

电子显微镜技术在鉴定筛选马铃薯 无毒核心材料中的应用*

周淑芹

朱光新

(黑龙江省农科院马铃薯所) (黑龙江省农科院原子能所)

摘要 应用免疫电镜和负染法检测马铃薯试管苗中的微量病毒。试验表明,二者都具有很高的灵敏度,复合血清免疫电镜检出率比负染法高出7.4个百分点,从而在原有基础上提高试管苗的无毒化。

关键词 免疫电镜 负染法 PVX PVY TMV PSTV

中图分类号 S121 S532.032

黑龙江省是全国马铃薯种薯生产主要基地省份之一,负有向各省市供种的任务。为提高种薯质量和产量,必需汰除病毒。实践证明,利用马铃薯无毒种薯做种和建立健全种薯生产体系,是解决马铃薯病毒病害的根本途径。我们已在省内外建立多处良种良繁基地,每年向基地供应大量无毒原原种,长年进行无毒试管苗繁殖。通过茎尖脱毒和病毒检测获得的无毒苗,在连续扩繁的情况下,因操作、培养环境、生理因素等诸多条件的影响,致使材料有再感染病的可能,若不汰除,会严重影响种薯质量。因此,需在每年大量繁殖投产之前,逐一取样,严格鉴定后,才能作为无毒苗予以扩繁。为此,我们在筛选出无马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTV)基础上,应用电子显微镜技术中的负染法和复合血清免疫电镜法鉴定筛选马铃薯无毒试管苗,为进一步深化防治马铃薯病毒病和种薯无毒化生产开拓新的鉴定技术方法。

1 材料和方法

1.1 材料

无毒苗取材:1990年繁殖保存的无毒试管基础苗克新二号17份、紫花白3份、克新三号2份、克新一号2份、东农3032份、预641份合计27份。

1.2 方法

同一试管苗采用负染法和复合血清免疫电镜法2个处理进行检测。

取无毒基础苗新鲜组织用天平称重,按比例加0.01%、pH7.2磷酸缓冲液,以每毫克鲜重加缓冲液10微升,碾磨成汁,使汁液稀释度一致,分别在蜡板上滴两滴汁液,以备用。

1.2.1 负染法 把有支持膜的铜网膜面朝下放在蜡板上的一滴汁液上孵育5分钟,用滤纸吸去多余液体,稍加风干,浮载于2%、pH7.2磷钨酸染色剂上漂浮5分钟,取出吸去多余染色剂,室温下干燥,电镜观察。

1.2.2 复合血清免疫电镜捕获法 把PVX、PVY、TMV三种抗血清按1:1:1比例均匀地

* 收稿日期 1996-06-17

混合在一起,用0.01%、pH7.2磷酸缓冲液稀释成2%浓度,滴一滴在蜡板上。把铜网膜面朝下漂在此液滴上,室温下孵育15分钟,取出铜网,用20滴磷酸缓冲液连续滴洗去掉多余抗血清,再将铜网漂在蜡板上的另一滴汁液上,室温下保持30分钟,再用上缓冲液滴洗铜网,吸掉余液,浮载于2%、pH7.2磷钨酸染色剂上染色15分钟,吸掉余液,室温下干燥,电镜观察。

2 结果与分析

用H-300电镜观察,4万倍率下300目铜网,沿网孔边缘寻找一圈所计的病毒粒子数。

2.1 应用负染法和复合血清免疫电镜法鉴定

马铃薯无毒苗镜检结果见表1。

表1 应用复合血清免疫电镜法及负染法鉴定筛选马铃薯无毒苗检测结果

编号及品种	复合血清(PVX+PVY+TMV)捕获法			负染法				
	三个视野病毒粒子数(个)			从形态上判断病毒类型	三个视野病毒粒子数(个)			从形态上判断病毒类型
1 克新二号	0	0	0		0	0	0	
2 克新二号	0	0	0		0	0	0	
3 克新二号	0	0	0		0	0	0	
4 克新二号	0	0	0		0	0	0	
5 克新二号	61	50	30	PVX、PVY、TMV	5	3	4	PVX、PVY
6 克新二号	0	0	0		0	0	0	
7 克新二号	0	0	0		0	0	0	
8 克新二号	0	0	0		0	0	0	
9 克新二号	20	50	65	PVX、TMV	3	2	1	PVX
10 克新二号	70	50	55	PVY、TMV	2	3	2	TMV
11 克新二号	65	55	45	PVY、TMV	5	5	5	PVY、TMV
12 克新二号	20	15	25	PVX、PVY	1	0	1	PVX
13 克新二号	19	21	35	PVX、PVY	0	0	0	
14 克新二号	0	0	0		0	0	0	
15 克新二号	47	36	32	PVX、TMV	1	1	0	PVX
16 克新二号	13	5	7	PVX、PVY	1	2	0	PVY
17 克新二号	0	0	0		0	0	0	
18 紫花白	53	23	29	PVX、PVY、TMV	2	3	1	PVX
19 紫花白	0	0	0		0	0	0	
20 紫花白	101	77	33	PVX、PVY、TMV	0	0	0	
21 克新三号	22	12	8	PVX、PVY	1	0	0	PVX
22 克新三号	9	4	32	PVX、PVY	2	3	4	PVY
23 东农303	50	39	42	PVX、PVY、TMV	1	1	0	PVX
24 东农303	5	5	5	PVX、TMV	3	4	3	PVX
25 预64	0	0	0		0	0	0	
26 克新一号	23	27	33	PVX、PVY	2	3	1	PVX
27 克新一号	0	0	0		0	0	0	

每个样品取3个视野观察(即重复3次),由表1可知,通过复合血清和负染色双重检测获无毒苗12份,占总鉴定材料的44.4%,其中克新二号9份、紫花白1份、预641份、克新一号1份。这些试管苗经3个网孔观察均无病毒粒子,又随机地观察其它网孔任意部位,也无病毒粒子存在,最后才确认为无毒材料。由鉴定结果可知,各品种试管苗在连续扩繁的情况下,均存在病毒再感染。因此,在进行试管苗大量繁殖之前,必须进行严格的病毒检测,确保试管苗质量。从形态上判断小植体内病毒类型均以PVX、PVY、TMV三种病毒为主,这也是生产中普遍流行的马铃薯病毒。

2.2 负染法和复合血清免疫电镜法鉴定效果比较

由表2可知,第I种情况,对13份带毒试管苗材料,在4万倍的电子显微镜下观察,负染法三个视野内观察到病毒粒子平均为2个,其数量幅度1~5个,复合血清免疫电镜观察到病毒粒子平均为31个,其数量幅度5~70个,捕获量远远多于负染色。在同一试管苗中,其检测出来的病毒种类也不同,负染法只观察到极少量的一种或两种病毒粒子,而复合血清免疫电镜却能检出大量的两种或三种病毒粒子。第II种情况,负染法电镜下三个视野均无病毒粒子,复合血清免疫电镜却观察到许多病毒粒子。如13号材料19~35个、20号材料33~101个,检出率比负染法高出7.4个百分点,看出这两种镜检法效果有一定差异,复合血清免疫电镜法比负染法灵敏度高。第III种情况,利用上述两种方法鉴定,电镜下均无病毒粒子材料12份,占总鉴定材料的44.4%。

表2 复合血清免疫电镜法和负染法鉴定效果比较

鉴定材料 总数 (份)	鉴定结果 类别	各类 材料数 (份)	占总数 (%)	复合血清(PVX+PVY+TMV)捕获法				负染法	
				平均病毒 粒数(个)	病毒数 量幅度	病毒 类型	平均病毒 粒数(个)	病毒数 量幅度	病毒 类型
27	I	13	48.2	31	5~70	PVX、PVY、 TMV	2	1~5	PVX、PVY、 TMV
	II	2	7.4	47	19~101	PVX、PVY、 TMV	0	0	
	III	12	44.4	0	0		0	0	

注: I, 负染法和复合血清捕获法均有病毒粒子,其中负染法量少; II, 负染法无病毒粒子,复合血清捕获法有病毒粒子;
III, 两种方法均无病毒粒子。

3 讨论

虽然免疫电镜捕获病毒量优于负染色,只要样品中有该种抗血清的病毒粒子,它能够捕获到。但二者都具有较高的分辨率,电镜下均可以清楚看到病毒粒子,各具优点。负染色技术适合大量检测,它无须样品提纯,也不用抗血清,鉴定程度简便快速,一般样品处理仅用10分钟,可及时汰除有毒试管苗。免疫电镜最大优点是病毒能与特异抗血清结合,病毒粒子周围吸附一层抗血清,使病毒粒子加粗,捕获病毒粒子量增加许多。对筛选马铃薯无毒苗来说,先用负染色技术大量筛选汰除,然后再用复合血清免疫电镜进一步过滤筛选,彻底汰除病株,确保核心试管苗质量,为马铃薯种薯无毒化生产提供优质无毒原原种。

参 考 文 献

- 1 朱光新.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.关于黑龙江马铃薯致病毒群发生性状与分离鉴定的研究.马铃薯科学,1982,1
- 4 李芝芳.马铃薯病毒病害的汰除与种薯无毒化生产的研究应用.中加马铃薯项目国际学术研讨会论文集,1991
- 5 朱丽霞等.生物学中的电子显微镜技术.北京大学出版社,1983

Application of Electron-microscope Technique on Identification of Virus-free Potato

Zhou Shuqin Zhu Guangxin

(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences)

Abstract Immune electron-microscope and negative stained methods were used to examine the trace virus in tube plants of potato. The results showed that the two methods were all very sensitive. The examined-out rate of complex-serum-immune electron-microscope was 7.4 percent points higher than that of negative stained method, therefore the virus-ridding degree of the tube plants was raised on original basis

Key words Immune electron-microscope, Negative stained method, PVX, PVY, TMV, PSTV



独联体优良的马铃薯新品种*

1 改良的阿比托夫2号 中晚熟至晚熟食用马铃薯品种,由乌兹别克育成。不抗癌肿病,受晚疫病、真菌性病害和疮痂病危害,受病毒病危害较弱,较抗S和M病毒。抗退化、抗热。每公顷产量15.4~19.7吨,商品薯重70~110克。块茎椭圆至长形,红至粉红色,表皮光滑,芽眼深度中等,薯肉黄色,秧苗红紫色。

2 柳树 中晚熟多用途马铃薯品种,由白俄罗斯育成。淀粉含量17.6%~29%,品质好,耐储藏。抗癌肿病,受晚疫病、黑胫病及病毒病危害较轻。在田间较抗皱叶病和花叶病。公顷产量34.6~49.4吨,商品薯重60~90克。块茎圆至长圆形,白色,芽眼浅,薯肉白色,秧苗红紫色。

3 新事物 中早熟食用、饲用马铃薯品种,由俄罗斯育成。淀粉含量13%~16.4%,品质较好,耐储藏。抗癌肿病,较抗X、S、M病毒,抗晚疫病、黑胫病和丝菌核病,抗马铃薯甲虫。是适于精耕细作类型的品种。被催芽的块茎早期播种于预先合成的茎内条件下,在熟化的壤土、砂壤土、甚至在排水的泥炭沼泽田种植均会获得较高产量。品种较抗涝。每公顷产量30.7~33.4吨,商品薯块茎90~100克。块茎圆形,带凹陷的葡萄茎痕迹,白色。表皮光滑,芽眼数多,芽眼浅至中等深度,不着色。薯肉白色,带有黄的色泽。刀切后不变暗,秧苗红紫色。

4 鹰皱 晚熟食用马铃薯品种,由白俄罗斯育成。淀粉含量15%~18%,品质及耐贮性较好。抗癌肿病,在大田条件下受晚疫病危害较轻,中抗疮痂病和黑胫病。品种适于精耕细作,土质肥沃,机械化种植。每公顷产量34.7~48.4吨,商品薯重90~120克。块茎大,圆形至扁圆形,带有圆头的顶端和凹陷的葡萄茎的痕迹,白色。芽眼数少,芽眼深度中等。 (李贵春 摘译)

* 收稿日期 1996-06-11