

植物病毒学

裘维蕃 主编

科学出版社

植 物 病 毒 学

裘维蕃 主编

科 学 出 版 社

1985

PLANT VIROLOGY

Edited by

Qiu Weifan (W.F. Chiu) PhD.

Professor of Plant Pathology,

Beijing Agricultural University

Member of Biology Division,

Academia Sinica

Science Press

Beijing, China

1 9 8 5

内 容 简 介

本书是植物病毒学的参考书,它介绍近 20 多年来植物病毒学范畴内的新进展,而不是系统地介绍这一学科的所有方面。本书选择的专题一般代表了本学科中发展最为迅速的部分。每一专题由国内从事此项研究工作的专家执笔,以综述国内外资料为主。关于发展史方面则补充了近 20 年来对植物病毒学作出新贡献的人物及其成果。本书的主要方面有关于植物病毒的化学组成、结构和遗传变遗,这些都是分子病毒学的基础。在植物病理病毒学方面,介绍了植物病毒的生物学测定,病毒与传染介体的关系及病毒病生态学等,这些都是对控制植物病毒病有实际意义的部分。在现代植物病毒学中起重要作用的抗血清免疫技术的原理和实际,也有所阐述。真菌病毒是过去一般植物病毒学中讨论得很少或不讨论的内容,而本书却单独辟出一章作了专题论述。此外对近年来发现的类病毒也有较详的叙述。因此本书适用于生物学工作者,特别是微生物学及农业科学工作者参考之用。

植 物 病 毒 学

裘维蕃 主编

责任编辑 范淑琴

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1985 年 5 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1985 年 5 月第一次印刷 印张: 26 1/2 插页: 1

印数: 0001—5,600 字数: 614,000

统一书号: 13031·2894

本社书号: 3950·13—8

定价: 6.30 元

序 言

植物病毒学在近二十年内出现了飞跃的进展。二十年前编者曾写过一本植物病毒学,但时至今日,该书的内容已远远落后于时代,如不加以重写是不复足用了。当前国际上有关植物病毒的研究材料,浩如烟海,既难于搜集,亦难于浏览,因此有必要集中我国的有关力量,发挥各自的专长,将其手头的现存资料,撷其精华,去其烦琐,汇集成书,以供有关科学工作者参考。这不仅因为植物病毒病在农业生产的经济意义上越来越受到重视,同时也因为植物病毒是研究分子生物学的良好材料。

1978年10月中国植物病理学会在广西阳朔召开了全国植物病毒病学术讨论会,会上广大植物病毒学工作者要求迅速编纂这样一本参考书。当时与会的科学出版社工作同志响应了这一要求,同意筹编并出版此书,并邀我负起主编责任,我当即欣然接受。会后曾与有关专家商订题目,约请撰稿人等,工作颇为顺利,预期1980年可以完稿。但事与愿违,1979—1980年之间,有些撰稿同志有出国任务,少数同志则因事耽延,更不幸的是承担电镜技术一章的彭加木同志因公遇难。为此一方面推迟完稿日期,另一方面又不得不调整题目及撰写人。此外鉴于1980年以前所完成的稿件已有增修之必要,以期本书能反映国际最新的成果从而送回修订。1982年9月全部稿齐,从而得进行一次全面的编辑工作,其中最重要的是统一术语。

这一本《植物病毒学》有下述几个特点:(一)它不仅适用于农业生物学工作者,也适用于一般生物学工作者之用,但本书是一种参考书,不是教科书。(二)本书虽然标明章数,但各章之间,并不如教科书那样存在着有机衔接,而是各自独立的。(三)各题之间有些内容有时有些重复,但这种重复的部分常是按不同的角度去讨论的。(四)有些题下的内容涉及到人、动物病毒和噬菌体的讨论,这是必要的,因为病毒的某些活动机制单靠植物病毒的材料就不能表达清楚。

植物病毒学的进展迅速,任何参考书每隔五年必须小修一次,每隔十年必须大修一次,因此本书在今后的十年中也必须重点抽出某些题目加以重订。如果出现新题材时,还应另行选题,编入此书,使本书得“永葆青春”!

现在病毒学涉及的范围广泛,触及的学科除生物学、农业科学的各门外,也充分利用了生物物理学及生物化学等各领域的原理及技术。因此集合有关专业人员协同写作,才能各尽所长,而介绍的内容可以比较全面而深入。主编者才疏学浅,在编辑过程中仅能尽到协调材料及统一术语等工作,虽勉力为之,诚恐未妥之处尚多,敬希读者不吝指正。

裘维蕃

1982年10月20日

目 录

序言	iii
第一章 植物病毒学发展史	1
第二章 植物病毒的侵染及免疫	7
第三章 植物病毒的传染及其机制	38
第四章 植物病毒的症状诊断及生物测定	67
第五章 病毒提纯及组分分离	101
第六章 电子显微镜技术	129
第七章 植物病毒的化学组成及结构	165
第八章 病毒的侵入和复制	201
第九章 活体内的抗病毒物质及治疗制剂	237
第十章 植物病毒的遗传及变异	250
第十一章 血清学原理及其在植物病毒学中的应用	270
第十二章 类似病毒病的病原体	293
第十三章 真菌病毒	338
第十四章 植物病毒的起源、分类与命名	384
第十五章 植物病毒的生态学及控制原理	397

第一章 植物病毒学发展史

- 一、植物病毒的存在及其传染性的确立
- 二、本质的研究及其进展
- 三、形态及结构的研究
- 四、植物病毒分类及命名的沿革
- 五、病毒研究技术的进展
- 六、与病毒混淆的新病原物
- 七、裸子植物及低等植物病毒的研究
- 八、小结
- 参考文献

从认识病毒的存在到发展成为一门学科——植物病毒学，大约经历了六十余年。其后又经历了三十余年的发展，才形成现代植物病毒学，亦即分子病毒学。第一个六十余年的发展，主要是植物病理病毒学，在此基础上，由于进入了对生命科学的探究，采用了现代生物化学及生物物理学研究方法，从而衍生了分子病毒学的新学科。为此，谈植物病毒学的发展史，应从不同的方面来讨论，因为许多问题都是相互交叉的。

一、植物病毒的存在及其传染性的确立

一致公认动物病毒学的进展比植物病毒学快，但是确认病毒是一种病原物，则以植物病毒比动物病毒稍早。且不说很早以前(1576)，在荷兰就注意到郁金香的碎色病，更值得注意的是在1775年欧洲马铃薯的“退化”病引起了人们极大的注意。1778年 Anderson 有一篇文章谈到马铃薯的退化病，指出英国的南部较北部为重，病株结的种薯仍能长出病株，而在田间拔除病株可以减少马铃薯的退化。当然，那时还不知道到底是什么原因使马铃薯发生退化的。1868年发现欧洲的观赏植物锦葵 (*Abutilon*) 的花叶型可以用嫁接的办法传染给正常的锦葵。其后 Smith (1891) 发现：用患有桃黄化及丛簇的桃芽嫁接在健桃上后，可以传染这种病害。烟草花叶病 (Tobacco mosaic) 这一名词是德国的 A. Mayor (1886) 首次命名的，他并证明用机械接触的方法可以使这种病害传染，但是用当时的光学显微镜，他未能看到有任何微生物的存在。当时 L. Pasteur 在研究疯犬的恐水病中，也未能从显微镜中看到任何微生物，不过 Pasteur 曾预言可能存在一种极细的微生物，实际上指的是一种极其微小的细菌。1892年俄国的 D. Ivanowski 证实了 Mayor 的结论，而且是将烟草病株汁液通过了细菌滤器以后实现的，但他并不重视他自己的结果，并认为他的细菌滤器可能有毛病。1898年 M. W. Beijerinck (图 1-1) 证实了 Mayor 及 Ivanowski 的结果，并提出：这种病原物不可能是一种细菌，从而称之为“传染活液” (*Contagium vivum fluidum*)。同年在动物病毒口蹄疫中，也获得了同样的现象。

从廿世纪开始，植物病毒学的研究，实际上只限于植物病理学的范畴。马铃薯退化病的研究，使 Quanjier (1916) 及 Botjes (1920) 确切地证实了马铃薯的卷叶病毒是由蚜虫传染的。自 1918—1925 年之间，研究者已经认识：有些病毒虽然可以侵染植物，但不一定表现症状，例如以 TMV 接种酸浆 (*Physalis alkekengi*) 后，酸浆便成为隐症寄主。较早发现病毒的混合侵染是在 1926 年 (Vanterpool)。番茄单独受 TMV 或 PVX 的侵染时，

只出现花叶或斑驳,当两者混合侵染时,就能出现条斑坏死。就在同时,植病工作者受到



图 1-1 M. W. Beijerinck (1851—1931)
传染活液的命名者

Pasteur 关于恐水病病原可以减弱其毒力的启示,从而也证实了植物病毒有强弱株系之分 (Castner, Johnson)。1931 年汤清香 (Thung, T. H.) 首次提出,植物病毒的弱株系首先侵染一种植物后,能使这株植物对强株系起保护作用。Holmes (1978—1929) 发现 TMV 接种在心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 上能产生局部枯斑,而这种枯斑的数量,似乎和病毒的浓度有相关性,这是利用枯斑寄主作病毒测定的开始。在植物病毒研究中,首先利用血清学方法的是 Dvorak (1927),其后这方面的应用及发展极为迅速。

综观自 30 年代初以前的时期中,虽然确立了一种病原物、病毒的存在,但既没有在形态上加以证实,也没有在本质上加以澄清,所以这一时期的发展完全是在植物病理的范畴

以内,只能说是植物病毒学的萌芽时期。

二、本质的研究及其进展

较早期间,即在 30 年代以前,所有对植物病毒本质的推论,大多是根据一个方面的观察而作出的猜测。有人认为这是一种氧化酶 (Woods, 1900), 有人认为这是一种极细的微生物 (Allard, 1916), 也有人认为是微生物的一个可滤性阶段 (Smith, 1924 及 Hoggan, 1927)。当时也曾注意到 Ivanowski 早就观察到的 TMV 侵染的病细胞中的结晶体, 有人认为这是病细胞的代谢产物, 也有人认为可能是由细菌带入植物体内的细菌噬菌体所引起的病理作用 (Paine 及 Bewley, 1919)。值得注意的是 Petre (1929) 用醋酸铅沉淀出烟草花叶病株的汁液中含有传染性的物质, 而这种物质却含有氮。当时 Purdy 也因植物病毒可以制备抗血清而认为病毒可能是蛋白质或多糖类物质。

1935 年 Stanley (图 1-2) 从烟草花叶病毒汁液中得出一种有侵染性的结晶或称作拟结晶, 这是一种蛋白结晶。这个发现使 Stanley 获得了诺贝尔奖金。实际上, 更重要

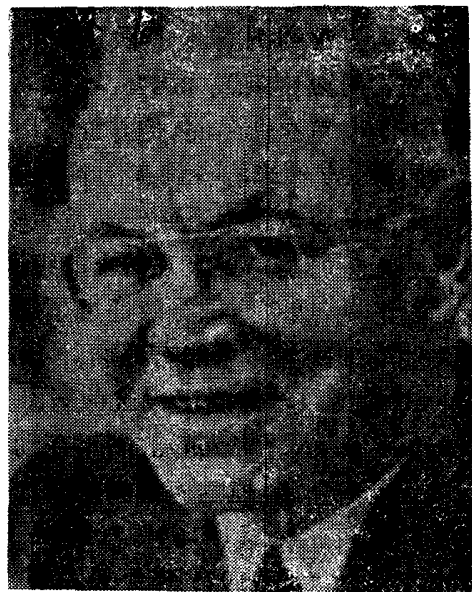


图 1-2 W. M. Stanley. 1933 年证实 TMV
为蛋白能结出假晶体并保持侵染性

的是 Bawden 及 Pirie (1937) 的工作证实了 TMV 中除蛋白质外, 还有核酸, 其比例为 RNA 5%, 而蛋白质为 95%。其后的许多研究进一步证明了所有已知的植物病毒都含有这两种成份, 一直到 1968 年 Shepherd 等才证明花椰菜花叶病毒的核酸是 DNA 而不是 RNA, 自后发现具有 DNA 的病毒, 并非只是花椰菜花叶病毒一种。

自 50 年代起, 人们对核酸的增殖作用及蛋白质的保护作用做了一系列的研究, 并指出, 在个别情况下, 蛋白衣壳中也可能带有增殖的基因组。自 60 年代起, 人们开始对烟草脆裂病毒 (TRV) 的长短粒体的致病性作了测定 (Harrison 及 Nixon 1959), 从而开始形成对 RNA 植物病毒中存在多分体基因组现象的研究。目前对于病毒核酸增殖或复制的机制主要依靠对动物病毒及噬菌体的研究得出了一些概念。总之 DNA 及 RNA 以及它们的双链型及单链的复制机制是不一样的。在复制过程中有一些酶如复制酶, 转录酶及转移酶等参与其间。这是最近二十年来获得的新贡献。

三、形态及结构的研究

早期对病毒的形态是靠一些间接的物理学方法来探测的。也曾利用超外滤器的不同滤孔口径来判断过滤物体的可能直径。真正观察到病毒粒体的外形, 从而确定其为球体 (或等径多面体) 或杆体是在 40 年代电子显微镜问世以后。由于人们较早就对病毒进行了理化分析及 X-射线的晶体图像分析, 结合电镜图像, 使人们对许多种病毒的形态及其基本单元的装组都有了比较清楚的概念。这不能不归功于一些先驱工作者如 Crick 及 Watson (1956), Caspar 及 Klug (1962) Markham 等 (1964) 的功绩。

四、植物病毒分类及命名的沿革

植物病毒的分类是随着人类对它们认识的不断进展而有所变革的。1935 年 Johnson 及 Hoggan 提出, 植物病毒根据分离的先后编号而以寄主名开头, 因此烟草花叶病毒将命名为 Tobacco virus 1; Smith (1937) 改变了这一方式, 将英语 Tobacco 换成拉丁属名, 成为 *Nicotiana virus 1*, 而 Fawcett 则企图将这名词全部改成拉文成为 *Nicotianaevir* (属名) *commune* (种名)。在此概念上, Holmes (1939) 提出, 将病毒归入一个病毒目 *Virales* 中并分为三个亚目; 噬菌体亚目 (*Phagineae*)、植物病毒亚目 (*Phytophagineae*) 及动物病毒亚目 (*Zoophagineae*)。在植物病毒亚目中, 又根据寄主表现的症状及传染方式分成六个科, 而属名则完全根据症状, 从而 TMV 成为 *Marmor tabaci* (Holmes ex Valteau) McKinney。这一分类法曾在 40 年代被采用过; 其后有多种类似的分类命名法, 都未能为广大植物病毒工作者所接受。

自从对病毒的形态及核酸性质有了较详细的认识后, Lwoff 等 (1962) 提出, 以核酸的类型及其粒子的对称性区分亚门及纲。这一设想经改进后, 在 1979 年的病毒国际分类委员会的第三次报告中加以采用了, 并初步承认了二十三个属于高等植物病毒的组。关于命名问题, 目前国际植物病毒工作者已同意暂时放弃拉丁双名法而通用标准的俗名法, 并配以 Gibbs (1968) 倡议的四组编码法来识别不同的病毒。目前认为这一方式是有其一定方便之处。

五、病毒研究技术的进展

三十年代以前,对植物病毒的研究,主要是想满足 Koch 氏定律,以证实病毒是一种病原物,但是 Koch 氏定律是以人工可以分离培养的细菌为依据的,而病毒在那时的技术条件下,无法分离成单元而用细菌培养基加以培养。为此有人曾认为, Koch 氏定律不适用于病毒,但是现在由于采用了提纯的技术,使不同病毒可以分开,不同株系可以分开,并且同一病毒的不同分体也可以分开。这种分离的纯度并不亚于细菌的单孢分离。此外病毒的繁殖则可以采取活体培养。迄今为止,除极少数外,绝大多数病毒的鉴定是可以 Koch 氏定律为依据的。现代分离病毒借用了超速离心、色层分析、电泳分析等技术。

在形态学方面,电镜技术也愈来愈有所改进,特别是负染的发展,使人们得以看清表层亚基的排列,有时也可以看到病毒粒体心部的范畴。扫描电镜的应用,使人得以观察病毒粒体经过冻蚀法后在细胞中的立体位置及表面形态。病细胞学的研究也随着电镜技术的改进而逐渐用以补充光学显微镜所不能观察到的部分。

在血清诊断方面,曾采用了一系列的方法来增进抗血清的效价,以及在反应试验中的灵敏度,例如乳胶或皂土吸附法,酶联免疫吸附法(ELISA)以及较近正在试用动物病毒免疫抗体法中的杂交瘤(单克隆抗体),来为植物病毒的免疫研究服务等。抗血清的应用早已超出了单纯为病毒鉴定之用,而同时可以测定病毒的增殖量,亲缘关系的远近,衣壳结构及遗传变异的关系等。

除此以外,生物化学及生物物理学技术用来分离核酸及衣壳蛋白以确定它们的分子量组成和序列等已成为分子病毒学不可缺少的环节,也是现代鉴定病毒的基础之

六、与病毒混淆的新病原物

在早期研究植物病毒病害中,曾有多种非病毒病,而一直误认为是病毒病的,最明显的就是所谓黄化型“病毒病”,例如翠菊黄化病,以及矮缩或丛枝型“病毒病”,例如桑树萎缩病。这些病害都不能用汁液摩擦接种,而只能由昆虫或嫁接来传染,因此对于这类“病毒”的本质极难确定,特别是不能按对 TMV 一类研究方法研究它们。1967年日本土居养二用电镜及嫁接证明桑树萎缩病是由一种类似菌原体(Mycoplasma)的病原物诱致的。自此以后有许多过去被误认为是“病毒病”的病害已经改正了过来,并且发现了更多新的由类菌原体(MLOS)诱致的病害。不久以后,Goheen等(1973)证明所谓葡萄皮尔斯氏病也不是病毒病,而是一种极细的在细胞内生活的类似立克次氏体(Rickettsia)的病原物(RLOS)所诱致。目前这两种病原物,也归属在细菌病害中加以研究。

就在这同时,另一类病原物称作类病毒(Viroid)的也已证实了(Diener 1972)。这类病原物只含有分子量极小的 RNA,但也能在植物细胞中增殖而诱致病害,例如马铃薯的纺锤块茎病。

七、裸子植物及低等植物病毒的研究

六十年代以前，植物病毒工作者很少对裸子植物及菌藻植物病毒加以研究。不过很早就研究了原核生物病毒，如细菌噬菌体（Bacteriophage）之类，而且据此对 DNA 病毒的侵染及复制机制等作出了巨大的贡献。由于细菌噬菌体的研究内容浩繁，已不能归入本书，因此，这里不予论述。

关于裸子植物，过去认为很少有病毒能侵染它们。自 60 年代初起，已经认识有一些病毒如南芥菜花叶病毒、烟草环斑病毒及番茄黑环病毒等可以侵染松柏之类的植物。此外也发现 TMV 及其他病毒可以侵染蕨类植物（周本瑾，1972；Hull, 1968）。对真菌病毒的研究，虽然 50 年代已经开始，但以 60 年代以后发展较快，其中高等担子菌的病毒的研究，可以 Holling 及 Gandy (1962) 为代表。子囊菌的病毒的研究，以 Lapierre 等 (1970) 为肇端，研究藻菌病毒的有 Schnepf 等 (1970)。此外研究青霉和曲霉病毒的有 Holling, Banks, Bozarth 等 (1969—1971)。

八、小 结

植物病毒学的发展过程，至今已历 90 余年，人们对这类病原物从一无所知到比较深入的了解其本质及其活动能力，不能不感到现代科学技术的发展对病毒学研究的帮助，但是这门学科正在壮年时代，其未发现的领域尚多，不论从农业生产、医学临床以及生命科学上都有广阔的园地。现将过去 90 年发展的大事记简述如下：

年 份	(国籍)人名	记 事
1892	(俄) Ivanowski	证实 TMV 的过滤性
1898	(荷兰) Beijerinck	称 TMV 为传染活液
1926	(美) Kunkel	证实昆虫介体的存在
1929	(美) Purdy	证实病毒的抗原性并提出可能是蛋白或多糖类物质
1929	(美) McKinney	提出病毒侵染的系统性
1929	(美) Holmes	指出 TMV 的局部侵染枯斑寄主
1931	荷籍汤清香 (T. H. Thung, 华裔)	病毒株系之间的交互保护作用的证实
1933	(日本) 福士贞吉	水稻矮缩病毒的经卵传染
1933	(美) Takahashi 及 Rawlings	利用流动复屈折性推断 TMV 为直杆状
1935	(美) Stanley	TMV 的结晶提出病毒为一种蛋白
1937	(英) Bawden 及 Pirie	证明 TMV 除含蛋白外尚含有 5% 的 RNA
1939	(德) Kausche	病毒最初使用电子显微镜显象成功
1949	(英) Markham 及 Smith	TYMV 具有实心及空心两种粒体的发现
1951	(美) Commoner	发现硫尿嘧啶之能抑制 TMV 的增殖
1955	(美) Fraenkel-Conrat	病毒的再组合
1956	(德) Gierer 及 Schramm	RNA 的侵染性
1959	(英) Harrison 及 Nixon	TRV 的多分体性
1962	(美) Grace	利用昆虫单层细胞研究病毒
1967	(日) 土居养二	类菌原体病原物的发现
1968	(美) Shepherd	发现花椰菜花叶病毒的核酸为 DNA
1968	(日) 建部 (Takebe, I) 等	利用原生质体研究病毒
1971	(美) Diener	发现类病毒病原物

参 考 文 献

- [1] 平井笃造、高桥壮、四方英四郎、都丸敬一, 1978. 植物ウイルス学. 东京养贤堂.
- [2] 裘维蕃, 1980. 我国植物病毒及病毒病研究卅年. 植物病理学报 **10** (1): 1—14.
- [3] 裘维蕃, 1984. 植物病毒学(修订版). 农业出版社.
- [4] 高尚荫, 1982. 三十年来的中国病毒学研究. 病毒学集刊 **1**(1): 1—26.
- [5] Chiu, W. F. (裘维蕃); Chang, Y. H. (章一华), 1982. Advances of science of plant protection in the Peoples Republic of China *Ann. Rev. Phytopathol.* **20**: 71—92.
- [6] Bawden, F. C.; Pirie, N. W., 1937. The isolation and some properties of liquid crystalline substances from solanaceous plants infected with three strains of tobacco mosaic virus. *Proc. Roy. Soc.* **1** London B **123**: 274—320.
- [7] Bawden, F. C., 1950. Plant viruses and virus diseases. 3rd. Ed. Waltham. Mas. USA.
- [8] Bos, L., 1970. Symptoms of virus diseases in plant with indexes of names of symptoms in English etc. 2nd. Ed. Pudoc, Wageningen.
- [9] Bos, L., 1976. Problems and prospects in plant virus identification *EPPO Bull.* **6**(2): 63—89.
- [10] Carter, W., 1973. Insects in relation to plant diseases 2nd Ed. John Wiley and Sons N. Y.
- [11] Diener, T. O., 1974. Viroids: The smallest known agents of infectious disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **28**: 23—39.
- [12] Doi, Y. et al., 1967. "Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witch's broom, aster yellows or Paulownia witch's broom" *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **33**: 259—266.
- [13] Fraenkel-Conrat, H., 1968. Molecular basis of virology. Reinhold, N. Y.
- [14] Gibbs, A. J., 1969. Plant Virus Classification *Adv. Virus Res.* **14**: 263—328.
- [15] Gibbs, A. and Harrison, B., 1976. Plant Virology, The principles Edward Arnold.
- [16] Holmes, F. O., 1928. Accuracy in quantitative work with tobacco mosaic virus *Bot. Gaz.* **86**: 66—81.
- [17] Hollings, M., 1978. Mycoviruses: viruses that infect fungi. *Adv. Virus. Res.* **22**: 2—54.
- [18] Johnson, J., 1927. The classification of plant viruses. *Agri. Exp. Sta. Univ. Wisc. Res. Bull.* **76**: 1—16.
- [19] Kado, C. I. and Agrawal, H. O., 1972. Principles and Techniques in Plant Virology. Reinhold Co.
- [20] Klinkowski, M., 1967. Pflanzliche Viologie Bd. I Einführung in die allgemein Probleme. Akad. Berlin
- [21] Kurstak. E. (Ed.), 1981. Handbook of plant virus infection, Comparative diagnosis Elsevier N. Y.
- [22] Markham, K., 1977. Land marks in plant viology. *Ann. Rev. Phytopathol.* **15**: 17—39.
- [23] Matthews. R. E. F., 1979. Plant Vitology 2nd. Ed. Acad. Press N. Y.
- [24] Matthews, R. E. F., 1979. Classification and Nomenclature of Viruses. 3rd. Rept. ICTV Int. Assoc. Microb. Soc.
- [25] Reed, H. S., 1942. A Short History of Plant Sciences. Waltham, Mass. USA.
- [26] Stanley, W. M., 1937 Crystalline tobacco mosaic virus protein. *Amer. J. Bot.* **24**: 59—68.
- [27] Thung, T. H. (汤清香), 1931. Smetstof en plantencel bij enkele virusziekten van de Tabakspiant *Handel Ned. Ind. Natuurwetensch. Congr.* **1931**: 450—463.

(裘维蕃 北京农业大学)

第二章 植物病毒的侵染及免疫

一、植物病毒的侵染

- (一) 植物病毒侵染的特点
 - 1 寄主细胞和病毒结构与侵染过程的关系
 - 2 植物病毒在叶片上的侵染过程
- (二) 研究植物病毒侵染用的实验体系
 - 1 原生质体方法的建立
 - 2 悬浮细胞方法
- (三) 植物病毒对细胞的感染及其一步生长曲线
 - 1 病毒的吸附、侵入和脱衣壳
 - 2 植物病毒的一步增殖实验
- (四) 植物病毒在细胞内的增殖
 - 1 TMV 在原生质体内的增殖
 - 2 分体基因组病毒在原生质体内的增殖
 - 3 DNA 植物病毒在原生质体内的增殖
- (五) 原生质体与病毒的寄主专化性

二、植物病毒的免疫

- (一) 免疫性在病毒防治上的重要性
- (二) 植物对病毒免疫性的类型
 - 1 获得免疫性
 - 2 先天性免疫
- (三) 病毒株系间的干扰作用及其利用
 - 1 病毒株系间的干扰作用
 - 2 弱毒株保护作用的利用
- (四) 非专化性免疫
 - 1 抗病毒因子 (AVF) 的提纯和性质
 - 2 b 蛋白与获得免疫性
- (五) 植物对病毒的抗病性
 - 1 抗病性的类型
 - 2 抗病性与病毒株系
- (六) 个体发育中形成的抗病性
 - 1 体细胞抗病性
 - 2 生理抗病性

参考文献

植物病毒的侵染

(一) 植物病毒侵染的特点

1. 寄主细胞和病毒结构与侵染过程的关系 病毒要进入细胞必须通过寄主细胞的表层结构。动物细胞的表面为细胞膜所覆盖,它是由按一定排列的蛋白、类脂与碳水化合物所构成,其表面有许多突起。细胞膜上存在着病毒的受体,例如脊髓灰白质炎病毒的受体是一种脂蛋白,而流感病毒的受体是糖蛋白。可见,不同病毒的受体是不同的。一些动物病毒还具有专门的吸附器,例如腺病毒表面的五邻体纤维和有膜病毒的钉状突起。寄主细胞的受体与病毒颗粒或其吸附器产生特异性的吸附是病毒侵染的第一步。被吸附的病毒可通过两种方式进入细胞:一是借助细胞的胞饮作用,将整个病毒颗粒吞入细胞内。另一方式是病毒直接穿过细胞膜,其机理尚不清楚。有些病毒在吸附和侵入过程中就开始脱去蛋白外壳,而大多数无膜病毒的外壳是被吞噬胞内的溶酶体所消化,有的病毒还能自己编码合成脱壳酶。

植物病毒、真菌病毒和噬菌体是侵染有细胞壁生物的病毒。坚硬的壁成为病毒侵染的一大障碍。对噬菌体的侵染过程已有较完整的了解。它具有主动侵染细胞的能力。大肠杆菌 T 系噬菌体的尾丝可作为吸附器,吸附到细菌细胞壁的特定受体上,不同噬菌体具有不同的受体。例如大肠杆菌噬菌体 T3、T4 和 T7 的受体位于细胞壁中层的脂多糖上,而 T2 和 T6 的受体则位于细胞壁外层的脂蛋白上。被吸附的病毒颗粒通过尾鞘蛋白的收缩,使尾管进入细胞内;尾丝因吸附作用,而使基板受到构形变化的刺激,致使尾鞘收缩成

原来长度的一半。收缩包含 144 个蛋白亚基的置换。尾鞘蛋白的收缩类似于肌肉蛋白收缩(包括有 ATP 的作用),将噬菌体的 DNA 注入细胞内,虽然病毒的蛋白外壳留在细胞外,但一些内部蛋白可能与核酸一起注入细胞内。

植物病毒大都结构简单没有吸附器,也没有消化细胞壁的酶系,故不能主动侵入细胞。由纤维素和半纤维素组成的细胞壁所包被的植物细胞,也不能像动物细胞那样把病毒吞入。在自然界植物病毒是通过伤口或借助介体进入细胞内的(田波,邱并生,1979)。

2. 植物病毒在叶片上的侵染过程 在噬菌体和动物病毒研究中确立的侵染过程——吸附、侵入、脱壳、复制和装配——是否适用于植物病毒。这方面的实验多用叶片接种方法进行。将病毒接种物小心地喷在叶面上,如果叶细胞未受任何伤害,则不会发生感染。虽然有人认为,胞外连丝可能是病毒进入细胞的通道,但至今未提出可靠的证据。根据现有资料,可以认为植物病毒的侵入是通过伤口,被动的进入细胞内。吸附也许发生在侵入细胞之后,在某种细胞器上建立侵染立足点。

植物病毒侵染过程中是否有脱壳阶段呢!下述实验提供了间接证据(Gibbs, Harrison, 1976)。

(1) 完整病毒和其 RNA 的接种实验:用 TMV 和烟坏死病毒的完整病毒及其 RNA 分别接种心叶烟和菜豆。结果用 RNA 接种的叶片内测出病毒产生和出现病状的时间缩短了 2—4 小时。这种缩短可能是病毒脱去衣壳所需的时间。

(2) 紫外线钝化实验:病毒和其核酸都可被紫外线钝化,但病毒在细胞内繁殖后变得不敏感。用病毒 RNA 接种后,立即变得对紫外线照射有抵抗力,而用完整病毒接种的须经 3 小时后才变得不敏感。这 3 小时可能是病毒粒体脱去蛋白外壳的时间。

(3) 光活化实验:将提纯的马铃薯病毒 x 用紫外线照射后接种心叶烟,分别放在光照和黑暗条件下。结果光照可以使紫外线钝化的病毒部分的恢复侵染性,称为光活化。但光活化作用只在接种后 2—5 小时后发生,可能脱去蛋白外壳的病毒 RNA 方可被活化。

曾企图获得植物病毒脱壳的直接证据。以 ^{32}P -TMV 接种烟叶。接种后不同时间取样测定对核糖核酸酶敏感的游离 RNA 的数量:零时占 1%;3 小时增至 2.5%;6 小时占 5%,此后达平衡。但实验未能确定对核糖核酸酶敏感的 RNA 分子的大小。因此不能证明这些 RNA 就是脱壳的完整病毒 RNA 分子。还曾用非标记的 RNA 和 ^{14}C -标记的蛋白重组的 TMV 接种烟叶。避免了标记的 RNA 降解产物的干扰。接种后 10 分钟,在叶片提取液中约有 25% 的病毒蛋白,在蔗糖梯级密度离心中处于与病毒分开的上层;接种后 5—9 小时病毒蛋白量仍在增加。感染初期,这种外壳蛋白的释放不受低温和酶抑制剂的影响。可见这一过程似乎不依赖于已存在的或诱导的酶的作用。但是,在上述接种实验中,只有 0.01% 的接种物成功地引起侵染,可能所研究的 RNA 和蛋白主要是未从叶面上洗去的多余接种物。因此,尚难得出存在脱壳过程的结论。在电镜下直接观察脱壳过程的企图未获成功。最近,根据注射 ^{125}I -标记的 TMV 和 TRV 到叶片中去的实验,观察到杆状病毒颗粒的一端立于细胞壁上,接触细胞的一端发生形态变化,呈漏斗状,因此认为植物病毒的脱壳是病毒与细胞壁相互作用的结果(Gaard 和 DeZoeten, 1980)。

(二) 研究植物病毒侵染用的实验体系

以 TMV 为代表的植物病毒,由于其组成和结构都比较简单,而且较易获得大量提纯的样品,因此关于病毒本身的理化性质,已作了详尽的研究,许多研究结果对整个病毒学有很大推动作用。但是关于病毒侵染和增殖机制的研究却远远落后于噬菌体和动物病毒。主要原因是:由于没有在细胞水平上对侵染和增殖过程,随着时间的推移,作定量分析的实验体系。用叶片或植株来接种病毒时,最初受感染的细胞只占细胞总数的 1% 左右,使侵染过程的研究极为困难。因为大量未受感染的细胞把侵染早期的反应冲淡了。病毒必须通过多次再侵染才能达到其余细胞。在这一过程中,大部分细胞实际上处于感染的不同阶段,难以对侵染过程进行定量测定。

为了获得同步感染的细胞实验体系,曾试探过许多途径。自从 White (1934) 以来,主要用愈伤组织细胞作了实验,但胼结组织中病毒的累积量只有叶组织的 1/30,没有真正获得可与动物病毒组织培养相比的实验体系。曾用果胶酶分离出烟叶肉的单细胞,虽能维持 TMV 的增殖,但其感染率极低(0.1% 左右),不能与噬菌体对细菌细胞的感染相比。直至本世纪六十年代末和七十年代初,才发现了同步感染率很高的原生质体体系。几乎在同时,也提出了改进胼结组织接种病毒的方法——悬浮细胞体系,也达到了很高的同步感染率。

1. 原生质体方法的建立 1966 年英国的 Cocking (1966) 用番茄果肉制备的原生质体成功地感染了 TMV,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(Cocking, 1969)。1968 年日本的建部等人系统的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,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和代谢产物的分离提取;已知浓度的原生质体悬浮液提供了高的原生质体。酶液里除渗透剂外还可加入葡聚糖硫酸钾(分子量 130,000),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的破坏作用,但并不是必需的。酶液的 pH 值对原生质体产量和活性影响很大,不同植物材料最适的 pH 值不同,例如烟叶以 5.6 为宜。

(1) 植物材料 要获得大量活性高的原生质体,应注意选择合适的植物材料。当用叶片薄壁组织作材料时,植株的生长条件,叶片的年龄和生理状态都很重要。烟叶以苗龄 60—80 天的顶叶以下第 4—6 片充分展开的叶片为宜。原生质体产量往往受季节的影响。冬季叶片生长脆弱,原生质体容易破碎,产量低。在人工控制条件下,烟 12 小时生长在温度 25℃,光照 10,800 勒克司和 12 小时 20℃ 黑暗条件下,所分离的原生质体最适于作病毒接种之用。

(2) 原生质体分离方法:目前所用的原生质体的酶法分离可分为两步法和一步法两种。

两步法:建部分离烟原生质的两步法是,撕去叶片的下表皮,剪成 4 厘米² 可定量吸取的均一实验材料,以便易于控制实验条件。它把复杂的多细胞体系,简化为单细胞与病毒分子的简单体系。这是从细胞水平上研究植物病毒的好材料。

① 原生质体的分离和培养：由于植物原生质体酶法分离技术的发展，现在可由各种植物的各种器官和组织分离原生质体。用于植物病毒研究的原生质体大部分还是由叶肉细胞制备的。

a. 分离原生质体用的酶液：降解细胞壁常用的酶是纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶。不同材料其细胞壁的成分和结构不一样，因此要求不同的酶组合。粗制纤维素酶实际上是这三种酶的混合物。酶液内须加入渗透稳定剂以维持渗透压的平衡。常用的有糖溶液系统和盐溶液系统。糖中甘露醇、山梨醇、蔗糖和葡萄糖等均可，其优点是分离的原生质体能再生细胞壁，其缺点是糖有抑制多糖水解酶的作用。盐溶液多用 2.5% KCl 加 1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，其优点是可从不同年龄、不同生理状态的植物分离到活性的小块，加入用 0.8M 甘露醇配制的含 0.5% 转化酶（即果胶酶）和 0.3% 葡聚糖硫酸钾（pH5.8）的酶液（每克叶片用 10 毫升酶液），抽真空 3 分钟，然后在 25℃ 水浴中振荡（120 转/分）15 分钟，弃去破碎细胞。再加入新酶液分离出完整的细胞。1 克鲜重叶片可得到 1×10^7 个栅栏细胞，所得细胞以 0.8M 甘露醇（含 0.1 mM $CaCl_2$ ）洗几次。加入 0.8M 甘露醇配制的 2% 纤维素酶（pH 5.4），在 36℃ 下保温 2—3 小时，每克叶片可获得适于病毒接种用的原生质体 5×10^6 个（Takebe 1968）。

一步法：也称混合酶法。以我们分离烟原生质体的方法为例。叶片用水淋洗，在 70% 酒精中浸泡 30 分钟，萎蔫后用镊子撕去下表皮。把去皮的叶面往下浸在 0.5—0.7% 纤维素酶（上海东风试剂厂产，溶于 0.6M 甘露醇中，pH 5.4）液中，在 25℃ 温箱内保温 2—3 小时，分离的原生质体经双层尼龙纱（80 目）过滤，除去大的碎片，35×g 离心 3 分钟，除去酶液和小碎片。原生质体用 0.6M 甘露醇液洗 3 次。最后把沉降的原生质体悬浮在 0.6 M 甘露醇中（图 2-2a）（邱并生等，1982；Kassanis, 1974）。

净化原生质体的方法：为了除去原生质体中的碎片，用 20% 左右的蔗糖或蔗糖加无机盐处理，离心后完整的原生质体飘浮起来。另一种方法是相分离，用葡聚糖和聚乙二醇制成可分相的混合液，把原生质体放在混合液中，高度净化的原生质体可在两相的界面上收集到（Kanai 和 Edwards, 1973）。

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均一，经常带有一定数量的小原生质体。这些小原生质体只含有一部分细胞内含物，活力较低，对病毒的敏感性和维持病毒增殖的能力都较差，在净化原生质体时应当除去。

b. 原生质体的培养：培养维持病毒增殖用的叶肉原生质体并不需要复杂的培养基，因为原生质体仍能进行光合作用。接种了病毒的叶肉原生质体都培养在建部用的培养液中，其成分列入表 2-1。其中除含有植物必需的几种无机盐外，还含有生长素 2, 4-D 或苄基腺嘌呤。在上述培养基中原生质体不能再生细胞壁和进行分裂。但能维持病毒增殖数天。头孢霉素和龟裂杀菌素用于抑制细菌和真菌的生长。原生质体被杂菌污染是培养中常遇到的问题，尽管采取较严格的无菌操作，仍需加入抗生素以控制污染。但许多抗生素对病毒增殖也有抑制作用。实验证明其他霉素、羧苯基青霉素和制霉菌素不影响病毒的增殖。培养基中的甘露醇是作为渗透稳定剂，它不是可代谢的碳源。

接种了病毒的原生质体应培养在光照条件下，一般用 2,000—3,000 勒克司的连续光照。病毒的产量在光照下比黑暗中为高。培养温度因病毒而异，TMV 感染的烟叶肉原

表 2-1 培养接种病毒的原生质体的常用培养基

KH ₂ PO ₄	0.2mM	2,4-D	1 微克/毫升
KNO ₃	1 mM	或苄基腺嘌呤	
MgSO ₄	1 mM	甘露醇	0.7M
CaCl ₂	10 μM	头孢霉素	300微克/毫升
CuSO ₄	0.01μM	龟裂杀菌素	10 微克/毫升
KI	1μM	pH	5.4

表 2-2 接种到叶肉原生质体中去的植物病毒

病 毒	植 物	对聚鸟氨酸的需要	侵染%	文 献
烟花叶病毒	烟	E*	90	Otsuki et. al., 1972
	番茄	E	80	Motoyoshi et. al., 1975
	矮牵牛	E	47	Hibi (个人通讯)
	豇豆	S**	57	Koike 等, 1976
	白菜	E	91	Otsuki 等(未发表)
	大麦	E	—	Hibi (个人通讯)
黄瓜绿色斑驳花叶病毒	烟	E	65	Sugimura 等, 1975
豇豆褪绿斑驳病毒	烟	E	65	Motoyoshi 等, 1973
雀麦花叶病毒 V ₁	烟	S	77	Motoyoshi 等, 1974
雀麦花叶病毒	大麦	S	30	Okuno 等, 1977
黄瓜花叶病毒	烟	E	90	Otsuki 等, 1973
	豇豆	S	95	Koike 等, 1977
豇豆花叶病毒	豇豆	S	96	Hibi 等, 1975
	烟	E	75	Huber 等, 1976
苜蓿花叶病毒	烟	E	35	Motoyoshi 等, 1975
	豇豆		6	Hibi (个人通讯)
豌豆耳突花叶病毒	烟	S	84	Motoyoshi 等, 1975
蚕豆萎凋病毒	蚕豆	E	40	Kagi 等, 1975
烟环斑病毒	烟	E	98	Kubo 等, 1975
马铃薯病毒 X	烟	E	70	Otsuki 等, 1974
油菜花叶病毒 15	烟	S	45	科学院微生物所病毒组, 1977
马铃薯病毒 Y	烟	E	—	Gofinot 等, 1974
大麦条纹花叶病毒	大麦	E	71	邱并生, 田波, 1981
芜菁黄花叶病毒	白菜	E	90	Renaudin 等, 1975
花椰菜花叶病毒	芜菁	E	—	Howell 等, 1978
芜菁丛簇病毒	芜菁	E	—	Brest, 1979
烟坏死病毒	烟	E		Wieringabrants, 1978
烟坏死矮化病毒	烟	E	70—80	Kubo 等, 1979
黄瓜白果类病毒	番茄	E	—	Mühlbach, 1977

* E 无聚鸟氨酸时感染率低于 1%。

** S 无聚鸟氨酸时有相当感染率,但加入时有刺激作用。

生质体内病毒的增殖, 28℃ 比 22℃ 快。

② 原生质体的接种: 脱去细胞壁的植物原生质体与动物细胞相似, 它被病毒侵染的方式也有相似之处。

a. 病毒颗粒接种: 用病毒颗粒接种原生质体的方法有两种。一是聚鸟氨酸接种法; 二是高等电点病毒接种法。