我国第一例双联病毒

——烟草曲叶病病毒的分离及电镜检定

龚祖埙 沈菊英 郑巧兮 陈作义 曹天钦
（中国科学院上海生物化学研究所）
陈瑞泰 韩晓东 张文丽
（中国农业科学院烟草研究所，山东）

双联病毒是一种由两个小球状病毒质粒以成对形式存在，从而与已知的其他病毒的形态有异．它的基因不是一般的植物病毒的单链或双链 RNA，也不是某些植物病毒的双链 DNA，这是迄今为止所发现的唯一的携带单链 DNA 基因的植物病毒组． 从最初报道甜菜卷顶病毒及玉米条斑病毒至今不到十年时间[1,2]，在南美、非洲、地中海地区，北欧和日本陆续发现十余种双联病毒，1978 年病毒分类学国际委员会列为一个独立的病毒组[3]． 我国还没有发现过双联病毒．

烟草曲叶病在我国云南、福建、广东、辽宁、吉林、黑龙江及台湾等省烟区都有发生．其中以云南、福建、广东及台湾发生较为普遍．这一病害是我国广大烟区的潜在威胁．我们对烟草曲叶病进行了病原的分离纯化及电子显微镜的研究，初步肯定我国烟草曲叶病是由双联病毒引起，从而填补了我国在植物病毒研究中的重要空白．

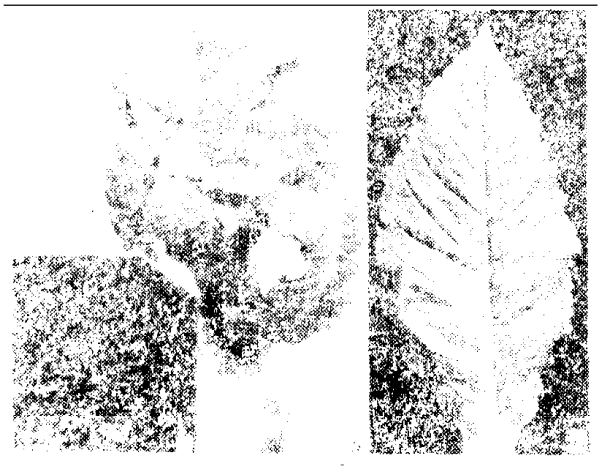


图 1

A．烟草曲叶病病株； B．烟草健叶对照； C．用浸出法制样，看到的双联病毒质粒（箭头所示）

1. 烟草曲叶病的典型症状 苗期即可发病．大田初期发病，病株严重矮化，病株最显著的症状是叶片皱缩，叶面凹凸不平，叶色变成深绿，叶缘向背面卷曲，叶片僵化变脆，叶脉呈黑色，叶背面常形成耳状突起，是本病的主要特征之一． 主茎及杈芽常呈弯曲状，重者卷叶、畸形，枝叶丛生．蒴果及萼片皱缩，种子干瘪不实．烟草卷叶病的病叶及健叶对照见图 1 A、B．

2. 烟草曲叶病病毒的分离纯化及电镜观察 取典型症状的病叶 50 克，加入三倍体积的磷酸缓冲液 （0.1 *M*， pH 7.2， 10m *M* EDTA，0.5％ 巯基乙酸），捣碎，尼龙纱布过滤，滤渣又经二次捣碎，每次加入上述缓冲液 50

本文 1982 年 3 月 30 日收到．

ml，合并滤液，离心 15000 转/分 15 分钟，上清加入 4% 聚乙二醇和 0.2 *M* 氯化钠，冰浴搅拌 2 小时后再离心 11000 转/分 20 分钟. 沉淀悬浮于上述稀释 10 倍的磷酸缓冲液，按体积加入 1% 的 Triton X-100，再经 15000 转/分离心 15 分钟，所得上清加于 1 毫升的 10% 蔗糖磷酸缓冲液衬垫之上，67500 转/分离心 1 小时，获得沉淀再经 10—40% 连续蔗糖密度梯度离心，25000 转/分离心 150 分钟，从底部取样，每 1.5 毫升为一部分，共分 8 个部分，再经一次差速离心，沉淀悬浮后分别在电镜中进行观察. 样品用 1% 醋酸铀负染，负染前部分样品曾用 1% 戊二醛进行预固定.

另取新鲜病叶，用浸出法制备电镜观察样品.

3. 电子显微镜超薄切片的研究　取新鲜病叶，分叶肉及主脉二部分，用常规方法进行 2.5% 戊二醛预固定，1% 锇酸固定，脱水，Epon 812 包埋，LKB-4800 I 型超薄切片机切片. 切片用醋酸铀及柠檬酸铅染色.

4. 结果与讨论　经密度梯度分离纯化的病叶制剂，在从底部数起的第 6、第 7、特别是第 8 部分，在电镜下可以观察到 18 × 30 毫微米的双联病毒质粒，有时相当密集（图 2），紫外吸收曲线显示典型的病毒吸收峰（图 3），在健康对照中未见双联病毒质粒. 用新鲜病叶进行浸出法制样时，有时也能看到典型的双联病毒质粒(图 1C).

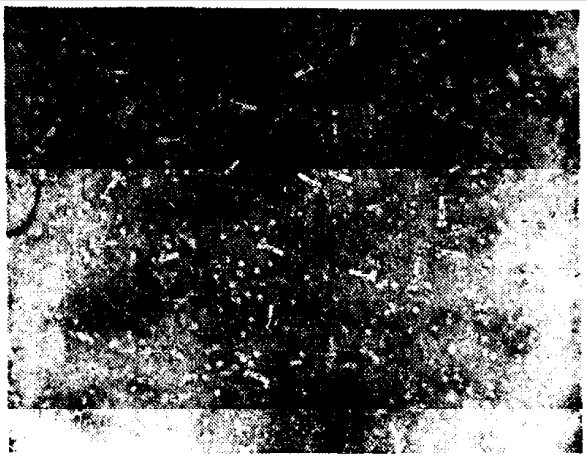


图 2　部分提纯的烟草曲叶病双联病毒（箭头所示）62400×

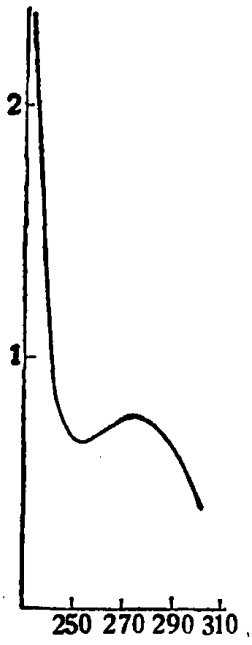


图 3　烟草曲叶病毒部分提纯制剂的紫外吸收曲线

在病叶叶脉的超薄切片中可以见到在韧皮部未成熟筛管细胞的细胞核内存在有大量的双联病毒质粒. 质粒以双联病毒特有的铁轨式形态整齐排列（图 4，5），宽度为 30 毫微米左右. 同时可以看到细胞核的严重病变，细胞核的外缘极不整齐，呈波浪式起伏，凹陷处可达细胞核深度的 2/3. 细胞质内并出现空泡. 关于患病组织及细胞的显微结构的变化我们将另文详细报道.

最早，Sharp[4] 等认为烟草曲叶病的病原是一种直径为 39 毫微米的球状质粒，后来桐山[5]等从烟草曲叶病材料分离到一种直径为 30 毫微米的球状病毒，并且制备了抗血清. 1976 年 Atsushi[6] 等报道，在由烟草曲叶病毒嫁接感染的蕃茄病株筛管细胞中，可以看到直径约 23—26 毫微米的单个散乱于细胞质的病毒质粒. 在一段时间内，烟草曲叶病病毒一直被认为



图 4

患病植株韧皮部筛管细胞中可看到大量双联病毒的积聚V病毒质粒，No. 核仁，CW. 细胞壁. 13200×

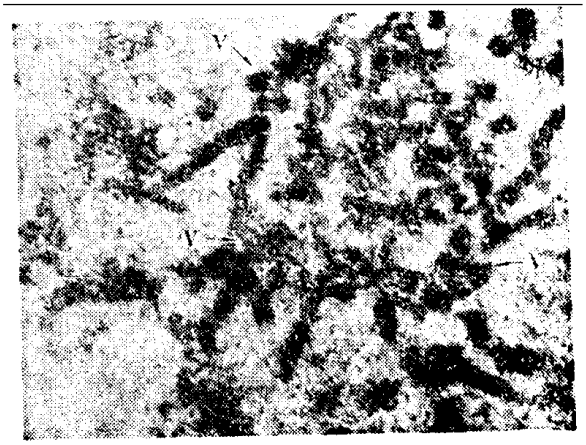


图 5

图 4 的局部放大，双联病毒成“棒”形或“铁轨形”整齐排列. 成对质粒清晰可辨（箭头所示）. 32000×

是一种球状粒子. 1978 年 Osaki[7] 等发现烟草曲叶病病毒为双联病毒，而且还可以引起蕃茄黄矮病和忍冬的黄脉花叶病. 我们的工作不仅证实烟草曲叶病病株内有双联病毒一类的病原物，而且在我国第一次找到了双联病毒.

应该指出，从已报道的双联病毒的分离提纯及电镜观察的研究来看，绝大多数工作显示的双联病毒质粒为数均不多. 双联病毒比较娇嫩，经过一系列的分离纯化过程，两个质粒很易断离. Osaki 报道，双联的质粒与单个质粒之比约 3:1. 我们的病毒制剂除部分视野外，单个质粒的数量要大于成对的双联病毒，重金属离子也容易引起双联病毒的分离. 所以电镜样品在进行负染前，一般均用戊二醛进行预固定.

我们对烟草曲叶病病毒的进一步提纯分离，细胞学及分子生物学的研究正在进行之中.

致谢：福建省龙岩地区烟草研究所张玉珍同志和云南省农业科学院烤烟研究所杨铭同志，协助在福建、云南两省调查和采集标本，特此致谢.

参 考 文 献

[1] Duffus, J. E. & Glod, A. H., *Phytopath.*, **63**(1976), 1107—1110.
[2] Bock, J., Guthrie. E. J. & Woods, R. D., *Annals of Applied Biol.*, **77**(1974), 289—296.
[3] Matthews, R. E. F., *Intervirology*, **12**(1979). 129—296.
[4] Sharp, D. G. & Wolf, F. A., *Phytopath.*, **41**(1951). 94—98.
[5] 桐山清，*Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **38**(1972), 323—372.
[6] 山内淳司、井本征史、日比忠明、小室康雄， *Ann. Phytopath Soc. Japan.*, **42**(1976), 424—430.
[7] Osaki, T. & Inouye, T. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **44**(1978), 167—178.