

利用光学显微镜观察泡桐丛枝病株中的类菌质体*

袁 嗣 令

(中国林业科学研究院林业科学研究所, 北京)

宋丽亭 黄照清

(河南农林科学院林业科学研究所, 郑州)

李 秀 生

(河南农学院, 许昌)

应用 Feulgen 染色切片法检测了泡桐丛枝病株中类菌质体的存在。所得结果表明 Kartha 等 1975 年报道的方法是有效的。

在病株不同部位取样, 韧皮部或叶脉切成 0.5 厘米大小固定在 Helly 氏固定液中。染色操作与 Kartha 等相同。切片在光学显微镜下检视, 类菌质体呈现暗色斑块或斑点, 凝聚在树木细胞中心或细胞边缘, 植物细胞作为背衬呈绿色。

自从 1967 年国际上发现类菌质体 MLO (或称 MLB) 引起植物病害以后^[1], 植物病理学科中开辟了一个新领域^[2]。这个领域进展甚快, 十年来有关类菌质体的生活特性, 分离培养, 传播媒介, 诊断鉴定, 化学治疗等, 已提供了不少资料。但其形态和细胞结构的观察, 则全靠电子显微镜的应用。由于电子显微镜目前在我国还不是一项通常的仪器, 不能普遍使用。因此探索一种较为简易的方法, 利用当前的设备条件来观察类菌质体在病植株内的存在, 具有广泛的实用意义。

Kartha 等^[3]用常规切片法, 并通过有关的染色步骤增加其分辨力及能见度, 使类菌质体成为凝聚状, 在一般光学显微镜下, 也能清晰观察到类菌质体。本文用泡桐丛枝病的根部及病叶作为试验材料, 进行了这方面的探索。

材料与方法

剥取罹丛枝病的泡桐根或主干的韧皮部, 或

病叶叶脉, 切成大小 0.5 厘米小块, 固定在 Helly 氏固定液中 (固定液成分: 二氯化汞 5 克, 重铬酸钾 2.5 克, 蒸馏水 100 毫升, 福尔马林液 10 毫升), 经 4 小时。然后清水淋洗 2 小时, 接着浸没在碘的乙醇溶液中 3 小时。(配法: 70% 乙醇中加碘数粒, 至色泽呈淡紫。)为了去除多余固定液, 材料在不同浓度乙醇中脱水。脱水顺序: 70% 乙醇 1 小时, 95% 乙醇 1 小时, 100% 乙醇 30 分钟。然后换放在异戊醇中 3 次, 每次 30 分钟。接着在 1:1 的异戊醇与石蜡 (熔点 52℃) 混合剂内放 30 分钟, 再移放在纯石蜡中, 换放 3 次, 每次 30 分钟。

包埋在纯石蜡中的材料, 用切片机切片, 厚度 5 微米 (部分材料切 10 微米)。切片放在已涂有 Mayer 氏粘贴剂的洁净载片上。(粘贴剂配法: 鸡蛋白 50 毫升, 甘油 50 毫升, 混合后, 加水杨酸钠 1 克, 过滤待用。)然后脱蜡。准备脱蜡的切片, 先在二甲苯中放 2 分钟, 再换放新鲜二甲苯 2 分钟, 然后移至 100% 乙醇中 2 分钟。再经过 90% 乙醇 2 分钟, 换放至 2% 火棉胶中 (火棉胶溶

本文于 1978 年 7 月 27 日收到。

* 本文曾请中国科学院微生物研究所周家炽教授校阅并提出修改意见。

于 30:1 的乙醚及 90% 乙醇中)。然后再换放至 70% 乙醇 2 分钟,经 1N 盐酸淋洗后,移至 60℃ 的 1N 盐酸中,经 8 分钟,再用冷的 1N 盐酸淋洗。经蒸馏水再淋洗后,用盐基性品红染色,在黑暗处放 20 分钟。载片上多余染色剂用滤纸去除。很快的在区分液中换洗 3 次。(区分液配方:去离子蒸馏水 210 毫升中加入 10 毫升 1N 盐酸及 1 克亚硫酸氢钠。区分液要新鲜,现用现配。)再用蒸馏水淋洗 15 分钟。去除多余水后,用 0.05% 亮绿进行负染色(亮绿溶于 95% 乙醇)。在 95% 乙醇脱水 2 分钟后,移入 100% 乙醇 2 分钟,再换至二甲苯中 2 分钟,然后用加拿大胶封片。观察时,用一般的光学显微镜 200 倍至 2000 倍镜头。

结 果

所有染病材料,经切片染色后均能获得清晰结果。泡桐的组织细胞呈绿色,而

类菌质体凝聚为深褐色大小不等,形状不同的斑块(图版 I-1)。有些则为密集黑点,分布在细胞中间或集中在某一侧(图版 I-2)。

利用常规切片和光学显微镜在某些方面替代电子显微镜的作用来观察染病植株细胞内类菌质体的存在,为研究工作提供了广泛应用的可能。

参 考 文 献

- [1] Doi, Y., M. Teranaka, K. Yera, and H. Asuyama: *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.*, 33: 259—266, 1967.
- [2] Ghosh, S. K. and S. P. Raychaudhuri: *Cur. Sci.*, 41: 235—241, 1972.
- [3] Kartha, K. K., M. T. Cousin and E. F. Ruegg: *Indian Phytopathol.*, 28 (1): 51—56, 1975.

A LIGHT MICROSCOPIC DETECTION OF MLO ASSOCIATED WITH PAWLOWNIA WITCHES' BROOM

Yuan Si-ling

(Institute of Forestry, Academy of Forestry Science, Beijing)

Song Li-ting

Huang Zhao-qing

(Institute of Forestry, Academy of Henan Agriculture & Forestry, Zhengzhou)

Li Xiu-sheng

(Agriculture College of Henan Province, Xuchang)

Feulgen staining method was applied to detect the existence of MLO in Pawlownia with witches' broom symptoms. As our results show, this method is as effective as the method reported by Kartha et al. in 1975.

The phloem of the trunk or roots from diseased tree and the main veins of diseased leaves were used as materials.

They were cut into 0.5 cm in size and fixed in Helly's fixative. All the sectioning and staining methods were after Kartha's. After staining sections were examined under ordinary light microscope. MLO appeared as dark dots or spots concentrated either in the center or near to the cell wall, while the plant cells stained green.