

马铃薯种薯生产的研究

II. 几种血清学方法对马铃薯病毒 X 诊断效果的比较

马铃薯种薯生产协作组*

用提纯病毒比较了放射状免疫扩散 (RID)、皂土凝聚反应 (BFT)、微量沉淀反应 (MPT) 和试管沉淀反应 (TPT) 测定马铃薯病毒 X (PVX) 的灵敏度。RID 和 BFT 测定 PVX 的最低浓度为 1 微克/毫升 (每个测定分别需 0.01 微克和 0.1 微克)。MPT 和 TPT 的灵敏度为 100 微克/毫升 (每个测定分别需 0.1 微克和 25 微克)。

用马铃薯叶片榨取液测定时, RID、BFT 和微量凝集反应 (MAT) 的诊断效率分别为 93%、71% 和 82%。用幼芽榨取液时, BFT 和 MAT 的诊断效率为 96% 和 80%。

近年来, 内蒙等省区开展了应用茎尖培养生产无病毒原种防止马铃薯退化的工作^[1]。为了在原种生产过程中对带毒率进行检测, 迫切需要快速简便的病毒诊断方法。

关于马铃薯病毒诊断方法, 国际上已进行了大量工作^[2]。本文报告应用近年发展起来的灵敏度较高的放射状免疫扩散和皂土凝聚反应, 以及国外已用于生产的微量凝集和微量沉淀反应, 测定马铃薯病毒 X (PVX) 的结果。放射状免疫扩散法 (或琼脂单扩散法) 是将抗血清混合在琼脂中制成凝胶平板, 把测定样品滴在打出的孔洞中, 反应后形成放射状的沉淀环。由于抗原抗体结合是在半固体中经过抗原扩散后完成的, 因而提高了灵敏度。皂土凝聚反应是将抗体蛋白吸附在皂土颗粒上, 并以美蓝染色, 当抗原抗体结合时形成清晰的蓝色凝聚物, 使诊断效果增强。微量凝集法和微量沉淀法是在培养皿底部铺一层火棉胶或聚乙烯醇缩甲醛薄膜, 将样品加至成滴的抗血清中, 其上盖一层石蜡油以防蒸发, 并通过延长保温时间来达到微量测定的目的。样品中有叶绿体颗粒存在时形成凝集物, 称微量凝集反应; 形成沉淀时

称微量沉淀反应。

材料和方法

病毒 用 PVX 的一个强株系作为制备抗血清和标准病毒的材料。病毒在烟 (*Nicotiana tabacum* L.) 上繁殖, 接种后 2 周收获叶片, 冰冻。在 0.005M 的柠檬酸钠中作成匀浆, 低速离心取上清液, 加入 10% 正丁醇充分搅拌。10000g 离心 15 分, 上清液中加入 7% 聚乙二醇 (分子量 6000) 和 2% 氯化钠使病毒沉淀, 沉淀悬浮于 0.005M 柠檬酸钠中, 低速离心除去不溶物后, 以 105000g 超速离心 60 分, 可得分析超离心纯的制品, 用作标准病毒。按 Reichmann M. E. 方法^[3]测定病毒含量。

抗血清 抗血清制备方法除使用 Freund 完全佐剂外, 与以前方法^[4,5]相同。所得抗血清效价为 5000 左右^[6]。

放射状免疫扩散 (RID)^[7-9] 制备抗体琼脂平板前, 所用琼脂先用蒸馏水浸泡 2—3 天。以蒸馏水配成 3% 琼脂, 加入 0.1% 叠氮钠防腐。在直径 10 厘米的培养皿内加入 2.5 毫升抗血清和 2.5 毫升缓冲生理盐水, 在 37—40℃ 下保温, 加入 5 毫升溶化后在 60℃ 下保温的 3% 琼脂, 迅速

本文于 1976 年 10 月 15 日收到。

* 参加工作单位: 内蒙古大学生物系微生物教研组、内蒙古乌兰察布盟农业科学研究所马铃薯组、中国科学院北京植物研究所病理生理组、中国科学院微生物研究所植物病毒组。

混合使均匀铺盖皿底。凝固后,用直径 4 毫米的打孔器按皿底衬放的抗原孔位置(孔距 4—6 毫米)打孔。每皿可打 72—84 个孔。将待测样品的粗榨取液 0.01 毫升加入孔内,在保湿的条件下 37℃ 反应 2—3 小时。如沉淀环不清楚,可用 2% 醋酸处理后观察结果。在阳性反应中可看到抗原孔周围的放射状沉淀环。

皂土凝聚反应 (BFT)^[10,11] 皂土悬液的制备:取皂土 0.5 克,在 100 毫升蒸馏水中作成匀浆,再加入 400 毫升蒸馏水,搅匀。静置 2 分钟。取上液,350g 离心 10 分。弃去上液,将沉淀悬浮于 100 毫升蒸馏水中,搅拌 1—2 分。200g 离心 10 分,取上清液,加入 3% 叠氮钠 1 毫升。在 4℃ 冰箱内保存备用。此悬浮液内应含有皂土 0.4—0.6 毫克。

抗体致敏皂土的制备:取 1 毫升抗血清,加入 9 毫升蒸馏水混匀,再加入 5 毫升饱和硫酸溶液,放置 30 分,1800 转/分离心 20 分,使免疫球蛋白沉淀。沉淀悬浮于 5 毫升缓冲生理盐水中,并对同一缓冲液透析 4 小时。800g 离心 15 分,上清液定容至 10 毫升。加入 20 毫升皂土悬液,置 4℃ 下过夜。再加入 2 毫升 0.1% 亚甲蓝溶液混匀。800g 离心 5 分钟,所得沉淀以缓冲生理盐水洗两次,最后沉淀用蒸馏水定容至 10 毫升。加入 0.2 毫升的 1% 聚乙烯吡咯烷酮作为稳定剂;0.2 毫升的 3% 硫柳汞作为防腐剂。

测定方法:榨取待测样品的汁液,加入等体积氯仿,充分振荡,静置过夜,取上清液 0.1 毫升,加到凹载玻片的凹内,并滴入 0.05 毫升抗体致敏皂土悬液,轻轻摇动 20 分,在低倍镜下观察,蓝色

皂土颗粒凝聚者为阳性反应(图版 I)。

微量凝集反应 (MAT) 和微量沉淀反应 (MPT) 选底部平整的直径 10 厘米的培养皿,洗净烘干。倒入溶于氯仿的 1% 聚乙烯醇缩甲醛溶液,使均匀覆盖皿底。多余的溶液立即转入另一皿中。放置 8 小时使氯仿充分挥发,在皿底形成疏水性的薄膜。皿底衬一 8×8 毫米的方格纸,在方格的交叉点上各滴 0.01 毫升 1:20 的抗血清。然后以直径 1.5 毫米的圆头玻棒蘸取被检样品的汁液,在抗血清小滴内充分搅拌。将培养皿略倾斜,缓缓倒入石蜡油覆盖液滴。在 20—25℃ 下保温 15 分,产生凝集物者为阳性反应。微量沉淀反应须延长保温时间至 3 小时。

结 果

(一) 灵敏度的比较

用提纯病毒比较了 RID、BFT、MPT 和试管沉淀反应可测出的抗原浓度和抗原量。取定量的不同浓度的病毒进行血清反应,得到表 1 所示结果。根据可测出的抗原最低浓度,RID 和 BFT 的灵敏度提高了 100 倍。一般沉淀反应要求 100 微克/毫升的浓度;而 RID 和 BFT 可测定 1 微克/毫升的样品。引起反应的最低抗原数量,RID 为 0.01 微克;BFT 和 MPT 均为 0.1 微克;试管沉淀反应为 25 微克。

(二) 对马铃薯植株的诊断效果

为适应田间检测的需要,以叶片汁液测定了几种方法的诊断效率。表 2 是从北

表 1 几种血清学方法测定 PVX 的灵敏度

抗原含量 微克/毫升	放射状免疫扩散	皂土凝聚反应	微量沉淀反应	试管沉淀反应
0.1	—*	—	—	—
1.0	+	+	—	—
10.0	++	++	—	—
100.0	+++	+++	++	++
1000.0	+++	+++	+++	+++
所用抗原体积(毫升)	0.01	0.1	0.001	0.25
可测出抗原量(微克)	0.01	0.1	0.1	25

* “—”为无反应,“+”为反应微弱,“++”为反应明显,“+++”为反应强烈。

京秋播马铃薯田采集的样品，以接种千日的诊断效率最高达 93%；其次为 MAT 和红的感染率为标准计算的诊断效率。RID BFT。

表 2 几种血清学方法测定马铃薯叶片内 PVX 的效率

测定株数	测出 PVX 株数				诊 断 效 率(%)			
	千日红接种	放射状免疫扩散	皂土凝聚反应	微量沉淀反应	千日红接种	放射状免疫扩散	皂土凝聚反应	微量沉淀反应
46	46	43	33	38	100	93.5	71.7	82.6

表 3 一些马铃薯品种感染 PVX 百分率的测定

品 种	测定株数	放射状免疫扩散		皂土凝聚反应		微量沉淀反应	
		阳性株数	阳 性 率 (%)	阳性株数	阳 性 率 (%)	阳性株数	阳 性 率 (%)
里 外 黄	31	21	67.7	—	—	25	80.6
	28	26	92.8	17	60.7	17	60.7
深 眼 窝	28	23	82.1	20	71.4	17	60.7
同 薯 8 号	47	45	95.7	—	—	43	91.4
乌 盟 684	50	41	82	—	—	24	48
阿 奎 拉 (Aquila)	50	36	72	—	—	28	56
阿 普 它 (Apta)	10	9	90	—	—	8	80
米 拉 (Mira)	10	9	90	—	—	9	90
卡梯拉尔 (Karchinal) × 阿普它	22	14	63.6	—	—	8	14
马 尔 楚 (Malchow) × 601	36	20	55.5	—	—	12	24
S ₄₁₉₅₆	10	0	0	0	0	0	0

表 4 马铃薯幼芽感染 PVX 百分率的测定

品 种	测定块茎数	皂土凝聚反应		微量沉淀反应	
		阳 性 数	阳 性 率 (%)	阳 性 数	阳 性 率 (%)
男 爵 (Irish Cobbler)	25*	24	96	20	80
红 纹 白 (Red warba)	20	20	100	13	65
白 头 翁 (Anemone)	25	4	16	3	12

* 用千日红接种鉴定证明都带有 PVX，因此其阳性率即为诊断效率。

表 3 是从内蒙乌盟农科所实验地采集的样品测定的结果。其中包括 7 个品种、两个杂交组合的后代和 S₄₁₉₅₆，RID 测出的阳性率一般都比 MAT 高。对 PVX 免疫的 S₄₁₉₅₆ 均为阴性反应，也说明了方法的可靠性。

(三) 对马铃薯幼芽、块茎的诊断效果

为了检测种薯带毒率,曾以萌动的幼芽和休眠块茎汁液做了测定。幼芽可产生明显的血清反应。由于用生理盐水研磨的幼芽汁液易于澄清,BFT 有很高的诊断效果(表 4)。休眠块茎顶芽组织的汁液血清反应不明显,且易产生假阳性反应,现有方法不能进行可靠的检测。

讨 论

RID 和 BFT 都提高了测定 PVX 的灵敏度,但仍然不及感染性测定灵敏。在几种方法中,RID 的可靠性最好,操作简便,如将样品以吡啶降解^[7]还可提高诊断效果。但其缺点是抗血清用量较大。当用澄清的样品汁液进行测定时,BFT 的灵敏度与 RID 相近,但用于检测休眠块茎仍有困难^[10,11]。其缺点是抗体致敏皂土的制备方法较复杂,且易产生假阳性反应。MAT 也有较高的灵敏度,抗血清用量少,每毫升稀释的抗血清可测定 150 个样品,操作简便工作效率高,适于对大量样品进行鉴定。在内蒙古的马铃薯无病毒原种生产中,已开始应用 RID、BFT 和 MAT 等方法。

根据几种诊断方法的比较,对种薯生产中 PVX 的诊断提出下列建议:

1. 对无病毒原原种的病毒检定,如从

茎尖培养中选择无 PVX 的单株,应以千日红作接种鉴定,以防少数带毒植株混入原原种中。

2. 一级原种场(省或地区)所生产原种的 PVX 鉴定,在进行田间检定时,可用 RID 和 MAT;检定块茎幼芽可用 RID 和 BFT。

3. 二、三级(县、公社)原种场可用 MAT 进行田间检定。

参 考 资 料

- [1] 马铃薯种薯生产协作组: 植物学报, 18: 233—238, 1976.
- [2] European and Mediterranean Plant Protection Organization, Potato Virus Diagnosis, Series A, No: 35. 1963.
- [3] Reichmann M. E.: *Canad. J. Chem.*, 37: 4—10, 1959.
- [4] 田波: 植物病理学报, 4: 71—80, 1958.
- [5] 田波、张秀华、林传光: 植物病理学报, 6: 68—86, 1960.
- [6] 内蒙古大学生物系微生物教研组: 微生物学通报, 印刷中。
- [7] Shepard J. F. et al.: *Phytopathol.*, 59: 1838—1844, 1969.
- [8] Shepard J. F.: *Phytopathol.*, 60: 1669—1671, 1970.
- [9] Fuehs R. et al.: *Potato Res.*, 18: 378—384, 1975.
- [10] Scott H. A.: *Phytopathol.*, 54: 1292—1293, 1964.
- [11] Kahn R. P.: *Phytopathol.*, 57: 61—65, 1967.

STUDIES ON THE TECHNIQUE OF SEED-POTATO PRODUCTION

II. COMPARISON OF THE EFFICIENCIES OF SEVERAL SEROLOGICAL TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF POTATO VIRUS X

Experimental Cooperation Group of Seed-Potato Production*

The sensitivities of radial immunodiffusion (RID), bentonite flocculation test (BFT), microprecipitin test (MPT) and tuber precipitin test (TPT), for the detection of potato virus X (PVX) were compared with pure virus preparations. The minimum concentration of PVX detected by means of RID and BFT was $1\mu\text{g/ml}$ ($0.01\mu\text{g}$ and $0.1\mu\text{g}$ for each test respectively). MPT and TPT were sensitive to $100\mu\text{g/ml}$ of PVX ($0.1\mu\text{g}$ and $25\mu\text{g}$ for each test respectively).

The relative efficiencies of RID, BFT and microagglutination test (MAT)

with potato foliage extract were 93%, 71% and 82% respectively. With young sprout the relative efficiencies of BFT and MAT were 96% and 80% respectively.

*Section of Microbiology, Department of Biology,
Nei Mongol University.

Potato Research Group, Agricultural Institute of
Ulanqab District, The Nei Mongol Autonomous Region.

Laboratory of Plant Physiology, Peking Institute
of Botany, Academia Sinica.

Research Group of Plant Virus, Institute of
Microbiology, Academia Sinica.