

原生质体在植物病毒学中的应用及其展望

田 波 奚仲兴

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在病毒学的发展史上, 植物病毒的研究在许多方面曾起过领先的作用^[1]。但是, 当深入到病毒与寄主细胞相互关系的研究之后, 植物病毒方面的进展就远远落后于噬菌体和动物病毒。主要原因是植物病毒不像后者那样可用单细胞或单层组织培养进行同步感染; 而必须用多细胞的组织(一般是叶片)甚至植株来感染病毒。最初受感染的植物细胞仅占细胞总数的 1% 左右。这使对病毒初侵染的研究极为困难, 因为大量未受感染的细胞把一些早期病理变化冲淡了。病毒必须通过多次再感染才能到达其余细胞。在这一过程中大部分细胞实际上处在病毒感染不同阶段, 因而难以对感染过程进行可靠地测定。

为了获得高百分率的同步感染并避免细胞间的再感染, 曾试探过许多可能的途径。起初参考动物病毒的经验, 利用植物组织培养来研究病毒, 可惜在愈伤组织中病毒的累积量只有叶组织的 1/30, 虽然有人提出使愈伤组织分散成细胞团的方法提高了同步感染的程度^[2], 但仍不能避免细胞团内的再感染。人们只能局限在植株上, 设法增加同步感染性, 如早期的系统感染叶^[3]和用高浓度病毒两面感染的接种叶。最近提出了这样一种方法, 即将植株下部置于病毒增殖的适温中, 而上部保持低温, 使病毒遗传信息进入上部叶片时不进行复制, 一旦给予合适温度, 病毒立即迅速增殖^[4]。这些方法都有明显的缺点。后来人们求助于单细胞体系。实验证明, 用果胶酶分离的烟叶细胞能维持 TMV* 的增殖, 但其感染率极低^[5]。由于植物病毒无主动感染细胞的能力, 只能通过轻微的伤口进入细胞。因此推测, 除去细胞壁的原生质体可能有利于病毒的感染。1966 年英国的考金 (Cocking, E. C.) 首先证明 TMV 能够侵染番茄果实的原生质体^[6], 但三年之后他们才发表了病毒在原生质体中复制的有力证据^[7]。1968 年日本的建部等人系统地解决了高活性原生质体

的分离和高感染率的病毒接种技术, 并获得了病毒在原生质体中复制的多方面证据^[8-9], 才使原生质体成为研究植物病毒的优越体系。除同步感染外, 利用原生质体还具有许多其他优点: 它便于物质的引入和排除, 可进行脉冲追踪等实验; 去壁的原生质体有利于核酸、蛋白质和代谢产物的分离提取; 已知浓度的悬浮液提供了可定量吸取原生质体的均一实验材料。上述发现立即受到广泛地重视, 各主要植物病毒研究中心都相继建立了这一技术, 这方面的研究报告与日俱增, 看来不久将会对有关植物病毒与寄主细胞相互关系的基本理论研究做出贡献, 并有可能提出防治病毒病的新途径。为了更好地开展工作, 并引起病毒工作者的重视, 总结一下现有资料是很必要的。

首先, 应当用一分为二的观点来考察原生质体在植物病毒研究中的地位, 它确实是从细胞和亚细胞水平上研究病毒的好材料; 但是, 植物病毒学的最终任务是解决病毒在多细胞体系内的发展规律, 并制定控制病毒病的有效途径。必须把分子水平、细胞水平和整体水平的工作结合起来, 才能正确反映病毒在自然界中活动的客观规律。

其次, 在高渗溶液中分离的原生质体是否还维持着体内细胞的本来特性呢? 已有资料证明原生质体的超微结构是正常的^[10], 且保持着细胞核糖体 RNA 和蛋白质的合成能力^[11]和转换速率^[12]。从原生质体能维持病毒的正常增殖也说明

* 缩写名称

AMV——苜蓿花叶病毒; BMV——雀麦草花叶病毒; CCMV——豌豆褪绿斑驳病毒; CFMV——花椰菜花叶病毒; CGMMV——黄瓜绿斑驳花叶病毒; CMV——黄瓜花叶病毒; CPMV——豇豆花叶病毒; PEMV——豌豆耳突花叶病毒; PVX——马铃薯 X 病毒; PVY——马铃薯 Y 病毒; RRSV——悬钩子环斑病毒; TMV——烟草花叶病毒; TRV——烟草脆裂病毒。

明了这一点。但是也有实验证明离体的原生质体在合成和分解过程的某些方面与体内细胞有差异,如核糖核酸酶活性^[13]和细胞壁合成能力显著增强;当系统感染了 TMV 的烟叶细胞中病毒 RNA 合成降低或停止时,从这种叶片分离的原生质体内,病毒 RNA 的合成又恢复到很高的水平^[14]。此外, TMV 在带有 N 基因(坏死基因)的烟叶原生质体中能正常增殖,并不引起坏死反应^[15],说明它对病毒的反应在某些情况下也有不同。因此用原生质体得到的资料须与体内细胞的反应进行比较。

下面,从几方面来叙述原生质体在植物病毒学中的应用。

一、原生质体的分离、培养和发育

1. 原生质体的分离

由于植物原生质体酶法分离技术的发展,现在已经能由各种植物的各种器官或组织分离原生质体^[16]。但至今用于植物病毒研究的原生质体大部分还是由烟叶肉细胞制备的。这与烟叶组织含有大量的薄壁细胞、下表皮易撕去以及对多种病毒敏感有关。

目前所采用的分离原生质体的酶法,大致分为二种。即两步法^[8,17]和一步法^[18-19](也称混合酶法),以前者用得较普遍。所谓两步法就是在高渗透压条件下产生质壁分离,先用 0.5% 果胶酶消化裸露的叶肉组织单离出细胞,再用 2% 纤维素酶消化细胞壁。果胶酶消化所获得的细胞主要是栅栏细胞,在 2 小时内可从 1 克鲜重的成熟烟叶分离到 10^7 个栅栏细胞^[17]。此外,也有人先用果胶酶短时间处理裸露的叶肉,使组织软化而不使细胞分开,之后再用水解纤维素酶消化^[20],此法适于分离番茄的叶肉原生质体^[21]。

一步法是用果胶酶和纤维素酶的混合液处理裸露的叶肉组织,使它直接释放出原生质体。有的是用 0.4% 果胶酶和 4% 纤维素酶的混合液与去掉下表皮的烟叶保温 4 小时制备出大量的原生质体^[22]。有的则用 0.3—0.4% 果胶酶和 0.6—1.2% 纤维素酶的混合液保温 17 小时,此时几乎游离出全部原生质体^[19]。从 1 张充分展开的烟叶约能获得 10^6 原生质体。我们单用 1.2% 的纤维素酶处理 15 小时左右也达到了同样的分离

效果。

一步法较两步法简便,完整的原生质体的产率也较稳定。但由于不能使海绵细胞和栅栏细胞分开,所以制备的原生质体往往不太均一,经常带有一定数量的小原生质体。这些小原生质体仅含一部分细胞内含物,活力较低,对病毒的敏感性和维持增殖的能力都较差,在洗涤原生质体时应当除去。

为加速酶的消化作用,通常需要撕掉下表皮。一般都是待叶片萎蔫后用镊子沿着叶脉小心地将它撕去。近来,有人以果胶糖甙酶^[23-25](Pectin glycosidase)处理烟草和马铃薯的叶组织;或在叶片下表面喷金刚砂,然后用画笔刷剥^[24];或用尼龙小刷直接刷叶的下表面^[25]来代替撕表皮的步骤,都有类似的效果。另外,把未去皮的烟叶切成细条也能单离出一定量的细胞^[26]。

关于原生质体的纯化,一般都用低速离心或悬浮在高浓度蔗糖溶液中沉降的方法,使完整的原生质体与碎片分开。这些方法仅能起部分纯化作用。近来报道^[27]用相分离的方法能从界面收集到纯化的完整原生质体。此法不仅能使完整的原生质体与碎片分开,且能制备不同类型的细胞。

活性原生质体的产量受植物品种、苗龄、叶龄和叶片位置以及生长条件的影响。就烟品种而言,以心西(Xanthi)、心西-枯斑(Xanthi-NC)、三生(Sumsan)和白柏莱(White Burley)用得较普遍。曾对不同烟品种作过比较,发现白柏莱品种在冬、夏季节都能获得产率稳定的原生质体^[28]。在我们的实验中,三生较黄苗榆品种易于获得完整的原生质体。用于原生质体分离的烟叶,一般都是苗龄为 60—80 天的顶叶以下第 4—6 片充分展开的叶片(叶龄为 20 天左右)。原生质体的产量往往受季节的影响。在冬季,叶片生长脆弱,原生质体容易破碎,产量就减低。根据季节变化,提供植株生长的适宜条件似乎是分离原生质体成功的关键。但因原生质体分离方法不同^[29],用于分离的植株生长所需的最适条件也有所不同。

用于分离细胞和原生质体的果胶酶和纤维素酶的来源对原生质体的产量也有明显地影响。现在国际上多数采用日本产的纤维素酶(商品名 Anozuka P-1500)。我们所用的上海东风试剂厂生产的纤维素酶,其活性(15000 单位)超过日本产的纤维素酶(商品名为 Anozuka R-10)。用西德 Cart Roth 厂从黑曲霉提取的纤维素

酶,原生质体的破损率较高。用一步法分离时加入英国 Light 厂产的果胶酶几乎得不到活性原生质体。最近,人们用纤维素酶“Driselase”处理细胞培养物和薄壁细胞 1—2 小时,可高效率地单离原生质体。但细胞和原生质体破损率较高,可能是因为酶中含有蛋白酶、脂肪酶或某些有毒物质的缘故。如将酶液用活性炭处理可以降低原生质体的破损,且能维持较长的存活时间^[11]。

许多研究者在用酶法分离原生质体时都要加入硫酸葡聚糖钾(分子量 13000),认为它具有保护原生质体免受混杂在果胶酶中的某种碱性蛋白酶破坏的作用^[1]。我们与一些研究者^[19]同样感到:用混合酶法时不一定必需硫酸葡聚糖钾。此法可能比较温和,因而不必用它保护。

分离液的渗透压和 pH 会明显影响完整原生质体的产率。原生质体必须维持在高渗液中,溶液中通常加入甘露醇,最初使用的为 0.8 克分子浓度,后来一般使用 0.7 克分子浓度。也有的加入蔗糖或盐类(2.5% 氯化钾和 1% 氯化镁)^[19-20]。所加化合物的种类和浓度的具体选择可因植物种类而异。分离液的 pH 一般以 5.6 为宜,低于 4.2 时,原生质体会严重破裂。

此外,保温过程中振荡速度(二步法)和温度对原生质体的产量也有一定影响。

2. 原生质体的培养

为了维持病毒的复制,一般把接种了病毒的原生质体培养在建部培养液中^[1]。其中除含有植物必需的几种无机盐外,还含有 6-苄氨基嘌呤,但不含可代谢的碳源^[1],对于加入这些成分的必要性未作过详细研究。植物生长素对病毒复制大概不是必需的,后来大多数人并不加入生长调节物质^[17,21]。在此培养液中,原生质体既不能再生细胞壁,又不发生细胞分裂,但病毒复制能维持数天。如果将原生质体培养在能维持细胞壁再生和细胞分裂的培养液中,病毒的产量反而降低^[11]。这与植物分生组织中病毒含量较低是一致的。有人认为在原生质体的培养过程中,酵母污染并不影响病毒产量^[19],但是,如何防止微生物污染还是人们十分关注的问题。在建部培养液中,加有头孢霉素和龟裂杀菌素,以防止细菌和真菌生长。曾有人系统地研究了各种抗菌素的抑菌效果以及对原生质体代谢的影响,提出了制霉菌素或两性霉素 B 和羧苄基青霉素组合应用的方法^[22]。后来又研究了各种抗菌素对原生质体

中病毒增殖的影响,证明两性霉素、羧苄基青霉素和制霉菌素组合不影响病毒增殖^[21]。但卡萨尼斯(Kassanis, B.)^[23](1975)指出:在抑菌浓度范围内,某些抗菌素,包括两性霉素就有全部或部分抑制原生质体中病毒增殖的作用。其抑制机理可能是抗菌素通过螯合原生质体膜上的金属离子,破坏了金属离子的功能而影响了病毒复制。因为一旦培养液中加入某种二价金属离子(以氯化锰最好)就能有效地防止抗菌素的这种抑制作用。

原生质体要培养在适于病毒增殖的温度中并要求一定的光照条件。如果在暗处培养,病毒产量就降低^[19],加入蔗糖后可提高病毒产量^[11]。不过,在光照条件下加入蔗糖和生长素并不提高病毒产量^[31]。长时间的强烈光照会使原生质体破裂,光照以 3000 勒克司以下为宜。原生质体的培养多采用静止培养,也有以低速振荡培养的。

3. 原生质体的发育

分离的植物原生质体在适宜的培养基中,就会再生细胞壁、进行细胞分裂、形成细胞群落,然后长成新的植株。这是植物细胞全能性的表现。

原生质体的发育是植物体细胞杂交工作中必须解决的技术问题。植物病毒学研究中一般并不须使感染病毒的原生质体发育成植株。但为了获得抗病或无病毒植株等目的,仍有必要掌握这一技术。1967 年考金等^[24]用光学显微镜和电子显微镜证实了番茄果实原生质体细胞壁的再生能力。1970 年他们又报道了烟叶原生质体再生细胞壁的研究^[14]。同年,建部等^[25]对烟叶原生质体细胞壁的再生和细胞分裂作了系统的观察,发现原生质体培养第三天出现细胞壁的再生,并发现再生细胞壁的原生质体一般都能进行细胞分裂,而且在两周内能重复分裂 2—3 次,第三次分裂后,在显微镜下能见到 6—8 个细胞的细胞群。接着他们又进行了烟叶原生质体再生成完整植株的研究^[24-27]。在改良的 MS^[28]培养基上培养的原生质体,两周之后就形成了愈伤组织,第六周移至 Sacristan B₃^[29]培养基上培养,群落生长旺盛并分化出幼芽,至第九周移至怀特(White)^[40]培养基上便分化出根,最后移至花盆的土壤中就培育成新的植株。除烟草外,还对马铃薯^[23]、天门冬^[41]、矮牵牛^[42]、油菜^[43]和豆类^[44]等植物的原生质体分化和发育作了研究。

二、原生质体的接种

自从建部以 TMV^[9] 和 TMV-RNA^[49] 接种烟叶原生质体取得成功以来,大大推动了这方面的研究。至 1975 年底,已成功地使 12 种病毒接种于几种植物原生质体(表 1)。其中包括 DNA 植

物病毒 CFMV^[46] 和几种多基因组病毒^[47-48]。很有意义的是有些病毒可感染原来不能感染的植物的原生质体。CFMV^[46] 和 RRSV^[49] 不能侵染烟草,但可在烟草原生质体内复制。离体的原生质体可能消除了某种阻碍病毒侵染的因素。

1. 用病毒颗粒接种

表 1 已成功接种于一些原生质体上的植物病毒

接种物类型	病毒种类	植物组织	原生质体感病率 (%)	病毒产量 (粒子/细胞×10 ⁶)
病毒颗粒	TMV	烟叶肉 ^[9]	30—90	1.1—9.3
		番茄叶肉 ^[21]	50	
		番茄果肉 ^[7]	40	0.26
		矮牵牛叶肉 ^[50]	47	
		豇豆叶肉 ^[21]	57	
		Vinca 悬浮培养 ^[21]		
	CMV	烟叶肉 ^[51]	90	
		豇豆叶肉 ^[21]	95	
		Vinca 悬浮培养 ^[21]	48	
	PVX	烟叶肉 ^[52,53]	16—70	
	CCMV	烟叶肉 ^[17]	65	10
	PEMV	烟叶肉 ^[54]	90	0.05
	BMV _(V₅)	烟叶肉 ^[55]	77	8
	AMV	烟叶肉 ^[47]	35	18
		豇豆叶肉 ^[21]	6	
	TRV	烟叶肉 ^[48]	98	
	RRSV	烟叶肉 ^[49]		
	CPMV	烟叶肉 ^[21]	80	4
		豇豆叶肉 ^[21]	96	1;0.5
	CGMMV	烟叶肉 ^[21]	70	
病毒核酸	CFMV	烟叶肉 ^[46]		
	TMV-RNA	烟叶肉 ^[50,45]	7—90	0.55—2.3
	CCMV-RNA	烟叶肉 ^[17]	31	15
	PEMV-RNA	烟叶肉 ^[54]	3	
	BMV _(V₅) -RNA	烟叶肉 ^[55]		

目前用病毒颗粒接种原生质体的方法有两种。一是利用多聚鸟氨酸的方法。就是把纯化的 TMV (2 微克/毫升) 悬浮在 pH 5.0 的 0.02 克分子浓度的柠檬酸缓冲液中,加入多聚鸟氨酸 (2 微克/毫升) 于 25℃ 预保温 10 分钟,然后与等体积的浓度为每毫升 1—4×10⁶ 的原生质体悬液混合,再保温 10 分钟。随后用 0.7 克分子浓度甘露醇溶液 (含有 0.1 毫克分子浓度的氯化钙) 洗涤 3 次,除去尚未吸附的病毒颗粒。最后将原生质体悬浮在保温培养液中培养^[9]。像 TMV^[9]、CMV^[51]、PVX^[52-53]、CCMV^[17]、AMV^[47]、TRV^[48]

等病毒唯有存在多聚鸟氨酸时,才能侵染原生质体。

另一些病毒,如 PEMV^[54]、BMV_(V₅)^[55],在侵染烟叶原生质体时不一定需要有多聚鸟氨酸。这些病毒的等电点都在 pH 5 以上,在接种液中都带有正电荷,因而可能直接吸附在原生质体表面。接种时,除接种液中不加多聚鸟氨酸,须将 pH 调至病毒的等电点以下,并减去预保温的步骤之外,其余均同上述方法。不过,当接种液中加入多聚鸟氨酸时,会明显地刺激病毒感染原生质体。

最近提出的所谓“直接接种法”,提高了 CCMV 接种烟叶原生质体的效率。这种方法是把沉降的原生质体直接悬浮在接种液中以代替先用甘露醇液悬浮,再与接种液混合。直接法只是接种经过贮藏或培养了一定时间的原生质体时效果比间接接种法高^[11]。但此法不是对所有病毒都有效,如 TRV 接种烟叶原生质体的实验^[12]表明:采用直接法或间接法,无论是对新鲜制备的还是贮藏过的原生质体,感病率都没有明显差异。

原生质体的感病率受接种物浓度影响^[9,11]。例如:用不同浓度的 PVX 接种烟叶原生质体,在一定范围内,原生质体的感病率与病毒的浓度成比例,但是病毒浓度超过一定量时,感病率不但没有相应的增加,反而有些减低。同样,用 PEMV 接种时亦出现类似的趋势^[11]。其原因尚不清楚。据建部^[11]的说法可能是由于过高的病毒浓度减少了与多聚鸟氨酸完全结合的病毒粒子数量。

接种液的 pH 和缓冲液种类明显地影响原生质体的感病率。但不同的接种方法或病毒可选择不同的 pH。就接种时需要多聚鸟氨酸的一些病毒而言,除 PVX^[11]和 TRV^[12]外,最适宜的 pH 为 5.2。对多聚鸟氨酸没有依赖性的一些病毒,接种液的最适 pH,一般都偏低,为 4.7。低于或高于此值往往会减低原生质体的感病率。PVX 和 TRV 对接种液 pH 的反应不太敏感,两者都要求较高的 pH,至少在 pH 6.0 时才能获得与其它病毒在 pH 5.2 时相近的侵染率。而且 PVX 还出现较宽的最适 pH 范围,对这种特殊情况的原因目前尚不清楚。通常用柠檬酸缓冲液来配制接种液。但有人曾研究了不同缓冲液对 TRV 接种原生质体的影响,发现磷酸缓冲液会明显地提高 TRV 感染原生质体的效果^[13]。用 TMV 接种烟草原生质体时,磷酸缓冲液亦有类似的影响^[11]。

2. 用病毒 RNA 接种

目前,已经成功地用病毒 RNA 接种原生质体的病毒有 TMV^[10,11]、BMV_(V₃)^[11]、PEMV^[11]和 CCMV^[11]。病毒 RNA 接种的方法也有两种。一是多聚鸟氨酸法^[11]。即将 1 体积的 TMV-RNA 水溶液(2—6 毫克/毫升)和 3 体积原生质体悬液(其中除原生质体外,含有 0.9 克分子浓度的甘露醇、13.3 毫克分子浓度氯化钙、6.6 毫克分子浓度的硫酸锌、1.3 毫克分子浓度硫酸镁和每毫升 6.6 微克多聚鸟氨酸)混合,于 0℃ 放置 20 分钟。然后按接种完整病毒粒子的方法进行洗涤和培

养。用此法接种的感染率较低,只有 3—7%,而且要求比较高的病毒 RNA 浓度,浓度为 1 毫克/毫升的 TMV-RNA 感病率尚低于 10%。据推测,感染率低的原因是由于核糖核酸酶降解了 RNA 接种物的缘故。但不同病毒的 RNA 感染效率有明显差异。PEMV-RNA 感染率较低(约 3%)^[11]。而 CCMV-RNA^[11]和 BMV_(V₃)-RNA^[11]只要很低的浓度(1.2 微克/毫升)就能达到感染原生质体。

另一种是萨卡尔(Sarkar, S.)等的方法^[10]。他们采用 pH 9.0 的接种液进行接种,明显地提高了 TMV-RNA 对原生质体的感染率。每毫升 0.4 微克的 TMV-RNA 就可使 70% 原生质体受感染,而 pH 5.7 时每毫升 1 毫克的 TMV-RNA 才使 10% 原生质体受感染。这种接种液的成分是:蔗糖 0.8 克分子浓度、甘氨酸 0.1 克分子浓度和氯化钠 0.1 克分子浓度。他们认为高 pH 接种液增进原生质体的胞饮现象有效地抑制 RNA 降解酶的活性,从而有利于病毒 RNA 的侵染。该法的最大优点是感染率高而且不需要多聚鸟氨酸的协助。当然,加入多聚鸟氨酸也会提高原生质体的感病率。此法今后可能会广泛应用。

3. 原生质体感病率的检查

一个病毒侵染原生质体的效率是根据接种液中的病毒粒子数与感病的原生质体数的比例来确定的。因此要了解病毒的侵染效率,除了推算出病毒粒子数之外,还必须测定原生质体的感病率。通常用萤光抗体染色法^[14]检查感病率。所用的标记染料多数为异硫氰酸酞萤光素(FITC),其萤光为蓝色。也有用罗德明 B 萤光素(RB200)^[11]的,其萤光为红色。如果同时使用 FITC 和罗德明 B 标记的抗体,可以分别染色同一原生质体中两个不同的病毒。萤光抗体染色法快速简便,但灵敏度较低。另一方法是制备原生质体的超薄切片直接在电镜下观察病毒颗粒的存在。其灵敏度较高。例如:以萤光抗体染色测定 PVX 接种的烟草原生质体只有 2% 的感染率,但在电镜下能见到病毒粒子的原生质体达 16%^[11,12]。

关于接种时原生质体吸附病毒粒子的数目,建部^[9]等根据侵染性测定结果估计接种之后每个原生质体大约结合 10^3 TMV 粒子。用 ^{14}C -标记病毒测定每个原生质体吸附的 CCMV 粒子数为 760,吸附的粒子数取决于所用的病毒浓度^[14]。每个豇豆原生质体约吸附 10^3 CPMV 粒子^[15]。

4. 关于多聚鸟氨酸的作用

鸟氨酸是一种碱性氨基酸, 它的直链聚合物为多价阳离子。多聚鸟氨酸促进感染的程度与其浓度有关。就 TMV^[1] 而言, 在浓度为每毫升 1 微克范围内, 烟草原生质体的感染率随多聚鸟氨酸量的增加而上升。但浓度过高会发生原生质体破损。有趣的是用 PVX 接种原生质体时, 却要高两倍的多聚鸟氨酸才能达到最高的感染率^[3]。

多聚鸟氨酸的作用与该聚合物分子大小有密切关系。常用制品的分子量为 1.3×10^5 , 具有高度的促进感染的作用, 分子量 0.9×10^5 的制品的作用减小, 分子量 1.6×10^4 的制品只有很小的促进作用^[1]。对其它碱性氨基酸的聚合物的研究^[1]证明: 多聚赖氨酸的作用与多聚鸟氨酸相近, 多聚精氨酸的作用较弱。促进动物细胞感染病毒的 DEAE-葡聚糖对植物原生质体有明显的毒害作用, 增进感染的作用极轻微。

关于多聚鸟氨酸促进感染的机理, 一般认为它可能与病毒结合改变病毒颗粒表面的电荷, 使之带正电, 以便与可能带负电的原生质体结合, 证据是它必须与病毒经过一定时间的预保温才能发挥促进感染的作用, 如不经预保温则原生质体很少感病。这说明多聚鸟氨酸可能先与病毒结合。另外, 在接种液的 pH 值下带负电荷的病毒的感染, 绝对必需多聚鸟氨酸, 而在接种液中带正电荷的高等电点的病毒可无需多聚鸟氨酸的协助。用标记病毒进行的研究^[3, 4]证明, 当多聚鸟氨酸存在时原生质体上确实可结合更多的病毒。此外多聚鸟氨酸还可能作用于原生质体, 增加其胞饮现象, 它甚至可轻微损伤原生质体从而有利于病毒进入原生质体。

三、原生质体中病毒的增殖

1. 植物病毒的一步生长曲线

在噬菌体工作中首先建立的一步生长曲线的测定是研究病毒增殖的基本技术。原生质体系统提供了测定植物病毒一步生长曲线的条件。根据病毒侵染性测定作出的 TMV 生长曲线如图 1 所示^[7]。零时的侵染性数值表示原生质体所吸附的病毒。其后侵染性下降, 可能是病毒脱去蛋白质外壳引起的。接种后 6 小时出现子代病毒。病毒的指数生长一直维持到接种后 12 小时。其后病毒复制速度减慢达到相对的平衡。从 TMV 增殖的潜伏期 (6 小时) 和指数生长期 (6 小时) 的长

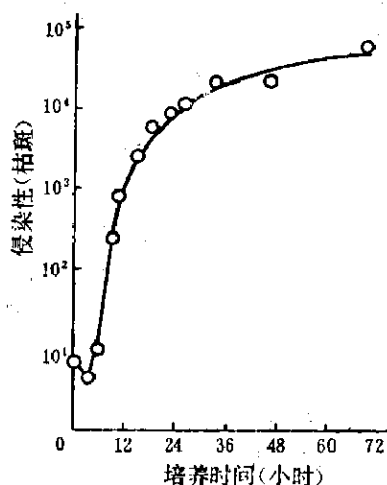


图 1 烟叶肉原生质体中 TMV 的生长曲线

短看, 其速度较噬菌体为慢 (后者是以分钟计算的), 而与动物病毒相近。但每个原生质体中病毒产量却远远超过噬菌体。TMV 在每个原生质体中颗粒数达到 $0.5-9.3 \times 10^4$, 与病叶中每个细胞的平均颗粒数 $0.5-2.5 \times 10^4$ 是相近的。其它植物病毒如 PVX^[13]、CMV^[13] 和 CPMV^[13] 的一步生长曲线与 TMV 相似, 只是在 PVX 和 CMV 的曲线中没有反映病毒脱壳阶段的侵染性下降, 这可能与测定病毒方法的灵敏度较低有关。

2. 病毒蛋白质的合成

在接种了病毒的叶片中可以测定外壳蛋白的合成过程, 但对是否合成非外壳蛋白的问题却有着完全矛盾的资料^[14-16]。植物病毒核酸的分子量都在 1×10^6 以上, 以 TMV 为例, 编码外壳蛋白信息量只占十分之一左右, 难道大部分的信息在寄主细胞内不被翻译吗? 还是因为在叶片中难于发现这些蛋白 (特别是早期蛋白) 的存在呢? 原生质体系统提供了解决这一疑问的良好条件。在原生质体中可通过紫外线或氯霉素处理等来抑制正常蛋白质的合成, 而使病毒诱导的蛋白合成易于被发现。应用脉冲双标记法在聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 除见到 TMV 外壳蛋白外, 在接种的原生质体中还发现有两种高分子量蛋白质, 一种分子量为 1.4×10^5 , 是未感染的烟草原生质体中没有的; 另一种分子量为 1.6×10^5 , 感病叶比未感病叶的合成量高。外壳蛋白合成量比其他两种蛋白质高得多。合成的时间也有明显的不同, 分子量 1.4×10^5 的蛋白质的合成先于外壳蛋白质, 而与病毒 RNA 的合成相平行。从这种高分子量

蛋白质合成的时间顺序和它在细胞 $20000 \times g$ 沉淀分部中存在的事实,都说明它可能就是曾在烟叶中发现的 TMV-RNA 复制酶。此蛋白质经 6M 胍处理证明并无亚基存在。如果这一高分子量蛋白质完全由 TMV-RNA 编码,则它占 TMV-RNA 信息量的 60%^[1]。最近还报道了感染 CCMV 的原生质体中蛋白质的合成,除外壳蛋白外,还发现一种分子量为 3.5×10^4 的早期蛋白质,可能是 CCMV-RNA 的复制酶^[2]。这两个例子说明,原生质体是研究病毒基因表现和病毒核酸复制酶的理想材料。

3. 病毒 RNA 的合成

原生质体系统很适于用来研究病毒核酸代谢。因为细胞无需机械破碎即可抽提出不混有多糖类的核酸样品。用自原生质体抽提的 P^{32} 标记 RNA,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了原生质体中 TMV-RNA 的合成^[3]。接种后 4 小时,在每个感病原生质体中就能检出 10^3 病毒 RNA 分子。此后直到接种后 8 小时病毒 RNA 合成速率迅速上升,接种后 10 小时速率减缓,然后保持相对平衡。在病毒 RNA 开始合成后 4 小时,才检出形成的病毒粒子。因此,在感病初期所累积的病毒 RNA 大部分以游离状态存在的。在中、后期阶段合成的病毒 RNA 才立即装配成病毒粒子。

在活跃地合成 TMV 的烟叶原生质体中已经检出曾在病烟叶组织中发现的几种病毒 RNA^[4,5]。即病毒的单链 RNA 和病毒 RNA 的双链复制型 (RF) 和复制中间型 (RI)。并发现感病原生质体中合成的 TMV-RNA 的双链复制体的数量比病叶组织中合成的量要多。然而,在感病原生质体中尚未检出在病叶中检出过的 TMV-RNA 低分子量组份。如果确实是这样,那末应重新考虑 TMV-RNA 低分子量组份活跃地参与 TMV 体内复制的假设。不过,在建部等的实验中还不能完全排除低分子量 RNA 迅速逆转和漏测的可能性。

四、展 望

目前,原生质体在植物病毒研究中的应用还处于初期阶段,可以预料这方面的研究将会蓬勃发展。根据国际上的进展趋势,结合我们的具体情况,我们特别要贯彻理论联系实际方针。现对今后研究工作提出一些不成熟的意见供参考。

1. 原生质体用于研究病毒侵染复制和寄主细胞变化

这是国际上注意的中心。目前尚在扩大病毒和原生质体种类,并已开始注意所谓多基因组的病毒,但只有 TMV 的工作较为系统。预计这方面的工作将会与日俱增。我们在进行这一工作时,除了首先建立研究技术外,可考虑立足于国内的材料,选取 1—2 种有代表性的、适于做基本理论研究的病毒,对其侵染、复制和寄主细胞变化进行系统的全面研究。以期绘制出植物病毒和寄主细胞相互关系的模型。

2. 原生质体用于研究病毒间相互关系

两种病毒在植物体内的相互关系可表现为拮抗(如交互保护或干扰)和协生(如加重病状或促进增殖)。由于在植株中难于了解两种病毒是在同一个细胞内发生作用呢?还是在不同细胞之间起作用呢?至今还不明了这些现象的机理。已有实验证明同一原生质体可被相关的或无关的两种病毒所感染^[1]。这说明细胞内病毒侵染位点是多个的;而不是像有人用叶片做材料所得到的每个细胞只有一个病毒侵染位点的结论。当 TMV 的普通株和番茄株同时接种烟叶原生质体时,相当数量的原生质体为两个株系所感染。接种物中一个株占优势或预先接种时可干扰另一株的增殖^[1]。对植物病毒干扰机理的深入了解,将为生产上应用干扰现象的设想提供启示。

两种病毒同时在一个原生质体中复制的事实提供了研究植物病毒遗传重组和表型混合的机会。实验证明两个 TMV 株系的外壳蛋白亚基可以装配到一个病毒颗粒中去^[1]。CCMV 的野生株和温度敏感株在原生质体中复制时也发生表型混合的现象^[1]。这方面的研究不仅对了解病毒的遗传变异规律是重要的,也是探索病毒病流行规律的一个新课题。

3. 原生质体应用于防治病毒病的一些可能途径

由于原生质体发育成植株技术的进展,为原生质体在实践中的应用展示了诱人的前景。这对植物病毒病的防治具有特殊的意义,因为我们对付病毒病的手段实在太少了。下边提出一些可能的途径,以便引起对这些问题的重视。

(1) 无病毒植株的获得:一些无性繁殖的植物(如马铃薯、甘薯等)优良品种一旦感染病毒后,即难以得到无病毒的健康植株。生长点培养法虽已在实践中应用,但有的病毒(如 PVX)仍难于排除,而且获得无病毒个体的数量也有限。无病毒

原生质体的培养可以克服上述困难。国际上尚未重视这方面的工作。至今只有一篇报告^[25]提到从感染 PVX 或 PVX、PVY 混合感染的烟叶获得大量无病毒植株。健康和感染 PVX 烟叶的原生质体发育成植株的植板效率(在琼脂平板上长成群落的原生质体的百分率)是相近的,均为 60—80%。在原来感染 PVX 的 4140 个新植株中,92.5% 仍然带有病毒,其余 7.5% 的植株经症状、寄主鉴别和血清测定,均未发现 PVX 的存在。可见在所谓系统感染的植株中并不是每一个细胞都有病毒存在的。由 PVX 和 PVY 混合感染的烟叶分离的原生质体发育成植株的植板效率仅为 4%,有意义的是所得 300 株中只有 1 株带有 PVX,5 株带有 PVY,没有一株是混合感染的,其余均不带病毒。这一工作为获得无毒植株开辟了新的途径。如能应用更灵敏的方法提前检验病毒的存在,将大大简化工作步骤。

(2) 抗病毒个体的选择:由系统感病植物的原生质体得到的无病毒植株中,少数对病毒具有高度的抗病性。上述由感染 PVX 的烟叶获得的 312 株无病毒植株,当用高浓度的提纯的 PVX (2 毫克/毫升)接种时,发现有 3 株仍不受感染;经 3 次接种才发病,原生质体中抗病个体产生的机率比马铃薯有性繁殖的自发突变率 0.02—0.06% 高的多。在烟叶原生质体抗野火病细菌的研究中,已应用在培养中加入细菌毒素类似物亚胺基蛋氨酸砜(methionine sulfoximine)的方法来选择抗病的烟突变体^[63]。在抗病毒研究中可考虑运用复合病毒感染的方法来选择抗性突变体。

(3) 原生质体融合在抗病毒育种中应用的前途:自从巴斯基发现动物细胞融合现象之后,植物体细胞融合也受到很大的重视。用完全分开的原生质体进行种间融合时虽需加以诱变,但并不需要灭活的仙台病毒颗粒(它广泛用于动物细胞融合)。这类复杂因子,它只需要补充亚硝酸钠等无机盐就足够了。原生质体融合是细胞间传递遗传信息的极可靠方法,目前国际上已获得不同种烟草的融合杂种植株。开展远缘的和种间的抗病病毒性状的融合转移,对解决在品种间无抗病性差异的病毒病害将是很有前途的。

(4) 外来 DNA 对原生质体的转化与抗病毒育种:多年来,以完整植株研究外来 DNA 对植物的转化作用未能获得十分可靠的资料。用原生质体来进行转化有突出的优点,它可以运用微生物

遗传学的方法,通过大量原生质体的平板涂布培养来检出转化体,然后由它再生出改变了基因型的完整植株。有目的地把抗病毒基因转移到经济性状优良的作物细胞中去,将为抗病育种开辟新的途径。这里还应提及,病毒核酸感染原生质体方法的研究,可能为外来 DNA 引入原生质体提供启示。在 pH 9.0 接种液中有利于病毒 RNA 侵染便是一个例证。

(5) 原生质体在病毒化学治疗剂研究中的应用:研究植物病毒化学治疗剂缺少有利的寄主模型,有些化学药物可能不易通过叶片的蜡质层进入细胞。利用原生质体可以克服这种困难。此外原生质体中易于分别测定寄主的和病毒的核酸和蛋白质合成,为筛选选择性的病毒化学治疗剂创造了条件。

近年来在植物病毒学领域中发展起来的原生质体技术,是研究病毒与寄主细胞相互关系的优越体系。不仅对解决病毒侵染、复制、遗传、免疫等理论问题具有很大潜力,而且也防治病毒病开创了有希望的前景。

参 考 资 料

- [1] 高尚荫:微生物学专题报告集,110—121,1964.
- [2] Murakishi, H. H. et al.: *Virology*, 41: 365—367, 1970.
- [3] Nilsson-Tillgren, T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 104: 124—141, 1969.
- [4] Dawson, W. et al.: *Virology*, 53: 476—478, 1973.
- [5] Zaitlin, M.: *Nature*, 184: 1002—1003, 1959.
- [6] Cocking, E. C.: *Planta*, 68: 206—214, 1966.
- [7] Cocking, E. C. et al.: *J. Gen. Virol.*, 4: 305—312, 1969.
- [8] Takebe, I. et al.: *Plant Cell Physiol.*, 9: 115—124, 1968.
- [9] Takebe, I. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 64: 843—848, 1969.
- [10] Takebe, I. et al.: *Planta*, 113(1): 21—27, 1973.
- [11] Sakai, F. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 224: 531—540, 1970.
- [12] Watts, J. W. et al.: *Colloques internationaux. C. N. R. S.*, 212: 119—123, 1973.
- [13] Lazar, G. et al.: *Plant Sci. Lett.*, 1: 53—57, 1973.
- [14] Foglein, F. J. et al.: *Virology*, 67:

- 74—79, 1975.
- [15] Otsuki, Y. et al.: *Virology*, 50: 45—50, 1972.
- [16] 上海植物生理研究所: 植物体细胞杂交参考资料, 第二集, 98—104, 1975。
- [17] Motoyoshi, F. et al.: *J. Gen. Virol.*, 20: 177—193, 1973.
- [18] Power, J. B. and Cocking, E. C.: *J. Exp. Bot.*, 21: 64—70, 1970.
- [19] Kassanis, B. et al.: *J. Gen. Virol.*, 24: 447—452, 1974.
- [20] Watts, J. B. et al.: *Ann. Bot.*, 38: 667—671, 1974.
- [21] Takebe, I.: *Ann. Rev. Phytopathol.*, 13: 105—125, 1975.
- [22] Schilde-Rentschler, L.: *Z. Naturforsch.*, 27b: 208—209, 1973.
- [23] Upadhy, M. D.: *Potato Res.*, 18(3): 428—445, 1975.
- [24] Beier, H. and Bruening, G.: *Virology*, 64: 272—276, 1975.
- [25] Shepard, J. F.: *Virology*, 66(1): 492—501, 1975.
- [26] Jensen, R. G. et al.: *Plant Physiol.*, 48: 9—13, 1971.
- [27] Kanai, R. et al.: *Plant Physiol.*, 52: 484—490, 1973.
- [28] Eriksson, T.: *Tissue Culture and Plant Science* p. 213—231, ed. by Street, H. E. and King, P. H., London and New York Academic Press, 1974.
- [29] Meyer, Y.: *Protoplasma*, 81: 363—372, 1974.
- [30] Sarkar, S., Upadhy, M. D.: *Mol. Gen. Genet.*, 135: 1—9, 1974.
- [31] Motoyoshi, F. et al.: *J. Gen. Virol.*, 25: 245—256, 1974.
- [32] Watts, J. W.: *Planta*, 113(3): 271—277, 1973.
- [33] Kassanis, B. et al.: *J. Gen. Virol.*, 28: 185—191, 1975.
- [34] Pojnar, E., Willison, J. H., Cocking, E. C.: *Protoplasma*, 64: 460—480, 1967.
- [35] Nagata, T. and Takebe, I.: *Planta*, 92: 301—308, 1970.
- [36] Takebe, I. et al.: *Naturwiss*, 58: 311—320, 1971.
- [37] Nagata, T., Takebe, I.: *Planta*, 99: 12—20, 1971.
- [38] Murashige, T., Skoog, F.: *Physiol Plant*, 15: 473—497, 1962.
- [39] Sacristan, M. D., Melchers, G.: *Mol. Gen. Genet.*, 105: 317—333, 1969.
- [40] White, P. R.: *The Cultivation of Animal and Plant Cells*, 2nd ed. Ronald Press, New York, 1963.
- [41] Bui-Dang-Ha, D., Mackenzie, I. A.: *Protoplasma*, 78(3): 215—221, 1973.
- [42] Durand, J. et al.: *Zeitschrift. Fur Pflaussenphysiologie*, 69(1): 26—34, 1973.
- [43] Kartha, K. K. et al.: *Plant Sci. Lett.*, 3(4): 265—271, 1974.
- [44] Pelcher, L. E., Gamborg, O. L., Kao, K. N.: *Plant Sci. Lett.*, 3: 107—111, 1974.
- [45] Aoki, S., Takebe, I.: *Virology*, 39: 439—448, 1969.
- [46] Takebe, I.: *Proc. 1st. Intersect. Conger. Int. Assoc. Microbiol. Soc.*, ed. by Hasagawa, T. 3: 55—64, Tokyo Jpn. Assoc. Microbiol., Vol. 5, p. 662, 1974.
- [47] Motoyoshi, F. et al.: *J. Gen. Virol.*, 27: 263—266, 1975.
- [48] Kubo, S. et al.: *J. Gen. Virol.*, 27: 293—304, 1975.
- [49] Kubo, S. et al.: *J. Gen. Virol.*, 28(2): 255—257, 1975.
- [50] Hibi, T. et al.: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 34: 375, 1968. (Abstr. in Jap.)
- [51] Otsuki, Y.: *Virology*, 52: 433—438, 1973.
- [52] Shalla, T. A., Petersen, L. J.: *Phytopathol.*, 63: 1125—1130, 1973.
- [53] Otsuki, Y.: *J. Gen. Virol.*, 22: 375—385, 1974.
- [54] Motoyoshi, F. et al.: *J. Gen. Virol.*, 24: 89—99, 1974.
- [55] Motoyoshi, F. et al.: *J. Gen. Virol.*, 25: 31—36, 1974.
- [56] Kubo, S. et al.: *Intervirology*, 3: 382—387, 1974.
- [57] Otsuki, Y. et al.: *Virology*, 38: 497—499, 1969.
- [58] Motoyoshi, F. et al.: *J. Gen. Virol.*, 21: 159—161, 1973.
- [59] Zhuravlor, Y. N. et al.: *Virology*, 64(1): 43—48, 1975.
- [60] Stephen, D. W., John, G. S.: *Virology*, 63(2): 459—465, 1975.
- [61] Zaitlin, M. et al.: *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, 39: 1031—1036, 1970.
- [62] Singer, B.: *Virology*, 46: 247—255, 1971.
- [63] Sakai, F. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 118: 93—96, 1972.
- [64] Aoki, S., Takebe, I.: *Virology*, 65(2): 343—354, 1975.
- [65] Jackson, A. O., Zaitlin, M. et al.: *Virology*, 48: 655—665, 1972.
- [66] Siegel, A. et al.: *Virology*, 53: 75—83, 1973.
- [67] Otsuki, Y.: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 39: 224, 1973 (Abstr. in Jap.)
- [68] Carlson, P. S.: *Science*, 180: 1366—1368, 1973.