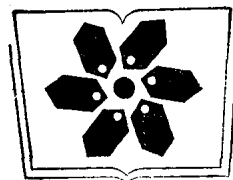


中国植物 类菌原体图谱

龚祖坝 陈作义 沈菊英 编著

科学出版社

S517.3
11.9



中国科学院科学出版基金资助项目

中国植物类菌原体图谱

龚祖坝 陈作义 沈菊英 编著

科学出版社

1990

407204

内 容 简 介

中国科学院上海生物化学研究所在全国各地农业科研机构的协作下,近 20 年来对严重危害粮食和多种经济作物的植物类菌原体进行了广泛调查研究,并获得了显著成果。本书即是在此项研究成果的基础上编写而成。内容包括我国已发现的类菌原体病原的电镜图和植物病态图百余幅。书中还附有文字部分,简明扼要地介绍了有关研究历史、最新研究成果、国内研究现状以及防治措施,并对主要的 30 多种病原的形态、分布、危害、传播昆虫、防治等作了简略介绍。

本书可供各级农业科研人员、农业院校有关师生、植物检疫人员、广大植保干部和农民参考。

中国植物类菌原体图谱

龚祖埙 陈作义 沈菊英 编著

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100707

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

*

1990 年 9 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1990 年 9 月第一次印刷 印张:3 1/2 插页:24

印数:0001-1300 字数:71 000

ISBN 7-03-001787-0/S·60

定价:17.90 元

序 言

植物类菌原体是本世纪 60 年代末期发现的一类新的植物病原。近 20 年来,世界各国报道有关此类病原引起的病害已达 300 种以上。植物类菌原体除能引起粮食、甜菜、牧草等作物和花卉的病害外,特别严重的是对具有重要经济意义的木本植物,如桑树、果树、泡桐等能引起毁灭性的损失,因此,目前已受到世界各国政府和科学研究部门的重视。

本书介绍了我国已报道的植物类菌原体病原的电子显微镜图谱共 31 种,占我国已发现的此类病原总数的一半以上。这些图谱是根据 1972 年以来中国科学院上海生物化学研究所病毒组在各地的农业科研机构的通力协作下所获得的科研成果汇编而成的。为了使读者对植物类菌原体危害植物的情况有更多的认识,图谱编入了多种植物危害的典型病状。同时,我们还编写了有关此病原的研究历史、最近的研究成果、国内研究的现状和防治等简短的文字。

本书编写的目的,是希望它能在以现代科学技术指导和促进农业生产方面起一点作用。因此,本书不仅可以作为各大专院校、农业科研单位等有关专业人员的参考书,也可供农业生产领导部门、广大农村技术人员及农村专业户参考。

作者衷心感谢中国科学院原生物学部主任、中国科学院上海生物化学研究所曹天钦教授、北京大学生物系沈同教授对编写本书的鼓励和支持,也感谢科学出版社的有关编辑同志,没有他们的支持和努力,此书的出版是不可能的。

最后,我们对 15 年来和我们团结协作,共同为开展和推动我国植物类菌原体研究的各协作单位表示衷心的感谢。

编 著 者

1989.1.

KAP9 / 06

目 录

序言

第一章 类菌原体、螺原体和类立克次氏体	1
一、类菌原体、螺原体和类立克次氏体的致病性	1
二、类菌原体、螺原体和类立克次氏体的形态和超微结构	5
三、类菌原体、螺原体和类立克次氏体引起的病害症状	7
四、类菌原体、螺原体和类立克次氏体在寄主植物内的分布、增殖和扩散	10
五、类菌原体、螺原体和类立克次氏体的分离和培养	11
六、类菌原体、螺原体和类立克次氏体的传播	17
七、我国已发现的类菌原体引起的多种植物病害	18
参考文献	26
第二章 我国植物黄化病害的研究	27
一、植物黄化病害病原鉴定	27
二、植物黄化病害的传播媒介	32
三、植物黄化病害菌体的分离、抽提及培养	32
四、植物黄化病害的防治	34
参考文献	36
第三章 植物类菌原体病害的防治	38
一、防治植物类菌原体病害的农业措施	38
二、植物类菌原体病害的化学药物治疗	40
三、植物类菌原体病害的物理疗法	46
四、植物类菌原体的生物防治	47
附录	47
参考文献	48

图版

第一章 类菌原体、螺原体和类立克次氏体

1967年日本科学工作者土居养二等报道,从桑树萎缩病、泡桐丛枝病和马铃薯丛枝病等4种过去被认为是典型病毒病的病株中,观察到一种类似动物菌原体的微生物,并认为它们是使这些植物致病的病原体,称这类微生物为类菌原体(mycoplasma-like organism)。这一发现引起了全世界植物病理、植物保护和植物病毒学家的高度重视,大大促进了这一新的植物病原学领域的研究。近20年来,有关各种植物病害的类菌原体病原鉴定的报道犹如雨后春笋,至80年代初,已发现植物类菌原体300种以上。根据植物类菌原体在形态、生物学特性方面的不同可分为两类,一类是和类菌原体在分类位置上同属菌原体目的螺原体(spiroplasma);另一类是在分类位置上不同的称为类立克次氏体,又称类立克次氏体细菌或类细菌(rickettsial-like bacteria)。

一、类菌原体、螺原体和类立克次氏体的致病性

1. 菌原体微生物的分类学位置和生物学特性

动物菌原体的鉴定和发现要比植物类菌原体早半个世纪。最早被研究和分离培养的动物菌原体是牛胸膜肺炎的病原物,这一研究是在法国巴斯德研究所进行的。1910年Borrel等建议牛胸膜肺炎的可过滤和可人工培养的病原物的双学名为*Asterococcus mycoides*。1954年以前,这一学名曾被广泛地应用,但同时,这一类病原物在文献中又常被称为类牛胸膜肺炎微生物(pleuropneumonia-like organism,简称PPLO)、L型细菌或L型微生物。为避免名词上的混乱和不统一,1955年细菌命名和分类学国际公报编辑委员会,鉴于*Asterococcus*早在1908年由Scherffel给一种淡水藻类作为属名,因此建议采用1929年由Nowak提出的菌原体(*Mycoplasma*)作为牛胸膜肺炎的属名,从此,这一类微生物统称为菌原体类微生物。目前,对动物菌原体和植物螺原体研究得比较深入,它们同属于软球菌纲,其分类学位置和生物学特性列于表1-1。由于植物类菌原体分离培养问题至今尚未解决,它们除在形态和结构上类似于动物菌原体外,其他生物学特性和分类学位置是否和动物菌原体相似,尚需进一步深入研究。

表 1-1 软球菌纲的分类及生物学特性

软球菌纲 (Mollicutes)
菌原体目 (Mycoplesmatales)
菌原体科 (Mycoplasmataceae)
(1) 生长期需固醇
(2) 对毛地黄皂苷(1.5%)敏感
(3) 基因组分子量约 5×10^6
G+C 为 23—41%
(4) NADH 氧化酶在细胞质中
菌原体属 (<i>Mycoplasma</i>)

- 目前已知约有 60 个种,不能分解尿素
 尿原体属 (*Ureaplasma*)
 仅一个种,能分解尿素
 不需固醇菌原体科 (*Acholeplasmataceae*)
 (1) 生长期不需固醇
 (2) 抗毛地黄皂苷(1.5%)
 (3) 基因组分子量约 1×10^9
 G + C 为 29—35%
 (4) NADH 氧化酶在细胞膜上
 不需固醇菌原体属 (*Acholeplasma*)
 目前已知有 8 个种
 螺原体科 (*Spiroplasmataceae*)
 (1) 在某些生长期呈螺旋形态
 (2) 生长期内需固醇
 (3) 对毛地黄皂苷敏感(1.5%)
 (4) 基因组分子量约 1×10^9
 G + C 为 26%
 (5) NADH 氧化酶在细胞质中
 此外,尚有两个分类学位置未完全确定的属
 嫌气原体属 (*Anacropasma*)
 已知有 2 个种
 嗜热原体属 (*Thermoplasma*)
 已知有一个种

继牛胸膜肺炎菌原体后,从人和脊椎动物、鸟类等呼吸、生殖和排泄系统中又分离出多种菌原体微生物。如禽类的窦炎,即是一种在本世纪初就引起人们注意和研究的菌原体疾病。但有些菌原体微生物至今尚未证明其致病性,也许是动物的呼吸、消化、生殖和泌尿排泄管道的共生物。例如在人的男性不育患者的精液中曾发现有菌原体微生物。但目前尚缺乏直接证据说明这一类微生物是引起不育症的致病因子。

2. 菌原体微生物的特点

作为一种病原物,菌原体具有一些和细菌病毒不同的特性:

(1) 菌原体没有细菌的典型细胞壁。这是菌原体和细菌或立克次氏体最大的差别。由于没有细胞壁,细胞质周围仅有厚度约 8—10 纳米的三层单位膜,所以菌原体容易变形和破裂,也能抗抑制细菌细胞壁合成的抗生素,如青霉素,并能通过一般细菌不能通过的滤器,所以菌原体是一种可过滤性的病原物。

(2) 菌原体和细菌一样,细胞内含有核蛋白体,基因组是双链 DNA,因此含有 DNA 和 RNA 两种核酸。病毒颗粒内仅含有一种核酸,而不会两者兼有。菌原体基因组分子量在 $(0.5—1) \times 10^9$ 左右,也远较病毒为大。

(3) 除属不需固醇菌原体科的菌原体外,其他的菌原体在生长期均需固醇。

(4) 菌原体可以和特异抗体反应,这一现象类似于病毒的中和反应。

(5) 四环素类抗生素能抑制包括菌原体在内的原核生物的蛋白质合成,对病毒则没有影响。

3. 植物类菌原体的发现及其致病性的证明

动物菌原体目前已进行了很深入的研究,并且已确立了其在微生物学中的分类地位。植物病害在很长一段时期内被认为主要是由线虫、真菌、细菌和病毒引起的。植物的黄化型病害根据其流行病的性质、传播方式、病株症状和病原物的可过滤性等特点,长期以来一直认为是由病毒引起的,尽管在这类黄化型病害的病株中始终未能分离到病毒病原。在植物黄化型病害的病原研究中,虽然也曾有不同的看法,如 Black 在 1943 年曾经指出,翠菊黄化病的病原可能大于已知的植物病毒,但这一看法并未引起人们的注意。

1967 年,日本的土居养二等利用超薄切片制样技术对桑树萎缩病、矮牵牛感染翠菊黄化病、马铃薯和泡桐丛枝病等 4 种典型的黄化病害的病株新梢进行了电子显微镜观察,发现在病株韧皮部的筛管组织中存在着一类在形态上和动物菌原体极为类似的微生物,称之为类菌原体。他认为这一类类似菌原体的微生物就是植物黄化型病害的病原体,其根据如下: 1) 类菌原体仅出现在患病植株的韧皮部组织中,在健康植株中始终未发现。2) 用四环素族抗生素对病株进行治疗,病株可在一段时间内康复,说明类菌原体和细菌、病毒不同,因抗生素类药物对植物病毒病是无效的。3) 在传播上述 4 种病害的媒介昆虫体内也能观察到类菌原体,而在健康无毒的昆虫体内则未发现。4) 迄今为止,在这类黄化型病害的病株中,一直未能分离到病毒和其他病原。

类菌原体作为一种植物病害的新病原现在似乎已不容怀疑,但是植物类菌原体的致病性至今仍未直接得到证明,因为上述证据都是间接的。证明一种植物病原体的致病性必须满足柯氏法则 (Koch's postulates)。在土居养二等的工作发表以后,众多实验室纷纷报道在不同的植物黄化型病害的病株中发现类菌原体病原,并且试图进行人工培养,但是有活性的类菌原体的分离至今没有成功,因而也无法满足柯氏法则的要求。

目前只有螺原体能成功地进行分离培养,从而能满足柯氏法则,证明螺原体的致病性。螺原体是在类菌原体深入研究过程中分出的一类与类菌原体在形态上和性质上有差异的病原。最初对柑桔顽固病和玉米矮化病的研究,也认为这两种病害的病原是类菌原体。1971 年两个独立的工作组 (Sagilo 和 Fudl-Allah) 分别报道柑桔顽固病的类菌原体培养成功,在显微镜下,它们呈活动的、螺旋型的线状形态,与一般的植物类菌原体不同。1973 年 Davis 和 Woley 从玉米矮化病的病株中发现病原体的形态和柑桔顽固病的相同,因此,这一类病原体就称为螺原体。螺原体和类菌原体的主要区别在于前者具有螺旋体形态,易于分离培养,在体外培养中呈现活动性。除此以外,螺原体和类菌原体具有其他一系列性质相似的生物学、生物化学的特性,例如螺原体在生长期也需要固醇、脂肪酸和糖的发酵,呈现“煎蛋”型的菌落,缺少细胞壁,能通过 220 微米的过滤器,对青霉素有抗性,能被专一抗体抑制其生长和代谢,无细菌的回复现象, DNA 分子量较小并含有较低的 G+C 值。根据上述性质,螺原体属于软球菌纲是毫无疑问的,所以在 70 年代末期,在软球菌纲菌原体目下面,又确定了一个新的螺原体科。目前柑桔顽固病的螺原体得到了最为深入的研究,并且是唯一的具有双名学名的类菌原体类病原 (*Spiroplasma citri*)。

1973 年 Danies 利用 Saglio 和 Fudl-Allah 等报道的方法,从柑桔小叶病(柑桔顽固病的一种)病株果实的种子中培养得到了一个螺原体 *S. citri* 的株系,当把培养的 *S.*

citri 注射进一种能传播柑桔小叶病和三叶草变叶病的欧洲叶蝉 (*Euscelis plebejus*) 体内 4 周后, 将被注射过的叶蝉喂饲三叶草。结果植株呈现严重的小叶病症, 而且在患病的三叶草病株的韧皮部组织内, 也观察到典型的螺原体, 此螺原体又能被再次分离培养。这种带螺原体的欧洲叶蝉不仅能将病原传至三叶草, 而且还能感染豌豆、蚕豆、长春花和甜橙, 特别是后者呈现典型的柑桔顽固病病症。1975 年 Rana 又成功地将柑桔顽固病螺原体的悬浮液通过薄膜饲毒, 接毒于另两种被认为是 *S. citri* 自然媒介的叶蝉: *Circulifer tenellus* 和 *Scaphytopius nitridus*。两种叶蝉均能将 *S. citri* 传播至柑桔实生苗, 呈现顽固病症状。稍晚, Chen 和 Liao, Williamson 和 Whitcomb 报道了玉米矮化病螺原体培养成功, 并证明了它的致病性。

Kondo (1976, 1977) 报道了仙人掌丛枝病的螺原体; Chen (1978) 报道了百慕大牧草白叶病的螺原体, 这两种螺原体在血清学关系上和 *S. citri* 及玉米矮化病螺原体不同。百慕大牧草有时也会出现丛枝症状, 而且在病株中也曾发现过类细菌一类的病原体, 因此, 百慕大牧草的病原还需进一步确定。

螺原体体外培养成功和它的致病性, 使螺原体成为研究植物黄化型病害病原的致病性机制和螺原体本身的生化和增殖机制的极好材料。由于柑桔顽固病并不是一种十分典型的黄化型病害, 所以玉米矮化病可能是更好的研究模型。

类立克次氏体微生物是随着类菌原体研究的深入而分化出来的第三种病原。类立克次氏体在分类位置和形态上与类菌原体及螺原体有较大的差异, 但由于植株的患病症状和流行病学方面有很多和类菌原体病害类似之处, 所以就纳入黄化型病害的研究范围。1977 年以后, 文献中又有人称类立克次氏体为类立克次氏体细菌或类细菌。

根据类立克次氏体在病株体内存在的不同部位, 可以将它分为木质部类立克次氏体和韧皮部类立克次氏体两大类, 前者限于感染寄主的木质部, 后者局限于韧皮部。已经报道的植物类立克次氏体病害见表 1-2。

表 1-2 类立克次氏体病原引起的植物病害

部 位	中 文 名	英 文 名
木 质 部	葡萄皮尔士病	Pierce's disease of grapevine, Phony disease of peach
	苜蓿矮缩病	Alfalfa dwarf
	杏叶萎病	Almond leaf scorch
	李灼叶病	Plum leaf scald
韧 皮 部	三叶草皱卷叶病	Rugose leaf curl of clovers
	三叶草棒叶病	Clover club leaf
	黄花稔小叶病	Little leaf of sida Cordifolia
	柑桔青果病	Citrus greening
	马铃薯小叶矮缩病	Potato leaflet stunt
	菟丝子矮缩病	Stunting of dodder
	甜菜隐潜丛叶病	Sugar beets latent rosette
其 他	葡萄感染坏死病	Infections necrosis of grapevine
	小麦褪绿无籽病	Chlorosis and aspermy of wheat
	葡萄黄化病	Yellows of grapevine
	苹果丛枝病	Apple proliferation
	胡萝卜丛枝病	Carrot proliferation

严格地讲,类立克次氏体的致病性也未得到证明。有报道,葡萄皮尔士病和杏叶萎病的类立克次氏体培养物通过不同的机械接种技术接种至健康寄主,可引起典型的病症,但这一结果未能被其他实验室所证实。

二、类菌原体、螺原体和类立克次氏体的形态和超微结构

在形态上,植物类菌原体、螺原体和类立克次氏体和相应的动物病原,即菌原体、螺原体和类立克次氏体十分相似。

1. 植物类菌原体的形态和超微结构

植物类菌原体的大小一般在 8—100 纳米范围内,并具有多形性的特点。在病株韧皮部筛管细胞内,比较常见的是大小约在 50—100 纳米的大球状体。病株新梢的超薄切片在电镜下观察时,它们的三层单位膜清晰可辨,内部中央充满核质样的纤维状物质,可能是基因组 DNA,周围分布有类似于核蛋白体的嗜锇颗粒,这是最为典型的类菌原体形态。经常还可看到一种较小的约 8—10 纳米的小球状体,内部比较致密,也称为基粒(elementary bodies)。类菌原体形态还可呈分枝型、纤维型和增生型(在主体上增生小球状体)等。一种植物的类菌原体形态可呈多型性,即包括上述各种不同的形态,因而各种植物类菌原体在形态上十分相似,彼此极难区别;而在整体上,类菌原体又保持有典型的形态结构,可以与寄主细胞内的细胞器或其他病原物相区别。类菌原体的多型性或可变性可能是由于缺乏坚厚的细胞壁而易受到寄主细胞内部环境的影响而造成的。McCoy 曾指出,在制备电镜样品时,当植物韧皮部筛管突然被切割时,由于丧失了原来在筛管内存在的较高的流体静压强,从而影响到类菌原体的形态,而这一因素过去很少有人注意。也有不少研究者认为,类菌原体的多型性反映了发育周期中各个阶段的不同形态。根据对甘薯丛枝病病株的电镜观察结果,将不同的类菌原体形态分成 3 种类型,称为发育型、增殖型和崩坏型。但是这种仅仅根据静态的电镜观察而没有体外培养的对照所作的形态区分,可能是不可信的,至少还应有更多的实验证据。例如,曾属于发育型的基粒,根据螺原体的体外培养结果,更可能是一种退化的形式,是剧烈的生理或营养条件改变的结果。同样,有人认为纤维状的类菌原体代表它的活动状态;但也有人认为,类菌原体不存在活动状态,它在植物体内的分布扩散基本上是被动的,由植物筛管内的体液所带动。

2. 螺原体的形态和超微结构

与类菌原体的多型性不同,螺原体具有比较稳定的和特征性的螺旋体的形态。这种螺旋状纤维的形态,不仅在体外培养的培养液内,而且在被感染的寄主筛管组织内都可以看到。螺原体的长度和宽度分别约为 3—25 微米和 0.1—0.2 微米。在体外培养时,螺原体的形态和大小与一系列培养条件有关,如营养、pH、培养时间等。以柑桔顽固病螺原体 *S. citri* 为例,在体外接种培养 1—2 天后,可以观察到短的螺旋体和小的球状体;在 2—4 天时,即在生长的对数期内,螺旋体的大小和数目均不断增加,可长达 2—4 微米,此时呈现较为挺长坚硬的形态。在对数期后的生长期,螺旋体达到最大长度,并聚集成中央致密和向四

周呈放射状扩散的聚合体;超过 6 天后,长纤维的螺旋体消失,出现各种长短不一的片段和不规则的粒体或球状体。

在电子显微镜下进行细致地观察可以发现,在生长旺盛的 *S. citri* 个体中,大多数螺旋体的两端是不同的,一端呈尖形,另一端呈扁平形,这种两端不同的个体常常是一些小的、具有两转螺旋的螺原体。有人认为,这些幼小的螺旋体是刚从亲体上分裂下来的,尖端即是与亲体分离的收缩区。稍后,螺旋体在成长过程中,尖端变为扁平端,因此,出现两端均为扁平的个体;但是,有时也会观察到两端均为尖端的螺旋体。

Lee (1977) 进一步研究了 *S. citri* 在长时间培养后,形态上的变化。他发现有两种因素,即个体老化和培养液内 pH 值降低可能同时起作用。当 pH 值低于 6.8 时,螺旋体纤维变得细长,细胞分裂受到抑制; pH 值进一步降低时,从螺旋体的一端能长出一种挺直的纤维或一种扁平的星状结构。当 pH 值低于 6 时,螺旋体开始退化,首先变成念珠状纤维,最后成为肿胀的小球状形态。

Liao 和 Chen 观察了体外培养的玉米矮化病螺原体的形态。随着培养个体的老化,螺旋体开始变长,出现分枝和聚集。当接种于 pH 5.3 或更低的培养介质中时,个体立即失去螺旋体的形态。因此,和 *S. citri* 一样,培养介质的 pH 值对维持螺原体的螺旋形态是十分重要的。

1977 年 Townseud 报道,从柑桔小叶病病株中分离出一个不呈螺旋体形态的 *S. citri* 株系——Asp-1。从血清学、DNA 杂交、毒素和致病性等试验均证实,Asp-1 是 *S. citri* 的一个株系,而非其他类菌原体的污染。

综上所述,螺原体的形态和一系列的外部培养条件以及寄主体内的内部条件有关。在合适的培养和生存条件下,正常螺原体应具有螺旋体纤维的形态,凡有利于生长的条件,也有利于螺旋体的形成。在非最适培养条件下,螺原体将丧失螺旋体形态的特征;个体呈现肿胀,但当条件回复到最适时,螺旋体的形态也可恢复。因此,正常的螺原体株系,如出现非螺旋体的形态,说明内外条件不适。具有螺旋体形态的螺原体是最有活力的。当螺旋体变为肿胀的球形个体时,活力已基本消失,细胞濒于死亡。生长最活跃的是二转螺旋体,这是最幼小的个体,也可称为基本螺旋体 (elemental helix)。大的螺旋体就是由这些基本螺旋体生长而成。从长的多基因的亲体螺旋体上分裂而获得小螺旋体,亲体螺旋体依靠收缩来实现细胞的分裂。

Asp-1 非螺旋体株系的发现虽然说明螺旋体形态并不是螺原体致病性所必需的,但 Asp-1 可能和正常的具有螺旋体形态的其他 *S. citri* 株系还是有某些不同的特性。

螺原体的超微结构和类菌原体相似,缺乏细胞壁。在 *S. citri* 的超薄切片中,可以看到螺原体有单一的细胞膜,有时还可以看到在细胞膜外尚有一层外膜。这层外膜在负染或冷冻蚀刻的样品中看得比较清楚,有时在外膜表面上还可以看到周期性的突起。但是,这样的外膜在膜的分离试验中却没有得到证实。Cole 等(1973)曾报道,除了外膜,在超薄切片中尚可观察到位于细胞膜内部并和细胞膜紧密相接的内膜。但其他大量的超微结构的研究证明,螺原体仅有单一的膜包裹。

3. 类立克次氏体的形态和超微结构

植物类立克次氏体的形态和超微结构和动物的立克次氏体十分相似。类立克次氏体

一般呈椭圆形,但也有报道呈多形性的球状或纤维状的形态。类立克次氏体长约1—3微米,宽约0.2—0.5微米,有三层结构的细胞壁和胞质膜。最有特征性的是细胞壁有周期性的畸形突起;这些畸形或波形突起似乎围绕整个菌体的长轴旋转。细胞壁和胞质膜间有一层电子透明的空间。在内层和外层胞质膜间还有一电子致密层,称为R层,这在葡萄皮尔士病的病原中能清晰地看到,但在其他的一些类立克次氏体病原中未见报道。R层的出现究竟是由于制样技术所引起,还是具有分类学的意义,目前还不清楚。在立克次氏体内部,可以观察到核蛋白体颗粒和几处电子密度深浅不同的区域。在较浅的区域内,含有和细菌相似的DNA丝状物质。

应该指出,为了更好地确定上述三种病原的形态和超微结构,仅仅依靠电镜的一般超薄切片技术是不够的。连续超薄切片、扫描电镜和冰冻蚀刻等对于进一步阐明这些病原体形态,都是极为有用的技术。Waters和Hunt曾对椰子树致死黄化病的类菌原体进行连续切片的研究,发现除球状和纤维状外,还有一些纤维伸展于体外的分枝状形态。

三、类菌原体、螺原体和类立克次氏体引起的病害症状

植物的黄化型病害很早就为人们所熟知。在土居养二等报道类菌原体病原以前,Merrett(1666)就描述过三叶草变叶病。在中国古代文献中,关于植物黄化型病害也早有记载。植物黄化型病害包括所有类菌原体、螺原体和类立克次氏体引起的病害,目前已知的有300余种,而且大多危害在农业、林业和畜牧业中占有十分重要地位的粮食和经济作物。植物黄化型病害具有传染病的性质,因此往往造成重大的经济损失,在木本植物上引起的损失常常更为惨重。如在上一世纪末就已报道的檀香木簇生病(1898),目前已成为世界上最严重的森林木材病害,已有毁坏整个印度南部檀香木林区并使该地区最重要的檀香油生产濒于停产的危险。比檀香木簇生病危害更早,桃树黄化病就曾引起美国南部地区很大的经济损失。近代的椰子树致死黄化病、柑桔黄龙病等都是引起毁灭性病害的例子。

类菌原体、螺原体和类立克次氏体引起的病害,在病症上有时极为相似,但有时也有差别。对这三种病原引起的植物病害,人们习惯上均称之为植物黄化型病害,但叶片黄化不一定是典型的症状。

1. 类菌原体引起患病植株的症状

类菌原体引起患病植株比较明显的症状是矮缩、黄化、丛枝和不育。患病植株节间长度缩短,树冠变小,整个病株和健康株相比,矮缩或萎缩就非常明显。病株的叶片黄化常从新生叶叶脉褪绿、明脉和发黄开始,直至整个叶片。病株的黄化还常从某一局部枝条开始,而其余部分可在几年内外观继续保持健康。疯长和丛枝也是一种典型的类菌原体病害的症状,这是由于侧枝丛生和花器变绿、萼片变成叶状而引起的。除番茄巨芽病外,病株的花器不能发育或发育极差,而番茄巨芽病则是由于生成了大的肿胀状的花萼,因而使得花器巨大。

受类菌原体感染的果树,其果实的质量和数量也受很大的影响。在很多情况下,植株受感染后,果实的发育停顿和终止,因此产生极小的、不成熟的和形状不规则的果实。

对某些木本植物来说,类菌原体对根部的影响可能还大于植株的地上部分。例如桃

树西方 X 病和榆树韧皮部坏死病,这两种病害使植株表现为营养缺乏的饥饿症状,树冠皱缩,由于韧皮部坏死,整个植株濒于枯萎,但局部的侧枝或根部可能会复活,也有花器变叶,病株矮缩和丛枝症状。

有人曾将类菌原体引起的植株病症分为 4 种类型:

- ① 翠菊黄化型。典型症状为节间延长,叶片黄化。
- ② 矮缩型。典型症状为顶端矮缩、卷叶和枯萎。
- ③ 疯长型。典型症状为丛枝和花器变叶。
- ④ 衰退型。典型症状为退化和枯萎。

以上是一种比较简单化的分类。在自然条件下,由于寄主不同,感染时间和方式的差异,以及周围环境的影响,一种类菌原体可能会引起不同类型的症状,或者在一种寄主上,同时出现几种类型的症状。因此,在缺乏致病因子的生化性质及血清学的分类方法时,依靠症状来对植物类菌原体进行分类是不可能和不可靠的。

类菌原体在细胞水平上引起病变的研究尚不深入,几乎所有的患病植株韧皮部都有坏死,并且韧皮部组织常有肿胀和增生。受类菌原体感染的植株叶细胞中,常有大量的淀粉积聚,和植株矮缩一样,这一现象也是韧皮部组织功能衰退的表现。

被类菌原体感染的病株,受危害的情况是不同的。有些寄主被感染后,短期内就可能导致死亡。例如,榆树韧皮部坏死病和椰子树致死黄化病,在感病几个月后,病株就可死亡。大多数情况下,病株在较长时间内逐步衰弱,退化,最后死亡。但也有个别例子,如翠菊和烟草在感染翠菊黄化病原后,甚至可以比健康植株活得更久一些。

2. 螺原体引起患病植株的症状

螺原体和类菌原体引起的症状常不易分辨。螺原体也可以引起褪绿、叶片斑驳和矮缩,花、叶和果实也会缩小。目前还有人认为,很多现在被认为是类菌原体的病原体,经过较为细致和适当的研究,也可能是螺原体。一般说螺原体引起的褪绿比类菌原体温 and,同时螺原体引起的丛枝现象也不像类菌原体所引起的“疯病”那样严重。

和种类繁多的类菌原体不同,目前仅报道有 4 种螺原体,它们是柑桔顽固病(在以色列,此病称为柑桔小叶病)和玉米矮化病,在 70 年代又分别从畸形仙人掌和百慕大牧草中分离出另两种螺原体。下面简略地分别描述这 4 种螺原体引起的植株病症。

(1) 柑桔顽固病

柑桔种植者发现,一旦柑桔感染此病后,任何措施均不能使病株获得良好的反应和恢复,故得此名。柑桔顽固病存在于美国的加利福尼亚州、亚利桑那州和南部地区,地中海的东部区域。此病可感染甜橙、柚和其他一些柑桔类品种,但较少感染柠檬。顽固病的症状随病原体的株系、柑桔的种类和环境条件的变化而有所不同,总的症状表现出某种程度的矮化,树冠颜色变深,多芽,多丛枝,病株的叶片变小,呈刷子状。叶片顶端斑驳,这常常是在温室条件下诊断顽固病的一种依据,但有时在整片叶面上呈扩散的斑驳。很多病叶的主脉也呈现引人注目的黄色和白色,严重时,病株常在未成熟时就落叶。

病果常呈不规则的果形,主轴两侧高低不均,有时呈橡实形。在美国加利福尼亚州中部和摩洛哥发现的柑桔顽固病病果底部常呈绿色。中果皮呈蓝色是顽固病的另一症状。病树在早期就开始落果,因此顽固病严重影响柑桔的产量和质量,平均损失可达 30—

50%，5年生的柠檬树可减少产量50%。病果果形小，味道酸苦。柑桔顽固病病树的根系发育差。

柑桔顽固病螺原体在自然或人工传播条件下，还可感染多种其他植物，如白菜、萝卜、甘蓝、长春花、雏菊、金盏草、蜀葵和紫罗兰等双子叶植物或洋葱等单子叶植物。

(2) 玉米矮化病

文献上关于玉米矮化病症状的描述是很混乱的，主要是因为以下4种病原物均能引起玉米矮化病的类似症状。这些病原物是玉米矮化病螺原体、玉米丛矮病 (bushy stunt) 的类菌原体、玉米褪绿矮缩病毒和玉米 Rayadofino 病毒。

玉米矮化病螺原体引起的症状是病株矮缩，特别是在早期感染后，节间缩短，叶片呈丛生，褪绿的叶片呈现绿白色条纹，有时在整个叶片上还出现红色或棕色的条带。每一病株仅有2—3个发育不良的穗。在温室内，人工感染病原体后，植株上部茎间明显缩短，叶片呈条纹状或褪绿斑点，有时病株的茎和叶片呈红色，颜色的深浅与寄主种类及周围环境有关。

玉米矮化病螺原体尚可感染蚕豆、长春花和黑麦草等。

(3) 感染仙人掌的螺原体

感染仙人掌的螺原体引起植株畸形，病株呈强烈的丛生和疯长症状，正常的阔而扁平的掌变成细长的圆柱状，仙人掌病株中分离的螺原体与柑桔顽固病、玉米矮化病的螺原体不同。这一病症目前还未给以确切的名称。

(4) 感染百慕大牧草的螺原体

在血清学上，这一病原体和柑桔顽固病、玉米矮化病螺原体不同。典型的症状是从生型地疯长，但从上述病株中曾分离到螺原体和类细菌两种病原物，因此，这一症状很可能是复合感染的结果。有人认为，螺原体引起的症状为白叶症，仅表现白叶症状的牧草，大小与健康株差不多。但疯长型的牧草带有很小的叶片，且根茎明显缩短。关于螺原体引起的典型症状看来还需进一步深入研究。

3. 类立克次氏体引起患病植株的症状

类立克次氏体存在于寄主的韧皮部和木质部的不同部位，所引起的症状是不同的。

(1) 局限于木质部的类立克次氏体引起的症状

据目前所知，局限于木质部的类立克次氏体引起的病害仅发生在温带气候的地域，其中最主要的是葡萄皮尔士病，发生于美国的加利福尼亚州、墨西哥的中北部、智利和阿根廷。同样的病原体可能引起苜蓿矮缩、杏叶萎病，这两种病害也局限于北美。在血清关系上和皮尔士病病原一致的尚有李灼叶病，此病发生于阿根廷。

木质部的类立克次氏体引起的病症和植物的脉管枯萎病相似，说明主要是输水系统的损害。病症包括叶片的枯萎或边缘坏死，结果少，果实小，植株一般最后死亡。感染桃树的病株虽不致死亡，但在经济上已无价值。

(2) 局限于韧皮部的类立克次氏体引起的症状

位于韧皮部内的类立克次氏体引起的病症和黄化病症极为相似，包括植株矮缩，嫩叶黄化，卷叶，叶面不平而扭曲，花器变绿，病株常在未成熟时就死亡。由同一的或者十分相似的类立克次氏体引起的三种病害是美国和英国的三叶草棒叶病和澳大利亚的玫瑰卷叶

病,均表现出十分相似的症状,并且都对青霉素敏感。

四、类菌原体、螺原体和类立克次氏体 在寄主植物内的分布、增殖和扩散

类菌原体和螺原体存在于病株韧皮部的筛管组织中。有报道,在韧皮部的薄壁组织和伴细胞中也发现有上述两类病原体。McCoy 认为,所谓在薄壁组织和伴细胞中发现类菌原体的报道值得怀疑,理由是很多双子叶植物的黄化病害是由于韧皮部的细胞增生所引起,产生一些不正常的丛生的筛管分子,特别是一些未成熟的筛管仍然可以含有核和细胞质的内含物,可能误认为是薄壁组织或伴细胞;另一种可能是把薄壁组织细胞内的空泡结构误认为类菌原体病原。这些空泡结构的出现主要是由于组织的老化或电镜制样时固定不够而产生的。类菌原体也存在于根部的韧皮部筛管组织或根部的中柱鞘内。

如上所述,类立克次氏体可以存在于木质部或韧皮部组织,但也有报道,某些类立克次氏体可以同时存在于木质部和韧皮部内。例如在捷克斯洛伐克鉴定的葡萄坏死病和在德国与希腊报道的葡萄黄化病,就分布在根部的木质部和韧皮部,这可能和这一病原体的传播方式有关。

在超薄切片中,类菌原体、螺原体和类立克次氏体常充满整个筛管,密度可超过 100 个/细胞,而且大部分分布在整个细胞的边缘,细胞的中央部分密度较低。

类菌原体、螺原体和类立克次氏体在病株筛管内能够移动,故病原体可扩散至其他健康组织。1953 年就有报道,翠菊黄化病病原体能从媒介昆虫传毒的叶子很快地运动至植物的其他部分。病原体要在病株内扩散必须通过筛管孔。曾经统计过近 160 种植物筛管孔的大小,平均为 2 微米,因此,类菌原体等一类病原体完全可以通过。大多数研究者认为,除螺原体可能具有主动通过筛管孔而扩散至植株的其他部分能力外,类菌原体和类立克次氏体可能是随着植株内的液体而流动,缺乏细胞壁类菌原体的多形性也可能是它能通过筛管孔的一个有利因素。类立克次氏体的扩散还可以通过木质部的输导组织。

类菌原体、螺原体和类立克次氏体在植株体内的增殖方式目前还不十分清楚。曾经提出过各种增殖方式的假设,如二均分裂、芽生、链状再生和内含小体的释放等等。这些假设都是根据电镜观察的结果而提出的,证据还是不足的。例如,根据哑铃状的类菌原体,就提出了两均分裂的增殖方式;根据从大的类菌原体分裂出致密的小球状个体,则提出芽生假设,同样的现象也有人解释为纤维状菌原体的发育最初阶段。大多数研究者认为,植物类菌原体和动物的菌原体一样,其增殖方式以两均分裂为主。动物菌原体在不良的培养条件下或者在培养物老化以后,会出现各种不正常的形态,包括致密的基本小体。Heaton 等发现,春季在幼小的植株中观察到的类菌原体均为纤维状形态,而在植株或组织老化以后,类菌原体就变成多形性。也有报道,纤维状形态的类菌原体能发育成念珠状的形态,在进一步发育中,念珠状的狭小部分再进一步收缩,最后分裂成单个体。

对柑桔顽固病螺原体的研究中,发现在体外培养的早期,大部分为球状小体,在合适的培养条件下,这些小体很快成长成为一种大约有两转的基本螺旋体,这些基本螺旋体可以继续生长和延伸,发育成成熟的个体。亲代的多基因的螺旋体通过局部收缩分裂成子代的球状小体或基本螺旋体;分裂最活跃的亲代螺旋体是具有三转的螺旋体。

对于类立克次氏体,两均分裂是最普遍的现象。在电镜下能观察到包括细胞壁和细胞质膜在内的不同程度的局部收缩。在有类立克次氏体存在的病株根部细胞中,或鸡胚的培养液内,在最活跃的繁殖阶段可以观察到很多形态不同的、有时仅包含有一层外膜的小体,大小为28—72纳米。这类小体被认为是类立克次氏体繁殖周期中的一个早期发育阶段,但是在一些用抗生素处理的培养物中,有时也能发现这样的个体,在这样的情况下,它又是一种退化的产物。

五、类菌原体、螺原体和类立克次氏体的分离和培养

到目前为止,所有对类菌原体进行体外培养的实验都没有获得成功。主要存在两个方面的问题。首先,要从植物组织中分离出完整的、带有侵染活性的类菌原体个体是十分困难的。由于类菌原体缺乏细胞壁,非常脆嫩,一旦体内或体外条件改变,如渗透压、温度、pH等变化,均易引起类菌原体的破裂和失活,而成功的分离是进一步离体培养的必先决条件。其次,目前对适合于类菌原体体外组织培养的条件尚不完全了解,因此,植物类菌原体的离体培养迄今未获成功。尽管有作者,如Nienhaus和Sikora曾经声称获得了煎蛋状的菌落,但别人未能重复他们的结果。两者相比,从病株中分离具有活性的类菌原体要比寻找合适的离体组织培养条件可能更困难。如果分离的问题能够解决,则离体组织培养也许能较快地获得成功。目前国内外的一些实验室正在加紧对类菌原体分离的研究,有些实验室是为了制备类菌原体的抗血清,并已获得一定的效价。当然分离抗血清制备用的抗原要比分离具有复制感染能力的类菌原体要容易得多,因为后者一定要保持基因组的完整和复制需要的酶系,如聚合酶、复制酶等,不被降解和破坏,而前者只要在分离制剂中存在有类菌原体抗原的散片,就能获得一定效价的抗血清。

1. 类菌原体、螺原体和类立克次氏体的分离

类菌原体类微生物可以从植株的患病组织或传毒昆虫的组织中分离。分离方法有组织抽提液的简单过滤法、差速及密度梯度离心法、植株韧皮部液汁渗出法和植株组织的冷冻法等,这些方法的分离效果均不够理想。看来要分离到具有感染力的有部分完整类菌原体的制剂,必须注意和解决下列一些问题。

① 渗透压的平衡。类菌原体缺乏细胞壁,因此远较细菌和一般细胞脆弱,特别是类菌原体寄生于植物的韧皮部组织内,处在相对较高的渗透压环境。一旦从寄主的组织转移到抽提液内,渗透压的变化常易引起类菌原体个体的崩解。从已经报道的结果来看,对螺原体的分离,抽提液中保持较高浓度(蔗糖浓度0.15—0.55mol/L)是有利的。如玉米矮化病的螺原体最合适的蔗糖浓度是0.25—0.35mol/L。

② 机械损伤。在分离提纯过程中,要十分注意防止脆弱的类菌原体受到机械损伤。差速离心和密度梯度离心是在分离过程中经常使用的一种技术。过高的离心速度,过长的离心时间,不合适的密度介质均会引起类菌原体的破裂和损伤。

③ 抽提液的性质。最初,类菌原体的分离均沿用分离植物病毒的方法,因此,较普遍地使用缓冲液作为类菌原体的抽提液。以后发现,用缓冲液作为抽提液,抽提结果均不理想。原因可能是缓冲液中的pH和离子强度不合适,也有可能是缓冲液内缺少类菌原体赖

以生存的营养物质,因而在分离抽提过程中,导致类菌原体丧失感染活力。不少实验室试用培养液或植物韧皮部组织的抽提液作为抽提溶液,目的是尽可能在体外条件下保持体内的自然状态。例如,一种叶蝉 (*Agallia contriefa*) 的细胞培养液,又称 ACTC 培养液,是抽提螺原体效果较好的抽提液。

④ 一些未知因素的影响。类菌原体一类的微生物的侵染性,可能要比其完整性受更多因素的影响。作为一种比病毒复杂得多的微生物,在其复制过程中需要众多的酶系,然而在抽提液中也许还存在有某些人们尚不了解的抑制因子,最简单的如盐离子的性质和浓度, pH 的变化等都可能起作用。也有报道,在抽提液中加入微量的亚硫酸钠 (0.02mol/L), 可以提高类菌原体的感染率,但其作用机制尚需进一步研究。

类菌原体微生物的分离效果,目前一般用两种方法进行鉴定,一种是用电子显微镜检查分离液内是否存在完整的形态与寄主体内相似的个体,另一种是将抽提液回接注射于媒介昆虫,再测定带毒昆虫的带毒率。尽管电镜检查不失为一种快速的鉴定手段,但几乎所有的作者都承认后者的可靠性。因为电镜观察仅能获得形态上的证明,而在植株和昆虫组织的抽提液中,存在着多种大小和形态类似于类菌原体的细胞器和有膜小体;此外,用磷钨酸或醋酸铀进行负染后,类菌原体是否能保持其固有形态也值得怀疑。Walanski 和 Maramorosch (1970) 曾经指出,在健康的和患有翠菊黄化病的病株抽提物中,均能观察到类菌原体的球状小体。Edeu-Geen (1978) 也曾报道,在健康的和患有致死性黄化病的椰子树组织的抽提液中,同样发现一些有膜的、大部分中空的、形态上和类菌原体很难区分的小体,这些小体可能是寄主组织中的成分。

2. 桑树萎缩病类菌原体的分离和培养试验

在类菌原体、螺原体和类立克次氏体中,只有螺原体已经分离和培养成功。目前,世界上很多实验室正进行不懈的努力以求突破类菌原体培养的难题,对类菌原体的一些离体培养条件,如必需的营养物质,培养介质的 pH 值,渗透压,缺氧及有氧的条件等正在进行探索。日本科学家对桑树萎缩病类菌原体的分离培养进行了较为系统的研究,结果有较大的可比性,因此,拟作较为详细的介绍。

日本科学家对桑树的患病组织和饲毒昆虫进行了下页所示的分离和培养步骤。

用下述步骤获得的分离物加入到不同的培养基中,如陈氏培养基(能在体外长时间维持玉米矮化病的螺原体)、Fudl-Allah 培养基(培养柑桔衰退病螺原体成功的培养基)和北里研究所的北研 PPLO 培养基(动物菌原体培养基)。从表 1-3 可以看出上述几种对动物菌原体和植物螺原体离体培养有效的培养基,对桑树萎缩病类菌原体的离体培养结果。

从表 1-3 的实验结果可知,将保毒媒介昆虫磨碎进行培养试验,陈氏培养基可维持病原一定的致病性,但经过 1 天以后,病原的致病性也降低到零,所以病原在体外的时间,实际上是影响病原稳定性的一个至关重要的因素。

在试用过的多种缓冲液中,如甘氨酸溶液, Tyrode 氏溶液, Gey 氏溶液, Hank 氏溶液等,以甘氨酸溶液为最佳。溶液中加入亚硫酸钠,则显示有保护作用。作者原以为在培养基中添加不同浓度的蔗糖 (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2mol/L) 或马血清、胎牛血清 (0, 1, 5, 10%) 后,病原维持率可以提高,实际上,添加蔗糖和马血清后,病原维持率反而降低,蔗糖浓度以 0.3mol/L 为最佳,而且只有在当日测定,才显示病原性。