

类立克次体是中国杏树小叶病的病原

史春霖 谢家仪 杨希才

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

刘学文

(北京市林业保护站,北京 100029)

本文描述了到目前为止仅在我国发现的一种杏树新病害——小叶病。用电镜检查天然感病杏树叶片中脉的超薄切片,发现韧皮细胞中存在类立克次体(RLO)。RLO为卵圆形或棒状,直径约0.2—0.5 μm ,长约1.0—2.5 μm 。它们被双膜(波纹状的细胞壁和光滑的细胞质膜)环围着。在横切片中,这些微生物为卵圆形,内部结构由核糖体和带有DNA样细丝的核区组成。在纵切片中,微生物呈棒状。在健株组织中未发现这种微生物。

青霉素处理染病杏树后,病状完全消失,说明利用电镜看到的类立克次体是杏树小叶病的病原物。

关键词 类立克次体;杏树;小叶病

1987年,北京郊区密云县建立杏树品种园,栽有7000多株杏树。自1989年开始发生死树现象。目前苗树已达1000多株,其中500多株已死亡,给经营者带来巨大损失。

杏树染病后,春季发芽开始病芽扭曲,叶小、细长似柳叶状,有丛生现象(图版1-2)。此后,叶片逐渐凋萎,最后整株死亡。从外观病状看,既不像生理病,也不像真菌病,且呈中心发病型,疑是限定于植物维管组织中的病原物所致。为弄清这种杏树新病害的病原,给生产提供防治依据,我们做了一些工作。本文首次报道,对这种杏树新病害病原物研究的初步结果。

材料和方 法

(一) 探索杏树小叶病的病原

取自然感病具有明显病状杏树的叶片中脉切成小块,同时取健康杏树的叶片中脉,切成小块用作对照。所有材料用2.5%戊二醛(0.1mol/L磷酸缓冲液,pH7.2配制)固定24小时,用同样的缓冲液冲洗三次,用1%OsO₄固定2.5小时,再用磷酸缓冲液清洗1.5小时,乙醇系列脱水,Epon 812树脂包埋,LKB III型切片机切片,切片用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,在Hitachi H-600电镜下观察,并照相。

(二) 杏树小叶病株对青霉素的反应

在青霉素处理的初步实验中,将浓度100ppm的兽用青霉素,直接从染病杏树的树干注入其维管组织中,两周后重复注射同样浓度的青霉素溶液。每次每株注射60—100ml,观察病状变化情况。

本文于1991年12月5日收到。

本工作得到田波教授热情支持,特此致谢。

结 果

(一) 染病杏树组织中的类立克次体

1. 类立克次体的检测: 利用透射电镜检查了染病杏树叶片中脉的若干超薄切片, 发现韧皮细胞中存在类立克次体 (RLO), 但在数株健康杏树韧皮细胞中, 从未见到这类微生物。

按纯化病毒的方法, 由染病杏树采集的小叶提取病毒, 所得到的制备物中, 在电镜下看不到任何病毒颗粒。为检查类病毒, 进行了凝胶电泳, 未见类病毒特有的电泳带出现。

2. 类立克次体的分布和超微结构: 类立克次体限定于染病杏树韧皮组织的筛管分子中。在筛管中, 它们大都散生在无细胞内容物的成熟细胞中。这些微生物为卵圆形或棒状, 直径约 $0.2-0.5\mu\text{m}$, 长约 $1.0-2.5\mu\text{m}$ 。它们被双膜(波纹状的细胞壁和光滑的细胞质膜)环围着。细胞壁和胞质膜被一染色浅的中间层分隔开, 中间层宽度约 $5-7\text{nm}$, 胞壁和胞质膜两者的厚度大体相等。胞壁或外膜通常染色较深, 而多数病原体的中心区染色微弱(图版 I-3, 图版 II-4)。

在横切片中, 类立克次体为卵圆形, 有的个体能看到核糖体和 DNA 样的细丝(图版 I-3, 图版 II-4)。有的个体含有致密的、无结构的物质。且个体较小, 这可能是正处于退化阶段(图版 I-3)。有的个体已经解体, 解体的个体外膜破坏, 内膜不复存在(图版 II-4)。

在纵切片中, 类立克次体呈棒状, 两端较钝, 外壁呈波纹状, 菌体往往沿细胞内壁成群的发生(图版 II-5)。

(二) 病原对青霉素的敏感性

在用青霉素处理的初步实验中, 我们发现, 病株用青霉素处理后, 病状明显缓解, 植株生长正常, 外观似健康株一般, 说明病原物受青霉素的影响。

讨 论

类立克次体 (Rickettsia-Like Organisms, 简称 RLO), 也称类立克次体菌 (Rickettsia-Like Bacteria, 简称 RLB), 又称类细菌 (Bacteria-Like Organisms, 简称 BLO), 通称难养菌 (Fastidious Bacteria), 是指在形态和超微结构方面类似真立克次体的一类新的原核植物病原体。关于类立克次体及其诱发的植物病害, Hopkins 曾作过较详细的综述^[1]。自那时以来, 又不断发现新的植物类立克次体病害。根据其在植物组织中的定位, 可分为限定于木质部的类立克次体 (Xylem-Limited RLO) 和限定于韧皮部的类立克次体 (Phloem-Limited RLO) 两类。

限定于韧皮部的类立克次体诱发的植物病害, 具有特征性的黄化型病状, 通常包括病株幼叶变小, 黄化、叶片卷曲或扭曲, 丛枝、植株矮化、早死^[2-6]。

限定于韧皮部的类立克次体诱发的植物病害, 目前国际上已正式报道的有: 三叶草绉叶卷曲病^[2], 黄花稔小叶病^[3], 马铃薯小叶病^[4], 三叶草棒叶样病^[5], 三叶草棒叶病^[7,8], 落叶松矮化丛枝病^[9], 甜菜和菠菜丛簇病^[10], 葡萄传染性坏死病^[11], 蛇麻草绉叶病^[12], 苹果疯枝病^[13], 柑桔绿花病^[14], 葡萄黄化病^[15], 棕榈衰退病^[16]等。

杏树小叶病是我国杏树发生的一种新病害。这种杏树病害的主要病状是小叶，叶细长似柳叶状，有丛生现象，叶片凋萎，植株早死。到目前为止，国内外还未曾报道过这种病害。

利用电镜检查染病杏树叶片中脉的超薄切片，发现韧皮组织中存在类立克次体，卵圆形或棒状。菌体被双膜（波纹状的细胞壁和光滑的细胞质膜）环围着。与感染其他黄化型病害的植物韧皮组织中发现的类菌原体（MLO）完全不同。类菌原体无细胞壁，只有三层结构的单位膜。染病组织提取物中未见病毒颗粒，凝胶电泳也未见类病毒特有的电泳区带。说明染病杏树与病毒和类病毒无关。

用青霉素处理染病杏树后，植株由病态消失，新生枝条上的叶片不表现任何病状，外观似健株一般。这与其他学者报道的，用青霉素处理限于韧皮部的类立克次体诱发的植物病害所获得的结果一致^[3,5,11]。因为青霉素能抑制类立克次体细胞壁的合成，而对无细胞壁，只有单位膜的类菌原体（MLO）往往是无效的。

上述结果表明，利用电镜观察到的类立克次体（RLO），是杏树小叶病的唯一病原。在我们的照片上，虽然能看到菌体上的缢痕，但看不到明显的二均分裂现象，这可能与其所处的发育阶段有关。

关于病原物的致病性、传染性、病原的分类地位及病害的诊断等方面的研究工作，目前正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Hopkins, D. L.: *Ann. Rev. Phytopathol.*, 15: 227—294, 1977.
- [2] Behncken, G. M. et al.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 29: 137—146, 1976.
- [3] Hirumi, H. et al.: *Phytopathology*, 64: 581—582, 1974.
- [4] Klein, M. et al.: *ibid.*, 66: 564—569, 1976.
- [5] Markham, P. G. et al.: *Ann. Appl. Biol.*, 81: 91—93, 1975.
- [6] Windsor, I. M. et al.: *Phytopathology*, 63: 44—46, 1973.
- [7] Windsor, I. M. et al.: *ibid.*, 62: 1112 (abstr), 1972.
- [8] Windsor, I. M. et al.: *ibid.*, 63: 1139—1148, 1973.
- [9] Nienhaus, F. et al.: *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 83: 309—316, 1976.
- [10] Nienhaus, F. et al.: *ibid.*, 83: 641—646, 1976.
- [11] Ulrychova, M. et al.: *Phytopath. Z.*, 82: 254—267, 1975.
- [12] Vanck, G. et al.: *ibid.*, 87: 224—230, 1976.
- [13] Petzold, H. et al.: *ibid.*, 78: 170—181, 1973.
- [14] Ploaie, P. G.: *Proc. 2nd Int. Congr. Plant Pathol. No. 643*, 1973.
- [15] Küppers, P. et al.: *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 82: 183—187, 1975.
- [16] Steiner, K. G. et al.: *ibid.*, 84: 345—351, 1977.

RICKETTSIA-LIKE ORGANISMS ARE THE CAUSAL AGENTS OF APRICOT LITTLE LEAF DISEASE IN CHINA

Shi Chunlin Xie Jiayi Yang Xicai

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Liu Xuewen

(Beijing Station of Forest Protection, Beijing 100029)

A new disease of apricot (*Prunus armeniaca* L.), called little leaf disease, is described, which has so far been found only in China.

Electron microscopic examination of ultrathin sections of the mid-veins of leaves from naturally infected apricot trees revealed the presence of Rickettsia-Like Organisms (RLO) in the phloem cells of infected plants. These organisms are oval or rod-shaped bodies, measuring about 0.2—0.5 μm in diameter and 1.0—2.5 μm in length. They are bounded by a double membrane: the slightly rippled cell wall and the smooth cytoplasmic membrane. In transverse sections, these organisms are oval shaped bodies. The internal structure, consisting of ribosomes and a nuclear region with DNA-like strands. In longitudinal sections, the organisms are rod-shaped bodies, and rounded at the ends. No such organisms were ever found in tissues of healthy plants.

Penicillin treatment of infected apricot trees with severe symptoms showed complete recovery from little leaf disease indicate that the Rickettsia-Like Organisms seen by electron microscopy is the causal agent of Apricot little leaf disease.

Key words Rickettsia-Like Organisms; *Prunus armeniaca* L.; Little leaf disease

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

1. 健康杏树； 2. 有小叶病状的杏树； 3. 杏韧皮细胞有若干具波纹状胞壁的 RLO($\times 40000$)。

图 版 II

4. 杏中脉韧皮横切片中的 RLO($\times 60000$)； 5. 杏中脉韧皮纵切片中的 RLO($\times 18000$)。

Plate I

1. A healthy apricot plant; 2. An apricot plant with little leaf symptoms; 3. An apricot phloem cell showing many RLO with rippled wall. CW(cell wall).

Plate II

4. RLO in transverse section of phloem in an apricot mid-vein. CW (cell wall), S(DNA-like Strands), R(ribosome-like particles), DM(a double membranes); 5. RLO in longitudinal section of phloem in an apricot mid-vein. CW(cell wall).