

烟草花叶病毒及其核酸侵染烟草 愈伤组织悬浮细胞的研究

康良仪 田颖川

(中国科学院微生物研究所, 北京)

比较了烟草的茎和叶片来源的愈伤组织对 TMV 侵染和繁殖的影响, 发现 TMV 在单倍体植株茎的悬浮细胞中侵染和繁殖最好。TMV 在悬浮细胞中的繁殖曲线表明, 接种后 25°C 保温 6 小时病毒滴度下降, 24 小时后对数增加, 144—216 小时病毒滴度达最高峰, 其后病毒滴度下降。接种后经 10°C 低温预处理 10 小时、24 小时和 4 天再转到 25°C 继续保温的细胞中, 比接种后直接在 25°C 保温的大大增加了病毒复制的同步性, 以低温处理 10 小时和 24 小时最佳。烟草悬浮细胞也适用于 TMV-RNA 接种。

植物组织培养中病毒增殖浓度低, 同步复制也不理想。为克服这些缺点, Murakishi 等人^[1,2]用机械振荡法将 TMV 接种悬浮培养的烟草细胞, 大大改善了接种效果, 提高了病毒滴度。最近 White 等人^[3]又利用低温预处理接种有烟草花叶病毒 (TMV) 的烟草悬浮细胞和接种有大豆花叶病毒 (SBMV) 的大豆悬浮细胞, 然后转到 24°C 培养; 与接种后直接在 24°C 下培养的进行比较, 前两者均明显提高了细胞内的病毒滴度。TMV 在低温预处理的烟草悬浮细胞中的同步复制与在原生质体中^[4]的同步复制极为相似。植物愈伤组织为在可控制的条件下研究病毒侵染与复制^[2,5,6]、病毒与寄主细胞的相互关系方面提供了一个容易得到的、无菌的, 在代谢上活跃的细胞来源。

本文报道了 TMV 及其核酸 (TMV-RNA) 侵染烟草愈伤组织悬浮细胞, 并在接种后利用低温预处理的方法提高病毒的侵染率和同步复制。

材料和方法

(一) 材料

1. 革新 1 号烟草单倍体植株的茎和叶产生的愈伤组织。

2. 三生烟 (*N. tabacum* CV Samsun) 叶产生的愈伤组织, 均在改良的 H 培养基^[7]上继代培养。

3. 病毒和核酸

TMV (普通株) 是用硫酸铵沉淀和超离心法提取的。TMV-RNA 是用酚法提取的。

(二) 方法

1. 愈伤组织悬浮培养

悬浮培养是将约 2 克生长三周的愈伤组织转到装有 25 毫升液体培养基^[7]的 100 毫升三角瓶内, 在旋转摇床上 (130 转/分), 25°C, 培养 7—10 天, 此时成块的愈伤组织便分散成单个细胞或小的细胞团, 可直接用于接种病毒或吸取 2

本文于 1979 年 7 月 24 日收到。

新西兰 R. E. F. Matthews 教授提供三生烟和枯萎三生烟; 中国科学院植物研究所蔡起贵同志提供革新 1 号单倍体植株茎和叶来源的愈伤组织, 本研究室奚仲兴等同志提供三生烟叶来源的愈伤组织, 特此致谢。

毫升细胞悬液转到新鲜培养液,继续培养7—10天后,用于接种试验。

2. 接种和侵染性测定

将上述悬浮细胞通过衬有尼龙纱的布氏漏斗过滤,约取1克鲜细胞转入装有2毫升液体培养基的试管中,加入提纯的TMV,使最终浓度为100微克/毫升,或加入TMV-RNA至50微克/毫升。用聚四氟乙烯膜封住管口,在振荡器上800转/分钟振荡半分钟接种。室温放置10分钟后,在布氏漏斗中先用无菌水洗两次,再用悬浮培养液洗一次,然后将细胞转入加有3—5毫升悬浮培养液的管中,培养不同时间后取样,称鲜重,−10℃冰冻保存,待取样完毕后一同测定病毒量。

3. 病毒含量测定

将冰冻的样品在玻璃匀浆器中匀浆,加入1:10(W/V)量的0.067M pH7.0磷酸缓冲液,匀浆后再用同样缓冲液稀释50—100倍,在枯斑三生烟上用半叶法测定。对照半叶用0.5微克/毫升提纯的TMV接种,48—72小时后数枯斑数。结果以平均枯斑数/半叶乘以稀释倍数表示。实验中所有数据都采用Otsuki等人^[1]的公式作校正。

结 果

一、愈伤组织的悬浮培养

在预备实验中,我们比较了TMV侵染不同来源的愈伤组织的效果和接种前不同培养方式的影响。接种后在摇床上培养72小时后测病毒含量。上述不同来源的愈伤组织,接种后0小时和保温72小时的病斑数分别为20.9和1870(革新1号茎来源);85.8和550(革新1号叶来源),27.5和165(三生烟叶来源),可见病毒在茎愈伤组织中增长最好,在两种叶愈伤组织中较差。而接种前悬浮培养的茎愈伤组织细胞比琼脂固体培养的好,前者为20.9和1870,后者为44和748。

因此,选择革新1号烟草茎的愈伤组织为材料,在悬浮培养条件下测定其生长

曲线。培养不同时间后取样,过滤,称鲜重,置105℃烘箱烘干6小时称干重。以干重对时间作图,结果如图1。

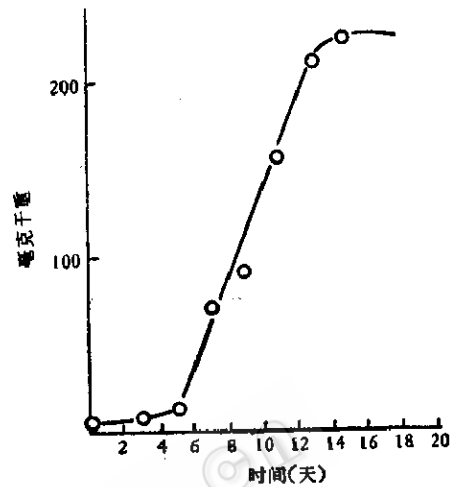


图1 茎愈伤组织在悬浮培养条件下的生长曲线

由图1可见,在悬浮培养条件下茎愈伤组织细胞在5天以前增长缓慢,从5天开始成对数急剧增加直到第13天,此后生长减缓。因此,采用7—10天悬浮培养细胞为材料。

二、TMV在悬浮培养细胞中的繁殖

接种后的悬浮细胞培养不同时间后取样测病毒量。以平均枯斑数/半叶×稀释倍数的对数对时间作图,结果见图2。在我们所选的时间内,接种后6小时,病毒滴度稍下降,随后开始上升。24至96小时对数增加,此后逐渐增加,在约144—216小时病毒滴度达到高峰,到240小时病毒滴度降低(图2)。在病毒滴度最高峰时(216小时),分别为0时和6小时的214倍和332倍。

在我们的实验中,TMV在烟草悬浮培养细胞中的繁殖曲线与Murakishi等人^[2]的实验结果相似,但他们得到病毒滴度在

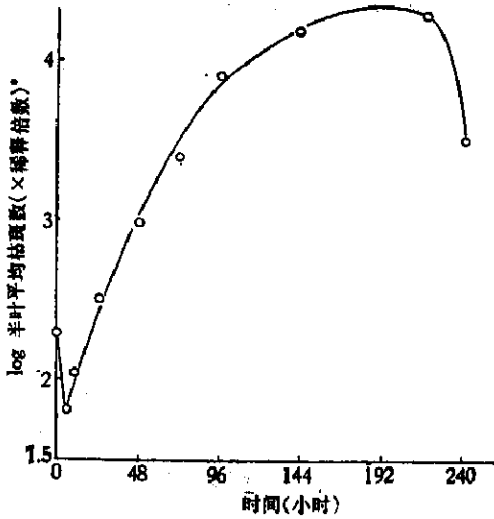


图2 TMV在烟草悬浮细胞中的繁殖曲线

* 四次重复实验, 15—20片半叶的平均枯斑数。

接种后10小时下降, 而我们得到病毒滴度在接种后6小时开始下降, 此后滴度上升。一般认为, 侵染过程中, 病毒滴度下降是由于病毒在体内脱壳游离出核酸, 因而使侵染性降低, 这个时期称为潜伏期。TMV在侵染烟草原生质体时, 病毒滴度下降发生在接种后6小时之前, 6小时后持续对数上升, 到24小时达最大值^[9]。我们的实验中, 病毒滴度在216小时才达最大, 说明病毒在烟草悬浮细胞中比在烟叶原生质体中起始复制较晚, 同步复制不如在原生质体中好。

三、低温预处理对 TMV 繁殖率的影响

接种后的烟草悬浮细胞分成五组进行不同时间的低温处理。各组都在转到25℃保温不同时间后取样, 测侵染性, 结果见图3。

图3结果表明, 接种后的烟草悬浮细胞经10℃低温预处理4天后(II), 病毒滴度在48小时即达到最大值, 保持到120小时。而接种后直接在25℃保温的(I), 直

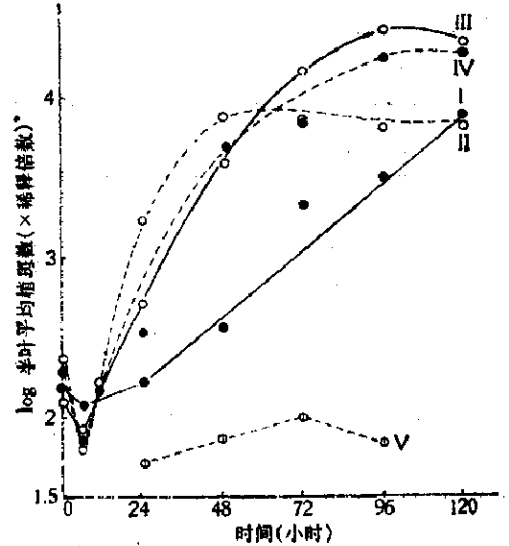


图3 低温预处理对 TMV 在烟草悬浮细胞中繁殖率的影响

I. 接种后在25℃保温; II. 接种后在10℃预处理4天; III. 接种后在10℃预处理24小时; IV. 接种后在10℃预处理10小时; V. 接种后一直在10℃处理4天。

* 四次重复实验, 15—20片半叶平均枯斑数。

到120小时才达最大值, 但在120小时二者的病毒滴度几乎相等。这结果与White等人^[3]的结果是一致的。在10℃预处理24小时(III)和10小时(IV)的, 病毒滴度在48小时也达很高的值, 但在96—120小时才达最大值, 两者的最大值都比曲线(I)和(II)要高。有趣的是两曲线(III, IV)的形状很相近, 这可能是由于二者在低温下处理的时间短, 低温处理对细胞的危害比前者(II)小, 既增加了病毒复制的同步性, 寄主细胞又能活跃地维持病毒在其中的复制。实验过程中我们也观察到, 低温下处理4天的细胞比只处理24小时和10小时的细胞生长的差。

四、病毒产量的测定

比较了接种后经低温预处理4天后再转到25℃保温的和直接在25℃保温的烟

表1 接种后经低温预处理和未经低温预处理的悬浮细胞中病毒产量

保温处理	25℃ 培养时间(天)	病毒产量 (微克/克鲜细胞)	平均枯斑数/半叶*	病毒粒子数/细胞
10℃预处理4天后 后转到25℃培养	3	335	2,610	2.7×10^6
	7	327	3,600	2.6×10^6
直接在25℃培养	3	150	1,240	1.2×10^6
	7	500	7,470	4.0×10^6

* 三次重复实验, 15—20片半叶平均枯斑数(\times 稀释倍数)。

草悬浮细胞中病毒的产量。两种不同处理的悬浮培养细胞都在25℃保温3天和7天后分别取样, 匀浆物经 $10,000 \times g$ 和 $105,000 \times g$ 高低速离心提取病毒, 最后溶在一定体积的0.067M、pH7.0磷酸缓冲液中, 在Hilger H700紫外分光光度计上, 260毫微米处测光密度, 按 $3.24 \text{ O.D.}_{260\text{nm}} = 1 \text{ 毫克 TMV/毫升}$ 计算每克细胞的病毒量。根据TMV的分子量为 40×10^6 , 每克愈伤组织有 1.9×10^6 个细胞^[2]计算出每个细胞中的病毒粒子数。另外取少量上述病毒悬液, 经适当稀释后在枯斑三生烟上, 用半叶法测侵染性, 结果列于表1。

由表1可见, 经低温处理的悬浮培养细胞转到25℃保温3天后病毒产量比未经低温处理的要高一倍多, 而保温7天后则后者比前者高得多。二者的侵染性测定结果有同样的趋势。这结果与本文前述结果(图3)是相吻合的。至于保温7天后未经低温处理的细胞中病毒产量比低温处理的要高, 这可能是经低温处理的细胞受到一定损害, 随着保温时间延长, 病毒在细胞中的繁殖不如在未经低温处理的细胞中好。也可能是经低温处理后细胞受损害, 影响到细胞分裂, 也影响后期病毒繁殖的缘故。

根据紫外分光光度计测定计算病毒产量, 再计算出每个细胞中的病毒粒子数表明, 低温处理后和直接在25℃保温3天的分别为 2.7×10^6 和 1.2×10^6 ; 保温7天的分别为 2.6×10^6 和 4×10^6 , 很接近于

TMV在烟叶原生质体中的数值^[9]。

五、TMV-RNA 接种烟草 悬浮培养细胞

接种物的浓度为50微克TMV-RNA/毫升, 并以50微克TMV-RNA/毫升加5微克RNase/毫升作为对照, 接种后在25℃保温30分钟后洗涤细胞, 培养3天和7天后分别取样, 测侵染性。结果见表2。

表2 TMV-RNA 接种的烟草悬浮培养细胞中病毒侵染性测定

接种物/毫升	平均枯斑数/半叶*		
	0小时	3天	7天
50微克 TMV-RNA	30	300	1516.5
50微克 TMV-RNA + 50微克 RNase	0	0	0

* 三次重复实验, 12—15片半叶平均枯斑数(\times 稀释倍数)。

由表2可见, 在用TMV-RNA接种的细胞中, 接种后保温3天和7天侵染性比0时分别增加10倍和50倍, 而用TMV-RNA和RNase一起接种时, 0时和保温3天、7天的细胞中均未测出侵染性。结果表明, 侵染悬浮细胞的是对RNase敏感的TMV-RNA。

讨 论

病毒及其核酸侵染悬浮培养的愈伤组织细胞, 可能是通过接种过程中细胞表面

因机械损伤而造成的伤口和通过胞间连丝断裂处进入细胞。它毋需多聚鸟氨酸(poly-L-ornithin)的协助, 而病毒侵染原生质体时, 一般需要多聚鸟氨酸的协助, 这可能反映了两体系侵染机制的不同^[1, 2]。在我们的实验中, TMV 对两种叶来源的悬浮培养细胞的侵染和繁殖不如茎来源的好, 可能是因为叶细胞对机械振荡忍受的程度不如后者。

关于低温预处理增加病毒滴度和增加病毒复制的同步性的原因还不清楚。可能是因为低温条件下, 虽然病毒不能复制出有侵染性的病毒颗粒, 但不影响病毒侵染和复制过程中某些早期阶段的进行, 其早期产物可通过胞间连丝到达邻近细胞, 一旦转到适合病毒复制的温度时, 病毒便在大部分细胞中同时开始复制^[5, 10-12]。

Murakishi^[13]曾用 TMV-RNA 接种番茄的悬浮培养细胞。在接种和保温后有一段较长时间侵染性丧失的过程, 到保温后第五天才开始测出侵染性, 到 13—14 天后侵染性才明显增加。在我们的实验中, 保温后第三天侵染性显著增加, 到第七天竟达到 0 时的 50 倍之多。

TMV-RNA 同样也可侵染烟草愈伤组织悬浮培养细胞, 因此, 利用这体系进一步分析接种后经低温预处理的悬浮细胞中病毒侵染的早期产物, 探索病毒复制早期阶段的情况是有意义的。

参 考 文 献

- [1] Murakishi, H. H. et al.: *Virology*, 41: 365—367, 1970.
- [2] Murakishi, H. H. et al.: *Virology*, 43: 62—68, 1971.
- [3] White, J. L. et al.: *Phytopathology*, 67 (1): 60—63, 1977.
- [4] Takebe, I. and Y. T. Otsuki: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 64: 843—848, 1969.
- [5] Pelcher, L. E. et al.: *Virology*, 47: 787—796, 1972.
- [6] White, J. L. and H. H. Murakishi: *Virology*, 21(2): 484—492, 1977.
- [7] 蔡起贵等: *中国科学*, 4: 347—354, 1977。
- [8] Otsuki, Y. T. et al.: *Virology*, 50: 45—50, 1972.
- [9] Takebe, I.: *Ann. Rev. Phytopathology*, 13: 105—125, 1975.
- [10] Dawson, W. O. and D. E. Schlegel: *Virology*, 53: 476—478, 1973.
- [11] Dawson, W. O. et al.: *Virology*, 65: 565—573, 1975.
- [12] Dawson, W. O. and D. E. Schlegel: *Phytopathology*, 66: 625—628, 1976.
- [13] Murakishi, H. H.: *Phytopathology*, 61: 993—996, 1968.

STUDIES ON INFECTION OF SUSPENSION CULTURE CELLS OF TOBACCO CALLUS TISSUES BY TOBACCO MOSAIC VIRUS AND ITS NUCLEIC ACID

Kang Liang-yi Tian Ying-chuan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The effects of tobacco callus tissues from stem and leaf sources on the infection and multiplication of TMV were compared. It was found that the infection and multiplication of TMV was optimal in suspension cells induced from stem of tobacco plant developed from pollen. The growth curve of TMV in suspension cells showed that virus titer dropped after 6 hours of incubation at 25°C, and then rose logarithmically after 24 hours, reached the highest level after 144—216 hours and

then declined. The synchronism of virus replication was increased much greater in suspension culture cells pre-treated with low temperature (10°C) after inoculation and then incubated at 25°C, than those continuously maintained at 25°C, and it was optimal with those cells pre-treated for 10 and 24 hours at low temperature. The procedure employed in the infection of suspension cells of tobacco callus by TMV was also applicable in that by TMV-RNA.