

## 烟草曲叶双生病毒的研究\*

### I. 广西分离物的生物学特性和血清学反应

蔡健和<sup>1</sup> 王小凤<sup>2</sup> 黄福新<sup>1</sup> 林明生<sup>1</sup> 王文慧<sup>2</sup> 田波<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>广西农业科学院植物保护研究所, 南宁 530007)

(<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

烟草曲叶病已在广西九个产烟县(市)发生危害, 一般为零星发生, 局部地区平均发病率高达 50% 以上, 造成严重经济损失。试验结果表明, 此病仅可通过嫁接和烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 传染, 而汁液摩擦、种子和中国菟丝子 (*Cuscuta chinensis*) 不传病。除普通烟 (*Nicotiana tabacum*) 外, 还可侵染桔斑三生烟 (*N. tabacum* var. *zanthi* N)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 和曼陀罗 (*Datura stramonium*) 等鉴别寄主, 产生典型的曲叶症状。ELISA 检测结果表明, 病烟叶提取液与非洲木薯花叶病毒 (ACMV) 的两个单抗 (SCR 18 和 SCR 23) 呈阳性反应, 而与另外两个单抗 (ACMV SCR 11 和 ICMV (印度木薯花叶病毒) SCR 52) 呈阴性反应, 用 ACMV 单抗 SCR 18 免疫吸附法制片, 在电镜下观察到球状成对或单个的病毒颗粒, 单颗粒直径为 18nm, 成对颗粒大小为 15—18×25—30nm。

**关键词** 烟草曲叶双生病毒; 血清学关系

烟草曲叶病毒 (Tobacco Leaf Curl Virus, TLCV) 是重要的植物双生病毒之一, 主要分布于热带和亚热带地区, 温带地区亦有发生<sup>[1]</sup>。过去我国曾有初步报道, 但未进行较系统的研究<sup>[2-4]</sup>。

近三年来, 我们在广西进行烟草病害调查中, 发现在南宁、武鸣、上林、田林、那坡、武宣、罗城、南丹和荔浦等 9 个县(市) 也有该病的发生, 一般为零星分布, 但在个别县(乡) 已严重影响到烟草生产的发展。如 1990 年上林县明亮六村的冬烟平均发病率为 5% 左右; 1991 年广西农业科学院试验地种植的春烟, 到生长后期, 全田烟株染病率接近 100%。烟株早期染病, 生长受阻, 植株矮化, 基本无经济价值; 后期染病, 顶部叶片皱缩卷曲, 仅下部叶片可作烤烟, 但质量已大为下降。可见, 此病是我区乃至全国烟草生产的潜在威胁。作者对广西烟草曲叶病的传播途径, 寄主范围及其与非洲木薯花叶病毒 (ACMV) 的血清学关系进行了研究。

### 材 料 和 方 法

1989—1991 年, 我们在对烟草曲叶病的发生、分布和危害情况调查中, 采集典型曲叶症状的烟, 移栽于防虫网室, 作为研究材料。

#### (一) 传播途径

本文于 1992 年 5 月 21 日收到。

\* 广西农业科学院植物保护研究所周至宏和蒲天胜副研究员协助鉴定烟粉虱; 广西各县生产办公室有关同志协助调查, 特此致谢。

1. 嫁接:采用腹接法,以病株嫩叶或小侧芽作接穗嫁接在健康烟上,试验重复三次,共嫁接烟苗 30 株。

2. 烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 介体:供试的无毒烟粉虱先在病株上饲毒 6—24 小时,然后转移到健康烟苗 (3—4 片叶) 上传毒 24 小时,每株烟苗接种成虫 5—10 头,试验重复四次,共接种烟苗 24 株。

3. 其它:汁液摩擦、种子和菟丝子等传病试验均按常规方法进行。

## (二) 寄主范围

供试植物有普通烟 (*Nicotiana tabacum*)、枯斑三生烟 (*N. tabacum* var. *xanthi* N)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 和曼陀罗 (*Datura stramonium*),用烟粉虱或嫁接接种,每种参试植物为 6 株,试验重复三次。

## (三) 血清学关系

1. ELISA:参照 Thomas 等 (1986)<sup>[6]</sup> 的方法。

2. 免疫吸附电泳:火棉胶膜覆盖的铜网在稀释 3 倍的 ACMV 单抗 SCR 18 液滴上漂浮 1 小时 (25℃保温),吸干, PBS 漂洗 3 次,每次 5 分钟,吸干,转移到病烟叶抽提液 (嫩叶加少量金刚砂研碎,加 200μl 0.01mol/L Tris pH8.0,震荡, 12000r/min 离心 10 分钟,取上清液) 上漂浮 1 小时,吸干, PBST 洗 3 次,吸干,用 1% 醋酸铀负染 30 秒,电泳观察。

供试的 ACMV 和 I CMV 单抗和多抗由英国苏格兰作物研究所 B. D. Harrison 教授提供。

# 结 果

## (一) 田间症状观察

发病初期,顶部嫩叶微卷;以后叶卷曲加重,叶背面叶脉增生加厚,对光看叶脉呈墨绿色;生长后期叶背面产生许多耳状或叶状增生,严重者叶柄、主柄、病株茎干及杈芽扭曲,花萼及蒴果粗糙皱缩,不能正常抽花。

## (二) 传播途径

1. 嫁接:嫁接后 20 天左右,烟株便陆续开始发病,观察至 40 天,接种的三批烟苗 (共 30 株) 有 18 株发病,症状与原自然病株相同,证明嫁接可以传病。

2. 烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 介体:接种后 20 天左右,烟株开始发病,观察至 40 天,接种的 24 株烟苗共有 12 株发病,证明烟粉虱是烟曲叶病的传播介体。

3. 其它:用汁液摩擦,中国菟丝子 (*Cuscuta chinensis*) 及种子等方法进行了传毒试验,结果表明烟曲叶病不能通过上述方法传播。

## (三) 鉴别寄主症状

试验表明,除普通烟 (*N. tabacum*) 外,烟曲叶病毒还可以侵染枯斑三生烟 (*N. tabacum* var. *xanthi* N)、曼陀罗 (*Datura stramonium*) 和番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 等寄主植物,产生卷叶、叶片皱缩,叶背面有耳状增生,矮化等典型烟曲叶病的症状 (图版 I-1—3)。

#### (四) 血清学关系

ELISA 试验结果表明, 广西烟曲叶病病株提取液与 ACMV 单抗 SCR 18 呈强阳性反应, 与 SCR 23 有较弱的阳性反应, 但与 SCR 11 和 SCR 52 单抗呈阴性反应 (表 1)。这表明广西烟曲叶病毒与 ACMV 有共同的抗原决定簇, 而与 ACMV 和 ICMV 在血清学关系上又有所不同。

表 1 ACMV 和 ICMV 单抗对广西烟曲叶病毒的 ELISA 检测  
Table 1 Test of relationship of tobacco leaf curl virus Guangxi isolate with ACMV and ICMV monoclonal antibodies by ELISA

| 单抗种类<br>Monoclonal<br>antibodies | OD <sub>492</sub> |              |      |
|----------------------------------|-------------------|--------------|------|
|                                  | 病<br>Infected     | 健<br>Healthy | P/N  |
| ACMV SCR 11                      | 0.155             | 0.125        | 1.31 |
| ACMV SCR 18                      | 1.56              | 0.16         | 8    |
| ACMV SCR 23                      | 0.28              | 0.145        | 2.33 |
| ICMV SCR 52                      | 0.21              | 0.245        | 1.71 |

注: 试验重复三次

Notes: Test repeated three times

ACMV African cassava mosaic virus

ICMV Indian cassava mosaic virus

Monoclonal antibodies kindly supplied by

Prof. B. D. Harrison of SCRI, UK.

#### (五) 病毒颗粒形态

用 ELISA 强阳性反应的 ACMV 单抗 SCR 18 免疫吸附制片法, 在电镜下观察到许多球状单个或成对的小病毒颗粒, 单个颗粒的直径为 18nm, 成对颗粒大小为 15—18×25—30nm (图 4)。用健康烟叶作对照未见有这些颗粒。

### 讨 论 和 结 论

本试验结果表明, 烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 是广西烟曲叶病的传播介体。此病并能通过嫁接方式传播, 汁液摩擦、种子和中国菟丝子均不传病。据 Thomas 等 (1986)<sup>[6]</sup> 报道, ACMV 单抗与多种烟粉虱传染的植物双生病毒有阳性反应, 但反应的情况有所不同, 并提出 ACMV 单抗可用于检测其它烟粉虱传染的双生病毒。我们的试验结果表明, 广西烟曲叶病株叶片提取液与 ACMV 的两个单抗 (SCR 18 和 SCR 23) 有阳性反应, 从而证明了广西烟曲叶病病原属于双生病毒。而与另外两个单抗 (ACMV SCR 11 和 ICMV SCR 52) 为阴性反应, 说明广西烟曲叶双生病毒抗原的特异性。用免疫电镜法, 在病烟叶抽提液中发现特异的双生病毒颗粒, 进一步确认了广西烟曲叶病毒的种类。

广西地区属亚热带, 适于烟粉虱的繁殖及烟曲叶病的蔓延, 及时采取有效防治措施是当务之急。

### 参 考 文 献

- [1] Osaki, T. & T. Inouye: Tobacco Leaf Curl Virus CMI/AAB., Description of Plant Viruses. No.232, 1981.

- [2] 龚祖坝等: 科学通报, (22): 1393—1395, 1982。  
 [3] 严增余等: 植物病理学报, 13(3):57—59, 1983。  
 [4] 王智发等: 山东农业大学学报, (1—2):75—77, 1985。  
 [5] 陈瑞泰等: 烟草病虫害防治, 第 96—100 页, 山东科学技术出版社, 济南, 1988 年。  
 [6] Thomas, J. E. et al.: *J. Gen. Virol.*, 87: 2739—2748, 1986。

## STUDIES ON TOBACCO LEAF CURL VIRUS (TLCV) IN GUANGXI PROVINCE OF CHINA

### I. BIOLOGICAL PROPERTIES AND SEROLOGICAL RELATIONSHIP WITH AFRICAN CASSAVA MOSAIC VIRUS (ACMV)

Cai Jianhe<sup>1</sup> Wang Xiaofeng<sup>2</sup> Huang Fuxin<sup>1</sup> Liu Mingsheng<sup>1</sup> Wang Wenhui<sup>2</sup> Tian Po<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007)

(<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Tobacco leaf curl disease was found in nine counties of Guangxi province, in general, only a few tobacco plant was infected, but in some places, the disease incidence reached more than 50 percent, and caused great damage to the production of tobacco. It has been shown that this disease could be transmitted only by grafting and *Bemisia tabaci*, and not by seed, *Cuscuta chinensis* and mechanical inoculation. Besides *Nicotiana tabacum*, it could infect *Lycopersicon esculentum*, *Datura stramonium* and *N. tabacum* var. *xanthi* N and caused typical leaf curl symptom. ELISA test show that the leaf extract from diseased tobacco reacted positively with two Mabs (SCR 18 and SCR 23) of ACMV, but negatively with ACMV Mab SCR 11 and I CMV Mab SCR 52. I SEM showed that single or paired spherical virus particles could be trapped by Mab SCR 18 of ACMV, the single virus particles was 18nm in diameter, and the size of paired virus particles was 15—18×25—30nm. It is clear from these data that the pathogen which induced tobacco leaf curl disease belongs to geminiviruses. Further study is in progress.

**Key words** Tobacco leaf curl geminivirus; Serological relationship

### 图版说明

#### Explanation of plate

1—3. 烟草叶病毒在普通烟 (*Nicotiana tabacum*), 枯斑三生烟 (*N. tabacum* var. *Xanthi* N) 及番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 上的症状; 4. 烟草叶病毒的免疫电镜 (×125,000)。

1—3. Symptoms on *Nicotiana tabacum*, *N. tabacum* var. *Xanthi* N and *Lycopersicon esculentum* infected with tobacco leaf curl virus; 4. ISEM of tobacco leaf curl virus.