

66-72

## 不同 CMV 分离物侵染寄主的超微结构变化\*

洪健, 陈集双, 李德葆

S432.41

(浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

**摘要:**应用电镜观察了黄瓜花叶病毒 CMV 不同分离物侵染寄主的细胞超微结构变化。来自一串红(*Salvia splendens*)的不含卫星 RNA 分离物 M-22 侵染心叶烟, 病毒粒子散布于细胞质, 在液泡中形成大片病毒粒子结晶, 液泡膜边缘产生小泡结构, 完整的病毒粒子穿过胞间连丝在细胞间运转, 胞间连丝中央部分有扩张现象。自然感染三生烟的含坏死卫星 RNA 分离物 8-S1 侵染普通烟, 病毒粒子分散于细胞质, 在液泡中未观察到结晶体, 叶绿体产生囊泡结构, 部分病毒粒子处在叶绿体空泡中。田间寄主上受 8-S1 侵染的三生烟细胞质中分布着大量球形病毒粒子, 叶绿体也产生含有病毒粒子的囊泡结构。表明含有卫星 RNA 和不含卫星 RNA 的 CMV 分离物引起的细胞病变特征存在差别, 可能是 CMV 卫星 RNA 参与病理变化的依据之一。

**关键词:**黄瓜花叶病毒; 卫星 RNA; 细胞病理学; 电子显微镜

超微结构 CMV

**中图分类号:** S432.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)01-0066-07

黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus)属雀麦花叶病毒科(*Bromoviridae*)黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*), 是我国十字花科、茄科、豆科及葫芦科蔬菜最主要的病毒病原之一。CMV 的寄主范围很广, 可侵染 1000 多种单子叶和双子叶植物, 我国也已从 38 科 120 多种植物上分离到 CMV。近年来国内学者在 CMV 株系及亚组鉴定、卫星 RNA、分子生物学研究以及病害防治等方面取得了重要进展<sup>[1]</sup>, 我们先后对来自十字花科、豆科、茄科作物及其它花卉的不同 CMV 分离物进行了生物学、血清学和双链 RNA 比较研究<sup>[2-5]</sup>。为了解不同分离物侵染寄主的细胞病理变化差异, 探讨卫星 RNA 影响寄主症状的超微结构机制, 我们对来源于一串红的 CMV 分离物 M-22(不含卫星 RNA)和来源于三生烟的分离物 8-S1(含坏死型卫星 RNA)所引起的寄主细胞超微结构变化进行了电镜观察, 现将实验结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒源

由一串红(*Salvia splendens*)上分离的 M-22, 经单斑分离纯化后人工接种于心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)。由田间症状表现为饰纹、脉间严重坏死的三生烟(*N. tabacum*-Samsun)上分离的 8-S1, 经单斑分离纯化后人工接种于普通烟(*N. tabacum*), 该分离物的原田间寄主编号为 CMV-8。

### 1.2 提纯病毒的负染色

适当稀释的病毒提纯液用 2% 醋酸铀水溶液(pH5.0)负染色, 或者先经 0.2% 多聚甲醛固定, 再用 2% 磷

收稿日期: 1998-11-20, 修回日期: 1999-01-14

\* 国家自然科学基金(No. 39970067)和浙江省教委科研项目资助。本实验室楼兵干、方月鲜同志参与部分工作。

作者简介: 洪健(1957-), 男, 浙江宁波人, 研究员, 研究方向植物病理学。

钨酸(pH6.8)负染色。在 CMV 悬液中加入少量 TMV 样品,用来比较测量病毒粒子的大小。

### 1.3 寄主组织超薄切片

用以上两个分离物和一个田间寄主为实验材料,分别取典型花叶症状的寄主叶片黄绿交界部位,切成 1 mm<sup>2</sup> 小片,用 Karnovsky' 2.5% 戊二醛-2% 多聚甲醛混合固定液预固定 2~4 h, 再按 Hatta 等人<sup>[6]</sup>的方法,用 2×SSC 缓冲液配制的 2 μg/mL 牛胰核糖核酸酶 RNase 处理过夜,然后用 1% 四氧化锇后固定 1~2 h, 常规脱水, Epon 812 环氧树脂包埋,超薄切片用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色。

以上样品均在日本 JEOL 的 JEM-1200EX 型透射电镜下观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 M-22 分离物侵染心叶烟的细胞超微结构

由人工接种繁殖于心叶烟的 M-22 分离物经分离提纯后,用醋酸铀负染色的病毒粒子为球形,直径约 30 nm, 呈现 CMV 粒子特有的“中心孔”结构,在电镜高倍放大下,可见表面的蛋白质形态亚基(图 1)。

在 M-22 接种感染的心叶烟叶片薄壁细胞及维管束组织中,大量球形病毒粒子散布于细胞质中(图 2),高倍放大也能看到“中心孔”结构,粒子直径比负染时要小一些。细胞质中未见病毒粒子呈结晶状排列。病变的细胞有膜结构增生现象,在液泡膜边缘可见到一些内含纤细丝状物的圆形或卵圆形小泡突入液泡中(图 3)。有的细胞还有较大的膜状体紧邻液泡。细胞的液泡明显增多,细胞质被大小不等的液泡分割成许多岛屿状,小液泡可以相互融合成大的液泡,或者与细胞的中央液泡融合。病变严重的细胞产生空泡化现象,细胞器解体,病毒粒子形成不同大小的聚集体,有的聚集体有膜包围。在中央液泡内可观察到大块呈结晶状排列的病毒粒子(图 4A, 4B),病毒晶体呈多边形或不规则形,大小不等,有的可达数微米,外周无膜。细胞核的形态无特殊变化,核内未观察到病毒粒子。线粒体内脊产生肿胀。叶绿体多数呈正常的梭形,基粒片层和基质片层较发达,排列有序,有许多淀粉颗粒和质体小球积累(图 5)。在一些薄壁细胞的细胞壁上,观察到发达的胞间连丝结构,一些完整的病毒颗粒处在胞间连丝中,有的胞间连丝中央部分扩展,容纳了多层病毒粒子。在紧邻着胞间连丝的细胞膜处,观察到类似管状物的结构(图 6)。

### 2.2 8-S1 分离物侵染普通烟的细胞超微结构

在带有坏死型卫星 RNA 的 CMV 分离物 8-S1 接种感染的普通烟叶片组织中,细胞的病变程度明显较重,空泡化细胞较多,许多细胞器瓦解。在病变程度较轻的细胞中,大量球形病毒粒子散布于细胞质中,或者形成小的聚集体(图 7、8)。膜结构和液泡明显增生,在液泡膜边缘也存在含纤细丝状物的小泡结构,但未在液泡中观察到病毒粒子的大块晶体,也未在细胞质中发现病毒结晶状排列。细胞核内未观察到病毒粒子。由于概率小,病毒穿过胞间连丝的现象也未观察到。线粒体内脊肿胀。叶绿体发生明显病变,有的片层结构发育较差,缺乏基粒;有的形态变得肿胀、畸形,片层结构疏松,排列混乱,淀粉颗粒和质体小球积累;有的叶绿体产生大的空泡状结构,一些病毒粒子处在叶绿体空泡之中(图 8)。随着细胞瓦解,叶绿体发生解体,外膜破裂,类囊体残片及淀粉粒散布于空泡化的细胞中(图 9)。

### 2.3 田间发病寄主三生烟的细胞超微结构

在田间自然发病的三生烟(样品编号 CMV-8)叶片组织中,细胞严重瓦解,大量球形病毒



图1 提纯的CMV M-22分离物粒子,350 000 $\times$

图2 M-22分离物感染的心叶烟,示病毒粒子散布于细胞质中,55 000 $\times$

图3 M-22分离物感染的心叶烟,示液泡膜边缘的小泡结构(箭头),65 000 $\times$

图4 M-22分离物感染的心叶烟,示液泡中的病毒结晶体,4A.28 000 $\times$ ,4B.46 000 $\times$

图 5 M-22 分离物感染的心叶烟, 示未显著病变的叶绿体, 15 000 $\times$

图 6 M-22 分离物感染的心叶烟, 示处在胞间连丝中的病毒粒子(箭头), 75 000 $\times$

Fig. 1 Purified virus particles of M-22, 350 000 $\times$

Fig. 2 Thin section of *Nicotiana glutinosa* leaf cells infected with the isolate M-22, showing virus particles scattered throughout the cytoplasm, 55 000 $\times$

Fig. 3 Material as in Fig. 2, showing virus-specific vesicles attached to the tonoplast (arrow), 65 000 $\times$

Fig. 4 Material as in Fig. 2, showing large crystals of virus particles in the central vacuole, 4A. 28 000 $\times$ , 4B. 46 000 $\times$

Fig. 5 Material as in Fig. 2, showing chloroplast with minor alteration, 15 000 $\times$

Fig. 6 Material as in Fig. 2, showing virus particles in the plasmodesma (arrow), 75 000 $\times$

粒子散布在细胞质中, 浓度非常高(图 10)。细胞器特别是叶绿体结构被破坏, 叶绿体的片层结构发育程度差, 病变后产生膨胀和囊泡化, 片层疏松, 排列混乱。一些病毒粒子存在于叶绿体的囊泡之中(图 11), 或者在叶绿体基质中(图 12)。

### 3 讨论

有关 CMV 侵染寄主的细胞超微结构变化报道已见不少<sup>[7-10]</sup>, 通过应用 Hatta(1979)的方法研究了同属的番茄不孕病毒(TAV)、花生矮化病毒(PSV)以及 CMV 的不同株系, 已基本明确了 *Cucumovirus* 属的细胞病理学效应。但由于 CMV 寄主范围很广, 病毒株系复杂, 其细胞病变特征亦有差异。Hatta 和 Francki 等(1981)比较 CMV 的六个不同株系和 TAV 的三个株系后发现:CMV 的 T 株系在细胞质中有病毒结晶体, 细胞核内也存在病毒;M 株系造成叶绿体形态变化, 基粒片层发育较差;U 株系在细胞质中发生病毒基质<sup>[9]</sup>。我们观察到的 M-22 分离物符合 CMV 普通株系的特征, 8-S1 分离物与 M 株系有相似之处。

本实验观察两个分离物的生物学、血清学以及双链 RNA 等特性已作过比较<sup>[3,11]</sup>。M-22 原寄主一串红症状表现为花叶、矮化、开花减少, 分离物在心叶烟和普通烟上产生系统花叶, 在昆诺藜上产生局部枯斑。8-S1 原田间寄主三生烟叶片上呈现饰纹、脉间严重坏死症状, 分离物在心叶烟、普通烟及黄瓜等寄主上除产生系统花叶外, 还有坏死症状。两个分离物在血清学关系上也存在明显差异。抽提感病组织中的 dsRNA, 电泳分析发现 8-S1 含有高浓度的卫星 RNA, 而 M-22 不含卫星 RNA。8-S1 分离物由于卫星 RNA 对辅助病毒以及寄主之间产生一系列调节作用, 加重了寄主的发病程度, 超微结构表现为细胞明显瓦解, 叶绿体结构遭受严重破坏。田间样品 CMV-8 的细胞受损程度, 尤其是叶绿体的囊泡化现象与人工接种寄主的情况相似。M-22 感染的寄主细胞虽然含有高浓度的病毒粒子, 在液泡中还形成大块病毒结晶体, 但细胞损坏程度较轻, 叶绿体畸变不明显。当然, 这是我们在两个 CMV 分离物上所观察到的现象, 是否其它分离物也如此, 需要继续研究以得到进一步的证实。

植物病毒侵染对寄主叶绿体影响表现在阻碍叶绿体发育, 使其发生聚集, 外形肿胀、畸形, 类囊体排列混乱, 质体小球数量增加。Reinero<sup>[12,13]</sup>报道 TMV 的外壳蛋白(CP)进入普通烟叶绿体内, 并结合到类囊体膜的光系统 II 上, 阻止电子在传递链中的传递, 降解叶绿体, 破坏了叶绿体结构和功能。朱水芳等<sup>[14]</sup>也报道 CMV 侵染的烟叶绿体中 CP 浓度与花叶症状严重度成正相关, Hsu<sup>[15]</sup>报道 CMV 强毒株侵染后在叶绿体中有 CP 积累, 而弱毒株侵染后叶绿体中无 CP 积累, 说明叶绿体的病变与 CP 直接相关。8-S1 分离物引起叶绿体严重畸形, 可能与高浓度 CP 进入叶绿体有关。至于在畸形的叶绿体中出现完整病毒粒子, 可能是叶绿体畸变导致



图7 8-S1分离物感染的普通烟,示液泡化细胞中的病变叶绿体和病毒粒子小聚集体,20 000 $\times$

图8 8-S1分离物感染的普通烟,示病毒粒子散布于细胞质和叶绿体的泡状结构中(箭头),35 000 $\times$

图9 8-S1分离物感染的普通烟,示瓦解细胞中的叶绿体残余片层、淀粉粒和病毒粒子,20 000 $\times$

图10 CMV-8田间寄主三生烟,示瓦解的细胞中分布着大量CMV病毒粒子,30 000 $\times$

图11 田间寄主三生烟,示叶绿体疏松的片层、质体小球、空泡结构和其中的病毒粒子(箭头),25 000 $\times$

图12 田间寄主三生烟,示瓦解的叶绿体中含有病毒粒子,30 000 $\times$

Ch:叶绿体; CW:细胞壁; M:线粒体; PD:胞间连丝; S:淀粉粒; V:液泡

Fig. 7 Thin section of *N. tabacum* leaf cells infected with the 8-S1 isolate of CMV, showing abnormal chloroplasts and small virus aggregates in the cytoplasm. 20 000 ×

Fig. 8 Material as in Fig. 7, showing virus particles scattered throughout the cytoplasm and in the vacuole of abnormal chloroplast (arrow), 35 000 ×

Fig. 9 Material as in Fig. 7, showing broken lamellae, starch granule and virus particles in disrupted cell, 20 000 ×

Fig. 10 Thin section of natural-infected *N. tabacum*-Samsum leaves from the field, showing numerous CMV particles in disrupted cell, 30 000 ×

Fig. 11 Material as in Fig. 10, showing the abnormal chloroplast with poorly remained lamellae, plastoglobulis, vacuoles and virus particles (arrow), 25 000 ×

Fig. 12 Material as in Fig. 10, showing some virus particles in the disrupted chloroplast, 30 000 ×

Ch: chloroplast; CW: cell wall; M: mitochondria; PD: plasmodesma; S: starch granule; V: vacuole

其包裹部分细胞质成分,也包入了病毒;或者是叶绿体外膜破裂,细胞质组分进入类囊体结构之间。因为除了芜菁黄花叶病毒 TYMV 有证据表明在叶绿体周边小泡中复制外,其它病毒的复制装配并不在叶绿体内。

在一些病变细胞中发现 CMV 粒子存在于胞间连丝,是病毒经由胞间连丝穿过细胞壁,在细胞间短距离转运的直接证据。这在豇豆花叶病毒(CpMV)、萝卜花叶病毒(RaMV)、烟草环斑病毒(TRSV)、番茄不孕病毒(TAV)等侵染的寄主细胞中也有报道<sup>[16]</sup>。植物病毒在细胞间的运动是一个或几个病毒基因产物所操纵的一种主动运动过程,细胞与细胞之间的短距离运动是以完整病毒粒子形式或以病毒核酸-运动蛋白复合体形式通过胞间连丝<sup>[17]</sup>。在 CpMV 侵染的寄主细胞中,常可看到由运动蛋白形成的管状物,病毒样颗粒成一列排在其中,在病毒编码的运动蛋白与胞间连丝相互作用下,发生扩展作用,使胞间连丝能够通过物质的最大孔径增加数倍,能通过完整的病毒粒子。我们实验中也观察到紧连着胞间连丝处有类似运动蛋白管状结构。更有意义的是,在细胞壁中央部分的胞间连丝中有一群病毒粒子,似乎其内部空间被拓展得更大,允许几个粒子并排通过,此种现象似与病毒粒子参与胞间连丝的扩展起到“开门”作用有关。

目前报道的 CMV 分离物相当多,但对卫星 RNA 影响寄主症状的机理了解还很有限。本实验从细胞病变角度比较了含和不含卫星 RNA 两个分离物的特性,为探索 CMV 卫星 RNA 的病理作用提供了初步证据。由于目前人们对 CMV 的复制装配、胞间转运等一系列细胞病理过程还不十分清楚,需要结合免疫细胞化学及分子生物学技术作深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 徐东平,李梅,林奇英等.我国黄瓜花叶病毒及其病害研究进展[M].刘仪主编.植物病毒与病毒病防治研究.北京:中国农业科技出版社,1997,13~22
- [2] 周雪平,刘勇,薛朝阳,金巧玲等.十字花科蔬菜上黄瓜花叶病毒分离物的比较研究[J].微生物学报,1997,37(3):203~211
- [3] 陈集双,盛方镜,李德葆.一串红花叶病及其病原研究[J].浙江农业大学学报,1995,21(1):5~10
- [4] 陈集双,吴林福,周雪平等.美人蕉黄瓜花叶病毒研究[J].浙江农业学报,1994,6(4):272~275
- [5] 金巧玲,周雪平,刘勇等.侵染绿花椰菜的黄瓜花叶病毒(CMV)研究[J].浙江农业大学学报,1995,21(6):610~614
- [6] Hatta T, Francki R I B. Enzyme cytochemical method for identification of cucumber mosaic virus particles in infected cells

- [J]. *Virology*, 1979, 93: 265
- [7] Honda Y, Matsui C. Electron microscopy of cucumber mosaic virus-infected tobacco leaves showing mosaic symptoms [J]. *Phytopathology*, 1974, 64: 534~539
- [8] Ehara Y, Misawa T. Occurrence of abnormal chloroplasts in tobacco leaves infected systemically with the ordinary strain of cucumber mosaic virus [J]. *Phytopathol Z*, 1975, 84: 233
- [9] Hatta T, Francki R I B. Cytopathic structures associated with tonoplasts of plant cells infected with cucumber mosaic and tomato aspermy virus [J]. *J Gen Virol*, 1981, 53: 343
- [10] Martelli G P, Russo M. Virus-host relationships, symptomatological and ultrastructural aspects [M]. In: Francki R I B ed. *The Plant Viruses*. Vol. I. Plenum Press, 1985. 163~205
- [11] Chen Jishuang, Makamoto C, Li Debao. Characterization of two cucumber mosaic virus isolates by host reaction, morphological serological tests and ds-RNA analysis [J]. *CNSC Review*, 1997, 2(1): 5~11
- [12] Reinero A, Beachy R N. Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves [J]. *Plant Mol Biol*, 1986, 6: 291~301
- [13] Reinero A, Beachy R N. Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with tobacco mosaic virus [J]. *Plant Physiol*, 1989, 89: 111~116
- [14] 朱水芳, Francki R I B. 黄瓜花叶病毒衣壳蛋白存在于被侵染的烟草叶绿体中[J]. *中国病毒学*, 1992, 7(3): 328~333
- [15] Hsu Y H, Tsai W S, Chu C L *et al*. Association of CMV coat protein and RNA, with chloroplast in tobacco [C]. *Proceedings of the Annual Meeting of the Amer Phytopathological Soc*, 1994, Aug. 6~10, Albuquerque, NM.
- [16] Francki R I B, Milne R G, Hatta, T. *Atlas of plant viruses* [M]. Vol. II. CRC Press, Inc. 1985. 53~68
- [17] 李毅, 陈章良. 植物病毒胞间运动的分子生物学和细胞学研究进展[J]. *植物生理学通讯*, 1995, 31(6): 463~469

## Ultrastructural Alteration of Host Plants Infected with Different Cucumber Mosaic Virus Isolates

HONG Jian, CHEN Ji-shuang, LI De-bao

(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** The ultrastructural alterations caused by the infection of two cucumber mosaic virus isolates were investigated. Spherical virus particles of CMV M-22, an isolate originally from *Salvia splendens*, scattered throughout the cytoplasm and aggregated into crystals in the vacuoles of tobacco cells. The existence of virus particles inside the chloroplast was not detected for this isolate. But virus particles were found being aggregated through the plasmodesma, that indicated the way of cell to cell movement of this isolate. Virus particles of CMV 8-S1, an isolate with necrosis satellite RNA and originally from naturally infected tobacco, scattered throughout the cytoplasm and in the vacuoles of abnormal chloroplasts. In the tobacco leaf cells natural-infected by CMV-8 in the field, numerous spherical particles and abnormal chloroplasts were observed. The results suggest that ultrastructural alterations induced by different CMV isolates are quite variable. This is a direct evidence of satellite RNA involvement in pathogenic process by CMV.

**Key words:** Cucumber mosaic virus; Satellite RNA; Cytopathology; Electron microscopy