

柑桔黄龙病的直接荧光诊断法

吴世盘

(广东省柑桔黄龙病研究小组)

提 要

试验证明,直接荧光诊断法是诊断柑桔黄龙病的一种快速、简便、准确的方法。

将健叶和黄龙病叶叶柄用保险刀片徒手切片,在透射式荧光显微镜下检查,可看到健叶叶柄的木质部导管细胞壁发黄色荧光,韧皮纤维细胞发绿色荧光,而病叶叶柄韧皮部中有1~多个鲜明的黄色或黄绿色荧光团块。这种特异性的荧光,在健叶柄韧皮部中是没有的,其它由病毒、类病毒、细菌、真菌等病原引起的病叶柄韧皮部中亦没有此种特异性荧光。

关键词: 诊断; 荧光; 菌原体; 坏死; 病毒; 黄龙病

前 言

黄龙病曾于1965年由中央农业部正式列为检疫对象,但迄今仍缺乏一种快速准确的检测手段,对于本病的鉴定,最通常的是根据黄龙病表现的特异性症状^[1],但是只凭外部症状,常发生所谓真假黄龙病之争。亦有人主张用指示植物鉴定或电子显微镜检查,但均有其局限性,目前在实际工作中尚难广泛应用。因此,研究一种简便的、准确性高的检疫方法无疑是非常需要的。据难波成任等(1981)报道,用落射式荧光显微镜可以直接检查出局限于韧皮部的由病毒和类菌原体引起的多种病害,包括由病毒引起的柑桔衰退病(Tristeza),他们把这方法称为直接荧光诊断法。本文是应用透射式荧光显微镜检查柑桔黄龙病的初步报告。

材 料 和 方 法

取田间表现新梢叶片均匀黄化或叶片表现斑驳症状的病接穗,嫁接于防虫网室内培育的椪柑(*Citrus reticulata* Blanco)、甜橙(*C. sinensis* (L.) Osbeck.)、葡萄柚(*C. paradisi* Macf.)、酸桔(*C. sunki* Hort. ex tan)、等的实生苗上,待表现症状后,取病叶徒手切片观察。

衰退病材料系由中国农科院柑桔所赵学源副所长惠赠,病株是用桔蚜传毒后所得。裂皮病(Exocortis)树材料则由该所李学柱副研究员惠赠,采自该所果园。

此外,还在广州市郊一些果园中采黄龙病病叶样品检查测定。

* 本文承蒙范怀忠教授审阅,本校电镜室章潜才同志拍摄照片,全国植保总站钱菊梅同志对此项工作给予支持,谨此致谢。

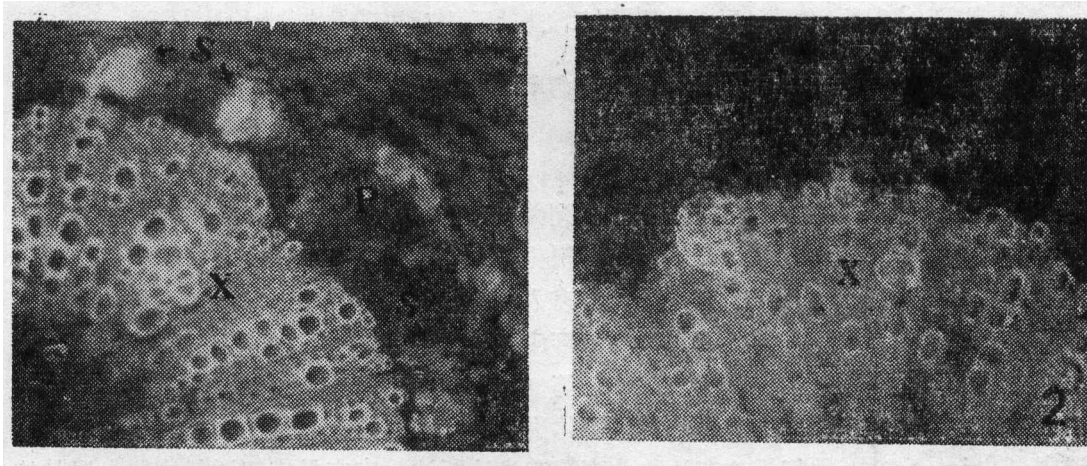
1986年6月25日收稿

为了了解其它由真菌、细菌等病原引起的病害是否有类似的反应,亦按同样方法进行检查。

将健叶和病叶叶柄用刀片进行徒手切片,切片置蒸馏水中,挑取质量较好的切片,置载玻片上,用蒸馏水封藏镜检,在Vanox万能显微镜AH—FL—2型透射式荧光装置上进行观察(激励片BG₁₂,滤光片O₅₃₀)。

试验结果

健叶和病叶叶柄切片在荧光的激发下,发出本身的自发荧光,在荧光显微镜下观察,可看到木质部导管胞壁发黄色荧光,韧皮纤维发绿色荧光,但感染黄龙病的病组织切片,在韧皮部中则可到1~多个鲜明的黄色或黄绿色荧光团块,而此种特异性的黄色荧光在健组织韧皮部中均没有发现(图1、图2)。



X—木质部

P—韧皮部

S—特异性荧光

图1 甜橙黄龙病叶叶柄切片,图中箭号所指为韧皮部中的特异性黄色荧光。

图2 甜橙健叶叶柄切片,韧皮部中无特异性荧光。

镜检的结果表明:椪柑实生苗病叶柄为5/5(分子表示检出特异性荧光的样品数,分母表示检查样品数,以下同),对照为0/5;葡萄柚实生苗病叶柄为10/10,对照0/5;酸桔实生苗健叶柄为0/4,(病株未测),田间甜橙大树病叶柄为25/25,对照为0/20,以上共检查40个病样品,都在病韧皮部中检出特异性黄色荧光,检出率100%,而在对照的34个健株样品中却都没有检出特异性荧光。

柑桔在自然条件下常并发多种病毒病或类似病毒病,在我国已查明黄龙病树和外观“健康”的树,常有衰退病毒的侵染,且发病率相当高。此外,在有些地方还发现有裂皮病,但用这两种病害的病叶切片观察,在韧皮部中均未发现特异性黄色荧光,检出结果为:葡萄柚衰退病叶柄0/4,四川锦橙裂皮病叶柄0/4。

在广东的果园中,尤其是苗圃中经常可发现一些缺素症的树苗,与黄龙病的后期症状很相似,采集这些缺锌(甜橙病叶0/4)、缺镁症状(甜橙病叶0/2)的病叶切

片,亦未发现韧皮部中有此种特异性黄色荧光,但用黄龙病后期表现缺锌症的病叶切片,则可检出特异性荧光10/10。

此外,作者还观察了广州一些果园中常发生的溃疡病(甜橙病叶0/2)疮痂病(柠檬病叶0/2)、脂斑病(蕉柑病叶0/2)等由细菌、真菌引起的病叶切片,亦未发现特异性荧光。

上述结果说明,用透射型荧光显微镜诊断黄龙病不但方法简单、快速、而且特异性高,检查过50个标样结果全部阳性,准确率达100%。

特异性的黄色荧光不但在病梢上的病叶中可检出,与病梢同一枝条,位于枝条下端的“健叶”和与病梢分枝的外观正常的“健”梢上亦可检出(6/6),但在病梢下方相距15公分处的“健”梢上却观察不到此种特异性荧光(0/4)。

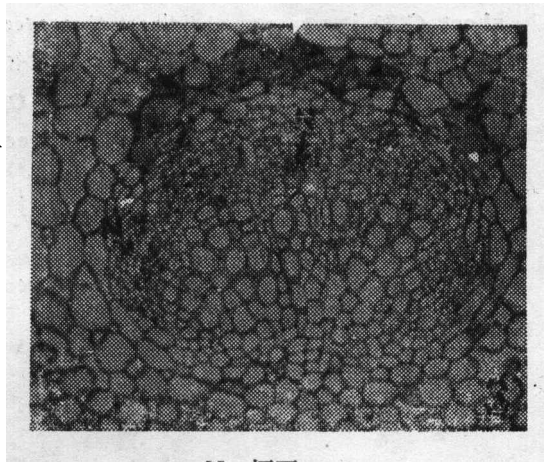
采样检查时,必须采取充分成熟的叶片,刚抽出来的病株嫩梢检查不到特异性荧光(0/2),同一株病树,秋梢叶片检查结果明显,但春梢叶片(0/4)和花柄(0/2)却检查不出来。

讨 论

难波成任等(1981)²曾对多种由病毒引起的病害,包括柑桔衰退病进行切片观察,均在韧皮部内发现有此种特异性荧光,而作者却没有观察到这种荧光,这个差异的存在是否由于荧光显微镜的性能引起,抑或其它原因,尚待研究。

据报告²,病叶韧皮部中观察到的特异性黄色荧光,是一群坏死细胞,根据作者的切片观察(未发表),柑桔感染黄龙病后,常引起病叶韧皮部细胞的坏死(图3),这与柑桔青果病的情况相类似³,可以认为黄龙病叶柄中观察到的特异性荧光团块,乃是一群坏死细胞。

虽然本法对诊断黄龙病树,以区分由于其它原因引起的黄化是可行的,结果也是准确的,但取样必须是完全老熟的黄化叶片,而且以病秋梢的结果最稳定。嫩梢、嫩叶因未产生坏死细胞,故检查结果阴性。已感染黄龙病但尚未表现症状的叶片,也由于同样原因而无法检出,而这也正是下一步工作中需要研究解决的问题。



N—坏死
图3 甜橙病叶脉切片

引用文献

- [1] 林孔湘, 柑桔黄龙病问题的讨论, 《柑桔科技通讯》, (3-4) 1977, 28~38.
- [2] 难波成任、山下修一、土居养二、奥良清, 萎黄型ウイルス病およびマイコプラズマ病感染植物の直接蛍光診断法 (DFD法), 《日本植物病理学会報》, 47, 1981, 258~263.
- [3] Schneider, H, Anatomy of greening-diseased sweet oranges shoot. *Phytopathology* 58, 1968, 1155-1160.

DIRECT FLUORESCENCE DETECTION METHOD FOR
DIAGNOSING CITRUS YELLOW SHOOT DISEASE

Wu Shihpan

(Citrus Yellow Shoot Study Group of Guangdong Province)

ABSTRACT

This article outlines a rapid simple and reliable method for diagnosing citrus yellow shoot (YS) it was named "direct fluorescence detection method". Thin leaf section were prepared from fresh tissues of YS-infected and healthy citrus plants, when observed under a fluorescence microscope (Type, Olympus AH-FL-2), a yellow fluorescence was distinctly observed in the YS-infected phloem tissues and not in the phloem tissues of healthy plants and of those infected with tristeza, exocortis, canker, scab, greasy spot, Mg and Zn deficiency.

Key words, diagnosis, Fluorescence, Mycoplasma, necrosis, virus, yellow shoot