

三種光學顯微鏡技術診斷 泡桐簇葉病之比較

王維洋 王涼綢

摘 要

野外採集具有簇葉病徵之罹病泡桐葉片，切下葉柄組織經過固定及徒手切片後，在螢光顯微鏡下，利用下列三種方法：篩管自發螢光觀察，登氏染色法及DAPI核酸螢光染色法，鑑定篩管內之病變情形，並與同樣方式處理過之無病泡桐種子苗葉柄組織切片相比對，以比較上述三種診斷技術之優缺點及準確度。結果顯示三種方法均可在罹病葉柄篩管內觀察到病變現象。由於老化或受昆蟲吸食之植物篩管內亦會產生自發螢光物質，故篩管自發螢光觀察法雖然最簡易可行但準確性較低。登氏染劑與DAPI螢光染劑均以核酸為染色對象故準確性較高，登氏染色法之染色時間較長，染色結果受切片厚度，切片角度及退染程度影響，有時不易判別罹病與否。DAPI螢光染色法過程簡易，染色時間短，染色結果辨認容易，故為最理想之泡桐簇葉病檢驗技術。

關鍵詞：泡桐簇葉病，篩管自發螢光，登氏染色法，螢光染色法。

王維洋、王涼綢 1988，三種光學顯微鏡技術診斷泡桐簇葉病之比較，林業試驗所研究報告報告季刊 4(1)：23—30

Comparison of three microscopic techniques in diagnosis of paulownia witches' broom disease

Wei-Young Wang Liang-Chou Wang

[Summary]

Petioles from leaves showing witches' broom symptom of *Paulownia taiwaniana* Hu et Chang collected in the field were fixed, free-hand sectioned and examined under light microscope equipped with a fluorescence apparatus. The following three methods were used to identify any visible abnormalities present in the phloem: sieve tube autofluorescence, Diene's stain, and DAPI fluorescence stain. Test results were compared with disease-free paulownia seedlings processed through the same procedure to determine the advantages, disadvantages and accuracy of the three techniques. The results indicated that all three methods could detect phloem abnormalities due to witches' broom disease infection. However, because senescence or sucking insect damage could also induce autofluorescence in the phloem, the method of autofluorescence detection in the phloem tissue, although is the simplest method among the three techniques, has a great disadvantage of less accuracy. Diene's stain and DAPI fluorescence stain both react with the nucleic acid within the sieve tubes and are more accurate in terms of disease detection. Diene's stain has longer staining time and a proper disease diagnosis often affected by the thickness and angle of the sections and the degree of destaining. The method of DAPI fluorescence stain is simple with very short staining time and disease diagnosis is not affected by the condition

1988年11月送審

1988年12月通過

主審委員：楊遠波
張玉珍

of the sections thus is the best way for routine paulownia witches' broom disease diagnosis.

Key Words: paulownia witches' broom disease, autofluorescence Diene's stain, DAPI fluorescence stain

Wang, W. Y. and L. C. Wang. 1989. Comparison of three microscopic techniques in diagnosis of paulownia witches' broom disease. Bull. Taiwan For. Res. Inst. New series 3(4): 23-30,

一、緒 言

泡桐原產東亞，分佈於中國大陸、日本、朝鮮半島和台灣，為經濟價值極高之落葉性高大喬木。泡桐樹型優雅，花朵美麗，自古以來即被當作觀賞樹木栽植。而其木材性質優良，材質輕軟，不蛀不腐，加工容易且共振性佳，製作樂器、傢俱及壁板等工藝品，外銷價格高昂，再加上泡桐生長迅速，伐期短，一般在8至12年即可主伐一次，並可實施萌芽更新，節省造林費用，因此泡桐成為最值得推廣的速生經濟造林樹種。

本省原產之泡桐共有三種，包括泡桐 (*Paulownia fortunei* Hemsl.)，台灣泡桐 (*P. taiwaniana* Hu et Chang)，及白桐 (*P. kawakami* Ito)。其中又以台灣泡桐生長最快，分佈最廣。臺灣光復之後，在政府的積極鼓勵之下，台灣泡桐造林面積急速增加，政府並在花蓮縣之光復、瑞穗、鳳林及壽豐等鄉設置泡桐專業區，積極推廣泡桐造林事業，據林文鎮 (1979) 報告中指出，民國66年本省公私有林泡桐面積為一萬九千餘公頃，達到巔峯。但自民國66年以來，泡桐簇葉病逐漸在本省蔓延，受害林木在兩年內遍佈全省，受害林木由於二次及三次枝條叢生而導致簇葉病徵，林木生長停頓甚而死亡，木材品質不良，泡桐造林事業陷於停頓，各地之泡桐成林紛紛砍伐，因而泡桐簇葉病成為泡桐造林最主要之限制因子。

泡桐簇葉病之最早研究記錄始見於日本川上瀧瀾鑑定其病原菌為 *Gloeosporium kawakamii* (川上瀧瀾, 1902) 但吉井甫指出上述病原菌僅導致炭疽病而非簇葉病，吉井甫並推測簇葉病之病原可能為病毒 (吉井甫, 1931) 此後數十年間無太大進展，直到1967年日人士居養二等利用電子顯微鏡觀察泡桐簇葉病罹病組織切片，發現在篩管內存在大量擬菌質體 (mycoplasma-like organisms, 簡稱MLO) 而確認泡桐簇葉病之病原 (土居養二等, 1967)。泡桐簇葉病發生之記載在日本可追溯至

1877年，但在本省最早之記載為黃潔華等於1964年在台中縣東勢泡桐造林地發現罹病植株，隨後又陸續在南投、苗栗、新竹、台北、宜蘭、嘉義及花蓮等地發現此病，在感染最嚴重地區有80%以上的樹被感染 (黃潔華, 1975; Ying, 1978)。本省所產三種泡桐均會感病，其中又以台灣泡桐最為嚴重。此病之所以能如此迅速蔓延，除了媒介昆蟲可能為一重要因子之外，大量利用無性繁殖根苗推廣造林，使得帶病根苗散播各地，亦是簇葉病迅速傳播之主要因素。

泡桐簇葉病病原擬菌質體是一種體積極微小之細菌，缺乏細胞壁，專性寄生於植物之篩管內，細胞大小約 260-380x360-1340nm，必須利用電子顯微鏡方可觀察的到，除了螺旋菌質體 (spiroplasma) 之外，擬菌質體細胞外人工培養至目前為止尚未有成功的例子。擬菌質體造成的病害一般病害診斷方法除了觀察病徵以及利用電子顯微鏡直接觀察篩管內之病原擬菌質體之外，尚可利用一般光學顯微鏡檢查篩管內之自發螢光 (Namba, 1981)，或是以登氏染劑 (Deeley, 1979) 或螢光染劑 (Hiruki, 1981) 染色後觀察篩管內病變情形。因為光學顯微鏡技術操作簡易，儀器設備價格較低廉，且可診斷大量樣本，本文試圖比較上述三種利用光學顯微鏡診斷擬菌質體病害技術之優劣點，以期得到一較佳方法供進一步泡桐根苗篩檢，生產健康根苗造林以避免簇葉病傳播，減少病害損失。

二、材料與方法

(一) 試驗材料

自花蓮縣吉安鄉台灣泡桐造林地採集具有簇葉病徵之泡桐葉片，切下葉柄組織，切成 8 mm 長度，並以 5% 甘油醛 (glutaraldehyde) 固定，利用雙面刮鬍刀片徒手切片，以下列三種方式處理觀察。台灣泡桐種子經表面消毒後播種於介質中，種子苗切下葉柄後亦同樣經過上述處理。組織切片觀察使用 Olympus BHT 型光學顯微鏡，配置 BH2-RFL

型 100W 反射式螢光設備。

(一)自發螢光觀察

泡桐葉柄橫切後，不經任何染色處理，直接置螢光顯微鏡下，使用激發濾鏡 (exciter filter BP-490) 及雙色鏡 dichroic mirror B (DM-500+0-515) 所產生之藍色光譜觀察植物篩管部位受激發所產生之黃色強烈自發螢光。

(二)登氏染色法

將泡桐葉柄橫切切片，以 0.2% 登氏染劑 (含 2.5gm methylene blue, 1.25gm azure II, 10gm maltose, 0.25gm sodium carbonate 及 100ml distilled water) 染色五分鐘，再以蒸餾水退染約二十分鐘後，置顯微鏡亮視野下觀察。

(三)螢光染色法

將泡桐葉柄縱切切片，以 1.0mg/ml DAPI 染劑 (4,6-di-amidino-2-phenylindole · 2HCl) 在載玻片上染色二分鐘後，直接蓋上蓋玻片，置螢光顯微鏡下，以激發濾鏡 (exciter filter UG-1) 及雙色鏡 (dichroic mirror U, DM-400+L-420) 所產生之紫外光譜，觀察篩管內是否有被染色而呈現藍色之螢光物質。

三、結果與討論

罹患泡桐簇葉病之植株葉柄組織橫切面，在反射式螢光顯微鏡藍色光譜激發下，可見到維管束組織中某些篩管發出強烈黃色螢光 (圖一、A)，而其它組織如木質部之導管及厚壁細胞則呈現黃綠色之自發螢光，二者顏色不同，明顯可辨。健康種子苗葉柄組織橫切面則很少見到此種強烈黃色自發螢光，但老化之篩管組織及一些可能受到昆蟲吸食傷害之部位，或多或少有一些擴散的黃色自發螢光產生，但通常不似罹病組織般強烈 (圖一、B)。發出強烈黃色自發螢光之篩管若置亮視野下觀察可見到篩管有變色壞疽的現象 (圖一、C)。本省落花生簇葉病感染之長春花病株組織切片中亦可觀察到此種由擬菌質體感染所產生之專一性自發螢光 (楊一郎, 1983)。Namba *et al.* 指出此種螢光反應係由老化組織或感染擬菌質體、病毒、細菌、或真菌之篩管組織中壞死細胞及細胞中堆積之螢光物質 (fluorophores) 受激發所產生之自發螢光 (Namba, 1981)。雖然此種方法操作簡易，但因專一性較低，用於簇葉病診斷之誤差大而準確度較低，但不

失為一個初步鑑定植物健康情形之簡易方法。

以登氏染劑處理之罹病組織，篩管部位呈現不均勻之特殊深藍色反應，藍點之數量、大小、形狀及顏色濃淡頗不一致，但通常與篩管之細胞外形相吻合 (圖二、A)，有時數個連在一起之篩管同時被染色，而形成大藍斑。在健株葉柄組織切片中，篩管部位通常無任何染色現象 (圖二、B)，但有時因退染不完全，切片太厚，或是切片角度傾斜而造成死角等原因，會在篩管或是薄壁細胞內殘留一些藍色染料。除了感病篩管被染成深藍色之外，木質部之導管以及韌皮部厚壁細胞的細胞壁亦會被染成淺藍或鮮藍色。國外與本省有數種擬菌質體造成的病害利用登氏染色法來鑑定，其結果與電子顯微鏡觀察相吻合 (Hibben, 1986; 楊一郎, 1983, 1984, Yang, 1984, 1985)。此技術一般而言，需要極熟練之徒手切片技巧，方可製出可供觀察用之切片，否則易被上述退染等問題干擾，而影響病害診斷的正確性。

以 DAPI 螢光染劑處理之泡桐葉柄組織縱切切片，在紫外光譜的激發下，產生淺藍色的螢光，產生螢光的組織包括導管和厚壁細胞的細胞壁，以及薄壁細胞的細胞核，篩管因為缺乏核酸在內，故無任何藍色螢光發出 (圖三、B)，但在罹病的泡桐葉柄組織中，篩管內有許多細碎分佈不均勻的淺藍色光點 (圖三、A)，此為被染色的擬菌質體 DNA，該病原雖然體積極小而在一般光學顯微鏡亮視野下不可辨認，但因染色後發射螢光之故，而在低倍率 (400X) 下即可見到。所有健株組織切片之篩管部位均未見到此一特殊螢光，因此 DAPI 螢光染色法的可靠性較高。DAPI 染劑對於 Adenine Thymidine rich DNA 具有很高的親合力 (Hiruki, 1988)，已被用為許多擬菌質體病害鑑定之用 (Hiruki, 1981, 1982, 1986; 及 Schaper, 1985)，因操作簡易，染色所需時間短，極適宜做大量植株篩選之用。

以上三種簇葉病診斷技術的優劣點在表一中作了簡單的比較，在表一中可看出上述三種方法均極簡易，可在半小時內完成檢驗，其中自發螢光觀察法最快但專一性及正確性較低。登氏染色法專一性較高，但需熟練之切片及染色技術方可增加其準確性。而 DAPI 螢光染色法專一性高，在三者之中為可行性及可信度最高之泡桐簇葉病診斷方法。而

在目前缺乏抗簇葉病泡桐品種的情況下，在育苗時利用DAPI螢光染色法篩選泡桐根苗，除去任何可疑帶病之苗株，確保出栽均為無病苗，以減少病害發生，不失為一可行的病害防治辦法。

表一 三種光學顯微鏡技術診斷泡桐簇葉病之比較。

Table 1. Comparison of three microscopic techniques in diagnosis of paulownia witches' broom disease.

診斷方法 Method	篩管自發螢光 Sieve auto-fluorescence	登氏染色法 Diene's stain	DAPI螢光染色法 DAPI Fluorescence stain
比較項目 Comparison			
染色所需時間 (min) Staining time	0	8-10	1-3
退染所需時間 (min) Destaining time	0	20	0
受切片技術影響 Affected by tissue section condition	較小 Less	大 Great	較小 Less
病害診斷專一性 Specificity	低 Low	高 High	高 Low
病害診斷正確性 Accuracy	低 Low	尚可 Medium	高 High

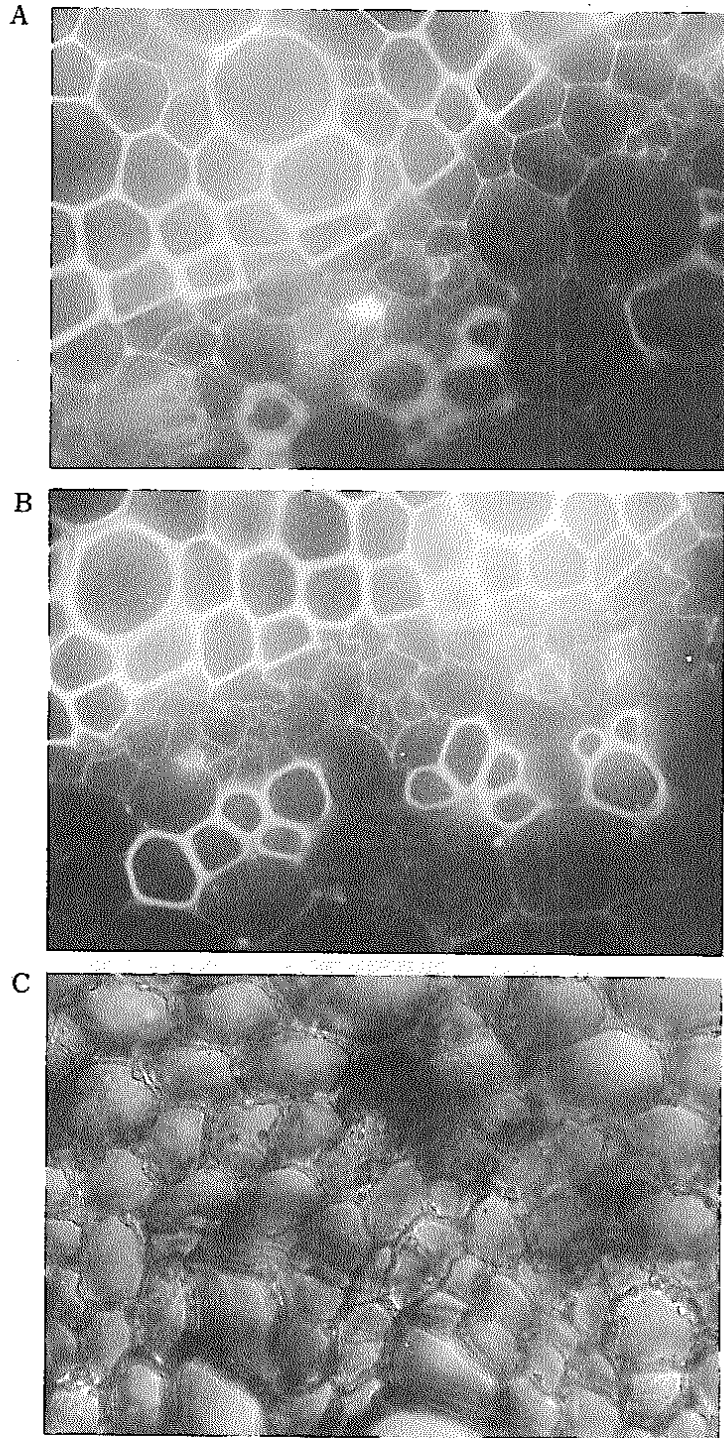


圖1.泡桐葉柄組織橫切面。A及B：自發螢光觀察；C：亮視野觀察。A及C：泡桐簇葉病病株；B：健康苗株。

Fig. 1. Paulownia leaf petiole cross section. A and B: auto-fluorescence, C: Bright field. A and C: plant infected with paulownia witches broom disease, B: healthy seedlings.

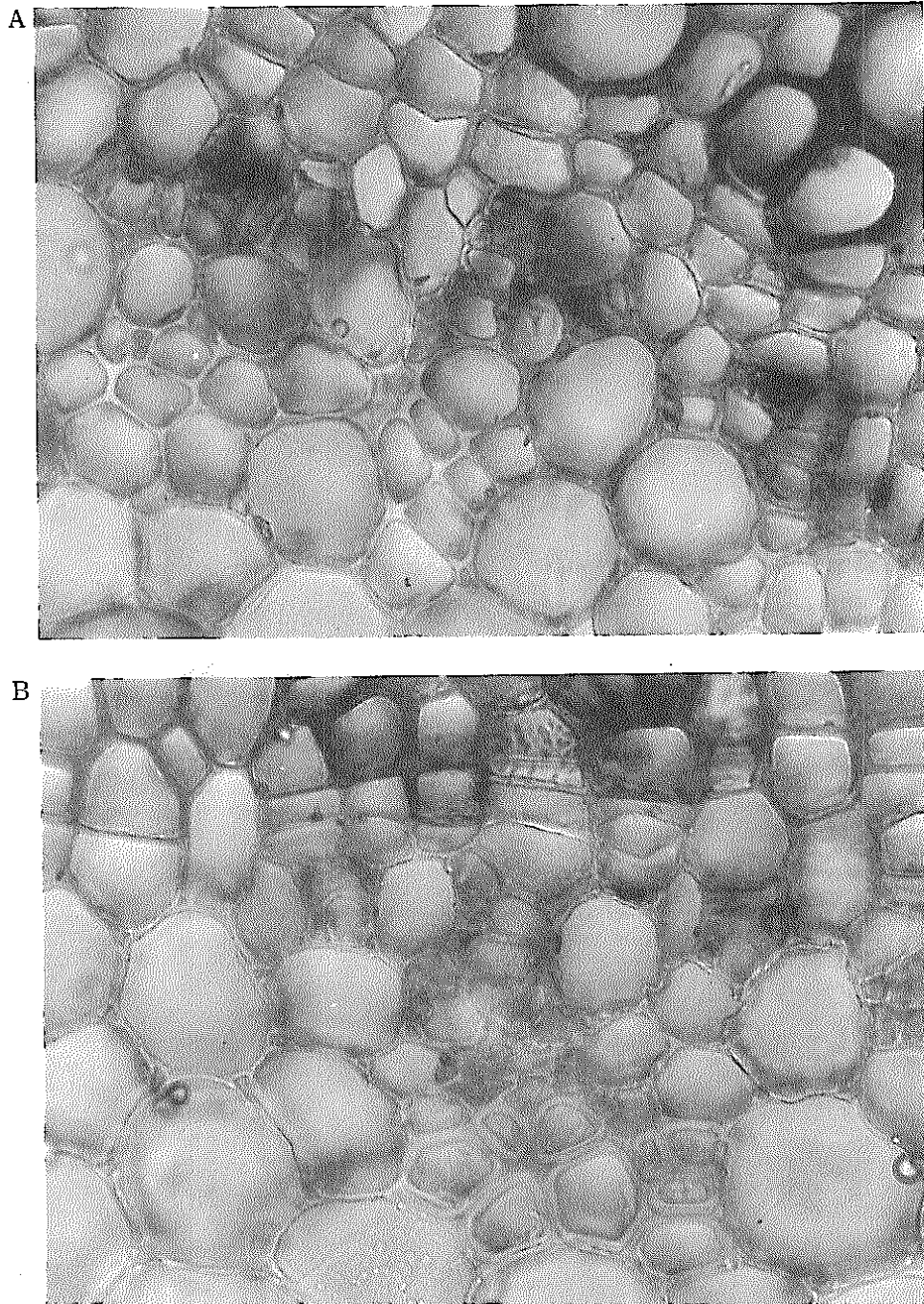


圖2. 泡桐葉柄組織橫切面登氏染色法觀察。A：泡桐葉病病株；B：健康苗株。

Fig. 2. Paulownia leaf petiole cross section treated with Diene's stain. A: plant infected with paulownia witches broom disease. B: healthy seedlings.

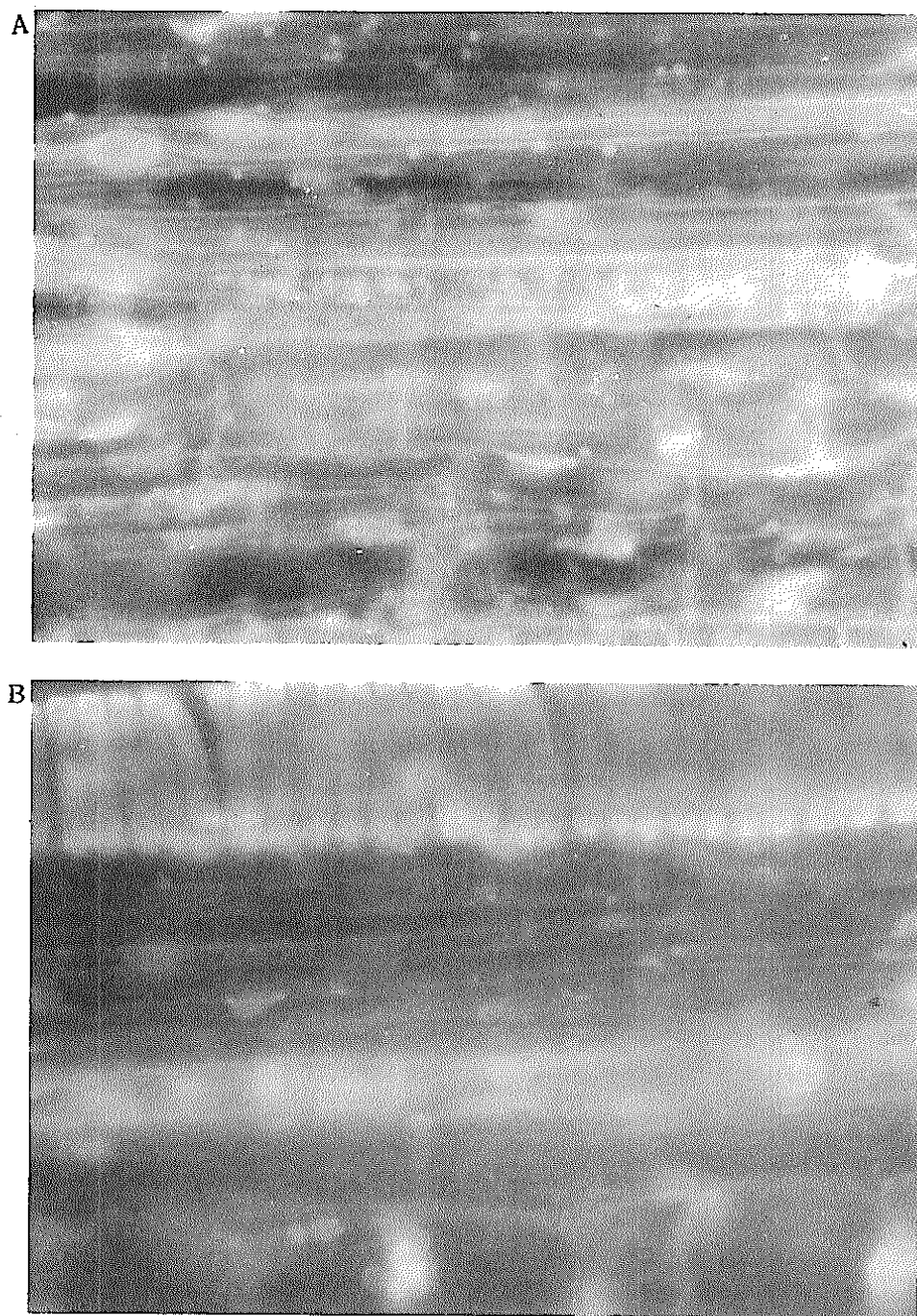


圖3.泡桐葉柄組織縱切面D A P I 螢光染色法觀察。A：泡桐簇葉病病株；
B：健康苗株。

Fig. 3. Paulownia leaf petiole longitudinal section treated with DAPI fluorescence stain and examined under UV light. A: plant infected with paulownia witches' broom disease. B: healthy seedling.

誌謝

本研究承蒙行政院國家科學委員會經費支持 (NSC-76-0409-B054-08)，本所育林系馬復京先生協助採集樣本，花蓮縣政府造林課協助調查，以及台灣省農業試驗所楊一郎先生技術指導，使本研究得以順利完成，謹以誌謝。

參考文獻

- 川上瀧彌 1902 桐樹天狗巢病 (桐萎縮病) 原論 pp. 19-4 日本東京。
- 吉井 甫 1931 *Gloeosporium kawakamii* Miyabe に関する研究 (I), *Gloeosporium kawakamii* 菌の桐の天狗巢病原説の對の疑義 日植病報 2 : 388。
- 黃潔華 應之璘 1975 台灣泡桐萎縮病的防治 豐年 25 (15) : 18-19。
- 楊一郎 1983 落花生簇葉病之菟絲媒介傳染與顯微鏡觀察 科學發展月刊 11 (9) : 821-826。
- 楊一郎 陳詠紀 曾德賜 1984 細葉野牽牛簇葉病之光學及電子顯微鏡觀察 中華農業研究 33 (1) : 53-58。
- Dale, J. L. 1988. Rapid compression technique for detecting mycoplasma like organisms in leaf midrib sieve tubes by fluorescence microscopy. *Phytopath.* 78 : 118-120.
- Deeley, J., W. A. Stevens and R. T. V. Fox. 1979. Use of Diene's stain to detect plant diseases induced by mycoplasma-like organisms. *Phytopath.* 69 : 1169-1171.
- Douglas, S. M. 1986. Detection of mycoplasma-like organisms in peach and chokecherry with x-disease by fluorescence microscopy. *Phytopath.* 76 : 784-787.
- Hibben, C. R., Lewis, C. A. and Castello, J. D. 1986. Mycoplasma like organisms, cause of lilac witches' broom. *Plant Dis.* 70 : 342-345.
- Hiruki, C. 1981. Fluorescence microscopy in diagnosis of tree diseases associated with mycoplasma-like organisms (MLO). *Proc. XVII IUFRO World Cong. Div. 2*, pp. 317-322.
- Hiruki, C. 1982. Histochemistry of tree mycoplasma diseases with special reference to mulberry dwarf and paulownia witches, broom. *Proc. 5th IUFRO Conf. on the Mycoplasma Diseases*. Green Bay.
- Hiruki, C. and A. da Rocha. 1986. Histochemical diagnosis of mycoplasma infection in *Catharanthus roseus* by means of a fluorescent DNA-binding agent 4'-diamidino-2-phenylindole 2HCl (DAPI). *Can. J. Plant Path.* 8 : 236-242.
- Hiruki, C. 1988. Fluorescence microscopy of yellows diseases associated with plant mycoplasma-like organisms. In "Mycoplasma. Diseases of Crops, Basic and Applied Aspects" K. Maramorosch and S. P. Raychaudhuri, eds., pp. 51-76. Springer-Verlag New York Inc.
- Namba, S., S. Yamashita, Y. Doi and K. Yora. 1981. Direct fluorescence detection method (DFD method) for diagnosing yellowstreak virus diseases and mycoplasma diseases of plants. *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 47 : 258-263.
- Schaper, U. and R. H. Converse. 1985. Detection of mycoplasma like organisms in infected blueberry cultivars by the DAPI technique. *Plant Disease* 69 : 193-196.
- Yang I.-L., M.-J. Chen and S.-M. Wang. 1984. Mycoplasma-like organism associated with witches' broom of *Ipomoea triloba* L. in Taiwan. *Proc. Natl. Sci. Coun. Part B: Life Sci.* 8(3) : 193-197.
- Yang, I.-L., M.-J. Chen and S.-M. Wang. 1985. Mycoplasma-like organism associated with witches' broom of jequirity rosary pea in Taiwan. *Proc. Natl. Sci. Council Part B: Life Sci.* 9(3) : 230-234.
- Ying, S. L. 1978. Witches'-broom disease of paulownia (*P. taiwaniana* Hu et Chang) in Taiwan. *Proc. R. O. C.-U. S. Cooperative Seminar on Mycoplasma diseases of Plants*. Mar. 27-31. pp. 161-168. National Science Council, Taipei.