

用感染病毒细胞超微结构的差异区分 RMV 及 TMV 株系*

徐均焕 冯明光

(浙江农业大学生物科学系 杭州 310029)

摘要 通过透射电镜观察被长叶车前草花叶病毒(RMV)和烟草花叶病毒(TMV)不同株系感染的普通烟叶肉细胞的超微结构,发现两种病毒的粒子分布、内含体类型、被感染细胞超微结构的病变均存在差异。病毒粒子分布有成束、分散、环状、膜包被及角状成层或平行成层排列等类型,存在于细胞质及液泡中,但未见于细胞核、线粒体及叶绿体等细胞器中。内含体的X-小管形状有长杆状、短杆状及颗粒状,数量各异。细胞壁常引起增厚、结构松散及扭曲等变化。叶绿体聚集成堆或分布于细胞边缘,其数量、大小、形状及所含淀粉粒、嗜银颗粒等存在差异,有些还有颗粒状物质积累。线粒体及内质网等在不同株系间也存在差异。本项研究表明,被感染细胞超微结构的差异可作为 RMV 和 TMV 株系区分的依据。

关键词 长叶车前草花叶病毒,烟草花叶病毒,超微病变特征,透射电镜观察

分类号 Q939[.46]

长叶车前草花叶病毒(Ribgrass mosaic virus, RMV)和烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)的形态和生物学特性极为相似,均能侵染十字花科蔬菜,造成严重危害^[1]。虽然国际上早已把 RMV 与 TMV 分开并划分为不同的株系^[2],但由于它们极其相似而经常被混淆。国内已对 RMV 与 TMV 不同株系间的血清关系、外壳蛋白的酶解图谱及多肽的氨基酸序列等方面有了较多的研究^[3~5],但还未见从超微病变的差异来区分各病毒株系的报道。利用超薄切片技术对感染植物病毒的组织细胞学如病毒粒子形态、病毒粒子存在的形式、病毒的侵染、胞间转移、病毒复制合成场所、内含体的存在形式等病毒基本特性进行研究,并利用特征性超微结构病变进行病毒的诊断,已有的研究工作多在病毒种群之间进行^[5~7]。本项研究通过比较 RMV 和 TMV 各株系侵染寄主植物后细胞超微结构的变化及差异,探讨超微病变特征在病毒株系研究中的意义,并为区分 RMV 和 TMV 病毒株系提供细胞病理学依据。

1 材料和方法

1.1 毒源收集

共收集 9 个 TMV 和 RMV 的毒株,包括 TMVI、TMVII(上海油菜分离株),TMVzh(杭州大白菜分离株)、TMVxi(新疆大白菜分离株)、TMVbe(中国科学院微生物研究所普通

* 国家杰出青年科学基金资助。

收稿日期: 1996-07-08

株)、TMVno(浙江省农业科学院番茄分离株)、RMVha(杭州大白菜分离株)、YMV15(北京油菜分离株)和RMVsh(上海大白菜分离株)。上述材料分别接种于鉴别寄主,进行观察记载,各性状均与原报道典型特征相一致。各毒株经摩擦接种感染普通烟(*Nicotiana tabacum*)四叶期植株,接种15d后采集样品,均取第一展开叶中脉附近退绿的感病叶肉组织作为供试材料,并取健康植株相同部位的材料作为对照。

1.2 超薄切片及电镜观察

将上述各感病及健康叶肉组织,切片成1~2 μ m,置于2.5%戊二醛固定液中,抽气至完全下沉,预固定4h,经缓冲液漂洗后,用2% OsO₄固定1h,再经缓冲液漂洗,常规丙酮系列脱水,Epon 812环氧树脂渗透包埋后超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,在日产JEOL-1200EX型透射电镜下观察。

2 结果和分析

2.1 普通烟感染各病毒株系后的症状表现

普通烟种子于3月18日播种于温室灭菌土壤中,幼苗移栽后至四叶期(4月7日),用磨擦接种法接种TMV及RMV各株系。接种3d(4月10日)后,感染RMVsh、TMVI、TMVII、TMVno的植株开始出现退绿斑驳,感染其余株系的植株均无明显症状出现。接种一周(4月14日)后,感染RMVsh、TMVI、TMVII、TMVno的植株退绿斑驳明显,而感染其余株系的普通烟植株均无明显症状。接种二周后,植株均出现系统黄化,感染RMVsh、TMVI、TMVII、TMVzh的较为严重,心叶畸形,黄色斑较大,但感染TMVbe的症状不明显。接种一个月后,感染RMVsh、TMVI、TMVII、TMVzh的植株心叶严重畸形,形成明显的绿岛,其余的均较前者轻,而感染TMVbe的症状最轻,有花叶但无畸形及绿岛等症状。

2.2 感染RMV及TMV各病毒株系超微病变的差异

接种后15d,取感染RMV和TMV的普通烟第一展开叶中脉附近叶肉组织超薄切片,电镜观察发现感染各株系的普通烟叶肉细胞内病毒粒子、内含体存在形式、细胞壁及细胞器超微结构的病变均存在一定差异。

2.2.1 细胞器超微结构病变:感染各病毒株系的细胞内常见细胞器发生不同程度的病变。叶绿体的病变尤为明显,其数量分布、形状、大小等均发生变化,如聚集成堆、数量减少、形状变粗短(图版I-1、2)、基质消失(图版I-1~3、6)、基粒片层减少(图版I-1~3、5~7;图版II-8),并有不规则扭曲(图版I-1)和大量淀粉颗粒、嗜锇颗粒(图版I-1、3~7)及其它特殊物质的积累(图版I-1、2),而正常细胞内叶绿体均分布于细胞边缘,为长梭形,有较小的梭形淀粉粒积累,基质致密,基粒多,基粒片层丰富,极少有嗜锇体颗粒积累。线粒体变化较叶绿体小,感病后一般在数量上有所增加(图版I-3),嗜增粗(图版II-13)。内质网也有不同程度的增多(图版I-2;图版II-13)。这些变化在不同株系间表现一定的差异。感染RMVha的细胞内叶绿体分布及数量正常,但形状不规则,常有较大的淀粉粒及嗜锇颗粒积累,并在淀粉粒周围有较多小颗粒的累积(图版I-1)。感染TMVno的细胞内叶绿体明显变小近圆形,内有较多大颗粒但无淀粉粒及嗜锇颗粒累积(图版I-2)。其他株系感染的细胞内叶绿体的数量及分布正常,形状变成短梭形,内有淀粉颗粒和嗜锇颗粒累积,其中淀粉粒以TMVII、TMVI、RMVsh较多(图版I-5、7),TMVbe、TMVxi次之(图版I-6;图版

II-12), YMV15 最少(图版 I-4); 嗜钺颗粒以 YMV15 最多(图版 I-4), RMVha 次之(图版 I-1), TMVbe, TMVxi, TMVzh 较少(图版 I-6; 图版 II-12), TMVI, TMVII 最少(图版 I-7)。上述两种颗粒的情况正好相反。线粒体数量变化以 TMVbe 最大, 感病后明显增多(图版 I-3), TMVno 次之(图版 II-13), 其他株系较小。线粒体嵴及内质网变化均以 TMVno 最大, 感病后嵴明显增粗(图版 II-13), 内质网数量显著增加(图版 I-2; 图版 II-12), 其他株系变化较小。

2.2.2 病毒粒子的差异: 感染 RMV 及 TMV 各株系的叶肉细胞内均能找到不同排列的病毒粒子, 有聚集成束分布于细胞膜边缘的, 有不规则分散在细胞质及液泡中的, 有平行及角状成层排布的, 也有膜包被后游离到细胞质中的, 但未在叶绿体及线粒体内发现病毒粒子。感染 RMVha, YMV15, RMVsh, TMV I, TMV II, TMVzh, TMVxi 的细胞内病毒粒子常以束生、散生或膜包被形式存在, 其中感病较轻的 RMVha, YMV15, TMVxi 等以束生为主(图版 I-1; 图版 II-12), 感病较重的 RMVsh, TMV I, TMV II 以散生及膜包被后游离到细胞质内为主(图版 II-15), TMVno 主要以散状形式存在(图版 I-2), 而感病最轻的 TMVbe 则以平行或角状成层排列(图版 II-11, 14)。此外, 感染 TMV II 的病毒粒子还以环状形式排列(图版 II-10)。对照叶肉细胞内未见病毒粒子。

2.2.3 内含体的差异: 感染各病毒株系的烟叶肉细胞内均有不同数量及类型的内含体存在, 其中内含体的数量以感染 YMV15 和 TMVno 最多, TMVbe 最少, 其余次之。X-小管在感染 RMVha 和 YMV15 的细胞中为长杆状(图版 II-8), 感染 TMVbe 和 TMVno 的为颗粒状(图版 II-9), 其余均为短杆状(图版 I-7; 图版 II-12)。

2.2.4 细胞壁超微结构差异: 接种不同毒株后, 叶肉细胞常见细胞壁畸形、细胞间隙增大、

表 1 感染 RMV 和 TMV 不同株系的普通烟叶肉细胞超微结构病变的比较

Table 1 Pathological comparison of the ultrastructures of *N. tabacum* mesophyll cells infected with various RMV and TMV strains.

病毒株系	RMVha	YMV 15	RMVsh	TMVI	TMV II	TMVbe	TMVno	TMVzh	TMVxi	CK
感病症状	较轻	较轻	重	重	重	轻	较重	重	较轻	无
病毒数量	轻多	较多	较多	多	多	多	较少	较多	较少	无
形状	束状	束状	散生	束状	束生, 散生	平行	散生	束状	束状	无
	散生	散生	束状	散生	膜包被	或角状		散生	散生	
	膜包被	膜包被			环状	散生				
内含体数量	较多	多	较多	较多	较多	较少	多	较多	较少	无
X-小管	长杆状	长杆状	短杆状	短杆状	短杆状	颗粒状	颗粒状	短杆状	短杆状	
叶绿体形状	变粗短	较正常	稍变短	稍变短	稍变短	稍变短	变小	稍变短	稍变短	长梭形
淀粉粒	1粒大	无或小	多粒小	1至多粒小	1至多粒大	多粒小	无	多粒小	1粒较大	无或较小
嗜钺粒	2粒大	4粒较小	8粒小	1粒较小	1粒较小	6粒较小	无	1粒较小	2粒较大	无
线粒体数量	较少	较少	较少	较少	较少	多	较多	较少	较少	较少
嵴	细而多	细较多	细较多	细较多	细较多	细而多	粗而少	细而多	细而多	细而多
内质网数量	较少	较少	较少	较少	较少	较少	多	较少	较少	较少
细胞壁	略扭曲	略变厚	正常	正常	正常	正常	略变厚	正常	正常	正常
其它	叶绿体内 有小颗粒						叶绿体内 有大颗粒			

* 淀粉粒和嗜钺体数量系10个叶绿体内的平均估计值。The numbers of starch grains and osmiphilic globules were estimated from 10 chloroplasts.

质壁分离等现象。感染 RMVha 的细胞内常产生细胞壁不规则扭曲, 感染 YMV15 和 TMVno 的常使细胞壁增厚(图版 II-8, 13), 其余的均未发现上述畸变现象。感染各毒株的叶肉细胞超微结构的比较结果见表 1。

上述分析结果表明, RMV 和 TMV 不同株系感染植株后细胞内病毒、内含体存在形式和数量、细胞壁及叶绿体等细胞器的超微结构存在明显的差异。

3 讨论

利用特征性超微结构病变进行病毒诊断已有较多的研究^[6~9]。不同病毒情况各异, 如已知病毒的排布形式有结晶状(如 CMV-T 株系)、涡轮状(如 CYMV)及环状(如 BBWV)等。病毒粒子有存在于细胞核内(如 PLRV、BYV、TBSV、PEMV、SBMV、TYMV)、线粒体内(如 TRV、BPMV、BYSV)、叶绿体内(如 TMV 的 U1、U5 株系)或高尔基体内(如 CRSV 及 CAV)。细胞超微结构的病变包括线粒体空泡化(如 CGMMV)、聚集(HMV)、膜系统畸形(BPMV 和 CaMV)等, 叶绿体的聚集成堆(TpMV)、膜上出现小泡(BSMV、TMV-U5、TSWV、PYFV)、淀粉颗粒增大、液泡产生、分解、基粒片层减少(TYMV)及嗜锲体颗粒增大变多等。有些病毒还引起细胞壁不规则增厚、细胞质不规则空泡、核膜上出现小泡等变化。特异性内含体可作某些病毒的识别特征, 如病毒质常作为 Caulimoviruses 或 Reoviridae 的特征, 风轮状内含体常作为 Potyviruses 病毒的特征, 并可根据风轮状结构的微小差别细分到种^[8]。上述研究主要针对病毒种群^[6, 7, 9], 而较少针对不同病毒的株系。关于病毒株系间存在某些细胞病理方面的差异已有一些研究报道, 如 Hatta 和 Francki 观察了 CMV 的 6 个株系和 TAV 的 3 个株系^[10], 发现除了有一点(即沿着液泡膜存在小泡状结构)相同外, 有关病毒粒子存在部位和其他的细胞超微病变都不相同。TMV 多数株系未见其病毒粒子存在于叶绿体内的报道, 但 U1 和 U5 株系例外^[10]。

通过对感染不同 RMV 和 TMV 株系的细胞超微结构的比较观察, 结果表明, 第一, 病毒粒子在细胞内的存在形式可用于区分各株系, 病毒的分布有聚集成束、外膜包被、散状、角状或平行成层排列等, 其中后两种类型只在感染 TMVbe 的细胞内发现。目前角状成层排列方式已在 TMV 的桃珊瑚株系、TMV-U5 株系、BNYVV 及 PCV 等几种 TMV 群感病细胞内发现, 平行成层排列只在 ToMV 感病细胞内发现。病毒可存在于细胞核、叶绿体、线粒体、高尔基体等细胞器内^[11~14]。在本研究中, 各株系病毒粒子均分布在细胞质及液泡中, 未能在叶绿体及线粒体等细胞器内发现; 感病较重的病毒粒子以分散分布为主, 而感病较轻的则以成层及成束排列较多。因此, 病毒粒子可能最早形成于细胞膜, 后用膜包被游离到细胞内, 最后膜破裂分散到细胞质及液泡中。第二, 内含体由众多的 X-小管、核糖体、小泡及病毒粒子所组成, 不同株系间所形成的 X-小管差异明显, 有长杆状、短杆状和颗粒状等, 特征明显可作为株系区分依据。第三, 细胞器以叶绿体变化较大, 感病后叶绿体的数量、分布、大小、形状、所含淀粉粒、嗜锲体及其它物质的积累均存在明显差异。尤其在感染 RMVha 及 TMVno 的叶绿体内存在颗粒状物质, 可用于区分这两个株系。此外, 线粒体、内质网、细胞壁等结构的变化也在各株系间存在或多或少差异。

参 考 文 献

- [1] 盛方镜, 陆关成, 李德葆. 浙江农业大学学报, 1983, 9: 39~46.
- [2] Harrison B D. CMI / AAB Descriptions of plant viruses(set. 9). England: Kluwer Academic Publishers, 1975.152~160.
- [3] 张永平, 李光, 李德葆. 病毒学报, 1987, 3(2): 45~49.
- [4] 徐均焕, 李德葆. 病毒学报, 1992, 8(2): 174~178.
- [5] 朱慧慧, 巫爱珍, 王鸣岐等. 病毒学报, 1987, 3(1): 46~52.
- [6] Francki R I, Milne R G, Hatta T. Atlas of Plant Viruses (Vol II). Boca Raton: CRC Press, 1985.103~131.
- [7] Kurstak E. Handbook of Plant virus Infections. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1981.
- [8] Ewardson J R, Christie R G. *Annu Gen Phytopathol*, 1978, 16: 31~38.
- [9] Matthews R E F. Plant Virology. New York: Academic Press, 1981. 314~507.
- [10] Hatta T, Francki R I B. *J Ultrastruct Res*, 1981, 74: 116~124.
- [11] Betto E, Bassi M, Favali M A *et al.* *Phytopathol Z*, 1972, 75: 193~203.
- [12] Esau K. *Virology*, 1979, 98: 1~8.
- [13] Lawson R H, Hearin S *Virology*, 1970, 41: 30~37.
- [14] Shepardson S, Esau K, Muccrun R. *Virology*, 1980, 105: 379~392.

ULTRASTRUCTURAL DIFFERENCES OF RMV AND TMV INFECTED *NICOTIANA TABACUM* MESOPHYLL CELLS FOR DISTINGUISHING VIRUS STRAINS

Xu Junhuan Feng Mingguang

(Department of Biological Sciences, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract Nine strains of ribgrass mosaic virus (RMV) and tobacco mosaic virus (TMV) from cruciferous and solanaceous plants in different geographic regions of China were used to inoculate 4-leave-old plants of *Nicotiana tabacum* for observation of ultrastructurally pathological changes due to infection of different strains. The samples of the mesophyll cells of the plants 15 d after inoculation were prepared in a routine and examined using transmission electronic microscopy. Characteristic virion arrangement, inclusion forms, and cell structural aberrations were found different among the various strains. The virions were accumulated in cluster, arranged in ring, scattered, irregularly congregated with membrane, and aggregated in angle layer or parallel layer in cytoplasm and vacuoles whereas they were not found in organelles including nuclei, chloroplasts, and mitochondria. The inclusions with bacilliform, club-shaped or granulous X-tubule varied in number and form among the viral strains investigated. The abnormality of cell wall including thickening, collapsing and distortions were also observed among the cells infected by the strains. Other distinguishable changes attributed to the strains included the number, size, shape, and clumping pattern of chloroplasts, and of starch grains and osmiphilic globules accumulated inside. interestingly, some special granules were found accumulated in the

chloroplasts of mesophyll cells infected only by two of the 9 strains examined. Additionally, the increased numbers of mitochondria and endoplasmic reticulum were observed in the cells infected by some of the strains. The results indicate that the ultrastructural changes due to viral infection may be useful for distinguishing various RMV and TMV strains.

Key words Ribgrass mosaic virus (RMV), Tobacco mosaic virus (TMV), Ultrastructurally pathological characteristics, Transmission electronic microscopy

图版说明

Explanation of plates

图版 I

普通烟感染 RMV 和 TMV 不同株系后叶肉细胞超微病变特征: 1. 感染 RMVha 后, 示叶绿体及成束病毒粒子; 2. 感染 TMVno 后, 示叶绿体、线粒体及分散排列的病毒粒子; 3. 感染 TMVbe 后, 示叶绿体及线粒体; 4. 感染 YMV15 后, 示叶绿体; 5. 感染 RMVsh 后, 示叶绿体及成束排列的病毒粒子; 6. 感染 TMVbe 后, 示叶绿体、线粒体及病毒粒子; 7. 感染 TMV II 后, 示叶绿体、内含体及线粒体。标尺均为 1.0 μ m。

图版 II

普通烟感染 RMV 和 TMV 不同株系后叶肉细胞超微病变特征: 8. 感染 YMV 15 后, 示细胞壁、内含体、病毒粒子及线粒体; 9. 感染 TMVno 后, 示内含体; 10. 感染 TMV II 后, 示环状排列的病毒粒子; 11. 感染 TMVbe 后, 示线粒体、平行成层及分散状病毒粒子; 12. 感染 TMVxi 后, 示叶绿体、成束病毒粒子及内含体; 13. 感染 TMVno 后, 示线粒体、内质网及细胞壁; 14. 感染 TMVbe 后, 示角状成层排列的病毒粒子; 15. 感染 YMV 15 后, 示膜包被病毒粒子。Ch——叶绿体; S——淀粉粒; Os——嗜银颗粒; Inc——内含体; V——病毒粒子; Mt——线粒体; CW——细胞壁; Er——内质网。标尺均为 1.0 μ m。

Plate I

Ultrastructural characteristics of *Nicotiana tabacum* mesophyll cells infected with various RMV and TMV strains: 1. Infected with RMVha, noting chloroplasts and clustered virions; 2. Infected with TMVno, noting chloroplasts, mitochondria and scattered virions; 3. Infected with TMVbe, noting chloroplasts and mitochondria; 4. Infected with YMV 15, noting chloroplasts; 5. Infected with RMVsh, noting chloroplasts and clustered virions; 6. Infected with TMVbe, noting chloroplasts, mitochondria and virions; 7. Infected with TMV II, noting chloroplasts, inclusions and mitochondria. Bars 1~7: 1.0 μ m.

Plate II

Ultrastructural characteristics of *Nicotiana tabacum* mesophyll cells infected with various RMV and TMV strains: 8. Infected with YMV 15, noting cell wall, inclusions and virions; 9. Infected with TMVno, noting inclusions; 10. Infected with TMV II, noting virions arranged in ring; 11. Infected with TMVbe, noting mitochondria and virions scattered or aggregated in parallel layer; 12. Infected with TMVxi, noting chloroplasts, clustered virions and inclusions; 13. Infected with TMVno, noting chloroplasts, endoplasmic reticulum, and cell wall; 14. Infected with TMVbe, noting virions aggregated in angle layer; 15. Infected with YMV 15, noting irregularly accumulated virions with membrane. Ch: Chloroplast; S: Starch grains; Os: Osmiphilic globules; Inc: Inclusions; V: Virions; Mt: Mitochondria; CW: Cell wall; Er: Endoplasmic reticulum. Bars 8~15: 1.0 μ m.