

〔苏〕Ю. М. 谢鲁奇柯 B. Г. 列夫曼 著

类 病 毒

一 类 新 病 原

科 学 出 版 社

厦门大学
海洋系资料室

S432.41
1645

类病毒——一类新病原

〔苏〕 Ю. М. 谢鲁奇柯 著
B. Г. 列夫曼

王小凤 译

科学出版社

1982

内 容 简 介

本书综合地介绍了一类新的病原体——类病毒的研究进展。着重描述了马铃薯、柑桔、菊花、黄瓜等植物类病毒,同时对羊的痒疹病及其病原性质作了叙述。校者在书后概括性地介绍了类病毒的研究成果和发展动向,并编制了略语检索。

本书可供生物学、微生物学和病毒学、植物病理学、分子生物学及农、牧业方面的有关科研人员和大专院校师生参考。

Ю. М. Шелудько, В. Г. Рейфман

ВИРОИДЫ—НОВЫЙ КЛАСС ПАТОГЕНОВ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА» МОСКВА 1978

类病毒——一类新病原

〔苏〕 Ю. М. 谢鲁奇柯 著
В. Г. 列夫曼

王小凤 译

罗明典 校

责任编辑 王惠君

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

*

1982 年 2 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/32

1982 年 2 月第一次印刷 印张: 4

印数: 0001—4,900 字数: 90,000

统一书号: 13031·1830

本社书号: 2488·13—6

定 价: 0.65 元

译 者 的 话

本书综合性地介绍了一类新的病原物——类病毒的研究进展。这类病原由低分子量的核糖核酸构成，比所有的病毒都要小。这种病原物没有足够复杂的遗传构造，使其在敏感寄主中诱导出能自我增殖的生物合成体系，它也不能编码特异性外壳蛋白。它借助寄主 DNA 进行复制。书中描述了马铃薯、柑橘、菊花、黄瓜等植物类病毒，同时对羊的痒疹病及其病原性质作了叙述，发现它与已知类病毒有类似之处。

类病毒的发现及其发展给一些病原尚不清楚的动物、植物和人类某些疑难病的研究提出了新方向。为了解整个类病毒的研究近况及其进展，书后对其研究成果及其发展动向作了概括性的介绍。

由于水平所限，译文中有不妥和错误之处，望读者批评指正

译 者

1980. 3.

目 录

一、序言.....	1
二、马铃薯纺锤块茎病病原.....	2
三、柑桔裂皮病病原.....	28
四、菊花矮化病病原.....	40
五、菊花褪绿斑驳病原.....	47
六、黄瓜白果病病原.....	48
七、椰子死亡病病原.....	51
八、关于羊类痒疹病病原的本质.....	53
九、结束语.....	70
十、文献.....	74
十一、附录.....	105
1. 类病毒研究概况及其进展	105
2. 略语检索	123

一、序 言

Stoller 和 Diener (1971) 最先注意到类病毒。Diener 及其同事在研究马铃薯纺锤块茎病原时,注意到了这种与病毒不同的病原体的特殊性。由于研究方法的完善,积累了有关此病原体的结构和生物学的新材料,最后得到了马铃薯纺锤块茎类病毒的纯制剂,并进行了一系列的精细分析。Diener 得出结论,这是与以前人们不知道的亚病毒病原有关系的。被称为类病毒的这个病原本身是低分子量的核糖核酸,它具有相当的致病性,并对各种化学和物理因子的作用非常稳定。Sanger 等在研究马铃薯纺锤块茎时得到了类似的结果。Semancik 和 Weathers 研究了柑桔裂皮病的本质后,阐明了此病原体与马铃薯纺锤块茎类病毒有许多共同之处。

近年来也曾报道了其它一些致病病原——支原菌 (*Mycoplasma*)、立克次氏体所引起的植物病害,按外部症状很难与病毒病相区别。支原菌没有核和细胞壁。在相当短的一段时间内,发现了 50 种以上的植物支原菌病害 (Дон 等, 1967; Kleinhempel 等, 1971; Москвевъ, Скрипаль, 1971; Borges, 1972; Лехнович, 1972; Шпаар 等, 1974), 因而相对的减少了黄化类型的病毒病的数目。在进化方面,支原菌比病毒高级些,在“进化树”靠上的部位,它同病毒紧紧连接起来,在亚细胞高分子生物——病毒和单细胞细菌之间 (Шелудько, 1970) 形成桥梁。立克次氏体区别于支原菌,它有细胞质膜和细胞壁,在人工培养基上不能繁殖,但对四环素也敏

感 (Hopkins, Mollenhauer, 1973; Goheen 等, 1973; Ploaic, 1973)。

如果核酸本身携带基因功能的话, 那么可以认为由蛋白质和核酸两种生物多聚体构成的体系是原始的生命体系。在类病毒被发现以前, 人们从未怀疑过病毒就是复杂生命体系的最低极限 (Слюродинцев, Голубев, 1970)。

亚病毒病原体——类病毒的发现把病毒推向分子性质生命体系进化的第二阶梯, 从病毒病的组成中又分化出一组新的病害——类病毒病。

研究最为详细的是引起马铃薯纺锤块茎病和柑橘裂皮病的类病毒。

二、马铃薯纺锤块茎病病原

马铃薯的病害——纺锤块茎被人们知道已有 50 多年的历史 (Martin, 1922)。在苏联, 此病于 1937 年由 А. И. Терещенко 首次报道, 并叫“哥德式病” (“Готика”)。之后, 此病曾以各种名称被描述: “黑皮病”、“块茎玫瑰斑点病”、“块茎坏死斑点病”、“叶畸形病”等, 但以后曾与美国的纺锤块茎病作了鉴定比较 (Леонтьева, 1960, 1963, 1964, 1966, 1971a, b)。

根据 М. К. Фомюк (1966) 和 Ю. А. Леонтьева (1971a) 的描述, 由于侧枝生长受阻, 病株的特征是滞长、直立、伸长、茎节少、叶小, 并与茎成锐角形生长。病株块茎颜色比健壮的浅, 光滑, 变长 (经常呈纺锤状), 表面芽眼突出。病块茎形成较晚, 数量也少 (图 3, 4)。

此病害使块茎减产 20—70%, 并使质量下降 (Hunter, Rich, 1964; Леонтьева, 1971a)。



图1 感染马铃薯纺锤块茎病类病毒的维尔基尼马铃薯品种植株
(Ю. А. Леонтьева)

曾经认为此病害系由病毒引起，当稀释到 1:1000 并加热到 65℃ 时仍保持侵染性。但稀释到 1:10,000 并加热到 80℃ 时，则失去活性 (Леонтьева, 1964)。

В. А. Колобаев (1964) 把由于“哥德式病”引起的病害归属于病毒 K 和 Y，以及某种未鉴定的、只能因嫁接传染的病原。

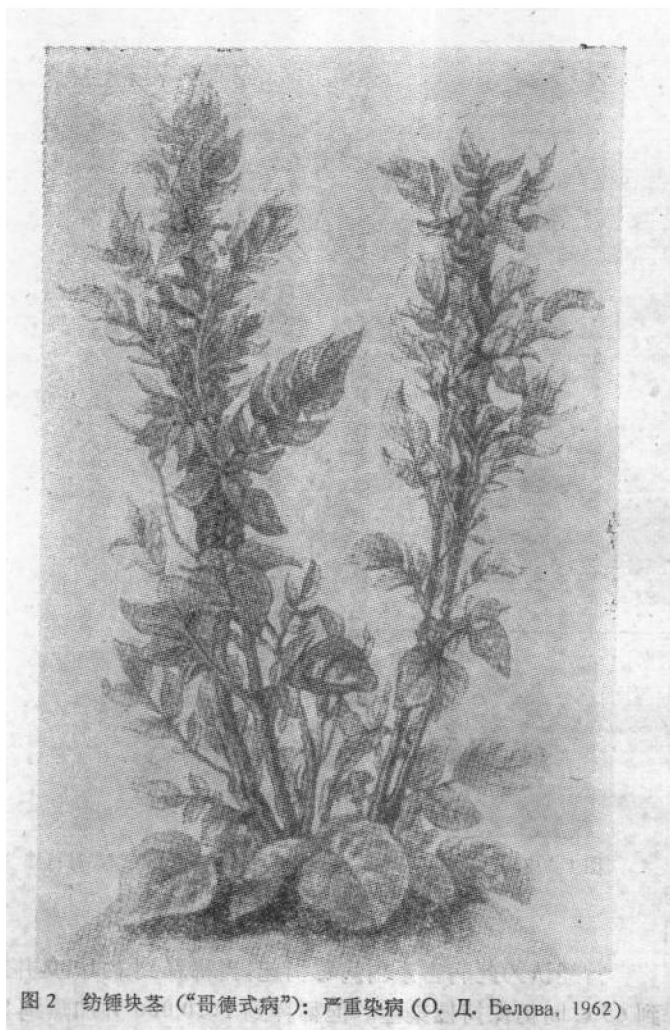


图2 纺锤块茎（“哥德式病”）：严重染病（О. Д. Белова, 1962）

В. А. Горюшин (1963, 1966) 在苏联各地感染“哥德式病”的植株中发现 K 病毒¹⁾ (马铃薯花叶卷叶病毒) 和细丝物,

1) 稍后证明 K 病毒是 M 病毒的一个株系——马铃薯卷叶病毒。



图3 普利耶库马铃薯早熟品种块茎 (Ю. А. Леонтьева)
左: 健康薯块 右: 病株薯块



图4 基奈尔玫瑰马铃薯品种块茎 (Ю. А. Леонтьева)
左: 健康薯块 右: 病株薯块

当时曾推测性地把这后一种当作马铃薯卷叶病毒或马铃薯M病毒的核酸。

根据其它的资料 (Пересыпкин 等, 1966), 在“哥德式病”植株中用血清学方法没有发现 X、K 和 Y 病毒, 但发现杆状颗粒和线形, 其长度有超过已知的马铃薯杆状病毒的, 也有更短的。在另一些植物中发现 X 和 Y 病毒的典型粒子, 用血清学方法鉴定不出这些粒子, 并且发现细线形像游离核酸。从试验过的植株中分离出六个典型的“哥德式病”株, 在其汁液中不存在杆状和线状颗粒, 而发现了结晶的球状结构, 初步被鉴定为“哥德式病”病毒, 得到了关于它的低滴度的抗血清。所以在苏联流行的“哥德式病”被认为是数个病原复合体所引起的病害。

人们曾在各种植物上发现几种病原体 (Грама, 1969, 1972; Москвев, Грама, 1970, 1971)。在 Лорх 品种的马铃薯叶子汁液中, 他们发现长线状, 在番茄 Rutgers* 品种中发现杆状。此病原体对 RNase 敏感, 在 250,000g 离心 3 小时不沉降。根据这些研究得出结论: 此病原体的部分或全部缺少蛋白外壳。考虑到物理性质、颗粒状态、抗原性及寄主范围时, 人们把它作为 M 病毒株系进行了鉴定。从 Парнасия, Островский, Юбель 等品种的“哥德式病”植株分离出的病原体可以由汁液经机械方式传递。对它用 250,000g 离心三小时不沉降, 可被 RNase 钝化, 而酒精可以使它沉降, 酚处理不起作用, 并具有活性。人们曾假定“哥德式病”的病原体可能是游离的核酸, 但也可能是 M 病毒的无蛋白株系。

Ю. А. Леонтьева (1971a) 把马铃薯“哥德式病”归属于马铃薯纺锤块茎病毒引起的病害。此病被认为是病毒病,

* 原文误印为 Ratgers。——译者注

因为根据症状表现及其生物学循环与已知的病毒病相似。病原体在种薯中保存,并在准备播种发芽种薯块时,在中耕除草时,由植株相互接触 (Bonde, Merriam, 1951; Manzer, Merriam, 1961) 等机械方式传播,以及由昆虫携带的方式进行传播 (Фомюк, 1960a, б; Герасимов, 1964, 1966; Герасимов, Леонтьева, 1969, 1970; Леонтьева 等 1970; Леонтьева, 1971a; Diener, Raymer, 1971)。

马铃薯纺锤块茎病病原体的一个独特的性质是:它可由马铃薯和番茄的种子和花粉进行传播。它在番茄上引起丛顶病(茎丛生),在1962年以前曾被认为是一种单独的病害 (Raymer; O'Brien, 1962; Benson 等 1965; Fernow 等 1970; Лехнович, 1971)。

McClean (1931, 1948) 发现此病原体对抑制剂有惊人的稳定性。这些抑制剂包含在成熟的种子中,通常可使全部已知的马铃薯病毒钝化。他把五种染病的茄科植物种子弄碎,成功地感染了番茄幼苗 (McClean, 1948),这样证明了茄属植物 (如 *Solanum incanum*) 和另一种茄属植物如癫茄 (*S. aculeatissimum*) 种子具有侵染性。同时证明马铃薯纺锤块茎病病原在老的癫茄种子中可以保存四年。在三年多时间里 *S. incanum* 的新收种子长出 63% 的病株,老的种子长出 39% 的病株;储存一年的灯笼果 (*Physalis peruviana*) 种子 11% 是传染“病毒”的,与此同时,番茄 (Benson, Singh, 1964) 和马铃薯 (Singh, 1966, 1970) 的种子有相似的致病率。根据 Singh 和 Finnic (1977) 的材料,马铃薯纺锤块茎病 (严重的) 在冷冻干燥的马铃薯叶组织中可以保存六年之久。

如果两个亲本都感染此病,则 87—100% 的马铃薯种子带病 (Hunter 等, 1969),这样就间接证明了花粉感染的可能性。这个独一无二的马铃薯纺锤块茎病特性曾被试验得以

证明 (Fernow 等, 1970)。同时传播病害的百分率与马铃薯品种和种龄无关,也指明该病原体的特殊性。

除上述寄主植物外,马铃薯纺锤块茎病病原还感染茄科 (Solanaceae) 的许多属和其它科 (Easton, Merriam, 1963; Леонтьева, 1971a, 6; O'Brien, 1972; Cammack, Harris, 1973)。用菟丝子 (*Cuscuta gronovii*) 嫁接法,马铃薯纺锤块茎病可以传给长春花 (*Vinca rosea*) (MacLachlan, 1960)。Bagnall 研究了 40 多个野生种马铃薯对马铃薯纺锤块茎病病原的敏感性,只发现茄属种 *S. gueroense* 的一个品系是免疫的。

Singh (1973) 试验确立了马铃薯纺锤块茎病病原的寄主范围。在 232 个样品中 (种和品种) 有 138 个是敏感的,包括以下各科中的一些属: 紫草科 (Borraginaceae)、桔梗科 (Campanulaceae)、石竹科 (Caryophyllaceae)、菊科 (Compositae)、旋花科 (Convolvulaceae)、川续断科 (Dipsacaceae)、无患子科 (Sapindaceae)、玄参科 (Scrophulaceae)、茄科 (Solanaceae) 和 缬草科 (Valerianaceae)。接种中等和强力毒株后表现病症状的有: 番茄 (*L. esculentum*)、莨菪属植物如 *Scopolia anomala*, 欧莨菪 (*S. corniolica*), *S. luride*, *S. sinensis*, *S. stramonifolia*, *S. tangutica*, 澳洲茄 (*Solanum aviculare*) 以及另一种茄的变种如 *S. aviculare* var. *albiforme*, 而在爪哇三七草 (*Gynura aurantica*)、矮牵牛 (*Petunia hybrida*), 和一种茄属种如 *Solanum depilatum* 上只有强力毒株能感染。Diener, Hadidi (1977) 总结了此病原体的寄主范围,主要包括茄科 (Solanaceae) 的 128 种。在 21.1—22.8℃ 和 400 英尺烛光有利于在天蓬子 (*Scopolia sinensis*) 上形成局部斑。

马铃薯纺锤块茎病病原的指示植物常用的有三个番茄品种: Rutgers (Raymer, O'Brien, 1962; Raymer 等, 1964;

Fernow 等, 1969), Sheyenne (Singh 等, 1964) 和 Allerfrüheste-Freiland (Singh, 1970a)。后者被推荐作为马铃薯纺锤块茎病病原中等毒株的指示植物。在营养混合物中加入高剂量的锰, 可以使特征性症状明显, 并加速症状的表现 (Lee, Singh, 1972; Singh 等, 1974)。

其它种类的植物也被用作指示寄主: 茄科的 *Solanum rostratum* (Singh, Bagnall, 1968a)、矮牵牛 (*Petunia hybrida*) (*Flaming velvet* 品种) 黄花菸草 (*Nicotiana rustica*)、*N. debneyi*、灯笼果 (*Physalis peruviana*) (O'Brien, Raymer, 1963)、心叶菸 (*N. glutinosa*) (Леонтьева, 1971a)、*Lycopersicon glandulosum* 和一些番茄杂种 (Singh, O'Brien, 1970)、天蓬子 (Singh, 1971)。所有指示植物除天蓬子外都产生系统反应。在天蓬子上接种后第 7—15 天产生特征性的局部坏死。Singh 和 Finnie (1973) 证明马铃薯纺锤块茎病原通过天蓬子种子和花粉传播。Hunter 和 Rich (1964a, b) 建议用液态氮从感染马铃薯纺锤块茎病的病叶子制备接种液, 可以极大地提高浸出液的侵染性。

在被感染的马铃薯和番茄植物中, 可快速探测出少量马铃薯纺锤块茎病病原体 (Morris, Smith 1977)。其方法是提取细胞核酸, 然后用 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

曾有人描述过两组马铃薯纺锤块茎病病原株系, 它们在马铃薯和番茄上的症状各不相同。第一组株系产生的症状与翠菊黄化或茄科大蕾束顶枝原菌所引起的紫顶卷曲或丛顶综合症相似, 感染这个株系的块茎变为纺锤状, 并裂开, 植株呈现直立状, 矮小, 并有茎及叶柄稍弯曲和坏死 (Singh 等, 1970, a, b)。在番茄 Rutgers 品种上表现矮化, 腋芽增生, 花芽坏死, 叶皱。在长春花 (*Vinca*) 植株上: 矮小, 黄化, 花状假叶 (蜕变成叶)。此株系分布在加拿大东部, 称为“黄化型”, “强

毒株”或“Schultz*株”(Raymer, O'Brien, 1962)。第二类株系(中强毒株或野生株)不引起纺锤块茎病和开裂症状。在马铃薯和番茄上产生直立症状,叶柄呈锐角伸展(Singh等, 1970a, b),即典型的“哥德式病”症状。此株系在自然界的分布占优势。例如,在加拿大中强毒株在病株中占92%,而强毒株只占8%(Singh等, 1970a, b)。Singh等人(1968b; 1970a, b)指出在用酚提取的核糖核酸侵染时,马铃薯纺锤块茎病原不丧失侵染性。

因此,综述早期的报道有可能得出结论,马铃薯纺锤块茎病按外表症状与大部分植物病毒病的病害没什么区别。病原的特点是:没有病毒颗粒和抗原性,能在成熟的种子和其提取液中存活,由种子和花粉传播。RNA的酚抽取液具有高度侵染性,耐热性(70—75℃),对高速离心稳定(即低分子量),对RNase敏感,所有这些特征给上述作者的假设提供了基础,即引起此病害的不是病毒,而是游离的核酸。

新的研究资料为类病毒的现代概念奠定了基础。

曾有人用聚丙烯酰胺凝胶电泳和蔗糖密度梯度的等比重离心的方法进行研究。Loening(1967)证明用5%和7.5%浓度的聚丙烯酰胺凝胶可以把低分子的4S和5S RNA与核糖体RNA(rRNA)分开,并得出结论,此法较之超离心更有效。用蔗糖密度梯度超速离心方法研究雀麦草花叶病毒,南方菜豆花叶病毒和菸草花叶病毒的核糖核酸,得到了明确的结果。

在1967年,Diener, Raymer从感染马铃薯纺锤块茎病原的病株中分离出侵染物质(沉降常数为10S),它对有机溶剂的处理不敏感,并能用乙醇沉淀方法使其浓缩。当用酚处

* “Schultz 株”是来自美国 Schultz 马铃薯病毒收藏所(Schultz potato virus collection)的马铃薯纺锤块茎病原毒株。——译者注

理时其侵染性和沉降性质不改变。用脱氧核糖核酸酶处理时其侵染性仍旧不变。在低离子浓度下用核糖核酸酶处理时，其侵染性丧失，当缓冲液离子浓度高时仅保持部分侵染性。

为证明此病原不具有蛋白外壳，把浸出液用酚处理或不处理，再与 RNase 一起保温，结果在此两种情况下侵染性完全丧失。

因此，第一次令人信服地证明了这种与病毒不同的新型病原体的存在，其主要的和唯一的组份是核酸。此病原体的特征是相当的稳定性和高度特异的侵染性，其最终稀释度是 10^{-6} 或 10^{-7} 仍保持侵染性，虽然在这样的稀释下在蔗糖密度梯度中或甲基化乳清蛋白柱的洗脱液中均没有明显的吸收峰。从纤维素柱下来的组分每毫升只含 4—5 微克，稀释到 10^{-3} — 10^{-4} 仍具有侵染性。所以病原体的溶液在每毫升含总核酸 5×10^{-4} 微克时，仍具有侵染性。

侵染性病原具有低分子量，因为在 40,000 转/分两小时高速离心之后它留在上清液中，在 24,000 转/分离心 16 小时之后它位于蔗糖密度梯度的上部和中部分 (Raymer, Diener, 1969)。

在用脱氧核糖核酸酶处理后比处理前侵染性物质在蔗糖梯度中的沉降速度更慢 (Diener, Raymer, 1969)。侵染性物质从甲基化乳清蛋白柱与寄主 DNA 一起洗脱下来。在此基础上提出了推测，认为侵染性基础系双链核糖核酸结构，至少有一条 RNA 链，可能具有环状结构 (Diener, 1970b)。

研究马铃薯纺锤块茎病原的 RNA 有相当大的困难，因为它在染病组织中的含量很低。初期对这个问题的研究只是以生物学实验为基础的。根据 Loening 的方法，RNA 分子量大小的测定是以 RNA 的二级结构对其沉降性质和在聚丙烯酰胺凝胶中电泳移动性影响的相反特征为基础的。确定马

铃薯纺锤块茎病病原的分子量为 5×10^4 d。Singh 和 Clark (1971) 设计了从番茄叶子提纯马铃薯纺锤块茎病病原的方法,同时确定了它的分子量。最大的侵染性部分相当于 4—5S 的小分子。

用羟基磷灰石柱层析可把侵染性马铃薯纺锤块茎病病原与寄主的双链 RNA 分开 (Lewandowski 等, 1971)。当用胰核糖核酸酶处理时,侵染性丧失,则使马铃薯纺锤块茎病病原中双链结构的存在受到怀疑。

人们曾得到了对双链 RNA 和 RNA-DNA 杂交体特异性抗血清 (Schwartz, Stoller 1969)。Stoller 和 Diener (1971) 利用它们对高度侵染性的马铃薯纺锤块茎病病原样品进行了相应的研究。这些免疫学实验未能证明在所分析的样品中存在有双链 RNA 和 RNA-DNA 杂交体 (Duesberg, Colby, 1969)。马铃薯纺锤块茎病病原的侵染性高于任何已知植物病毒 RNA。当 Diener (1972b) 成功地分离到大量病原体时,他用紫外吸收和热变性等物理学方法对它的性质作了鉴定。进一步证明了马铃薯纺锤块茎病病原 RNA 的低分子量。

关于马铃薯纺锤块茎类病毒的大小和形态见电镜照片 (图 5、6),是由 T. O. Diener (美国农业部植物保护研究所,马里兰州贝尔特斯维尔) 和 P. Kaesberg (美国,威斯康星大学) 赠送。

电镜研究表明,马铃薯纺锤块茎类病毒是单链的(部分双链) RNA,分子量 $8.0-9.0 \times 10^4$ d; 其平均长度将近 50 毫微米;在热变性后一些分子长度达到 70 毫微米 (Sogo 等, 1973)。

McClements 和 Kaesberg (1977) 证实马铃薯纺锤块茎类病毒是由两种单链 RNA 构成,其形态分别是线状和环