

※※※※※※※※
 ※ 译 文 ※
 ※※※※※※※※

应用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 鉴定 人工打破休眠期的马铃薯块茎中的 马铃薯卷叶病毒和马铃薯Y病毒

G Ugerlj P 和 Gehriger

摘 要

研究了测定初感和再感染植株所结块茎内的马铃薯卷叶病毒(PLRV)和马铃薯Y病毒(PVY)的必要条件。分析了用Rindite处理打破休眠期前的块茎。PLRV在休眠块茎中可准确地测出, 而PVY只有在经Rindite处理并且在暗处于22°C高温的条件下保持2~3周的马铃薯块茎中才容易鉴定出来。感染块茎内的马铃薯卷叶病毒的浓度脐部比顶端高, 并在35天的试验期间内, 其浓度保持恒定。然而发现马铃薯Y病毒在块茎顶端浓度大, 并且在打破休眠期后迅速增加。在22°C贮藏期间, 休眠块茎中的马铃薯Y病毒浓度下降。也讨论了ELISA方法用于块茎的鉴定。

铃薯卷叶病毒和马铃薯Y病毒进行早期鉴定所需条件。

1 前 言

植物病毒学家一直需要较为可靠的和应用广泛的鉴定马铃薯块茎中的病毒方法。

1977年, Clark 和 Adams 创立的鉴定植物病毒的酶联免疫吸附试验, 才能使上述要求的实现成为可能。然而有些问题仍然没有解决, 诸如同抗原反应高效价、同正常植物成分反应低效价的抗血清制品, 简化采样技术和在块茎上取样的时间和部位, 这3个问题当中, 适于马铃薯Y病毒、马铃薯卷叶病毒和马铃薯A病毒的抗血清的生产已有报道

(Murayama和Koiima, 1974; Mehrad et al, 1978; Maat和Bokx, 1978; Gugerli, 1978, 1979 a)。而Gugerli提出了块茎汁液榨取和取样的有效方法(1979 b)。

这篇论文报道用ELISA方法对块茎里马

2 材料和方法

1979年夏季由田间自然初感染的和再感染的植株上收获的马铃薯块茎。块茎在室温保存数天, 使表皮栓化。用Rindite处理打破休眠: 将块茎放到50立升容器里, 加30毫升乙撑氯醇、二氧乙烷和四氯化碳(容积比7:3:1)混合液在22°C下蒸发48小时。将处理过的块茎贮藏于22°C和相对湿度80~90%的暗处。按Gugerli的方法从维管束组织榨取块茎汁液。也采用了Gugerli另外报道的试验条件和抗血清。平板要预先包被, 并贮存在-20°C的干燥处几个月。提取缓冲液含有1%Bacto卵清蛋白(DIFCO)。按Gugerli(1979 b)所提出的方法冲洗并测定最后

的光密度值。每块板90个孔用于样品分析, 不设重复, 余下6个孔用于对照和参比: 3个健康块茎样品, 一个病毒的标准样品(感病植株的汁液或保存在液氮中部分提纯的病毒, 其使用前要用提取缓冲液按1:20稀释)和两个缓冲液样品。当样品的消光值高于每天测试(至少3板)的健康对照样品的消光值总平均数并且大于其标准差3倍时, 被认为是含有病毒。通过生长测定, 做块茎的对比试验, Rindite处理后立即取顶端芽眼切块, 栽培在田里或温室里, 于4~7周后观察幼苗上是否有病毒症状。

3 结果和讨论

以前我们曾说明: ELISA能100%的鉴定出从初浸染的品种“宾杰”植株所收休眠块茎的马铃薯卷叶病毒, 而对马铃薯Y病毒来说只能鉴定出60%(Gugerli, 1979b)。我们也发现ELISA测定比利用人工打破休眠期块茎的芽在A₁叶片进行生物鉴定马铃薯Y病毒或其他病毒灵敏得多(Gugerli, 1978, 1979b)。因此, 我们用ELISA法对比地测定了Rindite处理打破休眠前后的块茎中的病毒。

第1个试验, 块茎收获于7月25日, 生长3个月, Bintje, Désirée和Sirtema 3个品种每个收100株。品种Bintje和Désirée小区内的再感染植株分布有规律。可是在品种Sirtema小区内再感染植株分布则无次序。生长初期用ELISA方法测定叶片样品确定病毒感染率。每株测3个块茎, 间隔约1周, 在8月2日测第1个块茎。第1和第2块茎测定后用Rindite处理, 第3个块茎不处理。从第1个块茎切取顶芽并立即栽培在温室里进行生长试验。3周后将所有块茎进行再检定, 其中第1个块茎用Rindite处理17天后, 第2个块茎处理19天后在进行。在这期间, 品种Bintje和Sirtema的块茎长了小芽。

样品取自块茎两端或一端, 由于第1个块茎的顶端在Rindite处理后取下做生长试验, 仅能在接近顶端的部位取样。3个品种的试验结果表明: 虽然从消光值来判定病毒浓度一般在顶端比较低。Rindite处理前后所得到的结果差别不大, 此结果可以和第1个块茎的生长试验媲美, 或比其结果还要好些。

马铃薯Y病毒已经在块茎的顶端检查到, 这个部位的消光值通常比在脐部得到的要高。品种Bintje的块茎只有在打破休眠后并需17天或19天的培育期才能可靠地鉴定出马铃薯Y病毒。第1个块茎的顶端样品结果与生长试验结果是一致的, 所有的品种都表明: 用Rindite处理的和第2块茎中的病毒浓度同处理前的休眠块茎或没经处理的第3个块茎相比显著增高。另外, 在第1次试验后3周内病毒浓度降低。

从第1、第2和第3个块茎所得到的结果的变化幅度上看, 马铃薯Y病毒比马铃薯卷叶病毒大。在Désirée的块茎中, 用ELISA测定块茎感染马铃薯Y病毒的比率比生长试验的低得多。但是已经知道此品种对Rindite处理的反应慢。在其它的品种试验中也得到了类似结果(未发表)。因此, 我们详细地研究了不同品种打破休眠之后马铃薯Y病毒浓度增加的速度。

从种植于田间有初感染和再感染马铃薯Y病毒的6个品种中, 各取45个块茎用ELISA方法测定, 用Rindite处理前测定1次, 处理后测定5次, 每次间隔1周。上述品种中的5个品种的同一植株中的其它块茎, 通过生长试验来作对照。取块茎顶端优势芽眼和芽周围的组织作样品进行ELISA测定。在Rindite处理后19~26天期间, 消光值的增高表明所有增值的块茎顶端中有大量的病毒核蛋白的积累。诊断发现一直到第3次测定, 块茎感染的百分率迅速增高, 第3次测定是在用Rindite处理后的第12天进行的, 以后变化更

小。因此,这可能表明茎块在Rindite处理后2周内病毒浓度达到了可测定的水平。必须补充说明的是,在这个试验中,用Rindite处理之前所有块茎要先贮存在4°C条件下放置7周,因此,这次试验所用的块茎比第1次试验所用的块茎在生理上稍微有点老化。虽然2次试验不能完全对比,但是这个生理年龄的差别能够解释为什么在第2次试验中用ELISA鉴定马铃薯Y病毒与生长试验一样可靠,且比第1次试验提早5天或更多天。用ELISA方法较其它对比试验发现更多的块茎受到感染。这可能是由于从一颗植株上所结的各个块茎受到的马铃薯Y病毒浸染是不一致的,或者是由于在试验期间内病毒不是在植株体内系统地移动。从这些和其它未发表的结果来看,也许用ELISA方法鉴定Rindite处理后和经过培育的块茎比生长试验效果要更好些。也许,用Rindite处理后,病毒不仅在组织中积累,如以上所看到的那样,而且在某些情况下(例如:晚期的初浸染),病毒感染在这期间能达到顶部。因此这样的感染用生长试验是不能测出的。

用ELISA方法鉴定了Rindite处理前的品

(上接49页)

宜切块作种,最好用整薯作种。

c. 实行间套轮作 采用与禾谷类作物或水旱3~5轮作制,致使带菌土中的病菌失去寄主而丧失活力,能明显减轻病菌危害。间套作并能减少病菌株行间蔓延。

d. 选用早熟品种及时收挖 一般选用生育期短、早熟的品种,早种早收,当高温季节来临之前就能成熟,如川芋56,川西平原5月下旬就可以成熟。并及时抢晴天收挖,不要让成熟的薯块留在地下时间过长,以免增加感染机会。

种Sirtcma的块茎获得高的浸染百分数,这点可从植株所收获的块茎再感染比例高(80%)得到部分解释。Rindite处理后在6个品种间病毒的积累速度有差别。在第2次测试时Eba,Binije和Stella平均消光值相对高,在第5次和第6次测试所记载的病毒浓度在品种间差异已相当大。这表明品种的特性可能既影响处理的效果,也影响Rindite病毒的繁殖。

结论是用ELISA方法对初感染和再感染植株的休眠块茎的马铃薯卷叶病毒进行鉴定是1种有效方法。马铃薯Y病毒只有在块茎打破休眠之后并且在22°C下培育3~4周后进行鉴定才有效。可是用Rindite处理打破休眠,块茎的生理状态和品种特性似乎都影响着培育期长短。ELISA测定结果不仅比1个批准了的块茎鉴定方法可靠或效率高,而且获得的速度也快。在相同条件下鉴定其它的马铃薯病毒也是可能的,因此,ELISA被认为是筛选马铃薯无病毒育种工作有价值的新手段。

郭素华译 张鹤龄校

译自《Potato Res》1980,23:353~359

c. 高厢整植 在马铃薯整个生长期间注意田间排水,降低田间湿度,干旱季节严防串灌漫灌。

f. 及时拔除田间病株,作好病残株处理 当田间发现萎蔫植株或部分萎蔫植株时,连基部泥土、薯块一起铲除深埋或烧掉,并用1:100的生石灰水或1:200的40%福尔马林药液灌窝。感病植株的薯块好的可煮熟禽畜食用。收获时,田间烂薯、残体、烂叶和杂草要清理干净,也应深埋或烧掉,严禁丢入粪坑或堆沤作肥。