中培养, 用其培养液针刺接种棉苗,

以验证间接 ELISA 检测结果的可靠性。另外,本文采用碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体作为二抗,而不是过氧化物酶标记的二抗,有效地避免了植物体内过氧化物酶及酚类的干扰,增加了实验结果的可靠性。

目前棉子所用的包衣剂大多是针对苗病,而不是黄萎病,本文从包衣子中检测到棉花黄萎病菌,说明包衣还不能完全杀死黄萎病菌,包衣子并不是无菌子。但检测结果也显示出,经硫酸脱绒后的光子和包衣子,其黄萎病菌的带菌率已经明显低于毛子。如果能制备单克隆抗体,将对利用间接 ELISA 检测棉子黄萎病菌具有更重要的意义。

参考文献:

- [1] 朱有勇,王云月,Lyon B R. 大丽轮枝菌核糖体基因 ITS 区段的特异扩增[J]. 植物病理学报,1999,29(3):250-255.
- [2] 齐俊生,史雪岩,简桂良,等. 棉花黄萎菌落叶型菌系毒素纯化及抗血清制备[J]. 棉花学报,2004,16(6):343-346.
- [3] KOPPEL M M, Schots A. Monoclonal antibody-based double-antibody sandwich-ELISA for detection of *Verticillium* spp. in ornamentals [J]. Phytopathology, 1995, 85(5): 608-612.
- [4] BOUTERIGE S, Robert R, Bouchara J P, et al. Production and characterization of two monoclonal antibodies specific for *Plasmopara halstedii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3277-3282.
- [5] 顾本康,李经仪. 棉花黄萎病菌实针接种试验[J]. 江苏农业科学,1984(1):47.
- [6] NACHMIAS A, Buchner V, Krikun J. Differential diagnosis of *Verticillium dahliae* in potato with antisera to partially purified pathogen produced extracellular antigens[J]. Potato Res, 1982, 25:321-328.
- [7] 章元寿,王建新,刘经芬,等. 大丽轮枝菌毒素的分离、提纯及生物测定[J]. 真菌学报,1989,8(2):140-147.
- [8] 刘凤权,章元寿. 棉花黄萎病菌毒素 ELISA 检测方法的建立及其应用[J]. 棉花学报,2003,15(1):47-50.
- [9] 陈吉棣,陈松生,王俊英,等. 棉花黄萎病种子内部带菌的研究[J]. 植物保护学报,1980,7(3):159-163.

