

马铃薯块茎青枯病菌潜伏感染的酶联免疫学检测

谢从华, 柳俊, 张克顺

(华中农业大学 湖北武汉 430070)

摘要: 试验采用武汉市场上来源不同产地的7份马铃薯材料, 用CIP提供的RS-NCM-ELISA试剂盒进行了块茎青枯病菌携带情况的检测。试验结果显示, 应用该试剂检测马铃薯块茎青枯病菌携带情况具有较高的灵敏度; 检测前样品的富集时间对检测结果具有明显的影响, 其最佳富集时间为48 h; 不同来源的马铃薯块茎携带青枯病菌的程度具有显著差异。

关键词: 马铃薯块茎; 青枯病; 潜伏感染; RS-NCM-ELISA

中图分类号: S532, S435.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0092 (2000) 03-131-04

1 前言

马铃薯青枯病 (*Bacterial wilt*) 是由 *Ralstonia solanacearum* (RS) 引起的细菌性病害, 也是我国南方马铃薯产区的主要细菌性病害。每年因此造成的产量损失大约在 10%~15%, 发病严重的地块产量损失可达 80% 乃至失收, 给马铃薯生产带来严重威胁^[1]。由于青枯病为细菌性病害, 植株感病是系统性侵染, 因而青枯病的药物防治十分困难。长期以来, 人们试图筛选一些抗菌素用于青枯病防治, 如四环素、青霉素、多菌灵、放射菌酮等, 但试验效果均不理想, 在埃及, 放射菌酮的使用反而增加了青枯病的发生率, 其它如生物防治目前还在进一步研究中^[2,3]。因此, 农业栽培技术成为控制青枯病发生和蔓延的重要途径。青枯病可经土壤和种薯传播蔓延, 而种薯带菌又是马铃薯青枯病历年发病和远距离传播的主要侵染源, 由此可见, 控制种薯病原菌是防治青枯病蔓延的重要措施。目前, 我国的种薯生产大多在田间自然条件下进行, 有些地区甚至没有正规的种薯生产基地和措施, 一些边远地区常常只是按海拔高度进行换种, 不仅种薯质量低下, 而且造成病害蔓延。近十几年来, 对于病毒病的控制已经有了相对配套的脱毒种薯生产和检测体系, 而青枯病的控制一直没有适宜的方法, 特别是没有一种实用的快速检测方法, 从而很难预测种

薯的潜伏感染情况, 研究一种快速、准确、简便的青枯病检测技术以确保种薯质量是防治青枯病蔓延急待解决的问题。

国际马铃薯研究中心 (CIP) 研制的 RS-NCM-ELISA 试剂盒, 为青枯病的快速检测提供了一个新的有效方法。本试验的目的在于探索试剂盒在种薯检测中的操作方法以及各种参数如样品富集的适宜时间等, 为试剂盒的生产应用提供可供参考的实验方法, 为利用试剂盒检测种薯青枯病携带情况提供试验依据。

2 材料与方法

2.1 测试材料

测试材料采用武汉市场来源于不同产地的马铃薯块茎。

表1 试剂材料来源

编号	1	2	3	4	5	6	7
产地	武汉江夏区	武汉东湖	广西桂林	湖北长阳	内蒙古	湖北恩施	华中农大

2.2 试剂及试验用品消毒

检测 RS-NCM-ELISA 试剂盒由 CIP 提供, 试剂配制按试剂盒说明书提供的方法配制。所有试验用品和试剂均用高压蒸汽灭菌 (试剂盒中已注明为无菌的试剂除外)。

2.3 检测方法

2.3.1 制样

马铃薯块茎用自来水冲洗干净, 沥干水份。称取50 g块茎样品用10% NaOC1浸泡5 min进行表面消毒, 然后用无菌水清洗三次。在无菌条件下用刀片将块茎切成碎片, 再将其转移至一250 ml的三角瓶中立即加入70~80 ml的抽提液, 摇匀后置于碎冰上避光静置30 min左右(不要超过1 h以防酚氧化)以使碎片沉积。

2.3.2 富集

将试剂盒中提供的10×SMSA(半选择培养基)稀释到1×, 每个样品用12个指形管, 每管加入0.5 ml SMSA(1×)和0.5 ml抽提样品的上清液。每个样品均分成3组, 每组4管, 分别设置0 h、24 h、48 h的富集时间, 对照采用无菌蒸馏水加SMSA培养基。富集在温度30℃条件下全黑暗培养, 培养期间每天手摇样品3次。0 h的处理在加样完成后即置于-20℃冰箱中储存以备点样, 富集完成后所有处理均储存在-20℃冰箱中备用。

2.3.3 点样

取一20×15 cm的磁盘或塑料盒并在其中加入30 ml TBS(Tris 缓冲盐水), 将三张硝酸纤维素膜慢慢放入其中浸泡5 min, 避免产生气泡。同时取2张无菌滤纸重叠平放在一干净的玻璃板上, 在其上再放2张用TBS湿润的无菌滤纸, 然后将浸泡好的膜轻轻放在滤纸上, 避免形成气泡。待膜表面的液体吸收干净时开始点样。取出不同富集时间的处理样品, 用微量加样器取20 μl点样在准备好的纤维素膜的小方格里, 每个样品点一行, 共7行, 第8行为空白对照。同一富集时间的处理点于一张膜上。点样时要注意污染, 所有吸头、用品均要灭菌, 操作时要带手套。点样完成后, 将膜置于一干燥的无菌滤纸上自然干燥60 min, 然后将其夹放在两张滤纸之间储藏备用。点样过程中吸头尖端轻轻接触膜使液体慢慢扩散, 不要让液体滴下, 否则点样的圆点大小不匀。

2.3.4 血清学检测

固定: 取30 ml固定液于一直径15 cm的平皿中, 将已点样并干燥的膜与试剂盒中提供的阳性对照膜一起放入固定液中, 注意避免产生气泡。然后将其置于摇床上, 室温下用50 rpm的速度振荡温育60 min。

RS抗体结合: 弃除固定液, 在平皿中加入30 ml抗体溶液, 在上述温育条件下固定2 h。

酶标抗体结合: 弃除RS抗体溶液, 在100 rpm条件下用TBS洗膜3次, 每次3 min, 用TBS 30 ml。弃除最后一次洗液后, 加入30 ml酶标结合溶液在上述同一温育条件下固定60 min。

显色反应: 弃除结合液, 按上述洗膜方法洗膜3次。弃除最后一次洗液后, 按25 ml/膜的量加入显色液(NBT/BCIP), 显色反应一般在20 min左右, 当阳性对照呈现紫色时停止显色反应。弃除显色液, 用自来水彻底冲洗硝酸纤维素膜以除去残留的显色液, 然后将膜置于滤纸上干燥, 干燥后的膜夹在两张干净滤纸间保存。

3 结果

3.1 检测敏感性

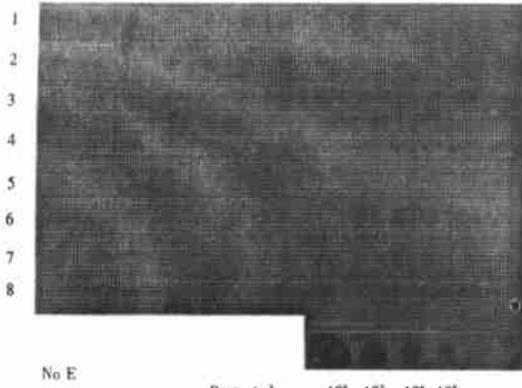
试验结果显示, 由CIP研制的RS-NCM-ELISA试剂盒检测灵敏性较高。加入显色液后阳性对照4 min即开始显色, 16 min即可定色, 此时阳性对照中 10^8 bact/ml的点呈深紫色, 10^6 bact/ml为浅紫色, 不同细菌含量的点可以明确区分开来(见图版中阳性对照)。

3.2 不同富集时间对检测结果的影响

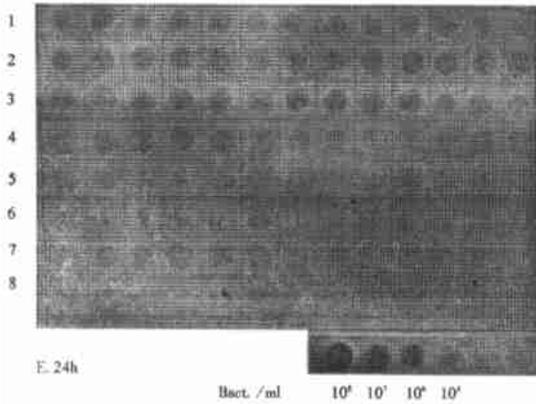
不同富集时间的样品点样检测的结果显示, 富集时间对于观察不同样品病原菌的携带情况具有显著影响。当样品不富集时, 7个不同来源的样品几乎看不出差异, 与空白对照的差异也很小(见图版1)。富集24 h的处理不同样品间的差异已开始呈现出来, 特别是样品与空白对照的差异已趋于明显(见图版2)。富集48 h的处理各样品间的颜色差异已十分明显, 可以根据阳性对照提供的标准作出各样品带菌情况的准确判断(见图版3)。

3.3 不同来源的马铃薯块茎携带青枯病菌情况

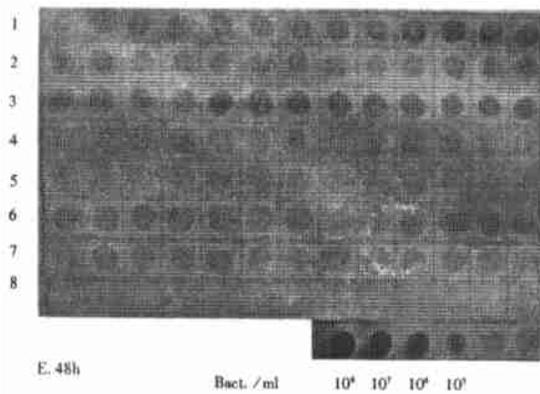
从富集48 h的样品检测膜的显色反应可以看出, 在本试验材料中, 来源于武汉江夏区和广西桂林的马铃薯块茎携带青枯病菌情况比其它材料严重, 与阳性对照比较, 样品细菌含量在 $10^6 \sim 10^7$ /ml。来源于恩施的样品其颜色与阳性对照中 10^5 /ml相当。来源于内蒙古的块茎样品检测中基本没有颜色反应, 与空白对照一致, 其它块茎样品的显色反应均比阳性对照中 10^5 /ml浅, 说明样品的带菌量低于 10^5 /ml。



图版 1 样品不富集时的检测结果



图版 2 样品富集 24 h 的检测结果



图版 3 样品富集 48 h 的检测结果

4 讨论

马铃薯生产中的一个重要环节是种薯生产。自 70 年代以来, 脱毒种薯的生产和病毒检测已基本用于世界各地的马铃薯生产区。然而, 种薯生产中除病毒以外的病原菌携带情况的检测一直是健康种薯生产中力求解决的课题, 特别是对马铃薯危害较大又可以通过种薯传播的细菌性病害——青枯病的种薯检测更是急需解决的难题^[4]。然而, 长期以来

沿用的病菌分离、培养鉴定方法因试验周期长、灵敏性低而难于种薯检测的实践中。由 CIP 研制的 RS-NCM-ELISA 试剂盒, 其试验周期短、试验操作相对较为简单, 是一种实用性较强的应用性试剂盒。由于采用硝酸纤维素膜代替了酶标板, 并且提供了一定范围的阳性对照, 使得试验中不需要酶标检测仪而在普通实验室即可进行^[5]。同时检测结果可以在膜上长期保存这更有利于种薯的质量管理。从试验采用的不同产地马铃薯块茎样品的检测结果显示, 其检测灵敏性较高, 检测结果反映了青枯病的自然分布状况。产于南方、西南高温多湿地区的马铃薯块茎青枯病携带量较高, 这与自然条件下的青枯病发病情况是一致的。而产于北方内蒙古地区的马铃薯块茎基本上不携带青枯病, 这与北方地区通常没有青枯病发生也是一致的。

在使用 RS-NCM-ELISA 试剂盒检测时, 对样品病原菌进行一定时间的富集是必要的, 特别是样品本身带菌量较少时, 富集可以提高检测的灵敏性。从试验采用的三个不同富集时间的检测结果可以看出, 当样品不富集 (0 h) 时, 检测结果很难显示出差异; 富集 24 h 的处理, 样品间已开始呈现差异, 某些带菌量较高的样品可以从中区分开来, 但样品间的差异仍然不明显; 富集 48 h 的处理, 各样品间带菌量的差异已十分明显, 带菌量少的样品也可与空白对照明显区分开来, 从而说明试验结果真实地反映了各样品病菌的携带情况。从本试验结果也进一步说明, 从市场上随便购买种薯, 在很大的机率上会带来青枯病的蔓延与危害。

由于 RS-NCM-ELISA 试剂盒检测是样品细菌性青枯病菌携带的情况, 因而在试验操作中必须保持无菌操作, 特别是在点样之前的样品处理、试剂准备等环节要严格避免其它细菌的污染, 所有用品菌应高压灭菌, 试验操作应尽可能在无菌环节下进行, 以保证试验结果的真实性。在本试验中, 采用了同一样品同一处理多重复点样 (13 次重复), 目的是保证试验结果的准确性。试验结果显示, 同一样品同一处理的各点在颜色上是一致的, 也就是说只要点量和点样方法一致, 同一样品的点样可以适当减少, 以提高每张膜的检测样品数, 使检测更为经济。

参 考 文 献

[1] 卢同. 我国农作物细菌性青枯病的研究进展. 福建农学报, (C) 1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1998, 13 (2): 33~40

87

- [2] CABI 与 EPP 主编. 中国-欧洲联盟农业技术中心译. 欧洲检疫性有害生物. 中国农业出版社, 1998, 572~576
- [3] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by pseudomonas solanacearum. Annu Rev Phytopathol. 1991, 29: 65~

- [4] 朱国庆, 罗晓玲, 王成华. 网室中脱毒小薯青枯病的发生和防治. 马铃薯杂志, 1998, 12 (3): 186~187
- [5] CIP. RS-NCM-ELISA kit for the detection of Ralstonia solanacearum. in latently infected potato tubers USER MANUAL.

DETECTION OF RALSTONIA SOLANACEARUM IN LATENTLY INFECTED POTATO TUBERS BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

XIE Cong-hua, LIU Jun and ZHANG Ke-shun

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

ABSTRACT: Potato tubers purchased in Wuhan market from seven sources, were used for detection of *Ralstonia solanacearum* using RS-NCM-ELISA kit kindly provided by CIP (International Potato Center). The results showed that the kit was sensitive and applicable to potatoes. Variations in degree of infection among samples from different locations were identified, indicating a high risk of using these tubers as seeds. The time of bacteria enrichment before detecting affected the results remarkably. We confirmed that the appropriate time for enrichment was 48 hr under the conditions of this experiment.

KEY WORDS: potato; *ralstonia solanacearum*, latent infection, NCM-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membrane)

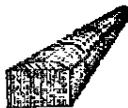
· 广 告 ·

路桥现代农业配套设施厂

向您优惠提供——尼龙防虫网



尼龙筛网



尼龙网罩(室)



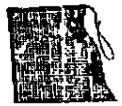
塑料遮阳网



塑料(纸)吊签



塑料插地牌



尼龙种子袋

尼龙防虫网(即尼龙筛网)可防止蚜虫、蜜蜂传粉及风吹传粉,广泛用于马铃薯等脱毒后隔罩,蔬菜、油菜等制种及无公害蔬菜生产等。规格20目~300目及特殊幅宽。

同时还生产塑料遮阳网、尼龙种子袋、塑(纸)吊签、塑料插地牌、尼龙晒单(垫布)、鲜花种植网、防鸟网、向日葵花粉隔离套袋、印制不干胶标贴等。

本厂备有产品详情介绍资料,欲需货请来电、来函索取。本厂是专业生产防虫网、塑料遮阳网等科研良繁系列用品定点厂,厂史悠久,产品质量优良,价格低廉,量大价特优,欢迎订购。

通讯地址: 浙江省台州市路桥区新桥镇凤阳章路东区 94 号 邮 编: 318055

联系人: 章仙华 (经营厂长)

手 机: (0) 13906575996

电 话: (0576) 2662860 2615800 (传真)

宅 电: (0576) 2615753