

烟草花叶病毒影响烟草细胞活力的初步研究

陈占洲^{1,2}, 周涛¹

(1. 中国农业大学 植物病毒研究室, 北京 100094; 2. 河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056021)

摘要: 以普通烟草原生质体为材料, 初步研究了烟草花叶病毒(TMV)对寄主细胞活力的影响。结果表明, 在接种 20 d 内, TMV 对寄主叶肉细胞的分裂有抑制作用, 且对不同细胞的生活力有不同的影响, 并通过原生质体的培养做了验证。

关键词: 烟草花叶病毒; 原生质体培养; 细胞活力

中图分类号: S435.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)03-0062-03

Effects of TMV on the Cells Vitality of Tobacco

CHEN Zhan-zhou^{1,2}; ZHOU Tao¹

(1. Laboratory of Plant Virology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Agronomy College, Hebei University of Engineering, Handan 056021, China)

Abstract: In the experiment, the *Nicotiana tabacum* protoplast was used as materials to study the effects of Tobacco mosaic virus on the vitality of host cells. The result showed that the leaf cell division could be restrained by TMV within 20 days after inoculation, and the vitality of different cells could be affected differently, which was validated by the method of tobacco protoplast culture.

Key words: Tobacco mosaic virus; Protoplast culture; Cell vitality

植物病毒是引起植物病害的主要病原物, 严重影响植物的正常生长发育。目前, 主要通过观察病毒所致病状在宏观上研究对植株的危害, 通过电镜观察在微观上研究病毒对细胞超微结构的影响, 而植物病毒对原生质体生活力的影响的报道还很少见到。笔者在烟草原生质体培养的过程中发现, 通过测定原生质体的活力可以在群体上估测病毒对细胞生活力的影响。烟草花叶病毒(TMV)是一种分布广泛、寄主种类较多、抗逆性较强的病毒, 笔者以普通烟草的原生质体为材料初步研究了 TMV 对细胞活力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV, 由中国农业大学植物病毒研究室保存); 普通烟草(*Nicotiana tabacum* cv.) NC89 种子由中国农业大学植物病毒研究室保存提供; 纤维素酶(cellulase onzuka R-10, 日本产); 离析酶(macerzyme R-10, 日本产)。

1.2 病毒的接种

选生长一致盆栽 40 d 的普通烟草 NC89 植株, 用机械摩擦方法接种 100 mg/mL 的 TMV 粗提液于第 3, 4 片叶上, 设未接种病毒的植株为对照。置于 25 °C 的温室中培养。接种 20 d 后, 取适量材料进行酶联免疫吸附测试(ELISA), 确定接种株是否感染 TMV。

1.3 原生质体的分离

分别在接种植株和健康植株上部取同叶位展开叶片各 2 g (面积大体相等), 在超净台上消毒。先用 70% 酒精浸 3 ~ 5 s, 再用 2% 次氯酸钠溶液浸 10 min, 用灭菌水冲洗 3 次。用刀片将叶肉切成细丝, 在培养皿中酶解分离原生质体。

酶液: 材料(V/W) = 10 : 1, 酶液组成: CPW 盐溶液(KH₂PO₄ 27.2 mg/L, KNO₃ 101.0 mg/L, CaCl₂ · 2H₂O 1480.0 mg/L, MgSO₄ · 7H₂O 246.0 mg/L, KI 0.16 mg/L, CuSO₄ · 5H₂O 0.025 mg/L) + 0.6 mol/L 甘露醇 + 1% 纤维素酶 + 0.2% 离析酶, pH 5.8, 酶液经 0.22 μm 混合纤维素微孔滤膜过滤除菌。25 °C 恒温培养箱中静置暗培养 12 ~ 14 h, 中间摇动 2 ~ 3 次。

收稿日期: 2007-12-27

作者简介: 陈占洲(1970-), 男, 河北故城人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病理及生物技术。

酶解结束前用手摇动约 30min, 然后将原生质体连同酶液经不锈钢筛网过滤。接种过 TMV 植株材料获得的原生质体标记为 P-TMV, 由未接种过 TMV 植株材料获得的原生质体标记为 P-CK。滤液移入 10mL 离心管 800r/min 水平离心 7min。去掉上清, 先缓缓加入 1mL CPW21 溶液(CPW 盐溶液附加 21%蔗糖)使沉淀悬浮, 再加入 7mL CPW21 混匀悬液, 700r/min 水平离心 6min, 分别收集上层的原生质体带、中层悬液和下层沉淀中的原生质体。上层的原生质体带和下层沉淀中的原生质体用 CPW 洗液(CPW 盐溶液附加 10%甘露醇)稀释至适宜的体积, 用血球记数板分别测定原生质体的密度, 用荧光素双醋酸盐(fluorescein diacetate, FDA)对原生质体染色测定原生质体的活力。

1.4 原生质体培养

P-TMV 和 P-CK 的上层悬液各取 4mL, 各加 4mL CPW 洗液混匀离心, 去掉上清, 再用洗液清洗 2 次; P-TMV 原生质中层悬液取 8mL 900r/min 水平离心 10min, 去掉上清, 再用洗液清洗 3 次, 所得即纯净原生质体。由于下层原生质活力太

低, 未进行培养。以 P-CK 上层原生质为培养对照。以 2 倍浓度的液体培养基将原生质体密度调至培养密度(为 1×10^5 个/mL)的 2 倍, 使其与保温于 40℃水浴中的 0.8%~1.2%低熔点琼脂糖溶液等体积混匀, 迅速加入直径为 3.5cm 的一次性培养皿中, 0.5mL/皿, 铺成直径约 2cm 左右的薄层, 待琼脂糖凝固后周围加 1.5mL 的液体培养基, 用 Parafilm 膜封口后放入 25℃恒温培养箱中暗培养。

1.5 原生质体存活率的测定

原生质体存活时间的长短, 可以反映叶片细胞生活力的强弱。为了解 TMV 对原生质体生活力的影响, 将剩余上层悬液、中层和下层悬液中的原生质体在 4℃冰箱保存 60h 后, 再用 FDA 法测定原生质体的存活率。

2 结果与分析

2.1 烟草花叶病毒对烟草细胞分裂的影响

计算接种过 TMV 的植株叶片和健康叶片的原生质体(细胞)产量, 可以反映叶片细胞的数量。细胞数量的多少可以表明细胞分裂的情况。结果见表 1。

表 1 各层悬液中分离到的普通烟叶肉原生质体(细胞)数量

项目	P-TMV			P-CK		
	悬液体积 (mL)	密度 ($\times 10^6$ 个/mL)	原生质数量 ($\times 10^6$ 个)	悬液体积 (mL)	密度 ($\times 10^6$ 个/mL)	原生质数量 ($\times 10^6$ 个)
上层	5	0.37	1.85	5	0.60	3.00
中层	10	0.13	1.30	8	0.07	0.56
下层	10	0.77	7.70	10	0.75	7.50
总计			10.85			11.06

注: 原生质体(细胞)数量($\times 10^6$ 个)= 悬液体积(mL) \times 原生质体密度($\times 10^6$ 个/mL)

由表 1 可见, 等量接种过 TMV 的材料和健康材料所得原生质体的数量(细胞)略有差异。P-TMV 为 10.85×10^6 个, 对照为 11.06×10^6 个, P-TMV 比对照少 0.21×10^6 个, 占对照的 1.90%。

还可看出, P-TMV 的上层、中层的总数(3.15×10^6 个)与对照的上层、中层的总数(3.56×10^6 个)相差较大, 比对照少 0.41×10^6 个, 占对照的 11.52%。由此可知, 在接种 20d 内 TMV 对普通烟叶肉细胞分裂有抑制作用。

表 1 还显示, P-TMV 上、中两层的细胞分布与对照有明显差异。P-TMV 的上层、中层的数量分别为 1.85×10^6 个, 1.30×10^6 个; 对照的上层、中层的数量分别为 3.00×10^6 个, 0.56×10^6 个。可以推测, TMV 影响了普通烟叶肉细胞的内部组分或使组分间比例发生了变化, 导致部分细胞的沉降系数增加了, 本应悬浮在上层的沉降到了中层。

2.2 TMV 侵染对烟草叶肉细胞活力的影响

取各层的样品 0.1mL 加 0.01%的 FDA 混匀, 室温静置 5min, 在荧光显微镜下观察, 有活力的原生质被染色发黄绿色荧光。分别记录染色的原生质体数和观察的原生质体总数。计算原生质体活力, 结果见表 2、表 3。

由表 2 可见, TMV 使普通烟原生质体(细胞)活力下降了 3.01 个百分点, 在上层和下层的 P-TMV 的活力比对照的活力分别低 8.03 个百分点和 6.30 个百分点。中层的 P-TMV 的活力却比对照高 5.30 个百分点。

由表 3 可看出, 4℃冰箱保存 60h 后, 虽然中层的 P-TMV 和对照的活力都有降低, 但 P-TMV 比对照仍然高 5.93 个百分点。因此可推测, “沉降系数增加”的那部分细胞有较高的活力。

由表 3 可见, 上层 P-TMV 的存活能力较差,

60h 后活力下降 35.39 个百分点, 而对照只下降了 10.24 个百分点, 上层 P-TMV 的下降幅度比对照大 25.15 个百分点。因此可知, TMV 可以使普通烟原生质体(细胞)生活力下降。中、下层的 P-TMV 分别与对照相比活力下降相差不大(0.63 个百分点, 0.12 个百分点), 中层分别下降 12.00 个百分点, 12.63 个百分点和下层分别下降 1.18 个百分点, 1.30 个百分点。

表 2 各层悬液中分离到的普通烟原生质体(细胞)活力 (%)

项目	P-TMV 的活力	P-CK 的活力
上层	82.81	90.84
中层	86.73	81.43
下层	14.41	20.71
平均	61.32	64.33

注: 原生质体活力= 染色的原生质体数/ 观察的原生质体总数× 100%

表 3 4℃保存 60h 后各层悬液普通烟叶肉原生质体(细胞)的活力 (%)

项目	P-TMV 的活力		P-CK 的活力	
	0h	60h	0h	60h
上层	82.81	47.42	90.84	80.60
中层	86.73	74.73	81.43	68.80
下层	14.41	13.23	20.71	19.41
平均	61.32	45.12	64.33	56.27

2.3 TMV—原生质的培养

培养 35 d 后, 在倒置荧光显微镜下观察。记录膨大的细胞数、发生分裂的细胞数和形成的细胞团数(分裂≥3 次), 结果见表 4。

表 4 感染烟草花叶病毒的普通烟叶肉原生质体(细胞)的生长状况

项目	P-TMV 上层	P-MV 中层	P-CK
细胞团形成率(%)	0.35	0.58	0.52
原生质分裂频率(%)	2.60	3.68	3.57
膨大细胞的比率(%)	26.80	27.52	33.09
具再生细胞的比率(%)	29.39	31.20	36.76

能够生长的细胞一定是有活力的。原生质体(细胞)的生长状况直接体现细胞的活力, 也可反映病毒对细胞活力的影响。由表 4 可见, 从感染 TMV 的普通烟植株取叶分离的原生质体, 具有再生能力的细胞比率(P-TMV 上层为 29.39%, 中层为 31.20%) 低于对照(36.76%), 可见烟草花叶病毒确实在总体上降低了寄主细胞的生活力。

与对照相比, P-TMV 上层细胞群受到 TMV 的不良影响要比中层细胞群大。上层细胞群的细胞团形成率、原生质分裂频率、膨大细胞的比率和具再

生力的细胞比率分别比对照低 0.17 个百分点, 0.97 个百分点, 6.29 个百分点和 7.37 个百分点; 而中层细胞群的膨大细胞比率和具再生力的细胞比率比对照分别低 5.57 个百分点和 5.56 个百分点, 细胞团形成率(0.58%) 和分裂频率(3.68%) 与对照(0.52%, 3.57%) 相比无明显差异。因此可以进一步证明, 烟草花叶病毒对寄主的不同细胞(或细胞群)有不同的影响。

3 讨论

植物原生质体(protoplast)一词始自 Hanstein (1880), 即指通过质壁分离, 能够和细胞壁分开的那部分细胞物质。虽然没有细胞壁, 但原生质体仍保持细胞的活力, 在适宜的培养基中单个原生质体可以恢复细胞壁, 并进行细胞分裂和植株的再生。病毒也可以在原生质体中复制增殖。原生质体系为研究病毒与寄主的互作提供了一个强有力的手段。遭受病毒侵染的植物在病毒的诱导和危害下, 自身会发生各种反应, 不同位置的细胞可能会表现不同的生理状态或特征, 来抑制病毒的增殖或阻止病毒的细胞间移动。本研究中通过简单的高浓度蔗糖离心将普通烟草叶肉细胞分为 3 类, 虽然还比较粗糙, 但能看出感染 TMV 植株的叶肉细胞在群体上与健康叶肉细胞存在明显的差异, 尤其表现在上、中层细胞的活力和数量大小上, 其中上层细胞的活力受病毒伤害较大, 可以代表病毒对细胞生活力的不良影响程度。通过原生质体培养的方法, 这种差异得到了验证。因此, 利用测定原生质体活力的方法可以在群体上估测病毒对细胞生活力的影响。至于导致这种影响的原因和本研究中的推测则需要进一步深入研究。

参考文献:

[1] 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法(上册)[M]. 北京: 科学出版社, 1987.

[2] 陈占洲, 李怀方. 烟草原生质体在植物病毒研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(6): 1119-1122.

[3] 陈名红, 李飞天, 陈学军. 培养基及植物激素对烟草原生质体再生植株的影响[J]. 种子, 2005, 24(9): 76-79.

[4] 孙勇如, 安锡培. 植物原生质体培养[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 1-4.

[5] 侯岁稳, 贾敬芬. 一种简易的植物原生质体计数方法[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(1): 57.

[6] 李晓薇, 盛毅, 马晓东, 等. 用同步辐射 X-射线荧光分析法研究烟草单细胞内微量元素变化[J]. 中国农业大学学报, 2002, 7(3): 79-83.