

SMV与TRSV混合感染大豆 叶片细胞的超微结构研究

李学湛

(黑龙江省农业科学院原子能利用研究所)

摘 要

用两种 RNA 病毒 (SMV、TRSV) 混合感染大豆“Lee”叶片。通过对叶片细胞超微结构的连续观察,显示的主要病理特征是①SMV与TRSV粒体共栖于同一叶片细胞之中。②SMV和TRSV粒体量,分别多于同期单独感染寄主细胞的病毒粒体量,而TRSV粒体相对多于SMV粒体量。③经提纯SMV和TRSV产量高。负染后电镜所示:SMV粒体呈线状,长约750nm,直径约12nm、TRSV粒体呈多球形面体,直径约27nm。④病叶研磨液与已知SMV抗血清、TRSV抗血清作用均生成沉淀线,呈阳性反应。与BPMV抗血清作用呈阴性反应。

关键词: SMV TRSV 混合感染 大豆叶片 超微结构

前 言

近年来,许多文章报导了一些植物疾病,不只是一种病毒所致,而是由两种或三种以上病毒复合感染同一作物所致。1972年 Yih—shyong Lee and J. P. Ross 报导了“SMV与BPMV混合感染大豆植株叶片细胞的超微结构研究”。1983年R. J. Carr和K. S. kim报导了“芸豆黄色花叶病毒和豇豆花叶病毒混合感染芸豆叶片细胞的超微结构的研究”等。众所周知,烟草环斑病毒可以引起大豆芽枯病,但烟草环斑病毒能否与大豆花叶病毒同时混合感染大豆,至今未见报导。本试验利用SMV和TRSV混合感染大豆,并对寄主细胞的超微结构进行了连续观察。其目的:一是证实SMV与TRSV可以同时混合感染大豆植株。二是观察SMV与TRSV混合感染大豆植株,与SMV、TRSV分别感染大豆,所引起细胞病理变化有何不同。

本文于1987年5月24日收到。

This paper was received in May 24 1987.

材 料 与 方 法

毒源和寄主植物：大豆花叶病毒 (SMV) 是东北农学院从“黑农 16 号”分离的毒株。1983 年，张明厚 (东北农学院植物病理教研室) 和 H. A. Scott (美国阿肯色州立大学植物病理系病毒室) 鉴定了该病毒属于 G₅ 株系。烟草环斑病毒 (TRSV) 是由 D. J. M. McGuire 提供。大豆花叶病毒 (SMV) 是由 H. A. Scott 提供。SMV 与 TRSV 混合感染的寄主是美国大豆品种“Lee”。

方法：SMV、TRSV 单独感染。在温室 (20—24℃) 播种大豆“Lee”，待幼苗长出真叶时，用小型喷粉器轻轻喷撒一层金刚砂于叶片上，然后用消毒棉纱布分别沾取两种病叶汁 (该两种叶汁是将“黑农 16”大豆植株叶片带有大豆花叶病毒和黄瓜叶片带有烟草环斑病毒分别在 0.05M 磷酸缓冲液中 pH7.2 研磨而成的)，在大豆“Lee”的不同植株叶片上轻轻磨擦。接种后用清水分别洗掉接种叶片上的杂物。待接种 8 天后出现病症，分别在病叶上的病灶典型部位取样。

SMV 与 TRSV 混合感染。接种方法所不同的是把两种等量病叶混合一起，在 0.05M 磷酸缓冲液中 (pH7.2) 研磨，接种在大豆“Lee”植株叶片上。待接种 8 天后出现病症，在病叶病灶典型的部位连续取样。用未接种的大豆“Lee”植株叶片做对照。将材料切割成 3—4 mm²，在 4% 戊二醛溶液中固定 4 小时，用二甲胍酚盐缓冲液 (0.2M) 漂洗 3 次，干净后再转入 1% 锇酸中固定 2 小时，用重蒸馏水冲洗干净，乙醇梯度脱水后在无水丙酮中过夜，后经树脂、丙酮混合剂 (1:1) 浸透过夜，再放入纯树脂浸透，最后用 Spurn 树脂包埋。用 LKB 型超薄切片机，玻璃刀切片，双染色后利用 JEM100cx 电镜观察。

TRSV 与 SMV 混合感染提纯：接种 16 天后采病叶用 Ross、J. P 和 Hunst、Tolin 两种提纯方法提纯病毒，提纯液经 2% 磷钨酸 PH5.5 染色，在电镜下观察。

TRSV 与 SMV 混合感染血清学测定：用 SDS 免疫双扩散和琼脂凝胶双扩散两种方法检测 SMV 和 TRSV。

结 果 与 讨 论

TRSV 单独感染：首先可见寄主叶片的表皮细胞和叶肉组织细胞的胞间连丝中有病毒粒体。而且，许多细胞里还看到细胞壁携带病毒粒体，向细胞质内突起延伸。通过胞间连丝将病毒粒体输入液泡中。病毒粒体除分布于液泡中外，还分布在微管中。因此该试验进一步证实 TRSV 的胞间传播，入胞是通过胞间连丝来实现的。

SMV 单独感染：感染后的叶片细胞质中，首先出现园柱状和风轮状内含体，其中一些风轮状内含体似乎是旋转式地从细胞质区向液泡里伸进。当病毒粒体出现时，被液泡膜包裹形成束丝。与此同时，风轮状内含体逐渐消失。而束缚了病毒粒体的束丝规则地附着在叶绿体上⁽⁶⁾。实验结果表明部份超微结构病变与 P. L. Hunst 和 S. A. Tolin

的报导⁽¹⁾不尽相同。

TRSV 与 SMV 混合感染的植株症状: 被感染的大豆植株, 所表现的既不是大豆花叶病毒单独感染的症状, 也不是烟草环斑病毒单独感染的症状。而是植株叶片发黄, 并带有白色斑点、叶片发育不正常。比大豆花叶病毒和烟草环斑病毒单独感染大豆“Lee”症状均重。(图 1—A)

TRSV 与 SMV 混合感染的血清学测定: 病叶研磨液与已知 SMV 抗血清、TRSV 抗血清作用均生成沉淀线, 呈阳性反应。与 BPMV 抗血清作用呈阴性反应(图 2—B)。

TRSV 与 SMV 混合感染后提纯: 经提纯 SMV 和 TRSV 产量高。负染后电镜所示 SMV 粒体呈线状, 长约 750nm, 直径约 12nm。TRSV 粒体呈球形多面体, 直径约 27 nm (图 4)

TRSV 与 SMV 混合感染叶片细胞的超微结构: 在 TRSV 与 SMV 混合感染的寄主叶片细胞中, 可见两种病毒粒体共存于同一细胞之中。从而, 证明了 SMV 和 TRSV 是可以混合感染大豆的。同时, 在细胞中显示了两种病毒在分别感染寄主细胞所引起的一些病理现象, 如: 由 SMV 感染寄主后, 引起的圆柱状、风轮状内含体和包裹病毒粒体的束丝。由 TRSV 感染寄主后, 病毒粒体集中存在于液泡之中。但在观察中未见到胞间连丝、细胞壁及微管中有 TRSV 出现, 这可能由于混合感染后病毒粒体相互作用, 致使病毒入胞速度加快。也未发现 SMV 所引起风轮状内含体向液泡中旋转伸进的现象。除此之外, 还发现了一些新的特征。

在混合感染 8 天后的叶肉组织细胞基质区出现大量的小泡囊物质(图 5)。这种小泡囊状物的形成, 可能与 TRSV 感染有直接关系。风轮状内含体显然是由 SMV 感染引起的。

混合感染 12 天后的叶肉组织细胞的液泡中均有 TRSV 粒体, 病毒粒体量与液泡大小呈正比。此时细胞中也见有少量的 SMV 粒体。

混合感染 16 天后的叶肉组织细胞中仍见 TRSV 粒体分布于液泡中。而且有大量的液泡膜不规则地分布于液泡中, 少量的 SMV 粒体被液泡膜形成的束丝包裹着。

混合感染 20 天后的叶片细胞中, 可见 TRSV 和 SMV 粒体量聚增, 远远超出单独感染的病毒粒体量。TRSV 粒体相对多于 SMV 粒体量。而且, 在细胞核膜处出现大量的 TRSV 和 SMV 粒体, 这可能与病毒代谢有关(图 6)。

混合感染 25 天后的叶片细胞中均有 TRSV 和 SMV 粒体。此时, 大量的 SMV 粒体被液泡膜形成的束丝包裹着不规则的与 TRSV 粒体混合分布于液泡中(图 7)。通过该试验可以看到 TRSV 粒体, 先出现于细胞的液泡中, 而 SMV 粒体先出现于细胞质中, 后被液泡膜形成的束丝包裹进入液泡中。

由此看来, 植株叶片发黄, 并带有白色斑点, 叶片发育不正常。可能主要是 TRSV 所致, 其原因: 一 TRSV 粒体先于 SMV 出现于细胞之中; 二 TRSV 粒体明显多于 SMV 粒体量; 三由 TRSV 引起叶绿体中淀粉粒增多, 使叶片发黄; 四 TRSV 粒体呈游离状态, 分布广泛, 而 SMV 粒体出现后即被束丝包裹, 分布窄, 对细胞作用轻微, 由此也可以认定, 大豆品种“Lee”是抗 SMV—H—16 的品种。

参 考 文 献

- [1] P. L. Hunst and S. A. Tolin *Phytopathology* 73: 615—619.
 [2] E. L. Halk and J. M. McGuire *Phytopathology* 63: 1291—1300.
 [3] Yih-Shyong Lee and J. P. Ross *Phytopathology* 62: 839—845.
 [4] R. J Carr and K. S. Kim *Virology* 124, 338—348 (1983).
 [5] 李学滋, E. M. Martin and K. S. Kim Vol. 74, No. 1984, 629, *Phytopathology*. U. S.A.
 [6] 李学滋, K. S. Kim and E. M. Martin, *中国植物病理学报*, 1987年第4期。

ULTRASTRUCTURE OF MIXED PLANT VIRUS INFECTION SOYBEAN MOSAIC VIRUS WITH TOBACCO RINGSPOT VIRUS IN SOYBEAN

Li Xuezhao

(*Institute of Atomic Energy Utilization in Agriculture, Heilongjiang
Academy of Agriculture Science.*)

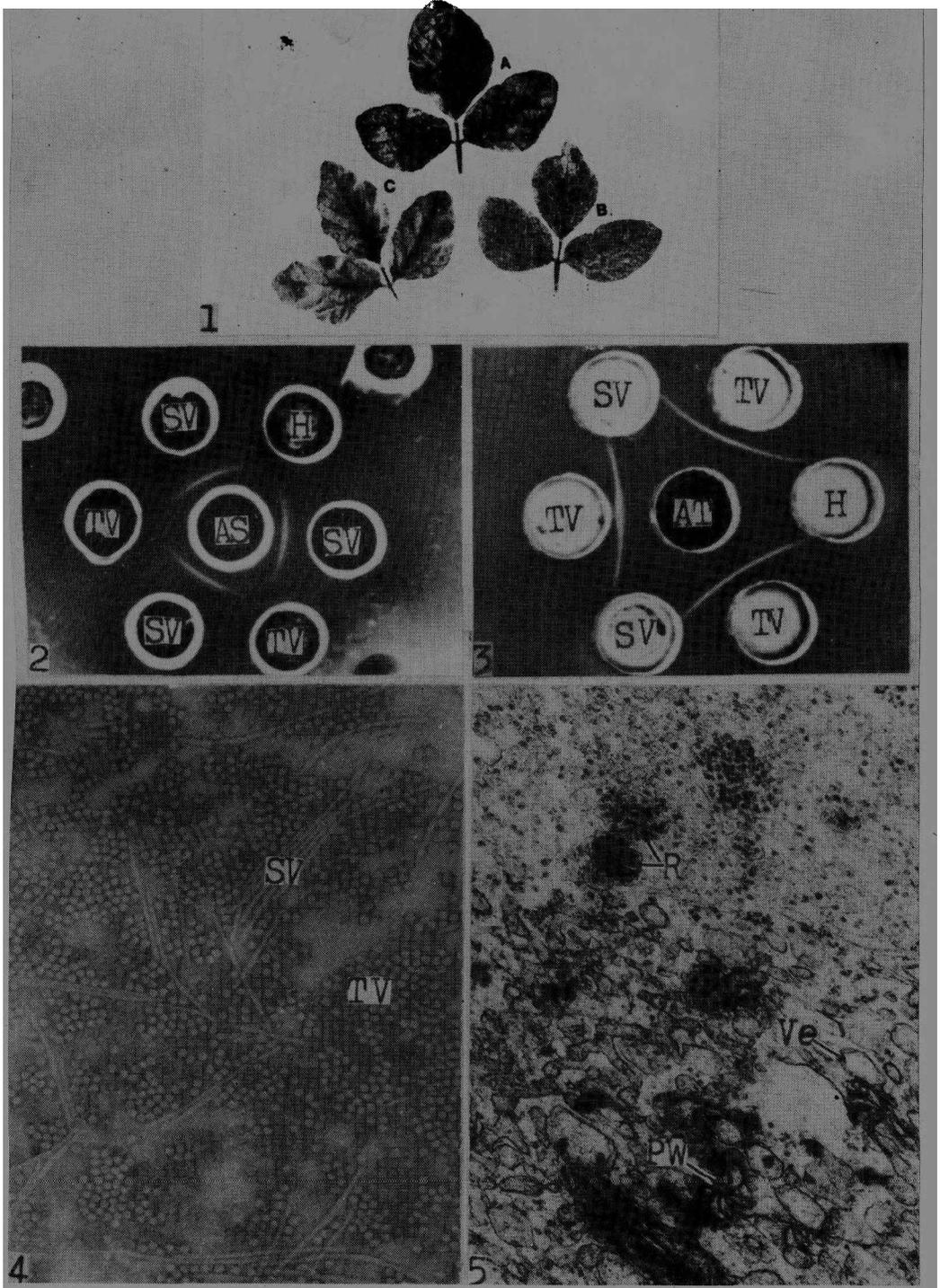
Abstract

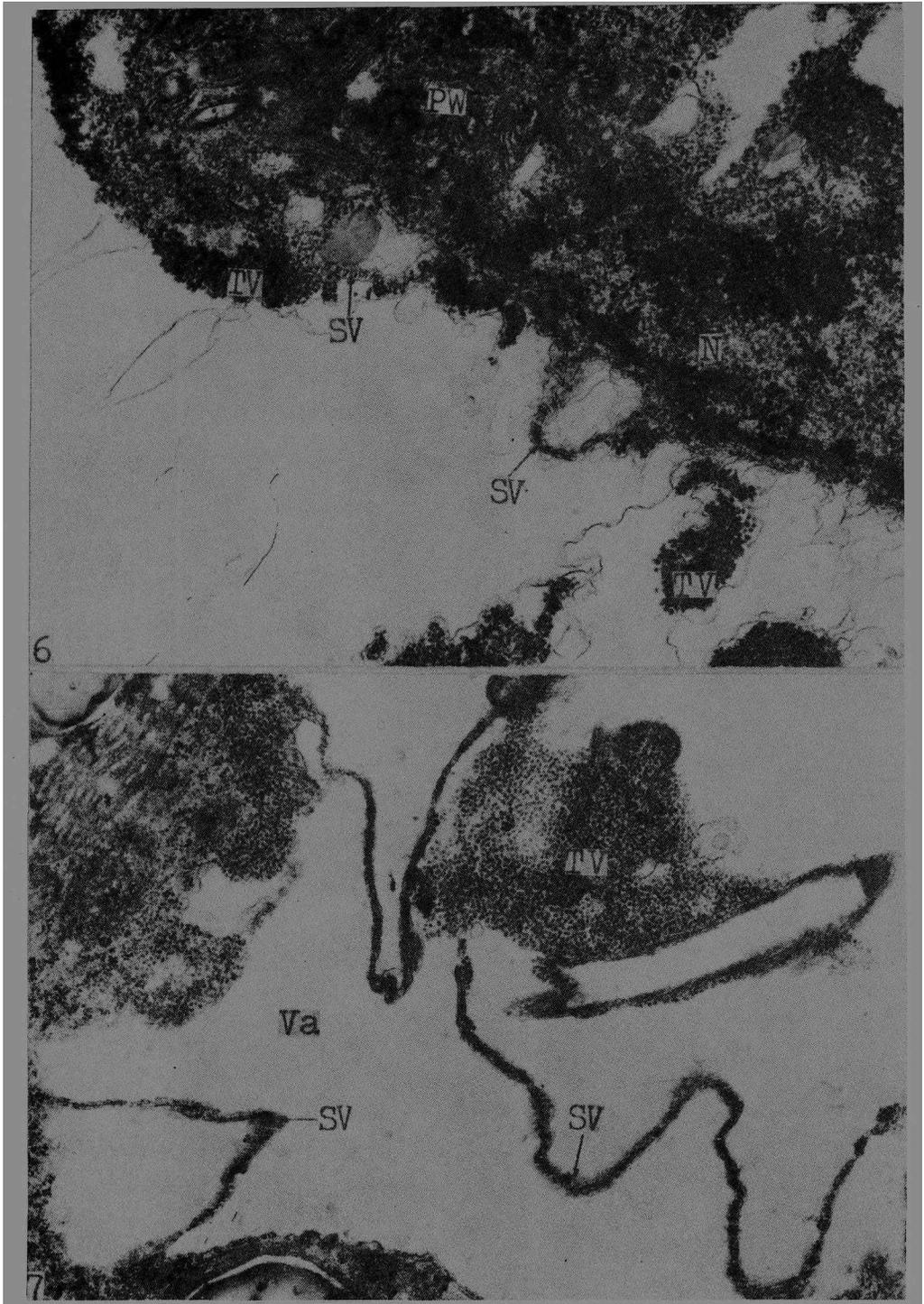
Ultrastructural responses of soybean leaf cells simultaneously infected with two morphologically distinct RNA viruses soybean mosaic virus and tobacco ringspot virus were studied. The major characteristic of Soybean cells infected with two viruses included: (1) There are two kind of viruses particles (SMV, TRSV) in the same cell of soybean leaf. (2) The viruses particles are much more than single infection respectively. (3) The high yield were gotten after purification. The mixture of purified SMV and TRSV were negatively stained and examined in the electron microscope, Flexuous rods typical of SMV (750nm in length) and TRSV (27nm in diameter) icosahedra were observed. (4) SMV-TRSV in the Outchterlony double-diffusion test and SDS-immunodiffusion respectively produced precipitin band upon reaction with known antiserum of the Arkansas.

Key words: SMV, TRSV, Mixed infection, Soybean leaf, Ultrastructure

李学湛：图版 I SMV 与 TSSV 混合感染大豆叶片细胞的超微结构研究

Plate. I Cytopathic effects of TRSV+SWV mixed infection





图版. II SMV 与 TRSV 混合感染大豆叶片细胞的超微结构研究

Plate. II Cytopathic effects of TRSV+SMV mixed infection

李学湛: SMV与TRSV混合感染大豆叶片细胞的超微结构研究图版说明

图1—A TRSV与SMV混合感染后的寄主叶片

B TRSV单独感染后的寄主叶片

C SMV单独感染后的寄主叶片

图2 病叶研磨液(SMV、TRSV)与已知SMV抗血清反应。

图3 病叶研磨液(SMV、TRSV)与已知TRSV抗血清反应。

图4 SMV与TRSV混合感染后提纯,经负染电镜照片,显示了两种形态的病毒粒

体(×52000)。

图5 细胞质区出现大量的小泡囊物质和风轮状内含体(×40000)。

图6 靠近细胞核膜处有一些SMV和TRSV粒体及风轮状内含体(×32000)。

图7 液泡中SMV与TRSV粒体集聚、增多,TRSV粒体相对多于SMV粒体(×26000)。

Fig. 1 a. The host leaf of mixed infection TRSV + SMV.

b. The host leaf of single infection TRSV.

c. The host leaf of single infection SMV.

Fig. 2. Ouchterlony double-diffusion test of SMV antiserum(center well) against crude sap extracts of TRSV+SMV(SV), Healthy(H), TRSV-infected(TV).

Fig. 3. SDS Immunodiffusion test of TRSV antiserum(center well) against crude sap extracts of TRSV + SMV(TV), Healthy(H), SMV-infected(SV).

Fig. 4. Cytopathic effects of TRSV+SMV mixed infection. It is a electron microscope photograph that virus particles was negatively stained after purification.(×52000)

Fig. 5. There were a large quantity of vesicles and pinwheel inclusion in the cytoplasmic area.(×40000)

Fig. 6. There are great number of virus particles of two mophologically and pinwheel inclusions near the nucleus.(×32000)

Fig. 7. Showing a large quantity of virus particles-aggregates of two morphologically in vacuole of the cell, the TRSV particles are more then SMV particles relatively.(×26000)

TRSV = TV = 烟草环斑病毒

SMV = SV = 大豆花叶病毒

BPMV = B = 菜豆荚斑病毒

CW = 细胞壁

V = 液泡

Ve = 小液泡

PW = 风轮体

Cy = 圆柱体

CH = 叶绿体

CS = 细胞质棘丝

T = 液胞膜

N = 细胞核

H = 健康植株

AT = 烟草环斑病毒抗血清

AS = 大豆花叶病毒抗血清

SV = soybean mosaic virus

TV = tobacco rinspot virus

CW = cell wall

PW = pinwheel

V = vacuole

N = nucleus

CS = cytoplasmic strand

Cy = cylindrical

BPMV = bean pot mosaic virus

CH = chloroplast

Ve = vesicles

T = tonoplast

AT = The antiserum of TRSV

AS = The antiserum of SMV

H = Healthy