

植物病毒弱毒疫苗

—— 番茄条斑病疫苗 N14

田波 覃秉益 著
康良仪 张秀华



湖北科学技术出版社

植物病毒弱毒疫苗

— 番茄条斑病疫苗 N₁₄

田波 覃秉益 康良仪 张秀华 著

湖北科学技术出版社



植物病毒弱毒疫苗——

番茄条斑病疫苗

田波、覃秉益著
康良仪、张秀华

湖北科学技术出版社出版

湖北科学技术出版社出版发行

邯郸地区印刷厂印刷

787 × 1092毫米 8 2开本 9.125印张 19,900字

1985年7月第1版 1985年7月第1次印刷

印数：12000册

统一书号：17304·92 定价：2.00元

数字图书馆
PDG

内 容 简 介

本书详尽介绍了番茄花叶病毒弱毒疫苗 N_{14} 的获得、生产和应用技术，也介绍了病毒弱毒疫苗及其应用的一般原理和技术。除证明了番茄花叶病毒弱毒疫苗 N_{14} 使用安全，有防病增产效果外，还有刺激生长、促进早熟和减缓真菌病害危害的作用，对其保护机理进行了分析。本书可供广大农业、生物学和病毒学工作者参考。



前 言

这本小册子是我们自1976年以来，进行番茄花叶病毒弱毒疫苗研制、使用和作用机理的研究小结。

弱毒疫苗是植物病毒病综合防治中一个有效的方法。本书的主要章节用于叙述疫苗的生产和使用。为了解除人们对在植物上使用弱毒疫苗的顾虑，也提供了疫苗安全性的实验证据。

通过与各地的协作和有关同志的帮助，番茄花叶病毒弱毒疫苗N₁₄的应用，已经受了多年的生产性示范的检验，除显示防病增产，促进早熟的作用外，还能增强番茄对真菌病害的抵抗力。

关于病毒毒力和保护作用的机理，我们进行的工作不多，所提供的一些试验仅供讨论。

参加编写和提供资料的还有相希才、梁锡娴、王小凤、马德芳和田颖川同志。

为了借鉴国外经验还在书的末尾附录了日本研制和应用病毒弱株系防治番茄花叶病的经验。

总之希望这本小册子的出版，有益于植物病毒弱毒疫苗的应用及其机理的研究，也希望各地继续验证番茄花叶病毒弱毒疫苗N₁₄的应用前景。

由于时间仓促，水平有限，一定有许多不妥甚至错误之处，切望大家指正，并愿在此向所有支持这项工作的协作单位和有关同志，特别是王先彬、祖茂增、谭增亮、仲崇良、

陆家兴和李云峰等同志，谨致诚忱的感谢。

作者

1985年4月



目 录

前 言	(1)
第一章	植物病毒病害防治策略.....	(1)
第二章	植物对病毒免疫性的类型和机理.....	(9)
第三章	植物病毒弱毒疫苗.....	(27)
第四章	番茄花叶病毒弱毒疫苗的获得和生产.....	(40)
第五章	番茄花叶病毒弱毒疫苗N ₁₄ 的安全性测定.....	(55)
第六章	番茄花叶病毒弱毒疫苗N ₁₄ 的使用.....	(72)
第七章	番茄花叶病毒弱毒疫苗N ₁₄ 预防番茄条斑病的 增产效果.....	(90)
第八章	番茄花叶病毒弱毒疫苗N ₁₄ 促进番茄早熟.....	(100)
第九章	番茄花叶病毒弱毒疫苗N ₁₄ 增强对真菌病害 的抵抗力.....	(108)
第十章	番茄花叶病毒弱毒疫苗的理化性质.....	(117)
第十一章	番茄花叶病毒及其弱毒疫苗N ₁₄ 感染的组 织中病毒双链RNA的提取.....	(133)
第十二章	感染番茄花叶病毒及其弱毒疫苗的植物中 免疫蛋白和体外翻译产物的比较.....	(171)
附录	(197)
图版及图版说明	(277)



第一章 植物病毒病害防治策略

(一) 传染性病原物基因组信息量与病害防治

(二) 各种病毒病防治措施的评价

1. 关于病毒病的治疗

2. 防止病毒传染的措施

3. 植物对病毒免疫性或抗病性的利用

4. 植物病毒病生物防治的前景



(一) 传染性病原物基因组信息量与病害防治

引起植物传染病的微生物病原物的主要类群是：1、真菌；2、细菌；3、支原体、螺旋体、类立克次氏体和L-型细菌；4、病毒；5、类病毒。这些病原物分别属于生物六界分类系统中的三个界，即

真菌界：真菌，属真核生物*。

原核生物界：细菌、支原体、螺旋体和立克次氏体。

病毒界：真病毒，由核酸和蛋白质等组成。

亚病毒，类病毒，由游离的低分子量RNA组成。

各类病原物的基因组大小和有关性质如表1-1所示。根据表中资料可以看出：属于真核生物的真菌和属于原核生物的细菌，其细胞核的结构虽有差别*，但都具有完整的细胞构造。而支原体、螺旋体和立克次氏体不具有细胞壁，故对抑制细胞壁形成的青霉素不敏感。但以上细胞型微生物都具有自己的能量代谢系统和合成蛋白质的场所——核糖体。与此不同，属于病毒界的真病毒（即通常所说的病毒）和类病毒都不具有独立代谢所必须的能量代谢系统和核糖体。合成病毒所需的能量、原料（主要是核苷酸和氨基酸）和场所（蛋白质在核糖体上，核酸在细胞核或细胞质中合成）都依靠寄主细胞。由于病毒基因组最少能编码三种蛋白质，除病毒外壳蛋白外，还包括病毒核酸复制酶或其亚基。即病毒核酸复制所需的酶与寄主核酸复制所需的酶有所不同。类病毒RNA的分子量极小不足以编码任何蛋白质（编码一种蛋白

* 真核生物细胞中的细胞核具有核膜并进行典型的有丝分裂，原核生物没有核膜。

表1—1 植物传染性病原微生物的基因组大小和其他特性的比较

特 性	植物传染性病原物				
	真 菌	细 菌	支原体	病 毒	类病毒
(1) 基因组分子量	10^{10}	10^8	10^8	10^{6-7}	10^5
(2) 含有DNA和RNA	DNA + RNA	DNA + RNA	DNA + RNA	DNA 或 RNA	RNA
(3) 具有核糖体	+	+	+	-	-
(4) 具有能量代谢系统	+	+	+	-	-
(5) 含有蛋白质	+	+	+	+	-
(6) 在无生命培养基上生长	+	+	+	-	-
(7) 对抗菌素敏感	+	+	+	-	-

质平均需 0.3×10^6 的核酸分子量)，因此它对寄主细胞的依赖性更甚于病毒。

对各类病原物进行防治时，人们对药物寄予很大希望。安全有效的药物是建立在选择性基础上的，即它必须对病原物有致死或抑制作用，而对寄主无药害或副作用。选择性药物是根据病原物和寄主代谢的差异形成的。由于真菌和细菌有独立于寄主细胞的代谢体系，已获得很有效的杀菌剂和抗

菌素。至今未获得对植物病毒有实用价值的治疗药物的原因，正是因为病毒对寄主细胞代谢的高度依赖性。对病毒有抑制作用的药物往往对寄主产生药害。

其复制完全依赖于寄主细胞的类病毒必然更难于治疗。实践证实了这种推理，对病毒病有普遍治疗作用的热处理和茎尖脱毒技术，对类病毒病没有效果。

理论和实践都证明，病原物愈简单、基因组愈小，其防治愈加困难。

（二）各种病毒病防治措施的评价

1. 关于病毒病的治疗

由于病毒的基因组很小，不能编码更多的酶，必须依赖寄主的酶系统，因此很难找到对病毒有选择性的化学治疗药物。尽管后来发现病毒基因组能编码病毒核酸复制酶或其亚基，但要找到它与寄主核酸复制酶的差别仍极不易。至今还没有适用的植物病毒化学治疗药物。随着对病毒复制和致病机理的深入了解，将来有可能找到选择性的病毒化学治疗剂。但仍难达到有效的治疗目的，因为当病毒病症状表现时，病毒已大量增殖。在病毒病的综合防治中，化学治疗可应用于无病毒原种的获得和经济价值高的多年生植物的治疗。与化学治疗的缓慢进展相反，植物病毒病害的物理疗法却得到广泛的应用。包括热治疗、分生组织脱去病毒的方法和冷治疗。

（1）热治疗：已感染病毒的植株或处于休眠期的种子和苗木，经过定温定时的温汤处理或乾热和湿热空气处理，引起病毒的体内钝化，达到治疗病毒病的目的。体内钝化病毒所需的温度大大低于体外钝化所需的温度，例如马铃薯卷叶

病毒，体外钝化温度为 70°C — 80°C 10分钟；而钝化块茎中的卷叶病毒只需 50°C 温汤浸种17分钟。可见体内病毒的钝化不是温度的直接作用，而是通过寄主的机制钝化的。对几十种植物病毒热治疗所用的温度都在 35 — 55°C 范围内，但处理时间有的长达3个月之久。经过热治疗的植物，必须杜绝病毒的再度侵染才能发挥作用（林传光，1981）。

（2）茎尖培养脱去病毒的方法：也可以说是一种外科手术治疗。系统感染的病毒在植物体内的分布是不均一的。病毒不能到达或不能在分生组织中增殖。把茎尖或根尖分生组织切割下来进行培养，可获得无病毒的植株。与防止病毒传染的良种繁殖制度配合，形成一种有效的防治病毒病的方法。已广泛应用于无性繁殖植物无病毒种薯和苗木的生产。我国应用茎尖脱去病毒和类病毒诊断技术以及适应各地情况的良种繁育体系，已开始大量生产无病毒种薯，基本上解决了马铃薯退化问题（田波等，1980年）。这种原理和技术对解决大多数无性繁殖植物的病毒病问题是有前途的。

（3）冷治疗：对大多数植物病毒病十分有效的热治疗和茎尖脱毒技术对类病毒病的治疗无效。根据类病毒适于在较高温度（ 30 — 35°C ）繁殖的特点，把马铃薯茎尖在 4°C 下培养2—3月，可以脱掉马铃薯纺锤形块茎类病毒。感染伤瘤病毒的三叶草在 14°C 的低温室中生长，使无病毒的枝条逐代增加，至第三代大部分植株都没有根瘤，而 27.5°C 下生长的三叶草，大部分植株都有根瘤。冷处理对类病毒病的治疗是有前途的。

2. 防止病毒传染的措施

像人类的疾病一样，植物病毒病也采取以“预防为主”

的防治方针，防止传染的措施可归纳为：

(1) 铲除侵染源：侵染源包括带毒的播种材料、同种和非同种作物的病株和病田、野生植物上的侵染源以及各种介体所携带的病毒。去除播种材料中的病毒和拔除病株在实践上可以做到，但只对那些传染缓慢的（或可控制其传染的）病毒病产生防治效果。例如，在隔离条件下繁殖无病毒的马铃薯，利用彻底拔除病株的方法防治可可肿枝病毒病。

(2) 防止介体传染：在植物病毒传染的主要介体——昆虫（蚜虫和叶蝉等）、螨、线虫和真菌中，除非持久性传染的蚜虫外，其他介体一般都可用防治介体的方法，收到控制病毒病的目的。由于非持久性传毒的蚜虫可在被杀死前完成传毒使命，因此治蚜防病没有明显效果。近年来，用银灰色薄膜忌避蚜虫的作用和油阻止蚜虫非持久性传毒的作用，可部分的防止病毒的传染。

在自然的生产条件下，防止介体传染病毒是有困难的，因此这一措施的应用受到限制。

(3) 病毒传染的隔离：可采用空间和时间的隔离使病毒侵染源与易感寄主植物分开。空间隔离包括近距离的屏障植物隔离和远距离的隔离区。前者适用于移动距离短的介体的传毒，但只能收到部分效果；后者只适用于无病毒播种材料的生产，难于普遍应用。例如用大麦作为屏障可防止黄化病毒在甜菜上的传染；马铃薯无病毒原种基地应远离一般马铃薯和其他茄科植物20公里以上。

所谓时间隔离是指通过播种期的调节和轮作，使敏感的寄主与侵染源隔离。例如冬小麦适当晚播可减少飞虱传染的丛矮病毒的传染；轮作可避免土传病毒的传染。

总之，防止病毒传染的措施应普遍提倡，但其效果因病毒而异。

3. 植物对病毒免疫性或抗病性的利用

人和动物病毒病的防治是以疫苗为主。病毒疫苗的主动免疫或通过免疫球蛋白的被动保护作用，是唯一有效的保护易感机体不受病毒感染的方法。近年来又出现了所谓“亚单位疫苗”“基因工程疫苗”和“化学合成疫苗”，它们都是决定病毒抗原性的病毒蛋白质的不同形式。由于干扰素的发现，对病毒病的防治产生了非特异性的广谱免疫的可能性，包括直接施用干扰素制剂和干扰素诱导剂两种形式，要达到实用的目的，还有许多问题要解决。

根据实践经验，植物病毒病的防治也是以免疫方法为主，即抗病品种的应用。植物对病毒的抗性表现为：免疫（高度抗病或不感染性）、抗病性、耐病性和过敏性等类型，将在第二章中介绍。由于抗病毒的品种具有较持久的防病作用和经济上的实用性，成为病毒病防治上首先要考虑的措施。当然并非所有病毒病都可通过抗病品种解决。

除抗病毒品种外，植物对病毒的感染也产生获得免疫性。弱毒疫苗引起的获得免疫性已开始在生产上应用，但仅限于株系间有高度干扰作用的病毒。

4. 植物病毒病生物防治的前景

根据植物病毒卫星（包括卫星病毒和卫星RNA）必须依赖辅助病毒才能复制、能调节辅助病毒的复制，并调节其引起的症状，和具有株系特异性等特点，我们认为病毒卫星实质上是病毒的专性寄生物。并首先实验成功用卫星RNA防治黄瓜花叶病毒引起的病害。在危害严重的CMV的基因

组RNAs中,加入卫星RNA后,可用于防治田间CMV引起的病毒。经过四年田间试验,卫星RNA可降低病情指数50%左右,产量增加20—30%。烟坏死病毒的卫星病毒也能抑制辅助病毒的复制。现已发现有将近10种病毒含有卫星RNA,这一数目还不断增加。因此,用卫星RNA作为生物防治因子的研究是有前途的(田波,1983;1984;1985)。

参考文献

- [1] 田波等,马铃薯无病毒原种生产的原理和技术,科学出版社,1980。
- [2] 林传光,林传光先生科学论文集,新土出版社,P323—328,1981。
- [3] 裘维蕃,植物病毒学,科学出版社,1984。
- [4] 田波,黄瓜花叶病毒组的卫星RNA,“病毒与农业”,田波、龚祖勋编,科学出版社,1985。
- [5] 田波,亚病毒——病毒学的一个新分枝,病毒学报,1(2),1985。
- [6] Tien Po (田波) and Chang Xiu-hua (张秀华), Control of two virus diseases by use of Protective inoculation in China, Seed Sci. and Technol., 11: 969, 1983。
- [7] Tien Po (田波) and Chang-hua (张秀华), Vaccination of Pepper with Cucumber mosaic virus; attenuated by Satellite RNA, Abstract of VI International Congress of Virology, 1984。
- [8] 邱并生、田波、丘艳、张秀华,植物病毒卫星RNA及其在病毒病生物防治上的应用 I.用加入卫星RNA的方法组建成黄瓜花叶病毒的疫苗,微生物学报,25(1),87—88,1985。

第二章 植物对病毒免疫性的类型和机理

(一) 植物对病毒免疫性的类型

1. 固有(先天)免疫性
2. 获得免疫性

(二) 植物对病毒的抗病性

1. 高度抗病性(免疫性)
2. 抗侵染
3. 抗扩展
4. 抗增殖
5. 耐病性
6. 过敏性反应
7. 对传毒介体的抗性

(三) 抗病性与病毒株系

(四) 个体发育中形成的抗病性

1. 体细胞抗病性
2. 生理抗性

(五) 抗病性的机理

1. 抗病毒因子
2. 交叉保护的机理



（一）植物对病毒免疫性的类型

植物对病毒侵染表现各种类型的免疫性。有些是植物本身固有的，称谓先天免疫性，是植物受病毒侵染前即具有的特性。病毒侵染后，寄主植物产生的免疫性称谓获得免疫性（田波，1985）。

1. 固有（先天）免疫性：大多数植物种对任一特定病毒可能表现高度抗病性，当这些植物用病毒接种后，不表现任何症状，也不能从这些植物中得到有侵染性的病毒。这类植物称谓不受感染的或免疫的。有些植物种是受感染的，可表现不同的敏感性，从无症状、各种程度的变色和抑制生长，到坏死和死亡。症状只产生于有病毒增殖的植株中，但病毒增殖不一定导致症状的出现。无症带毒可称作寄主的耐病性，使植物产量不受大的影响，但可能构成对感病植物的威胁。

各种程度的抗病性可表现为降低病毒增殖和限制病毒扩展。一般，在病毒增殖量和症状严重度之间并无相关性。因此降低病毒增殖，如不同时伴随病毒扩展的局限，并不是一种有效的抗病性，除非病毒的增殖被完全抑制。病毒扩展的高度局限性，可阻断病毒从侵染点向周围组织扩展，是一种有效的抗病性类型，称谓过敏反应。最有名的例子是烟草花叶病毒（TMV）的过敏反应，是由一单个基因控制，按孟德尔规律遗传。带有此称谓N-基因的烟草对TMV的所有株系的侵染都产生局部枯斑反应。而所有感病的种和品种都带有隐性同位基因n，产生系统的花叶症状。

上述的不感染性（或免疫性）、不敏感性（或耐病性）、抗病性和过敏性是植物在长期系统发育中形成的。对