

PVY/PVX 协生作用对病毒浓度及寄主细胞超微结构的影响

郭兴启¹, 冯 焮¹, 李向东², 郭恒俊¹, 李照会²

(¹ 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018; ² 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018)

摘要:以烟草品种三生烟(*N. tabacum* cv. Samsun)为测试寄主,采用酶联免疫检测实验(TAS-ELISA)和电镜观察的方法,在温室条件下研究了马铃薯Y病毒(PVY)和马铃薯X病毒(PVX)复合侵染所引起的寄主症状和病毒浓度变化的特点、不同条件下复合侵染时病毒浓度的变化规律以及复合侵染对寄主细胞超微结构的影响。结果表明,PVY/PVX在烟草植株内发生了协生作用,PVY是协生病毒,PVX是被协生病毒。与单独侵染相比,PVY和PVX的复合侵染使烟草植株症状明显加重。PVY在复合侵染植株中的浓度与在单独侵染植株中相比,没有明显的变化,而PVX在复合侵染植株中的浓度明显高于在单独侵染植株中的浓度。这种现象不受PVY株系、处理季节和接种次序的影响。但是,不同PVY株系、不同处理季节或不同接种次序对PVY/PVX协生作用中PVX浓度的影响程度存在着一定的差异。电镜观察表明,与不接种病毒或单独侵染的植株相比,受复合侵染的烟草叶片细胞超微结构发生了明显的病理学变化。细胞肿胀,叶绿体、线粒体等细胞器受到严重损伤,细胞质内有风轮状、薄片状的内含体,由于在细胞质中常常有大量纤维状的PVX病毒粒子聚集体存在,这意味着PVX浓度的增加可能是在复合侵染的细胞中病毒大量繁殖的结果。

关键词:马铃薯Y病毒;马铃薯X病毒;协生作用;细胞病理学

Effect of Synergism Between PVY and PVX on the Viruses Titer and the Ultrastructure of Infected Cells of Tobacco Plant

GUO Xing-qi¹, FENG Xin¹, LI Xiang-dong², GUO Heng-jun¹, LI Zhao-hui²

(¹ College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018;

² College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: The viruses titer and the ultrastructure of infected cells of tobacco host (*N. tabacum* cv. Samsun), doubly infected by potato virus Y necrosis strain (PVY^N) and potato virus X (PVX), were studied under greenhouse conditions. The results indicated that PVY^N and PVX interact synergistically, and tobacco plants which doubly infected by PVX and PVY^N could greatly increased symptom severity as compared with that induced by individual virus. As determined by triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (TAS-ELISA), the titer of PVX in tobacco leaves infected by both PVY^N and PVX was up to 9.10 times higher than the plants infected by PVX only. No significant differences in PVY^N titer were detected between singly and doubly infected plants. The enhancement of PVX titer in doubly infected plants was evident in greenhouse and was not influenced by virus strains, tested seasons, intervals between PVY^N and PVX inoculation. Sections of doubly infected leaves were examined with an electron microscope. It was found that cells contained pinwheels and large masses of PVX-like particles, pinwheels and laminate inclusion, or all three structures, most of them

收稿日期: 2002-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100117)、中国博士后科学基金资助项目(2002031167)和山东省科技厅重大科技攻关资助项目(981020171)

作者简介: 郭兴启(1963-),男,山东嘉祥人,副教授,博士,主要从事植物病毒与分子生物学研究工作。Tel: 0538-8242922; Fax: 0538-8226399; E-mail: xqguo@sdau.edu.cn

were swollen, and their chloroplast and other organelle were damaged heavily. This suggests that doubly infected cells be involved in the enhancement phenomenon, which seems the result of an increase in the amount of PVX synthesized in them.

Key words: Potato virus Y; Potato virus X; Synergism; Cytopathology

随着种植制度和生态条件的变化,植物病毒协生作用(synergism)的种类和数目不断增加,从而加剧了植物病毒的危害程度,给农业生产带来了巨大的经济损失。因此,探讨不同植物病毒之间所发生的协生作用及其分子机理是正确认识植物病毒病害生态学和流行病学的重要环节,也是当前植物病毒学研究领域中的新热点之一^[1-4]。近年来,人们利用生物技术手段,试图从分子水平上来阐述病毒协生作用的机理,并取得了有意义的研究结果。但是,由于病毒之间协生作用涉及到病毒、寄主与环境三者之间的相互作用,使得发生协生作用的病毒在不同寄主中的协生关系不同,所导致的寄主症状的严重程度也不一样。特别是病毒不同株系、病毒接种次序、环境因素等与协生作用的关系还存在着争议^[2,5],协生作用所导致的寄主细胞病理学变化的研究还未见报道。

国内外已有马铃薯 Y 病毒和马铃薯 X 病毒(PVY/PVX)发生协生作用的报道,但多数是关于 PVY/PVX 协生作用的分子机制方面的研究结果^[1,6,7],如李为民等以转基因烟草为材料,证明了 HC-Pro 不仅是 PVY/PVX 协生作用的必需因子,而且还具有增强 PVX 在寄主体内长距离运输的功能。本研究以三生烟为测试寄主,探讨 PVY/PVX 协生作用对病毒浓度以及寄主细胞超微结构的影响,其结果不仅对于烟草病毒病的防治具有重要的指导意义,而且还为进一步深入研究 PVY/PVX 协生作用的分子生物学提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

马铃薯 Y 病毒普通株系(PVY⁰)由浙江大学生物技术研究所周雪平教授惠赠,马铃薯 Y 病毒坏死株系(PVY^N)由中国农业科学院生物中心刘德虎研究员惠赠。马铃薯 X 病毒(PVX)由本实验室保存,从山东省种植的烟草植株上分离、纯化获得。这 3 种病毒分别繁殖并保存在普通烟草植株(NC89)上。测试寄主为三生烟(*N. tabacum* cv. Samsun)。

PVY^N 和 PVX 兔抗血清由本实验室制备、保存。ELISA 间接法实验表明,PVY^N 和 PVX 抗血清

效价分别为 1:1 500 和 1:4 000;PVY^N 和 PVX 单克隆抗体均由加拿大太平洋农业与食品研究中心 Wen R 博士提供,其效价分别为 1:10 000 和 1:15 000。

1.2 方法

1.2.1 病毒的接种和检测 取保存毒源的病叶,按 1:10(w/v)比例用磷酸缓冲液(PB)研磨,经低速离心后,上清即为接种物。混合接种时分别取离心后的两种病汁液,按 1:1(v/v)比例混合后作为接种物。采用常规机械摩擦接种。单一病毒接种时每株接种物用量为 300 μ l,混合接种时每株接种物用量为 600 μ l。样品病毒浓度的检测采用三抗体夹心 ELISA(TAS-ELISA)方法。

1.2.2 温室实验 (1) PVX 和 PVY^N 复合侵染植株的症状特点 在温室(20~25 $^{\circ}$ C)内选取长势一致的烟草植株,分成不同处理,在植株 4 叶期时分别接种 PVY^N,PVX 和 PVY^N+PVX,并设有非接种的对照植株。接种 1 周后开始记录植株主要症状的变化;(2) PVX 和 PVY^N 复合侵染时各自浓度的变化特点 温室(20~25 $^{\circ}$ C)内当植株长至 4 叶期时进行病毒接种实验。实验分为 3 组,一组只接种 PVY^N,另一组只接种 PVX,第三组混合接种 PVY^N 和 PVX。接种后第 7、14、21、28、35 和 42 天,分别从植株的第 4、5、6、7、8 和 9 片叶采集样品并进行 ELISA 测定。实验重复 3 次;(3) PVY 不同株系对复合侵染时 PVX 浓度的影响 当烟草植株长至 4 叶期时进行病毒接种实验。实验分为 3 组,一组只接种 PVX,另一组混合接种 PVY⁰ 和 PVX,第三组混合接种 PVY^N 和 PVX。取样时间和位置同(2);(4) 不同季节对复合侵染时 PVX 浓度影响的实验 为了明确不同季节对复合侵染时 PVX 浓度的影响,分别在春季、夏季和冬季进行了温室实验。植株长至 4 叶期时分别接种 PVX 和 PVY^N+PVX,接种后第 30 天取植株的上部叶片进行 ELISA 检测。重复 2 次;(5) 复合侵染时 PVY^N 与 PVX 接种间隔期对 PVX 浓度的影响 为探讨在复合侵染时病毒接种次序和间隔期对 PVX 的浓度的影响,根据 PVY^N 与 PVX 接种时间的关系将实验分为 3 类:1)PVY^N 提前接种,间隔一定时间后再

接种 PVX。又分 3 组处理,即在 PVX 接种前 72 h (+72)、48 h (+48) 和 24 h (+24) 分别接种 PVY^N; 2) 接种 PVX 后,相隔一定时间再接种 PVY^N。又分成 3 组处理,即接种 PVX 后 24 h (-24)、48 h (-48) 和 72 h (-72) 分别接种 PVY^N; 3) PVY^N 和 PVX 在植株 4 叶期时混合接种(0)。上述每组中不同处理都设有只接种 PVX 的单独侵染为对照,在 PVX 接种后第 21 天时取植株的上部叶片, TAS-ELISA 检测各处理中的 PVX, 分析比较单独侵染和复合侵染中 PVX 浓度的变化。

1.2.3 样品的超微结构观察 在温室(20~25℃)条件下,选取长势一致的 4 叶期烟草植株,分成 3 组(每组 5 株),分别接种 PVY^N、PVX 和 PVY^N + PVX,以不接种病毒的植株为对照。接种后第 28 天时从复合侵染的植株上症状表现最明显的第 7 叶(即接种后的第 4 叶)取样,单独侵染和未接种的对照植株也从相同的叶位取样。从每组的 5 株烟草上取 30 个样品。样品切成 1 mm × 1 mm 的小块,用 3.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛混合液固定 2 d,经缓冲液漂洗后用 1% 四氧化锇固定 6 h,乙醇梯度脱水, Epon812 环氧树脂渗透包埋,用 Reichert-Jung ULTR ACUTE 型超薄切片机切片,然后进行醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,在 JEM-1200EX 型透射电镜下观察。

2 结果与分析

2.1 PVX 和 PVY^N 单独侵染和复合侵染时的寄主症状

与健康对照植株相比,接种 PVY^N 的烟草植株,发病初期叶片明脉,上部叶片变小,有时叶脉和茎有少量条斑坏死,后期植株下部叶片干枯下垂,但

不脱落,植株略有矮化;接种 PVX 的烟草植株,叶片轻花叶,在上部小叶上有大小不等、形状不规则的黄绿或淡黄色斑驳,叶片很少出现卷曲或不平,植株长势基本正常;接种 PVY^N + PVX 的烟草植株,症状出现早,初期新生叶明脉,斑驳花叶,在接种后的第 4 片叶,即植株的第 7 片叶上症状最严重,叶脉和茎有大量条斑坏死,叶缘向下卷曲,病重时呈圆筒状,病叶较健叶小,色泽较淡,后期植株下部叶片干枯下垂,易脱落,植株严重矮化。

2.2 单独侵染和复合侵染时 PVX 或 PVY^N 在寄主叶片内浓度的变化比较

采用 TAS-ELISA 的方法对 PVX 或 PVY^N 单独侵染和复合侵染时在寄主叶片内的浓度进行检测,并对各自在单独侵染和复合侵染时的浓度变化做了比较,结果见表 1。从表 1 可以看出,在同样的条件下 PVX 在复合侵染时的浓度明显高于单独侵染时的浓度。随着测试叶位的不同,这种差异也发生了变化。如对接种叶片即植株的第 4 片叶检测时, PVX 在复合侵染中的浓度是单独侵染的 1.52 倍;对第 6 片叶检测时 PVX 在复合侵染中的浓度是单独侵染的 5.17 倍;对第 7 片叶检测时二者的比值高达 9.10。这些结果表明 PVY^N 和 PVX 复合侵染时二者发生协生作用,促使 PVX 浓度增加。接种初期 PVX 浓度增加的幅度小,到接种后第 28 天时达到最高,以后又趋于下降, PVX 是被协生病毒。从表 1 还可以看出,在接种后的每次检测时 PVY^N 在单独侵染植株中的浓度与复合侵染时的浓度相比没有明显的差异。如接种后第 7 天检测时, PVY^N 在复合侵染中的浓度是单独侵染的 1.01 倍;接种后第 28 天检测时二者的比值为 0.93,表明在 PVY^N/PVX 协生作用中 PVY^N 是协生病毒。

表 1 病毒单独侵染和复合侵染时烟草植株叶片内 PVX 或 PVY^N 浓度的变化比较

Table 1 Comparison of PVX or PVY^N titer in the leaves of tobacco plants singly and doubly infected with PVX and PVY^N as determined by TAS-ELISA

接种后天数 Days post inoculation (d)	取样叶位 Position of leaf tested	对 PVX 的 ELISA 吸收值 (OD ₄₀₅) ELISA values (OD ₄₀₅) for PVX		对 PVY ^N 的 ELISA 吸收值 (OD ₄₀₅) ELISA values (OD ₄₀₅) for PVY ^N		复合侵染与单独侵染的比率 Ratio of dual / single	
		单独侵染 PVX	复合侵染 PVX + PVY ^N	单独侵染 PVY ^N	复合侵染 PVX + PVY ^N	(PVX + PVY ^N) / PVX	(PVX + PVY ^N) / PVY ^N
7	4th	0.179 ± 0.021	0.272 ± 0.019	0.183 ± 0.019	0.185 ± 0.021	1.52	1.01
14	5th	0.248 ± 0.024	0.682 ± 0.032	0.247 ± 0.023	0.240 ± 0.030	2.75	0.97
21	6th	0.273 ± 0.018	1.411 ± 0.053	0.301 ± 0.027	0.325 ± 0.028	5.17	1.08
28	7th	0.264 ± 0.021	2.402 ± 0.066	0.291 ± 0.030	0.271 ± 0.017	9.10	0.93
35	8th	0.239 ± 0.017	1.776 ± 0.045	0.254 ± 0.025	0.262 ± 0.024	7.43	1.03
42	9th	0.251 ± 0.023	1.150 ± 0.030	0.221 ± 0.020	0.239 ± 0.026	4.58	1.08

2.3 在 PVY/PVX 协生作用中 PVY 不同株系对寄主叶内 PVX 浓度的影响

以 PVX 单独侵染的植株为对照,笔者用 PVX 与 PVY^N 和 PVX 与 PVY^O 组成的两类病毒复合接种物分别接种烟草植株,探讨了 PVY 不同株系对 PVY/PVX 协生作用中被协生病毒 PVX 浓度的影响。结果(表 2)表明,虽然 PVY^O 和 PVY^N 都能与 PVX 发生协生关系,使被协生病毒 PVX 浓度增高,但是, PVY 不同株系在 PVY/PVX 协生作用中对 PVX 浓度的影响存在差异。在相同条件下, PVY^N/

PVX 组成的协生关系使 PVX 在寄主中的浓度升高的数值略高于因 PVY^O/PVX 协生作用使 PVX 浓度增高的数值。如在接种后 21 d 时从各处理植株的第 6 片叶上取样进行的 ELISA 测试所得的 OD₄₀₅ 值可推出, PVY^N/PVX、PVY^O/PVX 复合侵染时 PVX 的浓度分别是 PVX 单独侵染时的 5.48 倍和 5.02 倍。实验表明,在 PVY/PVX 协生作用中株系 PVY^N 比 PVY^O 更利于被协生病毒 PVX 浓度的增高。

表 2 在 PVY/PVX 协生作用中 PVY 不同株系对烟草植株叶片内 PVX 浓度的影响

Table 2 Effect of different PVY strain on the PVX titer in singly and doubly infected tobacco plants as determined by TAS-ELISA

接种后天数 Days post inoculation	取样叶位 Position of leaf tested	对 PVX 的 ELISA 吸收值(OD ₄₀₅) ELISA values(OD ₄₀₅) for PVX			复合侵染与单独侵染的比率 Ratio of dual / single	
		单独侵染 PVX	复合侵染 PVX + PVY ^O	复合侵染 PVX + PVY ^N	(PVX + PVY ^O) / PVX	(PVX + PVY ^N) / PVX
		7	4 th	0.183 ± 0.024	0.238 ± 0.018	0.260 ± 0.017
14	5 th	0.252 ± 0.027	0.612 ± 0.024	0.663 ± 0.030	2.43	2.63
21	6 th	0.301 ± 0.021	1.511 ± 0.063	1.650 ± 0.043	5.02	5.48
28	7 th	0.278 ± 0.018	2.350 ± 0.082	2.563 ± 0.071	8.45	9.22
35	8 th	0.270 ± 0.020	1.874 ± 0.061	2.025 ± 0.051	6.94	7.50
42	9 th	0.281 ± 0.025	1.273 ± 0.044	1.340 ± 0.061	4.53	4.77

2.4 在 PVY^N/PVX 协生作用中不同季节对寄主叶内 PVX 浓度的影响

采用 TAS-ELISA 方法对 PVY^N/PVX 协生作用中 PVX 的浓度变化与季节的关系进行探讨,并比较了单独侵染和复合侵染中 PVX 浓度变化的差异。结果(表 3)表明,季节不同即温度和光照时间的差异,对 PVY^N/PVX 协生中被协生病毒 PVX 在寄主

细胞内的复制和积累产生较大的影响。在 PVY^N/PVX 协生中促使 PVX 积累量由大到小的季节依次为:春季、夏季和冬季。从 3 年实验数据的平均值可以看出,春季测试气温为 20 ~ 25℃ 时,在复合侵染植株中被协生病毒 PVX 的浓度是单独侵染时的 8.60 倍,而在夏季(30 ~ 35℃)和冬季(15 ~ 20℃)测试时二者的比值分别为 3.55 和 2.14。

表 3 在 PVY^N/PVX 协生作用中不同季节对烟草植株叶片内 PVX 浓度的影响

Table 3 Effect of different seasons on titer of PVX in the leaves of tobacco plants singly and doubly infected plants as determined by TAS-ELISA

处理季节 Treated season	检测时间 (年-月) Tested time (year-month)	测试气温 Tested temperature(℃)	平均日照时数 Sunshine time per day(h)	对 PVX 的 ELISA 吸收值(OD ₄₀₅) ELISA values(OD ₄₀₅) for PVX		复合侵染与单独 侵染的比率 Ratio of doubly infected/singly infected
				单独侵染 PVX	复合侵染 PVX + PVY ^N	
春季 Spring	2000-5	20 ~ 25	7.4	0.217 ± 0.021	1.872 ± 0.081	8.63
	2001-5	20 ~ 25	8.3	0.186 ± 0.020	1.581 ± 0.072	8.50
	2002-5	20 ~ 25	6.8	0.193 ± 0.020	1.673 ± 0.050	8.67
平均 Average						8.60
夏季 Summer	1999-8	30 ~ 35	6.2	0.203 ± 0.013	0.724 ± 0.033	3.57
	2000-8	30 ~ 35	5.7	0.203 ± 0.013	0.775 ± 0.045	3.82
	2001-8	30 ~ 35	9.1	0.194 ± 0.021	0.634 ± 0.025	3.27
平均 Average						3.55
冬季 Winter	2000-1	15 ~ 20	5.5	0.198 ± 0.022	0.430 ± 0.016	2.17
	2001-1	15 ~ 20	4.8	0.217 ± 0.019	0.480 ± 0.017	2.21
	2002-1	15 ~ 20	6.1	0.182 ± 0.018	0.371 ± 0.020	2.04
平均 Average						2.14

2.5 在 PVY^N/PVX 协生作用中 PVY^N 接种次序对寄主叶内 PVX 浓度的影响

PVY^N 接种次序及不同间隔期对 PVX 浓度影响的实验结果(表 4)表明, PVY^N 接种次序对被协生病毒 PVX 浓度的增减有一定的影响。与 PVY^N 和 PVX 同时接种的处理相比, PVY^N 提前接种有利于 PVX 浓度的增高。如 PVY^N 比 PVX 提前接种 72h 的处理, PVX 在复合侵染植株中的浓度是其在单独侵染植株中的 5.01 倍;而 PVY^N 比 PVX 滞后

接种 72 h 的处理, PVX 在复合侵染植株中的浓度是其在单独侵染植株中的 2.26 倍。从表 4 还可以看出,在 PVY^N 提前接种的不同间隔期的各处理之间, PVX 在复合侵染中增加的幅度差异明显。PVY^N 比 PVX 提前 48 h 接种时的处理, PVX 在复合侵染植株的浓度基本达到最大,是单独侵染的 4.97 倍;在 PVY^N 迟后接种的不同间隔期的各处理之间, PVX 在复合侵染中增加的幅度差异不明显。

表 4 在 PVY^N/PVX 协生作用中 PVY^N 接种次序对烟草植株叶片内 PVX 浓度的影响¹⁾

Table 4 Effect of sequential inoculation of PVY^N on PVX titer in the leaves of tobacco plants infected with PVX and PVY^N as determined by TAS-ELISA

PVY ^N 与 PVX 接种间隔期 Interval between PVY ^N and PVX inoculation (h)	对 PVX 的 ELISA 吸收值 (OD ₄₀₅) ELISA values (OD ₄₀₅) for PVX		复合侵染与单独侵染的比率 Ratio of doubly infected/singly infected
	单独侵染 PVX	复合侵染 PVX + PVY ^N	
+ 72	0.294 ± 0.023	1.473 ± 0.026	5.01
+ 48	0.287 ± 0.026	1.427 ± 0.030	4.97
+ 24	0.272 ± 0.018	0.851 ± 0.027	3.13
0	0.294 ± 0.028	0.885 ± 0.019	3.01
- 24	0.304 ± 0.023	0.648 ± 0.024	2.13
- 48	0.281 ± 0.022	0.581 ± 0.021	2.07
- 72	0.292 ± 0.023	0.660 ± 0.024	2.26

¹⁾ 病毒接种在 4 叶期进行, “0” 示 PVY^N 与 PVX 同时接种, “+” 示先接 PVY^N 后接 PVX, “-” 示先接 PVX 后接 PVY^N

Inoculation was conducted on the fourth fully expanded leaf; PVY^N was applied to the fourth leaf at the same time (0) or at various intervals before (+) or after (-) in which PVX was applied

2.6 PVY^N/PVX 协生作用对寄主细胞病理学的影响

以不接种病毒的烟草植株作对照,对 PVY^N 或 PVX 单独侵染以及二者复合侵染的植株细胞进行了电镜超微结构观察。结果表明,健康对照植株的细胞结构完整,各细胞器膜状结构清晰,发育正常(图版 I-1);在只接种 PVY^N 的植株细胞质中常常有大量风轮状(pinwheels)内含体,并伴随着病毒粒子的出现(图版 I-2)。细胞内有少量的膜状结构增生,细胞器如叶绿体、线粒体、细胞核等受到不同程度的损伤(图版 I-3);在只接种 PVX 的植株细胞中,细胞质内包含有线状的类似病毒的粒子,还含有薄片状内含体(laminate inclusion components, LIC), LIC 有两种形式,一是直杆型,另一种是卷筒型(scroll-like)(图版 I-4);细胞内质网状结构也有一定的增生,液泡内偶尔能看到小泡囊,其内含有纤维结构(图版 I-5)。

与单独侵染和健康对照样品相比,复合侵染时发生的 PVY^N/PVX 协生作用对植株细胞的超微结构产生了一些特征性的变化。(1) 细胞形态:受复合侵染的植株叶片细胞严重肿胀、变形;(2) 内含体的种类和数量:同一细胞内可以看到风轮状内含体和

形如卷筒状的薄片内含体(图版 I-6),或大量的直杆型薄片内含体(图版 II-1),或风轮状内含体、卷筒状薄片内含体和直杆型薄片内含体(图版 II-2)。(3) 病毒粒子形状和数量:伴随着内含体的出现细胞质内有大量的病毒粒子聚集体,由于病毒粒子大多以相同的方向平行排列,聚集体通常呈现出纤维状结构,充满细胞质的绝大部分,这些病毒粒子的特征与 PVX 的相似(图版 II-3)。(4) 细胞器的变化:复合侵染的细胞内多数叶绿体肿胀,被膜破碎严重,有的完全解体,基粒片层分散在细胞质中(图版 II-4)。细胞内过氧化物体增多(图版 I-6,图版 II-4)。线粒体数量增多、聚集、膨胀,而且大多线粒体被膜消解、变形,内嵴模糊,结构被破坏(图版 II-5);细胞核由圆形变成不规则形,内部的染色质分布不均匀,呈降解状态(图版 II-6)。(5) 膜状结构:受复合侵染的细胞最明显的结构变化是产生许多大小不等的次级泡囊。在液泡膜边缘处存在着许多直径约 50 nm 的小泡囊(图版 II-7) 细胞内质网结构增生,常常观察到有多层膜同心排列的髓鞘状结构伸入液泡(图版 II-7)。在一些细胞的液泡膜边缘可看到伸向液泡的、体积较大的多泡体结构(图版 II-8)。

3 讨论

已知, PVY^N 已成为当前我国尤其是山东省内引起茄科作物病毒病的主导株系, 并且常常与 PVX 混合侵染, 造成严重的病毒病害。因此, 笔者以 PVY^N 和 PVX 为毒源, 烟草三生烟为测试寄主, 在温室条件下研究了 PVY^N 和 PVX 复合侵染时病毒浓度的变化特点以及所导致的寄主细胞病理学变化。结果表明, PVY^N 和 PVX 复合侵染能使植株的症状加重, PVX 在复合侵染植株中的浓度明显增加, 并且与接种后的叶位有关。在接种后第 4 片叶时 PVX 浓度最高, 是其单独侵染时的 9.10 倍, 而 PVY^N 在复合侵染和单独侵染时其浓度变化不大, PVY^N 是协生病毒, PVX 是被协生病毒, 这与 Goodman 等人报道的结果一致^[8]。

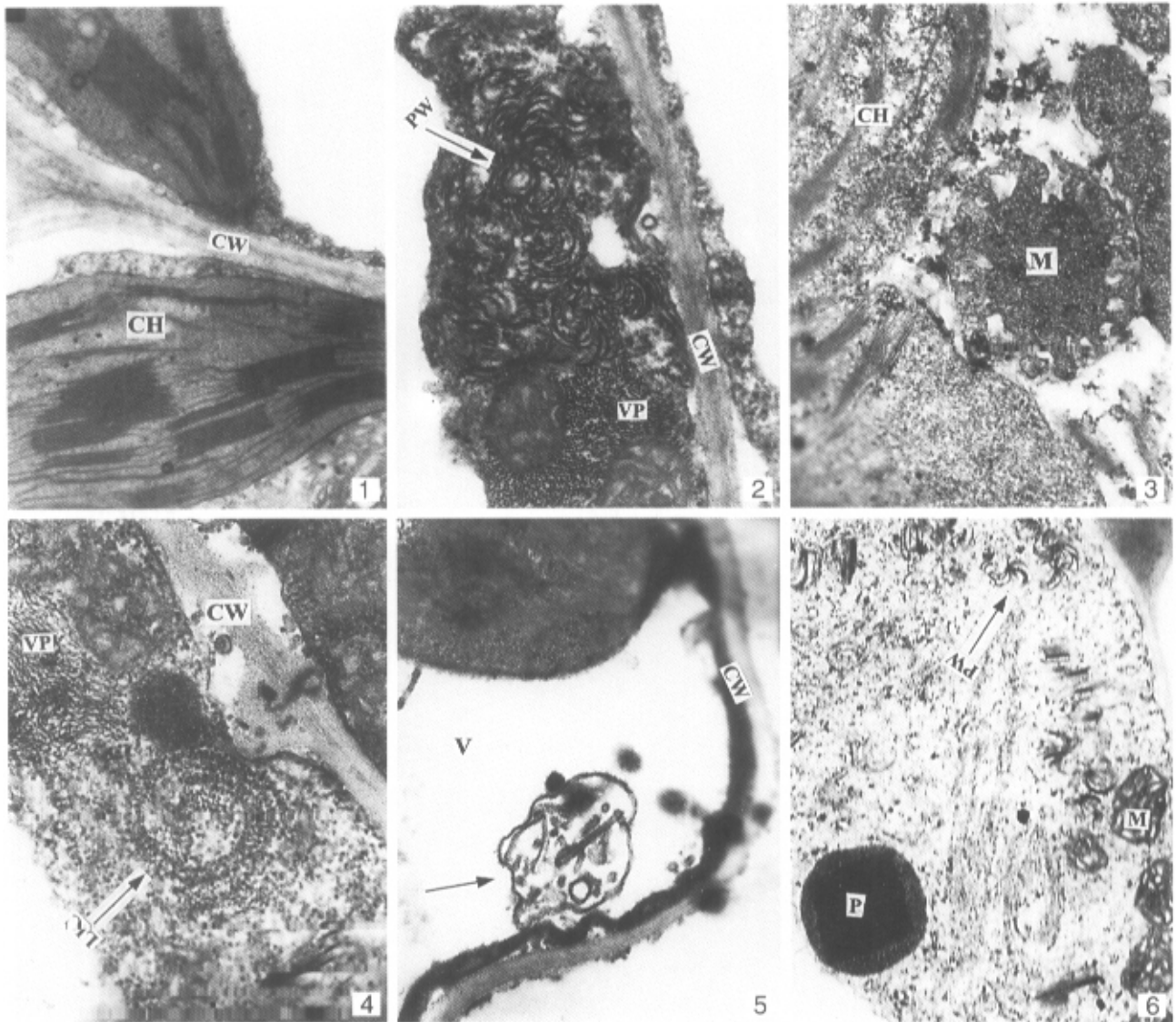
植物病毒协生作用涉及到病毒与病毒、病毒与寄主、病毒与环境间的相互作用, 比病毒单独侵染更复杂, 因而可能受到如温度、品种、病毒侵染次序与浓度等多种因素的影响^[4-8]。本研究表明, 在春季、夏季、冬季中 PVY^N 和 PVX 复合侵染都能发生协生作用, 使 PVX 浓度增加。但是, 春季 PVX 在复合侵染植株中的浓度与在单独侵染植株的比率最高, 这与前人报道的结果一致^[9]; 不同 PVY^N 接种次序的处理都能使 PVY^N 和 PVX 发生协生作用, 但是, 各处理之间对协生作用中 PVX 浓度的增加幅度存在差异, PVY^N 比 PVX 提前接种 72 h 的条件下, 能使 PVX 浓度增加最大。对这种现象的解释笔者认为, 植物本身具有天然的抗病毒的能力, 其抗病机制类似于转录后的基因沉默(PTGS), 由于 PVY 的 HC-Pro 蛋白是 PTGS 的抑制者, 因此, PVY^N 的提前侵染可能抑制了 PTGS, 使植物丧失了天然抗病毒的能力, 当随后的 PVX 再侵染时就可迅速而大量地繁殖^[10-12]。同时, 笔者用 PVY^N 和 PVY^O 分别与 PVX 组合, 比较 PVX 在 PVY^N/PVX 和 PVY^O/PVX 协生作用时浓度的差异, 表明, PVY 不同株系对病毒协生作用有一定的影响, 但没有明显的差异。

关于植物病毒之间发生协生作用所引起的寄主超微结构病变的研究, 国内外还未见报道。本实验表明, PVY^N/PVX 协生作用在使植株的症状加重和 PVX 浓度增加的同时, 也造成了细胞结构的病理学变化。受复合侵染的烟草植株细胞超微结构具有下列特点: 细胞明显肿胀, 细胞质内有大量纤维状的

PVX 病毒粒子, 在同一细胞内可见风轮状内含体、直杆型薄片内含体和卷筒型薄片内含体, 线粒体增多、聚集, 并发生不同程度的肿胀变形, 叶绿体等其它细胞器也受到严重损伤, 细胞内质网结构增多, 在液泡内常有大的泡囊。这些特征性变化是 PVY^N 或 PVX 单独侵染所不具有的, 这一结果为进一步研究 PVY^N/PVX 协生作用的机理提供了有关病毒与寄主互作的细胞病理学资料, 但能否作为鉴定和诊断病毒之间是否发生了协生作用的理论依据有待商榷。

References

- [1] 鲁瑞芳, 李为民, 王海云, 郭明, 彭学贤. 马铃薯 Y 病毒 HC-Pro 中心区域在病毒协生作用中的主导地位. 生物工程学报, 2001, 17(3): 264-268.
Lu R F, Li W M, Wang H Y, Guo M, Peng X X. The primary role of central region of HC-Pro of potato Y potyvirus in synergism of plant viruses. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(3): 264-268. (in Chinese)
- [2] Anjos J R, Jarlfor U, Ghabrial S A. Soybean mosaic potyvirus enhances the titer of two comoviruses in dually infected soybean plants. *Phytopathology*, 1992, 82(10): 1022-1027.
- [3] Wang Y Z, Gaba V, Yang J, Palukaitis P, Gal-On A. Characterization of synergy between cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology*, 2001, 92(1): 51-58.
- [4] 鲁瑞芳, 李为民, 彭学贤. 植物病毒协生作用及其分子机理. 中国病毒学, 2001, 16(3): 195-201.
Lu R F, Li W M, Peng X X. Molecular mechanism of synergism of plant virus. *Virologica Sinica*, 2001, 16(3): 195-201. (in Chinese)
- [5] Goldberg K B, Brakke M K. Concentration of maize chlorotic mottle virus increased in mixed infection with maize dwarf mosaic virus, strain B. *Phytopathology*, 1987, 77(2): 162-167.
- [6] Li W M, Lu R F, Guo M, Chen Y Q, Peng X X. Potato Y potyvirus helper component proteinase enhances long-distance movement of potato X potyvirus. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(9): 935-940.
- [7] Vance V B. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology*, 1991, 182: 486-494.
- [8] Goodman R M, Ross A F. Enhancement by potato virus Y of potato virus X synthesis in doubly infected tobacco depends on the timing of invasion by the viruses. *Virology*, 1974, 58: 16-24.
- [9] Rochow W F, Ross A F. Virus multiplication in plants doubly infected by potato virus X and Y. *Virology*, 1955, 1: 10-27.
- [10] 郭兴启, 朱常香, 宋云枝. RNA 沉默与植物病毒. 生命科学, 2002, 14(1): 9-13.
Guo X Q, Zhu C X, Song Y Z. RNA silencing and viruses in plants. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2002, 14(1): 9-13. (in Chinese)
- [11] Jorgensen R A, Atkinson R G, Forster R L S, Lucas W J. An RNA-based information superhighway in plants. *Science*, 1998, 279: 1486-1487.
- [12] Vance V, Vaucheret H. RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science*, 2001, 292: 2277-2280.

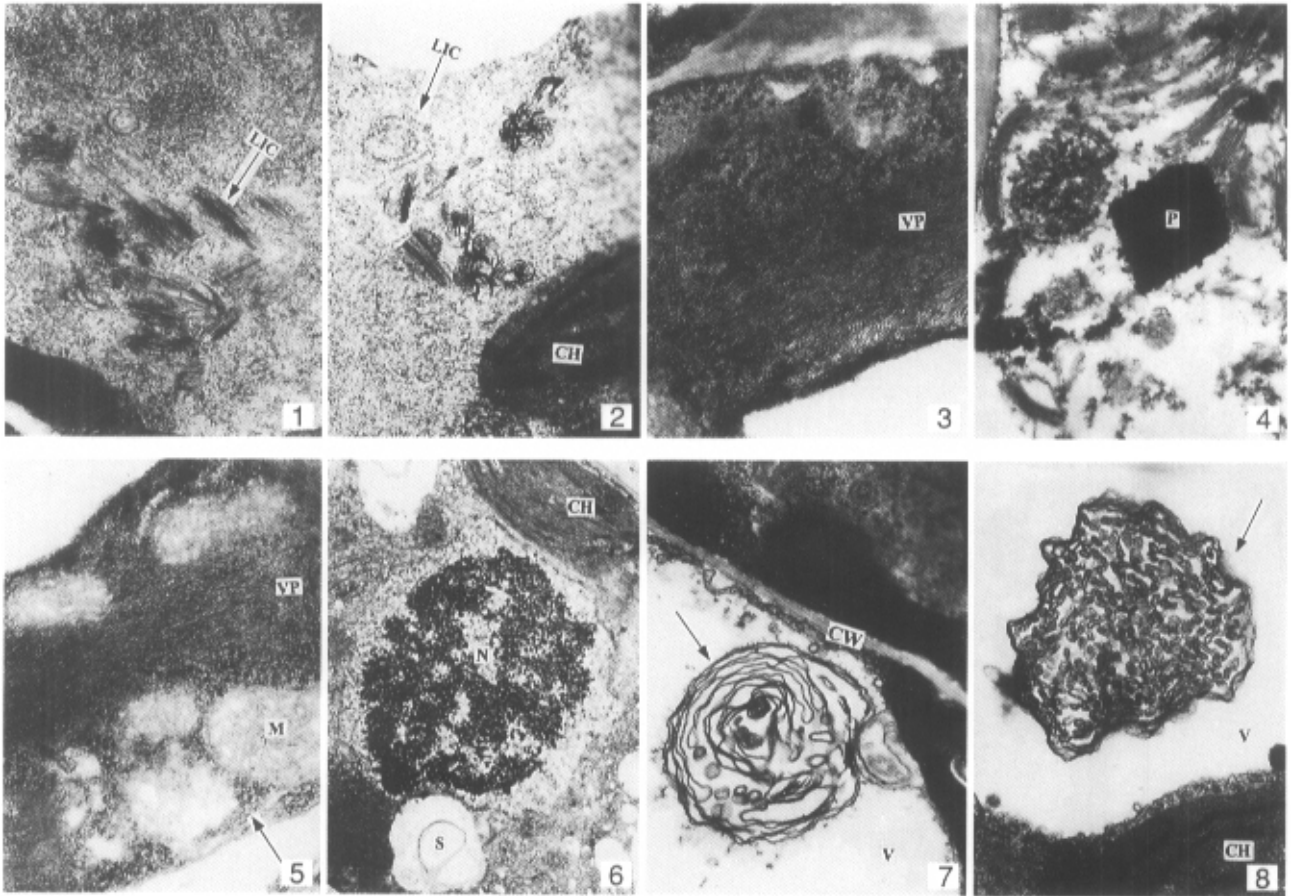


CW. 细胞壁; M. 线粒体; CH. 叶绿体; V. 液泡; N. 细胞核; S. 淀粉粒; VP. 病毒粒子; LIC. 薄片状内含体成分; PW. 风轮状内含体; P. 过氧化物酶体

CW. Cell wall; M. Mitochondria; CH. Chloroplast; V. Vacuole; N. Cell nucleus; S. Starch granule; VP. Virus particles; LIC. Laminate inclusion components; PW. Pinwheels; P. Peroxisome

1. 健康对照叶片细胞部分结构, $\times 40\ 000$; 2. 受PVYN 感染的叶片细胞质中风轮状内含体(—所示)和病毒粒子, $\times 50\ 000$;
 3. 受PVYN 感染的叶片细胞质中叶绿体、线粒体出现明显变形, 局部被膜发生破坏, $\times 30\ 000$; 4. 受PVX 感染的叶片细胞中形如卷筒的薄片内含体(—所示), $\times 25\ 000$;
 5. 受PVX 感染的叶片细胞中存在于液泡中的多膜结构(—所示), $\times 30\ 000$; 6. 复合感染的叶片细胞中含有大量风轮状内含体(—所示)和形如卷筒的薄片内含体, $\times 20\ 000$

1. Part of chloroplast and other organella in a normal leaf cell, $\times 40\ 000$; 2. Showing pinwheels (arrow) and virus particles in a leaf cell infected with PVYN, $\times 50\ 000$; 3. Chloroplast and mitochondria appear deformed and the envelopes were destructed in a leaf cell infected with PVYN, $\times 30\ 000$; 4. Showing scroll-like laminate inclusion components (arrow) and virus particles in a leaf cell infected with PVX, $\times 25\ 000$; 5. Showing proliferated membranes in the cytoplasm in a leaf cell infected with PVX (arrow), $\times 30\ 000$; 6. Region of a doubly infected cell containing scroll-like laminate inclusion components, pinwheels (arrow), $\times 20\ 000$



1. 复合侵染的叶片细胞中含有大量直杆型薄片内含体 (←所示), $\times 25\ 000$; 2. 复合侵染的叶片细胞中含有直杆型薄片内含体、卷筒型薄片内含体 (←所示)、风轮状内含体, $\times 20\ 000$; 3. 复合侵染的叶片细胞中含有大量纤维状的PVX病毒粒子聚集体, $\times 30\ 000$; 4. 复合侵染的叶片细胞中细胞器受到严重破坏, $\times 30\ 000$; 5. 复合侵染的叶片细胞中线粒体聚集、肿胀并被消化 (←所示), $\times 30\ 000$; 6. 复合侵染的叶片细胞中细胞核肿胀、变形, 局部核膜出现破裂, 染色质呈现降解, $\times 10\ 000$; 7. 复合侵染的叶片细胞中伸入液泡中髓鞘样结构 (←所示), $\times 20\ 000$; 8. 复合侵染的叶片细胞中伸入液泡中的多泡体结构 (←所示), $\times 30\ 000$

1. Region of a doubly infected cell containing straight laminate inclusion components (arrow), $\times 25\ 000$; 2. Region of a doubly infected cell containing straight laminate inclusion components, scroll-like laminate inclusion components (arrow), and pinwheels, $\times 20\ 000$; 3. Region of a doubly infected cell containing fibrous masses of PVX-like particles, $\times 30\ 000$; 4. Showing the chloroplast and other organelles were destructed in a doubly infected cell, $\times 30\ 000$; 5. Showing the collected mitochondria have been swollen and digested in a doubly infected cell (arrow), $\times 30\ 000$; 6. Nucleus showing the splitting of nuclear membrane in some area, $\times 10\ 000$; 7. Showing a myeloid body protruding into the central vacuole in a doubly infected cell (arrow), $\times 20\ 000$; 8. Showing a multivesicular body protruding into the central vacuole in a doubly infected cell (arrow), $\times 30\ 000$