

# 应用电镜技术对试管保存马铃薯毒源效果的鉴定研究

周淑芹

朱光新 苏俊 杨冰岩 陈喜昌

(黑龙江省农科院马铃薯所)

(黑龙江省农科院原子能所)

应用电镜技术鉴定试管保存马铃薯毒源的效果表明:试管里的马铃薯 PVX、PVY 和 TMV 毒源经几次切段扩繁后,病毒浓度和纯度都发生了变化、有的病毒含量既高又纯,有的侵染上其它病毒或已无病毒粒体存在。在试验中发现:用不同的抗血清检测同一管试管源,其检测出的病毒种类和浓度也各不相同。因此,当保存的毒源试管苗作为制造抗血清的抗原时,最好先用免疫电镜直观测出它们的浓度和纯度。

## 1 前言

利用试管封闭法可保存经分离纯化的十余种马铃薯病毒,其优点:避免了媒介昆虫和机械传毒的机会,而且减少裸露条件下保存毒源所占用温室面积,节省人力物力,为毒源保存开拓了新的途径。

我们采用双向电泳(R-PAGE)法、酶联(ELISA)法以及指示植物对该批试管进行检测,结果表明,切段后试管苗的病毒浓度和纯度均发生了变化。为了进一步研究毒源进管保存的效果,又应用电镜技术对试管毒源进行了鉴定研究,为毒源试管苗的应用提供科学依据。

## 2 材料和方法

材料 经四次切段扩繁的 PVX 毒源烟草试管苗—2 管, PVY—5 管, TMV—2 管。

抗血清稀释分别取 PVX 抗血清、PVY 抗血清、TMV 抗血清和正常血清各 10ml, 分别稀释 100 倍于 0.01% 磷酸缓冲液之中。

方法 ①负染法称取各毒源叶片 10~20 毫克, 分别加入 0.01% pH7.2 磷酸缓冲液, 研磨成汁, 把有支持膜的铜网直接放在病毒汁液上孵育 5 分钟, 用滤纸吸干铜网, 再将铜网漂浮在 2% pH7.0 的磷钨酸液滴上 5 分钟, 室温下干燥, 电镜观察。②免疫电镜(捕获法)。把有支持膜的铜网在稀释成 100 倍浓度抗血清液滴上孵育 30 分钟, 取出铜网, 加 20 滴 0.01% pH7.2 的磷酸缓冲液连续滴洗, 去掉多余抗血清, 用滤纸吸干, 放在新鲜毒源, 组织叶片的浸渍汁液上孵育 30 分钟, 再用 30 滴 0.01% pH7.2 的磷酸缓冲液冲洗载网, 吸干。放在 2% pH7.0 磷钨酸液滴上漂浮 15 分钟, 干燥后电镜下观察。

## 3 观察结果与分析

由表得出:同源抗血清捕获量最高, 负染、正常血清和异源抗血清差异不大, 用不同的抗血清检测同一管毒源, 其检测出的病毒种类和浓度也不同, 如 1 号毒源在 TMV 抗血清中就没有 PVX; 2 号毒源在 PVX 和 TMV 抗血清中分别检出 PVX 和 TMV 病毒粒体, 其它三个处理没有病毒粒体存在, 这说明免疫电镜对同源病毒粒体有明显的吸附作用, 对异源病毒粒体有排斥反应。从表中得知:3 号、8 号和 9 号三管毒源浓度高、纯度达 100%, 可作为毒源保存下去; 4 号、7 号两管毒源浓度高, 纯度为 80~90%, 也可作为毒源继续保存下去; 1 号、2 号、5 号和 6 号四

管毒源,有的已混杂其它病毒粒体,有的已无病毒粒体存在,失去作为毒源保存的价值。

表 应用不同抗血清及负染检测试管苗毒源结果

镜 号 及 毒 源 检 测 法	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	PVX	PVX	TMV	TMV	PVY	PVY	PVY	PVY	PVY
捕 获 法	PVX 抗血清	PVX+ TMV+++	PVX± TMV±	PVX+ TMV+++	—	—	PVX+ PVY++	—	PVY+++
	PVY 抗血清	PVX± TMV+++	— TMV+++	PVY± TMV+	—	—	PVY+++	PVY+++	PVY+++
	TMV 抗血清	TMV++++	TMV±	TMV+++	TMV++++	—	—	PVY++++	PVY+
	正常 血清	PVX± TMV+++	— TMV+++	PVX+ TMV+++	—	—	PVY+		PVY+
	负染法	PVX± TMV+++	— TMV+++	TMV+++	—	—	PVY+++		PVY+

在镜下观察到 PVX、PVY 和 TMV 三种病毒粒体,形态大小分别为 515×13nm 线条状,730×15nm 软线状和 300×18nm 直杆状,与已知文献相近。

4 结 论

- 4.1 由于病毒在植体内分布不均匀,植株各部位腋芽的病毒含量也就不同;试管毒源苗龄的长短也直接影响病毒含量,苗龄太短,病毒在植体内正处在逐渐增殖阶段,苗龄太长,植体组织老化,病毒含量也就低。因此,定期跟踪检测,明确病毒在试管内增殖,递减与植体生长发育的关系,掌握试管植体病素含量的高峰期,根据高峰期的长短,确定毒源最佳的更新与利用时间。此外,在毒源切段繁殖过程中,要严加杜绝机械、人为接触相互传染病毒的机会,使毒源试管保持高浓度和高纯度。
- 4.2 免疫电镜法和负染法取样少,有一小片病叶就能检测,处理方法简便,在电镜下都能清晰地观察到病毒粒体,能快速准确鉴定植物病毒,既可测定病毒含量高低又可鉴定病毒纯度,是可靠的病毒诊断技术之一。

参 考 文 献

1 朱光新等.应用免疫电镜对几种马铃薯病毒毒源的鉴定研究.马铃薯杂志,1992. 2  
2 李芝芳.怎样防治马铃薯病毒性退化,马铃薯,1980. 2  
3 李芝芳等.关于黑龙江省马铃薯致病病毒群发生性状与分离鉴定的研究.马铃薯科学,1982. 1  
4 朱丽霞等.生物学中的电子显微镜技术.北京大学出版社. 1983  
5 张成良等.植物病毒鉴定.农业出版社. 1980