

61-68

15957(11)

第11卷第1期
1996年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 11 No. 1
Mar. 1996

不同抗性的榨菜在芜菁花叶病毒感染后细胞超微结构的研究

徐均焕 李德葆 盛方镜 方月鲜

(浙江农业大学生物所, 杭州 310029)

S 436.349

A **提要** 超薄切片观察表明, 在三种感染芜菁花叶病毒的榨菜叶肉细胞内均发现有各种形状的内含体和病毒粒子的存在。内含体形状有风轮状、束状、管状、环状和板状聚集体, 且不同抗性的榨菜品种细胞内所含的内含体数量、种类及所占的比例亦不同, 抗性较弱的 90-149 榨菜品种叶肉细胞内内含体数量较多, 以管状及环状内含体所占比例为多, 束状及风轮状内含体所占比例较少; 抗性较强的 90-139 榨菜品种叶肉细胞内内含体数量较少, 且以束状及风轮状内含体所占比例较多, 环状及管状内含体所占比例较少。而抗性中等的 90-146 榨菜品种叶肉细胞内内含体数量及所占比例介于上述两者之间。病毒粒子也以易感病的 90-149 榨菜叶肉细胞内含量最多, 均以束状或拟晶格状存在。此外感病初期细胞内线粒体及粗面内质网数量有不同程度的增多, 且以易感病的品种叶肉细胞内这些细胞器增加明显, 但健康植株内以抗性较强的品种含这些细胞器较多。随着病毒症状的发展, 叶绿体畸形, 肿大, 基质消失, 外膜破裂直至解体。

关键词 芜菁花叶病毒, 内含体, 超微结构

榨菜病害, 病毒病;

榨菜是一种重要的蔬菜作物, 近年来, 由于芜菁花叶病毒病 (Turnip Mosaic Virus, TuMV) 的侵染^[1-3], 成为我国榨菜高产、稳产的主要限制因素, 杭州地区盛发期 (2~3 月份) 田间发病率为 10~40%, 减产 20~40%, 造成严重的经济损失。

目前对芜菁花叶病毒病的病原鉴定^[1,3,4], 快速诊断^[5,6], 细胞超微结构^[10,11], 抗病性^[7]等方面研究较多, 但对不同抗性的榨菜品种感染 TuMV 后细胞病理变化的差异与抗病品种的选育关系等方面的研究尚无报道。本研究试图在这方面作些研究, 通过比较, 了解榨菜细胞抗性的一些基本特征, 从而为抗病品种的选育提供细胞学的基础。

材料和方法

1 材料

芜菁花叶病毒为杭州榨菜分离物。

三种榨菜品种由本校园艺系蔬菜教研组提供; 其中 90-149 为常规榨菜品种, 易感病, 大田发病率为 38%。90-146 为中抗榨菜品种, 大田发病率为 20%、90-139 为高抗榨菜品种。大田发病率为 11%。

各榨菜品种于 4 叶期经摩擦接种感染芜菁花叶病毒, 接种 30 d 及 60 d 后分两次采集样品, 各取不同榨菜品种在心叶中脉附近的感病叶肉组织作为本研究的供试材料, 以健康植株的相同部位作为对照。

2 超薄切片及电镜观察

将上述各感病叶肉组织, 切片成 1~2 nm, 置于 2.5% 戊二醛固定液中, 抽气至完全下沉, 预固定 4 h, 经缓冲液漂洗后, 再用 2% O₃ 固定 1 h, 经缓冲液漂洗后, 用常规丙酮系列脱水, Epon 812 环氧树脂渗透和包埋,

• 本文于 1995 年 1 月 23 日收到, 6 月 15 日修回

用 Reichert-Jung ULTRACUT E 型超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,在日产 JEOL-1200EX 型透射电镜下观察。以健康叶的相同部位作对照。

结 果

1 三种不同抗性的榨菜品种病毒感染后症状表现的差异

各抗性榨菜品种于 4 叶期用摩擦接种的方法接种 TuMV, 感染 14 d 以后, 在感病的 90-149 榨菜品种上, 心叶开始出现退绿斑驳, 在中抗的 90-146 榨菜品种与高抗的 90-139 榨菜品种上均未见症状。感染 30 d 以后, 在感病的 90-149 榨菜品种上, 叶略变形, 退绿斑驳明显, 在中抗的 90-146 榨菜品种上, 已有轻花叶及退绿斑驳出现, 但在高抗的 90-139 品种上未出现症状。感染 60 d 以后, 在感病的 90-149 榨菜品种上, 叶皱缩, 植株严重矮化, 不拨节, 不结球茎, 并有坏死等症状, 一般感病株减产为 100%, 在中抗的 90-146 榨菜品种上, 叶为花叶, 皱缩, 植株略为矮化, 球茎较小, 一般感病株减产为 80%。而在高抗的 90-139 榨菜品种上, 叶为轻花叶, 斑驳, 植株正常。总之, 与感病品种相比, 抗病品种发病迟、症状轻、发病时球茎已接近正常大小, 故减产不明显。

2 三种不同抗性的榨菜品种叶肉细胞内病毒颗粒及颗粒束存在的差异

感染 TuMV 的榨菜叶肉细胞中含有健康榨菜叶肉细胞内所没有的病毒颗粒及颗粒束, 病毒颗粒有规律地分布于细胞质及液泡附近, 在纵切面中一般长度为 800~1000 nm(图 1B), 在横切面中病毒颗粒排列呈拟晶格状, 颗粒直径为 12~13 nm, 相邻颗粒彼此间隔分离(图 2B), 在三种不同的榨菜品种里, 感病的 90-149 榨菜品种叶肉细胞内有较多的病毒颗粒及病毒束, 在中抗的 90-146 榨菜品种叶肉细胞内偶有病毒颗粒及病毒束的存在, 而在高抗的 90-139 榨菜品种叶肉细胞内病毒颗粒及病毒束很少。

3 三种不同抗性的榨菜品种叶肉细胞内内含体及所占比例的差异

感染 TuMV 的榨菜叶肉细胞内主要内含体有风轮体(pinwheel)(图 4, 5)束状体(bundle)(图 3, 4), 板状聚集体(laminated aggregate)(图 1A, 2A, 4, 5), 环状(circles, scrolls, loops)(图 1A, 2A, 5)和管状内含体(tubes)(图 1A, 2A)等, 风轮体和束状体是感染 TuMV 的榨菜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或圆锥状内含体的横切面和纵切面。板状聚集体则是未与风轮体核心结合的未弯曲和未折叠的板即“片层内含体”密切结合或部分融合而成的, 如果这种片层聚集体最外层边缘扩展并向内卷曲, 其横切面成环状纵切面为管状。

检查的风轮体一般有 5~8 个臂, 其中央轴直径约为 200 nm, 臂长约为 300~500 nm, 臂厚约 30 nm, 相邻臂间隔约 50~75 nm(图 5), 束状体一端平齐, 另一端参差不齐, 平齐的一端与质膜及粗面内质网相连(图 3, 4); 板状聚集体一种是一端与风轮体相连, 另一端是游离的(图 5), 另一种是已脱离风轮体而存在于细胞质中, 长度约为 600~1000 nm, 厚度约为 20~40 nm; 环状及管状体外径约为 130 nm, 内径约为 100 nm。

这些内含体在感病榨菜叶肉细胞、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。不同抗性的榨菜品种叶肉细胞中内含体的数量, 各内含体所占的比例有明显的差异。抗性较强的如 90-139 榨菜品种叶肉细胞内内含体数量较少, 束状及风轮状内含体所



图1 感染TuMV初期的90-149榨菜叶肉细胞超薄切片。图1A:细胞内大量环状内含体,片状聚集体,束状病毒粒子,线粒体及核糖体。图1B:束状病毒粒子的放大。

图2 感染TuMV中期的90-149榨菜叶肉细胞超薄切片。图2A,细胞内大量环状内含体,片状聚集体,拟晶格状病毒粒子,核糖体。图2B,拟晶格状病毒粒子的放大。

图3 感染 TuMV 的 90-146 榨菜叶肉细胞超薄切片。示束状内含体与细胞膜相连。

Figure 1 Ultrathin section of mesophyll cells of 90-149 tuber mustard infected with TuMV in early stage of infection. Figure 1A: The circles, laminated aggregates, virus aggregates, mitochondria and ribosome in cells. Figure 1B: Magnified of virus aggregates in longitudinal section.

Figure 2 Ultrathin section of mesophyll cells of 90-149 tuber mustard infected with TuMV in middle stage of infection. Figure 2A: The circles, laminated aggregates, virus aggregates and ribosome in cells. Figure 2B: Magnified of virus aggregates in transverse section.

Figure 3 Ultrathin section of mesophyll cells of 90-149 tuber mustard infected with TuMV, longitudinally sectioned pinwheel inclusions (bundles) attached to cytomembrane.

占比例较多,环状内含体所占的比率较少;抗性较弱的如 90-149 榨菜品种叶肉细胞内内含体数量较多,且束状或风轮状内含体所占比例较少,而环状或管状内含体所占的比率较为明显;另外抗性较强的 90-139 榨菜品种叶肉细胞内的片层聚集体要比抗性较弱的 90-149 榨菜品种叶肉细胞内的片层聚集体长且宽;在不同抗性的榨菜品种之间束状体的长度有一定的差异,感病的束状体较长,抗病的束状较短,抗性中等如 90-146 榨菜品种叶肉细胞内的内含体含量、束状、环状、片层聚集体等种类及比例居于两者之间。现将从各不同抗性的榨菜品种叶肉细胞内检查到的内含体含量、大小及各类型所占比例等列表比较如下:

表1 不同抗性榨菜品种叶肉细胞内含体含量及所占比例

Table 1 The contents and proportions of three types inclusions in mesophyll cells of different disease resistant tuber mustard

品种 Varieties	田间 发病率 Rate of field disease	病毒及内含体(50 cells)		各类内含体比例(200个内含体)								
		Viruses and inclusions		The proportions of three different inclusions (200 inclusions)								
		内含体 Inclusions	病毒 Virus particles	束状或风轮状体			片层状聚集体			环状或管状体		
				Pinwheels or bundles			Laminated aggregates			Circles or tubers		
				比例	直径(nm)	长度(nm)	比例	长度(nm)	宽(nm)	比例	内径(nm)	外径(nm)
				Proportions	Diameter	Length	Proportions	Length	Width	Proportions	Inner-diameter	Outer-diameter
90-149	38%	1087	3	8% (16个)	138±20	900=181.11	54% (109个)	948=186.11	12=24.3	38% (75个)	104±6.7	134±11.7
90-146	20%	854	1	13% (26个)	141±18.5	539=221.11	70% (140个)	858=162.5	22±8.3	17% (34个)	86±5.4	122±12.7
90-139	11%	552	1	24% (49个)	151±26.5	482=176.8	60% (119个)	726=158.0	31±9.2	16% (32个)	91±5.0	122±10.6

4 三种不同抗性的榨菜品种叶肉细胞内细胞器病理变化的差异

感染 TuMV 的榨菜细胞中,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相差不多。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、线粒体及内质网等变化最为明显。首先,叶绿体发生肿胀,基粒片层排列轻度紊乱,出现嗜饿颗粒积累(图6),接着外膜破裂,最后叶绿体基质流出,基粒片层进一步松散、严重扭曲(图7),叶绿体解体,基粒碎片散布于细胞质中;线粒体的变化过程类似于叶绿体,发病初期,由于呼吸作用增加,蛋白质合成旺盛,线粒体大量增加(图6),到后期则线粒体脊模糊并开始降解减少直至消失(图7);细胞质中核糖体数量迅速增加,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、细胞中的小囊泡数量也增加,空泡化;细胞核没有明显变化。在观察的不同抗性榨菜品种的叶肉细胞中,以感病较重的 90-149 品种,叶绿体片层严重扭曲,外膜解体,有部分片层已流失到基质中,并有大量嗜饿颗粒产生(图7),感病中等的 90-146 榨菜品种叶肉细胞内叶绿体外膜解体,但基质及片层还基本完好,无嗜饿体产生,感病较轻的 90-139 品种外膜完好,基质略有减少,片层结构较好,有少量的嗜饿体颗粒产生。此外,不同榨菜品种叶肉细胞内线粒体及粗面内质网在数量上变化较为明显,感病较严重的 90-149 品种感病后线粒体及内质网数量明显增加,而抗性较强的品种上述变化不明显。



图 4 感染 TuMV 的 90-1 榨菜叶肉细胞超薄切片。示风轮状内含体, 束状内含体, 片状聚集体及核糖体。

图 5 感染 TuMV 的 90-139 榨菜叶肉细胞超薄切片。示风轮体, 环状体及片状聚集体的放大。

图6 感染 TuMV 初期的 90-149 榨菜叶肉细胞超薄切片。示叶绿体基粒片层扭曲,线粒体大量增加。

图7 感染 TuMV 后期的 90-149 榨菜叶肉细胞超薄切片。示叶绿体基粒片层严重扭曲,基质消失,嗜银体大量积累,线粒体开始降解。

图8 正常 90-149 榨菜叶肉细胞超薄切片。示叶绿体及线粒体。

Figure 4 Ultrathin section of mesophyll cells of 90-139 tuber mustard infected with TuMV. Note pinwheels, bundles, laminated aggregates and ribosome.

Figure 5 Ultrathin section of mesophyll cells of 90-139 tuber mustard infected with TuMV. Magnified of pinwheels, circles and laminated aggregates.

Figure 6 Ultrathin section of mesophyll cells of 90-149 tuber mustard infected with TuMV in early stage of infection. The early changes of chloroplast and mitochondria

Figure 7 Ultrathin section of mesophyll cells of 90-149 tuber mustard variety infected with TuMV in later stage of infection. The disrupted chloroplast and mitochondria.

Figure 8 Ultrathin section of mesophyll cells of healthy 90-149 tuber mustard. The normal chloroplast and mitochondria.

ch—叶绿体 m—线粒体 vp—病毒颗粒 cw—细胞壁 g—基粒 os—嗜银颗粒
pw—风轮体 b—束状体 la—片状聚集体 ci—环状体 tu—管状体

在三种正常的榨菜叶肉细胞中,则未见上述细胞器异常现象,且以抗病性较强的 90-139 品种健康叶肉细胞中线粒体含量较多,叶绿体基质丰富,基粒垛叠紧密,内有较多的淀粉粒积累,而抗性较弱的 90-149 品种健康叶肉细胞内线粒体含量较少,叶绿体基质较少,基粒垛叠疏松,无淀粉粒积累,并有大量液泡存在。

讨 论

1 关于内含体的起源

有关内含体与病毒复制和装配的关系尚不清楚^[10,11],对其形成的详细过程也尚未取得一致意见。有人报道它们是在细胞质的小泡内形成的^[13]。也有人认为是在细胞质膜上形成,然后移入细胞质中^[8,9]。另一种假设认为风轮体形成于增生的内质网区^[14]。Lawson 等^[13]通过对不同感染时期的细胞内内含体结构的观察,提出在质膜和风轮体中央轴之间存在着一种直接关系,认为风轮体形成于细胞质膜附近,垂直于细胞壁,然后移入到细胞中,并在细胞中不停运动,向细胞质的一定位置靠拢,而后由于蛋白酶等的作用使有些风轮体臂脱离风轮体密切结合或融合成片层聚集体,再进一步卷曲成环状或管状内含体。我们的观察基本同意这种观点。

2 内含体与抗病性的关系

有关内含体的含量和种类是否与植物抗病性有关至今未见报道,作者观察发现,抗病性的强弱与内含体的含量及种类是有关系的,抗病性弱的品种内含体含量较高,内含体以环状偏多,束状及风轮状内含体偏少,而抗性较强的品种则反之。另外,病毒含量也以易感病的品种较多,抗病品种较少。这些结果表明,可能在抗病性较强的品种细胞内含某种物质限制了病毒的产生,或病毒外壳蛋白一经形成就与细胞内的某些物质作用而形成内含体,而易感病的品种细胞内此类物质较少,故病毒大量繁殖,并形成大量内含体。从内含体的形成看,我们认为先形成风轮体,后风轮体臂脱落成片层聚集体,然后卷曲成管状或环状,故易感病的品种管状或环状内含体含量及所占的比例较多,也标志着感病较为严重,而抗性较强的品种细胞内内含体则以风轮体为主,说明感病较轻,这一点在本研究中得到了较好的证实,也与内含体的起源之假设相符合。至于限制病毒的物质则有待于作进一步深入的研究。

3 细胞器的变化与抗病性的关系

一般认为,细胞内的各细胞器与抗病性有一定的关系,即叶绿体基质丰富,基粒片层垛叠紧密,线粒体数量较多等,这在本研究中也得到了证实。此外从本研究观察发现感病以后则以易感病品种细胞内线粒体及粗面内质网数量增加较多,抗病品种细胞内线粒体没有明显的变化,同时,易感病品种叶肉细胞内叶绿体周围有大量嗜锇体颗粒积累,而在抗性较强的品种叶肉细胞内叶绿体周围无明显的嗜锇体颗粒积累。线粒体是呼吸作用的场所,而内质网是蛋白质合成的场所,故易感病品种细胞内这些细胞器的增加说明它们在感病后呼吸作用增强及蛋白质合成增加,同时也说明易感病品种因病毒的大量繁殖需要更多的能量及蛋白质。

嗜锇体实际上是铁酸与酚类物质作用后所形成的物质,故嗜锇体在叶绿体附近的积累说明细胞内有较多的酚类物质的存在,一般认为酚类物质能够限制病毒的繁殖及扩展。但在本研究中,抗性较强的品种细胞内无此类物质的积累,在健康的叶肉细胞内亦无此类物质的积累,说明这种物质增加可能仅是细胞对感病的一种反应,但同时我们也可以从这些物质的多寡来预测各品种的抗病性强弱。

参 考 文 献

- 1 刘相平,路文长,林宝详,等.我国十省(市)十字花科蔬菜芜菁花叶病毒(TuMV)株系分化研究.病毒学杂志,1990; 1: 82~87
- 2 韦石泉,吴元华.芜菁花叶病毒提纯技术的研究.沈阳农学报,1989; 20(3):307~312
- 3 许志纲,Cockbrein A J. 侵染蚕豆的芜菁花叶病毒的鉴定与提纯.植物病理学报,1987; 17(3):173~176
- 4 朱海英,袁维蕃.大白菜孤丁病主要病原芜菁花叶病毒的研究.植物病理学报,1989; 19(1):1~5
- 5 Lee K W, Lee B C, Park H C, *et al.* Occurrence of cucumber green mottle mosaic virus disease of watermelon in Korea. Korean J Plant Path. 1990; 6(1):133~137
- 6 Horsewood P, McDermott M R, Stobbs L W, *et al.* Characterization of a monoclonal antibody to turnip mosaic virus and its use in immunodiagnosis of infection. Phytoprotection. 1991; 72(2):61~68
- 7 Kamet T, Honda Y, Matsui C. Intracellular appearance of turnip mosaic and bean yellow mosaic virus particles. Phytopathology. 1969; 59(2):139~144
- 8 Edwardson J R. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. Amer. J. Botany. 1966; 53(4):359~364
- 9 Edwardson J R, Purcifull D E, Christie R G. Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rod-shaped viruses. Virology. 1968; 34:250~263
- 10 Henkel C M, Hudspeth M E S, Meganathan R, *et al.* Further characterization of mycolaminaran-induced resistance; temperature sensitivity against tobacco mosaic virus and function against cauliflower mosaic virus and tomato spotted wilt virus. Phytopathology. 1992; 82(6):637~642
- 11 Lawson R H, Hearan S S, Smith F F. Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. Virology. 1971; 46:453~463
- 12 李学湛,Kim K S, Martin E M. 大豆花叶病毒(SMV)感染大豆品种“Lee”叶片细胞超微结构的研究.植物病理学报,1987; 17(4):235~239
- 13 Hooper C R, Wiese M V. Cytoplasmic inclusions in wheat affected by wheat spindle streak mosaic. Virology. 1972; 47:664~672
- 14 Hunsr P L, Tolun S A. Ultrastructural Cytology of soybean infected with mild and severe strains of soybean mosaic virus. Phytopathology. 1983; 73(4):615~619

Studies on Cytopathological Ultrastructure of Three Different Disease Resistance Tuber Mustard Varieties Infected with Turnip Mosaic Virus

Xu Junhuan Li Debao Sheng Fangjing Fang Yuexian

(*Biotechnology Institute, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029*)

Ultrathin sections of leaf tissues of three tuber mustard varieties infected with Turnip Mosaic Virus were examined in the electron microscope. The results revealed that the aggregates of filamentous virus particles, which always distributed near vacuole membrane and cytoplasm in mesophyll cells, were seldom found. The inclusions including pinwheels (or bundles), laminated aggregates and circles (or tubers) were appeared in mesophyll, epidermal and xylem parenchymas cells of all diseased leaves, while the contents and the proportions of three types inclusions were different in different disease resistant tuber mustard varieties. The contents of inclusions in mesophyll cells of the sensitive tuber mustard (90-149) were more than those in resistant tuber mustard (90-139). Meantime the sensitive had high proportions of circles or tubers and low proportions of pinwheels or bundles, while contrasted to the resistant. The contents and the proportions of inclusions in the medial disease resistant variety (90-146) were between above two varieties. The results also showed that the virus particles in the sensitive variety are more than those in the resistant variety. In addition, cells infected at early period were characterized by a voluminous cytoplasm containing a high ribosome content, hypertrophied endoplasmic reticulum and mitochondria. The sensitive variety had more those cellular organelles than resistant variety, but in the health plant the sensitive variety contained less those cellular organelles than those of resistant variety. As the disease developed, a considerable degeneration of cellular constituents was observed, chloroplasts and mitochondria were gradually disrupted and cells filled with debris of these organelles and with remnants of the disease-associated inclusions.

Key words Turnip Mosaic Virus, Cytoplasmic Inclusions, Ultrastructure Cytopathology