

# 与蚕豆萎蔫病毒 2 号胞间运动和长距离转运相关的 寄主细胞超微结构研究

洪 健<sup>1,2</sup>, 王卫兵<sup>2</sup>, 周雪平<sup>2</sup>, 胡东维<sup>2</sup>

(浙江大学<sup>1</sup> 分析测试中心<sup>2</sup> 生物技术研究所 杭州 310029)

**摘 要** :电镜超微结构观察和免疫金标记显示 :受蚕豆萎蔫病毒 2 号(*Broad bean wilt virus 2*, BBWV 2)中国分离物 B935 侵染的豌豆(*Pisum sativum*)和蚕豆(*Vicia faba*)叶细胞中膜结构增生,形成膜结构增生区,病毒以结晶体和管状体形式存在于细胞质中。在病变早期,叶肉细胞的胞间连丝处连接有小管结构,病毒样颗粒呈纵列排在小管中,穿越胞间连丝的小管能被 BBWV 2 的金标记抗体特异性标记。维管束组织的薄壁细胞、伴胞及转移细胞内存在膜增生区及病毒管状体,在筛管壁附近存在的病毒样颗粒能被 BBWV 2 金标记抗体特异性标记。实验结果表明 BBWV 2 胞间运动形式与豇豆花叶病毒(CPMV)相似,以完整粒子通过在胞间连丝处形成的小管结构穿越胞间连丝,细胞质中存在的直径 160nm 管状体只是一种病毒聚集体,与胞间运动无直接关系,该病毒在筛管中可能也是以完整粒子形式进行长距离转运的。

**关键词** :蚕豆萎蔫病毒 2 号;胞间运动;长距离转运;免疫金标记;电子显微镜

中图分类号:Q939.4 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)03-0441-08

植物病毒侵入寄主后在细胞中复制增殖,通过胞间连丝短距离胞间运动(cell-to-cell movement)和维管束长距离转运(long-distance systemic transport)到达植株各个部位,形成系统性侵染<sup>[1~4]</sup>。以烟草花叶病毒(TMV)为代表的运动蛋白 MP/RNA 结合体形式和以豇豆花叶病毒(CPMV)为代表的管状结构形式是两种最主要的胞间运动形式。CPMV 基因组编码 58kDa/48kDa 运动蛋白在细胞中形成小管状结构,完整的病毒粒子排列在该管状通道内穿越胞间连丝<sup>[5,6]</sup>。与此类似的还有花椰菜花叶病毒科 *Caulimoviridae*、雀麦花叶病毒科 *Bromoviridae*、线虫传多面体病毒属 *Nepovirus*、番茄斑萎病毒属 *Topovirus*、纤毛病毒属 *Trichovirus* 的成员<sup>[7,8]</sup>。在通过维管束系统的长距离转运过程中,病毒要顺利穿过维管束鞘细胞、韧皮部薄壁细胞和伴胞进入筛管,连接筛分子和伴胞之间的胞间连丝有多重分枝,其 SEL(size exclusion limit)增大方式与叶肉细胞的不同,病毒进出筛分子的过程还需要其他病毒因子如外壳蛋白及寄主因子参与<sup>[9,10]</sup>。

蚕豆萎蔫病毒 2 号(*Broad bean wilt virus 2*, BBWV 2)属豇豆花叶病毒科(*Comoviridae*)蚕豆病毒属(*Fabavirus*),是我国粮食作物和经济作物上广泛发生的重要病毒病原<sup>[11]</sup>。周雪平等系统研究了

BBWV 2 中国分离物 B935 的分子生物学特性,发现其 RNA2 编码的 VP53/VP37 与 CPMV 的 58kD/48kD 运动蛋白具有同源性,并包含一个类似病毒运动蛋白特有的 rNTP 结合域,具有核酸结合特性<sup>[12,13]</sup>。鉴于 *Fabavirus* 成员的胞间运动机理迄今尚不明了,我们对 BBWV 2 中国分离物 B935 侵染的豌豆和蚕豆进行了详细的超微结构观察,得到了一些涉及病毒胞间运动和长距离转运的超微结构证据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒和寄主** :BBWV 2 中国分离物 B935 由周雪平等分离鉴定<sup>[14]</sup>,保存繁殖于昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)上。温室中盆栽豌豆(*Pisum sativum*)和蚕豆(*Vicia faba*),磨擦接种病毒 2~3 周后,分别采集刚显系统症状的幼叶和已显症状的成长叶为实验材料。以未接种病毒的健康豌豆和蚕豆为对照材料。

**1.1.2 主要试剂和仪器** :四氧化锇、Spurr 树脂和 Lowicryl K<sub>4</sub>M 低温树脂购自美国 SPI 公司;150 目电镜铜网和镍网购自北京 KYKY 公司;其他试剂均为国产分析纯;BBWV 2 兔多抗血清和 15nm 胶体金 A 蛋白探针由我们实验室制备。JEM-1230 型透射电

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30270873,30370305)

作者简介 洪 健(1957-)男,浙江宁波人,教授,从事分子植物病理学研究。E-mail:jhong@zju.edu.cn

收稿日期 2005-08-04 接受日期 2005-09-08 修回日期 2006-02-14

子显微镜为日本 JEOL 公司产 ;Power-Tome PC 型超薄切片机为美国 RMC 公司产。

## 1.2 超薄切片制备和电镜观察

将接种 B935 的豌豆和蚕豆病叶以及健康对照叶片分别切成  $1\text{mm} \times 3\text{mm}$  大小 ,置于  $0.1\text{mol/L}$  磷酸缓冲液 ( $\text{pH}7.0$ ) 配制的  $2.5\%$  戊二醛固定液及  $1\%$  四氧化锇固定液中进行双固定 ,乙醇系列脱水 ,Spurr 树脂包埋、聚合 ,超薄切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后透射电镜下观察拍照 ,加速电压为  $60 \sim 80\text{kV}$ 。

## 1.3 低温包埋超薄切片制备

一部分病叶材料用磷酸缓冲液  $0.1\text{ mol/L}$  ( $\text{pH}6.8$ ) 配制的  $3\%$  多聚甲醛 -  $1\%$  戊二醛在  $4^\circ\text{C}$  下固定  $2\text{h}$  , $4^\circ\text{C}$  下相同缓冲液漂洗后用  $30\%$  和  $50\%$  乙醇脱水 ,转入  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中乙醇系列脱水至  $100\%$  ,用 Lowicryl  $\text{K}_4\text{M}$  低温包埋剂在  $-20^\circ\text{C}$  下逐级渗透、包埋 ,经  $360\text{nm}$  波长紫外线  $-20^\circ\text{C}$  照射  $72\text{h}$  ,再室温照射  $24\text{h}$  使样品完全聚合固化 ,然后切成  $70 \sim 90\text{nm}$  的超薄切片。

## 1.4 免疫金标记和电镜观察

带低温超薄切片的镍网先用  $\text{ddH}_2\text{O}$  湿润  $5\text{min}$  ,然后在 BL 封闭液 ( $50\text{mmol/L}$  PBS ,  $\text{pH}7.0$  ,含  $1\%$  BSA ,  $0.02\%$  PEG20000 ,  $100\text{mmol/L}$  NaCl ,  $1\%$   $\text{NaN}_3$ ) 上封闭处理  $30\text{min}$  ,在 BL 稀释 100 倍的 BBWV 2 兔多抗血清液滴上孵育  $60\text{min}$  , $\text{ddH}_2\text{O}$  漂洗和 BL 封闭后用直径  $15\text{nm}$  的胶体金 A 蛋白探针标记  $60\text{min}$  ,最后经  $\text{ddH}_2\text{O}$  漂洗 3 次 ,每次  $5\text{min}$  。标记后的切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色 ,透射电镜观察拍照。

# 2 结果

## 2.1 感染 BBWV 2 B935 分离物的寄主细胞病理变化

透射电镜下观察受 BBWV 2 B935 分离物侵染的豌豆和蚕豆病叶超薄切片 ,在病变的表皮细胞、叶肉细胞中首先出现细胞质膜结构增生现象 ,形成一个含有大量膜状结构、小泡及电子致密物质的特殊区域 (图版 I -a) ,周围聚集分布着发达的线粒体。随后细胞质中出现许多长条形、矩形的结晶体 ,电镜高倍放大可看到结晶体是由病毒粒子整齐地排列而成 (图版 I -a ,b) 。免疫金标记显示这些结晶体能被 BBWV 2 免疫金颗粒特异性标记 (图版 I -c) 。除病毒结晶体之外 ,在叶肉细胞、维管束薄壁细胞甚至气孔保卫细胞中还观察到许多直径约  $160\text{nm}$  的中空管

状体分布在细胞质内 (图版 I -d ,e) ,管状体横切面由  $17 \sim 19$  个直径为  $25\text{nm}$  左右的粒子组成 ,纵切面为两排平行的粒子 ,长度可达数十微米 ,管状体无论横切面还是纵切面都能被 BBWV 2 免疫金颗粒特异性标记 (图版 I -f) 。管状体往往相互平行聚集成束 ,可在相邻的细胞中与结晶体同时出现 ,但不存在于同一细胞内。

## 2.2 胞间连丝及排列其中的病毒样颗粒

在健康对照的豌豆叶肉细胞中 ,胞间连丝直径约  $26\text{nm}$  ,两端与两侧细胞的细胞质膜相连 (图版 II -a) 。叶肉细胞的胞间连丝一般不分叉 ,极少观察到分叉状的。

在豌豆幼叶感病初期的叶肉细胞中 ,观察到胞间连丝连接了一个伸入细胞质的小管结构 ,直径约  $35 \sim 40\text{nm}$  ,小管外侧还包被了一层细胞质膜 ,小管中央有一列电子致密物质沿着胞间连丝穿越细胞壁 (图版 II -b) ,另一侧细胞与之相连的细胞质膜内陷。在豌豆卷须的薄壁细胞中也出现大量病毒管状体 ,细胞壁上胞间连丝发达 ,有的胞间连丝直径明显增大 ,中央存在病毒样颗粒 (图版 II -c) 。在豌豆卷须薄壁细胞中也观察到伸入细胞质的小管结构 (图版 II -d) 。在蚕豆病叶中同样观察到病变细胞和相邻细胞之间胞间连丝连接了一个伸入细胞质的小管结构 ,一些电子致密的病毒样颗粒呈纵列排在小管内穿越胞间连丝 (图版 II -e) 。用 BBWV 2 抗血清免疫金标记的低温超薄切片中 ,与胞间连丝相连的小管结构能被免疫金颗粒特异性标记 (图版 II -f) 。

## 2.3 叶片维管束组织及筛管中的病毒样颗粒

豌豆和蚕豆叶片的维管束组织均由导管、筛管、伴胞、转移细胞、维管束薄壁细胞组成 (图版 III -a) ,在 B935 分离物侵染的病叶维管束薄壁细胞和伴胞中也存在膜结构增生、线粒体聚集、形成病毒管状体等病变现象 ,甚至在转移细胞中也观察到病毒管状体 ,表明病毒不仅通过这些细胞转运到筛管 ,同时还能在细胞内复制增殖 ,形成子代病毒的聚集体。筛管中央是快速长距离运输的汁液流 ,筛管细胞质紧贴于管壁上 ,在筛管内没有观察到病毒结晶体或管状体 ,但在紧靠着筛管壁处观察到成堆的病毒样颗粒 (图版 III -b) ,用 BBWV 2 抗血清免疫金标记的切片中 ,筛管壁附近的病毒样颗粒能被免疫金颗粒特异性标记 (图版 III -c) 。

## 2.4 豌豆卷须维管束组织中的病毒

豌豆的卷须是变态叶 ,组织极度伸长 ,维管束组织也由导管、筛管、伴胞、转移细胞、维管束薄壁细胞

组成(图版 IV-a),这些不同类型的细胞因维管束大小不同而有分布差异。在筛管与伴胞、筛管与薄壁细胞之间有分枝状的胞间连丝相通(图版 IV-b),转移细胞有十分发达的细胞壁内突。B935 分离物感染的卷须维管束薄壁细胞和伴胞也常出现与叶肉细胞相似的病变结构,存在膜增生区、线粒体聚集、形成许多病毒管状体,在转移细胞中也观察到病毒管状体(图版 IV-c),表明这些细胞都具备病毒复制和转运的能力。

### 3 讨论

在 CPMV 侵染的寄主细胞中,由基因组 RNA2 编码的 58kDa/48kDa 运动蛋白在细胞质中可形成小管结构,这种小管直径约 35nm,能被运动蛋白抗体所标记,球状病毒粒子成纵列排在该小管中穿越胞间连丝<sup>[6]</sup>。*Comovirus*、*Nepovirus* 其他成员侵染的寄主细胞中也具有类似结构,我们在葡萄扇叶病毒(GFLV)侵染的昆诺藜叶肉细胞中观察到病毒粒子排列在小管中穿越胞间连丝,并被 GFLV 的运动蛋白金标记抗体特异性标记<sup>[15]</sup>。但在 BBWV 2 侵染的豌豆和蚕豆细胞中始终未观察到含有病毒粒子的小管结构分布在细胞质内,而只在胞间连丝处观察到与之相连并伸入细胞质的小管结构,外包被着细胞质膜,这与花椰菜花叶病毒(BaMV)、苜蓿花叶病毒(AMV)在寄主细胞内的胞间运动结构相似<sup>[7,16]</sup>。从连接胞间连丝的小管内排列着病毒样颗粒且能被病毒抗体特异性标记来看,BBWV 2 是以完整粒子形式通过由 VP53/VP37 运动蛋白在胞间连丝处形成的小管结构穿越胞间连丝,进入相邻细胞的。因此我们认为,BBWV 2 的胞间运动也属于管状结构模式。

至于病变豌豆和蚕豆细胞质中普遍存在的中空管状体,与上述涉及病毒胞间运动的小管结构有明显区别,在电镜高倍放大下可以看到该管状结构由 17~19 个直径约 25nm 的粒子组成,能被 BBWV 2 免疫金颗粒特异性标记,显然是由病毒粒子组成的一种特殊聚集体。我们在 BBWV 2 不同分离物侵染的寄主植物中还观察到管状体直径及组成的粒子数有明显差异。早期 Taylo 等(1972 年)报道 BBWV 欧洲分离物侵染的寄主细胞中存在直径约 70nm 的管状物,其横切面是由 9 个粒子组成<sup>[17]</sup>;Russo 等(1979 年)报道在 BBWV 豌豆分离物中发现另一种方管状结构是由两层病毒粒子组成<sup>[18]</sup>;Hull 等(1973 年)认为 BBWV 的细胞内含体存在株系间的差异<sup>[19]</sup>。这些管状体与病毒晶体一样,在细胞病变后期一直

存在,直至细胞死亡。因此我们认为,所有 BBWV 侵染细胞中产生的由病毒粒子组成的管状体只是一种病毒复制过程中的特殊聚集体形式,与病毒的胞间运动无直接关系。

关于植物病毒长距离转运的研究报道目前还甚少。病毒进入筛分子和从筛分子转移到周围薄壁细胞是长距离转运的两个过程,人们往往更多地关注病毒如何进入筛分子,而对筛分子中的病毒再释放到维管束薄壁细胞了解不多。一般超微结构观察到的既可能是由薄壁细胞到筛分子的转运过程,也可能是由筛分子到薄壁细胞的相反转运。我们在豌豆和蚕豆病叶维管束中都观察到邻近筛管、导管的薄壁细胞和伴胞中存在膜增生区,有的还存在病毒管状体,在转移细胞内也存在着管状体,表明这类细胞不仅在叶肉组织到维管束之间物质转运中起着桥梁作用,细胞本身还具有蛋白质合成功能,病毒可以在这些细胞内复制增殖,更有利于病毒通过筛分子转运到新的部位侵染健康细胞。大多数病毒是以完整粒子形式在筛管中随汁液流进行长距离转运,但进入筛分子的方式可能呈多样化,*Comovirus*、*Nepovirus*、*Caulimovirus*、*Tospovirus* 等属病毒都能产生小管结构,以完整粒子形式进入筛分子。但黄瓜花叶病毒(CMV)则不然,Leila 等(1998)报道 CMV 的外壳蛋白、核酸和运动蛋白可能以复合体形式通过分枝的胞间连丝进入筛分子,再装配成病毒粒子进行长距离转运<sup>[20]</sup>。值得重视的是,我们在筛分子内观察到一些病毒样颗粒聚集在细胞壁附近,这些部位能被 BBWV 2 免疫金颗粒特异性标记,表明 BBWV 2 可能是通过分枝状的胞间连丝由伴胞或转移细胞进入相邻的筛管中,并以完整粒子形式通过筛管系统进行长距离转运的。

### 参 考 文 献

- [1] Hull R. Matthews' Plant Virology. ed. San Diego: Academic Press, 2002. 373-411.
- [2] Lucas WJ, Gibertson RL. Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Ann Rev Phytopathol*, 1994, **32**: 387-411.
- [3] Oparka KJ. Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant Sci*, 1996, **1**: 412-418.
- [4] Verver J, Wellink J, Van Lent J, et al. Studies on the movement of cowpea mosaic virus using the jellyfish green fluorescent protein. *Virology*, 1998, **24X**(1): 22-27.
- [5] Lazarowitz SG, Beachy RN. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plant. *The Plant Cell*, 1999, **11**: 535-548.

- [ 6 ] Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK, *et al.* Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, 1996, **8**: 1669 – 1681.
- [ 7 ] Kasteel DT, Perbal CM, Boyer JC, *et al.* The movement proteins of cowpea mosaic virus and cauliflower mosaic virus induce tubular structures in plant and insect cells. *J Gen Virol*, 1996, **77**: 2857 – 2864.
- [ 8 ] Cheng CP, Tzafirir I, Lockhart BEL, *et al.* Tubules containing virions are present in plant tissues infected with *Commelina yellow mottle badnavirus*. *J Gen Virol*, 1998, **79**: 925 – 929.
- [ 9 ] 凌建群, 周雪平, 李德葆. 植物病毒长距离转运的分子机理. *病毒学报*, 2000, **16**(3): 285 – 289.
- [ 10 ] Karin Séron, Anne-lise Haenni. Vascular movement of plant viruses. *MPMI*, 1996, **9**(6): 435 – 442.
- [ 11 ] Zhou XP. *Broad bean wilt virus 2*. Descriptions of Plant viruses. 2002, <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=392>
- [ 12 ] Qi YJ, Zhou XP, Li DB. Complete nucleotide sequence and infectious cDNA clone of the RNA1 of a Chinese isolate of broad bean wilt virus 2. *Virus Genes*, 2000, **20**(3): 201 – 207.
- [ 13 ] 周雪平, 戚益军, 薛朝阳, 等. 蚕豆萎蔫病毒 2 中国分离物全基因组结构及可能的基因表达方式. *生物物理与生物化学学报*, 2001, **33**(1): 46 – 52.
- [ 14 ] 周雪平, 李德葆. 蚕豆萎蔫病毒纯化和病毒蛋白质及 RNA 组份分析. *病毒学报*, 1996, **12**(4): 367 – 373.
- [ 15 ] 李红叶, 周雪平, 洪健, 等. 葡萄扇叶病毒移动蛋白在寄主体内的动态检测和免疫金标记. *微生物学报*, 2002, **42**(5): 550 – 554.
- [ 16 ] Vander Wel NN, Goldbach RW, van Lent JWM. The movement protein and coat protein of alfalfa mosaic virus accumulate in structurally modified plasmodesmata. *Virology*, 1998, **244**: 322 – 329.
- [ 17 ] Taylor RH, Stubbs LL. Broad bean wilt virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 81. 1972.
- [ 18 ] Russo M, Kishtah AA, Martelli GP. Unusual intracellular aggregates of broad bean wilt virus particles. *J Gen Virol*, 1979, **43**: 453 – 456.
- [ 19 ] Hull R, Plaskitt A. The in vivo behavior of broad bean wilt virus and three of its strains. *Intervirology*, 1973, **2**: 352 – 355.
- [ 20 ] Leila M. Blackman, Patra Boevink. The movement protein of *Cucumber mosaic virus* traffics into sieve elements in minor vein of *Nicotiana clevelandii*. *The Plant Cell*, 1998, **10**: 525 – 537.

## Ultrastructural observation related to cell-to-cell movement and long-distance systemic transport on the hosts infected with BBWV 2

HONG Jian<sup>1,2\*</sup>, WANG Wei-bing<sup>2</sup>, ZHOU Xue-ping<sup>2</sup>, HU Dong-wei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Center of Analysis and Measurement, <sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract**: The alteration of ultrastructure in *Pisum sativum* and *Vicia faba* leaf cells infected with B935 isolate of BBWV 2 were investigated by electron microscopy, immunogold-labeling technique. The results showed that the membranous proliferation, virus-formed crystals and tubular structures were found in leaf cells of two hosts. At early stages of infection, the tubules containing virus-like particles associate with plasmodesmata in mesophyll cell. Immunogold particles anti-BBWV 2 were localized to the plasmodesmata modified by tubules passing through them. The membranous proliferation and virus-formed tubules were also found in the parenchyma cells, companion cells and transfer cells of vascular bundle. Some virus-like particles located within sieve tube can be labeled immunogold particles anti-BBWV 2. These suggest that BBWV 2, similar CPMV, produce tubules extending into the plasmodesmata. Virions assembled in the cytoplasm are escorted to the tubular structures through interactions with their MP and are then transported to the adjacent cell. Many 160nm in diameter virus-formed tubules in the cytoplasm, as a special aggregate, not directly relate to cell-to-cell movement; Intact virions are long-distance systemic transported possibly through sieve elements.

**Keywords**: Broad bean wilt virus 2; Cell-to-cell movement; Long-distance transport; Immunogold labeling; Electron microscopy