

对几种检测马铃薯卷叶病毒 方法的评价

王人元 吕文清

(东北农学院)

摘 要

本文报道了应用生物鉴定、免疫琼脂双扩散、免疫电泳、ELISA、I-KI 染色和根围田间植株感染等方法检测 PLRV。比较了各种方法的准确性, 并评价了各种方法的优缺点和适用范围。

前 言

马铃薯卷叶病是在马铃薯上发现最早的一种病毒病, 但其诊断与检测工作的研究进展缓慢。早期, 各国主要靠田间植株的症状表现来鉴定马铃薯卷叶病毒 (PLRV), 1942 年以后开始利用生物鉴定检测^[1,2,3,4], 50 年代以后很多研究都致力于血清学检测^[5,6,7,8,9,10]。但由于 PLRV 在植株体内的浓度极低, 提纯十分困难, 直到 1974 年 Murayama 等才首次制备出了高纯度的抗血清^[11]。1977 年 Casper 首次用 ELISA 方法成功地检测了植株体内的 PLRV^[12], 以后各国学者先后用免疫电泳方法和 ELISA 方法检测了 PLRV^[13,14,15,16,17,18,19,20]。

1933 年, Murphy 根据受 PLRV 感染的植株叶部可积累大量的碳水化合物, 提出用 I-KI 染色进行鉴定, 但由于方法不当, 结

果很不稳定, 没有得到应用。1978 年, Thomas 对这种方法进行了修改, 1983 年做了详细报道^[21,22]。

本研究系统比较了各种检测 PLRV 方法的准确性和各自的适用范围, 为病毒病害的诊断和进一步防治提供依据。

材 料 与 方 法

分别用生物鉴定、免疫琼脂双扩散、免疫电泳、ELISA、I-KI 染色和根围田间植株症状等几种检测方法检测 PLRV。

几种检测方法所测标样均采自东北农学院马铃薯育种试验地、材料圃和温床内, 共检测了 84 个品种和育种材料, 采样 445 份。其中, 生物鉴定检测了 36 份标样, 琼脂双扩散检测了 16 份标样, 免疫电泳检测了 20 份标样, ELISA 检测了 226 份标样, I-KI 染色检测了 117 份标样。ELISA 检测和 I-KI 染色检测均分别采植株顶部叶片 (新展开的

2~3片复叶)和底部叶片(基部2~3片复叶)进行检测。各检测方法中的阳性对照和阴性对照均经过生物鉴定。

抗血清由日本北海道大学 Kojima 提供的血清冻干粉,效价为 1/2048 (环状沉淀反应)。用生理盐水稀释。

一、生物鉴定检测

接种方式为蚜传,传毒介体为桃蚜 (*Myzus Persicae*),于养虫笼内在白藜上饲养无毒蚜虫。蚜虫接种均在养虫笼内进行。鉴定寄主为洋酸浆 (*Physalis floridana*) 和曼陀罗 (*Datura stramonium*),均于子叶期接种。

采得马铃薯的一个小枝,置于装有 1~2% (W/V) 复合肥水溶液的三角瓶内培养。将无翅桃蚜移至每个待测植株上饲养 3 天后,分别移至 5 株曼陀罗和 5 株洋酸浆上,每株 3~5 头蚜虫。同时以无毒蚜虫为对照。3 天后灭蚜,1 个月后调查结果。

二、免疫琼脂双扩散检测

待测样品的处理:取待测马铃薯的叶柄及主脉 10 克,加入 8 毫升 0.2 M 磷酸缓冲液 (pH 7.4),用研钵充分碾碎,将汁液低速离心 (6000 r/min) 15 分钟,弃沉淀,上清液再用 PEG 离心沉淀浓缩或酒精透析浓缩。

经试验确定抗血清最适浓度为 1/3 倍。

琼扩反应按 Hepp 等 1978 年报道的方法进行^[11]。

三、免疫电泳检测

按 Roberts 等 1979 年报道的方法进行^[12],经试验确定抗血清最适浓度为 1/400 倍。在 JEM 1200 型电子显微镜下观察。

四、ELISA 检测

按 Clark 等 1977 年报道的双抗体夹心法进行^[13],具体检测见王人元等 1987 年的报道^[14]。

五、I-KI 染色检测

按 Thomas 等 1983 年报道的方法进

行^[15],具体检测见王人元等 1987 年的报道^[14]。

六、田间植株症状检测

分别对具有不同卷叶症状的马铃薯植株进行 ELISA 检测,采样的同时记载植株症状,将不同症状分为底部卷叶、顶部卷叶、心叶淡黄或粉红色并顶部卷叶、心叶淡黄或粉红色并全株卷叶、全株卷叶和全株无症等 6 种症状类型。

结果与分析

一、生物鉴定检测、免疫琼脂双扩散检测和免疫电泳检测与 ELISA 检测的比较

在进行生物鉴定、免疫琼脂双扩散和免疫电泳等果糖检测的同时,在同一株上进行 ELISA 采样检测。比较的结果见表 1、表 2、表 3。

表 1. 生物鉴定检测与 ELISA 检测的比较

检测方法	阳性反应	阴性反应	与 ELISA 检测符合率 (%)
生物鉴定	25	11	100
ELISA	24	11	—

表 2. 免疫琼脂双扩散检测与 ELISA 检测的比较

检测方法	阳性反应	阴性反应	与 ELISA 检测符合率 (%)
免疫琼脂双扩散	14	9	81.25
ELISA	16	6	—

由表 1 和表 3 可见,生物鉴定检测和免疫电泳检测的结果与 ELISA 检测结果的符合率均达 100%,说明三者均具有很高的准确度。

表 3. 免疫电泳检测与 ELISA 检测的比较

检测	样品数	阳性反应	与 ELISA 检测符合率 (%)
免疫电泳	20	14	100
ELISA	20	14	—

由表 2 可见, 免疫琼脂扩散检测与

表 4. I-KI 染色检测顶叶和底叶与 ELISA 检测的比较

	顶叶为阳性	底叶为阳性	顶叶和底叶均为阳性	顶叶和底叶至少有一个为阳性
I-KI 检测	56	38	18	86
I-KI 与 ELISA 检测	28	23	16	45
ELISA 检测总数	52	52	52	52
I-KI 检出率 (%) ¹⁾	51.92	9.62	3.46	78.85
I-KI 检出率 (%) ²⁾	55.77	63.46	39.77	86.54

1) I-KI 检测为阳性—I-KI 与 ELISA 均为阳性/ELISA 检测总数

2) I-KI 与 ELISA 检测均为阳性/ELISA 检测总数

由表 4 可见, I-KI 染色检测以顶叶和底叶均呈阳性反应的误检率最低 (3.85%), 但其检出率也较低 (30.77%), 说明存在很多漏检病株; 而顶叶和底叶至少有一个为阳性反应, 虽然误检率较高 (78.85%), 但其检出率也较高 (86.54%), 漏检病株较少。因此, 如果为了准确地检出植株体内的

ELISA 检测结果的符合率为 81.25%, 其前者的阳性反应小于后者的阳性反应, 说明免疫琼脂扩散检测的灵敏度较低, 存在一定的漏检现象。

二、I-KI 染色检测与 ELISA 检测的比较

在进行 I-KI 染色采样检测的同时, 在同一株上进行 ELISA 采样检测。比较的结果见表 4。

PLRV, 则应以顶叶和底叶均呈阳性反应者为阳性, 其准确性最大; 如果目的在于检测淘汰病株, 则应以顶叶和底叶至少有一个为阳性反应的为阳性, 其漏检率最低。

三、马铃薯不同茎叶症状与 PLRV 的关系

ELISA 检测的结果见表 5。

表 5. 植株不同茎叶症状与 PLRV 的关系

	顶叶黄叶	顶叶卷叶	心叶黄或卷叶 色并顶叶黄叶	心叶黄或卷叶 色并全株黄叶	全株黄叶	全株无症
检测株数	21	15	45	17	30	23
带毒株数	20	7	13	13	22	6
带毒率 (%)	95.24	46.67	28.89	76.47	73.33	26.09

由表5可见, 马铃薯感染了PLRV后可表现不同的症状, 其中以底部叶片表现黄叶症状的带毒率最高(95.24%), 以心叶淡黄或粉红色并顶部卷叶的植株带毒率最低(28.89%)。另外, 有一些无症植株也检测出了PLRV, 带毒率为26.03%, 估计可能有些品种或材料较为抗病, 或对PLRV的感染不敏感, 因此症状不明显; 或者是植株在田间受PLRV的侵染较晚, 尚未表现出症状, 还有一部分植株(占35.1%)虽然表现出各类卷叶症状, 但并不是由PLRV所致, 究竟是何原因, 有待于进一步研究。

另外, 根据田间调查并结合室内检测发现, 同一品种感染了PLRV后所表现的症状基本趋于一致。有的品种虽带有PLRV却不表现症状或仅表现轻微的卷叶症状, 还有的品种(如东农303)到生育后期无论植株带有PLRV与否均表现典型的卷叶症状。所以, 根据植株症状来诊断PLRV存在很大的局限性。

对几种检测方法的评价

一、生物鉴定检测

生物鉴定检测比较费时费工, 仅接种一项就要1周时间才能完成, 从接种到得到结果一般需要3~4周, 并且要在防蚜网笼内进行。同时进行大量的样品检测将受到温室面积的限制。而分批检测则因时间拖得较长, 每批条件不容易保持一致。但生物鉴定结果稳定可靠。由以上比较试验也证实, 其准确性很高, 在设备条件较差的单位, 如各地区的科研单位和育种单位, 仍可作为一项基本的检测手段。

二、免疫琼脂双扩散检测

免疫琼脂双扩散法虽可以直接测出植株体内简单浓缩的PLRV, 但其灵敏度不很

高, 存在一定的漏检率; 另外, 相对比较而言, 此法的一大缺点就是比较浪费抗血清, 并且相对的抗原处理也比较费事, 因此进行大量检测受到限制。但此法要求的设备条件不高, 在已经制备出高质量的抗血清的前提下, 可以用来快速诊断田间卷叶的原因与鉴定育种材料和脱毒原种内的PLRV。

三、免疫电泳检测

免疫电泳方法快速灵敏, 具有较高的准确性, 并且样品的处理也比较简单, 特别是对于植株体内病毒浓度极低, 不用用浓缩法进行直接检测的PLRV意义更大。但此法的设备条件要求很高, 另外由于病毒颗粒有聚集现象, 在电泳膜上的分布并不均匀一致, 致使电泳观察比较费时, 并且要求观察人员对球状病毒较熟悉, 能够准确地将病毒颗粒与其他杂质区分开, 因此大量的检测受到了限制, 不易推广应用。

四、ELISA检测

ELISA方法准确快速, 灵敏度很高, 而血清需用量极少, 完成一次检测只需2天时间, 并可以进行大量的样品检测。除了能把PLRV的研究工作大大向前推进一步外, 对育种单位的抗原筛选、茎尖脱毒或热处理脱毒效果的检测, 以及原种田在播种前汰除病薯或田间汰防病株等均具有实践意义。但此法要求的技术条件很高, 操作人员必须具备较深的专业知识和受过专门的训练, 同时还要配备必需的设备条件, 只有技术设备条件较高的单位与各地区的科研单位和良种繁育单位共同合作, 才能达到推广应用的目的。

五、I-KI染色检测

I-KI染色检测PLRV虽然存在一定的误差, 但可根据试验目的选择适当的阳性反应标准, 尽量减少检测误差。另外, 此法简单易行, 不要任何特殊的仪器设备, 操作人员也不需要受专门的训练, 并且可以快速进

行大量检测, 易推广应用。这对于原种生产单位和良种繁育单位及时检测清除田间中心病株, 控制病害在田间蔓延, 从而达到防治的目的具有实践意义。

六、田间症状检测

在田间根据植株所表现的卷叶症状诊断 PLRV 存在较大误差, 但可根据植株所表现的症状类型尽量减少判断误差, 在没力量对 PLRV 进行系统研究的条件下, 仍可作为一项粗略的检测手段。该方法很适于田间大面积病害发生情况调查, 这对于良种繁育单位在蚜虫迁飞前及时检查清除病株, 保证种薯质量具有实践意义。

参 考 文 献

- (1) 崔鹤龄等, 马铃薯卷叶病病原检测及血清学初步研究, 《马铃薯》, 1981 (2): 1-5。
- (2) 崔鹤龄等, 马铃薯卷叶病毒 (Potato leafroll virus) 的 ELISA 诊断, 《西北农林科技大学学报》, 1983, 11(1), 17-21。
- (3) 王人元等, 应用酶联免疫吸附试验检测马铃薯卷叶病毒, 《西北农林科技大学学报》, 1982 (3): 91-97。
- (4) 王人元等, 用 I-KI 染色法检测马铃薯卷叶病毒, 《西北农林科技大学学报》, 1982 (3): 199-202。
- (5) Beier, H. et al., Serologically specific electron microscopy in the quantitative measurement of two isometric viruses. *Phytopathol.* 1978, 68: 55-59。
- (6) Broadbent, L. et al., Detection of leafroll virus in potato tubers. *Pl. Pathol.* 1969, 9: 123-128。
- (7) Casper, R., Detection of potato leafroll virus in potato and in *Phytolacca* flowers by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathol.* Z. 1977, 90: 364-368。
- (8) Clark, M.F. et al., Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virol.* 1977, 36: 475-483。
- (9) Clarke, R.G. et al., Enzyme-linked immunosorbent assay to detect potato leafroll virus in potato tubers and *Macrosiphum* aphids. *Pl. Pathol.* 1980, 64: 43-46。
- (10) Ehlers, U. et al., Detection of potato leafroll virus in primarily infected tubers by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathol.* Z. 1983, 107: 36-46。
- (11) Gugerli, P., The detection of two potato viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathol.* Z. 1974, 92: 51-58。
- (12) Herg, R. G. et al., Purification of potato leafroll virus and an evaluation of methods for its diagnosis. *Am. Potato J.* 1978, 55: 111-119。
- (13) Hill, S.A., An investigation of the reliability of ELISA as a practical test for detecting potato leafroll virus and potato virus Y. *Ann. Appl. Biol.* 1984, 93: 21-26。
- (14) Kirkpatrick, H.C., Indicator studies with the leafroll virus of potatoes. *Am. Potato J.* 1949, 26: 213-218。
- (15) Kajino, M. et al., An attempt to prepare antiserum against potato leafroll virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 1971, 38: 255-257。
- (16) Kajino, M. et al., Rapid diagnosis of potato leafroll virus by immune electron microscopy. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 1978, 44: 585-590。
- (17) Maat, D. Z. et al., Potato leafroll virus: antiserum preparation and detection in potato leaves and sprouts with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Neth. J. Pl. Pathol.* 1978, 14: 149-150。
- (18) Murayama, D. et al., Antigenicity of potato leafroll virus. *Proc. Japan Acad.* 1974, 50: 322-327。
- (19) Oryad, A. G., Diagnosis of potato leafroll virus in plants with primary infection. *Potato Rev.* 1975, 51: 142。
- (20) Peters, D., The purification of potato leafroll virus from its vector *Myzus persicae*. *Virol.* 1957, 31: 45-51。
- (21) Roberts, J.M. et al., Detection of potato leafroll and potato mop-top virus by immunosorbent electron microscopy. *Ann. Appl. Biol.* 1979, 98: 289-297。
- (22) Takasumi, Y. et al., Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. *J. Gen. Virol.* 1979, 44: 163-168。
- (23) Tamada, T. et al., Application of enzyme-linked immunosorbent assay to the detection of potato leafroll virus in potato tubers. *Ann. Appl. Biol.* 1980, 96: 67-78。
- (24) Thomas, P. E. et al., Diagnosis of potato leafroll virus infection by staining leaflets with iodine. *Am. Potato J.* 1978, 55: 397-398。
- (25) Thomas, P. E. et al., Use of I-KI leafroll test to reduce net necrosis storage losses of potatoes. *Am. Potato J.* 1983, 60: 309-320。

EVALUATION OF SEVERAL METHODS OF DETECTING POTATO LEAFROLL VIRUS

Wang Renyuan and Lu Wenqing

(Northeast Agricultural College, Harbin, China)

ABSTRACT

The methods of bioassay, immune agar double diffusion, immune electron microscopy, ELISA, I-KI staining and plant symptoms in the fields were applied to detect the potato leafroll virus (PLRV).

Though the method of bioassay wasted time and man power, it was very reliable. PLRV concentrated simply in plants could be detected by the method of immune agar double diffusion, but some viruses could not be detected. Although the method of immune electron microscopy was very accurate, it could not be widely used. The method of ELISA was not only accurate and rapid, but also used in the quantitative analysis. The method of I-KI staining, which could be widely used, was very simple, but the virus in some plants could not be detected correctly. There were some limitations to diagnosis of PLRV on the basis of the symptoms of the plants in the fields.

(上接第9页)

STUDY ON VIRUS-FREE SEED POTATOES AND THE SYSTEM OF HIGH-QUALITY SEED POTATO PRODUCTION

Sun Huisheng, Zhi Yuegong, Zhang Zhenhong and Xu Peiwen

(Vegetable Research Institute, Shandong Academy
of Agricultural Sciences)

ABSTRACT

In order to solve the problem of potato degeneration caused by viruses in Shandong Province, the viruses were taken from the cultivars adapting to double cropping regions by means of stem tip culture. The technique of rapid multiplication of virus-free potatoes and the effect of virus-free seed potatoes on increasing yield were studied. In addition, the characteristics of seed potato production in double cropping regions were discussed and the corresponding system of self-sustaining seed potatoes was put forward.