

马铃薯种薯青枯病潜伏感染 检 验 程 序

谢云陆 何礼远 高德香

(中国农科院植保所)

滕建勋 刘介民

(中国南方马铃薯中心品质组)

马铃薯青枯病 (*Pseudomonas solanacearum*) 是我国南方马铃薯的一种重要的细菌性病害。有些首区每年因此病减产 10%~15%, 严重地块甚至毁种, 给马铃薯生产造成严重威胁。

带病种薯是马铃薯青枯病历年发病和远距离传播的主要侵染源。常规的种薯检验方法主要根据病害症状和在选择性培养基上的菌落形态。这些方法对于病重的薯块是有效的, 但对于潜伏感染的病薯则较难检出。血清学技术特别是马铃薯青枯菌单克隆抗体的研制成功为检测马铃薯青枯病潜伏感染开辟了新的途径。我们根据近年的研究结果, 参照国外经验, 提出了马铃薯种薯青枯病潜伏感染检测程序如下, 供植物检疫、种子生产和育种单位参考使用。

1 种薯生育期的田间调查

在种薯收获前 15 天调查田间发病株率, 采用平行跳跃式调查法, 每块地查 5 行, 每行 40~50 株, 检查有无青枯病或可疑病株, 并及时拔除病株, 把可疑病株带回室内作进一步检验。供作马铃薯原种和良种

的种薯田间不允许出现青枯病株, 此时可与生产种薯的农户订立收购合同。

2 收获后的种薯检验

一般在收获时进行, 以便及早作出种薯质量分级的决定。

2.1 取样

同批种薯在 10 件以下的必须每件抽查, 超过 10 件的按超过部分的 10% 增加抽查件数。散装种薯以 50kg 当作一件进行抽查。每批取样 400 或 200 块, 小批量的种薯其取样量可按种薯量的 1% 抽取。

2.2 青枯病诱发试验

将样品用自来水洗净, 取其一半平铺在瓷盘里, 于 30℃ 下作潜伏感染诱发病害试验。10 天后作第一次检查, 视薯块脐部或芽眼处有无乳白色菌脓溢出。以后每隔 10 天查 1 次, 共 3 次, 最后 1 次剖薯观察薯块微管束变色或腐烂程度。作原种的种薯样品不允许有病薯发现, 良种的病薯率不能超过 0.5%。

2.3 集菌

取样品的另一半, 从薯块上挖出脐部,

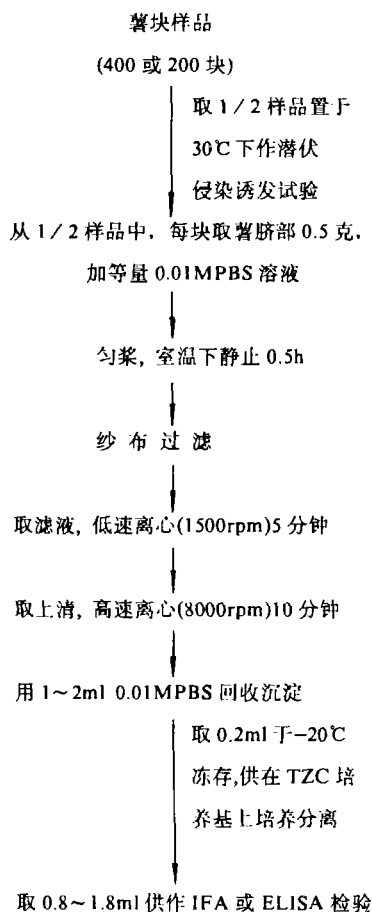
每块重约 0.5g, 加等量磷酸盐缓冲液 (PBS), 粉碎匀浆, 纱布过滤, 经低速 1500rpm 离心 5 分钟, 取上清, 再高速 8000rpm 离心 10 分钟, 用 1~2ml PBS 回收沉淀, 存 -20℃ 下, 供作检测。

2.3.1 磷酸盐缓冲液(0.01M PBS, pH7.2)的配制

$K_2HPO_4(A)$: 69.67g / ml; $KH_2PO_4(B)$: 54.44g / ml。

取 A 液 250ml, B 液 100ml 混合, 即为 PB 贮存液。取贮存液 25ml, 蒸馏水 960ml, 加 NaCl 8.5g, 溶解后把蒸馏水加至 1000ml 即为 0.01M PBS。

2.3.2 马铃薯种薯青枯病潜伏侵染的检测程序



2.4 检测方法

2.4.1 应用 IFA 检测马铃薯青枯病潜伏侵染

a. 试剂: ① 0.01M 磷酸盐缓冲液 (PBS), pH7.2; ② PBS-T 即 0.01M PBS 1000ml, 加 0.5ml 吐温 20; ③ 抗体稀释液即 2% PB 贮存液, 2% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.05% 吐温 20 和 2% 脱脂奶粉贮存液 (10% 溶液), 现配现用; ④ 抗青枯菌小鼠腹水单抗以 1:50 稀释或免抗青枯菌血清以 1:100 稀释; ⑤ 免抗鼠或羊抗兔荧光抗体以 1:10 稀释; ⑥ 荧光保护液即 0.01MPBS 10ml, 甘油 90ml, 对苯二胺 100mg。

b. 仪器: 荧光显微镜, 多孔免疫荧光载玻片, 微量移液管等。

c. 制片与检查: ① 应用 10 倍稀释法, 将种薯样品提取液用 PBS 稀释成 1/10, 1/100 和 1/1000, 用微量移液管分别吸取上述 4 个浓度 20μl, 移到多孔免疫荧光载玻片上, 并设阳性和阴性对照; ② 50℃ 下干燥, 用火焰或丙酮固定; ③ 用抗体稀释液稀释单抗 1:50 倍或多抗 1:100 倍, 每孔加抗体 15μl; ④ 37℃ 下, 温室里孵育 45 分钟; ⑤ 用 PBS-吐温洗玻片, 50℃ 下干燥; ⑥ 用 0.01MPBS 以 1:10 稀释荧光抗体, 每孔加 10μl; ⑦ 同④, 37℃ 下温室里孵育 45 分钟; ⑧ 用 PBS-吐温洗玻片, 黑暗下干燥, 加适量荧光保护液, 覆盖玻片, 用指甲油封片; ⑨ 在荧光显微镜下 (1000 倍, 配 FITC 滤板和无荧光镜头油), 观察每视野中典型荧光细菌数。每片样品左右、上下各检查 10 视野, 每视野平均值 ≥ 5 个荧光细菌数为该样品带菌。每视野荧光细菌数小于 5 个的样品可作为原种; 每视野荧光细菌数大于 5, 小于 15 的样品可作为良种。

2.4.2 应用 ELISA 双抗体夹心法检测马铃薯青枯病潜育侵染

a. 试剂: ① 碳酸盐缓冲液: pH = 9.6, Na_2CO_3 1.59g, $NaHCO_3$ 2.93g 加蒸馏水至

1000ml; ②磷酸盐缓冲液(PBS): pH = 7.4, KH_2PO_4 0.2g, NaHPO_4 2.9g, NaCl 8g, KCl 10.2g, NaN_3 0.2g, 加蒸馏水至 1000ml; ③洗涤液即 PBS1000ml 加 0.5ml 吐温 20; ④阻断贮存液: 脱脂奶粉 10g, NaN_3 0.2g, 加蒸馏水 100ml; ⑤样品溶液: 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)2g, 阻断贮存液 2ml, 50 μl 吐温 20, 加 PBS 至 100ml; ⑥兔抗青枯菌免疫球蛋白, 以冻干制品提供, 每支用 10ml 碳酸盐缓冲液稀释; ⑦碱性磷酸脂酶标记青枯菌单抗结合物, 每支用 10ml PBS, 加 100 μl 阻断贮存液稀释; ⑧底物溶液: 二乙醇胺 97.0ml, MgCl_2 100mg, 加蒸馏水 800ml, 用 10M HCl 调 pH 至 9.8, 最后加无离子水至 1 000ml; ⑨底物即对硝基苯磷酸盐, 以片剂提供, 每片 5mg; ⑩阳性对照, 马铃薯青枯病菌株; ⑪终止液: 3N NaOH。

b. 仪器: 酶联反应板, 微量移液管, 多道移液管, 96 孔微量反应板, 酶标检测仪等。

c. ELISA 操作步骤: ①用兔抗青枯菌免疫球蛋白 1 安瓿, 加 10ml 碳酸盐缓冲液, 以每穴 10 μl 加到 96 孔微量反应板中, 37℃ 孵育 2h 或 4℃ 过夜; ②用洗涤液洗板 3 次, 每次间隔 3 分钟; ③将种薯样品提取液于 8000rpm 离心 10 分钟, 弃上清, 用 1ml 样品溶液悬浮沉淀, 以每穴 100 μl 把样品分配到反应板中, 37℃ 孵育 1h 或 4℃ 过夜; ④同 2, 洗板 3 次; ⑤阻断, 取 0.5ml 阻断贮存液, 加到 20ml PBS 中, 以每穴 200 μl 分配到反应板上, 37℃ 孵育 30 分钟; ⑥同 2, 洗板 3 次; ⑦用 10ml PBS, 加 100 μl 阻断贮存液稀释碱性磷酸脂酶标记单抗结合物 1 支, 以每穴 100 μl 分配到反应板上, 37℃ 孵育 1h; ⑧用洗涤液洗板 3 次, 蒸馏水冲洗 1 次; ⑨显色, 取底物 (对硝基苯磷酸盐) 10ml, 加底物溶液 17ml, 溶解后以每

穴 150 μl 分配到反应板上, 室温孵育 1h; ⑩终止反应, 每穴加终止液 50 μl ; ⑪结果判断: 肉眼观察颜色反应或应用酶标检测仪于 405 波长下, 测出 OD 值, 样品吸收值 > 阴性对照吸收 2.1 倍时为阳性反应。凡样品吸收值 < 阴性对照 2.1 倍的都可作为良种。

2.4.3 在选择性培养基上分离培养马铃薯青枯病菌

a. TZC 选择培养基即牛肉汁培养基 (pH7.2) 加 0.5% 2, 3, 5—氯化三苯基四氮唑 (TZC):

分别配制牛肉汁培养基 (成分: 牛肉浸膏 3g, 酵母膏 0.5g, 蛋白胨 8g, 琼脂 18g, 水 1000ml, pH7.2) 和 1% TZC 水溶液, 单独灭菌, 待牛肉汁培养基 200ml/瓶凉至 50℃ 左右时, 加 1% TZC 1ml, 摇匀后倒入培养皿中。

b. 将冻存待检样品提取液融化, 用无菌接种环蘸取少许于平板上划线, 30℃ 培养 48~72 小时, 待菌落形成后, 挑取典型枯菌菌落移植到牛肉汁培养基上作进一步鉴定。

参 考 文 献

- 1 何礼远等. 马铃薯细菌性青枯病的发生与危害. 植物保护, 1985, 11 (2): 10~11
- 2 华静月等. 我国马铃薯青枯病菌菌系的初步研究. 植物病理学报, 1985, 15 (3): 181~184
- 3 He L Y. Bacterial wilt in the peoples' Republic of China. ACIAR Preceeding, 1986(13): 40~48
- 4 Xie Y L and L Y He. Establishment of hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to *Pseudomonas solanaceasum* of potatoes. CIP Region Working Paper, 1989, 44~51
- 5 Xie Y L, He L Y and Gao Dexiang. The use of monoclonal antibodies to detect bacterial wilt latent infection of potatoes by an indirect fluorescent antibody staining procedure. CIP Region VIII Working Paper, 1990, 41~48