

2012年—2022年TBTv、TVDV、TBTv satRNA和TVDVaRNA在云南主要烟区的发生与分布

杨亚辉[#], 杨洁[#], 罗恒明, 刘芳, 吕婧, 陈平,
陈海如, 陈小姣*, 李凡*

(云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201)

摘要 烟草丛顶病(tobacco bushy top disease, TBTD)是一种由烟草丛顶病毒(tobacco bushy top virus, TBTv)及其卫星RNA(tobacco bushy top virus satellite RNA, TBTv satRNA)和烟草扭脉病毒(tobacco vein distorting virus, TVDV)及其伴随RNA(tobacco vein distorting virus associated RNA, TVDVaRNA)共同侵染引起的危险性病害,曾在云南很多烟区造成严重损失。本研究对烟草丛顶病及其相关病原物在云南烟草上的发生情况进行了多年的调查研究,力图对烟草丛顶病及其相关病原物的发生与分布进行追踪和分析。结果表明,2012年—2022年,烟草丛顶病在云南各大烟区仅零星发生,2019年以来已很难发现。烟草丛顶病的相关病原物主要在曾经暴发流行过病害的楚雄、保山和大理发现,且TBTv、TVDV、TBTv satRNA和TVDVaRNA在烟草上并不总是同时被检出,其中引起烟草丛顶病典型症状的TBTv+TVDV+TBTv satRNA+TVDVaRNA检出率在5%以下,TVDV的检出率最高,达30.44%,TBTv satRNA的检出率最低,为7.68%。TBTv、TVDV、TBTv satRNA和TVDVaRNA不能同时感染同一烟株可能是当前烟草丛顶病很少发生的主要原因。

关键词 烟草丛顶病毒; 烟草扭脉病毒; 烟草丛顶病毒卫星RNA; 烟草扭脉病毒伴随RNA; 发生与分布

中图分类号: S 432.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2023069

Occurrence and distribution of TBTv, TVDV, TBTv satRNA and TVDVaRNA in main tobacco planting areas of Yunnan province from 2012 to 2022

YANG Yahui[#], YANG Jie[#], LUO Hengming, LIU Fang, LÜ Jing, CHEN Ping,
CHEN Hairu, CHEN Xiaojiao*, LI Fan*

(College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract Tobacco bush top disease (TBTD) is a dangerous disease caused by a combination of tobacco bushy top virus (TBTv) and its satellite RNA (TBTv satRNA), tobacco vein distorting virus (TVDV) and its associated RNA (TVDVaRNA). TBTD has caused serious losses in the main tobacco-planting areas in Yunnan province during the past decades. In order to track the occurrence and distribution of TBTD and its causal agents, disease survey and virus detection were conducted in this study. The results showed that TBTD occurred sporadically during 2012 to 2022, and no TBTD was found since 2019. TBTD causal agents mainly occurred in Chuxiong, Baoshan and Dali, where the disease recurred several times in 1990s. TBTv, TVDV, TBTv satRNA and TVDVaRNA were not always detected on the same tobacco plant, and the detection rate of TBTv+TVDV+TBTv satRNA+TVDVaRNA, which caused typical symptoms of TBTD, was less than 5%, TVDV showed the highest detection rate of 30.44%, while TBTv satRNA had the lowest rate of 7.68%. The fact that TBTv, TVDV, TBTv satRNA and TVDVaRNA failed to simultaneously infect the same tobacco plant may be the main reason why tobacco bushy top disease rarely occurs at present.

Key words tobacco bushy top virus; tobacco vein distorting virus; tobacco bushy top virus satellite RNA; tobacco vein distorting virus associated RNA; occurrence and distribution

收稿日期: 2023-02-18

修订日期: 2023-04-03

基金项目: 国家自然科学基金(31960532,31701767,31571983);云南省院士专家工作站(202005AF150040)

* 通信作者 E-mail: 陈小姣 cxj_ziweiyan@163.com; 李凡 fanli@ynau.edu.cn

为并列第一作者

烟草 *Nicotiana tabacum* L. 是云南省主要经济作物之一, 在云南经济发展中具有独特且重要的地位, 然而病毒病严重威胁烟叶的产量、品质和经济效益^[1]。我国烟草上发现的病毒主要有烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV)、黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV)、番茄斑萎病毒 (tomato spotted wilt virus, TSWV)、马铃薯 Y 病毒 (potato virus Y, PVY)、红辣椒脉斑驳病毒 (chilli veinal mottle virus, ChiVMV)、番茄环纹斑点病毒 (tomato zonate spot virus, TZSV)、烟草丛顶病毒 (tobacco bushy top virus, TBTv)、烟草扭脉病毒 (tobacco vein distorting virus, TVDV) 等^[2-5]。自然界中烟草病毒复合侵染普遍发生, 但多种病毒复合侵染引起一种病害很少见, 烟草丛顶病是一种非常特殊的由多种病原物复合侵染引起的烟草危险性病害, 病原物分别是来自番茄丛矮病毒科 *Tombusviridae* 幽影病毒属 *Umbravirus* 的烟草丛顶病毒 (tobacco bushy top virus, TBTv) 和 *Solemoviridae* 科马铃薯卷叶病毒属 *Polerovirus* 的烟草扭脉病毒 (tobacco vein distorting virus, TVDV), 染病植株中还常发现含有烟草丛顶病毒的卫星 RNA (tobacco bushy top virus satellite RNA, TBTv_{sat}RNA) 以及烟草扭脉病毒的伴随 RNA (tobacco vein distorting virus associated RNA, TVDV_aRNA)^[6-8]。烟草丛顶病主要依靠蚜虫为媒介进行传播, TVDV 是蚜虫传播烟草丛顶病的关键因子^[9], 可以辅助其余病原物通过蚜虫传播。

烟草丛顶病最早于 1957 年在津巴布韦北部的克里旺烟区出现^[10-11], 随后, 在南非、赞比亚、马拉维、埃塞俄比亚等非洲国家以及亚洲的泰国、巴基斯坦、中国陆续发生^[12-13]。烟草丛顶病主要症状为: 烟株叶片感病前期有坏死斑出现, 叶片逐渐变小并表现褪绿或黄化, 有时可见叶缘向后翻卷, 产生疱斑, 患病烟株植株矮缩, 呈密生小叶的丛枝状塔形^[14], 只有 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 同时侵染烟草时, 才会出现烟草丛顶病的典型症状^[15], 产生上述症状的烟草, 经济价值会急剧下降。在中国, 烟草丛顶病于 1993 年首次在云南省保山市大面积暴发, 随后发生地主要集中在云南省的保山市、大理州和楚雄州, 另外昆明、玉溪、红河、普洱、文山、西双版纳及怒江等州市也有烟草丛顶病零星发生的报道。截至 2001 年, 烟

草丛顶病在云南累计发病面积达 51 300 hm², 其中 8 700 hm² 绝收, 直接经济损失高达 2.1 亿元, 已成为云南省 20 世纪 90 年代以来唯一导致大面积绝产的烟草病害^[5]。

近年来, 烟草丛顶病在田间发生较轻, 很多地方已很难看到烟草丛顶病的发生。但实践证明, 病毒病的发生流行往往具有暴发性、迁移性和间歇性等“三性”, 一旦再次暴发, 必将严重影响云南烟草产业的健康发展。因此实时监测烟草丛顶病及其相关病原物在云南烟草上的发生动态和分布情况, 对于预防烟草丛顶病乃至其他作物和其他地区相关病害的暴发流行十分重要。本研究通过调查 2012 年—2022 年间烟草丛顶病在云南省主要烟区的发生危害情况, 分析 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 在田间的发生动态与分布, 探讨烟草丛顶病在田间发生率降低的可能原因, 为预防烟草丛顶病及其相关病原物引起的其他作物病害的发生流行提供依据。

1 材料与方法

1.1 病害调查及样品采集

2012 年—2022 年对云南省昆明市、玉溪市、曲靖市、楚雄州、大理州、保山市和红河州 7 个烟区的烟草丛顶病进行了调查, 并采集疑似病毒病症状的烟草样品 1 511 份, 症状表现为坏死、丛顶、扭曲、畸形、矮化、花叶、黄化等, 样品信息见表 1, 其中 2012 年和 2013 年由于采集的样品数量过少, 与 2014 年合并统计, 2016 年和 2017 年因故未开展调查。

表 1 2012 年—2022 年在云南省 7 个州市采集的烟草病毒病样品信息

Table 1 Tobacco virus disease samples collected in seven cities/autonomous prefectures in Yunnan province from 2012 to 2022

采样年份 Sampling time	采样地区 Sampling area	样品总数/份 Total sample number
2012—2014	昆明市、玉溪市、楚雄州、大理州	280
2015	昆明市、玉溪市、楚雄州、保山市	302
2018	昆明市、玉溪市、楚雄州、保山市、大理州	226
2019	楚雄州、大理州	48
2020	楚雄州、保山市、大理州	82
2021	昆明市、楚雄州、保山市、大理州	251
2022	昆明市、玉溪市、曲靖市、红河州	322
总计 Total		1 511

1.2 方法

1.2.1 烟草样品总核酸的提取及 RT-PCR 扩增

称取 0.1 g 叶片样品,利用 CTAB 法提取烟草样品的总核酸,保存于一 20℃ 冰箱备用。

将 RNA 反转录为 cDNA,反转录体系(10 μL)包括:模板 2 μL,烟草丛顶病 4 种病原物的特异性下游引物^[16] 1 μL, ddH₂O 3 μL, 70℃ 变性 10 min, 冰浴 2 min 后,加入下列试剂: 5× M-MLV Buffer 2 μL, dNTP mixture (10 mmol/L) 和 RNase M-MLV (RNaseH⁻, 200 U/μL) 各 0.5 μL, ddH₂O 1 μL, 42℃ 保温 60 min, 70℃ 保温 15 min。

PCR 扩增体系(10 μL)包括: Taq mix 5 μL, ddH₂O 3.6 μL, 烟草丛顶病 4 种病原物的特异性上下游引物^[16] 各 0.2 μL, cDNA 1 μL。扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 根据引物确定的退火温度退火 30 s, 72℃ 1 min, 循环 35 次; 72℃ 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照记录结果。

1.2.2 克隆和测序

参照凝胶回收试剂盒说明书[生工生物(上海)股份有限公司]纯化 PCR 产物,回收目的片段与载体 pMD19-T 连接,转化大肠杆菌 DH5α,菌落 PCR 筛选阳性克隆。阳性克隆测序由生工生物(上海)股份有限公司完成,测序结果提交 NCBI 数据库进行 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 2012 年—2022 年云南省主要烟区 TBTv、TVDV、TBTvsatRNA 和 TVDVaRNA 的检出情况

除 2016 年和 2017 年外,自 2012 年起,对云南

省昆明市、玉溪市、曲靖市、楚雄州、大理州、保山市和红河州 7 个烟区的烟草丛顶病进行了调查和疑似病毒病样品的采集,共采集烟草样品 1 511 份,症状有坏死、丛顶、扭曲、畸形、矮化、花叶、黄化等。调查发现,这些年烟草丛顶病在云南 7 个烟区均为零星发生,如 2012 年在保山市的平均发病率为 2%, 2015 年在大理州的平均发病率为 1%, 但自 2019 年起,基本未见烟草丛顶病的发生。

采用 RT-PCR 技术对烟草样品中 TBTv、TVDV、TBTvsatRNA 和 TVDVaRNA 进行检测,结果发现,在 2012 年—2015 年、2018 年、2020 年—2021 年采集的烟草样品中 TVDV 的检出率最高,平均检出率为 30.44%, 其次是 TVDVaRNA, 平均检出率为 21.32%, 第三是 TBTv, 平均检出率为 7.74%, TBTvsatRNA 的检出率最低,为 7.68% (表 2)。除了 2019 年和 2020 年外,在其余年份采集的烟草样品中都检测到了 TBTv、TVDV、TBTvsatRNA 和 TVDVaRNA, 其中 TVDV 在 2012 年—2014 年、2015 年、2018 年、2020 年和 2021 年采集的烟草样品中检出率均为最高,分别达到 76.79%、10.60%、61.95%、9.76% 和 23.90%; TVDVaRNA 在 2019 年和 2022 年的烟草样品中检出率最高,分别为 14.58% 和 3.11%; 2019 年的烟草样品中没有检测到 TBTv 和 TBTvsatRNA, 2020 年的烟草样品中没有检测到 TBTvsatRNA 和 TVDVaRNA (表 2)。TVDV 在每一年的烟草样品中都能被检测到, 而 TBTv、TBTvsatRNA 和 TVDVaRNA 则在部分年份的样品中未被检测到。

表 2 2012 年—2022 年 TBTv、TVDV、TBTvsatRNA 和 TVDVaRNA 在烟草上的检出情况

Table 2 Detection results of TBTv, TVDV, TBTvsatRNA and TVDVaRNA in the tobacco samples collected during 2012 to 2022

采样年份 Sampling time	采样地区 Sampling area	样品数/份 Sample number	检出率/% Detection rate			
			TBTv	TVDV	TBTvsatRNA	TVDVaRNA
2012—2014	昆明市、玉溪市、楚雄州、大理州	280	18.93	76.79	20.00	60.36
2015	昆明市、玉溪市、楚雄州、保山市	302	1.32	10.60	2.65	3.97
2018	保山市、大理州、楚雄州、昆明市、玉溪市	226	16.37	61.95	19.91	36.28
2019	大理州、楚雄州	48	0	10.42	0	14.58
2020	保山市、大理州、楚雄州	82	3.66	9.76	0	0
2021	保山市、大理州、楚雄州、昆明市	251	5.18	23.90	2.39	15.14
2022	昆明市、玉溪市、红河州、曲靖市	322	0.31	0.31	0.31	3.11
平均 Average			7.74	30.44	7.68	21.32

2.2 2012 年—2022 年 TBTv、TVDV、TBTvsatRNA 和 TVDVaRNA 在烟草上单独及复合感染类型

通过对检测结果进行统计分析,发现 TBTv、

TVDV、TBTvsatRNA 和 TVDVaRNA 并不总是在同一烟株中同时出现,单一感染和 2~4 种复合感染的现象均有,共有 12 种感染类型: TVDV、TVDVaR-

NA、TBTv_{sat}RNA 及 TBTv 的单一感染, 总检出率为 11.77%, 其中 TVDV 单独感染的检出率最高, 达到 8.80%; 两两复合感染的类型有 TVDV+TVDV_aRNA、TVDV+TBTv、TVDV+TBTv_{sat}RNA 及 TBTv+TVDV_aRNA 共计 4 种, 总检出率为 14.76%, 其中 TVDV+TVDV_aRNA 复合感染的检出率最高, 达到 12.24%; 3 种复合感染的类型包括: TVDV+TVDV_aRNA+TBTv_{sat}RNA、TVDV+TBTv+TVDV_aRNA 和 TVDV+TBTv+TBTv_{sat}RNA 共计 3 种, 总检出率为 3.24%, 其中 TVDV+TVDV_aRNA+TBTv_{sat}RNA 复合感染检出率最高, 为 1.46%; 还有 4 种同时感染的类型 TVDV+TBTv+TVDV_aRNA+TBTv_{sat}RNA, 总检出率为 4.04% (表 3)。以上结果表明, 在 2012 年—2022 年间, 云南省的烟草样品中 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 复合感染比单一感染更普遍, 其中两两复合感染的总检出率最高, 接近 15%, 而 TVDV+TBTv+TVDV_aRNA+TBTv_{sat}RNA 复合感染的检出率较低, 在 5% 以下, 说明这些年 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 并不总是共同侵染同一烟株。除单独感染外, TVDV 共参与 7 种复合感染类型, 是田间出现频率最高的病原物, 说明 TVDV 在烟草丛顶病其他致病因子的侵染中可能起着某种重要的作用。另外, 当 TVDV 与 TVDV_aRNA 共同出现时, 与其他病原物的复合感染率也相较其他组合高(表 3)。

表 3 2012 年—2022 年 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 单独感染和复合感染检出情况

Table 3 Detection of single and mixed infection of TBTv, TVDV, TBTv_{sat}RNA and TVDV_aRNA during 2012 to 2022

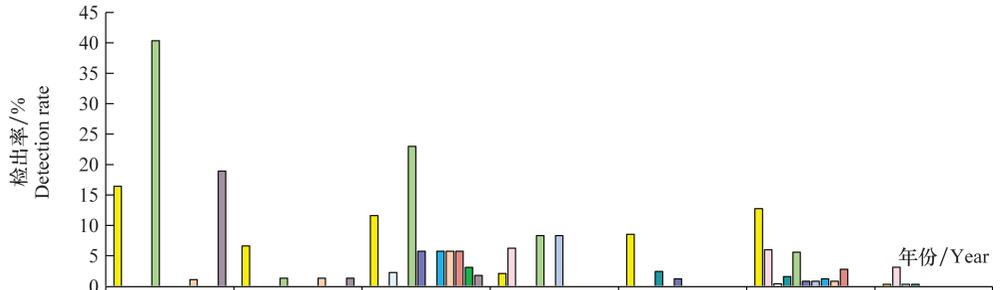
感染类型 Infection types	病原	检出率/% Detection rate
单一感染 Single pathogen	TVDV	8.80
	TVDV _a RNA	1.85
	TBTv _{sat} RNA	0.66
	TBTv	0.46
	总和	11.77
2 种复合感染 Two pathogens	TVDV+TVDV _a RNA	12.24
	TVDV+TBTv	1.06
	TVDV+TBTv _{sat} RNA	1.06
	TBTv+TVDV _a RNA	0.40
	总和	14.76
3 种复合感染 Three pathogens	TVDV+TVDV _a RNA+TBTv _{sat} RNA	1.46
	TVDV+TBTv+TVDV _a RNA	1.32
	TVDV+TBTv+TBTv _{sat} RNA	0.46
	总和	3.24
4 种复合感染 Four pathogens	TVDV+TBTv+TVDV _a RNA+TBTv _{sat} RNA	4.04

2.3 2012 年—2022 年 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 在云南烟草上的发生动态

通过对 2012 年—2022 年 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 在云南烟草上的检出情况进行分析, 不同年份的检出情况都不同, 其中每年都能检测到单独 TVDV 感染的情况, 在 2018 年和 2021 年的烟草样品中检出烟草丛顶病致病因子的类型多样。具体来说, 2012 年—2014 年以 TVDV+TVDV_aRNA 复合感染为主, 检出率为 40.36%; 2015 年以 TVDV 单独感染为主, 检出率为 6.62%, 其他类型的检出率均低于 2%; 2018 年以 TVDV+TVDV_aRNA 复合感染为主, 检出率为 23%; 2019 年主要是 TVDV+TVDV_aRNA 和 TBTv+TVDV_aRNA 的复合感染类型, 检出率均为 8.33%; 2020 年主要以 TVDV 单独感染为主, 其检出率为 8.54%, 其他感染类型检出率低于 3%; 2021 年检出的烟草丛顶病致病因子类型较丰富, 主要是以 TVDV 单独感染最多, 检出率为 12.74%, 其次为 TVDV_aRNA 检出率 5.98%, 单独感染, TVDV+TVDV_aRNA 的复合感染, 检出率为 5.58%; 2022 年只存在 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 及 TVDV_aRNA 单独感染的检出情况, 除 TVDV_aRNA 外, 其他的检出率不到 0.4%, TVDV_aRNA 的检出率也低于 4% (图 1)。2021 年—2022 年 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 在烟草上感染的检出情况逐年变化, 总体来看烟草上的检出率在减少, TBTv+TVDV+TBTv_{sat}RNA+TVDV_aRNA 复合感染检出的情况仅在 2012 年—2014 年、2015 年和 2018 年的烟草样品中出现, 2018 年后均未被检测到, 但 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 及 TVDV_aRNA 基本都能在烟草上以单独或者 2~3 种复合感染的类型被检测到。

2.4 2012 年—2022 年 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 在云南主要烟区的发生与分布

通过对云南省昆明市、玉溪市、曲靖市、楚雄州、大理州、保山市和红河州 7 个烟区 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA 和 TVDV_aRNA 检出情况的分析发现, 能够在烟草上产生烟草丛顶病典型症状的 TBTv+TVDV+TBTv_{sat}RNA+TVDV_aRNA 复合感染类型在保山市、楚雄州、大理州、昆明市和玉溪市都有发生。在红河州只能检测到 TVDV 和 TBTv_{sat}RNA, 在曲靖 TBTv、TVDV、TBTv_{sat}RNA



	2012-2014	2015	2018	2019	2020	2021	2022
■ TVDV	16.43	6.62	11.62	2.08	8.54	12.74	0.31
□ TVDVaRNA	0	0	0	6.25	0	5.98	3.11
□ TBTVsataRNA	0	0	2.26	0	0	0.40	0.31
■ TBTV	0	0	0	0	2.44	1.59	0.31
■ TVDV+TVDVaRNA	40.36	1.32	23.00	8.33	0	5.58	0
■ TVDV+TBTV	0	0	5.75	0	1.22	0.80	0
■ TBTV+TVDVaRNA	0	0	0	8.33	0	0.80	0
■ TVDV+TBTVsataRNA	0	0	5.75	0	0	1.20	0
■ TVDV+TVDVaRNA+TBTVsataRNA	1.07	1.32	5.75	0	0	0.80	0
■ TVDV+TBTV+TVDVaRNA	0	0	5.75	0	0	2.79	0
■ TVDV+TBTV+TBTVsataRNA	0	0	3.10	0	0	0	0
■ TVDV+TBTV+TVDVaRNA+TBTVsataRNA	18.93	1.32	1.77	0	0	0	0

图 1 2012 年—2022 年 TBTV、TVDV、TBTVsataRNA 和 TVDVaRNA 在云南烟草上的检出率

Fig. 1 Detection rates of TBTV, TVDV, TBTVsataRNA and TVDVaRNA on tobacco in Yunnan province from 2012 to 2022

和 TVDVaRNA 均未检测到。在保山市和楚雄州能够检测到 TBTV、TVDV、TBTVsataRNA 和 TVDVaRNA 的 12 种感染类型,在大理州、昆明市、玉溪市和红河州分别检测到 8 种、7 种、4 种和 2 种感染类型(表 4)。楚雄、保山和大理烟区过去一直是烟草丛顶病主要发生地,目前 TBTV、TVDV、TBTVsataRNA 和 TVDVaRNA 仍然在这些地区发生,且感染类型多样,当条件适合时,依然存在烟草丛顶病暴发的可能。而过去很少发生或尚未发生过烟草丛

顶病的烟区,依然是零星发生或不发生,如曲靖烟区一直未见烟草丛顶病发生的报道。综上所述,引起烟草丛顶病的 TBTV、TVDV、TBTVsataRNA 和 TVDVaRNA 在云南省大部分烟区有分布且感染类型多样,目前主要发生在云南省保山市和楚雄州,在大理州和昆明市能检测到大部分感染类型,在玉溪市和红河州检出的病原物感染类型较少,曲靖市还暂未发现 TBTV、TVDV、TBTVsataRNA 和 TVDVaRNA。

表 4 2012 年—2022 年 TBTV、TVDV、TBTVsataRNA 和 TVDVaRNA 在云南省的分布情况¹⁾

Table 4 Distribution of TBTV, TVDV, TBTVsataRNA and TVDVaRNA in Yunnan province from 2012 to 2022

感染类型 Infection type	地点 Area						
	保山市 Baoshan	楚雄州 Chuxiong	大理州 Dali	昆明市 Kunming	玉溪市 Yuxi	红河州 Honghe	曲靖市 Qijing
TVDV	+	+	+	+	—	+	—
TVDVaRNA	+	+	+	+	+	—	—
TBTVsataRNA	+	+	—	+	—	+	—
TBTV	+	+	+	—	—	—	—
TVDV+TVDVaRNA	+	+	—	+	+	—	—
TVDV+TBTV	+	+	+	+	—	—	—
TBTV+TVDVaRNA	+	+	+	—	—	—	—
TVDV+TBTVsataRNA	+	+	—	—	—	—	—
TVDV+TVDVaRNA+TBTVsataRNA	+	+	+	—	+	—	—
TVDV+TBTV+TVDVaRNA	+	+	+	+	—	—	—
TVDV+TBTV+TBTVsataRNA	+	+	—	—	—	—	—
TVDV+TBTV+TVDVaRNA+TBTVsataRNA	+	+	+	+	+	—	—

1) “+”表示此感染类型在该地区有检出,“—”表示此感染类型在该地区没有检出。

“+”indicates that the infection type is detected in the area, “—”indicates that the infection type is not detected in the area.

3 结论与讨论

烟草丛顶病是 20 世纪 90 年代以来在云南西部烟区发生的一种特殊的危险性病害, 目前在中国仅见云南有发生的报道。烟草丛顶病曾经给云南保山、大理等烟区带来了巨大的损失, 但近些年来, 烟草丛顶病在云南已经很少被发现。但由于引起烟草丛顶病的病原物种类较多, 是目前已知植物病害中病原物种类最多的一种病害, 只有 TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 同时感染普通烟‘K326’才会表现出烟草丛顶病的典型症状^[15]。另外, 研究发现, TBTv 单独感染的普通烟‘K326’主要表现为坏死, 而单独感染 TVDv 的普通烟‘K326’不表现明显症状。TBTv_{sat}RNA 缺乏复制酶不能独立完成复制, 也不能完成在植物体内的系统侵染, 而 TVDv_aRNA 自身含有复制酶单独可以进行复制, 但不含系统移动的相关蛋白, 独立情况下也无法完成在植物体内的系统移动, 但 TBTv_{sat}RNA 或 TVDv_aRNA 均可以加重 TBTv 和 TVDv 在普通烟和本氏烟上的症状^[17]。因此, 虽然 TVDv + TBTv + TVDv_aRNA + TBTv_{sat}RNA 同时侵染引起烟草丛顶病的概率降低了, 但致病因子单独感染或复合感染依然能对烟草产生不同程度的危害, 不能掉以轻心。

为探明这些年烟草丛顶病及 TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 在田间的发生情况, 并分析烟草丛顶病在田间逐渐减少乃至消失的原因, 通过对 2012 年—2022 年间(2016 年和 2017 年因故未开展) 云南省 7 个州市主要烟区烟草丛顶病发生情况的调查以及利用 TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 的特异性检测引物, 采用 RT-PCR 技术对烟草样品进行检测。发现除 2019 年和 2020 年外, TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 均有不同程度地检出, 但它们并不总是同时检出, 即使检出, 其检出率也非常低, 不到 2% (2012 年—2014 年除外), 而 2018 年后, 基本上未发现 TBTv + TVDv + TBTv_{sat}RNA + TVDv_aRNA 复合感染类型。在田间, 当前 TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 更多的情况下是以单一或 2 种复合感染的形式存在, 总检出率接近 15%, 而 3 种或 4 种组分复合感染的情况较为少见, 总检出率均在 5% 以下。由于烟草丛顶病典型症状的出现需要 TBTv + TVDv + TBTv_{sat}RNA + TVDv_aRNA 的共同侵染, 田间

TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 同时出现频率较低或消失, 可能是近些年很难在田间发现烟草丛顶病的主要原因。至于为什么 TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 在田间的检出率越来越低目前尚不得而知, 但这些年的追踪调查结果发现, TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 在田间都有一定的检出率, 所以仍然存在 TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 通过蚜虫传播而重新聚集在一起发生乃至暴发烟草丛顶病的风险。

我们前期的研究表明, TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 具有紧密的共生关系, 如 TBTv、TBTv_{sat}RNA 以及 TVDv_aRNA 均依赖于 TVDv 进行蚜虫传播, TVDv 或 TBTv 均可以帮助 TVDv_aRNA 在植物体内进行系统移动, TBTv_{sat}RNA 在植物体内的复制和系统移动依赖 TBTv, 而 TBTv_{sat}RNA 的存在能提高烟草丛顶病其他病原物的蚜虫传播效率^[17]。本实验室多年的田间样品检测结果发现, 存在只检测到 TVDv_aRNA 或 TBTv_{sat}RNA 而未检测到 TBTv、TVDv 的情况, 但检出率不高, 推测除了 TBTv 外, 可能还有其他病毒能协助 TBTv_{sat}RNA 在植物体内进行复制和系统移动, 同样的, 除了 TVDv 和 TBTv 外, 可能还存在其他病毒能协助 TVDv_aRNA 在植物体内进行系统移动的情况。由于本研究仅对与烟草丛顶病相关的 TBTv、TVDv、TBTv_{sat}RNA 和 TVDv_aRNA 进行检测, 未检测其他病原物, 故目前尚无法准确分析为什么田间植物样品存在只检测到 TVDv_aRNA 或 TBTv_{sat}RNA 而未检测到 TBTv、TVDv 的情况。本实验室前期从感染烟草丛顶病的烟草样品中还检测到了与 TVDv 同属于马铃薯卷叶病毒属的烟草马铃薯卷叶病毒 1 号 (tobacco polerovirus 1, TPV1) 和烟草马铃薯卷叶病毒 2 号 (tobacco polerovirus 2, TPV2), 检出率达到 15.15%^[15], 推测这 2 种病毒也可能具有协助 TVDv_aRNA 在植物体内进行系统侵染的能力。病毒的卫星需要辅助病毒才能在植物体内完成复制和系统移动, 一般来讲, 病毒的卫星与其辅助病毒具有一一对应关系, 但也存在一种病毒的卫星可以被另一种或多种病毒辅助完成植物体内的复制和系统移动的现象, 如幽影病毒属的花生丛簇病毒 (groundnut rosette virus, GRV) 及豌豆耳突花叶病毒 2 号 (pea enation mosaic virus 2, PEMV-2) 可以辅助彼此的

卫星 RNA 进行复制和系统侵染^[18]。我们最近的研究也发现,在 PEMV-2 的协助下,TBTVsatRNA 可以在烟草上进行系统侵染,暗示 PEMV-2 应该也能协助 TBTVsatRNA 在烟草体内的复制和系统侵染。另外,Dry 和 Behjatnia 等在双生病毒与异源卫星 DNA 的互作研究结果表明,DNA β 卫星对复制酶结合位点不具有严格的专化性,番茄曲叶病毒(tomato leaf curl virus, TLCV)的卫星 DNA 分子(tomato leaf curl virus satellite DNA, TLCV-satDNA)能被番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)、非洲木薯花叶病毒(African cassava mosaic virus, ACMV)甚至甜菜曲顶病毒(beet curly top virus, BCTV)辅助完成复制^[19-20],即一种病毒的卫星并不总是与其相应的辅助病毒同时出现,也可以被相近的病毒辅助完成复制。

调查发现,烟草丛顶病自 2019 年起即很难被发现,TBTV、TVDV、TBTVsatRNA 和 TVDVaRNA 的检出率也在相应降低,可能与烟草苗期消毒管理、田间施用蚜茧蜂防治烟蚜和培育抗病品种等田间管理措施相关^[21-23]。自 1993 年烟草丛顶病在保山烟区暴发以来,其病原物仍然主要在楚雄、保山和大理烟区发生,且感染类型多样,而过去很少发生或尚未发生过烟草丛顶病的烟区,依然是零星发生或不发生。然而 TBTV、TVDV、TBTVsatRNA 和 TVDVaRNA 也陆续在河南、西藏、海南、辽宁、陕西、内蒙古、贵州和江苏等地被发现^[24-26],说明烟草丛顶病及其相关病原物的发生地区已经不仅仅局限于云南。加之 TBTV 和 TVDV 较为广泛的寄主范围,能感染番茄 *Solanum lycopersicum*、辣椒 *Capsicum annuum*、蚕豆 *Vicia faba*、豌豆 *Pisum sativum*、油菜 *Brassica campestris* 和南瓜 *Cucurbita moschata* 等经济作物以及龙葵 *Solanum nigrum*、鬼针草 *Bidens pilosa* 和紫茎泽兰 *Ageratina adenophora* 等杂草^[15,27-28],另外,单独的 TVDV 还能感染马铃薯 *Solanum tuberosum*、三七 *Panax notoginseng*、西葫芦 *Cucurbita pepo*、藜麦 *Chenopodium quinua* 和豇豆 *Vigna unguiculata* 等^[15,29-30],上述经济作物和杂草可能是 TBTV 和 TVDV 的中间寄主,对烟草丛顶病的病害循环具有重要作用。因此,我们推测,烟草丛顶病或烟草丛顶病相关病原物引起的其他植物病害可能会在国内很多地区发生为害,应该加以防范。

参考文献

[1] 马国胜,何博如. 烟草病毒研究现状与展望[J]. 中国生态农业学报, 2006, 14(2): 150-153.

- [2] 青玲,牛颜冰,吴楚钊,等. 部分烟区烟草病毒病原检测及复合侵染分析[J]. 烟草科技, 2009(12): 58-64.
- [3] 佟爱仔,赵兴能,孔宝华,等. 2011 年云南烟草病毒病发生动态及复合侵染分析[J]. 植物病理学报, 2013, 43(1): 100-103.
- [4] 白静科,李淑君,李成军,等. 河南烟区烟草病毒病种类与分布[J]. 烟草科技, 2018, 51(10): 20-26.
- [5] 李凡,吴建宇,陈海如. 烟草丛顶病研究进展[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 385-391.
- [6] MO Xiaohan, CHEN Zhengbin, CHEN Jianping. Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of tobacco vein distorting virus [J]. Virus Genes, 2010, 41 (3): 425-431.
- [7] MO Xiaohan, CHEN Zhengbin, CHEN Jianping. Molecular identification and phylogenetic analysis of a viral RNA associated with the Chinese tobacco bushy top disease complex [J]. Annals of Applied Biology, 2015, 158(2): 188-193.
- [8] MO Xiaohan, QIN Xiyun, TAN Zhongxia, et al. First report of tobacco bushy top disease in China [J]. Plant Disease, 2002, 86(1): 74.
- [9] 刘芳,马琨玲,兰平秀,等. 从烟草丛顶病病原复合物中分离烟草扭脉病毒的方法[J]. 植物保护, 2014, 40(4): 101-106.
- [10] GATES L F. A virus causing axillary bud sprouting of tobacco in Rhodesia and Nyasaland [J]. Annals Applied Biology, 1962, 50(1): 169-174.
- [11] LUCAS G B. Diseases of tobacco [J]. Quarterly Review of Biology, 1965, 45(48): 1421.
- [12] DAVIS D L, NIELSEN M T. Tobacco-production, chemistry and technology [M]. Oxford: Blackwell Science, 1999: 196-215.
- [13] ABRAHAM A D, WULF M, BERHANU B, et al. A novel combination of a new umbravirus, a new satellite RNA and potato leafroll virus causes tobacco bushy top disease in Ethiopia [J]. Archives of Virology, 2014, 159(12): 3395-3399.
- [14] 李凡,周雪平,蔡红,等. 云南烟草丛枝病害初步研究[J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 372.
- [15] TAN Songtao, LIU Fang, LV Jing, et al. Identification of two novel poleroviruses and the occurrence of tobacco bushy top disease causal agents in natural plants [J/OL]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 21045. DOI: 10.1038/s41598-021-99320-x.
- [16] LIU Fang, TAN Guan, LI Xiaojing, et al. Simultaneous detection of four causal agents of tobacco bushy top disease by a multiplex one-step RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2014, 205(1): 99-103.
- [17] CHEN Xiaojiao, LUO Hengming, ZHANG Jingyi, et al. Synergism among the four tobacco bushy top disease casual agents in symptom induction and aphid transmission [J/OL]. Frontier in Microbiology, 2022, 13 (4): 846857. DOI: 10.3389/fmicb.2022.846857.
- [18] DEMLER S A, RUCKER D G, ZOETEN G A, et al. The satellite RNAs associated with the groundnut rosette disease complex and pea enation mosaic virus: sequence similarities and ability of each other's helper virus to support their replication [J]. Journal General Virology, 1996, 77 (11): 2847-2855.

终会进入土壤环境并在其中转化积累,导致农田土壤环境污染。药用植物能够通过根部吸收土壤中的农药转运至植株的各个器官和组织中,造成中药材中的农药残留,影响中药材质量和安全^[14]。本文通过检测药后 90、180、360 d 3 个时间点的土壤农药残留和 360 d 后苍术根茎及表皮农药残留发现,二甲戊灵及乙氧氟草醚 360 d 后才在土壤中降到安全浓度,而乙草胺处理在 90 d 后土壤中检测不到农药残留,较为安全;360 d 后苍术根茎及表皮均未检出农药残留,这表明当土壤农残降解 360 d 到安全浓度后并未向苍术药材中转移。

土壤微生物能敏感反映土壤生态系统的变化,表征土壤的健康水平。本文检测使用除草剂 360 d 后的土壤微生物情况,发现除草剂处理组与空白对照组的土壤微生物群落多样性与组成并无显著性差异,结合土壤农药残留说明 3 种除草剂使用 360 d 后对土壤已经较为安全。

综上所述,综合考虑 3 种苗前除草剂杂草防效、叶绿素荧光参数、土壤微生物群落及农药残留,发现乙草胺是较为适宜的茅苍术苗前除草剂,可以作为一种相对高效、安全的苗前除草剂。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科学出版社, 2020.
- [2] 王建, 张冰. 临床中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [3] 纪宏亮, 金钺, 张争, 等. 10 种苗前除草剂对桔梗田杂草的防

效及安全性评价[J]. 中药材, 2017, 40(4): 786 - 787.

- [4] 孙若晨. 二苯醚类除草剂土壤残留调查及其生物降解效果研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [5] 刘博静, 范小振, 田蜜. 超声萃取-气相色谱法测定土壤中乙草胺和莠去津残留量[J]. 农药, 2018, 57(11): 820 - 822.
- [6] 闫车太, 赵桂琴, 柴继宽, 等. 二甲戊灵在燕麦田土壤中的残留与消解动态[J]. 草原与草坪, 2018, 38(3): 23 - 27.
- [7] 方旭元, 夏高峰, 石巧巧, 等. QuEChERS-GC-MS 法检测当归中 9 种除草剂残留[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(6): 79 - 83.
- [8] 王维静, 杨理程, 苏思文, 等. 氟乐灵对土壤微生物、酶活性及作物生长的影响[J]. 农药, 2017, 56(7): 484 - 485.
- [9] BOLDYEN E, RIDEOUT J R, DILLON M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 852 - 857.
- [10] 罗志明, 尹炯, 邓军, 等. 2 种土壤处理除草剂对蔗田杂草的防除效果及其安全性评价[J]. 农药, 2022, 61(8): 622 - 624.
- [11] 孙云飞, 张文明, 巢建国, 等. 盐胁迫对茅苍术叶绿素含量及叶绿素荧光参数的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 146 - 149.
- [12] 唐婧文, 梁文斌, 邹辉, 等. 土壤水分胁迫对多花黄精光合作用及叶绿素荧光参数的影响[J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(5): 110 - 116.
- [13] SCHEIBER U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method; an overview [C] // PAPA-GEORGIOU G, GOVINDJEE G, eds. Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis. Dordrecht: Springer, 2004: 279 - 319.
- [14] 马畅, 刘新刚, 吴小虎, 等. 农田土壤中的农药残留对农产品安全的影响研究进展[J]. 植物保护, 2020, 46(2): 6 - 11.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 302 页)

- [19] DRY I B, KRAKE L R, RIGDEN J E, et al. A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(13): 7088 - 7093.
- [20] BEHJATNIA S A A, DRY I B, REZAIAN M A. Sequence divergence in new strains of tomato leaf curl virus resulting in replication specificity [J]. Australasian Plant Pathology, 2001, 30(4): 337 - 342.
- [21] 杨程. 云南烟区烟草病虫害的立体防治[J]. 植物医学, 2022, 1(3): 18 - 24.
- [22] 邱睿, 张昭, 李成军, 等. 烟蚜茧蜂对麦田蚜虫的防治效果[J]. 烟草科技, 2021, 54(7): 35 - 40.
- [23] 张丽芳, 赵兴能, 马美, 等. 抗烟草丛顶病转基因烟草的培育[J]. 分子植物育种, 2020, 18(5): 1605 - 1610.
- [24] MA Yan, TAN Songtao, LIU Qinli, et al. First report of tobacco vein distorting virus infecting *Eupatorium adenophorum* in China [J]. Plant Disease, 2018, 102(10): 2048.

- [25] 刘勇, 李凡, 李月月, 等. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势[J]. 中国农业科学, 2019, 52(2): 239 - 261.
- [26] LIU Qinli, LI Zhengnan, LUO Hengming, et al. First report of natural infection of tobacco bushy top virus on dahlia in China [J]. Plant Disease, 2019, 103(4): 778.
- [27] LI Yueyue, TAN Guanlin, XIAO Long, et al. A multiyear survey and identification of pepper- and tomato-infecting viruses in Yunnan province, China [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12(4): 623875. DOI: 10.3389/fmicb.2021.623875.
- [28] LI Yueyue, LIU Qinli, XIANG Dong, et al. First report of natural infection of tobacco bushy top virus on tomato and pepper in China [J]. Plant Disease, 2018, 102(7): 1466.
- [29] 杨馨, 孟钰, 李梅蓉, 等. 云南三七病毒病的发生及病毒种类检测[J]. 植物病理学报, 2019, 49(4): 456 - 464.
- [30] 马普权, 刘芳, 谭冠林, 等. 云南烟草丛顶病复合病原物的寄生范围[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2015, 30(3): 363 - 368.

(责任编辑: 田 喆)