

RBSDV 在玉米叶脉细胞内的侵染状态 与灰飞虱传毒活力的关系

陈声祥^{1**}, 洪健³, 吕永平¹, 雷娟利²

(1. 浙江省农科院病毒学与生物技术研究所, 浙江杭州 310021; 2. 浙江省农科院蔬菜研究所, 浙江杭州 310021;
3. 浙江大学分析测试中心, 浙江杭州 310029)

Study on the Relation Between RBDV Infecting Stages in Maize Vein Cell and Active Transmission of *Laodelphax striatellus* Fallen

CHEN Sheng-xiang^{1**}, HONG Jian³, LU Yong-ping¹, LEI Juan-li²

(1. Virology Department; 2. Vegetable Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 3. Center of Analysis and Measurement, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Rice black streaked dwarf virus (RBSDV) infecting stages were viewed in maize vein cell during its different infection period by electron microscope. It was found that the RBSDV particles infected in the maize cell appeared at first in the cytoplasm near the cell wall, some single virus particles seem to be connected with plasmodesma. The viroplasm was produced in cytoplasm, and the RBSDV particles multiplied and scattered initially along the periphery and subsequently spread out towards the viroplasm. When the viroplasm was full of virus particles, some tubules with about 90nm in diameter appeared in the cytoplasm. Subsequently the virus particles arrayed in row among them, and finally the particles aggregated into crystalline array and the cytoplasm tubules disappeared. The percentage of active transmission of small brown plant hopper (*Laodelphax striatellus* Fallen) varied with the infection stage of RBSDV in maize cell while the nymph acquiring feeding. There were 2.93% and 7.83% of viruliferous rate respectively when their nymph acquiring feeding in the vein cell of maize among RBSDV particles were going to multiply in the periphery and inner of viroplasma, but no one when the noninfective nymph of them acquiring feeding in maize cell among the virus particles was going to the stage of appearing cytoplasm tubules and forming crystalline array.

Key words: Rice black streaked dwarf virus; Maize; *Laodelphax striatellus* Fallen; Cytopathology

摘要: 根据水稻黑条矮缩病毒 (RBSDV) 侵染玉米 (*Zea mays* L.) 的症状发展过程先后取叶脉做超薄切片, 在透射电镜下观察病毒在细胞内的侵染状态, 并在取样前用灰飞虱无毒若虫进行饲毒和传毒试验。结果显示 RBSDV 侵入玉米叶脉细胞后先出现在细胞壁附近, 个别粒子似与胞间连丝相连; 细胞质内产生病毒基质, 病毒粒子先增殖并分布其周边, 后向病毒基质内扩展; 当病毒粒子布满病毒基质后在细胞质中出现直径约 90nm 的管状结构, 病毒成串排列在该管状结构中; 随后管状结构逐渐消失, 最终形成晶格状聚集排列。用灰飞虱无毒若虫在细胞内病毒基质出现和病毒增殖期饲毒的, 到成虫时分别有 2.93% 和 7.83% 个体传毒率; 在细胞内病毒成串分布于管状结构和晶格状聚集排列期饲毒的, 到成虫时均不能传毒。

关键词: 水稻黑条矮缩病毒; 玉米; 灰飞虱; 细胞病理学

中图分类号: S432.1

文章标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)02-0153-05

收稿日期: 2003-10-10, 修回日期: 2003-11-18

** 通讯作者: 陈声祥 (1937-), 男, 浙江杭州籍, 研究员, 主要从事植物病毒学研究。
Corresponding author. Tel: 0571-86098189, E-mail: chenshengx@suho.com

水稻黑条矮缩病毒 (*Rice black streaked dwarf virus*, *RBSDV*) 属痒肠孤病毒科 (*Reoviridae*)、斐济病毒属 (*Fijivirus*)^[1], 其基因组由 10 个双链 RNA 片段组成, 主要侵染禾本科植物, 是我国及东亚地区水稻、大小麦、玉米等粮食作物上的重要病毒病原之一^[2-4]。在田间, *RBSDV* 随着主要介体灰飞虱的迁移而在稻麦等禾本科作物和杂草寄主间循环传播, 而玉米作为 *RBSDV* 最敏感的寄主, 可作为田间是否存在 *RBSDV* 的指示作物^[5]。但在该病毒的发生和流行过程中, 玉米是否能作为侵染源至今国内外一直没有定论, 一般认为玉米为 *RBSDV* 的介体灰飞虱非适生寄主, 以玉米病株为毒源的回接试验往往不能成功^[6]。为了解 *RBSDV* 在细胞内的侵染状态与灰飞虱获毒和传毒的关系, 我们通过对 *RBSDV* 在玉米叶脉细胞不同侵染阶段的超薄切片电镜观察, 并在病毒不同侵染阶段对灰飞虱无毒虫进行了饲毒和传毒试验, 发现通常表现蜡白色脉肿典型症状的玉米叶细胞中病毒粒子已趋于聚集排列状态, 此时用灰飞虱无毒虫进行饲毒, 难以顺利获毒和传毒, 推测病毒在玉米细胞内的复制增殖阶段与介体昆虫能否获毒有关。现将实验结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 病毒分离物

RBSDV 浙江分离物由浙江省农科院病毒实验室分离保存。冬春接种在小麦 (*Triticum aestivum* L., 品种为浙麦 1 号和扬麦 3 号) 上繁殖, 夏秋接种在水稻 (*Oryza sativa* L., 品种为矮脚南特和浙湖 122) 上繁殖。

1.2 介体昆虫

灰飞虱 (*Laodelphax striatellus* Fallen) 由浙江省农科院病毒实验室保存, 冬春饲养和繁殖在小麦和看麦娘 (*Alopecurus aequalis* Sobol) 上, 夏秋饲养和繁殖在水稻上。用健康植株饲养灰飞虱无毒虫系; 用症状典型的病麦和病稻饲毒繁殖带毒虫系 (含带毒虫率 30%~60%), 以备实验之用。

1.3 病毒侵染玉米的超薄切片制备及电镜观察

用灰飞虱带毒虫系接种玉米 (*Zea mays* L., 品种为苏玉糯) 2-3 叶的幼苗 24 h, 然后在防虫条件下培育管理, 观察发病情况。从初见症状到典型症状变化过程中先后在病叶出现明脉点条、明脉点线、明脉点线变蜡白色、明脉点线变蜡白色脉肿、蜡白色脉肿变灰黄色和蜡白色脉肿变褐色等各个

时期取样, 将玉米叶脉组织切成 1 mm×3 mm 大小, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 配制的 2.5% 戊二醛和 1% 四氧化锇双固定, 乙醇系列脱水, Epon812 环氧树脂包埋、聚合, 在 Reichart-Jung ULTRACUT E 型超薄切片机上切片, 切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后, 在德国 Opton 公司的 EM-109 型透射电镜下观察拍照, 加速电压为 60KV。

1.4 饲毒和传毒试验

在玉米病叶超薄切片取样前 1d, 先用灰飞虱无毒若虫 (2 龄) 分别在出现明脉点线、明脉点线变蜡白色、明脉点线向叶背隆起成蜡白色脉肿和蜡白色脉肿变褐色等各个时期的病叶上饲毒 24h, 然后饲养到健稻上, 至成虫期进行传毒试验。

2 结 果

2.1 *RBSDV* 侵染玉米的症状变化过程

通过对灰飞虱带毒虫系接种玉米的持续观察和记录, 发现病叶症状有一个发展变化的过程, 从最初症状出现到典型症状出现和衰变可分为 6 个阶段: (1) 先在叶片中部侧脉上散生透明点条, 长约 2-3mm, 边缘清晰, 两端钝圆; (2) 透明条点上下延伸成透明点线; (3) 透明点线变成蜡白色; (4) 透明点线向叶背隆起成蜡白色脉肿; (5) 蜡白色脉肿变灰黄色; (6) 蜡白色脉肿变黄褐色。此时玉米病株严重矮缩不穗, 始病叶及其上叶片僵直地向茎秆两侧伸展, 病株生长开始衰退。

2.2 不同症状表现期玉米叶脉细胞中病毒的侵染状态

通过对不同症状表现期玉米叶脉细胞超微病变结构的观察, 可看到在始病期呈明脉点条症状的细胞中病毒粒子很少, 单个粒子从病毒基质周边侵入, 病毒基质外缘附近分布着一些中空粒子 (图 1A), 有的病毒粒子似与胞间连丝相连 (图 1B); 在呈明脉点线症状的叶脉细胞中产生大块电子致密的病毒基质, 病毒粒子出现在病毒基质周边 (图 1C), 此时复制增殖的粒子数量还不多; 在明脉点线变成蜡白色症状时细胞内的病毒基质进一步扩展, 大量病毒粒子布满在病毒基质中 (图 1D); 当症状呈蜡白色隆起脉肿时在细胞质中出现直径约 90nm 的管状结构, 病毒粒子成串排列在该管状结构中 (图 1E, 1F); 随后症状进一步发展成灰黄色至黄褐色时, 细胞质中的病毒成串地紧密排列, 管状结构逐渐消失 (图 1G), 最终形成紧密的晶格状聚集排列 (图 1H)。

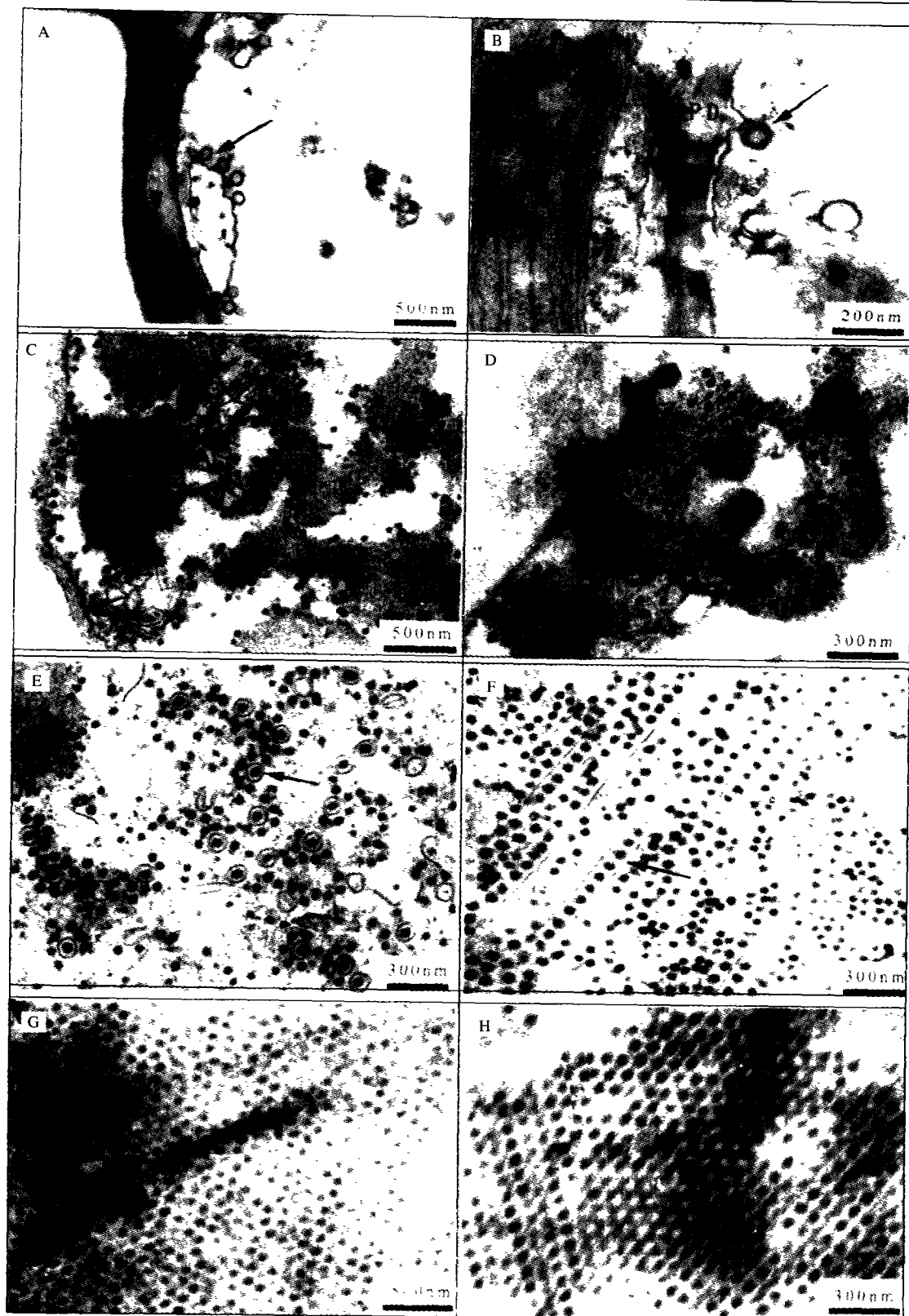


图1 接种 RBSDV 的玉米叶脉细胞超薄切片

Fig. 1 Thin section of maize vein cells infected with RBSDV

A. showing virus particles appeared at first in the cytoplasm nearly the cell wall(arrow); B. Single virus particle seems to be connected with plasmodesma(arrow); C. Virus particles scattered in the cytoplasm and the periphery of viroplasm with filaments; D. Numerous virus particles scattered throughout the viroplasm; E. Some virus particles and transversely section tubules(arrow) appeared in the cytoplasm of vein cell; F. Virus particles arrayed in row among tubules(arrow); G. Virus particles aggregated in the cytoplasm and the cytoplasm tubules disappeared; H. Virus particles aggregated into crystalline array in the cytoplasm. CH-chloroplast, CW-cell wall, PD-plasmodesma, VP-viroplasm.

2.3 病毒不同侵染状态与灰飞虱获毒和传毒的关系

分别在不同病毒侵染状态下的病玉米叶片上饲毒的灰飞虱,其传毒情况各异。在叶脉蜡白色隆起症状出现之前,也就是细胞质中病毒粒子在病毒基质周边和内部增殖时期饲毒的灰飞虱无毒若虫,到成虫期分别有 2.93% 和 7.83% 个体传毒率。而当叶脉蜡白色隆起条斑出现和变色之后,即细胞内病毒成串地分布于管状结构和呈晶格状聚集排列时期饲毒的灰飞虱无毒若虫,到成虫期连续传毒 6 天均未出现传毒个体(表 1)。

表 1 RBSVDV 侵染状态与灰飞虱传毒活力的关系

Table 1 The relation between RBSVDV infecting stages and active transmission *Laodelphax striatellus*

Infecting stage of virus	Number of infective insect / number of acquesting feeding insect		Infective insect %
	I	II	
	In periphery of viroplasm	3/107	
Inner viroplasm	4/49	3/40	7.83(7.5~8.2)
Arranged among tube	0/59	0/54	0
Crystalline array	0/58	0/53	0

*difference in two tests

3 讨论

玉米幼苗受 RBSVDV 侵染后,其始病叶症状的发展过程可能在一定程度上涉及病毒在寄主细胞内的增殖、分布和排列的过程。与呼肠孤病毒科的其他植物病毒一样,RBSVDV 在寄主植物的细胞质中进行复制增殖,其主要细胞病理学特征是形成电子致密的病毒基质^[7],此时成熟病毒粒子在其中不断被复制装配出来,大量积累在细胞质中,并通过胞间连丝实现细胞间的转运扩展。当玉米病叶叶脉出现蜡白色隆起脉肿——玉米水稻黑条矮缩病株特有的典型症状时,其细胞内部的病毒已经停止增殖,开始以成串排列在管状结构中过渡到最终形成晶格状聚集排列。这在同科水稻矮缩病毒(*Rice dwarf virus*, RDV)感染的水稻病叶中也可以看到,其病毒粒子在形成晶格状聚集排列之前先经过成串排列于管状结构形式聚集靠拢、并逐渐消失管状结构的阶段(图 2),两者具有明显的相似之处。

病毒的介体传播涉及基因组编码产物^[8, 9],但 RBSVDV 的基因组结构功能目前尚不完全清楚^[10-12]。根据上述实验结果推测,在寄主细胞的病毒增殖阶段,与介体传播相关的基因产物得以表达,

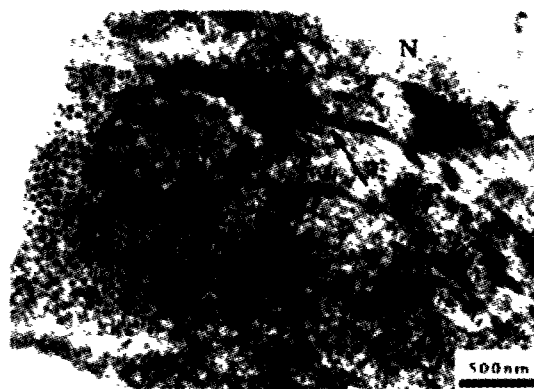


图 2 感染 RDV 的水稻叶片细胞超薄切片

Fig. 2 Thin section of rice leaf cells infected with RDV

Arrow indicates virus particles arrayed in row among tubules and aggregated into crystalline array in the cytoplasm. M-mitochondria; N-nucleus.

此时用灰飞虱无毒虫系进行饲毒可以获毒和传毒。而当病毒复制完成后,细胞内出现病毒粒子成串排列在管状结构中,并大量聚集成晶格状排列,此时与介体传播相关的基因产物可能已停止表达,灰飞虱难以获毒和传毒。

在 RBSVDV 不同侵染阶段饲毒导致灰飞虱可传毒或不传毒,这一实验结果可以充分说明 RBSVDV 感染前期的玉米病株能作为侵染源,而症状明显的病株和老病株不能作为侵染源。由于从玉米病叶上饲毒的灰飞虱无毒虫获毒和传毒率不高(低于 8%),再加上玉米在田间不是灰飞虱的适生寄主,因此可以推论在自然界玉米病株不可能成为 RBSVDV 流行的主要侵染源。但从玉米是 RBSVDV 的最敏感寄主、它的前期病株可作为毒源来推测,对于 RBSVDV 种株的生存和发展必经阶段还是起着一种寄主的作用,特别在玉米种植区尤其如此。

参考文献

- [1] Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, et al. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, San Diego. 2000, 455-462.
- [2] Shikata E. Rice black streaked dwarf virus: its properties, morphology and intracellular localization. *Virology*. 1997, 77(2): 826-842.
- [3] 浙江省农科院植保所病毒病组. 水稻病毒病(修订本). 北京, 农业出版社, 1985, 11-18.
- [4] 张恒木, 雷娟利, 陈剑平, 等. 浙江和河北发生的一种水稻、小麦、玉米矮缩病是水稻黑条矮缩病毒引起的. *中国病毒学*. 2001, 16(3): 246-251.

- [5] 陈声祥, 吴惠玲, 廖璇刚, 等. 水稻黑条矮缩病在浙中的回升流行原因分析. 浙江农业科学. 2000, 4: 287-289.
- [6] 阮义理, 陈声祥, 林瑞芬, 等. 水稻黑条矮缩病研究. 浙江农业科学. 1985, 4: 185-187.
- [7] Francki RIB, Milne RG. and Hatta T. Atlas of plant viruses. Vol. I. CRC Press. Inc., 1985, 47-72.
- [8] Omura T, Yan J. Role of outer capsid proteins in transmission of Phytoreovirus by insect vectors. Advances in Virus Research. 1999, 54: 15-43.
- [9] Hull R. Matthews' Plant Virology. Academic Press, San Diego. 2002.
- [10] 方守国, 于嘉林, 冯继东, 等. 水稻黑条矮缩病毒基因组片段全长 cDNA 的克隆及其序列分析. 农业生物技术学报. 2001, 9(4): 311-315.
- [11] 李毅, 陈章良. 水稻病毒的分子生物学. 北京, 科学出版社. 2001, 28-32.
- [12] Lsogai M, Uyeda I and Lee BC. Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10. J. Gen. Virol. 1998, 79: 1487-1494.

书讯

《现代实用兽医词典》简介

由陆承平教授主编的《现代实用兽医词典》已由科学出版社出版。本词典内容包括动物医学中的兽医学, 药理学, 动物解剖学、组织学及胚胎学, 动物生理学, 家畜病理学, 动物生物化学, 动物保护, 兽医免疫学, 兽医微生物学, 兽医传染病学, 兽医流行病学, 兽医寄生虫学, 兽医临床诊断、内科、外科及产科, 兽医生物制品学, 兽医卫生检验等。约 2500 条。每一词条均有释义。书后附有 6 个附录、中文词目汉语拼音音节索引和英文词目索引。

本书可供从事与动物医学有关的科研人员、教师、学生、临床工作者使用。