

芜菁花叶病毒粒体及寄主细胞内内含体的超薄切片电镜观察*

韦石泉

国际翔

(沈阳农业大学植保系, 沈阳)

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

张哈愚

(辽宁省理化测试中心, 沈阳)

提 要

从沈阳地区分离到侵染大白菜 (*Brassica pekinensis*) 及萝卜 (*Raphanus sativus*) 的芜菁花叶病毒 (Turnip Mosaic Virus, TuMV) 纯化繁殖于大白菜 (小白口) 及萝卜 (长白品种) 上。经约25天采收纯化繁殖的毒原材料, 进行病毒粗提纯, 并做病毒粒子的电镜观察。看到病毒粒体较为疏散清晰, 丝状, 长度多分布在 720nm 之间。另将接种 TuMV 的感病寄主有关部位, 切成小块经固定、系列脱水、环氧树脂包埋后, 制作超薄切片并用电镜观察, 看到病叶、病茎和病根韧皮部细胞内, 均有清晰的风轮状、环状及带状的内含体, 这是马铃薯 Y 病毒组 (Potyvirus) 成员特征之一。

辽宁省大白菜及萝卜的花叶病, 是普遍发生而较为严重的蔬菜病毒病。对于这一病毒病我省过去未有系统的研究和报道。近年沈阳农业大学植保系植物病毒组, 做了毒原分离和生物学性状鉴定等研究项目。确定本省大白菜花叶病毒, 主要毒原系芜菁花叶病毒 (TuMV)。将它接种到普通烟 (黄苗榆及白贝菜 [*White burley*]) 叶上, 表现稍大的褐色局部枯斑; 接种大白菜及油青菜 (*B. chinensis*) 叶上生系统花叶症; 接种苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 叶上生小枯斑, 在千日红 (*Gomphrena globosa*) 叶上生略带红晕的局部枯斑。这些结果和国内、外前人研究的报道是一致的^[1,2,8,11,12]。

将 TuMV 繁殖于大白菜 (小白口) 及萝卜 (长白种) 上, 培育于无虫温室内, 约经 25—30 天收取病叶进行较为简化程序的提纯, 并剪取病叶、茎和块根等部位, 切成小块进行固定、系列脱水和树脂包埋, 烘聚制作超薄切片, 并进行电镜观察, 均获较好结果。兹将研究初步结果整理于后。

材 料 与 方 法

供试毒原 从沈阳地区分离到的芜菁花叶病毒 (TuMV), 在无虫温室内按常规

本文于1986年9月7日收到

*中科院林土所王丽霞、沈阳农业大学植保系王振东、辽宁省理化测试中心田心等同志参加了部分工作。

机械摩擦接种于大白菜（小白口）、油菜及萝卜（长白种）叶上，繁殖 25-30 天收样。

病毒粒子的电镜观察 (1) 采用简化的提纯步骤：病叶去大脉，称 120 克，放 -10°C 保存过夜。次日用搅拌机绞碎榨汁，搅前加入 0.02mol/L 磷酸缓冲液 (PB)， $\text{pH}7.2$ ，搅后双纱布过滤，离心 4000r/m ，20 分钟。留上清液加 20% 氯仿 (CHCl_3) 强振荡 10 分钟，再离心 4000r/m ，20 分钟，留上清液加 6% 聚乙二醇 (PEG, MW 6000) 及 3% NaCl，搅溶放入 4°C 冰箱过夜，再离心留沉淀，并加入少许 0.02mol/L PB， $\text{pH}7.2$ ，含有 0.015mol/L 尿素，使沉淀悬浮。再用 8000r/m 及 $30,000\text{r/m}$ 差速离心，最后所得上清液为粗提纯的 TuMV^[2,3,4,5]。

(2) 电镜观察 将上面制备的粗提材料适当稀释，点样于覆福尔马膜并经碳增强的载网，用 2% 磷钨酸 (PTA) 负染色，用 JEM-100_{EX} 型电镜观察。病毒粒体放大 30000 至 60000 倍。

病茎、叶的超薄切片制备及电镜观察 选取接种发病的大白菜叶片和萝卜的块根、茎及叶片。切成 1mm^2 小块，放入有固定液的小瓶中（固定液为 2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛）。再用 0.1mol/L 二甲胍酸钠缓冲液漂洗 3 次，材料移入 2% 锶酸固定 15 小时，再用上述漂洗液漂洗。然后将材料移入系列乙醇逐级脱水，最后用“501”稀释剂置换乙醇，并用环氧树脂 (Epon, 812) 包埋材料（用 815 更安全，此处仍用 812），待烘聚，选取材料于 LKB-III 型超薄切片机制作超薄切片。捞选切片登于载网，并经 2% 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色，进行电镜观察。

结 果

温室接种 TuMV 的大白菜和萝卜，约 25 天收取病叶、茎和块根。病叶作为粗提纯材料，病叶、茎及块根又进行固定制作超薄切片。粗提纯液登载网进行电子显微镜观察，看到一些视野中病毒粒体比较均匀松散，凝聚现象亦较少，所得结果感觉较为理想。TuMV 粒子丝状，长度分布多在 720nm 左右（参看图 1 及 2）。提纯液经适当稀释后接种苜蓿藜和普通烟（黄苗榆），均有局部枯斑反应。

对感染 TuMV 的大白菜及萝卜的叶、茎及块根，经超薄切片电镜观察，在感病的大白菜叶肉细胞内，以及感病萝卜的叶、茎和块根韧皮细胞内，均观察到比较清晰的典型风轮状内含体，也有环状及带状内含体。这些观察充分证实侵染大白菜和萝卜的毒原是 TuMV，具有马铃薯 Y 病毒组的内含体的形态特征^[3,4,7,10,11]（参见图片 3、4、5、6、7）。

讨 论

芜菁花叶病毒粒子的电镜观察效果，在于材料是否合适。最简易的病叶浸蘸法 (Leaf-dip) 有时起到快速可靠的诊断效果；但因样品夹杂寄主植物细胞成分，常使负染色含糊或因病毒粒体过少，不易得到理想的影像。前人曾指出因 TuMV 粒体在提纯过

程中易于集聚或在初步离心程序中易于流失, 因而提纯方法须复杂些。认为除用差速离



图1 从大白菜病叶榨汁观察的芜菁花叶病毒粒子、标尺100nm

Fig 1 Turnip Mosaic Virus (TuMV) particles from infected chinese cabbage (*Brassica pekinensis*). Bar represents 100nm.

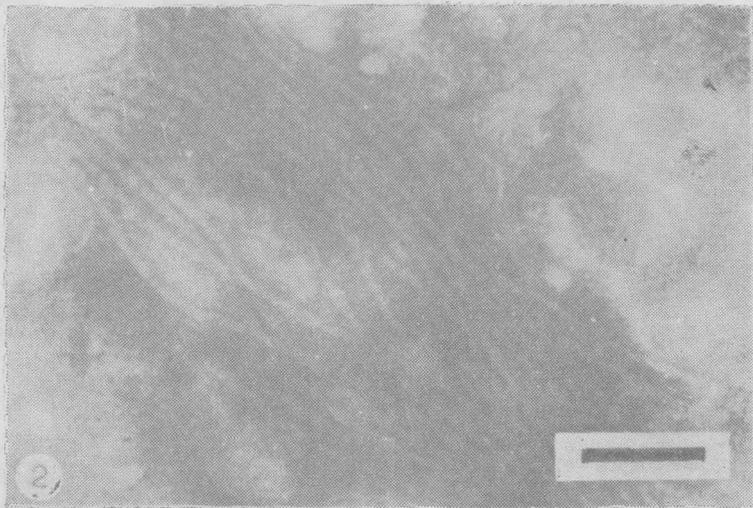


图2 从萝卜病叶榨汁观察的TuMV粒子, 标尺100nm

Fig 2 TuMV particles from infected radish (*Raphanus sativus*). Bar represents 100nm.



图3 大白菜感染TuMV病叶超薄切片, 箭头示风轮状, 环状及带状内含体
 Fig 3 Ultrathin section from the leaf of infected Chinese cabbage. Arrow shows the pinwheel, ring and belt form inclusion bodies. (45000×)

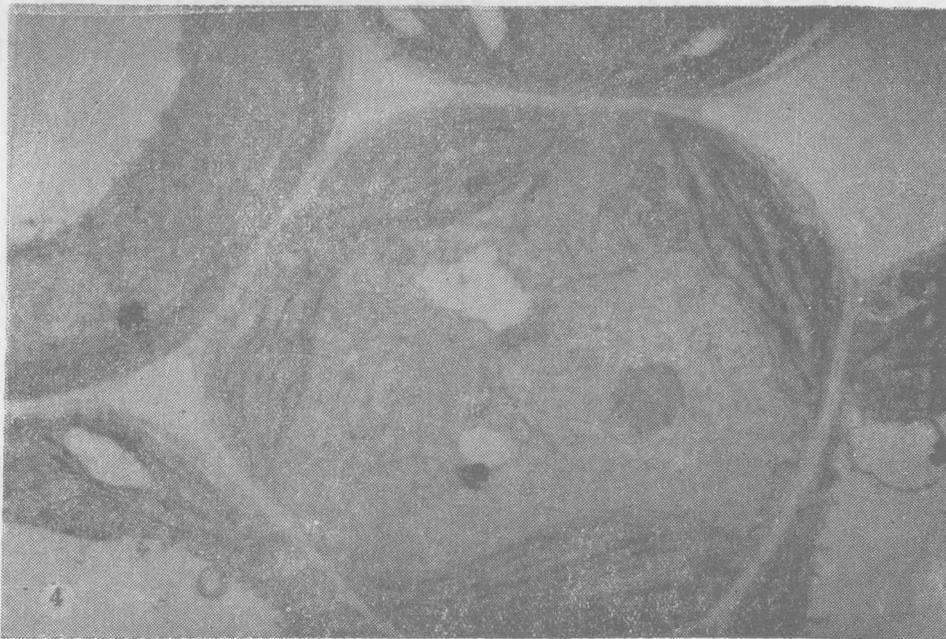


图4 大白菜受TuMV侵染后, 叶肉细胞超薄切片
 Fig 4 Ultrathin section of the mesophyll cells from Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) infected by TuMV. (40000×)



图5 萝卜受TuMV侵染后,根部细胞超薄切片观察,箭头示风轮状、环状、带状内含体
Fig 5 Ultrathin section of the root from the radish infected by TuMV. Arrow shows the pinwheel, ring and belt form inclusion bodies. (37500×)



图6 萝卜受TuMV侵染后茎部细胞超薄切片,箭头示风轮状、环状及带状内含体
Fig 6 Ultrathin section of the stem from the radish infected by TuMV. Arrow shows the pinwheel, ring and belt form inclusion bodies. (37500×)

心外,最好须再用蔗糖密度梯度离心,以便取得纯化的病毒材料^[2,5]。我们采用了上述部分方法,免去因一般条件做不到的蔗糖密度梯度离心过程,所获得的一般提纯材料,滴样于载网上,在电子显微镜视野中,能够选取到较为理想的图形。这种提纯液经稀释接种普通烟及苜色藜,证明有侵染活性。感病的大白菜叶片及萝卜的叶、茎和块根等部的超薄切片,经电镜观察均有清晰的风轮状、环状和带状病毒内含体。因此,试验的



图7 萝卜受TuMV侵染后, 叶部细胞超薄切片, 箭头示风轮状、环状及带状内含体
Fig 7 Ultrathin section of the leaf from the radish infected by TuMV.
Arrow shows pinwheel, ring and belt form inclusion bodies. (37500×)

结果既表明了我们所诊断的大白菜叶病是TuMV, 同时也明确了受侵染各部位内内含体的形态特征^[6,7,10,11]。McDonald等(1974)曾采用冰冻刻蚀电镜观察(Freeze-etch electron microscopy)证实TuMV内含体的三维结构(立体)形态。这种筒状细胞质内含体, 表现出典型的风轮状扇片, 说明属于马铃薯Y病毒组的成员, 如烟草蚀纹病毒(TEV)和PVY均有这样的内含体特征^[9]。这样的电镜观察技术和植物病毒的生物学性状试验相辅相成, 更加确证了鉴定的可靠性。此外, Christie等(1977)亦曾报道过^[6], 植物病毒的内含体, 亦可仅以光学显微镜做简单观察, 但染液必须适当。如将感病叶表皮轻轻撕下, 先浸入TritonX-100液里(曲拉通或聚乙二醇辛基苯基醚), 以便尽早除去某些植物细胞内的质体(plastids), 也许亦能观察到一些内含体。然而超薄切片的电镜观察, 肯定是更加细微、清晰和确实的。

参 考 文 献

- [1] 裘维善、王祈楷, 1957, 植物病理学报3(1): 31—43.
- [2] 徐来升等, 1983, 植物病理学报13(2): 21—29.
- [3] 韦石泉, 1986, 首届全国病毒学学术会议论文集p.270.
- [4] 韦石泉等, 1986, 沈阳地区萝卜花叶病毒的毒原鉴定(摘要), 中国植物病理学会学术论文(下集)(在印刷中)
- [5] Choi Jang Kyung et al., 1978, *Journal of Japan phytopathol.* 34: 440—448.
- [6] Christie R.G. et al., 1977, *Fla. Agric. Exp. Stn. Monograph No. 9*, P.150.
- [7] Edwardson J.R. and Christie, R.G., 1978, *Ann. Rev. Phytopathol.* 16: 31—55.
- [8] Lebeau F.J. et al., 1944, *Jour. Agri. Res.* 70: 347—364.
- [9] McDonald J.G. et al., 1974, *Virology* 58: 200—208.
- [10] McWhorter F.P., 1965, *Ann. Rev. Phytopathol.* 3: 287—312.
- [11] Tomlinson J.A., 1970, Turnip mosaic virus, CMI/AAB, Descriptions, No. 8.
- [12] Tompkins C.M. et al. 1938, *Jour. Agri. Res.* 56: 541—551.

Studies of Electron Microscopy on the Virus Particles and the Inclusion-bodies by Ultrathin Sections for the Detection of Turnip Mosaic Virus

Wei Shih-chuan

(Shenyang Agri.Univ. Shenyang)

Guo Ji-xiang

(Institute of Forestry and Soil Sciences, China Academy of Sciences, Shenyang.)

Zhang Ha-yu

(Center Exp.Station of Physics and Chemistry in Liaoning Province, Shenyang)

We have collected an isolate of turnip mosaic virus which infected Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) and radish (*Raphanus sativus*), and the isolate was identified by the plant virus researching group in Shenyang Agri. Univ. The pure isolate was propagated in netted green house in the University.

The experimental host was Chinese cabbage (Xiao pei kuo) and radish (Longshaped white radish), and was inoculated by hand with the isolate and was used for specimens about three weeks later. For the electron microscopy of virus particles, we have used the crude virus suspensions by a simplified purification procedure. The photograph from the electron microscope showed very clear and sparse filamentous virus particles. The longitude of most virus particles ranged 720nm or so. The other parts of inoculated leaves were cut into very small pieces (1mm²), and fixed in the solution containing 2.5% glutaraldehyde and 2% polyformaldehyde. After washing three times by 0.1mol/L sodium cacodylate, it was transferred into a 2% osmic acid solution for fixation about 15 hours, and treated with a series of ethanol solution and substituted by '501' and embedded in Epon "812". The ultrathin sections were made by LKB-3 type microtome and stained by 2% uranium acetate and lead citrate. The microscope used is of type JEM-100B.

We have found many conspicuous pinwheels, ring like and belt shaped inclusion bodies, which is further identified as Turnip Mosaic Virus (TuMV).