

感染病毒的侧耳的超微结构

刘宏迪 梁平彦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从侧耳属的两个种——糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 和 (*Pleurotus* sp.) 中, 提取到一种直径为 23nm 的球形病毒颗粒。在糙皮侧耳子实体细胞的超薄切片中病毒直径为 21nm, 病毒颗粒团状紧密或松散的聚集或以分散的形式存在于胞质内, 常常被以膜结构。并提供了病毒在菌丝内通过隔膜孔器桶孔 (dolipore septum) 进行胞间易位的证据。隔膜器的桶孔径是属于小孔径类型。本文是侧耳属病毒的首次报道。

关键词 糙皮侧耳病毒; 桶孔隔膜; 病毒易位; 超微结构

双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 病毒的早期研究导致了真菌病毒的发现^[1]。以后相继在蘑菇中找到 4 种直径不同的球形病毒^[2-6]、一种杆状病毒^[7] 和棍棒状病毒^[8,9]。在香菇 (*Lentinus edodes*) 中找到多种直径不同的球形病毒和杆状病毒^[10-12]。典型的真菌病毒核酸是由多个 dsRNA 节段组成, 双孢蘑菇中的杆状病毒是真菌中唯一的 ssRNA 病毒^[13], 其复制机理的研究已被注意。已报道的感染病毒的食用菌中, 还有银耳 (*Tremella fuciformis*) 和茯苓 (*Poria cocos*)^[12], 对目前栽培较广的平菇则尚无报道。

食用平菇中常见的种有侧耳属 (*Pleurotus*) 的糙皮侧耳 (*P. ostreatus*) 及漏斗状侧耳 [(*P. sajor-caju*) 又称凤尾菇]。作者自糙皮侧耳及漏斗状侧耳与德平侧耳单孢分离混合培养后的后代子实体中分离到球形病毒, 并进行了子实体组织的超薄切片电镜观察。

材料与方 法

(一) 样品来源

北京西郊市场销售的新鲜平菇, 经鉴定为糙皮侧耳。

漏斗状侧耳与德平侧耳单孢分离物混合培

养后的后代*。

(二) 病毒的提取

取 100g 子实体冲洗后晾干, 加 5 倍 (W/V) 磷酸缓冲液 (0.5M pH 7.0), 用组织捣碎机破碎, 双层尼龙布过滤, 6,000rpm 离心 20 分钟, 上清液中加 6% 聚乙二醇 (分子量 6,000) 及 0.3M 氯化钠, 充分搅拌 2 小时以上, 9,000rpm 离心 15 分钟, 上清液经 33,000rpm 离心 150 分钟, 沉淀充分悬浮后经 9,000rpm 离心 15 分钟, 其上清液即为病毒粗制品。

(三) 子实体的超薄切片

将新鲜的侧耳子实体切成 1mm³ 的小块, 用 2.5% 的戊二醛进行前固定, 0.1M 磷酸缓冲液充分冲洗后再用 1% 四氧化锇固定 24 小时, 经乙醇系列脱水, 用英国 Epon 812 环氧树脂包埋, LKB 8800III 型超薄切片机切片。

(四) 电镜观察

提取物用 2% 磷钨酸负染 3 分钟。

切片用醋酸双氧铀与柠檬酸铅双染色。

用日立 H500 型电子显微镜进行观察。

结果与讨论

(一) 病毒颗粒的形态

两种侧耳提取的病毒粗制品在电子显

本文于 1985 年 9 月 21 日收到。

承应建新先生鉴定菌种, 特此致谢。

* 菌种由南京师范学院何强泰先生提供, 特此致谢。

显微镜下其形态均为球形颗粒,直径为 23 nm,可见到病毒外壳上亚基的排列。糙皮侧耳病毒形态见图 1,德平侧耳与漏斗状侧耳培养后代病毒形态见图 2。

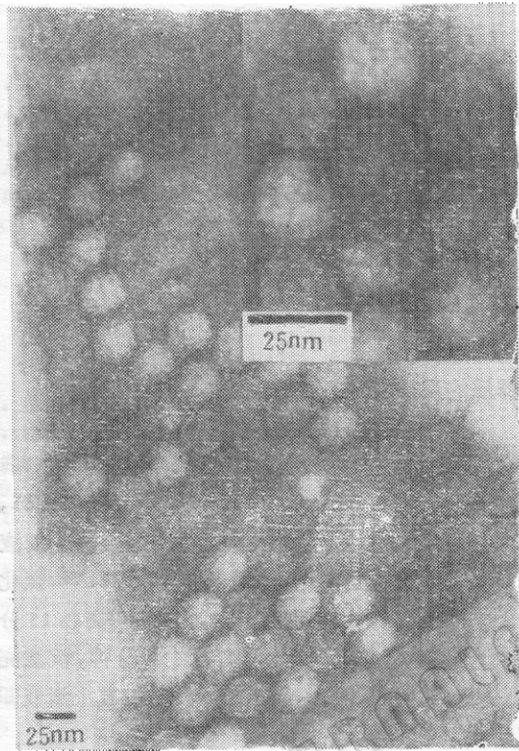


图 1 糙皮侧耳病毒

Fig. 1 Electron microscopic photographs of *Pleurotus ostratus* virus particles extracted from fruiting body

(二) 感染病毒的侧耳子实体细胞的超微结构和病毒分布

在疏松排列的菌丝组成的子实体中,可观察到菌柄和菌盖细胞内存在的密度相当高的病毒颗粒。病毒颗粒紧密或松散聚集,外面被以膜结构,膜厚 9—12nm,内包含多个聚集物(图版 I-1,2);病毒颗粒也以分散状态布于整个细胞(图版 I-3—5)。有时能见到包裹聚集物膜的局部缺损,以及病毒颗粒由此分散到膜外(图版 I-2 箭头所示)。线粒体在细胞内以近似球形(300×500 — $2,000 \times 2,500$ nm)或椭圆形($2,000 \times 4,500$ — $3,000 \times 5,500$ nm)分散

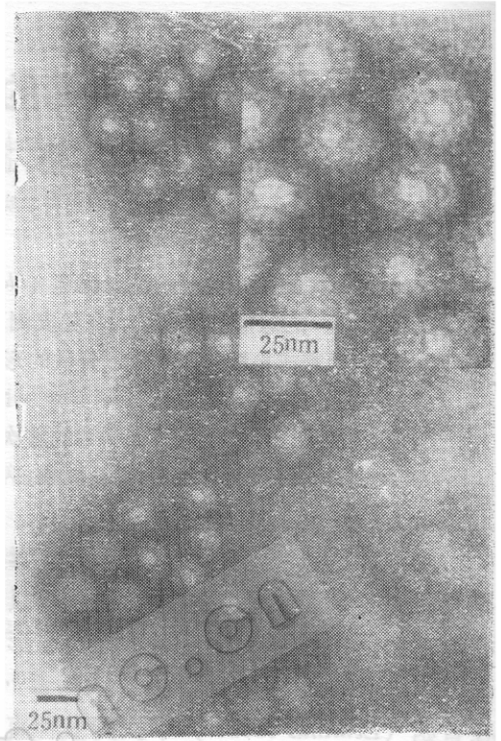


图 2 德平侧耳与漏斗状侧耳培养后代病毒

Fig. 2 *Pleurotus* sp. virus particles

在细胞内。它是由两层界膜结构构成,内层膜形成若干嵴并入线粒体腔中。线粒体上未见有病毒颗粒(图版 I-3,4)。细胞核由两层单位膜组成核被膜,每层膜厚 5—6 nm,可见核膜孔,孔径为 80—100nm。核区外细胞质中能见到病毒颗粒,并靠近核区(图版 I-1,4)。在大小不同的液泡中未见病毒颗粒。切片的病毒颗粒放大,可见到外壳蛋白的亚基(图版 I-5 右下),其直径略小于提纯的颗粒,为 21nm。

(三) 隔膜孔器的结构及病毒的胞间易位

对侧耳属两个不同种的隔膜孔区的观察表明,隔膜孔器是由膨大的隔膜孔(桶孔细胞)和环绕着孔的细胞质所组成(图版 II, III),细胞质于相邻的两细胞之间相通,并且相邻细胞的质膜通过隔膜孔处也是相通的(图版 II-7,8)。隔膜孔帽包围膨大部

分,后面伸入到细胞的隔膜孔内,前面平行于横隔膜而与内质网相连接(图版 II-7),可能是来自内质网的高度改变了的具有刚性的结构。两种菌的隔膜孔帽上均具有小孔,孔径为 40—80nm (图版 II, III),属于担子菌中具有小孔径的孔帽类型^[14,15],与以往报道的同属伞菌目的皱褶多孔菌(*Polyporus rugulosus*)相似^[16],而与分类地位相差较远的丝核菌(*Rhizoctonia solani*)不同^[17]。孔帽小孔排列整齐,形态均一,往往以 5—8 个排列成半圆形。糙皮侧耳的孔帽中间有一电子致密度很高的中心,似乎把帽分成两个均匀的部分(图版 II-7,8),而与皱褶多孔菌相区别。这种小口径孔帽可能阻止线粒体一类的胞器通过,后者显然较开口体积大,即使在壁压作用下胞质流动加速使开口增大的情况下也难以通过。这一观察结果与 Wilsenach 等在皱褶多孔菌中的结果相同,而病毒所显示的情况则不同^[16]。

侧耳子实体的超微结构中,可见病毒在细胞之间的分布是不均的,相邻细胞之间一方病毒颗粒密集以界膜包裹或分散,而隔膜另一面细胞内并无病毒(图版 II-7,8)。显然隔膜桶孔是病毒在细胞间易位的重要通道,图版 II-6、III-9 示病毒颗粒位于隔膜两个膨大处桶孔垫中间的孔内,而图版 III 右上及 III-9 细胞另一侧可见少数病毒颗粒,其排列的位置似乎随着胞间细胞质的流动而移入。值得注意的是全部桶孔隔膜的超微结构观察表明,病毒颗粒是以十几个成堆或成行通过孔间,而与双孢蘑菇病毒成片聚集在孔帽内不同^[18]。这可能与两种菌的隔膜孔器的形态结构不同有关。

真菌病毒在寄主细胞间通过隔膜桶孔易位的证据,最早由 Dieleman-van Zaayen (1972) 在双孢蘑菇中获得^[18]。真菌病毒和

植物病毒类似,同样是以特殊途径在细胞间易位,而前者通过隔膜孔器,后者则是通过胞间连丝。本文报道的感染病毒的侧耳属中两个种的超微结构,为真菌病毒胞间易位再次提供了证据。至于病毒对平菇栽培的影响,如是否像双孢蘑菇病毒那样造成经济损失^[19],或像香菇病毒一样无明显的影响,尚待研究。在超微结构观察中,可见到病毒密集部位线粒体有减少的趋势。

参 考 文 献

- [1] Hollings, M.: *Nature (London)*, 169: 692—695, 1962.
- [2] Dieleman-van Zaayen, A. and O. Igesz: *Virology*, 39: 147—157, 1969.
- [3] Dieleman-van Zaayen, A. and J. H. M. Temmink: *Neth. J. Plant Pathol.*, 74: 48—51, 1968.
- [4] Dieleman-van Zaayen, A.: *Nature (London)*, 216: 595—596, 1967.
- [5] Dieleman-van Zaayen, A.: *Neth. J. Plant Pathol.*, 82(4): 121—131, 1976.
- [6] Abouy, J.: *Ann. Phytopathology*, 4(1): 39—44, 1972.
- [7] Moyer, J. W. and S. H. Smith: *Phytopathology*, 66: 1260—1261, 1977.
- [8] Lesemann, D. E. and R. Koenig: *Phytopathology Z.*, 89: 161—169, 1977.
- [9] 梁平彦、陈开英: *植物病理学报*, 13(4): 402—406, 1974.
- [10] Ushiyama, R. et al.: *Proc. of the 1st Intersectoral Congress of IAMS*, 3: 402—406, 1974.
- [11] Mori, K.: *ibid.*, 3: 396—401, 1974.
- [12] 梁平彦、陈开英: *微生物学通报*, 9(5): 209—210, 1982.
- [13] Tavantzis, M. et al.: *Phytopathology Z.*, 106: 45—50, 1983.
- [14] Beckett, A. et al.: *An Atlas of Fungal Ultrastructure*, 192—193, 1974.
- [15] Khan, S. R. and J. W. Kimbrough: *Mycotaxon*, 15: 103—120, 1982.
- [16] Wilsenach, R. and M. Kessel: *J. Gen. Microbiol.*, 40: 397—400, 1965.
- [17] Butler, E. E. and C. E. Bracker: *Rhizoctonia solani*, *Biology and Pathology* (J. R. Parmate, Jr. ed), University of California Press, Berkeley, pp. 32—51, 1970.
- [18] Dieleman-van Zaayen, A.: *Virology*, 47: 94—104, 1972.
- [19] Frost, R. R. and E. L. Passmore: *Phytopathology Z.*, 98: 272—284, 1980.

[20] Mori, K.: The Third International Mycological Congress 28th August-3rd September,

Tokyo, Japan, p. 179, 1983.

ULTRASECTION OF VIRUS INFECTED *PLEUROTUS OSTREATUS*

Liu Hongdi Liang Pingyan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Spherical virus particles of 23 nm in diameter have been extracted from two edible fungi—*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus* sp. in North China. Thinsection of virus infected fruiting body of *P. ostreatus* showed that the virus particles of 21 nm in diameter distributed scattered throughout the cytoplasm or aggregated densely or loosely in some part of the cell and menbrane bounded.

Cross section of septal pore apparatus showed that the pore cap is integrated with the endoplasmic reticulum which lies parallel to the cross wall. The regular arrangement of the pore cap perforation can be seen, and the openings are regular in

shape and size with 40—80 nm in diameter. Virus particles appear to be passing through the septal dolipore.

Present paper is the first report of the presence of virus particles in *Pleurotus* sp. and it gives new evidence of virus translocation that the passage from cell to cell of Basidiomycetes virus particles probably take place through septal dolipores.

Key words

Pleurotus ostreatus virus; Ultrastructure; Dolipore septum; Virus translocation

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

1—5. 感染病毒的糙皮侧耳子实体的超薄切片。1, 2. 病毒颗粒松散或紧密聚集, 外被以膜。3—5. 直径 21nm 的病毒颗粒分散在细胞质内。液泡 (Va); 核 (N); 核仁 (Nu); 线粒体 (M)。

图 版 II

6—8. 侧耳属感染病毒子实体的超微结构。示桶孔隔膜及直径 21nm 的病毒颗粒位于隔膜两边细胞质内 (6), 或位于隔膜一侧的细胞内 (7, 8)。有的病毒位于两隔膜膨大处之间的通道内 (6)。

图 版 III

9. 感染病毒的糙皮侧耳子实体的超微结构。病毒位于桶孔隔膜两边的细胞内, 可见病毒颗粒通过通道内, (9) 右上角示全细胞。内质网 (ER); 隔膜膨大处 (SS); 桶孔帽 (PC); 孔帽孔 (PCP)。

Plate I

1—5. Ultrathin section of virus infected *Pleurotus ostreatus* fruiting body. 1, 2. Showing membrane rounded virus particles aggregated lossely or closely. 3—5, Virus particles of 21 nm are scattered theroughout the cytoplasm. No virus particles has been seen in nuclei (N), nucleolus (Nu), vacuole (Va) and mitochondrian (M).

Plate II

6—8. Ultrathin sections of virus infected *Pleurotus* sp. fruiting body showing septum with dolipore and 21 nm virus particles on both sides (6) or one of the sides (7, 8) of the pore. Some virus particles are seem in the cetral pore between two septal swellings (6).

Plate III

9. Ultrathin sections of virus infected *Pleurotus ostreatus* fruiting body. Showing septum with dolipore and virus particles on one side of the pore. Virus particles are passing through the central pore (9). Right top showing the whole cells.