

93, 8(2)
119-124

6042(1)

植物病毒病的风轮状内含体

王卉 阮义理

(浙江省农业科学院病毒学研究室, 杭州310021)

5432.41

Plant Viral Pinwheel Inclusion Bodies

Wang Hui Ruan Yili

(Virology Laboratory, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

关键词: 马铃薯Y病毒组 大麦黄花叶病毒组 风轮状内含体
Key words: Potyvirus Bymovirus Pinwheel inclusion

植物病害, 病毒病

在目前公认的34个植物病毒组中, 有25个病毒组的病毒能在寄主植物中产生内含体。能否产生内含体及内含体的形态结构是病毒组的主要特征之一^[1]。植物病毒内含体最早由steere williams^[2]于1953年在感染烟草花叶病毒(TMV)的烟草叶片中观察到, 呈晶板状(Crystalline plates)。以后人们渐渐认识到内含体与病毒病害密切相关, 但从发现至今近40年内, 对内含体的产生及其功能仍不很清楚。

马铃薯Y病毒组的所有成员侵入寄主植物后在寄主细胞质内能产生形态结构特殊的风轮状内含体^[3], 这是马铃薯Y病毒组有别于其它植物病毒组的最主要的特征之一。马铃薯Y病毒组是最大的一个植物病毒组, 已有55个明确成员^[4]和98个可能成员^[5], 在经济上非常重要。按照传毒介体种类, 马铃薯Y病毒组暂分为4个亚组, 即蚜虫传亚组、螨传亚组、粉虱传亚组和真菌传亚组。最近, 根据传播介体、病毒粒子形态和组分、核酸组分及血清学关系等特点, 建议将真菌传亚组的大麦黄花叶病毒(BaYMV)、小麦黄花叶病毒(WYMV)、小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)、燕麦花叶病毒(OMV)、水稻坏死花叶病毒(RNMV)等5个成员从马铃薯Y病毒组中划分出来, 新成立大麦黄花叶病毒组^[4, 6], 这个组的所有成员也都能在寄主细胞质内产生风轮状内含体^[7, 8, 9, 10], 这个组的病毒能引起禾谷类作物重要的病毒病害。

植物风轮状内含体最早由Cremer等报道^[11], 他们在水仙黄条病毒(NYSV)感染的水仙叶片细胞内发现这一特殊结构, 不久Rubio-Huertos等^[12]和Matsui等^[13, 14]在烟

本文于1992年1月29日收到, 8月19日修回。

草蚀纹病毒 (TEV) 侵染的烟草细胞内发现有风轮状内含体。在各种植物病毒内含体中, 风轮状内含体的意义最大, 研究也最多。

一、风轮状内含体形态结构及种类

Cremer等^[11]观察了一系列超薄切片后认为风轮状内含体是膜状的, 结构如垫子, 外廓不规则并逐渐变化。这种内含体的超微结构是有多种构造, 分别由一个轴心及从轴心放射状伸出来的弯曲的臂组成。在二维空间内观察到的形态结构有“稠密带”(dense bands)、“卷状体”(curled inclusions)、风轮体(pinwheels)、“束状体”(bundles)、“层片集结体”(laminated inclusions)、“环状体”(circular inclusions); 在三维空间内观察到的形态结构有“板状体”(plate-like inclusions)、“管状体”(tubes)、“卷筒体”(scrolls)、“柱状体”(cylindrical inclusions)、“片状体”(lamellar inclusions)。最常用的形态结构术语是“柱状体”、“风轮状体”、“卷筒体”和“层片集结体”^[5]。

细胞质内含体大量存在于感病寄主的叶肉细胞中, 在表皮细胞及木质部薄壁细胞中也有。柱状体较为常见, 存在于细胞质膜附近或细胞核周围。柱状体的纵切面为束状体, 横切面为风轮体。大麦黄花叶病毒^[16]、小麦黄花叶病毒和(或)小麦梭条斑花叶病毒^[14]的风轮体在发病初期较小, 直径约 $0.4\mu\text{m}$, 中心轴多为闭合的, 每个风轮体约有5—8个呈辐射状伸展较直的臂。到发病后期, 风轮体个体增大, 直径达到约 $1\mu\text{m}$, 数量增加, 常成群出现, 中心轴开放的风轮体增多, 臂数减少, 大多为2—4个, 臂弯曲度明显加大, 呈半圆形。同一群内的各风轮体较靠拢, 常平行排列, 有时甚至缠绕一起, 而相邻群的风轮体常垂直或成一定角度排列。

马铃薯Y病毒组的不同成员产生的风轮体形态差异很大。Edwardson根据内含体的形态将这一病毒组分成4个亚组^[17,18], 能产生风轮状体和卷筒体的病毒属亚组I; 产生风轮状体和长板状体的属亚组II; 产生风轮状体、卷筒体和长板状体的属亚组III; 产生风轮状体、卷筒体和短弯板状体的属亚组IV。卷筒体和板状体是由风轮状体弯曲的臂变形或合并而成。虽然风轮状内含体的形态有助于识别马铃薯Y病毒组的成员, 但根据内含体形态对马铃薯Y病毒组的成员进行亚组的系统分类不很可靠。例如, 有些马铃薯Y病毒组成员间有血清学关系, 但依照Edwardson的分类标准分在不同的亚组, 而且有时也很难仅从形态上区分它们^[17,18]。另外, 若根据内含体形态, 有些病毒的不同株系会被划分为Edwardson的不同亚组^[17,20]。因此现在不常采用Edwardson的分类方法。但是风轮状内含体的特殊结构对于诊断马铃薯Y病毒组和大麦黄花叶病毒组成员侵染引起的植物病毒病害有很大帮助。

二、风轮状内含体的产生

最初人们不明白风轮状内含体究竟是植物对病毒侵染后的反应产物, 还是病毒自身的产物, 或者是病毒粒子本身。近来人们才认识到细胞质风轮状内含体的产生是由病毒基因组编码产生的, 因此: (1)只有马铃薯Y病毒组和大麦黄花叶病毒组的成员能产生风轮状内含体; (2)同一种病毒在不同科、不同种的寄主植物内产生同一形态特征、具

有相同抗原性的风轮状内含体,不同病毒在同一寄主内产生不同形态的风轮状内含体^[17]; (3)同一病毒在寄主植物和介体真菌中产生同一形态特征的风轮状内含体^[21]; (4)风轮状内含体蛋白在血清学上与病毒外壳蛋白无关^[18,20]; (5)马铃薯Y病毒组成员的核酸体外转入兔——网状细胞后在转移产物内能检测到风轮状内含体蛋白^[24]。现代分子遗传学的发展进一步证明风轮状内含体由病毒基因组控制。例如已知大麦黄花叶病毒的RNA 1控制风轮状内含体产生^[15]。

关于风轮状内含体的起源及产生一直为人们所感兴趣。起初人们发现风轮状内含体与植物细胞的膜系统有关,这些膜系统包括细胞质膜和内质网^[21,27,28]。Hopper和Wisese^[29]观察小麦梭条斑花叶病毒侵入小麦叶片细胞后,风轮体在细胞双层膜表面形成。Lawson等观察到细胞质膜是甘薯叶片受甘薯褐裂病毒(SPRCV)感染后风轮体的产生部位,一些风轮体的开放轴心常整齐地排列在细胞质膜上^[20,30]。Andrews^[31]发现烟草感染TEV后,在根尖组织细胞质膜周围存在风轮状内含体,后期风轮体游离于细胞质中,臂数增加,长度增长,有的臂脱落并合并,而且出现开放轴心。Murphy等^[32]用烟草花叶病毒(TMV)接种烟草原生质体,然后观察原生质体的超薄切片,发现束状体与原生质膜连结在一起,风轮状体常远离原生质膜,有时风轮状体与核糖体和内质网非常靠近。Baunoch等^[33]用烟草蚀纹病毒接种烟草后电镜检查发现内含体开始以束状体的形式与胞间联丝附近的细胞质膜相联系,侵染后期以风轮状体存在于细胞质内。在感染大麦黄花叶病毒、小麦黄花叶病毒和小麦梭条斑花叶病毒的叶片内也发现内含体开始形成于细胞质膜或其附近的内质网上^[15,11]。由此可见细胞质膜是风轮状内含体的形成部位。

关于风轮状内含体的产生时间,Goffinet等报道烟草叶肉原生质体接种马铃薯Y病毒(PYV)48小时后,在超薄切片中可观察到柱状体^[34]。Murphy等^[35]报道烟草叶肉原生质体接种烟草花叶病毒15—30小时后在超薄切片中可观察到束状体和风轮状体,其柱状体蛋白抗血清用免疫金颗粒成金联A蛋白标记,然后处理超薄切片,发现烟草叶肉原生质体接种病毒10小时后就有柱状体蛋白。可见风轮状内含体在病毒侵入寄主后不久就开始形成。

三、风轮状内含体的提纯和免疫分析

迄今已有许多风轮状内含体的提纯方法^[35,36,37]。目前大多数提纯方法最后步骤多采用蔗糖密度梯度离心,但这一方法很难将风轮体分离成一条区带,因为风轮体大小不一致^[38]。据报道在提纯后期降低有机溶剂用量,并在蔗糖-酒石酸钾密度下进行等密度离心,可分离到一条单一的等密度区带^[39]。一般来说病毒产量高,则风轮状内含体产量也高,通常100克新鲜病组织提取的内含体产量为2—40毫克,内含体产量的多少取决于寄主和病毒,有些病毒提纯内含体的产量比病毒粒体的产量还高^[40]。

提纯的风轮体用SDS-PAGE分析表明不同病毒的风轮体蛋白分子量不同,这正如不同病毒外壳蛋白分子量不同一样^[40],因为它们都是各自病毒核酸编码的蛋白。所有马铃薯Y病毒组成员和大麦黄花叶病毒组成员产生的风轮状内含体蛋白分子量大约都在65—75kd之间,大约是病毒外壳蛋白分子量(32—40kd)的2倍^[36,41]。

可用风轮状内含体的抗血清分析病毒与其内含体之间的关系及分析内含体的产生,也可用来分析马铃薯Y病毒组各成员的内含体之间的关系^[32,41,43,45]。有些马铃薯Y病毒的风轮状内含体之间有血清学关系^[23],但大多数没有血清学关系^[44]。人们发现大多数病毒风轮状内含体蛋白与病毒外壳蛋白及寄主植物蛋白之间无血清学关系^[22,30]。但Langenberg^[42]发现小麦线条花叶病毒(WSMV)和小麦梭条斑花叶病毒的外壳蛋白与它们的风轮状内含体蛋白关其抗血清有一定联系,这种病毒外壳蛋白与风轮状内含体特异性的结合,在病毒通过细胞质膜的胞间运输有一定作用。Langenberg^[43]还发现WSMV的风轮状内含体能被大麦条纹花叶病毒(BSMV)和WSMV的抗血清标记,这表明BSMV及WSMV与WSMV的风轮状内含体有某种联系。

四、风轮状内含体的功能

由于对风轮状内含体的功能缺少研究,人们至今仍无全面的认识。根据观察到的一些现象,推断风轮状内含体的功能主要有两个。

(1)在病毒从细胞到细胞的运输上的作用。风轮状内含体常出现在细胞质膜附近,并常与细胞质膜相连,而且风轮状内含体上常吸附有病毒颗粒^[30,31],因此风轮状内含体在运输病毒上起作用。但在胞间联丝内并未找到风轮状内含体蛋白,也未找到外壳蛋白,因此可能病毒以核酸形式在胞间连丝内运输^[41]。Langenberg^[42]发现WSMV的风轮状内含体除了与WSMV有联系外还能吸附BSMV,因此他推测风轮状内含体除了运输自身的病毒颗粒外,还可能运输另外一些马铃薯Y病毒组和大麦黄花叶病毒组的成员,甚至运输一些完全没有亲缘关系的病毒颗粒。

(2)在病毒复制上的作用。最近研究发现风轮状内含体蛋白的氨基酸顺序和参与病毒复制的蛋白的氨基酸顺序具有同源性,尤其是与蜗牛酶相关蛋白具有同源性^[45]。

最近,Reinke等^[44]采用原位定位杂交技术和胶体金免疫电镜技术研究花椰菜花叶病毒(CaMV)和烟草花叶病毒(TMV)的基因产物与寄主植物的关系,发现寄主植物体内的蛋白泛激素(ubiquitin,一种参与细胞蛋白质水解的关键物质)与CaMV和TMV的内含体联结在一起,而病毒负链RNA(病毒复制的关键成分)并不存在于内含体上。他们认为CaMV、TMV内含体是降解蛋白质的场所,并不参与病毒核酸的复制。他们甚至推断CaMV、TMV内含体是寄主细胞受病毒侵染后产生保护作用的场所。Gaspar等^[41]也发现泛激素与TMV的内含体联结在一起。他们对这些内含体(虽然不是风轮状内含体)功能的新发现、新观点对于进一步正确了解内含体的功能有一定的促进作用。

五、展望

国际上60—70年代对植物病毒内含体的形态结构研究较多,但对内含体的产生及功能还不很清楚。风轮状内含体蛋白是由病毒基因组编码的,然而有人在无病毒的植物细胞中也发现有类似风轮状内含体的结构,并认为这些结构是植物组织对特殊培养条件的反应产物^[43,46]。这些结构不是病毒编码产生的风轮状内含体,但这些现象使人们更感兴趣研究风轮状内含体的产生与功能^[5]。

许多马铃薯Y病毒组蚜虫传、粉虱传和螨传亚组的成员,在植物体内都能找到风轮

状内含体,但在传毒介体内尚未发现有内含体。随着研究技术的改进,可能从介体发现一些能在其上增殖的病毒的内含体。目前已在真菌介体内已找到了大麦和性花叶病毒的风轮状内含体^[11]。随着研究的深入,传毒介体内风轮状内含体的产生及其功能将会引起人们的兴趣,对风轮状内含体也将会有全面、正确的认识。

免疫电镜技术的不断改进和分子生物学的迅速发展,例如通过构建病毒核酸的风轮状内含体基因突变体,人们已能从现象到本质研究风轮状内含体的产生时间、部位、功能及其与病毒的关系,最终人们将会真正认识内含体在病毒作为病原物引起植物病毒病中的作用。

参 考 文 献

- [1] Matthews, R.E.F., 1982, *Intervirology*, 17: 199.
- [2] Steere, R.L., Williams, R.C., 1953, *Am.J.Bot.*, 40: 81.
- [3] Brandes, J.et al., 1965, *Advan.Virus Res.*, 11: 1.
- [4] Murrant, A.F.et al., 1989, CMI/AAB, *Descriptions of plant Viruses*, Set 22.
- [5] Francki, R.I.B.et al., 1985, *Atlas of plant Viruses*, Vol.11, p183.
- [6] Usugi, T.et al., 1989, *Ann.Phytopathol.Soc.Japan* 55: 26.
- [7] Inouye, T.et al., 1975, CMI/AAB, *Descriptions of plant Viruses*, No.143.
- [8] Hebert, T.T.et al., 1975, CMI/AAB, *Descriptions of plant Viruses*, No.145.
- [9] Inouye, T.et al., 1977, CMI/AAB, *Descriptions of plant Viruses*, No.172.
- [10] Slykhuis, J.T., 1976, CMI/AAB, *Descriptions of plant Viruses*, No.167.
- [11] Cremer, M.C.et al., 1961, *Proc Eur.Reg.Conf.on Electron Microscopy*, Delft, 2: 974.
- [12] Rubio-Huertos, M.et al., 1964, *Virology*, 24: 84.
- [13] Matsui, C.et al., 1964, *Virology*, 22: 40.
- [14] Matsui, C.et al., 1964, *Virology*, 23: 346.
- [15] 陈剑平, 阮义理, 1990, *病毒学杂志* 2: 207.
- [16] 阮义理, 陈剑平等, 1991, *植物病理学报* 21(3): 165.
- [17] Edwardson, J.R., 1974, *Fla.Agric.Expt.Stn.Monogr.Ser.No.4*, p398.
- [18] Edwardson, J.R., 1984, *Phytopathol.* 74: 1111.
- [19] Moghal, S.M.et al., 1976, *Virology*, 73: 350.
- [20] Chamberlain, J.A.et al., 1977, *J.Gen.Virol.*, 36: 297.
- [21] Chen Jianping, et al., 1991, *Ann.Appl.Biol.*, 118: 815.
- [22] Shepard, J.F.et al., 1969, *Virology*, 38: 185.
- [23] Purcifull, D.E.et al., 1973, *Virology*, 55: 275.
- [24] Dougherty, W.G., 1980, *Virology*, 104: 174.
- [25] Kashiwazaki, S.et al., 1990, *J.Gen.Virol.*, 71: 2781.
- [26] Barnett, D.W.et al., 1971, *Phytopathol.*, 61: 926.
- [27] Harrison, B.D.et al., 1971, *J.Gen.Virol.*, 10: 71.
- [28] Lawson, R.H.et al., 1971, *Virology*, 46: 453.
- [29] Hooper, G.R.et al., 1972, *Virology*, 47: 664.
- [30] Lawson, R.H.et al., 1971, *Virology*, 44: 454.
- [31] Andrews, J.H.et al., 1974, *Phytopathol.*, 64: 1234.
- [32] Murphy, J.F.et al., 1991, *Phytopathol.*, 81: 371.
- [33] Baunoch, D.A.et al., 1991, *J.Gen.Virol.*, 72: 487.
- [34] Goffinet, D.et al., 1979, *Parasitic*, 35: 25.
- [35] Hiedert, E.et al., 1971, *Virology*, 43: 638.

- [36] Hiebert, E. et al., 1973, *Virology*, 56 : 349.
- [37] Lima, J. A. et al., 1979, *Phytopathol.*, 69 : 1252.
- [38] Hiebert, E. et al., 1984, *Methods in Virology*, 8 : 225.
- [39] Chiyoichi Noda, et al., 1988, *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 54 : 319.
- [40] Hammond, J. et al., 1988, *J. of Virol. Methods*, 20 : 203.
- [41] Brakke, M. K. et al., 1987, *J. Gen. Virol.*, 68 : 281.
- [42] Langenberg, W. G. 1986, *J. Gen. Virol.*, 67 : 1161.
- [43] Langenberg, W. G. 1988, *Phytopathol.*, 78 : 589.
- [44] Langenberg, W. G. 1991, *J. Gen. Virol.*, 72 : 493.
- [45] Linn, S. et al., 1989, *Gene*, 82 : 357.
- [46] Reinke, K. J. et al., 1991, *Phytopathol.*, 81 : 1306.
- [47] Gaspar, J. O. et al., 1990, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3 : 182.
- [48] Wilson, H. J. et al., 1974, *J. Cell Sci.*, 15 : 57.
- [49] Wilson, H. J. et al., 1976, *Arch. Virol.*, 51 : 347.