

怎样识别植物病毒病

史春霖

(中国科学院微生物研究所,北京)

植物病毒病害是一类很重要的农作物病害。农作物得了病毒病后,产量降低,质量下降,给农业生产带来巨大损失。

我国马铃薯产区,经常遭受病毒性退化病的危害。例如,长城以南的发病率为85—90%,减产50—70%。葫芦科和茄科植物的病毒病,在我国也普遍存在,危害不小。

近年来,在我国发生的重要植物病毒病害,是禾谷类作物病毒病。其中,麦类病毒病主要有小麦黄矮病,小麦从矮病,土传小麦花叶病等。小麦黄矮病在1970年,流行范围已扩大到16个省市;小麦从矮病近年来在北方也普遍发生,危害甚重;土传小麦花叶病,发病面积也逐年扩大,病区小麦减产10—70%。玉米矮花叶病毒病在一定程度上也影响了玉米的产量。

我国是一个以农业为基础的国家。随着全党动员,大办农业,普及大寨县的伟大运动深入发展,农作物病毒和病毒病害的研究工作,便具有更重要的意义。

作物的病毒病害和其他病害的区别

一、病毒病是一种传染性病害

病害有许多不同的病原,根据病原是否可以传染健株和引起植株生理异常,可将病害分为两个截然不同的类型,即传染病和非传染病。在田间,往往把某种特定的病害认为是由病毒引起的,其实,很多生理病也与病毒所致症状相似。所以不掌握病毒病害侵染性的本质,要区分病毒病害和生理病害是不可能的。病毒病害一个最主要的特点是:病毒能够从染病植株中分离出来,将分离出的病毒再回接到原来的毒源植物上又发生原来的症状,还可以从染病植株中再分离出来,作一系列无穷止的传染。

二、病毒的可过滤性

病毒的体积比其他寄生物的病原体小。所以许多病毒能够通过微孔小到细菌不能通过的滤器,假如通过这种滤器的汁液有侵染力,一般便认为是存在着病毒。利用这个标准,可排除真菌和细菌的可能性。

三、弄清病毒和枝原体的区别

过去往往把枝原体所致的植物病害,误认为是病

毒引起的。近年来,随着超薄切片技术的发展,越来越明确了某些植物病害,实际上是由枝原体所致。目前已知有40多种植物病害是由枝原体造成的,如桑树萎缩病、玉米矮化病等。为了搞清病原,要求我们把病毒和枝原体区分开。它们的主要区别如下表。

病毒与枝原体的区别

| 微生物 | 体外人工培养 | 同时有RNA及DNA | 有自己的核糖体 | 对抗菌素敏感性 | 对于抗生素敏感 |
|-----|--------|------------|---------|---------|---------|
| 病毒 | - | - | - | - | + |
| 枝原体 | + | + | + | + | - |

怎样知道是哪种病毒

了解某种作物的病害确是由病毒引起以后,还必须搞清楚是哪种病毒引起的。为此,必须完成一项基础的工作,这就是植物病毒的鉴定。

鉴定是比较病毒学的一个特殊形式。测定“未知”病毒的特性并与别的病毒的已知特性作比较,从而确定“未知”病毒的归属。

植物病毒的鉴定,所采用的方法包括生物学、血清学、物理化学诸方面。

一、症状和寄主范围

在已经确定侵染性的基础上,要进一步认识症状。依靠症状来诊断鉴定,有一定的参考价值,但也有其复杂性。许多种病毒在同一植物上往往引起不同的症状。如果这种症状比较明确而稳定,这种寄主植物就可作为鉴别寄主。所谓复杂性就是,有些不同的病毒往往在同一种寄主上产生相同的症状,例如烟草花叶病毒和黄瓜花叶病毒在普通烟草上产生极相似的花叶症状,感病初期不易识别。

在植物病毒鉴定中,利用得较多的一种方式,是病毒在不同寄主上表现不同症状的特性。例如白菜孤丁一号(芜菁花叶病毒)在普通烟草上表现局部性枯斑,在心叶烟叶片上却表现为系统性的花叶,而花椰菜病毒则根本不能侵染上述两种烟草。

另外,还有所谓复合症。复合症是由两种以上的病毒侵染后共同发生的症状。因此,应当记住,“未知”病毒实际上可能是病毒的混合物。根据存在两种或数

种明显不同类型的症状或两种或数种类型的内含体,就表明可能存在一种以上的病毒。这时,应接种不同的寄主,接种后2—3周内,由各种寄主植物的接种叶和未接种的叶取样,回接原来的寄主植物。假如回接后,不产生原来的症状,就证明是复合侵染。因此,可用几种方法或几种方法并用来进行分离。因为单一方法仅对从混合物中分离出一种病毒或甩掉一种病毒有效,只有使用几种不同的方法才能使病毒彼此分开。

接种很多不同的测定植物,然后回接原来的寄主可能是简便有效的分离方法。一种寄主植物可能对一种病毒敏感,而对别的病毒可能是免疫的,或一种病毒在特定的寄主上可能引起系统性侵染,而别的病毒则可能局限于接种叶。

用不同的传播方法也能将病毒分离出来。

用高度稀释的汁液机械接种可以从混合物中分离出一种病毒。当一种病毒的稀释终点比别的病毒高很多时,这种方法特别有用。

混合物中病毒稳定性可能不同,因此,在各种温度下,对汁液进行热处理,或在室温下放置不同时间,可从混合物中去除一种或一种以上的病毒。

用特异抗血清法可由混合物中分离出已知的病毒;利用孔径大小不同的滤膜,或借助密度-梯度柱的沉降作用,或借助电泳法也可进行分离。

不管用何种方法进行分离,分离后都应当回接原来的寄主植物。回接后,假如所致症状与原来不同,就说明混合物中失去了一种或一种以上的病毒。再回接,如仍产生不同的症状,可连续分离出各病毒。因此,应当将全部被分离出来的病毒重新组合起来,用此混合物接种原来的寄主植物,如产生原来的症状,就说明是原来的全部病毒。于是,可对分离出的各病毒作更详细的鉴定,以确定是什么病毒。

了解植物病毒的寄主范围,不但在生产上确定防治措施有重大意义,而且在鉴别病毒的种及株系的差异上,也有很大的价值。有的病毒寄主范围很狭,有的病毒寄主范围较广,如烟草花叶病毒和黄瓜花叶病毒。

研究植物病毒的寄主范围,对病毒鉴定有很大帮助。因为同一病毒的不同种及不同株系有它们自己不同的寄主范围及寄主反应。但有时不同种的病毒也可以在同一寄主上产生同样的症状及反应,这可借扩大寄主范围的方法来克服。

接过种的植株,必须定期检查并记录症状产生的顺序,某些病毒诱发病的顺序是特征性的,如许多环斑型病毒,先是局部侵染,症状限于接种叶→系统性发病→新叶产生退绿环→症状减轻或无症状。

在全部接种植物上产生清晰症状后,应当回接到原来作毒源的健株上,这样做不仅仅是证明测定植株的敏感性,又可用来核对混合物中各病毒的分离作用。

由于在寄主范围的研究中回收试验的重要性,所以应当改用良好的测定寄主或指示植物,即接种后产生易辨认证状的植物。在寄主范围的研究中应找出适用的指示植物。

二、体外抗性

单纯根据症状鉴定病毒有困难,还需采用其他特性,例如致死温度,稀释限点和体外保毒期。这些特性一般是用病株的粗汁液来测定,所以毒源植物一般是用首次发现病毒的植物,或用保存和繁殖病毒的植物。

一般说来,体外抗性的主要价值是,一个既定病毒的株系(无特异蛋白的变种除外),稳定性和在一种既定寄主植物内增殖或累积的能力是相同的。体外工作都是用粗汁液。

应当仔细地选择毒源材料。一般说来,所用毒源材料为呈现典型症状的幼株叶片。通常用接种后10—14天呈现清晰症状的系统性病叶;出于需要,也可用接种后7—10天的接种叶。在研钵中磨碎病叶,用纱布将汁液挤出,尽可能立刻使用。

汁液暴露后,由于氧化作用,会导致某些病毒很快失活,所以,应加入还原剂或氧化酶抑制剂来延迟病毒寿命,这样做对不稳定的病毒尤为重要。

(一) 致死温度

侵染性粗汁液加热时,病毒钝化的速度不仅取决于温度,还取决于病毒浓度、pH等。病毒完全钝化或部分钝化需要的时间,受同一变量的影响,所以时间通常规定为10分钟。10分钟内,未经处理的粗汁液中病毒完全钝化所需温度,称为致死温度。

在常规试验中,是将粗汁液吸入一支小的薄壁试管中,封口,将试管放进事先调至一定温度的恒温水浴中,10分钟后取出试管,立即用水冷却。然后,用处理过的汁液和未经处理的汁液磨擦接种测定植物,试验重复三次。

(二) 体外保毒期

在室温下,不同的病毒有不同的体外保毒期。通常是在室温下,用贮存在密闭器中未经处理的粗汁液作体外保毒期测定。间隔一定时间取样,并在合用的寄主植物上测侵染力。所间隔的时间应为几何级数(即1,2,4,8,16,32……天),直到丧失侵染力为止。

因为这种测定,其结果随若干因子而变化,如所用的拍提温度,毒源植物,测定方法的灵敏度和汁液污染微生物,所以汁液中应添加还原剂,过滤灭菌或添加防腐剂,以减少测定的误差。

(三) 稀释限点

病毒在一种既定寄主植物上增殖或累积的程度是

病毒及其大多数株系的一个特征。所以,简单的稀释度测定可作为鉴定病毒的另一指标。

稀释度通常为 $1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} \dots$ 。每一稀释度的汁液,用水稀释,应按数量相等的均一的测定植物。记录每一个稀释度有无侵染性。其表示方法是取上、下限侵染性稀释度。如某病毒的稀释限点为 $10^{-2}-10^{-4}$ 。

三、传播方式

病毒的传播方式,很大程度上取决于病毒的本质。传播特性,在鉴定许多不能机械传播,而借特异介体传播和迄今不能做血清测定的病毒时是很有用的。例如大麦黄矮病毒,仅根据症状、寄主范围、蚜虫能传毒和病毒-介体关系就能鉴定出来。

即使是机械传播的病毒,其中多数可为活介体传播。传播方式在鉴定中是有帮助的。

介体的鉴定,往往是许多介体传播的病毒(即无抗原性和体外很难鉴定的病毒)鉴定中的一个重要步骤。在发现病毒介体后,要研究病毒-介体关系,特别有价值的是研究病毒在介体内的持久性、潜育期、传毒能力和病毒能否在介体内增殖。

有的介体能传播很多病毒,例如绿桃蚜 (*Myzus persicae* Sulzer) 能传播 30 多种植物病毒。因此,证明“未知”病毒是借绿桃蚜传播的,对其鉴定来说,只是很小的一步。相反,已知番茄斑萎病毒是由蓟马 (*Thrips*) 传播的唯一病毒。因此,仅再做少量工作,就能确定蓟马传播的“未知”病毒是番茄斑萎病毒。

传播特性在鉴别同一病毒的不同株系时是有价值的。如大麦黄矮病毒有几个介体特异性株系,仅根据它们的特异性蚜虫介体就能鉴别这些株系。

另外,还有一类所谓土传病毒,这类病毒的介体实际上是真菌,也有的是线虫。如果发现“未知”病毒可以土传,这就可以缩小研究范围。如在麦类作物中发现土传病毒,经研究其介体是禾谷类多粘菌,再进一步研究其寄主范围和形态特征,“未知”病毒很可能就是土传小麦花叶病毒的一种。

四、与其它病毒的相互作用

设计这种实验的目的,主要是考查“未知”病毒和“已知”病毒有无亲缘关系。“未知”病毒与一特异病毒相互作用,有助于对“未知”病毒的鉴定。

(一) 交互保护反应

关于这个问题,这里仅介绍一个梗概,并指出交互保护反应在植物病毒鉴定中的作用。

一株被一病毒完全感染的植物,如再接种同一病毒便不再进一步受损害。因此,先感染的病毒对密切相关的病毒产生保护反应,所谓交互保护反应就是根

据这个原理。交互保护反应是病毒鉴定中较为重要的和广泛采用的手段。依据交互保护反应可测定两种病毒的亲缘关系。

凡是两个不同种的病毒株系,在同一寄主植物上,就会在原有症状的基础上,出现第二种病毒应有的症状,或出现一种新的症状;凡是同一种病毒的不同株系,第二个病毒不表现任何症状,不管先接或后接那一个株系都是如此。如大白菜僵叶病毒接在 CMV 已发病的普通烟及黄瓜上时,不产生僵叶病所特有的沿脉枯纹和圆环症状,但接在 TMV 的发病普通烟和健全普通烟上,则产生沿脉枯纹特征。这说明僵叶病毒是 CMV 的同种。TMV 接种在 CMV 和僵叶病毒发病的普通烟上都产生新的局部枯斑。

(二) 无亲缘关系病毒的同时侵染试验

这类试验是测定病毒分离物中无亲缘关系的依据。假定:同一病毒的株系需求相同,因此,混合侵染时,发生竞争现象,而不相关的病毒需求不同,彼此完全不相干。

做这类测定的程序极简单。一对既定的病毒——“未知”病毒和“已知”病毒在若干寄主植物上分别测定或同时测定,如混合物诱发的病害比单一病毒重,就可断定这两种病毒是不相关的。

不相关病毒混合物的联合效应,通常是协同作用。

五、血清学测定

血清学是植物病毒鉴定中最有用的方法之一。因为血清学方法特异性强,灵敏度高,测定迅速,所以血清学测定法在植物病毒鉴定工作中占有很重要的地位。

不同植物病毒所引致的抗血清是有专化性的;病毒相关株系所引致的抗血清和这些相关病毒都是可以相互起反应的。从而认为:根据病毒的血清反应关系,就可能将“未知”病毒归类。

抗血清的意义,就是带有抗体的血清。抗体是动物有机体在外来抗原刺激下产生的新蛋白质,主要存在于血清中。这种物质具有结合抗原的能力,这种结合的过程叫做血清反应。

一切能在动物有机体内诱致抗体的物质,都称做抗原。蛋白质和蛋白质分解后的高分子化合物以及多糖类物质,都具有抗原的特性。由于植物病毒的组成主要是蛋白质和核酸,其中蛋白质含量很高,大部分达 90%,病毒外壳就是由蛋白质组成的。因此,植物病毒具有抗原物质的作用,应用所得的抗血清或抗体,可测定“未知”病毒与“已知”病毒间的亲缘关系。我国从油菜上分离到的油菜花叶病毒 15 号 (YMV₁₅), 未经血清测定前,还认为是芜菁花叶病毒,因过去未报道过关于来自油菜上的 TMV, 但经血清学测定证明,油菜花

叶病毒 15 号 (YMV₁₅) 是 TMV 的一个株系。

六、病毒颗粒的形态

关于许多植物病毒侵染性颗粒的形态和化学组成了解得很少,但已被详细研究过的病毒提供的大量资料,在鉴定工作中是有很大价值的。在鉴定过程中,任何特征都可用,但是某些特征比别的特征更实用。最有用的是株系同株系差异很小或没有差异的那些特征,但在株系当中,差异是看得出的,例如同一种病毒的株系,大小和形态差异较小,而不同的病毒,大小和形态不同。当然,两种或数种病毒颗粒,大小和形态相同是有可能的,但这只是很例外的情况。所以,两种病毒颗粒大小、形态相似,表明它们是同一株系或相关株系;两种病毒的大小、形态差别明显,就表明它们是两种不同的病毒。

除了大小和形态,确定病毒相似性的别的特征是病毒颗粒的分子量和蛋白亚单位数。不过,除了能获得高度提纯的病毒而外,大多数病毒还不能测定这些特征,且这些测定需要特殊的设备。

(一) 物理特性

在电镜下,已确认了很多不同的植物病毒,颗粒形态似乎是一个既定病毒及其株系的一个相当稳定的特征。因而,电镜在病毒鉴定中是一重要工具。就棒状病毒而言,在鉴定初期,对病株粗提液进行检查,就能看到病毒颗粒(健株粗提液中则无),不必进行提纯或浓缩。

制备粗提液的方法很多,但最简单省事的是浸出法,即用针在病叶上扎几个洞,然后加几滴蒸馏水,浸渍 1—2 秒钟,直接制网,俟干燥后,立刻置电镜下观察。

粗提法仅适用于棒状或线状病毒。球状病毒不能用此法,因为植物汁液中含有球状的正常组分,其大小与病毒相近,故用电镜观察前,必须高度提纯。例如,过去认为芜菁花叶病毒类型的病毒形态是线状颗粒,但我国分离的 YMV₆, 根据寄主范围和反应、传染方

法及体外抗性把它归入 T_pMV, 然而多次电镜观察中见到的都是直径约为 380 Å 的球状颗粒,与文献报道的迥然不同。

利用沉降常数也可鉴定病毒。沉降常数是颗粒大小、形态和密度的函数。这种特性在各株系之间是不同的,就一既定病毒及其株系而言,通常是恒定的。利用分析超离心方法可测定沉降常数。

高度提纯的病毒也可用别的方法鉴定,如测等电点、分子量、扩散系数、X-射线衍射谱,对一既定病毒来说,这些特性是恒定的。

(二) 化学组成和结构

病毒中核酸的含量约为 5—35%,其中多数棒状病毒的核酸含量为 5—6%。核酸含量对一既定病毒及其所有株系而言是恒定的。分析核酸组成对病毒鉴定有帮助。

所有植物病毒蛋白质外壳都是由亚单位组成的,对一既定病毒及其株系而言,氨基酸残基数是恒定的。

小 结

植物病毒病与农业生产是密切相关的。为了防治植物病毒病,首先就要认识病毒和病毒病害,确定某种病害是由何种病毒引起,这就需要进行植物病毒的鉴定工作。

根据病毒的高度特异性,按照一系列特征,可很好的完成这一工作。因此,对在很多寄主植物上所导致症状的研究,可将“未知”病毒归入几大类群中,诸如,花叶、黄化、环斑、坏死等。进一步作寄主范围、传播方式和体外抗性实验,把“未知”病毒缩小到少数病毒范围内。此时,可作特异性测定,例如血清学测定或交互保护试验。如果已初步认为是某种病毒,再用电镜观察,同别的病毒相互作用,接种另外一些植物,证明是某种病毒。如希望鉴定到株系,还需做更进一步的工作。