

冰冻断裂的枣疯病树韧皮组织中类支原体的扫描电镜观察

史春霖

张凤舞 陈子文*

(中国科学院微生物研究所,北京) (河北省农林科学院昌黎果树研究所,昌黎)

枣疯病树韧皮组织的冰冻断裂样品,经扫描电镜观察揭示,病树韧皮组织的筛管中存在类支原体,而健树韧皮组织筛管中则未观察到。用此方法观察到的类支原体,其大小和形状,与文献中利用其它方法获得的结果基本相符。讨论了这种方法的优、缺点。

关键词: 类支原体,枣疯病,冰冻断裂法。

类支原体 (MLO) 是许多植物病害的病原^[4], 并且其数量还在逐年增加。已经证明, 我国枣树的毁灭性病害——枣疯病的病原也是 MLO^[1-3]。

在考查染病植物组织中是否存在 MLO 时, 最简便的方法是用四环素处理病株, 如经处理后病状缓解, 或外观康复, 便可说明这种病害的病原是 MLO。然而, 在 MLO 的研究工作中, 惯用的考查方法是利用透射电镜 (TEM) 检查超薄切片上染病植株韧皮细胞筛管中是否存在 MLO, 不过此法流程长, 较费时。

与透射电镜相比, 扫描电镜 (SEM) 的样品制备容易, 能够检查大量组织。应用扫描电镜检查某些动物支原体表面形态、大小等方面的应用已有不少报道^[5-7]。近二、三年来, 扫描电镜又成功地应用于 MLO^[8,9], 该法能原位检查存在于筛管中的 MLO。

本文报道利用冰冻断裂和扫描电镜术检查枣疯病树中 MLO。

材料和方 法

(一) 病株的获得

用在枣疯病树上饲毒的枣疯病的媒介昆虫,

凹缘菱纹叶蝉 (*Hishimonus Sellatus Uhler*) 接种健康的枣树幼苗。接种后的幼苗放在防虫温室中, 以观察其发病情况, 待发病后取带有典型症状的叶片及叶柄作样品, 以同龄的不接种的健康植株作对照。

(二) 冰冻断裂和扫描电镜观察

取病株样品, 用蒸馏水洗去表面污物, 用手术刀把材料切成 3—5 mm 长的小块, 在其两端作出标记。室温下, 用 2% 戊二醛固定 1 小时, 用 1/15M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 洗两次, 每次 15 分钟。移入 1% OsO₄ 固定 2 小时 (若在冰箱内固定, 时间要加倍), 再用 1/15 M 磷酸缓冲液洗两次, 每次 15 分钟; 然后将样品移入 25% 二甲亚砜 (DMSO) 中放置 1 小时, 每 30 分钟换液一次。

用国产冰冻断裂装置进行断裂, 断裂后的样品移入 50% DMSO 中浸泡 15—20 分钟, 取出后用 1/15M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 冲洗 3—5 次, 每次 5—8 分钟, 再用 1% OsO₄ 固定 1 小时, 用无离子水清洗两次, 每次 15 分钟; 然后移入 2% 单宁酸中浸泡 30 分钟, 每 15 分钟换液一次; 用 1% OsO₄ 后固定 30 分钟, 用乙醇系列脱水, 在临界点干燥, 喷涂金, 置国产 DX-3 型扫描电镜下观察。

本文于 1982 年 4 月 12 日收到。

本工作得到王祈椿先生热情支持; 中国科学院微生物研究所刘如臻同志给予技术协助, 生物物理所张树林同志惠借断裂装置; 王祈椿、徐浩、周家斌先生审阅文稿, 一并致谢。

* 现在通讯处: 中国农业科学院植物保护研究所。

结 果

用冰冻断裂和扫描电镜术考查染病植株中的 MLO, 及其在植物组织内的定位、表面形态、大小和分布, 首先要在电镜下找出组织断裂面, 然后观察韧皮细胞的筛管。经断裂的组织, 其断裂面看得十分清楚(图版 I-1), 可以看到排列有序的细胞, 但用此法看到的细胞多数是“空”的。

用扫描电镜检查韧皮细胞的筛管, 发现 MLO 均位于这类细胞中(图版 I-2—4), 呈大小不等的球状体; 在经检查的健康对照株的同类细胞中均未观察到这种个体。这些呈球状体的 MLO, 直径约为 93—600 nm, 与文献中用其他方法观察到的个体相似^[1—3], 或略大, 但未见其他形状的个体, 这可能与取样时 MLO 所处的发育阶段不同有关。

如果筛管分子中 MLO 较少时, 它们一般附着在管壁上(图版 I-4), 其他 MLO 也有类似现象^[8]。

就其分布而言, 大量观察表明, 在一个断裂面上的若干韧皮筛管中, 其中只有少数存在 MLO, 大部分筛管是“空”的, 不存在 MLO。这说明其分布是很不均一的。当然, 不排除随着病情的发展, MLO 通过筛孔逐渐蔓延到邻近筛管中去的可能性。

根据上述结果, 可以认为: 冰冻断裂和扫描电镜术是考查病株中 MLO 及其在组织内分布情况的一种较好方法。

讨 论

在检查染病植物组织内是否存在 MLO 的方法中^[10,11], 最常用的是透射电镜(TEM)检查超薄切片上染病植株韧皮细胞筛管中的 MLO。透射电镜分辨率高, 有利于揭示 MLO 细胞的内部结构, 是其一大优点。但这种方法只能研究少量植物组织。

由于病原体在植物组织内含量多少不等, 分布也不均一, 往往存在于少数细胞内, 所以不能较快得到满意的结果, 有时甚至得不到结果。这就需要重复制样, 要观察一系列的切片, 流程长, 费时多。

光学显微镜与不同的染色术并用, 在诊断黄化病病原 MLO 时也有一定价值, 但这种方法特异性不强; 荧光检测法也是近年用于诊断病原 MLO 的方法, 但是上述两种方法都是间接检测法, 都不能直接地观察到 MLO, 所以也有一定的局限性。

扫描电镜(SEM)分辨率虽不及透射电镜高, 但用扫描电镜检查 MLO 时, 制样容易, 能较快地检查大量植物组织。尽管 MLO 在植物组织内一般浓度较低, 分布不均一, 但只要它存在就能观察到其表面形态和大小, 也能了解其分布情况, 获得的结果较可靠。

冰冻断裂后的细胞大都是“空”的。因此, 位于筛管中的 MLO, 特别有利于扫描电镜作原位检查和观察其三维结构。

参 考 文 献

- [1] 陈作义等: 科学通报, **23**(12): 751, 1978.
- [2] 徐绍华: 微生物学报, **20**(2): 219—220, 1980.
- [3] 王祈禧等: 植物病理学报, **11**(1): 15—18, 1981.
- [4] Maramorosch, K.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **28**: 301—324, 1974.
- [5] Klaiiner, A. S. et al.: *Ann. N. Y. Sci.*, **225**: 236—245, 1973.
- [6] Kammer, G. M. et al.: *J. Bact.*, **104**: 499—502, 1974.
- [7] Mayberry-Carson, N. J. et al.: *J. Bact.*, **120**: 1472—1475, 1974.
- [8] Petzold, H. et al.: *Phytopath. Z.*, **89**: 237—248, 1977.
- [9] Haggis, G. H. et al.: *Phytopathology*, **68**: 677—680, 1978.
- [10] Kartha, K. K. et al.: *Indian Phytopathol.*, **28**: 51—56, 1975.
- [11] Goszdzieski, M. et al.: *Phytopath. Z.*, **82**: 63—69, 1975.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION ON MLO IN FREEZE-FRACTURED PHLOEM TISSUES OF WITCHE'S-BROOM DISEASED JUJUBE

Shi Chunlin

(Institute of Microbiology, Academia Sinica Beijing)

Zhang Fengwu Chen Ziwen

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academia of Agronomy and Forestry, Changli Hebei)

Scanning electron microscopic observation on freeze-fractured phloem tissues of witche's-broom-diseased and of healthy jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) revealed that MLO was present in the sieve tube elements of diseased plant, but not in healthy ones at the same age.

The size and shape of the MLO in freeze-fractured samples from diseased jujubes

observed in SEM corresponded with those results obtained by other methods in literature. The advantages and disadvantages of scanning electron microscopy of freeze-fractured sample were discussed.

Key words

mycoplasma-like organism, witche's-broom-diseased of jujube, freeze-fracture