

## 泡桐丛枝病脱毒组培苗电子显微镜检测\*

孙福生 张锡津 田国忠

**关键词** 泡桐丛枝病、类菌原体、电子显微术

泡桐丛枝病是当前泡桐生产中的严重病害,对泡桐丛枝病的病原体——类菌原体(Mycoplasma-like organism, 简称 MLO)的研究与检测已愈来愈受到重视。目前对组织化学方法检测的报道较多,如迪纳氏染色、苯胺蓝染色,这些方法有时出现非特异反应,只能作为检测 MLO 对植物侵染的一种辅助手段<sup>[1,2]</sup>;朱激等人<sup>[3]</sup>报道了用 DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吡啶)荧光显微术,可以用光学显微镜看到 MLO 的类核 DNA 荧光光点,这是目前普遍认为比较成功的检测方法。但 DAPI 也可使植物细胞内的线粒体、叶绿体、或侵入的细菌、类细菌等发出荧光,仍存有一定干扰,因此这一手段的应用尚存在局限性。

MLO 的大小一般在 80~800 nm 之间,只有用电子显微镜才能观察到。本文同时应用光学显微和电子显微技术,在修块时注意保留植物组织的韧皮部,从而提高了 MLO 的电子显微镜的检测效率和可靠性,为泡桐温度处理脱毒组培苗的脱毒效果提供较为准确的鉴定结论。

### 1 材料和方法

泡桐组培苗的培养和高温脱毒过程参见有关报道<sup>[4]</sup>。本工作采集 35℃ 处理的脱毒组培苗(正常生长、无从枝病症状)8个,25℃处理的组培苗(仍表现典型的丛枝病症状)7个,共15个样品。靠近苗的茎尖 0.5 cm 处切下细茎段,再切成 1~2 mm 长的小段。在 4℃ 下用 3% 戊二醛水溶液固定过夜,蒸馏水充分清洗后,用 1% 锇酸常温下固定 6 h,乙醇系列脱水,spurr 树脂渗透包埋<sup>[5]</sup>。超薄切片之前,先仔细修块,暴露出中心束组织,并在超薄切片机上切下几片厚片,厚度约为 2 μm。经 1% 碱性番红染色后,置于光学显微镜下观察,以确定组织部位。再修块留下韧皮部及其周围组织。超薄切片经柠檬酸铅染色和醋酸双氧铀染色后,用 Philips EM-400 T 透射电镜观察。

### 2 结 果

图版 I-1 是泡桐丛枝病症状明显的组培苗嫩茎纵切面。中间细胞密集部分是中心束,外层较大细胞区域为嫩茎的皮层。一般幼茎的构造为:从中心向外依次是髓、初生木质部、维

1993-02-16 收稿。

孙福生工程师(中国林业科学研究院分析中心 北京 100091);张锡津,田国忠(中国林业科学研究院 林业研究所)。

\* 本文为国家“八五”攻关项目“泡桐丛枝病防治技术研究”中的一部分。

管形成层、初生韧皮部和皮层<sup>[6]</sup>。因此，幼茎纵切无论是弦面或径面(或方向不大准确)，韧皮部均位于中心束外围，与皮层细胞相邻，易于辨识。从图版 I-1, 2 可以看到, 25℃处理的组培苗嫩茎韧皮部有染色很深的细长细胞，此部位的电镜观察表明，其中充满了 MLO。对 35℃脱毒苗幼茎的相同部分观察，没有发现 MLO 存在。

图版 I-6、7 低倍电子显微照片更清晰地显示了上述情况。图版 I-6 为中心束内维管形成层与韧皮部结构，图版 I-7 是韧皮部与皮层薄壁细胞的结构。图片显示，尽管韧皮部细胞内几乎充满了 MLO，而在相邻的皮层细胞与维管形成层细胞内，则没有或极少 MLO。这与历来 MLO 检测结果一致。因而，在超薄切片之前，用光学显微镜初步确定韧皮部的部位，采用定位切片技术，对检测植物组织内是否存在 MLO 是很重要的步骤。

图版 I-3~5、8 分别来自 3 个 25℃下培养、丛枝症状明显的组培苗样品。有的筛管细胞中已被 MLO 完全充满，MLO 个体之间已没有空隙(图版 I-3、5 左侧细胞)；有的筛管中，MLO 分布相对比较稀疏，可以观察到切面为长形或亚铃形的 MLO，表明 MLO 群体仍处于分裂增殖之中。

在一个样品的韧皮部筛管中，除观察到大量 MLO 之外，还见到很多纤丝状物质，一簇簇分布，这种结构在正常细胞中未发现。其性质及其是否与 MLO 有关，尚需进一步探讨。

本工作应用相同的技术，对 35℃处理后的 8 个无从枝症状的组培苗韧皮部进行检查，均未发现 MLO 的存在，证实：温度(35℃)处理结合茎尖培养技术<sup>[4]</sup>，培养出的泡桐组培苗，是无毒苗，这一结果与 DAPI 荧光显微镜检测一致。说明该脱毒技术是成功的。

### 3 讨 论

自 1967 年 Doi 等<sup>[7]</sup>发现 MLO 以来，已发现 300 多种植物受害。由于 MLO 最大仅为 800nm，超出了光学显微镜的分辨率极限，电子显微成为 MLO 检测、研究的关键技术。但电子显微技术中，超薄切片经常面积很小，有时只包含几十个细胞。另外，MLO 在大树内经常含量低，在树体内分布不均匀，分布与季节有关。因此，常出现丛枝症状明显，而电镜检不出的情况。

本文利用光学显微与电子显微技术相结合的方法，对温度处理脱毒泡桐组培苗进行检测。对 25℃处理、丛枝症状明显的样品，在韧皮部均发现了大量 MLO；以同样的方法，对脱毒的组培苗进行检测，未观察到 MLO，这一检测结果是可信的，并证实泡桐组培、温度处理结合茎尖培养脱毒技术的可行性<sup>[4,6]</sup>。

为提高电镜对 MLO 的检出率，人们早已发展了将 MLO 接种到其它温室植物的技术，例如将 MLO 接种在长春花上<sup>[9]</sup>。本文所提供的方法，也可推广用于其它植物丛枝病 MLO 的检验。如对于患病的大树，可分别采集不同部位(根、茎、叶、花)的组织，在适当温度下(如 25℃)进行组织培养，再对表现病状的组培苗进行电子显微检测。因此，本方法有一定的普遍应用价值。

## 参 考 文 献

- 1 金开璇, 田国忠, 汪跃. 组织化学技术快速检测泡桐丛枝病研究. 植物病理学报, 1989, 19(3), 185~188.
- 2 袁嗣令, 宋丽亭, 黄照清, 等. 利用光学显微镜观察泡桐丛枝病株中的类菌质体. 微生物学报, 1978, 18(4), 310~311.
- 3 朱激, 徐丽云, 金开璇, 等. 用DAPI荧光显微术检测泡桐丛枝病. 植物学报, 1991, 33(7), 495~499.
- 4 张锡津, 田国忠, 黄钦才. 温度处理和茎尖培养结合脱除泡桐丛枝病类菌原体. 林业科学, 1993, 29(5).
- 5 朱丽霞, 程乃乾, 高信曾. 生物学中的电子显微技术. 北京: 北京大学出版社, 1983.
- 6 成俊卿主编. 木材学. 北京: 中国林业出版社. 1985, 6~20.
- 7 Doi Y, M Teranaka, K Yora, et al. Mycoplasma or PLT group-like micro-organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwaf, potato withes'-broom, aster yellows, or Paulownia witches'-broom. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 1967, 33, 259~266.
- 8 Ducrocquet J D. Effect of temperature on symptom express of apple proliferation. Agronomie, 1986, 6(10), 897~903.
- 9 金开璇, 傅仓生, 李振兰, 等. 泡桐丛枝病病原及传染途径的研究. 林业科学, 1978, 14(4), 1~4.

*Detection of Mycoplasma-like Organism in Paulownia  
Witches-broom Tissue by Electron Microscopy*

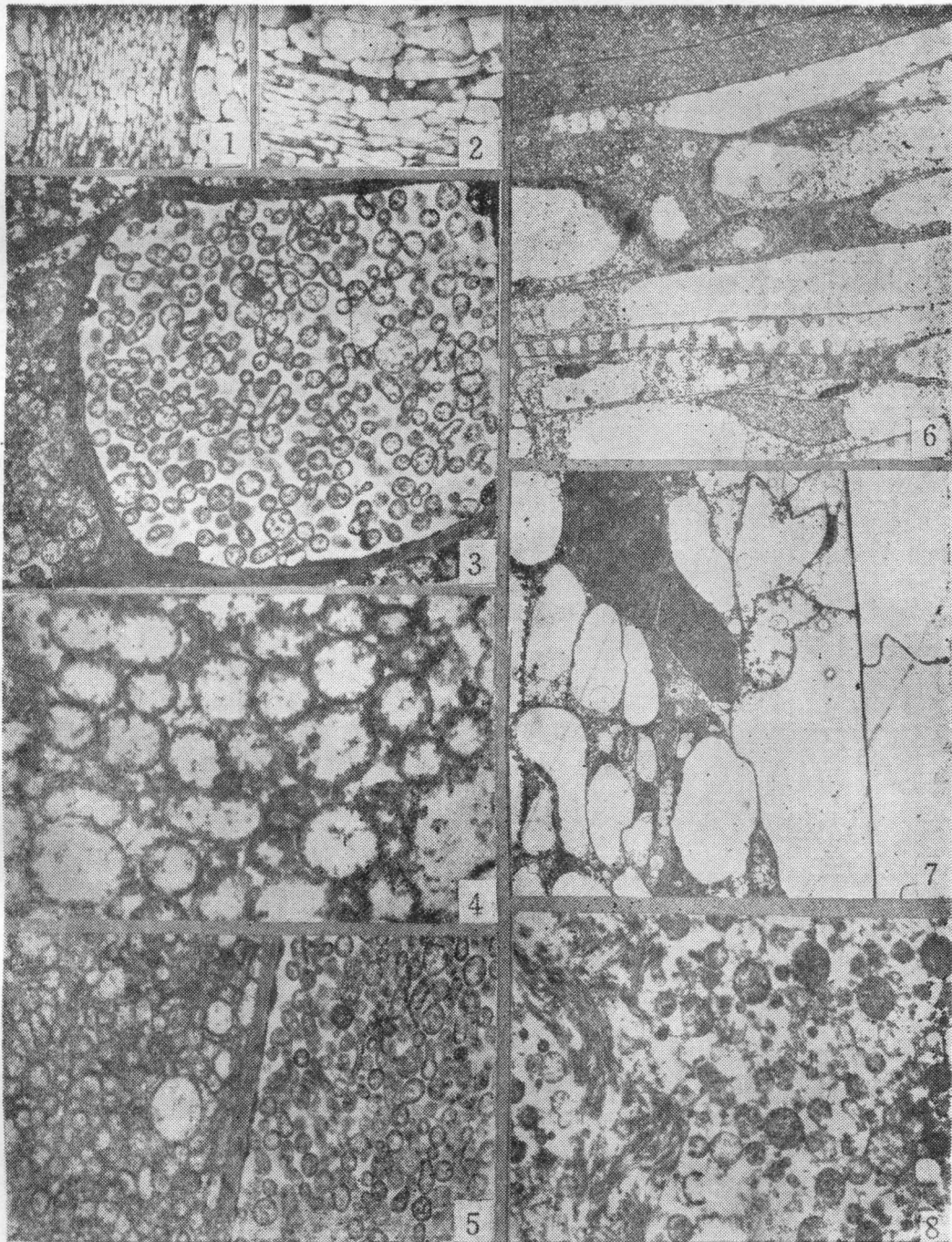
Sun Fusheng Zhang Xijin Tian Guozhong

**Abstract** In this paper the light microscopy, electron microscopy and orientation ultrathin sectioning techniques are used for the detection of MLO, and the MLO in the infected sieve elements can be directly and reliably observed with an electron microscope. The convincing detection is furnished for the study in the elimination of MLO of paulownia saplings and this technique can also be used universally in the detection of MLO in other plants.

**Key words** paulownia witches-broom, mycoplasma-like organism, electron microscopy

---

Sun Fusheng, Engineer (Analytical Centre, CAF Beijing 100091), Zhang Xijin, Tian Guozhong (The Research Institute of Forestry, CAF).



1. 丛枝病症状明显的泡桐组培苗嫩茎纵切面(1号样品)。注意中心束外围有染色很深的细长细胞,  $60\times$ (光镜); 2. 图版 I-1 韧皮部及附近区域的局部放大, 深色细长细胞内含有大量MLO,  $120\times$ (光镜); 3. 韧皮部细胞中的 MLO。注意有长形和哑铃形的MLO个体,  $8000\times$ ; 4. MLO的放大照片,  $22000\times$ ; 5. 两个相邻筛管中的MLO, 右侧细胞中的MLO仍处于分裂增殖之中,  $8000\times$ ; 6. 韧皮部与维管形成层; 韧皮部细胞内含大量MLO, 而维管形成层中基本无MLO,  $1700\times$ ; 7. 韧皮部与皮层薄壁细胞。染色发黑的细胞内充满MLO, 而皮层内无MLO,  $800\times$ ; 8. 在一个样品中, 含MLO筛管中出现纤丝状物质,  $10000\times$ 。