

# 应用电子显微镜技术 检测云南省烟草病毒病原

USING TECHNIQUE OF ELECTRON MICROSCOPY DETECTING  
THE PATHOGENS OF YUNNAN TOBACCO VIRUS DISEASES

张仲凯 李彦刚 方琦 梅文泉 李云海

(云南省农科院测试中心)

Zhang Zhongkai Li Yangang Fang Qi Mei Wengquan Li Yunhai

(Testing and Analysis Centre, Yunnan Academy of Agricultural Science)

**摘要** 应用负染色,超薄切片等电镜制样技术,结合病毒分离提纯方法,对云南省各烟区烟草病毒病植株及马铃薯病毒病植株进行了电镜检测分析,观察到五种类似烟草病毒病原的分离物。从烟草花叶病叶中检测出类似烟草花叶病毒(TMV)及黄瓜花叶病毒(CMV)的分离物,从烟草蚀纹病叶中检测出类似烟草蚀纹病毒(TEV)的分离物,在马铃薯小叶病叶及蓝叶病叶中检测出类似马铃薯病毒Y(PVY)、烟草脆裂病毒(TRV)的分离物。首次从形态学上证实了上述病原或病原所属组成员在这一地区的存在。

**关键词** 电子显微镜技术;烟草病毒病原

**Key words** Technique of electron microscopy; The pathogens of tobacco virus diseases

烟草是云南省重要的经济作物,长期以来,病毒病在云南烟草生产中造成严重的产量和质量损失<sup>[1]</sup>。由于对病毒病缺乏系统的、准确的诊断和鉴定,无法采取针对性较强的防治措施,使得云南省烟草病毒病未能有效地控制。本试验应用电子显微镜技术,从1990年6月份至1991年8月份对类似病毒病的云南各烟区烟草病植株及马铃薯病植株进行了系统的电镜观察,发现了类似烟草病毒病原的五种不同形态的分离物,这些结果在本地区还是首次报道,对于这一地区生产中的防治和病毒病原的研究具有一定的参考价值。现将结果初步报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 烟草花叶病叶 症状表现有两种:(1)大面积块状退绿斑,采自澄江、玉溪、曲靖等地发病烟田中。(2)脉间花瓣状花叶,采自建水路南等地发病烟田中。

1.1.2 烟草脉斑病叶 采自通海等地发病烟田中,沿叶支脉的小脉有褐色坏死小斑块,植株矮化。

1.1.3 烟草蚀纹病叶 采自建水烟地中,叶脉间有不规则的线状、环状灰褐色坏死蚀刻线,内有小的不规则坏死环。

1.1.4 马铃薯小叶病叶 采自会泽马铃薯苗圃中,叶细小,向内卷曲。

1.1.5 马铃薯蓝叶病叶 叶发蓝,植株顶部叶平长,采自会泽马铃薯苗圃中。

### 1.2 方法

1.2.1 待测毒源制备 按相应的症状,仿文献<sup>[2]</sup>中的方法进行粗提纯及粗汁液制备。

1.2.2 电镜样品制备 仿文献<sup>[1,2,4]</sup>中方法,制备粗提纯液负染、粗汁液负染及超薄切片样品。

## 2 结果与分析

比较磷钨酸、钼酸铵等负染效果,发现2%钼酸铵(pH6.0)效果较好。超薄切片采用2.5%戊二醛前固定,1%OsO<sub>4</sub>后固定,醋酸铀前染,柠檬酸铅后染。制备样品置100CX-I型JEM透射电子显微镜下观察。

### 2.1 烟草花叶病叶

2.1.1 大面积块状退绿斑 经粗汁液负染和超速离心粗提纯液负染,都观察到了大量的杆状粒体,大小约300 nm×18 nm,可见明显芯线,与烟草花叶病毒(TMV)相似,见图版A:聚集成线状一束状的粒体(粗提纯液),60 000×;图版B:单个的分散的杆状粒体(粗提纯液),60 000×。

2.1.2 脉间花瓣状花叶 经粗汁液负染观察,发现大量的球形分离物,直径约25~30 nm之间,病株叶片反卷,叶柄狭长,根据症状和主要分离物形态,类似黄瓜花叶病毒(CMV),CMV是烟草花叶病的重要病原之一,见图版C,↑所指为主要的球形分离物,60 000×。

### 2.2 烟草脉斑病叶

经粗汁液及粗提纯液负染观察到弯曲的长线条状粒体。通过超薄切片观察,在细胞质的微体中有结晶体,结晶体由长约700 nm左右的线状粒体密集排列而成,有可能是烟草脉斑病病原马铃薯病毒Y(PVY)的聚集体。

### 2.3 烟草蚀纹病叶

经粗汁液负染观察,发现有较多的线状粒体,约720 nm×11 nm左右,与烟草蚀纹病毒(TEV)相似,见图版D:60 000×,方框中为单个线状粒体,75 000×。

### 2.4 马铃薯小叶病叶

经粗汁液负染观察,有大量的线状粒体,约700 nm×11 nm左右,见图版E:30 000×。参照有关文献<sup>[5]</sup>,这类粒体可能就是PVY,PVY也是烟草病毒病的重要病原之一。

### 2.5 马铃薯蓝叶病叶

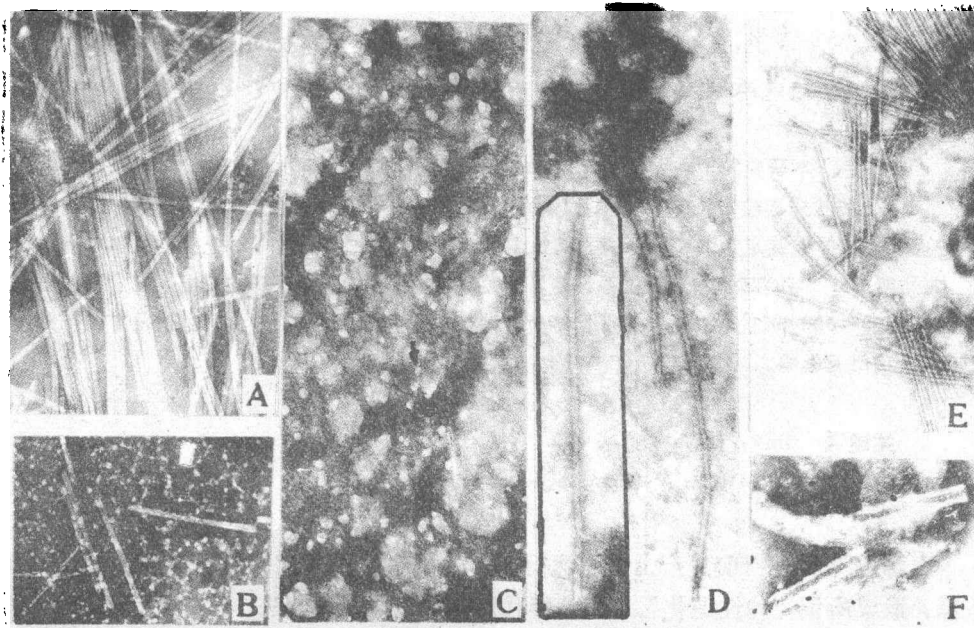
经粗汁液负染观察,该样品中主要分离物为一种短杆状粒体,芯线较粗且明显,长度有不同程度的变化,同时分离物中还有一些球形颗粒存在。参照文献<sup>[5]</sup>进行分析,这类分离物有可能是烟草脆裂病毒(TRV)。图版F为短杆状分离物的一种,60 000×。

从电镜观察的结果结合症状进行分析,在云南省烟区存在着TMV,CMV,PVY,TEV及TRV或其所属组成员中烟草的病毒病原。电镜观察的分离物粒体形态还不能作为诊断的唯一依据,但它可以克服粗泛的症状诊断及血清反应中的假阳性反应,检测的灵敏度也较普通酶联免疫反应为高,同时可为深入鉴定和研究病毒病原提供直观的依据。根据初步调查及电镜观察的结果,可推测TMV,CMV,PVY是云南省烟草病毒病的主要病原,其中,以CMV造成的产量和质量损失最为严重。

## 参 考 文 献

- 1 田波,裴美云.植物病毒研究方法.北京:科学出版社,1987
- 2 朱丽霞等.生物学中的电子显微镜技术.北京:北京大学出版社,1983

- 3 杨铭等. 云南烤烟病害普查报告. 云南烟草科技 1987, 2
- 4 洪涛等. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 北京: 科学出版社, 1984.
- 5 Hooker W J. Editor Compendium of Potato Diseases. The American Phytopathological Society, 1981.



图版 各种分离物粒体形态

A. 烟草花叶病杆状病毒; B. 单个分散的烟草花叶病杆状病毒 60 000 $\times$ ; C. CMV 病毒 60 000 $\times$ ; D. 烟草蚀纹 TEV 病毒 60 000 $\times$ ; E. 马铃薯小叶病病毒 30 000 $\times$ ; F. 烟草脆裂病毒 (TRV) 60 000 $\times$