

桑萎缩病的类菌原体病原物及其 超微病变特征*

徐均焕 冯明光 朱家新** 商哈武***

(浙江农业大学生物科学系 杭州 310029)

摘 要 对感染桑萎缩病的桑叶及嫩梢进行超薄切片的电镜观察发现,其韧皮部组织,筛管及伴胞内有多型性类菌原体。菌体为圆形及椭圆形,大小约为 50~160nm,双层膜,厚度约为 8~10nm,内含物中具有核质样的纤维状物质,而在健株叶梢中未观察到任何病原体。随着病害的发展,可观察到细胞成份的降解。第一,在感病植株叶肉细胞内存在部分细胞核的降解、核膜破裂或核质流失甚至核仁分散消失。第二,叶绿体内有不同程度的淀粉粒和嗜银颗粒累积,部分叶绿体外膜破裂,基质流失,基粒降解。第三,线粒体及粗面内质网在数量上有所增加,部分线粒体嵴已降解。

关键词 桑萎缩病,诱因,类菌原体,透射电镜观察

分类号 Q939[.95]

桑萎缩病是日本和我国蚕桑区一种重要的桑树病害。我国的桑萎缩病有三种病型,即黄化型、萎缩型、花叶型^[1]。黄化型萎缩病在全国多数桑园发生较为严重,后二种则在浙江省分布较多^[2]。近年来,由于大量的桑苗调运,桑萎缩病的发病率有上升趋势。据我们对浙江丽水、桐乡、海宁、兰溪等桑园的调查,一般发病率在 10%~30%,个别严重的地块发病率高达 80%~90%,严重影响蚕叶的产量和质量,给养蚕业带来较大的损失。早期对此病的研究偏重于剪伐、栽培、土肥营养等因素与病害发生的关系方面。自 1967 年土居养二在病桑新梢韧皮部筛管细胞的超薄切片中观察到类菌原体以来^[3],国内也对桑萎缩病原进行了研究^[2,4],同时对发病流行规律也作了大量的调查,明确了传病机制^[5]。但是,有关该病的病原国内至今还有许多争议,为此我们对浙江省主要病区的病原情况进行了调查,现将引起该病病原的类型及细胞超微结构病变的研究报道如下。

1 材料和方法

1.1 样品采集

取自浙江桐乡桑园中典型发病的桐乡青品种,分别采集桑苗和成桑的新梢及不同叶龄的叶片及茎韧皮组织,进行超薄切片观察分析,取健康植株的相同部位作对照。

* 国家杰出青年科学基金资助

** 浙江省畜禽防疫检疫站,杭州 310004

*** 浙江省植物检疫站,杭州 310016

收稿日期: 1996-08-23

1.2 电镜样品的制备及观察

将新鲜的病健叶脉及茎韧皮部组织切取 1mm 大小的长条, 迅速置于 pH 7.0 的 0.1mol / L PBS 缓冲液冲洗干净, 然后用常规的戊二醛、四氧化锇双重固定, 丙酮系列脱水, Epon 812 渗透、包埋、聚合, 再用 Reichert-Jung ULTRACUT E 型超薄切片机切片, 以醋酸铀和柠檬酸铝双染色, 在日产 JEOL-1200EX 型透射电镜下观察。

2 结果和分析

2.1 症状描述

发病初期枝叶顶端的桑叶变小, 叶脉变细, 叶色稍黄, 叶面皱缩, 节间稍变密。随着病情加重, 腋芽萌发, 生出一些细小的丛生侧枝, 侧枝节距特短, 叶序乱, 叶质粗硬, 叶背的细脉变为褐色, 无花梗。病情进一步发展, 叶片显著变小, 枝条瘦小徒长, 呈帚状, 最后整株枯死。为典型的桑萎缩型萎缩病症状。

2.2 病原体形态

在病株叶脉的超薄切片中, 发现韧皮部的筛管、伴胞和薄壁细胞中均有大量的类菌原体样的病原体存在。该病原体呈不规则的圆形或椭圆形, 大小为 50~160nm, 内含物中有核质似的纤维状物质。有的病粒子电子密度较大(图版 I-1, 箭头所示), 有的呈仅有外膜及少量内容物的空泡型(图版 I-2)。细胞质膜为明显的双层膜, 厚度约为 8~10nm。有些病原似哑铃状处于二均分裂阶段(图版 I-2, 双箭头所示)。而健康桑的相同部位均未见上述类菌原体样的病原体。

2.3 细胞病理变化

受病原体侵染的病株叶脉、韧皮部的薄壁细胞及叶肉细胞中, 常发现细胞核、叶绿体及线粒体结构的改变和部分细胞成分的降解。细胞核的降解如细胞核外膜破裂, 核质流失(图版 I-4), 核仁分散(图版 I-5), 部分核仁降解甚至消失等(图版 I-6)。叶绿体的破坏也很严重, 叶绿体内有不同程度的淀粉粒和嗜锇颗粒的积累, 部分叶绿体外膜破裂(图版 II-7), 基质流失, 最后基粒不规则分散并降解(图版 II-8)。线粒体的变化没有叶绿体明显, 但有不同程度的增多(图版 II-9), 部分线粒体内嵴膨胀并开始降解(图版 II-10)。另外, 粗面内质网在数量上也有所增加(图版 I-3), 而在健康材料相同部位的超微结构观察中没有发现上述变化。

3 讨论

由于桑萎缩病可以通过传毒昆虫凹缘菱纹叶蝉(*Hishimonus sellatus*)和拟菱纹叶蝉(*Hishimonoides sellatiformis*)及嫁接法等传染, 故早期关于桑萎缩病的病原体有生理障碍及病毒病两种观点^[6]。自从土居养二等在病桑树新梢韧皮部筛管细胞的超薄切片观察到一类不均一的质粒类菌原体后, 类菌原体病原的学说得到了普遍的认同^[3]。目前, 至少已在 40 多种植物病害特别是黄化型的患病组织中观察到有类菌原体的存在。

我们在对病桑叶片及茎韧皮部超薄切片的电镜观察中, 发现在筛管细胞中存在有典型的具双层膜的菌原体, 粒子大小 50~160nm, 双层界膜清楚, 厚度约为 8~10nm, 内部充有核质样的纤维状物质和类似核蛋白体的颗粒。这与土居养二等报道的类菌原体相似^[3],

但形状较后者小得多(后者为 80~800nm), 与国内报道的桑黄化型萎缩病病原体也小得多, 后者为 250~800nm^[4]和 200~500nm^[7], 但双层壁厚度基本相近。从病原粒子大小看, 桑萎缩型萎缩病要比黄化型明显的小, 但是否属两种不同类型的病原, 还有待作进一步研究。另外, 在观察中未发现与病毒复合感染的现象。

植物感染病毒病后常观察到叶绿体及线粒体等细胞器的变化^[8], 如叶绿体内在淀粉粒和嗜锲颗粒积累, 叶绿体破坏降解及线粒体数量增多等变化。桑树感染类菌原体后, 内部细胞组织及超微结构也发生显著的变化。在超微结构上, 由于同化淀粉在病叶中运输受阻, 在叶绿体中可观察到大量的淀粉粒积累。又由于代谢中多元酚的大量积累, 在叶绿体内还观察到有较多的嗜锲颗粒的累积, 且感染类菌原体后因呼吸作用的增强而使细胞内线粒体的数量有较多的增加, 这些与病毒感染后的超微病变相类似。但是, 在感染类菌原体的细胞超微结构中常发现细胞核破坏较为严重, 如细胞核外膜破裂, 核质流失, 核仁分散甚至消失。这些现象在病毒感染的植物细胞内很少见到, 实为类菌原体所特有。

参 考 文 献

- [1] 龘元章. 蚕业科学, 1965, 3: 205~218.
- [2] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组, 浙江省农业科学院蚕桑研究所病虫害组. 中国科学, 1974, 3: 292~294.
- [3] 土居养二, 寺中理明, 与良清等. 日本植物病理会报, 1967, 33: 259~266.
- [4] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组, 江苏省蚕业研究所桑树保护组. 中国科学, 1974, 3: 283~291.
- [5] 范怀忠, 赖文姜, 陈鼎新等. 植物病理学报, 1964, 7(2): 152~156.
- [6] 中国农业科学院蚕业研究所. 中国植物保护科学, 1961, 3: 1064~1072.
- [7] 陈培根, 龘元璋, 夏志松. 蚕业科学, 1996, 22(1): 5~8.
- [8] 徐均焕, 李德葆, 盛方镜等. 中国病毒学, 1996, 11(1): 61~68.

ULTRASTRUCTURES OF A MYCOPLASMA-LIKE ORGANISM CAUSING MULBERRY DWARF DISEASE

Xu Junhuan Feng Mingguang Zhu Jiaxin Shang Hanwu

(Department of Biological Sciences, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract The pathogen causing the dwarf disease of mulberry in Tongxiang, Zhejiang Province was investigated based on transmission electronic microscopy of the leaf vein of diseased plants collected in the field. A mycoplasma-like organism was identified in the sieve tube, companion, and parenchyma cells of the phloem tissues infected. The organism was spheric or oval in shape, ranging from 50nm to 160nm in diameter, and with bilamina unit membrane of 8~10nm in thickness, and was filled with nuclear strands or fibrous material. Some nuclei of mesophyll cells in the diseased leaves were found disrupted as their nuclear membrane was broken, followed by loss

of nucleocytoplasmic matrix and dispersive disappearance of nucleoli. Furthermore, other ultrastructural aberration including depletion of chloroplast stroma, disruption of chloroplast grana, increase of mitochondria and rough endoplasmic reticulum, and discomposition of some mitochondrial cristae were also observed associated with the pathological changes caused by the mycoplasma-like organism. In contrast, this type of organism was not found in healthy plants examined. Thus, the mycoplasma-like organism is likely to be a pathogen attributable to the mulberry dwarf disease.

Key words Mulberry dwarf disease, Causal factor, Mycoplasma-like organism, Transmission electronic microscopy

图版说明

Explanation of plates

图版 I

1. 聚集在叶脉韧皮部薄壁细胞中的多型性类菌原体; 2. 类菌原体聚集成堆游离到细胞内; 3. 受类菌原体感染的叶肉细胞内的粗面内质网及高尔基体; 4. 受类菌原体感染的叶肉细胞内细胞核膜破裂; 5. 受类菌原体感染的叶肉细胞内细胞核基质流失; 6. 受类菌原体感染的叶肉细胞内细胞核仁消失。图 1~2 标尺: 0.1 μ m; 图 3~6 标尺: 1.0 μ m。

图版 II

7. 受类菌原体感染的叶肉细胞内叶绿体膜破裂, 叶绿体内有嗜钨体及淀粉粒的积累; 8. 受类菌原体感染的叶肉细胞内叶绿体基质流失, 基粒降解; 9. 受类菌原体感染的叶肉细胞内线粒体数量增多; 10. 受类菌原体感染的叶肉细胞内线粒体嵴降解。图 7~9 标尺: 1.0 μ m; 图 10 标尺: 0.3 μ m。My——类菌原体; CW——细胞壁; Mt——线粒体; Nu——细胞核; Ch——叶绿体; Er——内质网; Gb——高尔基体; S——淀粉粒; Os——嗜钨颗粒。

Plate I

1. Mycoplasma-like organism (MLO) in the parenchyma cells of the leaf vein of mulberry plants infected with mulberry dwarf disease; 2. MLO concentrated at the cytoplasm of sieve cells; 3. The rough endoplasmic reticulum and Golgi body of MLO-infected mesophyll cells; 4. Breakup of nuclear membrane in MLO-infected mesophyll cells; 5. Disappearance of nucleocytoplasmic matrix in MLO-infected mesophyll cells; 6. Disappearance of nucleoli in MLO-infected mesophyll cells. Bars 1~2: 0.1 μ m; Bars 3~6: 1.0 μ m

Plate II

7. Chloroplast membrane broken in MLO-infected mesophyll cells; 8. Chloroplast stroma disappearing in MLO-infected mesophyll cells; 9. Increase of mitochondria in MLO-infected mesophyll cells; 10. Disruption of mitochondrial cristae in MLO-infected mesophyll cells. Bars 7~9: 1.0 μ m; Bar 10: 0.3 μ m. My: mycoplasma-like; CW: cell wall; Mt: mitochondria; Nu: nuclear; Ch: chloroplast; Er: endoplasmic reticulum; Gb: Golgi body; S: starch grains; Os: osmiphilic globules.