

# 棉花皱缩花叶病的初步研究

章松柏<sup>1,2\*</sup>, 张长青<sup>1</sup>, 吴祖建<sup>2</sup>, 谢联辉<sup>2</sup>

(1. 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025; 2. 农药生物化学教育部重点实验室, 福建农林大学, 福建 福州 350002)

**摘要:** 2007年湖北荆州地区一些棉田棉花叶片上发生一种新的棉花病害, 暂定名为棉花皱缩花叶病。通过症状描述、电镜观察和生物学接种对其进行了初步分析。结果显示: 该病害症状疑似病毒病, 但与已经报道的棉花病毒病症状都不相同。电镜观察显示, 病株叶片汁液中存在4种杆状病毒颗粒, 大小分别约是 $18\text{ nm} \times 300\text{ nm}$ 、 $18\text{ nm} \times 500\text{ nm}$ 、 $18\text{ nm} \times 800\text{ nm}$ 、 $18\text{ nm} \times 1100\text{ nm}$ 。生物学接种结果表明, 该病不能经种子、棉蚜、烟粉虱、汁液摩擦4种方式传播。

**关键词:** 棉花皱缩花叶病; 电镜观察; 生物学接种

**中图分类号:** S432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)03-0048-03

## Preliminary Study on Cotton Crimple Mosaic Disease

ZHANG Song-bai<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Chang-qing<sup>1</sup>, WU Zu-jian<sup>2</sup>, XIE Lian-hui<sup>2</sup>

(1. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. Key Laboratory of Pesticide and Biochemistry, State Education Commission, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** In 2007, a virus-like disease occurred in some cotton fields of Jingzhou, Hubei province, named cotton crimple mosaic disease temporarily. By symptom observation, electron microscope observation and biological inoculation experiment, the disease was preliminarily analyzed. The results showed that the disease symptoms were similar to viral disease though different from the cotton viral disease known so far. Four different kinds of bacilliform viruses were observed through electron microscope from the sap of diseased cotton leaf and their sizes were  $18\text{ nm} \times 300\text{ nm}$ ,  $18\text{ nm} \times 500\text{ nm}$ ,  $18\text{ nm} \times 800\text{ nm}$ ,  $18\text{ nm} \times 1100\text{ nm}$ . No disease transmission was found using, cotton aphid, tobacco whitefly and sap inoculation.

**Key words:** Cotton crimple mosaic disease; Electron microscopic observation; Biological inoculation

棉花作为一种重要的经济作物, 提供了世界上绝大多数的天然纤维。我国是世界上最大的棉花生产和消费国之一, 棉花生产在整个国家经济中具有十分重要的战略地位<sup>[1]</sup>。因此, 保障棉花生产, 增加棉农收入, 十分重要。但棉花病害问题严重制约着棉花的生产和发展, 如全球范围分布的棉花枯萎病和黄萎病, 每年给棉花生产造成数十亿美元的经济损失<sup>[2]</sup>; 局部地区分布的棉花曲叶病(cotton leaf curl disease, CLCuD), 在巴基斯坦、印度等国已造成严重危害<sup>[3-5]</sup>;

其他棉花病害也不同程度制约着棉花的可持续发展。因此, 必须了解这些病害发生规律, 密切监视各种棉花病害的流行发展动态, 以便抑制主要病害的发生, 控制次要病害的发展, 保障棉花生产。

2007年在湖北省荆州地区进行棉花病虫害调查时, 发现一种新的、疑似病毒病的棉花病害, 但与已经报道的棉花病毒病皆不相同, 经相关专家初步鉴定为棉花病毒病, 暂命名为棉花皱缩花叶病。以下是研究初报, 以供参考。

收稿日期: 2009-11-06

基金项目: 长江大学基金项目(2006Z2070); 农业部农业公益性行业科研专项(nyhyzx07-051)

作者简介: 章松柏(1978-), 男, 湖北黄梅人, 讲师, 在读博士研究生, 研究方向: 分子植物病毒学。\*为通讯作者。

E-mail: yangtze2008@126.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

棉花病株采自湖北省荆州市太湖农场棉花田,病叶于 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,活株种植于防虫温室中,病株种子脱绒处理后室温保持于干燥环境中。感病品种杂交抗虫棉太 D5 号(鄂杂棉 10 号)购自荆州市农资公司;烟粉虱、棉蚜分别采自无病棉田棉花植株上,并在网室中种植的太 D5 号棉花上繁殖备用。

### 1.2 症状观察

于发病田间仔细观察发病症状,对照健康植株观察叶片颜色、叶片有无变形,叶脉是否明脉,茎秆表面和内部有无变化,植株有无矮化现象,病田有无发病中心,植株分枝情况等。

### 1.3 电镜观察

采用汁液负染法<sup>[6]</sup>:取样品组织加入 PBS 缓冲液( $\text{pH } 7.0$ )充分研磨,  $10\,000\text{ g}$  离心  $1\text{ min}$ , 取上清液备用。用铺有 Formvar 膜的电镜铜网沾取上述病毒汁液吸附  $10\text{ min}$ , 然后用滤纸吸干, 加  $2\%$  磷钨酸( $\text{pH } 7.0$ )或  $2\%$  醋酸铀( $\text{pH } 4.0$ )1 滴, 染色  $5\text{ min}$ , 再吸干, 待干燥后, 于投射电镜下观察有无病毒颗粒。

### 1.4 病毒粗提

按照吴兴泉<sup>[7]</sup>的方法粗提棉花体内的病毒。棉花叶片  $50\sim 60\text{ g}$  加  $100\text{ mL}$  PB 缓冲液( $0.1\text{ mol/L}$ ,  $\text{pH } 8.0$ , 含  $1\%$  巯基乙醇,  $10\%$  乙醇)充分研磨, 3 层纱布过滤; 取过滤液  $8\,000\text{ g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  离心  $20\text{ min}$ ; 取上清液加  $1\%$  Triton-X100,  $4^{\circ}\text{C}$  磁力搅拌  $1\text{ h}$ ;  $5\,500\text{ g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  离心  $20\text{ min}$ ; 取上清加入  $0.2\text{ mol/L}$  NaCl,  $4\%$  PEG6000,  $4^{\circ}\text{C}$  搅拌  $1\text{ h}$ , 室温静置  $1\text{ h}$ ;  $10\,000\text{ g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  离心  $30\text{ min}$ , 取沉淀悬浮于  $3\text{ mL}$  PB 缓冲液( $0.05\text{ mol/L}$ ,  $\text{pH } 8.0$ , 含  $1\%$  Triton-X 100)中, 转入另一离心管中, 并用  $2\text{ mL}$  上述缓冲液洗涤 1 次;  $8\,000\text{ g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  离心  $10\text{ min}$ , 上清液即为病毒粗提液, 于 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

### 1.5 生物学试验

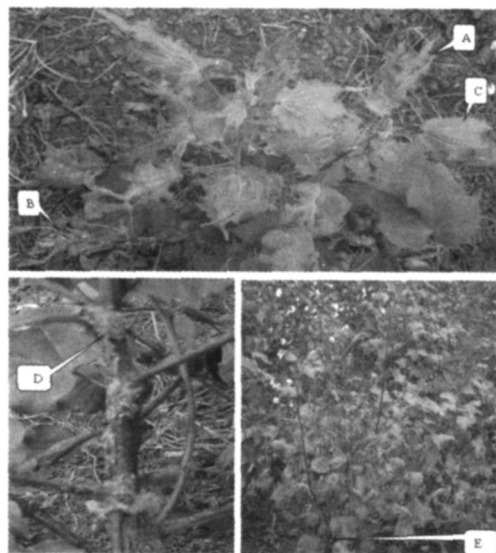
生物学接种试验在防虫温室中进行。具体操作如下: (1)种传试验, 播种在病株上采集的棉花种子, 观察有无发病; (2)棉蚜传播试验, 参考吴云峰等<sup>[8]</sup>方法, 在病毒粗提液中加入少量的蔗糖, 让棉蚜透过薄膜吸取病毒粗提液  $1\text{ h}$ , 转移棉蚜至三叶期棉花幼苗上,  $1\text{ h}$  后用药剂杀死棉蚜; (3)烟粉虱传播试验, 用密网箱收集烟粉虱后, 罩在病株枝条上, 吸食  $8\text{ d}$  后, 转移至三叶期棉花幼苗上, 集团接种, 每隔  $6\text{ h}$  拨动棉花 1 次, 确保烟粉虱接触每一株幼苗,  $5\text{ d}$  后

用药剂杀死烟粉虱; (4)汁液摩擦传播试验, 再用磷酸缓冲液稀释 10 倍后加入石英砂, 参考谢联辉等<sup>[9]</sup>方法, 选用病症明显的嫩叶剪碎, 加入适量的磷酸缓冲液( $0.05\text{ mol/L}$ ,  $\text{pH } 0.8$ )研碎过滤, 获取病株汁液  $2\text{ mL}$ , 摩擦接种 50 株棉花幼苗。

## 2 结果与分析

### 2.1 病害症状

该病发生在荆州市太湖农场部分棉花田上, 只在杂交抗虫棉太 D5 号(鄂杂棉 10 号)棉花品种上发现。发病棉花田块有明显的发病中心, 发病率为  $5\%\sim 10\%$ , 棉花病株挂桃少甚至不挂桃, 棉桃也小; 棉花病株矮化现象明显, 高度不及正常植株的  $2/3$ , 主枝生长受到抑制, 分枝较多; 病叶较正常叶片嫩绿, 脉明, 皱缩, 多带状, 少数叶片倒舌状, 晚分枝枝条上叶片有时呈线形, 叶片不能展开; 茎秆早期点状物增多, 后期则逐渐粗糙形成粗皮(图 1)。



A. 病叶明脉、皱缩、花叶, 多带状叶; B. 部分病叶倒舌状; C. 部分新生病叶线形; D. 病株茎秆粗皮; E. 植株矮化, 主茎秆不明显, 分枝增多

图 1 棉花皱缩花叶病的症状

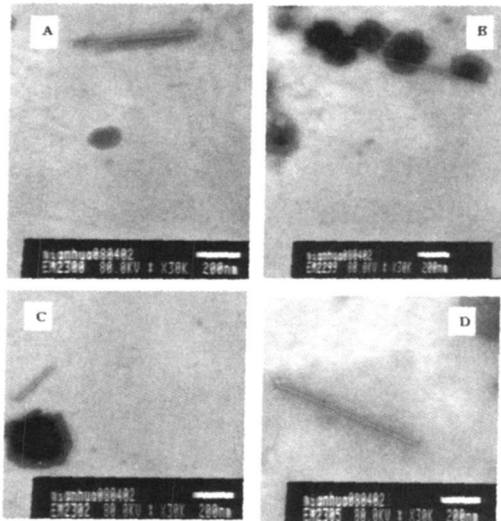
### 2.2 电镜观察结果

电镜观察显示病株叶片汁液中存在 4 种杆状病毒颗粒, 大小分别约是  $18\text{ nm}\times 300\text{ nm}$ 、 $18\text{ nm}\times 500\text{ nm}$ 、 $18\text{ nm}\times 800\text{ nm}$ 、 $18\text{ nm}\times 1\,100\text{ nm}$ (图 2)。

### 2.3 生物学试验结果

生物学接种试验分别于 2007 年和 2008 年在防虫温室中进行。种传试验播种 300 粒种子, 成活 164 株; 蚜传接种试验接种 70 株, 成活 63 株; 汁液摩擦接种 150 株, 成活 132 株; 烟粉虱传毒接种试验接种棉花 80 株, 成活 65 株。但 4 种方法接种的病

株无一发病。如果这种病害是由病毒引起的,则说明这4种传毒方式不能传播该病害。



A. 病毒粒体 ( $18\text{ nm} \times 500\text{ nm}$ ); B. 病毒粒体 ( $18\text{ nm} \times 1100\text{ nm}$ ); C. 病毒粒体 ( $18\text{ nm} \times 300\text{ nm}$ ); D. 病毒粒体 ( $18\text{ nm} \times 800\text{ nm}$ )

图2 棉花皱缩花叶病叶片汁液电镜观察结果

### 3 讨论

在诊断棉花皱缩花叶病的过程中,有些专家认为这种症状是农药2,4-D引起的。但2,4-D引起的病害往往在棉田中较大面积发生,无发病中心,而从棉花皱缩花叶病的症状上来看,是典型的病毒病症状。因此,初步认定该病害是一种植物病毒病。植物病毒病的鉴定需要做很多工作,其中关键是科赫法则。但在生物学接种试验中,4种传毒方式皆不能够传播这种病害,因此,不能够完成科赫法则所要求的程序,也就无法确定该病害是由本研究电镜观察到的4种病毒引起的。值得注意的是,病汁液中存在长达1100 nm的病毒粒体,这在病毒中比较少见<sup>[10,11]</sup>。其他几种病毒粒体是粗提过程中该病毒的断裂所致,还是不同的病毒粒体,或是多分体病毒,需要进一步研究。

许多植物病害的流行都是在人们忽视它或不认

识的情况下开始积累的,如棉花枯黄萎病、棉花曲叶病的流行和扩散。我国是世界上最大的棉花生产国和消费国,棉花总产量和总消费量均占世界的1/4。棉花安全生产非常重要,在做好栽培育种的同时,必须加强棉花病虫害的监控和管理。尽管目前我国还没有棉花病毒病发生的报道,但必须保持警惕,及时了解邻国巴基斯坦和印度棉花曲叶病的发生动态,同时投入人力、物力于棉花新发病害(如棉花皱缩花叶病)的研究,力争将新发病害拒绝于门外,或消灭在萌芽状态。

### 参考文献:

- [1] 张桂寅. 棉花黄萎病抗性表现及其基因表达的研究[D]. 石家庄: 河北农业大学, 2005.
- [2] 王红梅. 棉花抗黄萎病遗传及分子标记研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [3] Briddon R W, Markham P G. Cotton leaf curl disease [J]. *Virus Research*, 2000, 71: 151-159.
- [4] 郭荣. 对棉花生产构成严重威胁的病害: 棉花曲叶病毒病[J]. *中国植保导刊*, 2005, 25(2): 46-47.
- [5] 青玲, 周雪平. 棉花曲叶病的研究进展[J]. *植物病理学报*, 2005, 35(3): 193-200.
- [6] 夏更寿, 郭志平. 马铃薯病毒试管苗保存技术及病毒侵染力的研究[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2007, 28(4): 103-105.
- [7] 吴兴泉. 福建马铃薯病毒的分子鉴定与检测技术[D]. 福州: 福建农林大学, 2002.
- [8] 吴云峰. 植物病毒学原理与方法[M]. 西安: 西安地图出版社, 1999: 72-98.
- [9] 谢联辉, 林奇英. 植物病毒学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [10] 洪健, 陈集双, 周雪平, 等. 植物病毒的电镜诊断[J]. *电子显微学报*, 1999, 18(3): 274-289.
- [11] 洪健, 陈集双, 周雪平, 等. 植物病毒的电镜诊断(续篇)——新增植物病毒科和属及其形态学和细胞病理学特征[J]. *电子显微学报*, 2001, 20(6): 772-779.