

露地栽培番茄斑萎病毒病发生流行规律调查 及 TSWV 重要寄主植物监测

李婷婷¹ 尹跃艳^{1,2} 兰 梅³ 袁琼芬⁴ 李 凡⁵ 丁 铭^{1*}

(1. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 农业部西南农业基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650223; 2. 云南省农业科学院高山经济植物研究所, 丽江 674199;
3. 云南省农业科学院园艺作物研究所, 昆明 650205; 4. 昆明市晋宁区农业技术推广中心,
昆明 650201; 5. 云南农业大学, 云南省植物病理重点实验室, 昆明 650205)

摘要: 为明确云南省昆明市露地栽培条件下番茄斑萎病毒病的发生流行特征, 于2014—2015年采用病害系统调查法结合病毒 ELISA 及 RT-PCR 检测方法研究露地栽培条件下由番茄斑萎病毒 (tomato spotted wilt virus, TSWV) 引起的病毒病发生规律及其重要寄主种类, 并研究利用防虫网隔离蓟马对番茄斑萎病毒病的防控效果。结果表明: 番茄斑萎病毒病在露地番茄主要种植期3—10月普遍发生, 番茄苗期和移栽初期是该病毒病防控的关键期, 带毒种苗调运是该病毒病的主要传播途径; 田间多种茄科和菊科植物是 TSWV 的重要中间寄主。在田间, 菊科寄主植物油菜、茼蒿、鬼针草、牛膝菊上 TSWV 的检出率均较高, 在42.53%~81.63%之间; 茄科寄主植物中辣椒上 TSWV 的检出率最高, 为41.99%, 其次为马铃薯, TSWV 检出率为27.78%, 在番茄上 TSWV 的检出率为19.02%, 因此生产中应对这些 TSWV 重要中间寄主给予更多关注和防控。应用防虫网能有效隔离蓟马, 使番茄斑萎病毒病发病率和病情指数较对照分别降低了6.44个百分点和5.31, 可有效降低番茄苗期及定植期斑萎病毒病的发生。

关键词: 番茄斑萎病毒病; 发生流行规律; 田间寄主; 监测; 病害防控

Regularity of occurrence and epidemiology of tomato spotted wilt virus disease on open field in cultivation and screening of field hosts of TSWV

LI Tingting¹ YIN Yueyan^{1,2} LAN Mei³ YUAN Qiongfeng⁴ LI Fan⁵ DING Ming^{1*}

(1. Yunnan Province Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Key Laboratory of the Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture; Institute of Biotechnology and Germplasm Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, Yunnan Province, China;
2. Institute of Alpine Economic Plant, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Lijiang 674199, Yunnan Province, China; 3. Horticultural Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan Province, China; 4. Agricultural Technology Extension Center of Jinning District, Kunming 650201, Yunnan Province, China; 5. The Key Phytopathology Laboratory of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650205, Yunnan Province, China)

Abstract: To characterize the occurrence and epidemiology of tomato spotted wilt virus (TSWV) disease on open field conditions, the incidence of TSWV in tomato plants and other field hosts were studied in Kunming, Yunnan Province from 2015 to 2016, by using ELISA and RT-PCR methods. And the insect-

proof screens was used to reduce thrips for control TSWV diseases. The results showed that frequent occurrence of TSWV diseases during March to October growing season on open field of tomato plants and the infected tomato seedlings at the early stages after transplanting as the primary infection source. The key stages of TSWV diseases control were the seedling stage and the early stages after transplanting. Other important field hosts include Compositae and Solanaceae plants. High frequencies of TSWV occurrence were observed in Compositae plants, i.e. *Lactuca sativa*, *L. sativa* var. *angustana*, *Bidens bipinnata*, *Galinsoga parviflora*, infected rates from 42.53% to 81.63%, followed by Solanaceae plants, *Cap-sicum annuum* had the highest infected rate of 41.99%, and *Solanum tuberosum* had the infected rate at 27.78% and the infected rate of *Solanum lycopersicum* was 19.02%. Insect-proof screens could effectively control thrips in the greenhouse, thereby decreasing the infected rate with 6.44 percentage point and the disease index of TSWV diseases with 5.31 compared to check plot.

Key words: tomato spotted wilt virus; occurrence and epidemiology; field host; monitor; disease control

番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt virus* 是布尼亚病毒目 *Bunyavirales* 番茄斑萎病毒科 *Tospoviridae* 正番茄斑萎病毒属 *Orthotospovirus* 的代表种 (Adams et al., 2017)。该病毒寄主范围广泛,可侵染包含 15 个科的单子叶植物和 69 个科的双子叶植物,共涉及 1 090 种植物,在全世界均有发生,由番茄斑萎病毒 (tomato spotted wilt virus, TSWV) 引起的病毒病每年造成的减产超过 10 亿美元 (Adkins, 2000),是一种严重危害番茄等经济作物产量和品质的病毒 (Scholthof et al., 2011)。

自然条件下,TSWV 可以通过汁液和传毒介体蓟马传播,目前已报道有 8 种蓟马以半持久方式传播该病毒 (Pappu et al., 2009),其中以西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 和烟蓟马 *Thrips tabaci* 的传毒效率最高 (Groves et al., 2001)。蓟马具有种群数量巨大、寄主种类广泛、活动性强且活动范围大等特点,TSWV 通过其在感病植株和健康植株之间进行扩散,导致番茄斑萎病毒病在寄主植物间不断传播蔓延。目前我国广州 (许泽永等, 1989)、四川 (姚革, 1992)、云南 (张仲凯等, 2004)、台湾 (Zheng et al., 2010)、天津 (王勇等, 2014)、贵州 (王莉爽等, 2015) 等省市均有检出 TSWV 的报道。云南省是正番茄斑萎病毒属病毒种类报道最多的地区,已发现 9 种,由于当地独特而多样的地理和气候特征,导致不同区域病毒种类差异较大,而 TSWV 和番茄环纹斑点病毒 (tomato zonate spot virus, TZSV) 在一些重要经济作物上造成的危害最严重,其它几种病毒仅在局部地区零星发生,并未造成大范围流行 (Dong et al., 2010; Li et al., 2015)。TSWV 广泛分布于除滇西北寒带地区以外的云南省各区域,尤其在常年种植烟草、番茄和辣椒的地区发生尤为严重,其田间寄主种类多样,已发现有番茄、辣椒、马铃薯、生菜、莴

苣、芹菜等主要蔬菜作物及田间杂草鬼针草 (Xiao et al., 2016; Jiang et al., 2017)。尹跃艳等 (2013) 调查结果显示,2009—2011 年 TSWV 引起的病毒病在昆明市番茄和烟草生产中广泛发生,严重地区发病率达 80% 以上,造成番茄减产 40%~100%,给当地农民带来了巨大的经济损失。

当前对番茄斑萎病毒病的研究主要集中在植物抗病机制 (Chou et al., 2017; Zhu et al., 2017)、病毒检测技术 (Kuwabara et al., 2010; Hassani-Mehraban et al., 2016; Bald-Blume et al., 2017)、病毒全基因组序列分析 (Ciuffo et al., 2017; Huang et al., 2017)、病毒与介体昆虫互作 (Schneweis et al., 2017) 等方面。对于番茄斑萎病毒病发生流行规律的系统研究尚未见报道。本研究拟对云南省昆明市番茄斑萎病毒病的发生流行规律、病原田间重要中间寄主种类以及不同寄主间病原的系统进化关系进行调查分析,以期对当地该类病毒病害的有效防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:于 2014 年 3 月至 2015 年 12 月在云南省昆明市晋宁区番茄斑萎病毒病发生严重的蔬菜种植区采集具有典型感染 TSWV 症状的番茄病株叶片或果实,并在种植区内及周边 5 km 半径范围内采集疑似或具典型感染 TSWV 症状的田间杂草及其它周边作物,共采集到样品 1 892 份,于 -80℃ 冰箱保存或整株植株种植于隔离的防虫温室。健康番茄品种红宝石种子购自当地市场,在实验室人工气候室种植,取健康叶片供试;从采集样品中选择经检测仅感染 TSWV 的样品在健康红宝石番茄叶片上摩擦接种,取发病叶片供试。

试剂:植物 RNA 提取试剂盒,美国 Invitrogen 公

司;反转录试剂盒、载体 pEGM-T Easy、T4 连接酶,美国 Promega 公司;PCR 试剂盒、DL2000 Marker、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;碱性磷酸酶标记羊抗鼠酶标抗体、NBT/BICP 显色液,美国 Sigma 公司;TSWV 单克隆抗体,浙江大学周雪平教授提供;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:TP350 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;5804R 低温冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;DYY-6C 电泳仪,北京市六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 番茄斑萎病毒病发生流行规律的调查方法

调查地点为昆明市晋宁区上蒜镇柳坝村露天蔬菜种植区,调查作物为番茄,品种为农户自选品种红宝石和东风 1 号。在种植区内随机选择 5 个不同田块作为定点系统调查样区,每个样区面积约 1 000 m²;番茄定植时间分别为 2014 年 3 月 8 日和 5 月 6 日,株距为 30 cm,行距为 50 cm,自 2014 年 3 月 8 日开始调查,每 10 d 调查 1 次,直至采收结束,共调查了 19 次。采用定点定株调查方法,在每个样区中定点选取番茄 3 000 株,调查番茄植株上斑萎病毒病的自然发病情况,并计算发病率和病情指数。同时与试验地气象和农业部门合作,详细记录调查区内的日均温。发病率=发病株数/总调查株数 $\times$ 100%;病情指数= $\sum$ (各级病株数 $\times$ 该病级值)/(调查总株数 $\times$ 最高级值) $\times$ 100。调查采用 9 级分级法,分级标准为:0 级:无任何症状;1 级:顶部新叶有少量黑色斑点;3 级:顶部新叶有明显的黑色斑点,有时还出现坏死斑,部分侧枝新叶出现黑色斑点;5 级:主茎及侧枝均现花叶,少数叶片畸形、皱缩,有时叶片或茎部出现坏死斑;7 级:全株严重花叶,多数叶片畸形、植株矮化;9 级:植株严重系统花叶、畸形,有时严重系统坏死,植株明显矮化,甚至死亡。

1.2.2 TSWV 的重要寄主调查及 dot-ELISA 检测

在 1.2.1 所述番茄露地栽培田块,从 2014 年 3 月 8 日至 2015 年 12 月 31 日每 30 d 在调查点及周边 5 km 半径范围内调查和采集番茄斑萎病毒病害样品 1 次,调查期内共采集了 19 次,每次采集疑似或具有感染 TSWV 典型症状的番茄、田间杂草及其它周边作物,详细记录样品种类和发病症状。将采集到的 1 892 份样品利用斑点酶联免疫吸附测定(dot enzyme linked immunosorbent assay, dot-ELISA)法进行 TSWV 的检测。每份样品按照质量体积比 1:10~1:20 加入 PBST 缓冲液并充分研磨,取 2.5 μ L 加至硝酸纤维素膜上,同

时以健康红宝石番茄叶片为阴性对照,以摩擦接种 TSWV 发病红宝石番茄叶片为阳性对照;待硝酸纤维素膜干燥后,加入用 PBST 配制的 5% 脱脂奶粉封闭液 20 mL,于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;将 TSWV 单克隆抗体按体积比 1:3 000 加入到封闭液中,37 $^{\circ}$ C 孵化 1 h;用 PBST 缓冲液洗膜 3 次,再加入按体积比 1:8 000 稀释的碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG 抗体,37 $^{\circ}$ C 孵化 1 h;PBST 缓冲液洗膜 3 次,加入 NBT/BICP 显色液显色,显色充分后将膜移至清水中终止显色。根据硝酸纤维素膜中不同样品点样斑点的显色情况直接观察判断或扫描至电脑后放大观察,红色至深紫色为阳性,白色或绿色为阴性,并记录检测结果。

1.2.3 TSWV 的 RT-PCR 验证及其 N 基因序列分析

将 1.2.2 中经 dot-ELISA 检测为阳性的作物(番茄、辣椒、油麦菜、莴苣、芹菜、马铃薯和生菜)和杂草(鬼针草、牛膝菊和酸模)分别各取 10 份,采用 Trizol 法提取植物总 RNA 并进行反转录。20 μ L 反转录体系:模板 RNA 10 μ L、下游引物(5'-ATGTCTAAGGTTAAGCTC-3') 1 μ L、dNTP 1 μ L、反转录酶 1 μ L、反转录溶液 4 μ L、RNase-free ddH₂O 3 μ L。反转录程序:60 $^{\circ}$ C 反转录 1 h 合成 cDNA 第一链;90 $^{\circ}$ C 终止反应 5 min。反应结束后获得 cDNA,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

根据 GenBank 中报道的 TSWV 序列设计并合成 TSWV N 基因特异性引物(上游引物:5'-TCAAGCAAGTTCTGCGAGT-3';下游引物:5'-ATGCTTAAGGTTAAGCTC-3')对 1.2.2 中检测为阳性的样品进行 PCR 验证。引物均由英潍捷基(广州)贸易有限公司公司合成。50 μ L 反应体系:cDNA 5 μ L、上下游引物各 1 μ L、5 $\times$ PCR 反应缓冲液 10 μ L、ddH₂O 33 μ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,55 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。将获得的 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,每份样品选取 5 个阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序所得序列利用 DNAMAN 7.0 进行序列拼接及核苷酸相似性分析。采用 MEGA 6.0 软件以邻接法对测序所得序列构建系统进化树,进化树各分支的可信度用 Bootstrap 检测,设置 1 000 次重复。

1.2.4 利用防虫网防控番茄斑萎病毒病的试验方法

苗期使用防虫网防控试验:供试番茄品种为红宝石,于昆明市晋宁区上蒜镇柳坝村育苗专业户大棚内穴盘育苗,番茄自 2015 年 3 月 8 日播种至移栽前用 100 目防虫网罩苗,共罩苗 6 000 株,随机分为 6 个重复,每个重复 1 000 株,以不用防虫网罩处理作为对照,共 3 000 株,随机分为 3 个重复,每个重复

1 000株。育苗专业户大棚内主要繁育番茄、辣椒、十字花科蔬菜种苗,育苗期间棚外周边种植油菜、马铃薯、小麦。育苗棚内农事操作常规管理,自然发病,播种15 d后开始进行调查,基本上每10 d调查1次,并记录幼苗发病情况,调查分级方法同1.2.1。番茄种苗移栽前随机采集防虫网处理和对照各20个样品,以每5个不同植株叶片混合为1个样品,利用dot-ELISA法检测TSWV,具体步骤同1.2.2。

定植期使用防虫网防控试验:于2015年6月11日开始番茄种苗的移栽定植,生育期为7~8叶期,每个供试大棚面积约600 m²,每棚定植3 000株,株距为30 cm,行距为50 cm。防虫网防控处理设2个重复,每个大棚为1个重复,共2个大棚,涉及6 000株幼苗。对照大棚与处理大棚相邻,定植3 000株幼苗,株行距同防虫网处理。处理大棚顶部及侧墙上部为

透光塑料膜,长边侧墙下部约1 m高通风侧墙和门用100目防虫网封闭隔离,对照大棚长边侧墙下部无封闭隔离。自定植日开始调查,方法同1.2.1。

2 结果与分析

2.1 番茄斑萎病毒病的田间调查结果

昆明市晋宁区可全年种植番茄,露地栽培主要种植时期为3—10月,其中第1茬种植日期在3—8月,第2茬在5—10月。2014年对2个不同定植时期的植株进行番茄斑萎病毒病调查,发现番茄植株主要症状为萎蔫、叶片黄化、顶部叶片坏死、环斑(图1-A),辣椒植株症状为顶部叶片黄化、叶片规则或不规则环斑、果实不规则黄化、同心圆环斑(图1-B),莴苣植株主要症状为顶部叶片黄化或褐色坏死、植株萎蔫死亡(图1-C)。



图1 番茄(A)、辣椒(B)和莴苣(C)感染番茄斑萎病毒病的田间症状

Fig. 1 Symptom of tomato (A), pepper (B) and lettuce (C) wilt spotted diseased samples in field

调查结果显示,随着番茄定植时间的延长及温度的不断升高,番茄斑萎病毒病均呈逐渐加重的趋势,其中3月8日番茄定植时,移栽苗盘上未发现典型发病植株,定植后10 d首次发现病株,发病率为0.18%,病情指数为0.04,该种植期内种苗直至移栽时尚未发现典型发病植株,说明病毒病主要通过少量介体昆虫从周边杂草或其它作物寄主中传播而来,病害传播速度较慢,发病率较低。随着番茄定植时间的延长和温度的升高,番茄斑萎病毒病不断扩

展,到5月6日时发病率达到6.92%,至6月19日最后一次调查时发病率为12.36%,病情指数最高为12.05。而在5月6日定植番茄种苗中已发现典型发病症状植株,之后该病害在田间呈暴发式增长,番茄植株在大田生长前40 d内病情指数变化呈对数增长,从8.99快速增长到34.93,70 d后病情指数保持稳定,最高时达到42.44(图2)。表明番茄种苗携带TSWV和田间病毒大量积累对番茄斑萎病毒病害的发生流行起着关键作用。

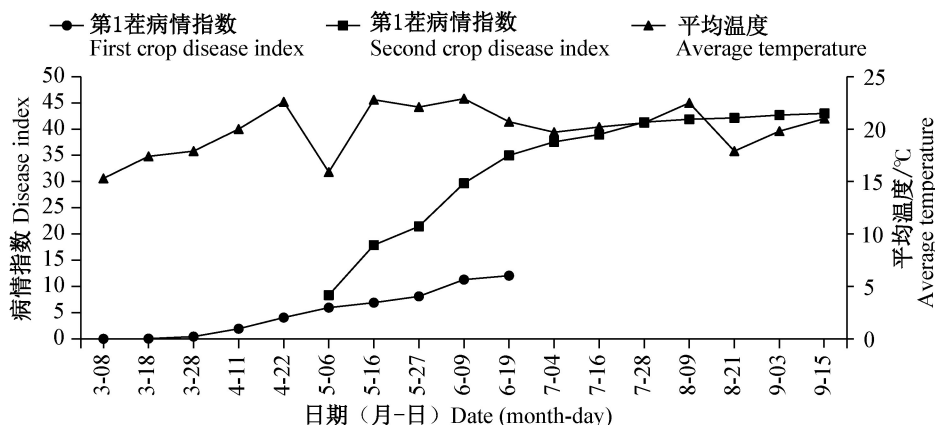


图2 2014年田间感染TSWV的番茄病情指数变化趋势

Fig. 2 The development trend of disease index of tomatoes infected by TSWV in 2014

2.2 TSWV 的 dot-ELISA 检测结果与分析

检测结果显示,从 1 892 份样品中检出 TSWV 的植物主要包括菊科和茄科植物,菊科植物中 TSWV 的检出率均较高,在 42.53%~81.63% 之间,其中油麦菜和莴苣中 TSWV 的检出率最高,分别达 81.63% 和 78.02%,且在病害调查中发现油麦菜和莴苣上番茄斑萎病毒病的平均发病率超过 10.00%,最严重地地

发病率在 90.00% 以上,产量损失严重,与其 TSWV 高检出率的结果相吻合;茄科植物包括辣椒、马铃薯和番茄,辣椒中 TSWV 的检出率最高,达 41.99%,其次为马铃薯,TSWV 检出率为 27.78%,在番茄上 TSWV 的检出率为 19.02%(表 1)。此外,田间还发现芹菜和酸模可以携带 TSWV,由于检出率较低,因此不作为该调查区内 TSWV 的重要中间寄主。

表 1 昆明市露地蔬菜种植区各类植物样品中 TSWV 的 ELISA 检测结果

Table 1 The results of ELISA testing TSWV in open-field vegetable planting area of investigated sites in Kunming

寄主 Host	分类 Taxonomy	症状 Symptom	种植时间 Planting Time	阳性		
				样品数 No. of samples	样品数 No. of positive samples	检出率 Detection rate/%
油麦菜 <i>Lactuca sativa</i>	菊科/莴苣属 Compositae/ <i>Lactuca</i>	顶芽坏死、新叶半叶坏死 Terminal bud necrosis, new leaves half necrosis	1—12 月 From Jan. to Dec.	196	160	81.63
莴苣 <i>L. sativa</i> var. <i>angustana</i>	菊科/莴苣属 Compositae/ <i>Lactuca</i>	顶芽坏死、新叶半叶坏死 Terminal bud necrosis, new leaves half necrosis	1—12 月 From Jan. to Dec.	182	142	78.02
鬼针草 <i>Bidens bipinnata</i>	菊科/鬼针属 Compositae/ <i>Bidens</i>	花叶 Mosaic leaves	5—10 月 From May to Oct.	106	62	58.49
牛膝菊 <i>Galinsoga parviflora</i>	菊科/牛膝菊属 Compositae/ <i>Galinsoga</i>	花叶 Mosaic leaves	5—10 月 From May to Oct.	87	37	42.53
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	茄科/辣椒属 Solanaceae/ <i>Capsicum</i>	顶芽坏死,新叶黄化、有坏死斑,花叶,果实环斑 Terminal bud necrosis, yellowing of new leaves and necrotic spots, mosaic leaves, fruit ring spots	2—6 月 From Feb. to June	312	131	41.99
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	茄科/茄属 Solanaceae/ <i>Solanum</i>	顶叶萎蔫、坏死,中下部叶片黑色坏死斑 Terminal leaves wilted and necrotic, with dark necrotic spots in the middle and lower leaves	10 月—次年 2 月 Oct. to Feb. of the following year	36	10	27.78
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	茄科/番茄属 Solanaceae/ <i>Lycopersicon</i>	顶芽坏死,新叶有褐色坏死斑,花叶,果实环斑 Terminal bud necrosis, new leaves have brown necrotic spots, mosaic leaves, fruit ring spots	3—10 月 From Mar. to Oct.	915	174	19.02
芹菜 <i>Apium graveolens</i>	伞形科/芹属 Umbelliferae/ <i>Apium</i>	顶芽坏死,新叶有坏死斑,中下部叶片环斑或不规则斑点 Terminal bud necrosis, new leaves have necrotic spots, middle and lower leaves rings, or irregular spots	12 月—次年 5 月 Dec. to May of the following year	25	1	4.00
酸模 <i>Rumex acetosa</i>	蓼科/酸模属 Polygonaceae/ <i>Rumex</i>	叶片褐色至黑色坏死斑 Leaves have blade brown to black necrotic spots	1—12 月 From Jan. to Dec.	33	2	6.00
合计 Total				1 892	719	38.00

2.3 TSWV 不同寄主分离物 N 基因扩增及序列分析

TSWV 不同寄主分离物的 N 基因 RT-PCR 扩增结果显示,在番茄、辣椒、油麦菜、莴苣、芹菜、马铃薯和鬼针草中均获得约 750 bp 的目的片段,而在牛膝菊和酸模中未扩增到目的片段。将目的片段进行克隆及测序分析,结果表明扩增片段为 TSWV N 基因序列,全长 777 bp,将其上传 GenBank,由于部分分离物间 N 基因核苷酸相似性为 100.0%,仅获得辣椒、番茄、莴苣、油麦菜和鬼针草 TSWV 分离物 N 基因序列的登录号,分别为 GM656988、GM656989、

GM656990、MT345024、MT345025;不同 TSWV 分离物 N 基因核苷酸同源性在 98.4%~100.0% 之间,编码蛋白氨基酸同源性在 99.2%~100.0% 之间。根据 N 基因核苷酸序列用 MEGA 6.0 构建获得 TSWV 不同寄主与不同地域分离物的系统进化树,发现本研究获得的 TSWV 分离物在系统进化树上聚为一支,且与中国番茄分离物(GenBank 登录号 MG878875)聚为一支,而中国 TSWV 分离物则与亚洲 TSWV 分离物具有相同的起源,表明 TSWV 具有明显的地域分布特征,没有明显的寄主分布特征(图 3)。

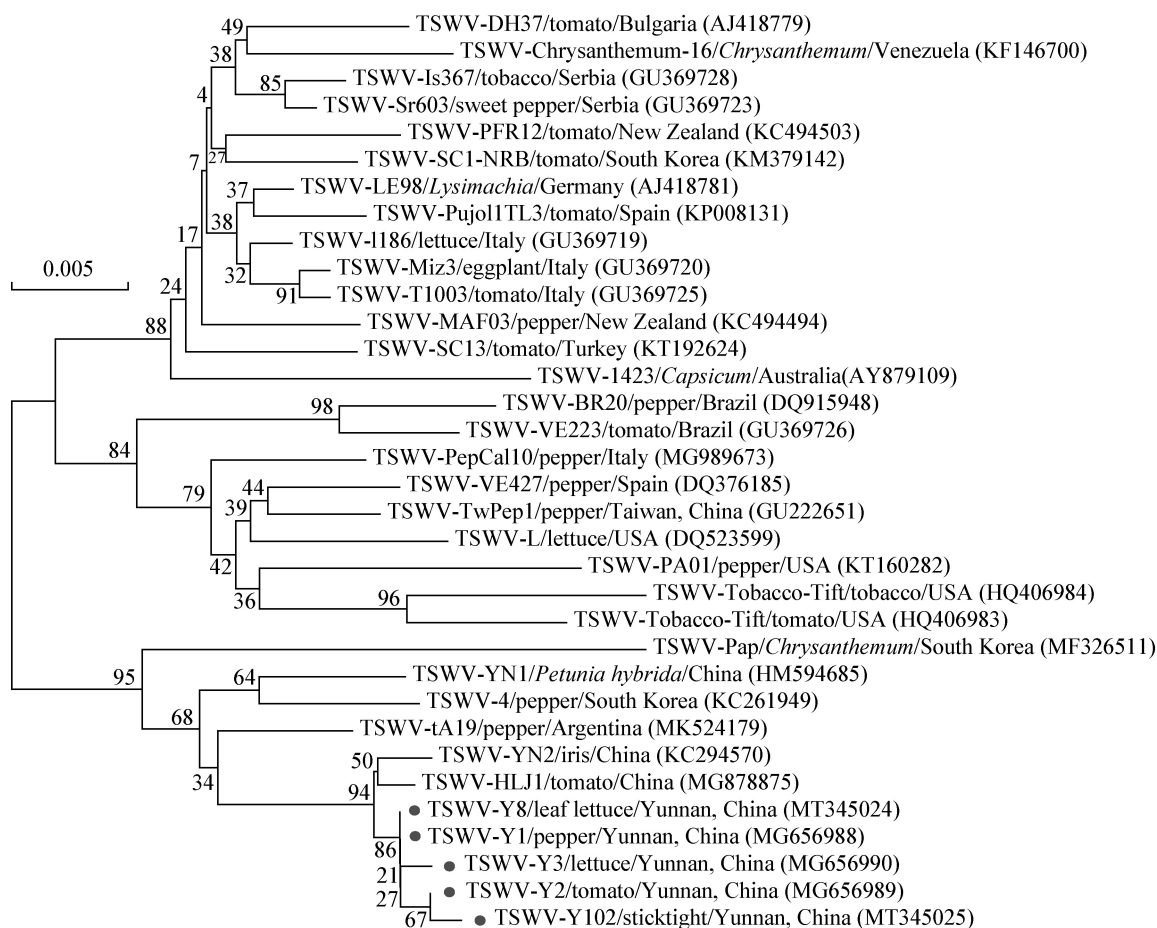


图3 基于N基因序列以邻接法构建TSWV不同分离物的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic analysis of the different TSWV isolates based on N gene

图中内容表述形式为病毒分离物名称/寄主/来源(登录号)。黑点标记分离物为本研究测定序列。The description is represented as the isolate/host/origin (accession number). The black dot indicates the sequence obtained in this study.

2.4 防虫网对番茄斑萎病毒病的防控作用

空白对照区检出TSWV阳性番茄植株1株,检出率为5.00%,防虫网罩苗区未检出TSWV。2015年的系统调查结果显示,防虫网罩苗区初始发病率为0,最后1次调查时的最高发病率仅为1.69%,病情指数为1.50;而空白对照区初始发病率为2.14%,最后

1次调查时的发病率和病情指数分别为8.13%和6.81(图4)。表明试验区番茄斑萎病毒病自然发病不严重,但防虫网罩苗区番茄的发病率较对照降低了6.44个百分点,病情指数降低了5.31,表明防虫网处理与对照间番茄斑萎病毒病发生及危害程度差异明显,但未达显著水平。

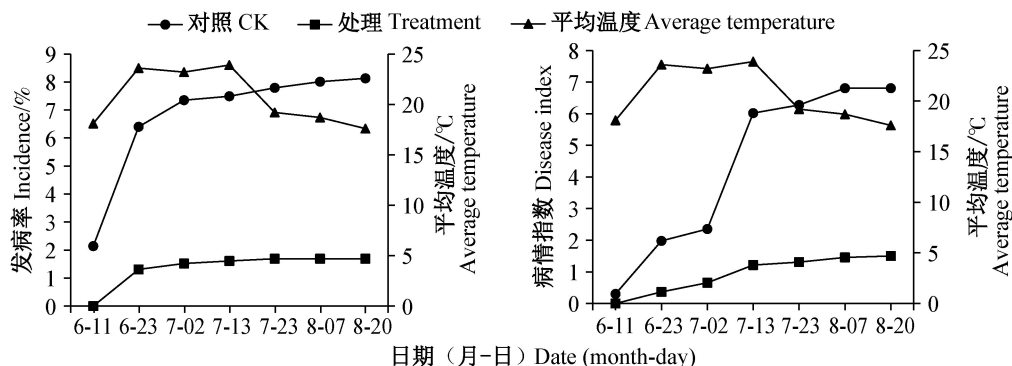


图4 2015年田间自然感染TSWV番茄的发病率及病情指数变化趋势

Fig. 4 The development trend of incidence and disease index of tomatoes infected by TSWV on field in 2015

3 讨论

由于云南省大部分州市具有适宜病毒越冬越夏的环境条件和周年繁殖的传播介体,是我国正番茄斑萎病毒属病毒种类最多、发病最严重的地区,该类病害是云南省烟草、蔬菜等重要经济作物的主要病毒病之一,近年来该类病害的危害范围和严重度在不断增加(张仲凯等, 2004; Dong et al., 2010; Li et al., 2015)。本研究对番茄斑萎病毒重发区昆明市晋宁区上蒜镇露地栽培条件下番茄、周边其它作物和杂草进行持续2年的系统调查,结果显示,调查区内番茄、辣椒、油麦菜、茼蒿和马铃薯是TSWV主要的作物寄主,鬼针草和牛膝菊是田间周边TSWV重要的杂草寄主,其TSWV检出率均较高,在育苗棚、生产简易大棚内或周边田地成为该类病害的主要中间寄主,其中牛膝菊和芹菜是首次在国内发现可以被TSWV侵染。

本研究对番茄、辣椒、茼蒿、油麦菜、鬼针草、马铃薯和芹菜中TSWV分类相关的 N 基因进行克隆、测序和序列分析,发现该区域TSWV不同寄主分离物 N 基因核苷酸序列同源性在98.4%以上,编码蛋白氨基酸序列同源性在99.2%以上,系统进化分析表明相同地理分布的各TSWV分离物聚为一支;同一地区TSWV在不同寄主中交叉传播扩散,因此在云南省昆明市不同寄主中获得的TSWV分离物具有相同的系统进化关系,表明TSWV云南分离物具有相同的进化来源。这与French et al. (2016)对美国新墨西哥州6种不同作物上TSWV种群的分析结果一致。

TSWV主要通过蓟马传播,包括西花蓟马、花蓟马 *Frankliniella intonsa* 和棕榈蓟马 *Thrips palmi* 等9种蓟马,其中以西花蓟马为主(Riley et al., 2011)。前期研究已表明滇中昆明和玉溪等市的番茄、辣椒中蓟马种类主要有西花蓟马、花蓟马和棕榈蓟马,其中西花蓟马是优势种群,约占调查数量的90%以上。西花蓟马作为TSWV的主要传播介体,其数量变化与TSWV的发生呈正相关(郝建华等, 2009; 郑雪等, 2015)。本研究通过苗期和大棚定植期使用防虫网隔离蓟马防控番茄斑萎病毒病起到了明显的效果,其中苗期使用防虫网效果最为明显,其初始发病率和种苗带毒率均为0,确保了使用无毒健康番茄种苗进行生产,这与王广印等(2016)和李娇娇等(2017)应用防虫网隔离烟粉虱 *Bemisia tabaci* 显著降低番茄褪绿病和番茄曲叶病危害的研究结果相同。因此,在温带露地栽培条件下,番茄斑萎病毒病

害的防控首先应从使用无毒健康种苗入手,使用防虫网物理隔离TSWV传毒介体蓟马可以减少病毒传播扩散,降低番茄斑萎病毒病的发生危害程度。

番茄斑萎病毒病害已成为云南省各地经济作物生产中重要的病毒病害,并且发生面积、危害程度呈逐年加重的趋势。本研究从TSWV在番茄中的发生流行、重病区杂草和其它作物寄主种类鉴定几方面明确了温带区域露地栽培条件下蔬菜中番茄斑萎病毒病的发生流行规律,系统监测了周边主要寄主带毒情况,研究了防虫网对该类病害在苗期和生产期的病害防控效果。下一步工作应加强蓟马传播TSWV特性、TSWV寄主范围变化、种苗TSWV快速检测技术以及抗病品种筛选等方面的研究。建议在番茄生产上应进一步加强无病毒种苗使用、蓟马综合防控、田园杂草铲除、番茄种植时间调整、轮作或冬季闲田等措施减少大田环境中病毒积累量和传播介体,从而有效控制TSWV在该地区的发生和蔓延。

参考文献 (References)

- ADAMS MJ, LEFKOWITZ EJ, KING AMQ, HARRACH B, HARRISON RL, KNOWLES NJ, KROPINSKI AM, KRUPOVIC M, KUHN JH, MUSHEGIAN AR, et al. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). Archives of Virology, 162: 2505–2538
- ADKINS S. 2000. Tomato spotted wilt virus: positive steps towards negative success. Molecular Plant Pathology, 1(3): 151–157
- BALD-BLUME N, BERGERVOET JHW, MAISS E. 2017. Development of a molecular assay for the general detection of tospoviruses and the distinction between tospoviral species. Archives of Virology, 162(6): 1519–1528
- CHOU WC, LIN SS, YEH SD, LI SL, PENG YC, FAN YH, CHEN TC. 2017. Characterization of the genome of a phylogenetically distinct tospovirus and its interactions with the local lesion-induced host *Chenopodium quinoa* by whole-transcriptome analyses. PLoS ONE, 12(8): e0182425
- CIUFFO M, NERVA L, TURINA M. 2017. Full-length genome sequence of the tospovirus melon severe mosaic virus. Archives of Virology, 162(5): 1419–1422
- DONG JH, YIN YY, XU XY, DUAN YM, ZHANG ZK. 2010. First report of tomato spotted wilt virus in tomato and tobacco in China. Journal of Plant Pathology, 92(S4): 121
- FRENCH JM, GOLDBERG NP, RANDALL JJ, HANSON SF. 2016. New Mexico and the southwestern US are affected by a unique population of tomato spotted wilt virus (TSWV) strains. Archives of Virology, 161: 993–998
- GROVES RL, WALGENBACH JF, MOYER JW, KENNEDY GG. 2001. Overwintering of *Frankliniella fusca* (Thysanoptera: Thripidae) on winter annual weeds infected with *Tomato spotted*

- wilt virus and patterns of virus movement between susceptible weed hosts. *Phytopathology*, 91(9): 891–899
- HAO JH, LIU QQ, QIANG S. 2009. Reproduction traits associated with invasiveness in *Bidens pilosa* (Asteraceae). *Chinese Bulletin of Botany*, 44(6): 656–665 (in Chinese) [郝建华, 刘倩倩, 强胜. 2009. 菊科入侵植物三叶鬼针草的繁殖特征及其与入侵性的关系. *植物学报*, 44(6): 656–665]
- HASSANI-MEHRABAN A, WESTENBERG M, VERHOEVEN JTJ, VAN DE VOSSENBERG BTLH, KORMELINK R, ROENHORST JW. 2016. Generic RT-PCR tests for detection and identification of tospoviruses. *Journal of Virological Methods*, 233: 89–96
- HUANG KS, TAI CH, CHENG YH, LIN SH, CHEN TC, JAN FJ. 2017. Complete nucleotide sequences of M and L RNAs from a new pepper-infecting tospovirus, *Pepper chlorotic spot virus*. *Archives of Virology*, 162(7): 2109–2113
- JIANG L, HUANG Y, SUN L, WANG B, ZHU M, LI J, HUANG C, LIU Y, LI F, LIU Y, et al. 2017. Occurrence and diversity of *Tomato spotted wilt virus* isolates breaking the *Tsw* resistance gene of *Capsicum chinense* in Yunnan, southwest China. *Plant Pathology*, 66: 980–989
- KUWABARA K, YOKOI N, OHKI T, TSUDA S. 2010. Improved multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction to detect and identify five tospovirus species simultaneously. *Journal of General Plant Pathology*, 76: 273–277
- LI JJ, ZHANG XX, ZHOU XH, YU Y, GUO JJ, ZHANG AS. 2017. Occurrence regularity of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) disease and its relations with population dynamics of *Bemisia tabaci* biotype Q in solar greenhouses. *Journal of Plant Protection*, 44(5): 746–752 (in Chinese) [李娇娇, 张秀霞, 周仙红, 于毅, 国家进, 张安盛. 2017. 日光温室番茄褪绿病毒病的发生规律及其与Q型烟粉虱种群动态关系. *植物保护学报*, 44(5): 746–752]
- LI YY, XIAO L, TAN GL, FU XP, LI RH, LI F. 2015. First report of *Tomato spotted wilt virus* on celery in China. *Plant Disease*, 99(5): 734
- PAPPU HR, JONES RAC, JAIN RK. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, 141(2): 219–236
- RILEY DG, JOSEPH SV, SRINIVASAN R, DIFFIE S. 2011. Thrips vectors of tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management*, 2(1): 1–10
- SCHNEWEIS DJ, WHITFIELD AE, ROTENBERG D. 2017. Thrips developmental stage-specific transcriptome response to tomato spotted wilt virus during the virus infection cycle in *Frankliniella occidentalis*, the primary vector. *Virology*, 500: 226–237
- SCHOLTHOF KG, ADKINS S, CZOSNEK H, PALUKAITIS P, JACQUOT E, HOHN T, HOHN B, SAUNDERS K, CANDRESSE T, AHLQIIST P, et al. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9): 938–954
- WANG GY, WANG SN, CHEN BH, SHEN J. 2016. Effects of insect-proof screens on microclimate in greenhouse, growth and pests of autumn tomato. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 45(7): 76–81, 92 (in Chinese) [王广印, 王胜楠, 陈碧华, 沈军. 2016. 防虫网覆盖对大棚内小气候、秋番茄生长和病虫害的影响. *河南农业科学*, 45(7): 76–81, 92]
- WANG LS, CHEN XJ, CHEN W, TAN QQ, YANG XH. 2015. Detection of main viral species of vegetable virus diseases in Guizhou. *Guangdong Agricultural Sciences*, 42(20): 63–67 (in Chinese) [王莉爽, 陈小均, 陈文, 谭清群, 杨学辉. 2015. 贵州蔬菜病毒病主要病毒种类检测. *广东农业科学*, 42(20): 63–67]
- WANG Y, GAO W, ZHANG CX. 2014. Occurrence and ELISA detection of tomato virus in Tianjin area. *Tianjin Agricultural Sciences*, 20(12): 1–5 (in Chinese) [王勇, 高苇, 张春祥. 2014. 天津地区番茄病毒病发生情况调查及其毒源ELISA检测. *天津农业科学*, 20(12): 1–5]
- XIAO L, LI YY, LAN PX, TAN GL, DING M, LI RH, LI F. 2016. First report of *Tomato spotted wilt virus* infecting cowpea in China. *Plant Disease*, 100(1): 233
- XU ZY, ZHANG ZY, CHEN JX. 1989. Biological properties of a Guangdong isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV). *Acta Phytopathologica Sinica*, 19(4): 198 (in Chinese) [许泽永, 张宗义, 陈金香. 1989. 番茄斑萎病毒(TSWV)广州分离物生物学特性研究. *植物病理学报*, 19(4): 198]
- YAO G. 1992. Tomato spotted wilt virus (TSWV) on cigar tobacco in Sichuan. *Chinese Tobacco Science*, (4): 2–4 (in Chinese) [姚革. 1992. 四川晒烟上发现番茄斑萎病毒(TSWV). *中国烟草*, (4): 2–4]
- YIN YY, DONG JH, XU XY, DUAN YM, ZHANG ZK. 2013. Genetic diversity of isolates of *Tomato spotted wilt virus* in Kunming. *Southwest China Journal of Agricultural Science*, 26(1): 159–162 (in Chinese) [尹跃艳, 董家红, 徐兴阳, 端永明, 张仲凯. 2013. 昆明番茄斑萎病毒不同分离物N基因遗传多样性分析. *西南农业学报*, 26(1): 159–162]
- ZHANG ZK, DING M, FANG Q, ZHANG LZ, LI TT, PENG LB, SU XX, LI Z. 2004. The preliminary study of the occurrence and distribution of *Tospovirus* in Yunnan. *Southwest China Journal of Agricultural Science*, 17(S1): 163–168 (in Chinese) [张仲凯, 丁铭, 方琦, 张丽珍, 李婷婷, 彭璐波, 苏晓霞, 李展. 2004. 番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*)病毒在云南的发生分布研究初报. *西南农业学报*, 17(S1): 163–168]
- ZHENG X, CHEN YD, WU K, ZHANG LZ, SU XX, ZHENG KY, ZHANG J, DONG JH. 2015. Occurrence characteristics of tospoviruses and thrips vectors on tomato and pepper of Yunnan in 2014. *Journal of Southern Agriculture*, 46(3): 428–432 (in Chinese) [郑雪, 陈永对, 吴阔, 张丽珍, 苏晓霞, 郑宽瑜, 张洁, 董家红. 2015. 2014年云南番茄、辣椒上番茄斑萎病毒属病毒与传毒蓟马的发生特点. *南方农业学报*, 46(3): 428–432]
- ZHENG YX, HUANG CH, CHENG YH, KUO FY, JAN FJ. 2010. First report of *Tomato spotted wilt virus* in sweet pepper in Taiwan. *Plant Disease*, 94(7): 920
- ZHU M, JIANG L, BAI BH, ZHAO WY, CHEN XJ, LI J, LIU Y, CHEN ZQ, WANG BT, WANG CL, et al. 2017. The intracellular immune receptor sw-5b confers broad-spectrum resistance to tospoviruses through recognition of a conserved 21-amino-acid viral effector epitope. *Plant Cell*, 29(9): 2214–2232

(责任编辑:李美娟)