感染大麦黄花叶病毒(BaYMV)的大麦细胞质

内含体及细胞器病变的研究*

陈剑平 阮义理

(浙江省农业科学院病毒实验室,杭州310021)

洪 健

(浙江农业大学电子显微镜实验室,拉达20029)

摘 要

超薄切片电镜观察表明, 在感染大麦黄花叶病毒(BaYMV)的大麦(品种"早熟3号")叶肉细胞中, 液泡周围偶而可看到病毒颗粒束, 在发病后期黄化或坏死的叶肉细胞中, 可见到散布的病毒颗粒。在所有表现症状的病叶叶肉细胞, 表皮细胞和木质部薄壁细胞中均可观察到风轮体、束状体、板状集结体以及膜状体等细胞质内含体, 未见卷简体和细胞核内含体。感病初期细胞中, 细胞质丰富, 核糖体数量增加, 内质网肥大, 随着病毒症状发展, 叶绿体、线粒体等细胞器逐渐肿大, 外膜破裂直至解体。

关键词: 大麦黄花叶病毒 圆柱状内含体 风轮体 京状体 板状集结体 膜状体

由禾谷多粘菌 Polymyxa graminis L。传播的大麦黄花叶病 專(Barley Yellow Mosaic Virus, BaYMV)最早发现于日本^[1],我国自七十年代中 期以来, 在浙江、上海、江苏、安徽和湖北等省市发生, 成为长江中下游及东部沿海地区大麦的重 要病 書^[2]。

关于 BaYMV 感染大麦 Hordeum distichum L. 后所致的细胞质内含体, 日本的 Hibino等^[3]和联邦德国的Huth等^[4]曾作过一些研究,但未对这些内含体的发展过程及细胞病理学进行描述。本文详细报道大麦寄主感染BaYMV后,细胞质中所形成的各种内含 体超微结构及其发展过程和主要细胞器的病变情况。

材料和方法

--、材料 病毒系大麦黄花叶病毒浙江萧山分离物(BaYMV—XSh)。 在本 实验 室大麦黄花 叶病病圃(萧山病土)播种感病大麦品种"早熟3号",于1989年2月采集不同发病程度的大麦病 叶,作为本研究的供试材料,并以健康"早熟3号"植株作为对照。

二、超薄切片及电镜观察 取不同发病程度(花叶、黄化和枯黄)的病 叶, 切片 1~2mm²,

本文于1989年8月6日收到,

*农业部和浙江省自然科学基金会资助项目。

病毒学杂志 2, 1990 Virologica Sinica

置于 Karnovsky, 2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛混合固定液中, 油气至完全下沉, 预固定 2小时, 经缓冲液冲洗后, 再在 2% 四氧化银中固定 2小时, 经缓冲液冲洗,常规乙醇系列 脱水,丙 酮过 渡, Epon 812 环氧树脂渗透和包埋。用 Reichert—lung ULTRACUT E型超薄切片机切片,醋酸 铀和柠檬酸铅双染色,在日产 JEM—1200EX 型透射电镜下观察。

结 果

一、病毒颗粒及颗粒束

感染 BaYMV 的大麦叶肉细胞中含有健康大麦中所没有的病毒颗粒及颗粒束。 病毒颗粒束偶而见于发病初期表现为轻度花叶的大麦心叶,有规律地分布于液泡附近。在纵切面中,长一般为2000nm,个别的长达 4500nm(图1A),在横切面中,病毒颗粒排列呈拟晶格状,颗粒直径 12—13nm,相邻颗粒彼此间隔分离(图1B)。 在表现明显花叶,已展开的大麦病叶中,找不到病毒颗粒束,由于此时细胞质尚较丰富,病毒颗粒较细胞器不易染色,从而很难找到零星分布的病毒颗粒,但在细胞器基本解体的坏死细胞中,可看到游离的线状病毒颗粒(图3),一般长约 1000—3000nm,宽 12—13nm。在风轮体的臂或板状集结体上,未见有病毒颗粒分布。在细胞核中也未找到病毒颗粒。

二、细胞质内含体

1. 风轮体,束状体以及板状集结体 风轮体(pinwheel)和束状体(bundle)是 感染BaYMV的大麦植株中所出现的一种最明显的细胞质内含体,它们分别是一种圆柱状 内含体(Cylindrieal inelusion)的横切面和纵切面。这些内含体在病叶叶肉细胞、木 质部薄壁细胞和表皮细胞中均能见到,其中以叶肉细胞中最为普遍。发病初期的大麦叶 片中所观察到的风轮体较小,直径约为0.4μm,其臂呈辐射状伸展,弯曲程度较小,其 周围还可看到由若干个臂叠合而成的板状集结体(laminated aggregate)(图1A,2,5e), 此时的风轮体多分布于细胞壁或质膜附近。在发病中后期,即表现明显花叶,甚至黄化 的叶片中,风轮体增大,直径达约1μm,臂弯曲程度增大,数量明显增加,常成群出现 于细胞质中,有些风轮体彼此靠拢,甚至相互纠缠在一起,有些还共拥有一个臂而彼此 相连(图4)。在所有风轮体上,均未见病毒颗粒。

检查 222 个清晰而完整的风轮体,中央轴封闭的有85个,开放的有137个(表1)。 中央轴封闭的风轮体,通常有 5~8 个臂,其中央轴直径约为 50nm,臂长约 700nm,臂 厚约 20nm,相邻臂的间隔约 75—100nm。中央轴开放的风轮体,通常只有 2~4 个臂, 臂长、厚及相邻臂的间距均与中央轴封闭的风轮体差下多。

束状体一端平齐,另一端参差不齐。平齐端常与相面内质网相连(图1A,2)。在花 叶叶肉细胞中,束状体长度较为一致,通常达 900-1000nm。

在明显花叶叶肉细胞中,板状集结体的数量比在发病初期心叶中的多得多,长度和厚度也显著增加(图1A, B; 2)。但未见卷筒体(Seroll)。

2. 膜状体 由BaYMV感染所引起的另一种特殊而明显的内含体为膜状体(membranous body)。膜状体显得由许多相互联接的小管组成,其切面似蜂巢状, 呈三维空间 分布。在发病初期的大麦心叶的叶肉细胞壁或质膜附近,可以看到结构简单,周围没有

209

病毒学杂志 2, 1990 Virelegies Sinica



210		周海学 米 本 〒17939賞[sa	2, 1990 Sinice
表 1 Teb.1 Morpho of BeY	大麦叶肉细胞中BaYMV所致 logical characteristics of <u>p</u> MV infected barley	风轮体的形态特征 sinwheels in mesophyll cells	
	观察到的风轮体数 Number of pinwheels	abserved	
背数 Number of arms	中央軸封闭 Central cylindor intect	中央袖开放 Contral cylinder open	•
1	0	; D	
2	0	27	
3	0	60	
4	3	40	
5	20	10	
8	37	0	
7	9	0	
8	7	0	
9	0	0	
	85	137	

限制性膜包被的幼小膜状体,这些幼小膜状体彼此由发达的,呈钟表发条状的内质网联 接(图 5A),随着病害的发展,膜状体逐渐扩大,复杂性也增加, 中间出现 小管和小 饔,在内质网的牵引下,若干个膜状体相互合并,体积也进一步扩大,并从细胞壁附近 移动到细胞质中央或细胞核附近(图 5B)细胞质丰富的区域,而 且常与 风轮体 相伴存 在,与此同时,内质网发达程度逐渐减弱,以辐射状与膜状体相联。在黄化或枯黄的病大 麦叶肉细胞中,所有的复合膜状体都有许多以不同方向伸展的单个膜状体愈合而成,有 的大如线粒体、叶绿体,有的甚至大如细胞核,占据整个细胞的大部分(图5C),直径 达5μm,周围保持与残余的粒面内质网相连,膜状体内部散布的小囊,小管也增大,充 **满细胞代谢产物和其他物质。**

在感染 BaYMV 的大麦叶片表皮细胞和木质部薄壁细胞中也常可 见到与内质网相连 着的膜状体(图6、7)。

三、细胞器的一些变化

感染BaYMV的大麦细胞中, 早期所含的叶绿体、线粒体、核和其 它细胞 器的形态 和数量与对照中差不多。随着病害的发展,细胞器也出现了一些变化,其中尤以叶绿体 和线粒体最为明显。首先,叶绿体发生肿胀、基粒片层排列轻度紊乱,出现大量嗜锇颗 粒(图8),接着,外膜局部破裂(图8中大箭头所指),最后,叶绿体基质流出,基粒 片层进一步松散,叶绿体解体,基粒碎片散布于细胞质中(图3、8)。线粒体的变化过 程类似于叶绿体。在发病初期的大麦叶肉细胞中,由于蛋白质合成旺盛,细胞质中的核 糖体数量剧烈增加(图 1A 中小箭头所指),但在发病中后期的叶肉细胞中,核糖体消 失。病细胞中,内质网膨大,细胞质中的小囊泡数量也增加,空泡化,有的里面含有类 似于核酸的纤维状物质。细胞核没有明显变化。在大麦病组织的叶肉细胞中,可以看到

病毒学杂志 2, 1990 Virologics Sinics

+

处于不同衰退时期的细胞器,但是没有看到病毒颗粒或其他内含体与细胞器之间的直接关系。

在正常大麦叶肉细胞中,则未见上述细胞器的异常现象(图9)。



2							病毒学 杂志 Virologicu	2, 1990 Sipics				
		图5-	A-5C (肉大麦叶肉	细胞中膜状体的	的发展过程						
		[হা 6	病叶表)	皮细胞中的	膜状体							
		图7	病叶木	贡部薄壁 筆	胞中的膜状体							
		[] 8	病叶叶	肉细胞中处	于不同解体阶段	及的叶绿体						
		图9	健康大調	麦叶肉细胞	超薄切片							
CH—P		-叶绿体	C—基粒		M线粒体	\$ ER <i>p</i> [†]	ER—内质网					
	₹А—液	泡	CW—细	咽胸壁	VP—病毒啊	页粒 PW-	一风轮体					
		₽──東×	伏体	la—板	状集结体	mb膜体状						
	除注明的	内外, 其余	桥尺均示	1µm								
	Fig,5A	5C, D	evelopmi	ent of me	mbranous bod	ies in barley n	nesopbyll					
		coll infected with BaYMV										
	Fig.6	ig,6. Membranous hedies in an epidermal cell of symptem bearing										
		barley l	CEVO									
	Fig.7.	Membranous bodies in a xylem parenebyma cell of symptom-bearing										
		barley h	eave									
	Fig.8,	, Chloroplasts at stoges of different degeneration in a mesophyll										
		cell of BaYMV infected barley leave										
	Fig.9.	Ultrathin section of healthy barley cell										
		CH-Chloroplast, G-Granum, M-Mitochendria										
		ER—Endoplasmic reticulum, VA—Vacuole, CW—Cell wall,										
		VP—Virus particle, pw—pinwheel, b—hundle,										
		la-lumi	nated ag	grogate,	mb-membran	ious bedy						
		Bars in	the mics	cegraphs 1	epresent] μα	n if net specifi	ie d.					

讨 论

在提纯制剂中, BaYMN 颗粒具有两种长度(370 和 550nm)的颗粒^[4-0], 但在超薄 切片中, 所观察到的病毒颗粒长度为 2000nm, 甚至达 4500nm, 所以, 上面所引用的 BaYMV 有二个长度,可能是病毒颗粒断裂后的结果,病毒颗粒长 度可能是 上二个长度 之和甚至更长。当然,在超薄切片中所见的超长病毒颗粒也存在着病毒颗粒头尾相连或 部分重叠的可能性。至于 BaYMV 是否是一种具有多种长度的病毒还是仅仅由 断裂或凝 聚的颗粒组成的病毒,这个有趣的问题仍然尚未解决。迄今,我们还不能分别分离出较 长和较短的颗粒进行有关性质的比较。

感染 BaYMV 的大麦植株, 在一定的发病阶段中,所观察到的风轮体在其大小和形态方面总是一定的,其臂数在初期为8个,以后可能合并或脱落,使臂数减少。和其他病毒所致的风轮体相比,表明每种病毒的风轮体臂数一定^[7]。

风轮体与病毒复制和装配的关系尚不清楚⁽³⁺⁹⁾,对其形成的详细过程也尚未取得一致的意见,有人报道它们是在细胞质的小泡里形成的⁽¹⁰⁾,也有人认为是在细胞质膜上形成,然后移入细胞质中⁽⁷⁾,Lawson等⁽¹¹⁾提出在质膜和风轮体中央轴之间存在着一种直接关系。另一种假设认为风轮体形成于增生的内质网区⁽¹²⁾。我们基本同意李学湛等⁽¹³⁾的观点,认为风轮体形成于质膜附近的内质网扩散增殖区,是内质网的一种衍生

前時学杂志 2, 1996 Virelogies Siniss

Ł.

213

物,并在细胞中不停地运动,向细胞质中的一定位置靠拢。

膜状体是一种特殊的细胞质内含体,,至今只见于BaYMV,小麦黄花叶病毒(WYMV) ⁽³⁾,小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)⁽³⁾,水稻坏死花叶病毒(RNMV)⁽³⁾ 以及夏南 瓜 黄 色斑点病毒(ZYFV)⁽¹⁴⁾,其中前4种均为真菌传线状病毒。Langenberg 等⁽¹⁵⁾提出膜状 体可能与风轮体或束状体的发育有关,但我们觉得这似乎缺乏证据。从我们的研究结果 看,膜状体的形成与内质网有关。

BeYMV 感染所致最明显症状是叶片量黄色花叶,叶绿体破坏 是造成叶片发黄的主要原因,这从本实验病叶中叶绿体病变过程,进一步得到证实。在另外一些引起花叶或黄化的病毒病中,看到淀粉粒的积聚,但本研究未见到类似现象,这是否是本病的真实情况,还是染色方法问题?尚需进一步研究。

参考文献

(1) Incove T. et al., 1975, CMI/AAB Descrip, of Plant Virus No. 172

〔2〕 阮义運等, 1987, 大麦通讯 4:1

(3) Ribino H, et al., 1981, Ann. Phytopath. Soc. Japan 47:510

(4) Hath W. ot al., 1984, Phytopath, Z., 111: 37

(5) 陈剑平等, 1988, 浙江农业科学 5:239

(6) Usugi T. et al., 1976, Ann. Phytopath. Soc. Japan 42:12

(7) Hooper G. R. et al., 1972, Virology 47: 884

(8) Edwardson J. R., 1986, Amer. J. Bot. 53 : 359

[9] Edwardson J. R. et al., 1968, Virology 34: 250

(10) Lawson R. H. et al., 1971, Virology 48:454

(11) Lawson R. H. et al., 1971, Virology 44: 454

(12) Hunst P. L. et al., 1983, Phytopathology 73 + 615

[13] 李学湛等, 1987, 植物病理学报 17(4):235

(14) Martelli G. P. et al., 1981, Phytopath. Mediterr. 20: 193

(15) Langernberg W. G. et al., 1973, Virology 55 : 218

Cytoplasmic Inclusions and Organelle Alternations in Barley Infected by Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV)

Chen Jian-ping Ruan Yi-li

(Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Hong Jian

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Examination of ultrathin sections with an electron microscope revealed that aggregates of filamentous virus particle were seldom found, which always distr buted near vacuale membrane in mesophyll cells, and sometimes scattered si-

· 病毒学杂志 2, 1960 Virologica Sintea

ngle virus-like particles were also seen in some yellowing and necrotic mesophyll cells of barley (Hordeum distichum L.cv. Zhaoshu No.3) plants infected by barley yellow mosaic virus(BaYMV). A variety of cytoplasmic inclusions included pinwheels or bundles, laminated aggregates and membranous bodies, but no any scrolls and nuclear inclusions, were appeared in mesophyll, epidermal and xylem parenchyma cells of symptom-bearing barley leaves. Infected cells at early infection were characterized by a voluminous cytoplasm containing a high ribosome content and hypertrophied endoplasmic reticulum. As the disease progressed, a considerable degeneration of cellular constituents was evident, chloroplasts and mitochondria were gradually disrupted and cells filled with debris of these organelles and with remnants of the disease-associated inclusions.

Key words, Barley Yellow Mosaic Virus Cytoplasmic inclusion Pinwheel Bundle Laminated aggregate Membranous body

_t

214