

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2024.06.003

云南省保山市烟草病毒多样性及其危害特征

沈广材¹, 张富强¹, 郭应成¹, 董文凤²,
申莉莉², 杨金广², 焦裕冰², 宫燕伟²

1. 云南省烟草公司保山市公司, 云南保山 678000;

2. 中国农业科学院烟草研究所, 山东青岛 266101

摘要: 烟草病毒是影响烟草生产的重要病原, 常造成复杂且严重的病害。研究利用宏病毒组测序和分子检测技术, 分析云南省保山市隆阳区 2022—2023 年烟草病毒的多样性及危害特征。结果表明: 2022 年各地块烟草病毒危害情况轻于 2023 年。危害烟草的烟草病毒主要有 6 种, 分别为烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)、马铃薯 Y 病毒(Potato Virus Y, PVY)、辣椒脉斑驳病毒(Chilli Veinal Mottle Virus, ChiVMV)、番茄斑萎病毒(Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV)和烟草曲叶病毒(Tobacco Leaf Curl Virus, TLCV)。TMV 为主要优势病毒, PVY 和 ChiVMV 危害显著上升, 且部分病毒株系呈现显著的地域分化特性。研究结果为云南省保山市烟草病毒病流行机制的深入解析和科学防控提供了重要依据。

关键词: 病毒多样性; 宏病毒组;

烟草花叶病毒; 马铃薯 Y 病毒

中图分类号: S432.4

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2024)06-0023-09

Diversity and Occurrence Characteristic of Tobacco Virus in Baoshan

SHEN Guangcai¹, ZHANG Fuqiang¹, GUO Yingcheng¹,
DONG Wenfeng², SHEN Lili², YANG Jinguang²,
JIAO Yubing², GONG Yanwei²

收稿日期: 2024-01-29

基金项目: 云南省烟草公司保山市公司科技项目(2022530000242003)。

作者简介: 沈广材, 硕士, 农艺师, 主要从事烟草生产。

通信作者: 宫燕伟, 博士。

1. Baoshan Branch of Yunnan Tobacco Company, Baoshan Yunnan 678000, China;
2. Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao Shandong 266101, China

Abstract: Tobacco viruses are important pathogens that significantly impact tobacco production, often causing complex and severe diseases. This study utilized metagenomic sequencing and molecular detection techniques to analyze the diversity and harm characteristics of tobacco viruses in Longyang District, Baoshan City, Yunnan Province, from 2022 to 2023. The results showed that the virus damage to tobacco in 2022 was less severe compared to 2023. Six tobacco viruses were identified as the main pathogens: Tobacco Mosaic Virus (TMV), Potato Virus Y (PVY), Chilli Veinal Mottle Virus (ChiVMV), Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), Cucumber Mosaic Virus (CMV), and Tobacco Leaf Curl Virus (TLCV). TMV was the dominant virus, while the damage by PVY and ChiVMV increased significantly. Furthermore, some virus strains exhibited distinct characteristics of regional differentiation. The findings provide important insights into the viral epidemic mechanisms in tobacco plants in Baoshan, Yunnan, and offer valuable data for effective control strategies.

Key words: virus diversity; macro virus set; Tobacco Mosaic Virus; Potato Virus Y

植物病毒单独或混合侵染烟草引起的病毒病害是烟草生产中最常见且防治最困难的病害之一。我国已报道烟草病毒 31 种, 并发现多个分离物, 田间复合侵染加剧了病害的复杂性和危害性^[1], 经济损失超过病虫害造成的总损失的 1/3^[2]。烟草是云南、四川、贵州等省的重要经济作物。随着种植结构调整和气候变化, 特别是干旱和设施农业的发展, 媒介昆虫的增多导致病毒病长期流行, 病毒种类日益复杂。烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)和马铃薯 Y 病毒(Potato Virus Y, PVY)依然是各烟区的优势病毒; 此外, 自 1992 年番茄斑萎病毒(Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)首次在四川发生后, 通过蓟马传播, 该病毒的危害已扩展至云南、贵州、黑龙江、山东等地^[3-7]。辣椒脉斑驳病毒(Chilli Veinal Mottle Virus, ChiVMV)由蚜虫传播, 自 2011 年首次在云南发生后, 迅速蔓延至四川、重庆、贵州等省(市)^[8-13], 成为烟草生产中需重点关注的病毒; 粉虱传播的烟草曲叶病毒(Tobacco Leaf Curl Virus, TLCV)在广西、云南、四川局部地区危害较重^[14-15]。烤烟是云南省保山市隆阳区的主要支柱产业之一, 在经济总收入中占比较高。2023 年全区植烟面积为 6 200 hm², 分布在蒲缥、丙麻、板桥、西邑、汉庄、杨柳和水寨。受气候变暖、种植结构调整和城乡变迁等因素的影响, 植物病毒的寄主范围扩大, 媒介昆虫增多^[16]。近年来, 烟草病毒病种类和危害范围逐步扩大, 精准诊断变得更加困难, 亟需明确病毒种群结构和危害特征, 为烟草病毒的有效防控提供科学依据。

宏病毒组测序通过特殊方法将样品中的病毒与其他微生物分离, 提取核酸进行高通量测序, 将测序结果与现有文库比对, 以分析样本中病毒的种群结构。宏病毒组已成为绘制病毒图谱和鉴定新病毒的重要技术^[17]。宏病毒组测序在感病葡萄中发现了新的葡萄灰皮诺病毒(Grapevine Pinot Gris Virus, GPGV)^[18]; 在猕猴桃病样品中检测到 8 种已知病毒, 并首次发现 3 种侵染猕猴桃的病毒^[19]; 在河南感病苹果树中鉴定到 5 种苹果病毒、1 种柑橘病毒及 7 种真菌病毒^[20]; 江苏地区豆蚜携带 19 种昆虫病毒和包括新的弹状病毒(Aphis Craccivora Associated Rhabdo Virus, AcARV)在内的 5 种植物病毒^[21]。本研究旨在明确保山市隆阳区烟草病毒的种群结构和危害特征, 开展病毒宏基因组分析及主要种类的危害特征研究, 以为病害流行预警和防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 引物

根据病毒的基因组序列,采用 Primer 5.0 设计合成特异性检测引物 F1/R1 及扩增外壳蛋白引物 F2/R2. 引物合成和测序由青岛蔚来生物科技有限公司完成.

1.2 田间烟草病毒病病情调查

2022—2023 年,采用大田普查法分别对云南省保山市隆阳区板桥、蒲缥、汉庄、丙麻、西邑这 5 个烟站种植的“云烟 116”“云烟 300”“红花大金元”“K326”“云烟 99”“云烟 105”进行病情调查. 每个烟站调查 1~3 块地,每地块采用随机 3 点取样方法,每点不少于 30 株. 根据典型症状判定病害种类,以株为单位,逐株记录发病级别,按式(1)和式(2)计算发病率和病情指数^[4].

$$\text{发病率}(\%) = \frac{\text{发病株数}}{\text{调查总株数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{病害级别})}{\text{调查总株数} \times 9} \times 100 \quad (2)$$

1.3 病叶采集、PCR 检测及毒株鉴定

每个地块采集疑似病毒症状的病株叶片,同类型重复取样 3 株. 每次采样后更换手套,并单独封存样品,同时记录症状及疑似病毒类型. 2022 年共取样 69 份,2023 年共取样 97 份. 提取病叶总 RNA,反转录为 cDNA,使用特异性引物配置 PCR 体系,依据琼脂糖凝胶电泳结果分析产物片段大小,从而鉴定病毒种类^[5]. 对每种病毒选取 1~3 个阳性样品,扩增 CP 基因并进行测序. 将测序结果提交 NCBI 进行比对,并以主要分离物为外群,使用 MEGA 7.0 软件构建分子进化树^[7, 10].

1.4 烟草病叶宏病毒组测序分析

2023 年,在 5 个烟站采集的感病植株病叶被混合为 1 个样品,并通过干冰冷冻后寄送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行宏病毒组测序^[19-20, 22]. RNA 基因组经过反转录和二链合成后转化为双链 cDNA,并进行 RNA 建库. 经质检合格的文库使用 Illumina 平台进行测序. 测序结果通过 SOAPaligner, BWA 等软件进行处理,首先将 clean reads 比对到宿主基因组,去除宿主序列,再比对到病毒参考数据库,从而快速获得样本中的病毒分类信息. 使用 Prokka 预测病毒 contigs 上的基因序列,并将预测的基因蛋白序列与 UniProtKB/Swiss-Prot/KEGG 数据库中的病毒序列比对,进而获得功能注释信息.

2 结果与分析

2.1 保山市烟草病毒典型病症及 PCR 检测结果

2022—2023 年,通过普查 5 个烟站发现了 6 种主要病毒病害,分别为 TMV, PVY, ChiVMV, TSWV, CMV 和 TLCV. TMV 引起沿叶脉的黄绿相间斑驳花叶,叶片轻微变形并出现深绿色斑块; PVY 引发退绿环斑、轻微花叶、叶脉坏死和叶片皱缩; ChiVMV 导致叶片褪绿、黄化,表现为圆形亮斑及病斑连片变褐坏死; TSWV 引起半边叶点状密集坏死、不对称生长,顶芽坏死并侧倒,茎秆半边坏死及髓部变黑; CMV 导致疱斑畸形、鼠尾叶,叶片变薄并出现橡叶纹坏死; TLCV 引起严重曲叶、叶脉不规则增厚肿大及皱褶增生(图 1).



图1 保山市烟区烟草病毒病害典型症状

2022年,在69份病叶中检测到5种病毒.其中, TMV, CMV, PVY和ChiVMV的产物大小分别为480 bp, 380 bp, 300 bp和1 706 bp; TSWV在两条双义链(M, S)上的3个基因(NS_m, N和NS_s)产物大小分别为910 bp, 770 bp, 1 000 bp. 2023年,在97份病叶中,除了检测到2022年报道的5种病毒外,还在西邑“云烟105”病叶的DNA中发现双生病毒TLCV, PCR产物大小为500 bp(图2).

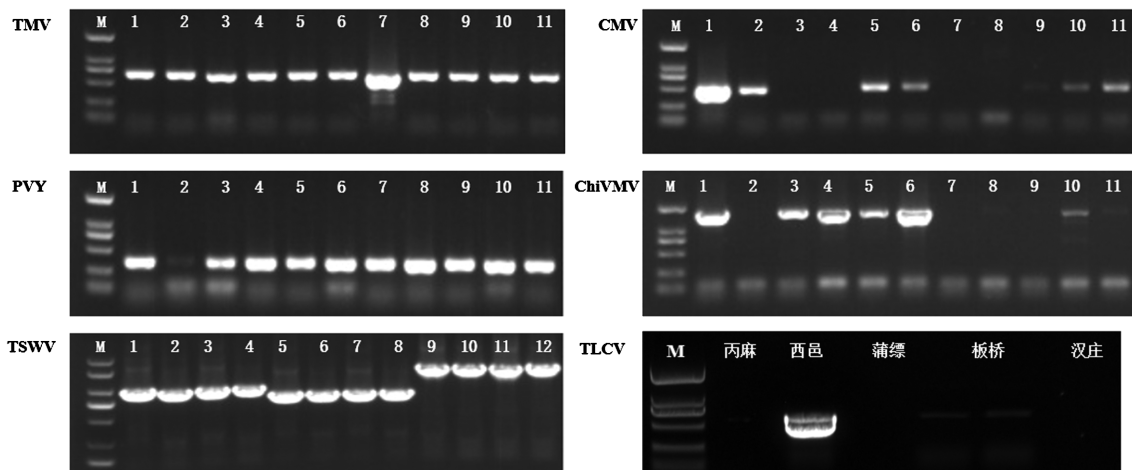


图2 保山市烟草病毒病叶PCR产物凝胶电泳

2.2 保山市烟草病毒分离物的分子进化

对板桥、蒲缥、汉庄、丙麻和西邑5个烟站采集的97份烟草病叶样品进行PCR检测和外壳蛋白(CP)基因测序.结果表明, TMV, PVY, CMV和TSWV是主要病毒种类. TMV-baos-

han 与 NCBI 数据库比对后,进行系统发育分析,发现其与 15 个代表性序列^[23]中的 X68110.1, GQ280795.1, HE818443.1, NC001367.1, AY360447.1, AF165190.1 聚为一大分支,相似度 96%,与 HE818443.1 Jimo(U1 株系)相似度最高. PVY-baoshan 与 8 个株系(NTN-NW, N:O, N-Wi, O, C, NTN, N 和 NTN-N)进行系统发育分析^[24],发现与 NTN-NW 株系的基因序列一致性最高,相似度为 72%. CMV-baoshan 与 19 个 CMV 株系及 1 个外群(TSWV-CP)进行系统发育分析^[25],发现与 IA 株系的基因序列一致性最高,聚为一分支,相似度为 97%. TSWV-baoshan 与 12 个代表株系^[26]的 CP 基因进行系统发育分析,发现其与 KC294570 Yunnan 株系的基因序列一致性最高,聚为一分支,同源性达到 94%(图 3).

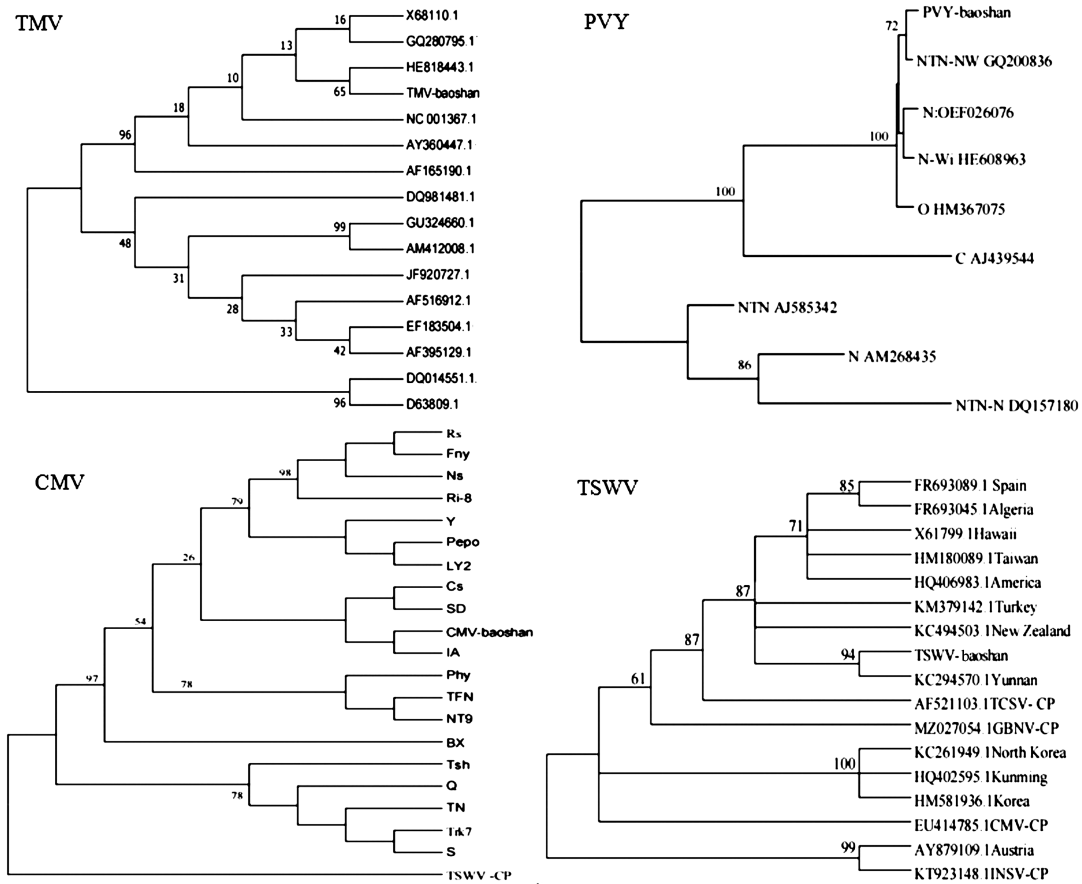


图 3 保山市烟草病毒分离物的系统进化树

2.3 保山市烟草病毒的危害特征

2022 年 8 月上旬,对板桥、蒲缥、汉庄和丙麻 4 个烟站的 7 块病地进行病情分类统计,发现 5 种病毒,发病严重程度从高到低依次为 TMV, PVY, CMV, ChiVMV 和 TSWV. 2023 年 6 月下旬,对西邑、蒲缥、丙麻、板桥和汉庄 5 个烟站的 13 块病地进行病情统计,发病严重程度从高到低依次为 TMV, ChiVMV, TSWV, PVY 和 CMV(图 4).

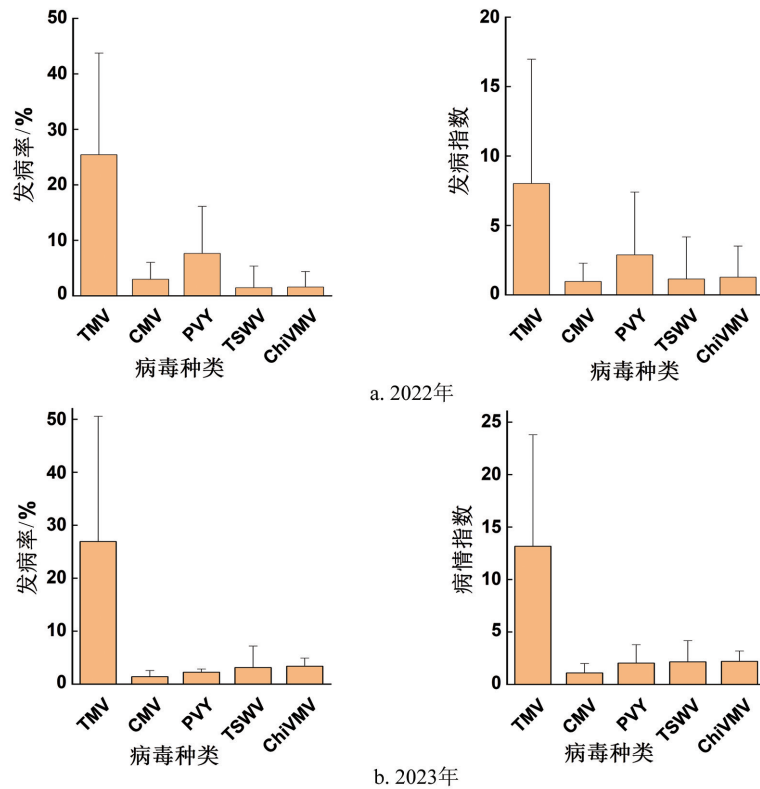


图4 2022—2023年保山市烟区病毒病发病情况

2.4 病毒组信息、群落结构、病毒基因预测及功能注释

2023年,保山市烟草病叶宏病毒组RNA测序共检测到7种植物病毒,包括6种已知烟草病毒TMV, PVY, TSWV, ChiVMV, CMV和番茄环纹斑点病毒(TZSV),以及1种新侵染烟草的水稻病毒属(*Oryzavirus*) dsRNA病毒——水稻齿叶矮缩病毒(Rice Ragged Stuntvirus, RRSV). 在病毒属水平上,马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*)、番茄斑萎病毒属(*Orthospovirus*)、烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)的相对丰度分别为62.88%, 11.91%和3.91%(图5).

利用MEGAN的SEED数据库对病毒基因进行功能预测. 注释结果显示,在生物过程条目中,细胞过程、代谢过程和生物调节相关基因的占比较高. 在细胞组分条目中,病毒粒子和含蛋白复合物的基因占比较高,这些基因在维持病毒复制和生理结构方面起重要作用. 在分子功能条目中,催化活性、结合和转运体活性相关基因占比较高,这些过程在不同程度上影响了病毒在植物体内的侵染和复制能力(图6).

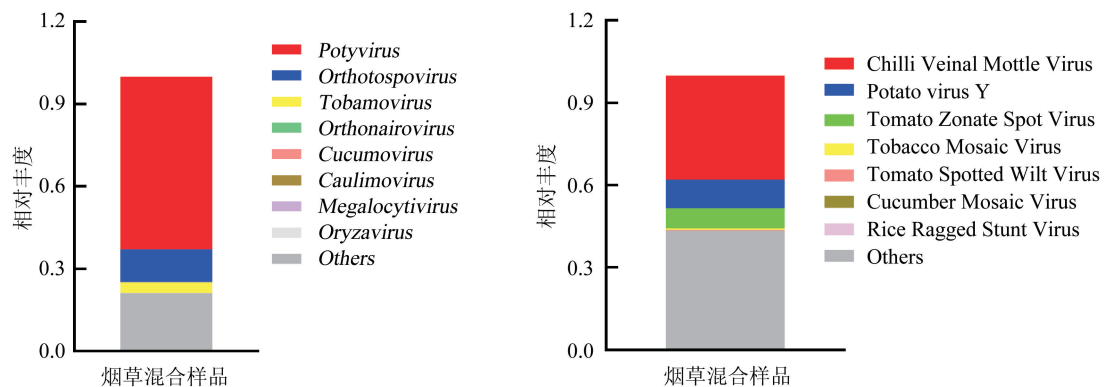


图5 宏病毒组物种注释结果

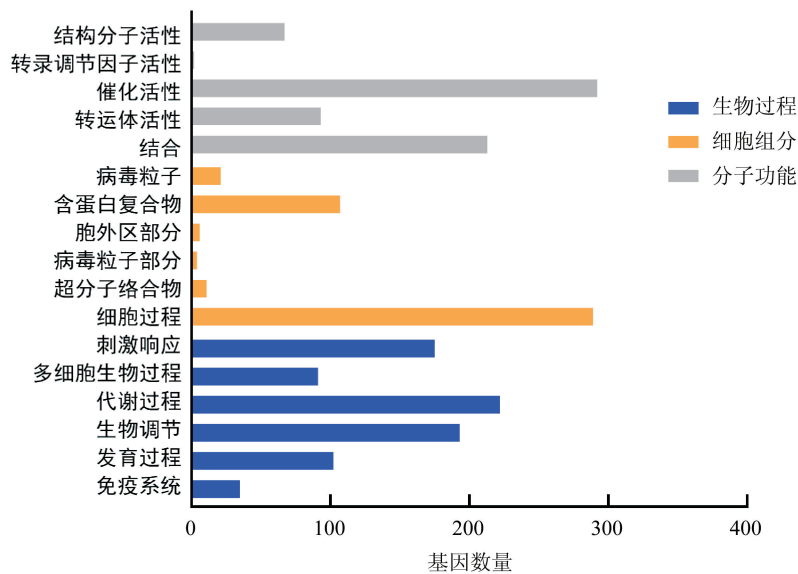


图 6 病毒基因组在数据库中的注释结果

3 结论与讨论

中国各烟区气候、种植制度、烟草类型及品种差异较大,导致主要病毒种类和株系的不同。北方和黄淮烟区以 TMV 和 PVY 为主,西南烟区为 TSWV 和 TLCV,以及近年迅速蔓延的 ChiVMV。研究显示,河南烟区主要发生 TMV, CMV, 烟草蚀纹病毒(Tobacco Etch Virus, TEV), PVY 和烟草脉带花叶病毒(Tobacco Vein Banding Mosaic Virus, TVBMV), 其中 TMV 为优势种,单一病毒侵染率为 26.86%,复合侵染率为 61.84%^[9]。PVY 侵染烟草表现为普通花叶、点刻条斑、脉坏死和茎坏死 4 种类型^[15]。云南烟草 TSWV 分离物呈多样性^[10],由于株系分化变异频率高,以及 Sw-5 型抗病番茄和 Tsw 型抗性辣椒品种的种植,已出现突破 Sw-5 抗性的毒株 TSWV-A^[27],以及克服 Tsw 抗性并引起辣椒系统性绿斑的分离物 YN53^[28]。TLCV 分离物在烟草上的症状主要分为 I 类(严重曲叶和杯状增生物)、II 类(叶色淡绿、窝状凹陷和针状增生物)、III 类(叶片革质和脉间狭小突起增生)和 IV 类(叶脉不规则增厚肿大和绿色褶皱增生)^[15]。ChiVMV 分离物根据 CP 序列分为 I, II 和 III 三类群体,种群分化与寄主种类无显著相关性,但地域特征明显,云贵川地区烟草分离物亲缘关系较近^[10-13]。

本研究通过病害症状、PCR 检测和 CP 序列,确定 TMV, PVY, CMV 和 TSWV 为保山市隆阳烟区的主要病毒种类,分别与 U1, NTN-NW, IA 和 KC294570 Yunnan 分离物相似度最高。田间试验结果显示, TMV 发病率最高, PVY 导致的脉坏死危害较重, TSWV 和 ChiVMV 从少数烟站零星发生上升至广泛存在, CMV 危害较轻,中后期 TMV 易与其他病毒混合感染。前期 TMV 主要通过接触传播,而蚜传病毒 PVY, ChiVMV 和 CMV 较轻,这与释放烟蚜茧蜂(*Aphidius* sp.)有效防控媒介有关;后期 PVY 的危害上升, TSWV 表现为光杆且一侧坏死的重病株,易与青枯病混淆。

农事操作、品种抗性和传毒介体是导致病毒病流行的主要因素。移栽后接触传播可导致 TMV 在 3 周内迅速爆发;蚜传病毒 PVY 的发病率和病情指数与有翅蚜迁飞及蚜虫虫口密度密切相关^[3]。高温干旱时蓟马数量增加,导致 TSWV 爆发^[7]。本研究对隆阳烟区 5 个烟站 2 年

的病情统计表明,地块间的农事操作、品种抗性、间作/临作物以及媒介昆虫的差异显著影响病毒种类和危害程度.通过持续的系统调查、数据转换和建模,为各因素赋予权重,明确其在病毒病流行中的作用,可为病害源头控制和节点防控提供科学依据.

虽然宏基因组无法评估病毒对宿主的适应性,但能快速鉴定样本中的所有病毒及优势病毒,已成为病毒快速诊断、新病毒发现和流行预警的重要技术^[21].本研究利用宏病毒组技术从保山市隆阳区烟草混合病叶中鉴定到6种已知烟草病毒,分别为TMV, PVY, TSWV, TLCV, ChiVMV和CMV,以及新侵染烟草的水稻病毒属RRSV.在属和种水平上,其结果较普查记录和检测更为多样.对于丰富度较高的马铃薯Y病毒属的PVY和ChiVMV、番茄斑萎病毒属的TSWV和TZSV,应加快抗性种质筛选,并持续监测病毒变异及抗性突破株.

云南省保山市隆阳区烟草的病毒种类丰富多样,其中TMV发病率最高, PVY可导致脉坏死,危害最重. TSWV和ChiVMV由零星发生上升为各烟站常见的重病株, CMV危害较轻, TLCV仅在局部地块重发,并为新发现类型.农事操作、品种抗性及其虫媒种类显著影响病情发展.

参考文献:

- [1] SCHOLTHOF K B G, ADKINS S, CZOSNEK H, et al. Top 10 Plant Viruses in Molecular Plant Pathology [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(9): 938-954.
- [2] 王凤龙, 周义和, 任广伟. 中国烟草病害图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- [3] 姚革. 四川晒烟上发现番茄斑萎病毒(TSWV)[J]. *中国烟草*, 1992, 13(4): 2-4.
- [4] 刘雅婷, 郑元仙, 李永忠, 等. 番茄斑萎病毒在烟草植株上症状学特征[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(19): 190-193.
- [5] 高雪, 王偲博, 李正洋, 等. 云南省烟草正番茄斑萎病毒属病毒的调查和鉴定[J]. *中国烟草学报*, 2020, 26(1): 84-90.
- [6] 段艳茹, 杨军章, 游堂贵, 等. 昭通烟区番茄斑萎病毒病流行与西花蓟马数量关系研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2020, 35(6): 950-956.
- [7] 张万红, 冯佳, ALI KAMRAN, 等. 山东烟区首次发现番茄斑萎病毒侵染[J]. *中国烟草科学*, 2020, 41(5): 87-91.
- [8] DING M, YANG C, ZHANG L, et al. Occurrence of Chilli Veinal Mottle Virus in *Nicotiana Tabacum* in Yunnan, China[J]. *Plant Disease*, 2011, 95(3): 357.
- [9] YANG J, DONG J, ZHANG T, et al. A New Isolate of Chilli Veinal Mottle Virus that Infects Tobacco in China[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2013, 95: 187-190.
- [10] JIAO Y B, XU C T, LI J L, et al. Characterization and a RT-RPA Assay for Rapid Detection of Chilli Veinal Mottle Virus (ChiVMV) in Tobacco[J]. *Virology Journal*, 2020, 17(1): 33.
- [11] 杨洁, 马清遵, 孟钰, 等. ChiVMV在滇重楼上的首次发现及部分基因序列分析[J]. *植物病理学报*, 2022, 52(1): 17-24.
- [12] 田绍锐, 温玉霞, 马婷, 等. 重庆地区烟叶辣椒脉斑病毒检测与鉴定[J]. *烟草科技*, 2023, 56(1): 33-38.
- [13] 陈越, 朱迪, 李婷婷, 等. 贵州黔西南烟草中辣椒脉斑病毒的鉴定及遗传多样性分析[J]. *植物病理学报*, 2023, 53(6): 1072-1082.
- [14] 蔡健和, 王苏燕, 王小凤, 等. 番茄曲叶病及其血清学和PCR测定[J]. *微生物学报*, 1995, 35(5): 394-396, 399.
- [15] 朱贤朝. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [16] LEFEUVRE P, MARTIN D, ELENA S, et al. Evolution and Ecology of Plant Viruses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 632-644.
- [17] 徐志伟, 魏云林, 季秀玲. 病毒宏基因组学研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2560-2570.

- [18] GIAMPETRUZZI A, ROUMI V, ROBERTO R, et al. A New Grapevine Virus Discovered by Deep Sequencing of Virus- and Viroid-Derived Small RNAs in Cv Pinot Gris[J]. *Virus Research*, 2012, 163(1): 262-268.
- [19] 温少华. 猕猴桃宏病毒组学分析及三种新发生病毒的分子特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [20] 夏炎, 黄松, 武雪莉, 等. 基于宏病毒组测序技术的苹果病毒病鉴定与分析[J]. *园艺学报*, 2022, 49(7): 1415-1428.
- [21] 朴君, 靳道然, 朴敬爱, 等. 宏病毒组测序检测豆蚜田间种群病毒种类[J]. *华北农学报*, 2023, 38(3): 191-198.
- [22] 张松. 基于宏病毒组学技术的柑橘病毒多样性及其分子进化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2022.
- [23] 周向平, 许清孝, 刘峰, 等. 永州烟区烟草花叶病病毒株系调查与分析[J]. *湖南农业科学*, 2021(11): 5-9.
- [24] 赵淑娟. 黑龙江省烟草马铃薯 Y 病毒株系鉴定[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2012.
- [25] 刘媛媛. 黄瓜花叶病毒和花生斑驳病毒分子变异分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [26] 默宁. 陕西杨凌地区番茄斑萎病毒鉴定及抗性遗传分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [27] HOFFMANN K, QIU W P, MOYER J W. Overcoming Host- and Pathogen-Mediated Resistance in Tomato and Tobacco Maps to the M RNA of Tomato Spotted Wilt Virus[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(2): 242-249.
- [28] JIANG L, HUANG Y, SUN L, et al. Occurrence and Diversity of Tomato Spotted Wilt Virus Isolates Breaking the Tsw Resistance Gene of *Capsicum chinense* in Yunnan, Southwest China[J]. *Plant Pathology*, 2017, 66(6): 980-989.

责任编辑 苏荣艳