

两个病毒分离物在心叶烟上产生的 系統环斑复原过程的观察

濮祖芹* 周家熾

(中国科学院微生物研究所, 北京)

引 言

Wingard^[2] 观察烟环斑病毒在烟的接种叶上产生环斑之后, 系統感染的叶上也出现环斑, 但此后新生叶上的环斑逐渐趋向集中在叶尖部分, 终于在再次新生的叶上没有病状了。他在这些已无病状的新生叶上再接种病毒时却不能再出现病状, 但是用这些已无病状的叶汁接种健康植株的叶上却产生典型的环斑, 这结果说明虽然已无病状但仍有病毒。他认为这是一种免疫现象。Price^[12,13,14] 重复证明了上述的观察, 并且注意到这种复原现象的环境条件相当广; 用复原植株所作扦插的植株上再接种病毒也不再出现病状, 但扦插10代后的植株中仍有少量病毒; 一般复原植株叶内的病毒浓度仅为有病状叶内的10—20%。Price 认为这是感染病毒的植株内的某种细胞免疫现象。

但是 Henderson^[9] 和 Valteau^[18] 认为这是外在温度影响了病状的发展。Valteau^[19] 又指出实际上并非完全复原, 仅是病状发展有所变化。Bawden^[3] 认为所谓复原是没有一整套原来的病状了。

Benda 和 Naylor^[4-6] 注意到有病烟株去顶之后所长腋梢并不是同时复原的。把复原植株上的芽或叶嫁接在健康植株(砧木)上, 复原植株的芽或叶(接穗)长出的叶仍然是复原状态, 但砧木所长的腋梢的叶上却出现典型环斑病状; 这结果说明健康砧木(根系)不能影响复原的接穗, 而接穗中的病毒却能侵入砧木, 又说明并无“复原因素”和病毒一起从复原的接穗被转移到砧木中去。用复原叶作扦插, 或用扦插的复原叶上叶脉和叶柄上所长不定芽作扦插, 之后所长的梢上叶仍然是复原状态; 再接种病毒也不能出现典型的环斑病状; 他们认为只要“初生组织的细胞中有病毒, 新生叶上一般无病状”, “复原叶无病状的机制是在叶内”。他们设想“是否接种叶内有某种反应可与系統感染叶中的复原相比拟”, 因此利用接种叶研究了不同环境条件对环斑形的影响。把接种后的植株放在遮荫(黑暗或低光强度)或高温(最低 35—36°C, 最高 44.5°C) 条件下一定时间之后, 再移回普通温室中, 就能延迟病斑的出现。延迟出现的环斑的直径, 视处理的条件和处理植株的大小而异, 与平常温室中出现的病斑直径(不到 4 毫米)比较, 则延迟出现的病斑直径的幅度变大了, 从 1 毫米到 55 毫米以上。一般较大植株在低光强度条件下是扩大型的病斑, 高温下是小型病斑。他们认为病斑延迟出现是坏死过程被抑制了, 病斑的扩大是病斑的中心区

* 南京农学院进修教师。

本文于 1964 年 10 月 5 日收到。

坏死被抑制而“病毒行动”并未被抑制，但高温下则“病毒行动”和坏死二者可能都被抑制。因此，他们认为叶的复原相当于扩大型的病斑中心区，并指出“Price 着重在病毒的浓度，Valleau 着重在病害不同时期内的不同病状，而我们着重在病毒行动与病斑形成的关系”。但他们又发现把高温处理过的复原植株移回普通温室后，可“再现典型的环斑病状”，这可能是由于高温下韧皮部和薄膜组织中的病毒行动被阻，也“可能和叶的发育有关”。

以上的简略的介绍是植物病毒免疫学中的三大现象中——复原，毒株间或病毒间的干扰，和局部侵染坏死引起的获得免疫——有关著名的烟环斑病毒病复原现象的三十年来的三种观点，即细胞免疫，环境影响和病毒行动；至今是尚待阐明的重大问题之一。

观 察

我们研究室在调查病毒的寄主范围时，先后从不同植物上分离的病毒已积累好几个分离物在心叶烟上产生典型的同心轮纹环斑，又能复原。这些材料一方面可研究复原，另一方面可以研究病斑的环与环之间是否有类似于局部坏死病毒所能引起获得免疫，对系统感染病毒的植株免疫作一些探索。

我们先后选定了两个分离物——萝卜 14 号^[1]是从萝卜花叶复合病中分离的，在心叶烟叶上的环斑较小较少，其中坏死的环斑也较少；龙葵 2 号是从龙葵矮生厚叶中分离的，在心叶烟叶上的环斑较大较多，其中坏死的环斑也较多。

我们先进行了一些观察，这些观察的本身似乎值得注意，因此根据 1963 年 12 月和 1964 年 1 月所观察的 9 株心叶烟上 25 片叶上萝卜 14 号分离物的 106 个环斑，以及 1964 年 1 月所观察的 5 株心叶烟上 20 片叶上龙葵 2 号分离物的 109 个环斑的逐日系统勾图，记录和数据先写此报告。

（一）两个分离物在心叶烟的接种叶和较老的叶上一般无明显的环斑病状

接种叶有时出现退绿黄斑，仅偶尔出现 1—3 环的（1—7 毫米直径）坏死的环斑。接种 8 天后系统感染的幼叶或新生叶上经常出现典型的同心轮纹环斑；但接种叶和系统感染后有环斑的叶之间有时有 1 至数片叶上无病状。

（二）在扩展中的幼叶上每天定时观察

病斑的出现有三种情况：退绿黄斑，或深浅绿相间的环斑，或坏死与绿色相间的环斑。

病斑的发展情况也不尽同：退绿黄斑既可保持原状一直到病斑消失，又可变成深浅绿相间的环斑或坏死的环斑。深浅绿相间的环斑的环数一般为 1—8 环，在 24 小时内有时增加 1—3 环，有时竟变为退绿黄斑。坏死的环斑虽能扩大，环数也能增加，但不能转变为其他两种形式，也不能消失。

病斑的消失过程也不一样：病斑从轮廓不清到消失的过程，有些是从病斑的中部开始模糊，有些是从病斑的外缘开始模糊，然后消失。有些病斑消失后可再现，再模糊，而后再消失。也有少数病斑消失后再现时变成坏死的环斑，不再能消失了。

每片叶上许多病斑的出现、发展和消失的过程也不一致，似乎各个病斑有一定程度的独立性；甚至有时环斑之间靠得很近，似乎愈合时也并不交叉和重迭，再能分开而消失。各病斑的出现到消失的时间也不一样，最短的在出现 1 天后即消失，最长的在出现后第 21 天才消失。萝卜 14 号消失最多是在第 6—9 天，龙葵 2 号较多在 3—12 天消失。

病斑消失是叶片复原的基础,叶片复原不是所有叶片同时复原的。冬季心叶烟在花序的小叶上有时还可見环斑病状;夏季心叶烟病状較不明显。

(三) 病斑陸續出現,陸續消失和叶面积扩展的关系

病斑大小的幅度很广,萝卜 14 号环斑的直径是 1—20 毫米,龙葵 2 号是 1—30 毫米。陸續出現的新病斑往往比老病斑小,例如萝卜 14 号 10 个老病斑与 10 个新病斑的平均直径各为 4.9 和 2.5 毫米,龙葵 2 号 37 个老病斑与 37 个新病斑的平均直径各为 8.0 和 3.5 毫米。在病斑扩展时,24 小时內的直径可增加 1—5 毫米,个别病斑可增 7—8 毫米。

病斑消失时大小的幅度也相当广。两个分离物的病斑多数在 1—5 毫米直径时消失。

观察的叶片以幼叶居多。24 小时內叶的长度的扩展平均为 0.1—0.6 厘米,宽度的扩展平均为 0.1—0.5 厘米。观察終了时的叶的大小多数在 3.4×2.4 — 5.6×4.4 厘米之間。萝卜 14 号在 2.0×1.4 — 3.8×2.9 厘米时病斑出現較多,在 5.3×4.0 — 6.1×5.4 厘米时病斑消失較多。龙葵 2 号在 1.6×0.9 — 2.4×1.4 厘米时病斑出現較多,在 3.0×1.9 — 5.5×4.5 厘米时病斑消失比較集中。显然病斑消失时,叶仍在繼續扩展之中,甚至整个叶上病斑完全消失近于复原时的叶片还在扩展之中。

以上数字說明,幼叶上病斑出現較多,但病斑的出現与消失是交叉发生的,时常看到在同一片叶上有新病斑出現,也有老病斑消失,这现象一方面固然說明病斑的出現与消失似有一定程度的独立性,同时也反映了叶复原过程的复杂性。

(四) 在局部病斑寄主菜豆 (Pinto) 的第一对真叶上用对叶法(不完全拉丁方排列)比較测定了心叶烟的 1 片叶上的病斑和无病斑組織,或一株上的病叶和复原叶,以及病株和复原株上不同层次的叶內的病毒浓度

感染萝卜 14 号的心叶烟叶的 19 个病斑內(选病斑較少的叶,分別剪下)和同一片叶上的无病斑的組織內的病毒浓度的比較: 16/19 个病斑內病毒浓度高于无病組織, 2/19 个病斑內与无病斑組織內相近, 1/19 个病斑內低于无病組織。

感染龙葵 2 号的心叶烟叶上 29 个病斑內和同一片叶的无病斑的組織內病毒浓度的比較: 20/29 个病斑內病毒浓度高于无病斑組織, 7/29 个病斑內与无病斑組織內相近, 2/29 个病斑內低于无病斑組織。病斑內的病毒浓度基本上高于无病斑組織。

先后四次比較了感染龙葵 2 号的病叶和复原叶中的病毒浓度: 从病叶叶汁产生的平均病斑数是 187.0, 10.3, 15.6, 和 5.7, 相应的从复原叶片叶汁产生的平均病斑数是 65.0,

表 1 感染龙葵 2 号分离物的心叶烟病株和复原株上不同层次叶內病毒浓度比較

心叶烟上接种日期——测定 的日期——测定时感病的天数	菜豆叶上平均病斑数							
	1 ¹⁾	2	3	4	5	6	7	8
20/II—7/IV——47天(有病状) ²⁾	0	1	0.3	7.3	4.6	10.3	16.5	10.0
9/IV—14/V——35天(有病状) ³⁾	0	0.25	1	0.25	0.75	0.25	5.75	0.5
9/IV—8/VI——60天(复原株) ⁴⁾	0.5	0.25	1	2	0.5	0	21.5	1

注: 1) 心叶烟由下而上的叶片顺序,第 1 叶即最下层叶。

2) 病株各叶的主要病状: 1——无病状, 2——退綠黃斑, 3——近于复原, 4——环斑, 5——退綠斑, 6——环斑, 7——环斑, 8——退綠黃斑。

3) 病株各叶的主要病状: 1——黃斑(接种叶), 2——黃斑(接种叶), 3——无病状, 4——坏死环斑, 5——坏死环斑, 6——无病状, 7——环斑, 8——环斑。

4) 复原株上 1—8 叶都无病状。

0, 0.3 和 0.25。一次测感染萝卜 14 号的病叶叶汁产生的平均病斑数是 4, 复原叶为 0.75。病叶中的病毒浓度基本上也高于复原叶。

感染这两个分离物的心叶烟一般都是植株靠近顶端的较幼叶上的病斑比较明显, 为此比较了感染龙葵 2 号的心叶烟病株和复原株不同层次叶内的病毒浓度, 三次测定的结果(表 1)说明上层叶内的病毒浓度趋于比下层叶内高, 以第七片叶为最高。

(五) 较老的心叶烟植株上接种往往不能出现系统病状 4—6 月中, 四次在已有花序的健康植株的 4 片下层叶以及有 4—6 叶的幼株的 4 片下层叶上接种龙葵 2 号病毒。老株仅接种叶有退绿黄斑而无系统病状, 幼株都有系统病状。把老株和幼株的接种叶接种 3 天后, 黄昏时摘下, 用热酒精脱去绿色素, 再用碘液染色^[10], 幼株的接种叶内淀粉斑比老株接种叶多; 接种后半月, 再测老株上层无病状叶未发现淀粉斑; 在菜豆上测老株接种叶病毒浓度很低, 上层叶仅偶尔能测出病毒。

讨 论

萝卜 14 号分离物来自萝卜花叶复合病, 龙葵 2 号分离物来自龙葵矮生厚叶。这两个分离物仅仅在心叶烟上产生典型的轮纹环斑。这情况和烟环斑病毒在很多寄主上都产生环斑病状不同。

以病斑为单位的观察中, 感染这两个分离物的心叶烟的 1 片叶上各个病斑的出现、发展和消失有一定程度的独立性, 终于病斑都消失而复原的现象则是烟环斑病毒的报导中似未有过的情况。可能烟环斑病毒引起的环斑主要是坏死型, 仅新生叶逐渐无病状而复原。Benda 和 Noylor^[5] 把感染烟环斑病的复原植株, 经高温处理后, 移回普通温室中, 可再现环斑, 但也是之后的新生叶逐渐无病状而趋于复原的。

Helms^[8] 报导 TMV 在 pinto 菜豆叶上的坏死病斑因叶扩展而“隐蔽”。Bennett^[7] 报导在感染兔丝子潜伏花叶病毒的番茄复原植株上再接种第二种病毒——烟刻纹病毒或 TMV——一时, 兔丝子潜伏花叶病毒的浓度能上升, 而且病状更严重。这两个事例与本文的情况也是无从比较的。

Bawden^[3] 怀疑感染甜菜缩顶病的烟或番茄的复原现象是由于毒株之间的干扰作用; 但他对烟环斑病并未认为是毒株之间的干扰作用。那么, 复原现象似乎至少有两种可能性: 其一, 毒株之间的干扰可以引致复原; 其二是并非毒株间的干扰引致的复原。正是后面这种复原仍然是无所进展的老问题。

如果说复原是指“没有一整套原来的病状”^[13], 这是复原的程度问题, 不是有无复原的问题。环境影响或病毒行动只能是有助于了解复原问题的途径或步骤之一, 不能阐明复原问题的内在联系。

复原问题牵涉到对植物有无免疫的看法。Price^[14] 的综述中的一些较重大的论点并未过时, 尤其其他提到植物免疫可能是细胞免疫这个论点, 即使在动物免疫问题中至今还存在体液免疫和细胞免疫问题; 而况植物病毒病害中已经发现有不带病毒的获得免疫(Ross, 1961a, b)^[16, 17], 不能不再度注意这个问题。

同是植物有免疫的观点的支持者, Price 和 Wallace 两位对感染甜菜缩顶病毒的烟复原的看法的分歧何在? Price^[15] 用 Wallace 的毒株重复了他的实验, 并未发现有毒株间

的干扰作用,与 Wallace 分歧之处主要是在未能重复出 Wallace 所报导的那样一致的结果,问题的实质已接触到 Wallace 大胆提出的“复原因素”——当时还难于捉摸是不足为奇的。现在,某些病毒在局部侵染的寄主中能产生系统的获得免疫,又一再被证明^[2,16,17],在某些系统感染的寄主中可能存在某种复原因素至少不再象以往一样难于被理解了。

Wallace^[20]除了提出“复原因素”的看法而外,他又比较了甜菜缩顶病和烟环斑病复原情况的主要不同之处:(1)烟环斑病的复原不能通过嫁接传递,而感染甜菜缩顶病毒的烟和番茄中的病毒和“复原因素”可以一起通过嫁接传递给健康的植株。(2)烟环斑病毒可以侵入薄膜细胞,而甜菜缩顶病毒主要被认为是被限制在韧皮部中。因此,他提出“感染甜菜缩顶病的烟和番茄的复原现象是不同于烟环斑病的另一类型”。复原现象是病毒和寄主之间相互动态关系的表现形式之一,在我们还不能掌握这种互相关系的普遍规律之前,在我们还不能恰当地作出概括之前,先明确一些对比是有帮助的。本文报导的初步观察似乎指出所用的两个分离物在心叶烟上的复原现象可能又是另一种复原的类型,其特点在于:(1)这两个分离物仅仅在心叶烟上产生环斑,同时有复原现象;(2)心叶烟的复原是以病斑的消失为先行的;(3)同一片叶上出现的新病斑比老病斑较小以及病斑内病毒的浓度基本上比同一片叶上无病斑组织内的病毒浓度为高。这些环斑病状动态的观察指出同一病毒在某些寄主中并没有或者不容易发现复原现象,而在某一种(这里是心叶烟)寄主中却有容易见到的复原现象;指出环斑病状,尤其那些没有坏死环的深浅绿相间的环斑,有利于追究系统性病害的复原过程,从而又指出了这种复原过程与局部侵染产生坏死病斑的病毒所引起的获得免疫可能有类似的问题,即,系统感染的植株中“是否有某种新产物或仅仅是某些已有物质被促进了”^[11]。进一步在这种观察的基础上设计实验可能有助于问题的阐明。

参 考 文 献

- [1] 李德葆、周家炽: 植物保护学报, **3**: 155—164, 1964.
- [2] 濮祖芹、周家炽: 微生物学报, **11**(2): 216—226, 1965.
- [3] Bawden, F. C.: *Plant Viruses and virus diseases*. 1950.
- [4] Benda, G. T. A. and A. W. Naylor: *Amer. Jour. Bot.*, **41**: 799—809, 1954.
- [5] ————: *Amer. Jour. Bot.*, **44**: 443—448, 1957.
- [6] ————: *Amer. Jour. Bot.*, **45**: 33—37, 1958.
- [7] Bennett, C. W.: *Phytopath.*, **39**: 637—646, 1949.
- [8] Helms, K.: *Virology*, **18**: 546—552, 1962.
- [9] Henderson, R. G.: *Phytopath.*, **28**: 548, 1934.
- [10] Holmes, F. O.: *Contrib. Boyce Thompson Institute*, **3**: 163—172, 1931.
- [11] Loebenstein, G. and A. F. Ross: *Virology*, **20**: 507—517, 1963.
- [12] Price, W. C.: *Contrib. Boyce Thompson Institute*, **4**: 359—403, 1932.
- [13] ————: *Phytopath.*, **26**: 503—529, 1936.
- [14] ————: *Quart. Rev. Biol.*, **15**: 338—361, 1940.
- [15] ————: *Phytopath.*, **33**: 586—601, 1943.
- [16] Ross, A. F.: *Virology*, **14**: 329—339, 1961.
- [17] ————: *Virology*, **14**: 340—358, 1961.
- [18] Valleau, W. D.: *Ky. Agr. Exp. Sta. Bull.*, **360**: 181—191, 1935.
- [19] ————: *Phytopath.*, **31**: 522—533, 1941.
- [20] Wallace, J. M.: *Jour. Agric. Res.*, **69**: 187—214, 1944.
- [21] Wingard, S. A.: *Jour. Agric. Res.*, **37**: 127—153, 1928.

ON THE DEVELOPMENT AND RECOVERY OF INDIVIDUAL RINGSPOTS OF TWO VIRAL ISOLATES ON *NICOTIANA GLUTINOSA*

PU THU-CHIN AND CHEO CHIA-CHIH

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

Two viral isolates, radish mosaic No. 14 and *Solanum nigrum* No. 2, produce systemic concentric ringspots on *Nicotiana glutinosa*, and the infected plants finally recover.

The appearance, development and disappearance of 215 ringspots on the younger leaves have been continuously observed.

Distinct ringspots occur only occasionally on the inoculated leaves and the older leaves.

On younger leaves, three types of spots were noted: chlorotic yellowish spots, light and dark green alternating concentric ringspots, and green and necrotic alternating concentric ringspots.

The development of these spots varies. Chlorotic yellowish spots may either persist until disappearance or develop into light and dark green ringspots or green and necrotic ringspots. The light and dark green ringspots may increase 1—3 rings in 24 hours and up to 4—8 rings just before disappearance; sometimes they may transform into chlorotic yellowish spots and finally disappear. The green and necrotic ringspots may increase in rings and diameter, but neither transform into the other two types nor disappear from the leaves.

The course of disappearance of these spots also varies. Obscurity may begin either in the center or along the external margin of the spots. Sometimes these spots may disappear and reappear in the original type and finally disappear; but once taking the form of green and necrotic ringspots, they never disappear.

These types of spots, on one leaf, appear, develop and disappear insynchronously. The minimum interval of time between appearance and disappearance is 1 day, the maximum observed is 21 days. The range of spot size, when they disappear, is rather wide. Most spots disappear when they are 1—5 mm in diameter. Spots coalesced during development may occasionally separate again and then disappear individually.

It might be also interesting to note that, on one and the same leaf, the new spots are usually smaller in diameter than the older spots.

It seems that the spots on the same leaf behave individually to a certain extent, and the disappearance of the spots is the basis of leaf recovery.

There seems no direct correlation between the leaf expansion and the course of spot formation and disappearance. Both the development and disappearance of the spots occur when the leaf is still expanding.

Virus concentration, assayed on Pinto bean, is lower in the non-symptomatic tissue, in recovered leaves, and in lower leaves on the recovered plant.

It is also noted that inoculations made on older plants do not easily result in systemic development of the disease in *N. glutinosa*.

It is suggested that the case herein reported is probably a different type of recovery from either the well known tobacco ringspot type or the curly top type.