

植物細胞中的 病毒內含体

M. H. 高尔琴

科学出版社

植物細胞中的病毒内含体

M. И. 高尔琴 著

曹若彬 张月季 黄梧芳 译

科学出版社

1960

М. И. ГОЛЬДИН
ВИРУСНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ В РАСТИТЕЛЬНОЙ
КЛЕТКЕ

Издательство Академии Наук СССР, 1954

內 容 簡 介

本书分为两篇,第一篇論述植物体中病毒内含体的特征及主要特性,包括病毒微粒在內含体中的浓度,外界条件对內含体形态的影响,病毒内含体的若干基本特性等。第二篇論述研究病毒内含体的方法,包括隱蔽現象的闡明,病毒内含体的診斷,病毒分化的診斷及观察植物細胞中病毒内含体的方法等。本书材料丰富,內容新穎,系一理論及实践結合的专著。

植物細胞中的病毒内含体

М. И. 高尔琴 著
曹若彬 张月季 黄梧芳 譯
游修齡 黄梧芳 校

*

科学出版社出版 (北京朝阳門大街 117 号)

北京市书刊出版业营业許可証出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总經售

*

1960 年 3 月第 一 版

1960 年 3 月第一次印刷

(京) 0001—5,000

书号: 2116 字数 114,000

开本: 787×1092.1/27

印张: 5 5/27 插圖: 17

定价: 0.95 元

目 录

第一篇 植物病毒内含体的鑑定和主要特性

引言.....	1
第一章 病毒的内含体——植物細胞中病毒微粒的沉淀物.....	5
第二章 关于内含体中病毒微粒的浓缩.....	17
第三章 外界环境对内含体形态的影响.....	25
第四章 病毒内含体的一些共同特性.....	38

第二篇 病毒内含体的研究方法(“内含体方法”)

引言.....	59
第一章 潛隱感染(隱蔽)的說明.....	64
第二章 病毒内含体对植物各种病毒病的診斷学意义.....	68
第三章 相似病毒(不同毒系)的鑑別診斷.....	100
第四章 应用“内含体方法”的各种情况.....	108
第五章 用以观察植物細胞中病毒内含体的一些方法.....	116
結束語.....	123
参考文献.....	126

第 一 篇

植物病毒內含体的鑑定和主要特性

引 言

关于植物細胞中病毒內含体最早是由俄国的学者Д. И. 伊凡諾夫斯基 (ИВАНОВСКИЙ) 报告的, 他創立了关于病毒及植物病毒病的学說。在“烟草花叶病”(1902) 的著作中, Д. И. 伊凡諾夫斯基写道:“在标本的綠色部分中是完全沒有內含体的, 很經常地(即使不是随时)发现某种无色的、結晶状的沉淀物, 如图 3 一样, 很似蜡状物质的沉淀, 不过带有微微的折光。

……显然, 与結晶状沉淀物相似的还有一些形状細薄的淡色薄片的沉淀物, 如图 4 一样; 不过这些薄片是聚集在細胞質中; 我在观察活标本时, 曾偶然看到这样的薄片和細胞質在一起移动。在另外的情况下容易証实, 它們也如叶綠体那样是在同一层中, 并且时常推开叶綠体。

特別有兴趣的是这种情况, 即当这样的薄片似乎复盖了整个細胞的空腔, 而仅在轉动測微螺旋时, 可以看到其淡色的带状部分——即薄片的皺折或波浪式的弯曲部分”。

根据作者的插图判断, “无色的、結晶状的沉淀物”和“微小的淡色的薄片”是处在不同情况下的同一种內含体的外形。在第一种的情况下它們是側面放着, 而在第二种情况下——平放着。由此可見它們不是伊凡諾夫斯基所猜想的相似物, 而恰恰是相同的東西 (图 1)。

植物細胞中产生的病毒結晶体和副結晶体的內含体的研究,

最初就是这样开始的。除这些形成物外，伊凡諾夫斯基还确认“在它們附近(在有病的細胞核的附近——M. Г.) 或常常直接在它們的上面，当仔細观察的时候可以看出某种細胞質的特有的聚集体(參看图 8)，有时明显地呈液泡状，有时呈大粒状。这些形成物显然与其余的細胞内含体是不同的，而且很象寄生在細胞內的变形虫、……”。这种内含体以后称为变形虫状体，液泡状体，或 X 体。伊凡諾夫斯基無論在活細胞中，或在固定的和染色的切片中都看到内含体。在烟草花叶病染色的細胞中，伊凡諾夫斯基观察到各种形状弯曲的薄片的菌胶团 (зооглеи)。他写道，“菌胶团是由很微小的粒子組成，但不是球菌，而是很短的桿菌”。其次——“現在比較图 9—12 和图 3—6，自然地得出假定，即蓝色的菌胶团与淡色的、不大明显的薄片相符合，这些薄片是在活細胞中找到的”。他詳細地描述了而且深入地分析了发生在烟草花叶病上的两种内含体。以后曾查明，在其他很多患病毒病的植株上也有相似的内含体(图 2 和 3)。

根据設計巧妙的試驗，Д. И. 伊凡諾夫斯基肯定了在原則上，非常重要的一个事实，即烟草花叶病毒的内含体发生在細胞質中，而在細胞液中从来也沒有找到过。

根据伊凡諾夫斯基的發現，很多的研究者进行了大量的工作，主要是要了解发生在感染烟草花叶病毒的植株上以及其他病毒病上的内含体。目前工作的任务之一是总结这方面所获得的材料，把在各种病毒病的植物上关于病毒内含体的資料系統化。此外，我們还要詳細地介紹一下，到目前为止还没有失去理論和实践价值的一些著作。可惜在研究病毒内含体的領域內还容許存在不少投机的見解和錯誤的說法。我們必須注意其中某些見解在試驗中竟被容許到多么錯誤的程度！例如，納尔逊 (Nelson, 1922, 1923) 写道，他好象在番茄、三叶草和其他豆科的花叶病中，以及在感染捲叶病毒的馬鈴薯中看到过各种原生动物。他把这些假定的生物視為病毒病的病原。在感染花叶病的豆科植物上，他“发现了”生物的新种，在番茄和馬鈴薯上——发现錐虫属的特殊的种。根据

作者的証据，这些“生物”的大小和形状是有很多变异的。琼斯 (Jones, 1926) 在烟草花叶病的組織中找到变形体，以后发育成为变形虫或……鞭毛原生动物；甚至他好象将这生物在人工培养基上培养成功。他肯定說，在患花叶病的番茄中，感染捲叶病毒的馬鈴薯中，及飼养在这些植物上的蚜虫中都发现有相似的生物。

爱克逊 (Eckerson, 1926) 在患簇生病 (розеточная болезнь) 的小麦各种組織中，以及番茄花叶病的叶肉細胞中，看到細小的、移动很快的生物，这些生物她认为是属于原生动物 (鞭毛生物)。相似的生物她在有花叶病的大丽菊中，在 *Hippeastrum* 属中和在很多其他的植物中也找到过。納尔逊、琼斯和爱克逊、以及肯凯尔 (Kunkel, 1924a)、麦克霍脱 (McWhorter, 1923) 的著作，曾經经过很多研究者的实验审查。审查的結果发觉关于原生动物作为植物病毒病原的假設是完全沒有根据的。

杜里特和麦克琴納 (Dolittle a. McKinney, 1923) 在健康的和感染花叶病的番茄、黃瓜、大豆、三叶草和其他植物的韌皮部中發現和納尔逊所描述的錐虫相似的形成物。但是这些内含体是不动的。它們沒有細胞膜、細胞核和內部的結構。显然，这些形成物不是生物。作者看到，韌皮部的細胞質常常聚集成易于染色的长的或短的不規則的螺旋形，并且可以看到从这些形成物全部轉变为納尔逊所描述的“原生动物”。

拉賽 (Lacey, 1923) 根据自己用有病的和健康的蛇麻草和大豆的組織的試驗得出結論說納尔逊所描述的原生动物，实即退化的細胞核。卡賽 (Kasai, 1925)、柯梯拉和松斯 (Kotila a. Coons, 1923)、柯佛特、謝維林和斯維茲 (Kofoid, Severin a. Swezy, 1923)、K. 斯密司 (K. Smith, 1924)、H. 斯密司 (H. Smith, 1930a) 等在納尔逊、琼斯和爱克逊所研究的同样的对象上並沒有发现他們所描述的原生动物。

亨格尔 (Hunger, 1905) 用氯酚化物的水溶液处理感染烟草花叶病毒的植株組織。在这种情况下看到内含体完全溶解，同时細胞的結構保持着。根据这些試驗作者得出結論，花叶病的发生由

于在有机体中能生成具有自媒作用的物质。无论如何这些内含体不是生物。

在“植物病毒病”一书中雷茹科夫(РЫЖКОВ)写道:“最近呼蒂娜(Худына)和我一起实验室中,在烟草花叶病上找到小体,极似鞭毛生物。同时其中很多小体的形状接近蛋白质的结晶体,因此我们认为这些小体就是蛋白质结晶体”。

可能,爱克逊和纳尔逊也在个别场合中偶然看到发生在植物细胞中的某种原生动物,但它们与病毒病没有丝毫的关系。并且这些假设的作者自己在他们以后的研究中也沒有交代这个问题。

本书主要目的是企图解决这迫切需要的問題——发生在病毒植物中的内含体是病毒的沉淀物或是有病植物代谢的产物。

在进行研究这个问题的过程中,我們和后来的谢菲尔特(Sheffield)曾找出了肯定的解答(至少对于若干种病毒病来说是如此),并曾累积了資料,分析这些資料有可能提出以下的原理。因为証明結晶体的内含体是病毒的沉积物,使我們不仅对观察和描述各种内含体感到兴趣,而且要布置試驗,以研究病毒微粒的习性及其和植物細胞統一性的关系。

本书的第二篇是討論利用有关病毒内含体的資料来研究和制定植物病毒病防治的方法,以及达到認識病毒基本特性的目的的极大的可能性。

病毒病的診斷,相似病毒的鑑別診斷,潜伏性侵染的查明,病毒的特性及其和寄主細胞的相互作用有关的重要因素的确定,这些问题由于应用了病毒内含体的分析方法,正处在具体解决的过程中,所以还不能作出完整的一覽表来。在很多場合中,只有查明病毒的内含体以后,我們才能够解答問題,因为要順利地回答这些问题是困难的,而且往往是得不到其他任何方法的帮助、启发,例如,关于二种不同病毒在同一細胞中存在的可能性的問題,病毒微粒出現在气孔机构中或在植株的其他細胞中等。

关于植物病毒病的科学已經取得了丰富的資料,証明在研究病毒内含体的过程中,揭发病毒秘密的可能性是很大的。

第一章

病毒的内含体——植物細胞中病毒微粒的沉淀物

在植物病毒病科学发展的初期，很多研究者曾把注意力集中于伊凡諾夫斯基所描述的变形虫状的X体的研究。有一些人认为在这些X体中全部包含着原生动物。另一些人精细地、一步一步地证明了X体不是細胞核，不是假足 [псевдоподия (拉丁文: pseudopodia——譯者注)] 或鞭毛，因为它们(指細胞核、假足和鞭毛——譯者注)不能够繁殖，即它們不是生物。但是两者大抵都沒有注意到特殊的結晶质的内含体，这些内含体至多只是使研究者惊奇，但是沒有喚醒他們创造性的思維。好象这些形成物对于病毒沒有密切的关系。

在显微镜下研究感染病毒的人或动物的組織，研究者十分正确地对于特殊的、微小的形成物給以最大的注意，它含有胸腺核酸。这些就是所謂原小体，它們即是病毒的微粒。X体大半是在人和动物病毒病的系統內被研究，目的在帮助診斷。

植物病毒結晶体状态和副結晶体状态标本的制成——是病毒本质学說的新阶段。由于这些发现，关于細胞內病毒内含体的研究开始使用新的方式。从这个时期起，当研究植物病毒时，無論結晶质的或結晶体的内含体都特別受到精细的注意。应该指出，植物病毒内含体的研究是以 Д. И. 伊凡諾夫斯基的有重大价值的研究成果作为基本前提和出发点的。

他在研究烟草花叶病叶子中結晶质内含体时(1902)确定了，“在酸的作用之下，叶子中出現了明显的橫的綫条；因而在用酸性佛来明氏液固定的标本中，它們是充滿着橫的綫条的……”伊凡諾夫斯基还有更卓越的指示，用以下的話来表明：“外胚叶的細胞，如

黃色的及綠色的部分,在固定劑的作用下,被整個結球的某種綫條 (М. Г.) 或揉成一團的小顆粒所充滿……。在活的標本中,這些形成物不表現出來,但是在醋酸的作用下,它們在那里也會呈現出來”。

所以,當斯丹萊 (Stanley) 在試管中獲得了精制的烟草花葉病毒絲狀的或針狀的副結晶體的標本時,提出了把這些形成物和早在 1902 年伊凡諾夫斯基所描述的結球的綫條或揉成一團的小顆粒相比較的問題。

在這裡可不可以說只是外表上相似或者就是相同的呢? 讓我們介紹一些試驗工作的情況,這些試驗的目的正是想解決這個原則上非常重要的問題。

貝爾 (Beale, 1936) 証實了伊凡諾夫斯基得到的資料,即烟草花葉病組織中結晶質的內含體在 0.1N HCl 的作用下,被分解成為針狀的結晶體,這和在純化的烟草花葉病毒的標本中可以看到結晶體是相同的。在另一工作中 (1937) 曾証明,如果進行繼續的酸化 (至 pH 1.0), 那末當結晶質的內含體分解時,已形成的針狀的副結晶體也溶解了。在經過針狀形成物階段的情況下,當 pH 為 11.7 時,結晶質的內含體同樣被溶解了。這裡作者認為在試管中純化的病毒標本具有相似的特性。眾所周知,烟草花葉病毒在 pH 低於 1.0 和高於 11.0 之下是會變性的。細胞內結晶質的內含體是病毒微粒的聚集体,這個問題間接地証明,從上述的工作在某種程度上可以作出以下的論據。在感染所謂隱蔽的烟草花葉病毒毒系的植物組織中,形成病毒的微粒,正如用滴定法所肯定的,它比感染典型的烟草花葉病毒的毒系形成病毒的微粒為少。與這點符合的是在第一种情況下病毒的內含體是很少的。當然,這樣的比較可能只有相對的意義。必須要獲得更精確的証據。

由於李維斯頓和杜加 (Livingston a. Duggar, 1934)、高爾琴 (Гольдин, 1938)、謝菲爾特 (1939) 進行顯微外科研究的成就,使這個問題獲得直接的和完善的解答。

從事這方面的研究以後,李維斯頓和杜加首先提出了,在活細

胞的各部分中,特别是不同成分的原生質中和液泡中,关于病毒的局限性和浓度的問題。作者应用了奇伯那(Чибналл)的方法¹⁾。为了避免过滤时受压力的影响使細胞破裂,引起方法上的不正确,以后作者改用了微量法。在这种場合下,液泡的内容物用透光2微米的微量量管取出。不需要的原生質的吸入在某种程度上,可通过微量量管中液体折光系数的变动来控制。結果列于表1。

表1 关于烟草花叶病植株表皮毛細胞的液泡内容物中
及原生質中病毒的濃度,用微量法得到的資料

标本的性质	标本材料的数量(毫克)	标本稀释的程度	接种植株的数量	病害植株的数量	病害的百分数
液泡的内容物… …	0.577	1:1000	10	2	20
原生質的抽出物……	0.581	1:1000	10	8	80

作者作出結論:“試驗的結果,其中之一列在表中,說明極大多數病毒是存在于原生質中。用液泡的内容物进行接种,在某种程度上由于方法不完善、比如,少量的原生質或受伤細胞的原生質細粒滲入移液管中而受到限制。在这方面正在繼續进一步的研究中”。

馬丁(Martin)和麦克琴納在以下的誘发变异中重复了李維斯頓和杜加的試驗。175克感染烟草花叶病毒新鮮的烟草叶子,浸在100克的乙醚中10分鐘。然后利用水力压榨机得到了45毫升褐色透明的液体。使殘渣冻结起来,而且在研鉢中研碎。在这个物質中加入50毫升水和20毫升0.5克分子浓度的磷酸鈉溶液。

进一步的浸出和通过分离器过滤得到78毫升褐色透明的液体。在45毫升液泡的内容物中总含氮量为0.317毫克/毫升,而蛋白質氮仅有0.022毫克/毫升。在78毫升原生質的抽出物中总含氮量为0.583毫克/毫升,而蛋白質氮为0.389毫克/毫升。两种标本在磷酸的緩冲液(pH7)中稀释,这样使它們的蛋白質的含量等于 10^{-4} 毫克/毫升。純化的病毒蛋白質相应地被稀释作为对照。每

1) The J. of Biol. Chem. 55, 3, 1923.

个样品在 32 张指示植物的叶子上試驗。以液泡的内含体接种时曾得到:1 个坏死斑;用原生质的抽出物——240 个坏死斑。对照得到 222 个坏死斑。

作者归納說:“在个別の場合中液泡的汁液出現极小的感染率,这可以用在處理的过程中从細胞质内流入了病毒来解释”。

因此,李維斯頓和杜加得出了結論,即烟草花叶病毒集中在原生质中。这个結論后来为馬丁和麦克琴納所証实。

在李維斯頓和杜加的試驗中的下一部分是研究結晶质的内含体。

結晶质的内含体发生在感染烟草花叶病毒的植株上,甚至不均衡地分布在同一組織内。例如在感染烟草花叶病毒的烟草或番茄的一些表皮毛中,結晶质的内含体可能是很多的,而在另外的表皮毛中根本沒有。李維斯頓和杜加决定要查明这个問題:在沒有結晶质内含体的細胞中会有病毒嗎?他們在植物病毒的研究領域中最先应用了显微外科学的方法。試驗的要点如下:将幼小的植株用烟草花叶病毒接种。接种后 15 天取这些植株做成切片。用直径 2—5 微米的微量量管分別从含有大量的病毒内含体的表皮毛細胞中和沒有内含体的表皮毛細胞中抽取内容物。在这个材料中測定病毒的效值。进行接种試驗时,細胞的内容物用生理溶液稀释成 1:100 和 1:1000 的比例,同时每个这样的样品被接种到一些植物上。結果列于表 2。

表 2 关于細胞中病毒内含体与濃度的关系的資料

試驗号碼和細胞内容物	試驗材料的数量(毫克)	稀 释 度	接种植株的数量	病害植株的数量
試驗 1				
内含体很多.....	0.249	1:1000	10	8
内含体沒有.....	0.303	1:1000	10	0
試驗 2				
内含体很多.....	0.577	1:100	3	3
		1:1000	4	4
内含体沒有.....	1.064	1:100	5	1
	1.064	1:1000	10	0

从上表看来,在試驗 1 中,虽然用含有内含体的細胞較沒有内含体的細胞为少,而所得的感病率却相应地各为 80% 和 0。而在試驗 2 中感病率相应地各为 100 和 20% (稀释 1:100),从有内含体的細胞中所取的供試材料只及沒有内含体的細胞的一半。應該指出,个别的病害可能是試驗过程中偶然感染之故。作者根据得到的結果作出以下的結論:内含体是病毒的聚集体或者更可能的是与病毒在細胞中积累有关的产物。

我們曾进行过以下的誘发变异試驗 (19386)。用显微操作器从同一番茄花叶病枝条上扯下 15—20 根带有内含体的表皮毛,及 15—20 根沒有内含体的表皮毛。兩組的表皮毛分別在灭菌水中洗淨,用砂打碎然后用这些材料接种到光叶烟 (*N. Glutinosa*) 的叶子上。試驗重复三次 (参看表 3)。

表 3 光叶烟的叶片接种試驗

(分別用含有或不含有伊凡諾夫斯基結晶体的表皮毛的滴液接种)

試 驗 号 碼	表皮毛中結晶体的存在	半叶上坏死斑的数量
1	+	16
	-	0
2	+	8
	-	0
3	+	22
	-	0

从上表看来,只有用含伊凡諾夫斯基結晶体的表皮毛的滴液接种的才得到良好的效果。同样的方法試驗烟草病毒的几片表皮也得到相似的資料。这些試驗确定了内含体和植株組織中烟草花叶病毒的浓度之間存在着密切的关系。

虽然有了这些成果,毕竟仍然存在着主要的問題:應該認為病毒内含体仅是有病植物中病毒和細胞相互作用所生成的产物,抑或这些内含体就是病毒粒子可見的聚集体? 主张以内含体为“伪象”(артефакт)的研究者們可能会断言:含病毒的細胞中含有結晶体和不含病毒的細胞中沒有結晶体这种現象正是由于这些内含体乃是細胞对病毒的反应的产物 (此处所称“伪象”即指产物之意

——譯者注)。也就是說，內含体和病毒二者存在的關係可能具有“伴隨”的性質，即病毒濃度愈高，則細胞中病理代謝的產物愈多。因此需要尋找新的方法，另外的論證來駁倒這些見解。按照以下方案布置的試驗，可以得到徹底全面的答復，用显微操作器從花葉病植株的表皮毛細胞中取出伊凡諾夫斯基的結晶體，然後作接種試驗：1)取出而且洗淨伊凡諾夫斯基的結晶體；2)將除去伊凡諾夫斯基的結晶體的細胞進行接種；最後，3)對照——同樣細胞的數目，如在第二種情況下一樣，但帶有結晶體。

我們進行這樣方式的試驗起初遇到不可克服的困難。問題在於伊凡諾夫斯基的結晶體在植物細胞受傷時會很快地消失了。因此我們選用幾種另外的證明方法。在烟草或番茄花葉病的表皮毛細胞中一般有1—3個伊凡諾夫斯基的結晶體。它們的分布可能不一樣。在表皮毛細胞中結晶體的分布約如圖4所示。表皮毛6部分，包括第二細胞的一半和第三細胞的一半，這個表皮毛的切片正是沒有伊凡諾夫斯基結晶體的，如果我們移出這部分來接種，根據我們的假設，實際上不會含有病毒的。相反地，兩個另外的切片a和c應該含有病毒。這個問題的試驗，說明如下。

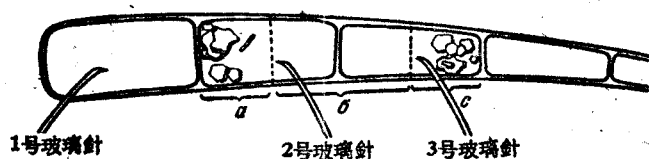


圖4 显微外科手术實驗的圖解

發現烟草花葉病毒最方便的和使人信服的方法之一是用試驗的材料接種在光葉烟的葉子上。用這些方法能發現極小量的病毒。但是達到何種的限度呢？

當用含有伊凡諾夫斯基結晶體的表皮毛1—2細胞接種在光葉烟的葉子上，我們沒有得到證明烟草花葉病毒存在的壞死斑。只有當應用5—10個表皮毛細胞，每一細胞中有很多數量(3—5個)的伊凡諾夫斯基結晶體時，才經常地得到壞死斑。

在這些初步的試驗之後，我們開始主要的試驗。當時我們應

用以下的方法。用鋒利的小解剖刀从番茄花叶病的小枝上拉出表皮毛,首先不要使它受伤(不要压皱,不要压坏等),其次是尽可能少带住表皮細胞。然后将表皮毛放置在消毒过的載玻片上的一大滴自来水中,同时在其上謹慎地盖上盖玻片。表皮毛在放大450—700倍的显微镜下观察。选择其中結晶体的分布如图4所示的表皮毛用作試驗。含有不典型的伊凡諾夫斯基的結晶体或除伊凡諾夫斯基結晶体外,还有其他結晶質形成物的表皮毛,一概除去。可能这些微小的形成物由于伊凡諾夫斯基結晶体的分解而出現,或者相反的,伊凡諾夫斯基結晶体是从它們之中发生的。至于这些微小形成物的性質,我們在目前还不清楚,为了不使我們的問題的解答复杂化,在試驗中取用的表皮毛,除含有一般的植物細胞成分外,只含有典型的伊凡諾夫斯基的結晶体。

这样选出的表皮毛在蒸餾水中洗几次,再用烧过的試驗小針移到新的載玻片上的小滴蒸餾水中。以后的手术借助于显微操作器进行。

用1号玻璃針將表皮毛紧貼在載玻片上。再如图4所示,用3号玻璃針將第三表皮毛細胞(从基部算起)的中間割开,迅即用3号玻璃針將割的部分移开,俾使第三細胞結晶体中所含之传染源来不及传染到該細胞的其余部分。其次用2号玻璃針在第二細胞之中部行第二次割裂。以后,同样很快地使第一和第二部分分开。此时,由第二細胞右半和第三細胞左半所組成的小块表皮毛的切片,在显微镜的視域下是沒有伊凡諾夫斯基結晶体的。将这个切片用玻璃針迅速挑起,使其内含体不致流出,并移到小鍍面皿中,以做成悬滴。因此,在一个小鍍面皿中,我們收集一定数量的小块——6,不含有伊凡諾夫斯基的結晶体,而在另一小鍍面皿中——小块表皮毛a和c(用同样的方法精確地分开),不含有結晶体。积累这种材料的手續要延續好几天,为了更好地保存病毒玻片,須予以冷藏。积聚了足够数量的材料以后,我們就开始接种。表皮毛的切片用显微操作器切成最小的小块。在每一小鍍面皿中加入1—2滴弱硷性的磷酸盐緩冲剂。玻片放置在37°定温箱中

1—2小时,然后将烘干的表皮毛小粒用細小的金刚砂或細砂磨碎。再次加入 1—2 滴弱硷性磷酸盐的緩冲剂。混合体充分攪和而且按照半叶法用来接种到光叶烟的叶子上。試驗重复三次。为了更好地証明不含伊凡諾夫斯基結晶体的表皮毛小块,我們取用的数量特別比含有結晶体的切片多 1—2 倍。

从表 4 看来,在所有的場合下,只有含伊凡諾夫斯基結晶体的表皮毛小块接种成功了。这也証明我們应用的方法沒有偶然感染的可能性。

表 4 用含有和不含伊凡諾夫斯基結晶体的小块表皮毛
接种时,在光叶烟叶子上环死斑的数量

試驗号数	不含有伊凡諾夫斯基結晶体的小块表皮毛			含有伊凡諾夫斯基結晶体的小块表皮毛		
	小块的数量	第一次接种	第二次接种	小块的数量	第一次接种	第二次接种
1	35	0	0	30	12	6
2	47	0	0	15	5	4
3	30	0	0	15	9	4

注:每一小块大約等于一个表皮毛細胞。

最先研究烟草花叶病毒的植物細胞中发生的内含体的是,И. И. 伊凡諾夫斯基。我們可以滿意地指出,关于这些内含体性质的問題,亦是在我們国家内解决的。在植物病毒病的实践中最早用显微外科科学的实验証明細胞内結晶质的内含体是病毒的濃縮。

我們的著作发表在 1938 年。1939 年謝菲尔特报导了他的試驗,也是用相似的方法进行的。他同样对伊凡諾夫斯基結晶体不稳定状态的事实发生怀疑。他写道:“因为不可能分离这些結晶体來說明其中含有病毒,为此,不得不利用感染番茄奧古巴花叶病毒所产生的非結晶内含体。”因此,作者的研究遂限于所謂番茄奧古巴花叶病所特有的 X 体¹⁾。謝菲尔特試驗的实质是:用生物学的方

1) 实际上沒有任何令人信服的事实足以証明在自然界中存在着这样的种 或 甚至毒系。在产生黄色花叶病的烟草花叶病类羣中,各种不同的毒系都是这个名称研討的对象。

法成功地找出病毒最大的稀释度是不超过 $1:10^8$ 。如果认为内含体是球形的,它的直径为 20 微米或 (2×10^{-3}) 厘米,那么它的体积大约等于 $4(10^{-3})^3$ 立方厘米。一个内含体的重量估计为 $4(10^{-9})$ 克。在此种场合下,为了要使最大稀释度为 $1:10^8$ 的病毒的浓缩,需要聚集 10 个内含体于 4 毫升的水中。用显微操作器在液体 pH 3 及含有 0.1 m.p. 苯二甲酸钾的悬滴中取出 X 体。被取出的 X 体集中起来,清洗几次而后从其中得到的悬浊液接种到光叶烟的叶子上。试验重复 4 次。其结果列于表 5。

表 5 内含体(X 体)中的病毒

用 以 接 种 的 材 料	坏 死 斑	
	60 片 光 叶 烟 的 叶 子	12 片 光 叶 烟 的 半 叶
清水(对照).....	0	0
病毒植株压榨的汁液稀释 $1:10^8$	19	1
同上稀释 $1:2 \times 10^7$	—	4
内含体: 1)10 个在 4 毫升溶液中.....	15	1
2)10 个在 0.8 毫升溶液中.....	—	7

从表 5 看来,虽然用以接种的内含体的量极少,病毒在叶子上还是呈现的。这说明了(1)在内含体中有病毒,(2)在内含体中有较大数量的病毒。这些资料促使作者进一步去推断和试验,病毒是怎样分布在植物细胞中的?它在何处较多——在内含体中抑在原生质中?

用显微操作器将表皮毛断裂为两半:一半有 X 体,而另一半没有。20 个有 X 体的一半移植在试管中,试管内含有 0.8 毫升的水。这个混悬质 0.15 毫升使稀释到 0.7 毫升。另 20 个没有内含体的一半作同样的处理。病毒植株压榨出的汁液稀释成 $1:10^7$ 和 $1:5 \times 10^7$ 供作对照。用每个样品接种到 6 份光叶烟的半叶上。试验做 6 个重复。

在第一号试验中取用最近形成的内含体,而在第二号试验中——内含体是在二周以前形成的(表 6)。

根据这些试验作者指出,含有内含体的一半细胞其病毒的浓