

三、小 结

玉米本身是一种喜温的作物，各生育时期都需一定的积温，但满足拔节至抽雄穗期的温度是加速玉米生育进程的关键。生育期中有效积温和各生育阶段积温是互相制约的。

引种、育种当中不仅注意无霜期，总有效积温，同时应该细致研究拔节至抽穗期的积温。

在生产当中，常年促早熟的措施，对玉米要特别注意提高拔节至抽穗时期的地温。这样增加该阶段的积温，是玉米促早熟的关键措施，尤其低温年更为必要。

马铃薯 X. Y. S 和 G 病毒抗血清的 制备及其鉴定的技术方法*

李芝芳 张 生 朱光新 王国学

(黑龙江省克山农业科学研究所)

马铃薯的退化，主要是由于马铃薯感染了某些病毒，从而导致产量逐年下降，严重地影响着马铃薯生产。据科学试验和生产实践证明：利用无毒或少毒的种薯做种，能显著地提高产量。我们于 1973~1977 年在马铃薯株系选、留种工作中，采用指示植物鉴定、马铃薯 X 病毒抗血清鉴定，选出的马铃薯优良株系比劣株系增产一倍半到两倍。

利用抗血清鉴定是一种选优汰毒的有效手段。在马铃薯无病原种生产过程中，对各个等级的马铃薯株系，应按照规定的技术措施鉴定其是否带有某些病毒。由于某些品种感染某种病毒后不表现症状，或者症状极轻，不易辨别，如现在生产上应用的克新一、三和四号等品种，是马铃薯 X 病毒的带毒体，感病后不表现症状，这就需要利用抗血清鉴定。用抗血清鉴定，操作简单，特异性强，短时间可鉴定大量样品。某些国家在马铃薯无病毒留种和抗病毒育种工作中，已广泛应用血清鉴定方法。

我们从 1960~1964 年和 1973~1978 年先后进行了制备马铃薯 X. Y. S 和 G 病毒抗

血清研究工作，制备成马铃薯 X. Y. S 和 G 病毒的抗血清及其冻干粉。现将制备几种马铃薯病毒抗血清的方法及其鉴定技术介绍如下。

一、应用病毒抗血清鉴定的基本原理

所谓抗血清，就是带有抗体的血清。抗体是动物有机体抵抗外来的抗原而产生的一种物质。免疫动物被注射进异体蛋白（如病毒等）时，其体内就会产生一种特异性的两种球蛋白，称为免疫球蛋白，亦即抗体。抗体和原来免疫用的抗原能够结合而发生沉淀。这种结合的过程，在动物体外亦可进行。因而可以制成病毒抗血清而利用之。

植物病毒抗血清，具有特异性很强，所谓特异，就是一种病毒抗血清只能与制备这种抗血清相同的或相近的抗原呈阳性反应。如 X 病毒抗血清，只能鉴定 X 病毒。如果几种病毒抗原混合制备的血清，或者各种抗血清混合起来，可同时检验几种病毒。

二、马铃薯 X. Y. S 和 G 病毒抗血清的制备方法

(一)病毒的分离:要制备病毒抗血清,首先要有纯的病毒源,并使它在某种植物上繁殖,然后再利用它制备抗原。为了避免有品种病毒复合感染,用各种指示植物接种来分离病毒,分离工作应在防虫网温室中进行。

需要的设备有:研钵(或用电动捣碎机)、金刚砂(规格为600筛目)、喉头喷粉器等,药品有 pH7.2 的磷酸缓冲液。

1. X 病毒的分离:来自马铃薯克新一号品种表现轻花叶症的病株,榨取其叶片汁液摩擦接种在白花刺果蔓陀罗 (*Datura Stramonium*) 上。该植物对 A. Y. S 病毒免疫,因而,可排除这三种病毒。接种方法是先在被接种的植物叶片上喷洒一些金刚砂,再将接种体的汁液用 pH7.2 磷酸缓冲液按 1:10 稀释进行摩擦接种,然后用清水冲洗接种叶片。接种 10 天后,表现花叶症状或间有坏死斑。第二次是将发病的白花刺果蔓陀罗的叶片汁液摩擦接种在普通烟草上,本植物对 S. M 病毒免疫,因而,可以排除 S. M 病毒。接种 10 天后表现花叶症状。再取其叶汁液接种在千日红 (*Gomhrena globosa*) 的叶片上,接种 5~7 天后,接种叶片出现灰白色斑点,周围绕以紫红色环圆枯斑。X 病毒在普通烟草上保存与繁殖。

2. Y 病毒的分离:来自马铃薯波兰一号 (*Łpoka*) 品种表现条斑坏死症的病株。先将汁液摩擦接种在普通烟草上,约 7~10 天出现明脉,然后表现沿脉缘带症状。为了排除可能混有 X 病毒,用桃蚜放在该病烟草叶上饲毒 10~20 分钟,随即转移到无毒普通烟草叶上传毒半小时,然后灭蚜。约 7 天后表现出上述的症状。即可用烟草保存和繁殖病毒。

3. S 病毒的分离:来自马铃薯克新三号品种表现脉间花叶症状的植株,汁液摩擦接

种在千日红叶片上,12~24 天后,在接种叶片上出现不规则橙黄色小枯斑,或桔红色圆斑(大小 1~2mm)。挑取单斑以排除可能存在的 X. Y. A 病毒,并接种在德伯尼烟 (*Nicotiana debneyi*) 上,接种 20~25 天后出现明脉,随后表现斑驳花叶,即可在德伯尼烟上保存和繁殖。

4. G 病毒的分离:来自马铃薯艾皮库尔 (*Epicure*) 品种表现黄绿块斑花叶的病株,汁液摩擦接种在白花刺果蔓陀罗上,以排除可能存在的 A. Y. S 病毒,再接种在普通烟上以排除可能存在的 S. M 病毒。然后在心叶烟 (*Nicotiana glutnosa*) 上保存和繁殖病毒。

(二)毒源的繁殖:根据制备的植物病毒抗血清的种类,选用上述适宜的繁殖毒源的植物。在接种以前的一个半月到两个月育苗,幼苗 2~3 片叶时移栽在花盆里,然后追施少量氮肥。幼苗 3~4 片叶时即可进行接种。接种 20~30 天后,即可用其制备抗原。毒源繁殖数量,可按制备血清的数量而定,一般用一只兔子作血清。毒源盆数以 30 盆为宜。

(三)抗原的制备:需要的仪器和药品:离心机一台,天秤一台(感量 1/100 克),研钵(或捣碎机),量筒,烧杯,不同规格的三角瓶,冰箱,纱布。药品有硫酸铵、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠,酒精和火棉胶等。

我们对马铃薯 X. Y. S 和 G 病毒的提纯,采用了相似的作法,只是在离心沉淀病毒蛋白时,应用了不同离心速度。

1. 病叶的研磨:取病叶 200 克(供一只兔子注射用的抗原),洗叶去掉叶脉之后,最好在研磨之前在零下 10~20℃ 下冷冻,在研磨病叶时,可按病叶和缓冲液 1:0.5~1.0 的比例加入缓冲液(重量比),或在榨汁后,按汁液量 30% 加入 pH7.2 的磷酸缓冲液。病叶的研磨方法:少量新鲜叶片可用研钵研碎,多量时可用双搅肉机或用电动捣碎机搅碎,然后用双层纱布过滤。

2. 粗提取液的澄清:为了除掉寄主植物

汁液中的一些大颗粒。

(1) 加入有机溶剂, 有机溶剂能使某些正常植物成份变性而不影响多数病毒活性。常用的是氯仿(即三氯甲烷), 加入的数量为汁液量的 $\frac{1}{7}$ 或 $\frac{2}{7}$, 充分振荡 20~30 分钟, 然后以每分钟 2000~3000 转离心 20~30 分钟, 得深棕色的上清液(病毒悬浮液), 弃去管底部沉淀的细胞和叶绿体等碎片。

(2) 加热: 为了使汁液中某些成份变性, 汁液可适当加热处理, 如钝化温度较高的 X 病毒, 可在 55℃ 水浴中加热 10 分钟, 然后立即在冷水中冷却再低速离心。其它病毒可用 50℃ 左右加热。

我们常用的是上述的加入有机溶剂的方法。

3. 病毒的沉淀: 用超速离心法或加沉淀剂(硫酸锰), 把病毒从澄清液中沉淀出来, 我们是用的硫酸铵沉淀法, 做法如下:

按澄清汁液量的 2/5 (重量比) 加入硫酸铵, 然后充分搅拌, 此时可看到一些絮状物(即病毒), 静止 30 分钟到 1 小时。然后离心沉淀病毒(X 病毒每分钟 5000~6000 转, Y、S 和 G 病毒用每分钟 7000~8000 转离心 30~40 分钟), 去掉上清液, 留沉淀(病毒), 沉淀物按原汁液量的 1/10 加入蒸馏水溶开, 或将此步骤再重复一次。

4. 透析: 将沉淀溶液放在半渗透膜的透析带内(是火棉胶制成), 透析 12 小时, 以除去残留的硫酸铵。透析带底放在污水面上透掉硫酸铵, 透析后病毒悬液经低速离心, 除去沉淀的杂质, 清液作为免疫用的抗原。

(四) 动物免疫过程: 需用的仪器和药品: 动物(家兔)、动物注射固定器、消毒器、注射器、刀片、药棉少许。药品有 70% 酒精、液体石蜡、二甲苯和蒸馏水。

1. 免疫动物的选择与饲养: 一般用家兔作免疫动物。选用体重 2.5 公斤左右的健康公兔, 尽量不用母兔。新购的家兔, 须经 15~20 天的观察, 确实健康无毒才能使用, 如果发现兔耳烫热或食欲不正常, 都不能使用。

在免疫注射过程中, 要加强饲养, 以增加营养, 除饲喂麦麸外, 还适当喂些黄豆芽和青饲料等, 以促进抗体的形成。

2. 注射方法: (1) 耳静脉注射: 耳静脉位于耳背外侧, 注射前用 75% 酒精消毒兔耳的注射部位。为便于注射, 先用手指轻弹兔耳, 促其因充血而使血管明显突出, 将抗原注入血管内。第一次注射先从耳尖开始, 逐次下移, 可避免疤痕组织阻塞抗原进入血流。每三天注射一次, 共注射七次, 抗原注射量逐次递增, 第 1~3 次为 2~3 毫升, 第 4~7 次为 3~4 毫升或增至 5~8 毫升。

(2) 肌肉注射: 抗原加福氏佐剂按 1:1 混合进行肌肉注射。

福氏(Freund)佐剂的制备: 把 9 份液体石蜡和 1 份羊毛软脂混合后高温灭菌。用前抗原和佐剂按 1:1 的比例混合乳化。为使抗原充分乳化在佐剂中, 可用配有粗针头的注射器连续抽射 50~70 次, 当滴一小滴乳浊液在水面上不扩散时, 即可用于注射。每周肌肉注射一次, 连续注射三周, 第一周注射抗原 3~4 毫升, 第二、三周为 4~6 毫升, 肌肉注射的部位为两侧大腿外侧臂肌群, 注射量左右腿各半。

(3) 耳静脉注射和肌肉注射相结合进行, 开始三次耳静脉注射, 每隔三天一次, 每次注射量 2~3 毫升, 后两次为每周一次肌肉注射, 每次注射量 3~5 毫升。

3. 采血: 需用物品有采血杯、剪刀、小手术解剖刀、止血钳、脱脂棉。药品有酒精, 乙醚。

最后一次注射 7~10 天后采血。我们主要采用颈动脉放血, 有时用耳动脉采血或心脏采血。

(1) 颈动脉放血: 采血前停食一天, 只给少量饮水, 可避免血清混浊。采血时先将家兔仰缚于解剖板上, 固定四肢和上颌部, 剪掉颈部周围的毛, 再用蘸有 75% 酒精的药棉消毒颈部。沿正中线将颈部皮肤剪开至上颌骨处, 剥皮后可见到和食道、迷走神经平

行的两根鲜红颈动脉，剥开周围组织，分开迷走神经，使一根颈动脉暴露4~5厘米，用止血钳夹住在远心端的血管上，以止住血流，再用一把止血钳夹在近心端血管的边缘。割断血管，用近心端止血钳将血管引入采血杯中，也可采用切断动脉将兔体倒过来放血的办法，一般可采血60~70毫升。

(2) 耳动脉采血：取少量血液时可用此法。兔耳中部一根粗的动脉采血。用酒精消毒兔耳，并用蘸有二甲苯液的脱脂棉球摩擦耳部，使血管扩张，再用注射针头刺入耳动脉，即可采得血液。有时血液在注射针头里凝固，障碍抽血，则可用刀片切开耳动脉采血，然后用于脱脂棉压迫，采点止血。

(3) 心脏采血：心脏取血的优点可减少污染，有利制备无菌血清。但抽血技术要熟练，否则心脏被刺破会损失全部血清，如遇此情况，要迅速开腹取血。其做法是，先将兔胸腹朝上，四肢固定在板上，剪去左侧胸部的毛，用酒精棉球消毒，用手摸感到心脏搏

动最强的一点，将针头自针上方轻轻刺入肋间，针刺后不要太深，有血液流入注射器后，说明针头确已刺入心脏，即可缓缓抽出血液。

(五) 血清的制备：需用的仪器有：血清凝固器(或用恒温恒湿箱代替)，冰箱等。

将采血杯斜放在温度为37℃的血清凝固器里4小时，红血球即可凝聚沉淀，并和血清分离。将血清取出放在室内或1~4℃的冰箱中过夜。如果血清内还有残余血球，可用每分钟1500~2000转离心10分钟，去沉淀，液体血清在0~4℃可保持半年以上。要避免反复冻融，以免降低抗体滴度。

1. 病毒抗血清效价的测定：需用的仪器和药品有：试管架、血清管、吸管、血清凝固器或用恒温恒湿箱。生理食盐水。

用试管沉淀法反应定血清稀释终点。即用生理食盐水将抗血清稀释，与等量的抗原产生沉淀反应的抗血清的最高稀释度，即为抗血清效价。其稀释方法如下表：

处 理	管 号 血清稀释度	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
生理食盐水(毫升)		0.8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗 血 清(毫升)		0.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
连续转管(毫升)		→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→ 0.5	→弃去 0.5
抗 原(毫升)		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

测定用的抗原可用毒源植物进行粗提纯，去杂质后即可使用(其作法与抗原粗提纯法相同)，将等量抗原加入到不同稀释浓度的抗血清中，然后将试管放在37℃的血清凝固器里(或用恒温恒湿箱代替)3~4小时，取出放在室温条件下过夜，观察记录结果。

絮状沉淀很多，即为极明显的阳性反应，记为“卅”号；有多量的沉淀，为明显的阳性反应，记为“卅”号；絮状沉淀少，但仍明

显，记为“+”号；有沉淀但有些模糊不清，不能肯定其为阳性反应，记为“±”号，无絮状沉淀，即无反应或称为阴性反应，记为“-”号。

与某一稀释度产生明显阳性反应的抗血清稀释度即为抗血清的效价。

我们按上述方法制备的抗血清效价：X病抗血清效价可达500倍以上(特殊情况除外)。Y病毒抗血清效价在160~640倍以

上。S 和 G 病毒抗血清效价可达 2560 倍。用的三种注射方法进引免疫所得三种血清效价差异不大,故认为肌肉注射,为简便易行的免疫方法。

2. 病毒抗血清干冻粉的制备: 将血清分装在安瓶内,置于真空冷冻干燥机内。干燥后取出密封,即可制成抗血清冻干粉。具体做法是:

每安瓶内装 3~4 毫升抗血清,在入冻干机前,首先在 -35°C 下预冻 2 小时,使成固定状态。然后放入机内抽成真空,在 -5°C 温度下保持一小时,再升温至 0°C 保持 2.5 小时,随后升温至 $+5^{\circ}\text{C}$ 保持 3 小时,至此干燥结束。然后转入高温下脱掉残余的水分。先升温至 10°C ,保持 1 小时,升温至 28°C ,保持 2 小时,脱残余水分,出机密封。干冻粉水份一般不超过 4%。

三、马铃薯病毒抗血清的鉴定方法

广泛应用的方法有沉淀反应和凝聚反应。

(一) 沉淀反应: 主要是试管沉淀法。是抗原和抗体之间由于链的结合而生成一种抗

原抗体复合物的沉淀。这种反应要用提纯的抗原。试管沉淀反应的作法和抗血清效价的测定方法相似。按试验的样品数目,取一些直径 8~9 毫米、长 10~12 厘米的小试管,每管加入 0.5 毫升适当稀释的抗血清,然后加入等量的抗原,使充分混合,在 37°C 的恒温恒湿箱中放置 2~4 小时,在 4°C 的冰箱中过夜后,观察结果,记载标准和方法与血清效价测定的相同。此法常用于测定感病植物组织中病毒滴度(抗原稀释终点)。

(二) 凝聚反应: 是由小颗粒絮状凝聚作用产生的可见反应。马铃薯感染病毒之后,叶绿体表面上载有病毒,当植物原汁液和抗血清混合时,由于抗原抗体结合作用使叶绿体聚合起来形成肉眼可见的聚合物。这是田间鉴定常用的方法。

玻片点滴凝聚法: 在洁净的载玻片一端用毛细管滴入稀释 5 倍的抗血清 2~3 滴,另一端加正常血清 2~3 滴作对照,然后各加入被检验的植物叶汁液 1 滴,使之混匀,在 20°C 条件下,1 分钟左右,即产生凝聚反应。此法简便易行,是无病毒原种生产中常用的检验病毒的方法。

* 曾参加部分工作的有:唐俊清、申佩良、吴国林、洪乃武等同志。经东北农学院吕文清教授阅改。

玉米大斑病化学防治试验

姚浩然 张凤英

(黑龙江省农科院牡丹江地区农科所)

一、试验目的

目前防治玉米大斑病的较好药剂为 50% 敌菌灵可湿性粉剂,效果在 50% 左右。为了进一步提高其防效,我们进行了混加成膜物质——聚乙烯醇或苯氧乙酸试验。

二、试验材料和方法

1. 供试药剂: 50% 敌菌灵可湿性粉剂

(吉林市石油化工所提供); 聚乙烯醇为市售商品,白色粉末状; 苯氧乙酸配成 0.6% 的水溶液。

2. 试验地: 为一般生产田,玉米品种为“望红×塔 220”。每一处理 50 平方米,3 行区,顺序排列大区对比。

3. 接菌: 7 月 17 日接菌。由高粱粒培养