

植物保护

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). GAO Xue, WANG Sibao, LI Zhengyang, et al. Investigation and identification of Orthotospovirus on tobacco in Yunnan province, China [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2020, 26(1). doi: 10.16472/j.chinatobacco.2019.164

云南省烟草正番茄斑萎病毒属病毒的调查和鉴定

高雪¹, 王偲博¹, 李正洋², 杨宝菊¹, 飞进强¹, 刘雅婷^{1*}

1 云南农业大学, 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201;

2 云南省测绘地理信息局地图院, 云南 昆明 650034

摘要: 【背景和目的】烟草是云南省支柱产业, 近年来烟草斑萎类病害发生严重。了解烟草斑萎类病害在云南的病原种类、病害发生、流行和分布势在必行。【方法】2012 以来, 本课题组从云南省 10 个地州市共采集疑似 *Orthotospovirus* 属病毒感染的烟草样品 38 份, 采用症状学观察、酶联免疫吸附反应以及 RT-PCR 鉴定。【结果】结果显示有 20 份烟草样品感染 *Orthotospovirus* 属病毒, 其中番茄斑萎病毒单独感染样品 11 份、朱顶红褪绿环斑病毒单独感染样品 4 份、番茄环纹斑点病毒单独感染样品 2 份、马蹄莲褪绿斑病毒单独感染样品 2 份、番茄斑萎病毒和朱顶红褪绿环斑病毒复合感染 1 份。【结论】本研究首次报道朱顶红褪绿环斑病毒感染烟草, 同时发现番茄斑萎病毒和朱顶红褪绿环斑病毒复合感染烟草, 鉴定结果对于科学制定烟草斑萎病害综合防治措施, 保障云南省烟草种植业的持续健康发展具有重要意义。

关键词: 正番茄斑萎病毒属; 烟草; 酶联免疫吸附反应; RT-PCR; 鉴定

烟草, 是云南省的一种重要的经济作物, 其种植面积和产量位居中国首位^[1]。然而, 正番茄斑萎病毒属病毒 (*Orthotospoviruses*) 是一类重要的植物病原物, 严重危害云南烟草产业, 属于正番茄斑萎病毒属 (*Orthotospovirus*), 番茄斑萎病毒科 (*Tospoviridae*), 布尼亚病毒目 (*Bunyavirales*)^[2]。烟草感染正番茄斑萎病毒属病毒后, 出现烟叶坏死、畸形、褪绿、顶芽坏死等症状, 影响烟草的经济效益^[3]。*Orthotospovirus* 属病毒主要通过蓟马以持久增殖型方式传播^[4], 在田间可传播该属病毒的蓟马属于缨翅目 (*Thysanoptera*) 蓟马科 (*Thripidae*) 的花蓟马属 (*Frankliniella*) 和蓟马属 (*Thrips*), 主要有西花蓟马 (*Frankliniella occidentalis*)、花蓟马 (*Frankliniella intonsa*)、棕榈蓟马 (*Thrips palmi*)、烟蓟马 (*Thrips tabaci*), 细角带蓟马 (*Taeniothrips eucharii*)^[5]等, 郑雪^[6]等人研究发现, 云南省烟田中正番茄斑萎病

毒属病毒的传毒蓟马主要是烟蓟马和花蓟马等。

1915 年, Brittlebank 在澳大利亚的番茄植株上发现了一种新的病害症状“斑驳、萎蔫”, 这是关于番茄斑萎病毒病的最早描述^[7]。1930 年, Samuel^[8]等人确定了引起这种症状的原因是由于病毒感染, 将该病毒命名为“番茄斑萎病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)”。截止目前, 该属有 31 种病毒被发现及鉴定, 其中 18 个确定种和 13 个暂定种^[9]。*Orthotospovirus* 属病毒粒子呈球状, 直径约为 80-120 nm; 粒体外层由一层脂质包裹, 脂质由两种被称为糖蛋白 (*Glycoprotein*, Gn/Gc) 的多糖蛋白组成; 脂膜内部为核壳体蛋白 (*Nucleocapsid protein*, N) 构成的病毒衣壳^[10]。N 蛋白是 *Orthotospovirus* 属病毒中最保守的蛋白, N 蛋白序列相似值是用于鉴定种和血清组划分的主要依据^[11]。*Orthotospovirus* 属病毒寄主范围广泛, 其代表种番茄斑萎病毒 (*Tomato*

基金项目: 云南省重点项目 (2018FA019); 国家自然科学基金资助项目 (No.31471828, No.31260451)

作者简介: 高雪 (1990—), 硕士研究生, 主要从事植物病理研究, Tel: 18788545601, Email: xuegao2016110008@126.com

通讯作者: 刘雅婷 (1971—), 博士, 教授, 主要从事植物病原微生物与寄主互作研究, Tel: 13888984101, Email: liuyating66@163.com

收稿日期: 2019-05-27; 网络出版日期: 2020-01-21

spotted wilt virus, TSWV) 每年可造成达 10 亿美元的巨大经济损失, 已被列为世界危害最大的 10 种植物病毒之一^[12]。近年来, RT-PCR 检测是诊断鉴定 *Orthotospovirus* 属病毒的重要方法^[13], 同时, 可以通过制备高效价的核壳体蛋白抗体进行该属病毒种类检测^[14]。

在烟草上, 国内最早是 1992 年姚革^[15]在四川的晒烟上发现 TSWV, 2010 年 Dong^[16]等人报道了 TSWV 侵染云南烟草, 2011 年蔡健和^[17]等人首次报道番茄环纹斑点病毒 (Tomato zonate spot virus, TZSV) 侵染中国广西烟草, 同年张仲凯^[18]等人报道 TZSV 侵染云南烟草, 2012 年刘雅婷等^[19]发现云南文山和楚雄烟草上感染了马蹄莲褪绿斑病毒 (*Calla lily chlorotic spot virus*, CCSV)。由此可见, 烟草上 *Orthotospovirus* 属的病毒种类在增加。

本研究自 2012 年以来对云南省烟草种植区的病害进行调查, 采集疑似感染 *Orthotospovirus* 属病毒的烟草样品。采用酶联免疫吸附测定和 RT-PCR 方法鉴定, 生物信息学分析序列并构建系统发育树, 确定侵染烟草的正番茄斑萎病毒属病毒的种类。为云南省正番茄斑萎病毒属病毒的防控提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

2012 年以来, 从云南省昭通、昆明、曲靖、玉溪、



图 1 烟草样品采集地点分布图

Fig. 1 Distribution of tobacco sample collection sites

楚雄、红河、临沧、保山、大理和丽江地区共采集 38 份疑似 *Orthotospovirus* 属病毒症状的烟草样品 (图 1), 主要症状有烟叶畸形、褪绿、坏死等。

1.2 血清检测

血清检测所用的抗体: 番茄斑萎病毒 (TSWV, 血清组 I)、凤仙花坏死斑病毒 (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV, 血清组 III)、鸢尾黄斑病毒 (*Iris yellow spot virus*, IYSV), 番茄褪绿斑病毒 (*Tomato chlorotic spot virus*, TCSV, 血清组 II) & 花生环斑病毒 (*Groundnut ring spot virus*, GRSV, 血清组 II), 西瓜银色斑驳病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV, 血清组 IV) & 花生芽坏死病毒 (*Groundnut bud necrosis virus*, GBNV, 血清组 IV) 5 种病毒酶联检测试剂盒购自美国 Agdia 公司。辣椒褪绿病毒 (*Capsicum chlorosis virus*, CaCV)、番茄环纹斑点病毒 (TZSV)、马蹄莲褪绿斑病毒 (CCSV)、朱顶红褪绿环斑病毒 (*Hippeastrum chlorotic ringspot virus*, HCRV) 这 4 种病毒的抗体由课题组委托武汉三鹰生物技术有限公司制备。

采用双抗体夹心酶联免疫吸附和间接酶联免疫吸附法检测 TSWV, INSV, IYSV, TCSV & GRSV, WSMoV & GBNV, CaCV, TZSV, CCSV, 检测步骤参照 ELISA 试剂盒说明书。以健康植株为阴性对照, 样品 OD 值 / 阴性对照 OD 值大于 2 为阳性反应, OD 值是利用酶标仪在 450 nm 和 415 nm 波长下测定。

1.3 RT-PCR 检测及测序

PCR 检测引用 3 对正番茄斑萎病毒属通用引物^[20, 21]和 6 对由课题组设计特异性 N 基因引物^[22], 具体见 (表 1)。采用 RNA 提取试剂盒 (全式金, 北京) 提取 38 个烟草样本的总 RNA, 用 PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 大连) 合成 cDNA。在 PCR 反应管中配置 20 μL 反应体系为: cDNA 1 μL, Forward Primer (10 μM) 1 μL, Reverse Primer (10 μM) 1 μL, Prime STAR Max DNA Polymerase 10 μL, ddH₂O 补充至 20 μL。然后分装到各个 PCR 反应管中进行目的片段扩增。PCR 反应程序为: 98℃ 10s; 98℃ 20s, 50℃ 1-2 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。将获得的 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 与 DNA Marker 条带比较, 确定出现目的条带的大小。割胶纯化之后, 进行克隆转化, 测序, 获得病毒的 N 基因序列。

表 1 用于烟草样品中病毒鉴定的 RT-PCR 引物
Tab. 1 RT-PCR primers used for virus identification in tobacco samples

引物名称 The name of the primer	引物序列 (5'-3') Sequence of the primer (5'-3')	片段大小 /bp Fragment size /bp	目标产物 Target product
J13	dCCCGGATCCAGAGCAAT	800-1200	<i>Orthospovirus</i>
UHP	dCACTGGATCCTTTTGTGTTTTGTTTTG		
gM410	AACTGGAAAAATGATT(T/C)(A/T/C/G)(T/C)TTGTTGG	460	<i>Orthospovirus</i>
gM870c	ATTAG(C/T)TTGCA(T/G)GCTTCAAT(A/T/G/C)AA(A/G)GC		
gL2740	ATGGG(A/G/T)AT(A/T/G/C)TTTGATTTC	1180	<i>Orthospovirus</i>
	ATG(A/G)TATGC		
gL3920c	TCATGCTCAT(C/G)AG(A/G)TAAAT(T/C)TCTCT		
TSWV-F	ATGTYTAAGGTAAAGCTCACTAAG	751	TSWV
TSWV-R	TTAAGCAAGTTCTGTGAGTTTTGCC		
HCRV-F	CAGGTGGCGAAGCAGATGTA	432	HCRV
HCRV-R	CCATTAGGGGGAGAGGACCA		
CCSV-F	AAAGATTGCTTGCTGGAGGG	756	CCSV
CCSV-R	CGCCGCTCTTCTTCTAGTTGG		
TZSV-F	TGGTTAAAAAGACAGATCATTGCT	837	TZSV
TZSV-R	CTACTTGCCAACATGTCTAACGTC		
INSV-F	CCCAAAATCAATAGTAGC	750	INSV
INSV-R	AGGAGAACATAGTCAAGC		
CaCV-F	AGCAGTACCAGGGTTGCTTT	686	CaCV
CaCV-R	ACGTCAGGCAACTTACCGAG		

1.4 构建系统发育树

测序返回的烟草样品的 N 基因序列, 使用 MEGA 7.0 软件打开测序公司测序结果的 .ab1 文件; 观察文件中信号是否单一, 是否出现杂峰, 重叠峰等现象。如果出现杂峰和重叠峰, 则表明该测序结果不可用, 需要重新测序; 导出 FASTA 格式文件; 序列分析, 删除载体序列; BLAST 序列结果。将分离的 21 个 N 基因序列和从 National Center for Biotechnology Information website (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载的正番茄斑萎病毒属的 31 种病毒的 N 基因序列进行分析, 31 种病毒 N 基因序列分别是 TNSV (登录号 KM355773.1), TNeV (登录号 AY647437.1), PhySMV (登录号 AF067151.1), MSMV (登录号 EU275149.1), GRSV (登录号 AF251271.1), ANSV (登录号 GQ478668.1), ZLCV (登录号 NC031759.1), MVBaV (登录号 NC026619.1), TNRV (登录号 FJ489600.2), LNRV (登录号 AB852525.1), PCSV (登录号 KF383956.1), WSMoV (登录号 NC003843.1),

WBNV (登录号 GU584184.1), TSWV (登录号 JN664252.1), TZSV (登录号 NC010489.1), TYRV (登录号 AY686718.1), BeNMV (登录号 NC_018071.1), SVNaV (登录号 HQ728387.1), PolRSV (登录号 KJ541744.1), PYSV (登录号 AF013994.1), PCFV (登录号 AF080526.1), MYSV (登录号 NC008300.1), IYSV (登录号 AF001387.1), INSV (登录号 GU112504.1), PNSV (登录号 HE584762.1), GBNV (登录号 NC003619.1), CSNV (登录号 AB600873.1), CCSV (登录号 AY867502.1), CaCV (登录号 NC008301.1), HCRV (登录号 JX833564.1), TCSV (登录号 AF282982.1)。选用 MEGA 7.0 中集成的 Clustal W 进行多序列比对, 通过 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析, Bootstrap 为 1,000 次。

2 结果

2.1 血清鉴定结果

血清检测结果显示, 38 份烟草样品中有 16 份样品

检测出 *Orthospovirus* 属病毒, 16 份样品检测出 17 份 *Orthospovirus* 属病毒的分离物, CaCV 0 份, TZSV 2 份, CCSV 2 份, HCRV 3 份, TSWV 10 份, INSV 0 份, IYSV 0 份, TCSV & GRSV 0 份, WSMoV & GBNV 0 份, 其中 NT-16 是 TSWV 和 HCRV 复合侵染 (表 2)。

2.2 RT-PCR 鉴定结果

RT-PCR 检测结果显示, 38 份烟草样品中有 20 份样品感染 *Orthospovirus* 属病毒, 其中 TSWV 单独侵染的样品 11 份, 集中在昆明市、玉溪市、曲靖市、昭通市、楚雄州和红河州; HCRV 单独侵染样品 4 份, 集中在保山市、昭通市; TSWV&HCRV 复合侵染 1 份在曲靖市; TZSV 单独侵染 2 份在昆明市; CCSV 单独侵染样品 2 份在丽江市和昭通市 (表 2)。

2.3 烟草上正番茄斑萎病毒属病毒 N 基因的进化分析

如系统发育树 (图 2) 所示, 12 份烟草样品的分离物与 TSWV 相似度达到 93%, 5 份烟草样品的分

表 2 烟草样品中 *Orthospovirus* 属病毒种类鉴定结果

Tab. 2 Identification of Orthospoviruses in tobacco samples

编号 Numbers	样品采集地 Location of Sample Collection	血清鉴定 Identification of Serum	分子鉴定 Identification of Molecular
NT-1	临沧市	N/A	N/A
NT-2	临沧市	N/A	N/A
NT-3	玉溪市	TSWV	TSWV
NT-4	临沧市	N/A	N/A
NT-5	昆明市	N/A	N/A
NT-6	昆明市	N/A	N/A
NT-7	昭通市	N/A	N/A
NT-8	昭通市	N/A	N/A
NT-9	昭通市	N/A	N/A
NT-10	昭通市	HCRV	HCRV
NT-11	昭通市	N/A	TSWV
NT-12	昭通市	CCSV	CCSV
NT-13	昆明市	TSWV	TSWV
NT-14	红河州	N/A	TSWV
NT-15	红河州	N/A	N/A
NT-16	曲靖市	TSWV&HCRV	TSWV&HCRV
NT-17	曲靖市	TSWV	TSWV
NT-18	楚雄州	TSWV	TSWV
NT-19	玉溪市	TSWV	TSWV
NT-20	昆明市	TSWV	TSWV
NT-21	玉溪市	TSWV	TSWV
NT-22	昆明市	TZSV	TZSV
NT-23	玉溪市	TSWV	TSWV
NT-24	昆明市	TZSV	TZSV
NT-25	玉溪市	TSWV	TSWV
NT-26	大理州	N/A	N/A
NT-27	丽江市	CCSV	CCSV
NT-28	保山市	N/A	N/A
NT-29	保山市	HCRV	HCRV
NT-30	保山市	N/A	N/A
NT-31	保山市	N/A	N/A
NT-32	保山市	N/A	N/A
NT-33	保山市	N/A	N/A
NT-34	保山市	N/A	HCRV
NT-35	保山市	N/A	N/A
NT-36	保山市	N/A	N/A
NT-37	保山市	N/A	HCRV
NT-38	保山市	N/A	N/A

注: “N/A” 表示没有检测到 *Orthospovirus* 属病毒。
Note: "N/A": no *Orthospovirus* was detected.

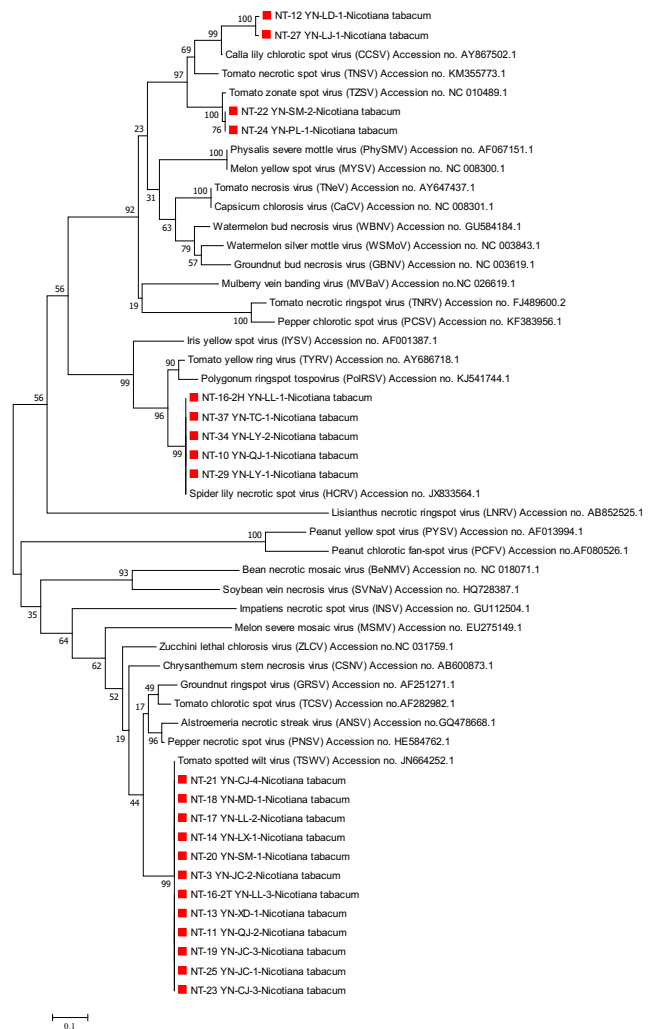


图 2 *Orthospovirus* 属病毒 N 基因序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on N gene of Orthospoviruses

离物与 HCRV 相似度达到 98%，2 份烟草样品的分离物与 TZSV 相似度达到 94%，2 份烟草样品的分离物与 CCSV 相似度达到 97%。由此可见，系统发育树的分析结果和 RT-PCR 的检测结果相一致。

3 讨论

自 1989 年在我国广州珠江三角洲的花生上发现 TSWV 以来^[23]，在四川^[15]、云南^[24]、北京^[25]、贵州^[26]、宁夏^[27]、天津^[28]、山东^[29]、重庆^[30]、湖北^[31]、黑龙江^[32]等 14 个地区报道 *Orthotospovirus* 属病毒的发生，*Orthotospovirus* 属病毒的自然寄主包括烟草、辣椒、番茄、甜瓜、西瓜、莴苣、蜘蛛兰、鸢尾和蝴蝶兰等经济作物。由于云南省具有生物多样性、以及丰富的气候资源和传播介体种类为正番茄斑萎病毒属病毒的发生、传播提供条件^[33]，我国现已报道 *Orthotospovirus* 属病毒有 12 种，其中云南有 8 种，包括番茄斑萎病毒 (TSWV)^[34]、凤仙花坏死斑病毒 (INSV)^[35]、马蹄莲褪绿斑病毒 (CCSV)^[19]、番茄环纹斑点病毒 (TZSV)^[36]、朱顶红褪绿环斑病毒 (HCRV)^[37]、花生环斑病毒 (GRSV)^[24]、辣椒褪绿斑病毒 (*Pepper chlorotic spot virus*, PCSV)^[38] 和西瓜银色斑驳病毒 (WSMoV)^[39]，其中 TSWV 在云南番茄上发病最为严重，平均检出率为 13.11%^[40]。云南省是我国 *Orthotospovirus* 属病毒种类最多、发病最严重的区域。

近年来，烟草上由蓟马传播的正番茄斑萎病毒属病毒引起的烟草斑萎病危害日趋严重^[6]，造成极大的经济损失。由于云南省气候多样，而且干旱范围增加、程度的加深等问题的出现，加重病虫害的发生，加速以蓟马为传播介体的正番茄斑萎病毒属病毒病的传播。本研究发现云南省烟草上的 *Orthotospovirus* 属病毒除了 TSWV、TZSV、CCSV，还出现了 HCRV，以及 HCRV&TSWV 复合侵染。HCRV&TSWV 复合侵染烟草后，出现严重的黄化、沿叶脉坏死的现象。

植物病毒的检测主要采用 ELISA，检测过程操作简便、准确性强、易标准化、规模生产等，可以用于检测田间 *Orthotospovirus* 属病毒^[21]。本研究对采自云南省 10 个地州市烟田的 38 个烟草样本采用 ELISA 和 RT-PCR 法检测，两种方法检测结果的符合率 85%，采自昭通市 NT-11，红河州 NT-14，保山市 NT-34 和 NT-37 样品 RT-PCR 检测出 *Orthotospovirus* 属病毒，而 ELISA 方法没有检测到 *Orthotospovirus* 属病毒，可能由于样品中病毒量较低，导致血清学方法没有检测到 *Orthotospovirus* 属病毒。

4 结论

本研究对云南省 10 个地州市采集的 38 份烟草上 *Orthotospovirus* 属病毒进行鉴定。结果表明：(1) 38 份疑似 *Orthotospovirus* 属病毒的烟草样品有 12 份感染了 TSWV，占比 31.58%，TSWV 是侵染云南烟草的斑萎类病毒优势种，主要集中在烟草的主栽区，包括昆明市、玉溪市、曲靖市、昭通市、楚雄州等地区；(2) 云南烟草首次报道了 HCRV 在烟草上的发生，集中在保山市、昭通市，并发现 TSWV&HCRV 复合侵染的情况；(3) 同一个地区的烟草同时感染 2-3 种 *Orthotospovirus* 属病毒。本研究报道 HCRV、CCSV、TZSV、TSWV、TSWV&HCRV 侵染烟草，*Orthotospovirus* 属病毒侵染烟草的范围不断扩大，病毒种类也不断增多，给病毒的防治带来一定的难度。本研究明确了云南烟草上 *Orthotospovirus* 属病毒发生情况，对科学制定烟草正番茄斑萎病毒属病毒的防治措施，保障云南省烟草种植业的持续健康发展提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 杨真. 云南省烟草蓟马种类及其天敌种类研究 [D]. 云南农业大学, 2016.
YANG Zhen. Study on the Thrips species and its natural enemies on tobacco in Yunnan Province [D]. Yunnan Agricultural University, 2016.
- [2] Maes P, Alkhovsky S V, Bao Y, et al. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018 [J]. Archives of Virology, 2018, 163(8): 2295-2310.
- [3] 李丞, 李永忠, 文国松, 等. 烟草番茄斑萎病的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(2): 374-378.
LI Cheng, LI Yongzhong, WEN Guosong, et al. Advance of research on tobacco tomato spotted wilt disease [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(2): 374-378.
- [4] Turina M, Kormelink R, Resende R O. Resistance to tospoviruses in vegetable crops: epidemiological and molecular aspects [J]. Annual Review of Phytopathology, 2016, 54: 347-371.
- [5] XU Y, GAO X, JIA Z Q, et al. Identification of *Taeniothrips eucharii* (Thysanoptera: Thripidae) as a Vector of *Hippeastrum chlorotic ringspot virus* in Southern China [J]. Plant Disease. 2017, 101: 1597-1600.
- [6] 郑雪, 刘春明, 李宏光, 等. 云南省红河地区传播番茄斑萎病毒属病毒的蓟马及其寄主植物种类调查 [J]. 中国植保导刊, 2013, 33(3): 41-44.
ZHENG Xue, LIU Chunming, LI Hongguang, et al. Investigation of thrips and host plants species of transmitting *Tomato spotted wilt virus* in Honghe Region of Yunnan Province [J]. China Plant Protection 2013, 33(3): 41-44.
- [7] Brittlebank C C. Tomato diseases [J]. Journal of the Department of Agriculture in Victoria. 1919, 17: 231-235.
- [8] Samuel G, Bald JG, Pittman HA. Investigations on 'spotted wilt' of tomatoes [J]. Australia Council for Scientific Industrial Research Bulletin, 1930, 44: 64.

- [9] Olaya C, Adhikari B, Raikhy G, et al. Identification and localization of *tospovirus*, genus-wide conserved residues in 3D models of the nucleocapsid and the silencing suppressor proteins [J]. *Virology Journal*, 2019, 16(1): 1-15.
- [10] Zhu M, van Grinsven I L, Kormelink R, et al. Paving the way to *tospovirus* infection: multilined interplays with plant innate immunity [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2019, 57: 1-22.
- [11] 吴竹妍. 西瓜银斑病毒病的分子特性及抗血清的制备 [D]. 华南农业大学, 2012.
WU Zhuyan. Antiserum preparation and molecular characterization of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) [D]. South China Agricultural University, 2012.
- [12] 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.
- [13] Hassanimehraban A, Westenberg M, Verhoeven J T J, et al. Generic RT-PCR tests for detection and identification of tospoviruses [J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 233: 89-96.
- [14] 刘欢, 李娜, 周雪平, 等. 中国小麦花叶病毒 (CWMV) 单克隆抗体制备及其检测应用 [J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(6): 711-719.
LIU Huan, LI Na, ZHOU Xueping, et al. Development of monoclonal antibodies against Chinese wheat mosaic virus (CWMV) and their application [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(6): 711-719.
- [15] 姚革. 四川晒烟上发现番茄斑萎病毒 (TSWV) [J]. *烟草科技*, 1992, (6): 2-4.
YAO Ge. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) on cigar tobacco in Sichuan [J]. *Chinese Tobacco Science*, 1992, 4: 2-4.
- [16] Dong J H, Yin Y Y, Xu X Y, et al. First report of *Tomato spotted wilt virus* in tomato and tobacco in China [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2010, 92 (4S): S4. 107-S4. 122.
- [17] Cai J H, Qin B X, Wei X P, et al. Molecular identification and characterization of Tomato zonate spot virus in tobacco in Guangxi, China [J]. *Plant Disease*, 2011, 95: 1483.
- [18] 卢训, 丁铭, 方琦, 等. 侵染云南烟草的番茄环纹斑点病毒 N 基因的分子变异分析 [J]. *植物病理学报*, 2012, 42(2): 195-201.
LU Xun, DING Ming, FANG Qi, et al. Molecular variation of natural populations of Tomato zonate spot virus infecting flue-cured tobacco in Yunnan [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2012, 42(2): 195-201.
- [19] Liu Y, Lu X, Long Z, et al. Calla lily chlorotic spot virus from spider lily (*Hymenocallis littoralis*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) in the south-west of China [J]. *Journal of Phytopathology*, 2012, 160(4): 201-205.
- [20] Cortez I, Saaijer J, Wongjakaew K S, et al. Identification and characterization of a novel *tospovirus* species using a new RT-PCR approach [J]. *Archives of virology*, 2001, 146(2): 265-278.
- [21] Chen T C, Li J T, Lin Y P, et al. Genomic characterization of *Calla lily chlorotic spot virus* and design of broad-spectrum primers for detection of tospoviruses [J]. *Plant Pathology*, 2012, 61(1): 183-194.
- [22] 吴保为, 吴家琪, 胡玉洁, 等. 朱顶红褪绿环斑病毒云南君子兰分离物 S 序列的克隆及分析 [J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(14): 38-40.
WU Baowei, WU Jiaqi, Hu Yujie, et al. Cloning and analysis of S RNA of *Hippeastrum chlorotic ringspot virus* isolate on *Cliviaminiata* in Yunnan Province [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(14): 38-40.
- [23] 许泽永, 张宗义, 陈金香. 番茄斑萎病毒 (TSWV) 广州分离物生物学特性研究 [J]. *植物病理学报*, 1989, 19(4): 198-198.
XU Zeyong, ZHANG Zongyi, CHEN Jinxiang. Biological properties of a Guangdong isolate of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1989, 19(4): 198-198.
- [24] 丁铭, 张丽珍, 方琦, 等. 侵染马铃薯的一个 *Tospovirus* 混合分离物的鉴定, 纯化及多抗血清制备 [J]. *西南农业学报*, 2004, 17(B05): 160-162.
DING Ming, ZHANG Lizhen, FANG Qi, et al. Identification, purification and antiserum preparation of *tospovirus* isolate affecting potato [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2004, 17(B05): 160-162.
- [25] 李飞, 吴青君, 徐宝云, 等. 北京地区发现番茄斑萎病毒 [J]. *植物保护*, 2012, 38(6): 186-188.
LI Fei, Wu Qingjun, Xu Baoyun, et al. *Tomato spotted wilt virus* was identified in Beijing [J]. *Plant Protection*, 2012, 38(6): 186-188.
- [26] 任锡毅, 刘永翔, 谭玉梅, 等. 贵州烟草病毒病的主要种类及分布特点 [J]. *贵州农业科学*, 2014, 42(5): 117-120.
REN Xiyi, LIU Yongxian, TAN Yumei, et al. Distribution characteristics of main tobacco virus diseases in Guizhou [J]. *Guizhou Agricultural Science*, 2014, 42(5): 117-120.
- [27] 曹金强, 谢学文, 柴阿丽, 等. 李宝聚博士诊病手记 (九十三) 番茄斑萎病毒病在宁夏的发现与防治 [J]. *中国蔬菜*, 2016, (4): 87-89.
CAO Jinqiang, XIE Xuewen, CHAI Ali, et al. Dr. Li Baoju's Handbook of Diagnosis (93) The discovery and control of *Tomato spotted wilt virus* in Ningxia [J]. *China Vegetables*, 2016, (4): 87-89.
- [28] 高苇, 王勇, 张春祥, 等. 天津地区辣椒病毒病调查及毒源种类初步鉴定 [J]. *山东农业科学*, 2016, 48(3): 91-94.
GAO Wei, WANG Yong, ZHANG Chunxiang, et al. Investigation and pathogen preliminary identification of pepper virus disease in Tianjin [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2016, 48(3): 91-94.
- [29] 李洁, 迟胜起, 杨勤民, 等. 山东烟台地区发生番茄斑萎病毒病危害 [J]. *植物保护*, 2017, 43(1): 228-232.
LI Jie, CHI Shengqi, YANG Qinmin, et al. Identification of *Tomato spotted wilt virus* disease in Shandong, China [J]. *Plant Protection*, 2017, 43(1): 228-232.
- [30] 孙森, 荆陈沉, 楚成茹, 等. 重庆辣椒上番茄斑萎病毒的血清学检测及分子鉴定 [J]. *园艺学报*, 2017, 44(3): 487-494.
SUN Miao, JING Chenchen, CHU Chengru, et al. Serological detection and molecular identification of *Tomato spotted wilt virus* in pepper in Chongqing [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(3): 487-494.
- [31] 张艳超, 侯明生, 蔡丽. 湖北省蔬菜病毒病主要毒原种类检测 [J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(06): 31-38.
ZHANG Yanchao, HOU Mingsheng, CAI Li. Detection of main viral species of vegetable virus diseases in Hubei Province [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2017, 36(06): 31-38.
- [32] 王凯娜, 战斌慧, 周雪平. 黑龙江地区番茄斑萎病毒的鉴定及其部分生物学特征分析 [J]. *植物保护*, 2019, 45(1): 37-43.
WANG Kaina, ZHANG Binhui, ZHOU Xueping. Detection and partial biological characterization of *Tomato spotted wilt tospovirus* in Heilongjiang Province [J]. *Plant Protection*, 2019, 45(1): 37-43.
- [33] 黄亚宁, 董玉梅, 徐烨, 等. 昆明市园艺植物番茄斑萎病的初步鉴定 [J]. *云南农业大学学报*, 2015, V30(4): 648-652.
HUANG Yaning, DONG Yumei, XU Ye, et al. Preliminary identification of horticultural plant spotted wilt diseases in Kunming [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2015, 30 (4): 648-652.
- [34] 佟爱珍, 赵兴能, 孔宝华, 等. 侵染云南烟草的番茄斑萎病毒 (TSWV) 的 RT-PCR 检测 [J]. *云南农业大学学报*, 2012, 27(6): 809-813.
TONG Aizi, ZHAO Xingneng, KONG Baohua, et al. The Detection of *Tomato spotted wilt virus* from tobacco by RT-PCR in Yunnan [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2012, 27(6): 809-813.

- [35] 郑元仙, 李永忠, 刘雅婷, 等. 云南省蝴蝶兰上凤仙花坏死斑病毒的鉴定 [J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 313-318.
ZHENG Yuanxian, LI Yongzhong, LIU Yating, et al. Identification of *Impatiens necrosis spot virus* from *Phalaenopsis amabilis* in Yunnan [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(2): 313-318.
- [36] 李秋芳, 智龙, 李穆, 等. 云南鸢尾上发现番茄环纹斑点病毒 [J]. 云南农业大学学报, 2014, 29(2): 167-172.
LI Qiufang, ZHI Long, LI Mu, et al. Tomato zonate spot virus as a pathogen found in *Iris tectorum* [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2014, 29(2): 167-172.
- [37] Yin Y, Zheng K, Dong J, et al. Identification of a new *tomspovirus* causing necrotic ringspot on tomato in China [J]. Virology Journal, 2014, 11(1): 213-213.
- [38] Zheng K, Chen T C, Yeh S D, et al. Characterization of a new isolate of *Pepper chlorotic spot virus* from Yunnan province, China [J]. Archives of Virology, 2017, 162(9): 2809-2814.
- [39] Yin Y Y, Fang Q, Lu X, et al. Detection *Watermelon silver mottle virus* infecting watermelon in Yunnan, southwest of China [J]. Journal of Plant Pathology, 2014, 96(4SUP): 123.
- [40] 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.
LIU Yong, LI Fan, LI Yueyue, et al. Identification, distribution and occurrence of viruses in the main vegetables of China [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(2): 239-261.

Investigation and identification of *Orthospovirus* on tobacco in Yunnan province, China

GAO Xue¹, WANG Sibo¹, LI Zhengyang², YANG Baoju¹, FEI Jinqiang¹, LIU Yating^{1*}

¹ College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

² Map Academy of Yunnan Provincial Bureau of Surveying and Mapping Geographic Information, Kunming 650034, China

Abstract: Yunnan is one of the major areas of tobacco cultivation in China. Tobacco spot wilt diseases are becoming more and more serious in recent years. It is important to understand the etiology, occurrence, prevalence and distribution of tobacco spot wilt diseases in Yunnan. Since 2012, a total of 38 samples of tobacco plants suspected to be infected by *Orthospovirus* were collected from 10 different tobacco-growing areas in Yunnan province. All the samples were identified by symptom observation, ELISA and RT-PCR identification. The results showed that 20 samples were identified to be with *Orthospovirus*, including 11 samples infected with *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), 4 samples infected with *Hippeastrum chlorotic ringspot virus* (HCRV), 2 samples infected with *Tomato zonate spot virus* (TZSV), 2 samples infected with *Calla lily chlorotic spot virus* (CCSV), and 1 sample infected with TSWV & HCRV. This study for the first time reports the tobacco infected with HCRV and finds the TSWV & HCRV co-infected tobacco. Identification results provide theoretical basis for development of prevention and control measures against tobacco spot wilt diseases and are also of great significance to ensure the sustainable and healthy development of tobacco planting in Yunnan Province.

Keywords: *Orthospovirus*; tobacco; enzyme linked immunoabsorbent assay; RT-PCR; identification

*Corresponding author. Email: liuyating66@163.com

关于 2019 年第 6 期英文目次页中作者名的勘误

由于排版和校对疏忽, 本刊印刷版 2019 年第 25 卷第 6 期英文目次页中, 《Research and application of big data technology in Fujian Tobacco's commercial section》一文的英文作者名错误, 该文的英文作者名应为 ZHANG Huimin。

特此声明更正英文目次页的该项信息。另外, 中文目次、正文以及英文摘要中该文的作者信息是正确的。

《中国烟草学报》编辑部

2020 年 2 月 26 日