

类病毒和类病毒病

〔美〕T. O. 迪内 著

科学出版社

类病毒和类病毒病

〔美〕T. O. 迪内 著

刘 勇 糜克永 译
杨 平 陈 炜
田 波 校

研 学 出 版 社

1985

内 容 简 介

本书是类病毒发现者 T. O. Diener 写的一本专著,叙述了类病毒的发现经过、引起的病害、实验生物学、鉴定、提纯、物理和化学性质、与寄主细胞的相互关系以及本质和起源。可供从事病毒学、病理学和分子生物学的科研和教学工作者参考。

T. O. Diener

VIROIDS AND VIROID DISEASES

John Wiley and Sons, Inc., 1979

类病毒和类病毒病

〔美〕T. O. 迪内 著

刘 勇 糜克永 译

杨 平 陈 炜

田 波 校

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9月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1985年9月第一次印刷 印张: 8 1/4

印数: 0001—4,100 字数: 183,000

统一书号: 13031·2980

本社书号: 3883·13—9

定价: 1.95 元

序 言

类病毒是已知最小的传染病病原。它们能引起若干栽培植物的毁灭性的病害,而且也可能使动物发生疾病。尽管人们知道由类病毒引起的病害已有几十年之久,但却普遍认为这些病害是由于常见的一些病毒感染造成的。只是在1971年,当指明马铃薯纺锤块茎病的病原是一种具有特殊性质的低分子核糖核酸(RNA)时,才明确它有本身独特的病原性质,尽管它很小,但仍然能在敏感的细胞中自主复制。由于这种病原和包括已知病毒在内的所有其它病原极不相同,因此建议将这类病原取名为类病毒。

从那时以来,另外几种植物病害也被证明是由相似的低分子量RNA引起的。由于许多研究人员的努力,类病毒独特的物理化学和生物学性质就知道得更加清楚了。本书力图论述关于类病毒以及它们所引起病害方面的综合性的和最新的知识。同样,可能更为重要的是,本书也试图指出关于对作为生物学单位的类病毒的认识过程中的许多全然无知的领域。例如,我们不知道,类病毒在自然界的分布如何,它们对农业的潜在威胁的严重性怎样,它们是否以一些不同于高等植物的生命形式发生,它们如何复制,它们如何导致某些感病植物发生新陈代谢畸变,以及在某些情况下,又导致感病植物死亡。

不仅是对类病毒和它引起的病害,而且对深奥的和一般性的生物机制,这些全然无知的领域,本书都为扩大我们的知识,提供一个引人注目的机会。我们希望本书将会吸引更多

的研究人员深入到类病毒的研究中去，并希望能在获得这类新认识的病原的知识方面有所补益。

T. O. DIENER

1979年1月于马里兰州贝尔茨维尔城

(糜克永 译 田 波 校)

目 录

序言	vii
1. 类病毒的发现	1
1.1 类病毒发现的先决条件	1
1.2 各种类病毒发现的时间	2
1.3 类病毒的定义	6
1.4 类病毒术语	6
2. 自然界中的植物类病毒病害	9
2.1 马铃薯纺锤体块茎病	9
2.1.1 简史	9
2.1.2 地理分布	10
2.1.3 症状学	11
2.1.4 田间的扩散和传播	13
2.1.5 天然寄主	17
2.1.6 株系	18
2.1.7 经济损失	19
2.1.8 防治方法	21
2.2 番茄簇顶病	22
2.2.1 地理分布	22
2.2.2 症状学	23
2.2.3 田间的扩散和传播	24
2.2.4 天然寄主	25
2.2.5 株系	25
2.2.6 经济损失	25
2.2.7 防治方法	26

2.3 柑桔裂皮病	26
2.3.1 简史	26
2.3.2 地理分布	28
2.3.3 症状学	28
2.3.4 田间的扩散和传播	31
2.3.5 天然寄主	32
2.3.6 株系	32
2.3.7 经济损失	34
2.3.8 防治方法	35
2.4 菊花矮化病	35
2.4.1 简史	35
2.4.2 地理分布	35
2.4.3 症状学	37
2.4.4 田间扩散和传播	37
2.4.5 天然寄主	38
2.4.6 株系	38
2.4.7 经济损失	38
2.4.8 防治方法	39
2.5 菊花褪绿斑驳病	39
2.5.1 简史	39
2.5.2 地理分布	40
2.5.3 症状学	40
2.5.4 田间扩散和传播	41
2.5.5 天然寄主	41
2.5.6 株系	42
2.5.7 经济损失	42
2.5.8 防治方法	42
2.6 黄瓜白果病	43
2.6.1 简史	43
2.6.2 地理分布	43

2.6.3	症状学	42
2.6.4	田间的扩散和传播	43
2.6.5	天然寄主	45
2.6.6	株系	45
2.6.7	经济损失	45
2.6.8	防治方法	45
2.7	椰子死亡病	45
2.7.1	简史	45
2.7.2	地理分布	46
2.7.3	症状学	47
2.7.4	田间的扩散和传播	49
2.7.5	天然寄主	50
2.7.6	株系	50
2.7.7	经济损失	50
2.7.8	防治方法	51
2.8	酒花矮化病	52
3.	实验生物学	53
3.1	类病毒的繁殖	53
3.1.1	实验植物宿主和宿主范围	53
3.1.2	环境条件	70
3.1.3	在组织细胞培养以及原生质体中的繁殖	72
3.2	试验性传染	73
3.2.1	嫁接传染	74
3.2.2	菟丝子传染	74
3.2.3	节肢动物传染	75
3.2.4	种子和花粉传染	76
3.2.5	土壤传染	77
3.2.6	机械传染	77
3.3	类病毒的鉴定	78
3.3.1	诊断宿主	79

3.3.2	血清学鉴定	81
3.3.3	物理-化学鉴定	82
3.4	类病毒的生物测定	83
3.4.1	系统感染宿主上的测定	84
3.4.2	局部病斑测定	87
4.	类病毒存在的证据	89
4.1	马铃薯纺锤体块茎类病毒的初期工作	89
4.1.1	沉降性质	89
4.1.2	对核酸酶的敏感性	98
4.1.3	无病毒颗粒	103
4.1.4	对低分子量的认识	107
4.1.5	物理性质的鉴定	112
4.2	证实马铃薯纺锤体块茎类病毒和其它类 病毒的证据	114
4.2.1	马铃薯纺锤体块茎类病毒	114
4.2.2	菊花矮化类病毒	116
4.2.3	柑桔裂皮类病毒	117
4.2.4	菊花褪绿斑驳类病毒	119
4.2.5	黄瓜白果类病毒	120
4.2.6	椰子死亡病	120
4.2.7	酒花矮化类病毒	120
5.	未知同一性病原物类病毒本质的确定	121
5.1	病原物类病毒本质的标准	121
5.2	沉降性质	122
5.3	核酸酶的敏感性	123
5.4	对苯酚处理不敏感	123
5.5	电泳迁移率	124
6.	类病毒的提纯	125
6.1	BELTSVILLE 方法	126

6.1.1	直接苯酚提取	127
6.1.2	氯仿-丁醇预处理	128
6.1.3	凝胶过滤	132
6.1.4	凝胶电泳	133
6.1.5	从凝胶上回收类病毒	133
6.1.6	菊花矮化类病毒提纯方法的改进	134
6.2	其它方法	135
6.2.1	柑桔裂皮病类病毒(CEV)的提纯	135
6.2.2	椰子死亡病的核糖核酸	138
6.3	纯度的评价	138
7.	类病毒的物理性质	141
7.1	大小(分子量)	141
7.1.1	凝胶电泳测定	141
7.1.2	电子显微镜测定	142
7.1.3	辐射测定	142
7.1.4	平衡沉降测定	144
7.1.5	根据核苷酸序列测定	145
7.2	形状(分子结构)	146
7.2.1	单链或双链核糖核酸	149
7.2.2	环状或线状核糖核酸	156
7.3	稳定性	162
7.3.1	热的影响	162
7.3.2	冷的影响	164
7.3.3	其它物理因素的影响	165
8.	类病毒的化学性质	166
8.1	核糖核酸以外的其它组分	166
8.2	一种或几种核糖核酸	167
8.3	化学成分	170
8.3.1	核苷酸比例	170

8.3.2	末端分析	171
8.3.3	寡核苷酸图型	171
8.3.4	核苷酸序列的测定	174
8.3.5	没有 Poly A 和 Poly C 序列	175
9.	类病毒与其寄主间的相互作用	176
9.1	类病毒的感染性	176
9.1.1	独特的感染性	176
9.1.2	类病毒的浓度和感染性	178
9.1.3	环状类病毒和线状类病毒的感染性	178
9.1.4	感染的抑制剂	182
9.2	类病毒在细胞内的作用	183
9.2.1	信使核糖核酸(mRNA)的活性	183
9.2.2	转移核糖核酸(tRNA)的活性	186
9.3	亚细胞位置	186
9.4	复制模型	190
9.4.1	是自主复制还是依赖于辅助病毒复制	190
9.4.2	DNA 指导复制的证据	193
9.4.3	RNA 指导复制的证据	206
9.4.4	环形和线形类病毒复制的证据	211
9.5	致病模型	214
9.5.1	细胞致病效应	214
9.5.2	可能的致病机制	214
10.	动物类病毒问题	216
11.	类病毒的本质	222
11.1	类病毒可能的同系物或类似物	222
11.2	类病毒可能的起源	227
11.3	有关类病毒病的本质的推测	227
	参考文献	232

1. 类病毒的发现

“坚信自己对客观实际的探求取得进展是第一步；说服别人才是第二步。”

——路易斯·巴斯德

在科学上，日常试验中所遇到的意外的结果是新发现的最经常的来源。然而对于许多试验意外的结果，几乎总是作一些浮浅的解释，例如方法错误或推测错误。而且对这些意外的结果又总是屡次忽略或者把它们归咎于实验的差错，但与理论上重大偏离的解释则是极少见的。

对作为一种新类型病原的类病毒的认识便是如此。对一般认为是常见植物病毒病的马铃薯纺锤体块茎病病原提纯的努力，引起了与这种观念以及与病毒学和分子生物学广为采纳的观念不一致的结果。但是经历了一段时间以后，它才被确认为是一种新类型的病原。本章将讨论认识类病毒的必要条件和发现它们的编年史。

1.1 类病毒发现的先决条件

认识类病毒和常见病毒的基本区别，只有在某些病毒学和分子生物学的基本原理确认以后才有可能。其中首要的是对病毒遗传信息包含在它们的核酸成份中的认识。事实上，就植物病毒而言，最引人注目的是确认从烟草花叶病毒中分离出的核酸是有感染性的(Gierer 和 Schramm, 1956; Fraenkel-Conrat, 1956)。从亚硝酸处理的病毒制剂中分离

出缺陷型的烟草花叶病毒毒株，及其在感染方式上恰好与病毒分离的感染性 RNA 相似(Siegel 等, 1962), 清楚地说明了病毒可能以游离的 RNA 形式存在于体内。对所谓非增殖型或冬季型的烟草脆裂病毒的发现, 以及这些由未被衣壳包裹的病毒 RNA 组成的测定(Sänger 和 Brandenburg, 1961; Cadman, 1962)说明了病毒病原以游离 RNA 形式存在于自然界。以后, 又证明了游离的, 有感染性的 RNA 也存在于常见植物病毒感染的植物中(Diener, 1962)。这样, 游离 RNA 形式的病毒在自然界存在的可能性, 就更令人相信了。但是在这些发现中, 还没有一个能够指出自主复制的各种低分子量 RNA 的存在, 以及它们自然引起作物毁灭性病害方面的重要性。

1.2 各种类病毒发现的时间

回顾证明类病毒是与病毒相区别的新类型病原, 显然需要五个方面严格的有说服力的证据。

1. 病原以无蛋白外壳核酸存在于体内。
2. 类似于病毒的粒子不能在感染的组织中检查到。
3. 病原是一种低分子量的核酸。
4. 感染性的核酸自主复制, 即不须协助病毒参加。
5. 感染性的核酸仅由同一种分子组成。

迄今为止, 已鉴定了下述类病毒, 而且以它们引起的病害命名:

1. 马铃薯纺锤体块茎类病毒(PSTV);
2. 柑桔裂皮类病毒(CEV);
3. 菊花矮化类病毒(CSV);

4. 菊花褪绿斑驳类病毒(ChCMV);
5. 椰子坏死类病毒(CCCV);
6. 黄瓜白果类病毒(CPFV);
7. 酒花矮化类病毒(HSV)。

对于每一种类病毒按照上述五个方面考察它们的编年史,这是一件很有趣的事。至今以五个方面证明的只有 PSTV,近来发现的一些类病毒还缺乏一个或一个以上方面的严格的有说服力的证明。

这里仅仅列举对每一种病毒的最早的有说服力的证明的记载,已证实的报告以及对试验证据更详细地讨论将在第四章叙述。

1967 年, Diener 和 Raymer(1967)根据 PSTV 的低沉降率和对核糖核酸酶的敏感性,认为它是游离的 RNA。它不因苯酚对粗提物的处理而改变这种感染物质的沉降性质,它有预想的 RNA 浮力密度,并且这种低沉降性质不能以假想的具有低密度的病毒粒子(含类脂质)来解释。

1968 年, Diener(1968)指出 PSTV 对核糖核酸酶敏感,这样病毒粒子存在于 PSTV 感染的组织中,更是不可想像了。Semancik 和 Weathers(1968b)证明柑桔裂皮病病原以低速沉降,并对核糖核酸酶敏感,而且用电子显微镜方法不能在 CEV 感染的组织中鉴定有类似病毒的粒子(Semancik 和 Weathers, 1968a)。

1970 年, Zaitlin 和 Hariharasubramanian(1970)报道在 PSTV 感染的组织中,不能鉴定有构成外壳蛋白的蛋白质。

1971 年, Diener(1971b)综合密度梯度离心和聚丙烯酰胺凝胶电泳的分析结果,推论出 PSTV 是低分子量的 RNA。在同一报告中,也充分说明了无辅助病毒参与 PSTV 的复

制。由于 PSTV 和病原核酸具有相似的性质, 因此建议将类病毒作为一个普通术语。

Diener 和 Smith(1971)以 PSTV 能够进入高浓度聚丙烯酰胺凝胶, 而高分子量 RNA 则不能进入的方法进一步证明, PSTV 是低分子量的。

1972 年, Diener(1972)根据 PSTV 感染性的稀释曲线, 指出它为一种单一的靶子, 因此认为 PSTV 是由单一分子所组成。

Semancik 和 Weathers(1972b)根据 CEV 在聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率, 推论出它是一种低分子 RNA。他们指出, 它的浮力密度是在预想的 RNA 范围内(Semancik 和 Weathers, 1972a)。

Diener 和 Lawson(1972b)以菊花矮化病的病原具有感染性, 低沉降率, 对核糖核酸酶敏感以及在聚丙烯酰胺凝胶中具有低分子量 RNA 泳动的特点, 证明菊花矮化病是由类病毒引起的。

1973 年, Semancik 等(1973b)研究了 CEV 对离子辐射的抗性, 并且报告其靶体积约为 10^5 道尔顿, 指出 CEV 由单一一种分子组成。

Hollings 和 Stone(1973)确定了 OSV 对紫外光辐射有高度抗性。

Sogo 等(1973)首先应用电子显微镜技术完成了对类病毒(PSTV)的观察, 并且用直接长度测量法确定了它的低分子量。

1974 年, Romaine 和 Horst(1974)根据菊花褪绿斑驳病原的低沉降率和核糖核酸酶的敏感性, 推论它是一种类病毒。

Diener 等(1974)报告 PSTV 对紫外光照射的灭活作用

有一种很高的抗性，而指出 PSTV 仅由一种分子组成。

1975 年，Randles (1975) 提出了与椰子坏死病有关的两种 RNA 相伴物的证据，指出此病可能由类病毒引起。

Dickson 等(1975)发表了第一个类病毒 RNA 的酶解图谱(PSTV 和 CEV)，并从它们的错综复杂性，推论每一种类病毒是一种单一的又互相区别的分子类型。

1976 年，Sänger 等(1976)根据未发表的证据(Van Dorst 和 Peters, 1974)已经作出的断言，进一步提出了黄瓜白果病病原是类病毒的证据。所提出的证据包括低沉降率，对核糖核酸酶的敏感性，凝胶电泳中的迁移率和应用电子显微镜方法作的长度测定。

Dickson(1976)根据所提出的 CSV 和椰子坏死病有关的 RNA 的两向指纹图谱，认为每一种都是单一的又相互区别的不同种的低分子量 RNA。

1977 年，Sasaki 和 Shikata(1977b)报告酒花矮化病病原具有低沉降率，和对 RNase 敏感的性质。他们认为该病原为类病毒。

Conejero 和 Semancik(1977)证明，在 CEV 感染的组织中不能鉴定到有病毒外壳蛋白性质的蛋白质，因而它不同于存在于同样组织中类似病毒的粒子。

这样，迄今为止，对于所有已鉴定的类病毒，都有充分证据说明它们是无蛋白外壳的 RNA，对于 ChCMV 和 CPFV 两种类病毒也提出了某些证据，同样说明，类似于病毒的粒子也不存在于其感染的组织中。除 ChCMV 和 HSV 以外，已有理由公认类病毒是低分子量的。但是关于自主复制问题，至今还只限于对 PSTV 的研究。类病毒是单一种分子的证

据适用于 PSTV、CEV、CSV 和 CCCV, 而不适用于 CFPV、ChOMV 或 HSV。

类病毒的独特的分子结构(见第七章), 以及如环状和高度的分子内互补性的特殊的结构特征, 可用来作类病毒 RNA 的鉴定, 然而直到现在仍未肯定是否所有的类病毒都能证明有这些结构特性。

1.3 类病毒的定义

根据目前需要和对病原性质的认识, 对类病毒作出如下定义:

类病毒是存在于某些生物中, 并能引起特殊病害的一种低分子量核酸。在同种健康个体中不能检查到, 而当引入到这些个体时, 它们便能自主复制, 并引起特殊的症状。类病毒不同于病毒核酸的是无外壳蛋白。类病毒对热以及对紫外光和离子辐射有高度的抗性, 它们的分子内含有互补的密集区域和以共价键结合的环状结构。

毫无疑问, 随着对类病毒性质认识的增加, 这个定义还会修改。但是在目前掌握的知识相当少的情况下, 它适合于区分类病毒和其它已知病原, 包括常见病毒。

1.4 类病毒术语

虽然现在已经普遍采用本书的类病毒术语, 但是早期对这个术语有过争论。争论的中心围绕以下两点:

1. 新发现的病原在性质上不能充分地、与常见病毒区分, 这些病原体仅仅由非常小的一些病毒所组成, 因而不需要新的术语。