

龙眼鬼帚病的研究\*  
Ⅲ. 病毒病原的确认

陈景耀 柯冲 叶旭东

(福建省农科院果树研究所, 福州 350003)

李开本

(福建农科院植保研究所, 福州)

S436.67

A

**提要** 应用 500、1500 单位人体注射用的盐酸四环素和青霉素 G 钾浸渍处理龙眼鬼帚病苗, 均无抑制病状表现, 表明本病不是由 MLO 和 BLO 引起的; 电镜观察仅在病叶组织筛管细胞内见到成束分布在细胞质内的线状病毒粒体; 通过 A 蛋白-免疫电镜检测, 亦可在龙眼鬼帚病介体昆虫荔枝蜡 (*Tessaratoma papillosa* Drury)、龙眼角颊木虱 (*Carnegeomycesylla sinica* Yang et Li) 唾液腺内捕获到与病叶组织相同的病毒粒体, 从而进一步肯定本病病原的病毒性质。

**关键词** 龙眼, 鬼帚病, 病毒

早在 50 年代初, 李米荣就根据龙眼鬼帚病可通过嫁接和种子传病的侵染性, 认为该病由病毒引起<sup>[1]</sup>。1972 年 Vera So 等人首次报道通过电镜观察在病叶组织内看到线状病毒粒体<sup>[2]</sup>。此后, 一些学者曾从事这方面的研究, 均未能从病组织内找到上述病毒粒体, 从而引起学术界对该病原性质的不同看法。为弄清这个问题, 我们自 1986 年以来, 开展了病原研究, 取得重要进展, 发表了初步研究结果<sup>[3-4]</sup>, 本文是此项工作的进一步研究结果。

## 材料与方 法

## 1 药物处理病苗试验

1.1 供试药物与病苗来源: 盐酸四环素(25 万单位/支)和青霉素 G 钾(40 万单位/支)均为人体注射用针剂。龙眼鬼帚病苗系虫传或种传的实生苗。

1.2 处理方法: 将供试病苗的叶、梢轻度修剪后在四环素 500、1500 单位和青霉素 5000 单位水溶液中浸泡处理 4 小时, 取出用清水冲洗, 移植于盛有水稻土的盆钵中, 每处理供试病苗 4-6 株。设清水处理作对照。上述处理均在防虫网室内进行。

2 病原电镜观察 取虫传和田间病叶叶脉按常规方法用戊二醛、锇酸双固定, 系列酒精和环氧丙烷脱水, 经 Epon812 渗透、包埋, 用 LKB-V 型切片机制备的超薄切片, 经柠檬酸铅、醋酸铀双染后在 JEM-100C<sup>x</sup> II 电镜下观察。

本文于 1993 年 2 月 25 日收到, 9 月 9 日修回

\* 本研究系福建省科委重点研究课题

3 A 蛋白免疫电镜检测龙眼鬼帚病介体昆虫唾液腺内的病原 供试介体昆虫为荔枝蚜 (*Tessaratona papillosa* Drury) 和龙眼角颊木虱 (*Corneolancepsylla sinica* Yang et Li), 分别饲毒 8—15 天。喷碳铜网 100 $\mu$ g/ml A 蛋白包埋。冲洗后漂于 20 $\mu$ l 1% 抗血清半小时, 在蒸馏水中冲洗后使用。取介体昆虫荔枝蚜(成虫)和龙眼角颊木虱(成虫)唾液腺置于 15 $\mu$ l PBS 中压碎, 将用抗血清包被的铜网漂于其上 1 小时。蒸馏水充分洗后用 2% 醋酸铀染色后在 JEM-100C $\times$  I 电镜下观察。

## 结 果

### 1 药物处理疫苗试验

1986—1988 年两次进行四环素和青霉素浸渍处理疫苗试验, 结果(见表 1)表明, 采用 500、1500 单位盐酸四环素和 5000 单位青霉素 G 钾处理疫苗, 均无抑制病状的表现。

### 2 病原电镜观察

我们多次取虫传和田间病株的不同器官组织制成超薄切片, 在电镜下观察, 仅从病叶组织的筛管细胞内见到成束分布在细胞质内的线状病毒粒体(图 1), 而健叶组织内未发现类似的病毒粒体。

表 1 四环素、青霉素处理龙眼疫苗试验(1986—1988 福州)

Tab. 1 Experiment on the longan seedlings with witches' broom disease immersed in the solutions of tetracycline-HCl and penicilin-GK

处理时间 (年、月、日)	处理浓度 Treatment concentrations	供试株数 Tested plants	成活株数 Living plants	现症株数 Symptom- showing plants
	四环素 Tetracycline -HCl			
1986 4. 23	1500ppm	5	4	4
	青霉素 GK Penicilin-GK			
	5000ppm	4	3	3
	清水(对照) Water(ck)	4	4	4
	四环素 Tetracycline -HCl			
1988 6. 7	500ppm	6	2	2
	青霉素 GK Peniciline-GK			
	5000ppm	6	5	5
	清水(对照) Water(ck)	6	6	6



图1 A 成束分布在病叶筛管细胞质内的线状病毒粒子( $\times 30000$ )

Fig. 1 A The bundle of filamentous virus particles in the sieve cells of the diseased leaf ( $\times 30000$ )

图1 B 线状病毒粒子的横切面( $\times 60000$ )

Fig. 1 B The cross section of the filamentous virus particles ( $\times 60000$ )

### 3 A 蛋白-免疫电镜(SPA-ISEM)检测龙眼鬼带病传病介体昆虫体内的病原

免疫电镜检测结果,在8只龙眼角颊木虱中发现有4只和5只荔枝蝽中有2只均捕获到线状病毒粒子(图2),其形态与提纯或从病叶组织免疫电镜所捕获的病毒粒子相同<sup>[4]</sup>。

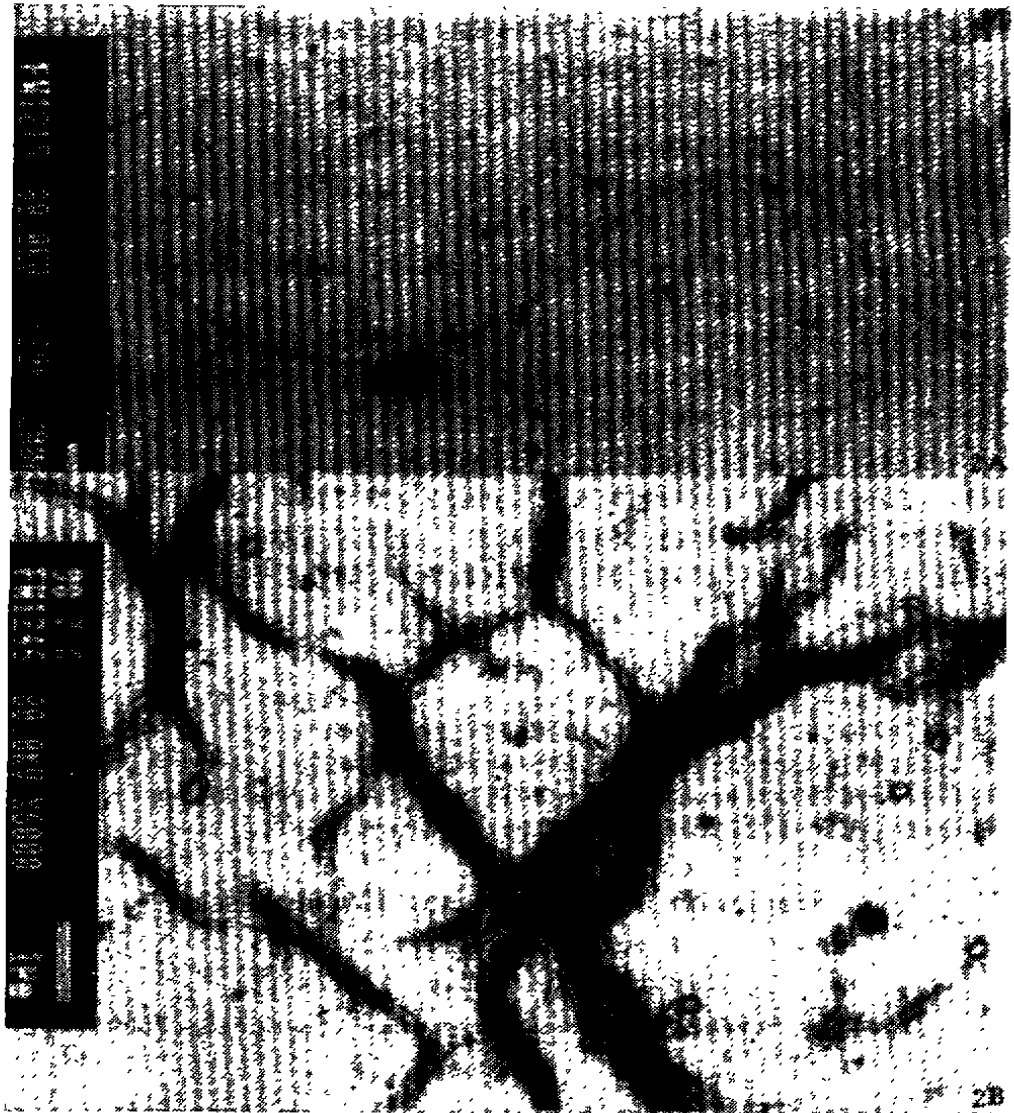


图 2 A 应用 A 蛋白-免疫电镜技术从龙眼鬼吊病介体昆虫——龙眼角颊木虱唾液腺中捕获到的线状病毒粒子( $\times 30000$ )

Fig. 2 A The filamentous virus particles trapped from salivary gland of *Corynephorus unicus* Yang et Li by SPA-TSEM ( $\times 30000$ )

图 2 B 应用 A 蛋白-免疫电镜技术从龙眼鬼吊病介体昆虫——荔枝蚜唾液腺中捕获到的线状病毒粒子( $\times 45000$ )

Fig. 2 B The filamentous virus particles trapped from salivary gland of *Tessaratona papillosa* Drury (adult) by SPA-ISEM ( $\times 45000$ )

## 讨 论

关于龙眼鬼帚病的病原性质,长期来存在分歧。虽然李米荣和 Vera So 等人分别根据其侵染性和电镜观察结果,提出该病是一种病毒病<sup>[1,2]</sup>,但以后的研究者因未能重复其电镜观察结果而提出异议。有的根据病树枝梢出现丛枝病状,便将此病划归由 MLO 引起的一类病害,有的病树枝梢看到蛀虫为害,就将此病与虫害联系在一起。本试验应用对 MLO 和 BLO 反应敏感的四环素、青霉素处理病苗,无抑制病状表现;多次病叶组织超薄切片的电镜观察,亦未发现类似 MLO 或 BLO 的多形态粒体;热处理(白天 40℃,晚上 30℃,2—3 个月)可抑制病状表现(未发表资料);种子带毒<sup>[3]</sup>和汁液摩擦不传病<sup>[5]</sup>等又明显区别已经报道的类病毒特征,由此可见,本病不是由 MLO、BLO 或类病毒引起的。

几年来我们多次对龙眼鬼帚病的介体昆虫进行饲毒传病,所获病株病状与田间病株的病状完全相同<sup>[4]</sup>;不仅直接从虫传或田间病株的病叶组织超薄切片见到与 Vera So 等人所报道的相似病毒形态,而且成功地从病组织提纯到大量大小为 300—2500×14—16nm、病毒亚基呈轮状排列的线状病毒粒体<sup>[4]</sup>;用介体昆虫荔枝瘿(成虫)唾液腺制成的超薄切片,在电镜下观察,找到其形态和结构类似于病叶组织所观察到的线状病毒粒体<sup>[6]</sup>;应用 SPA-ISEM 技术可从病叶组织<sup>[4]</sup>和介体昆虫唾液腺内捕获到病毒粒体。上述直接证据可以确认本病病原的病毒性。有关病原的进一步提纯,病毒粒体性质和抗血清研制等尚在进行中。

## 参 考 文 献

- 1 李米荣. 龙眼树病毒病害的初步研究. 植物病理学报, 1955, 1(2): 211—217
- 2 Vera So, S-X Zee. A new virus of longan (*Euphoria longana* Lam.) in Hong Kong. PANS, 1972, 18(3): 283—285
- 3 陈景耀, 柯冲, 叶旭东, 等. 龙眼鬼帚病的病原研究简报. 福建农业科技, 1989, (5): 42
- 4 叶旭东, 陈景耀, 柯冲. 从龙眼鬼帚病树提纯一种线状病毒. 病毒学报, 1990, 6(3): 284—285
- 5 陈景耀, 柯冲, 许长藩, 等. 龙眼鬼帚病的研究 II. 传病途径. 福建农科院学报, 1990, 5(2): 1—6
- 6 陈景耀, 许长藩, 李开本, 等. 龙眼鬼帚病的昆虫传病试验. 植物病理学报, 1992, 22(3): 245—249

## Studies on Longan Witches' Broom Disease

### III. Affirmance of Viral pathogen

Chen Jinyao Ke Chung Ye Xudong

(Institute of Pomology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003)

Li Kaiben

(Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou)

The results of longan seedlings with witches' broom disease immersed in the solutions of tetracycline-HCl (500, 1500ppm for four hrs) and penicillin-GK (5000 ppm for four hrs) showed that the symptom of the diseased seedlings were unable to be inhibited, which indicated that the disease was not caused by MLO and BLO. The bunchy filamentous viruses were found in the sieve cells of the diseased leaf under electron microscope, no virus particle were detected in healthy plant used as control. The virus particle similar to that existed in the diseased leaves can be trapped from the salivary glands of *Tessaratoma papillosa* Drury (adults) and *Cornegenapsylla sinua* Yang et Li (adults) by SPA-ISEM method. It is concluded that the virus particles are the causal agent of longan witches' broom disease.

**Key words** Longan, Witches' broom disease, Virus