

# 3 个烤烟品系对 TMV 抗性的遗传规律分析

张 玉<sup>1</sup>, 蒋彩虹<sup>1</sup>, 冯 莉<sup>1</sup>, 张 伟<sup>1</sup>, 殷 英<sup>2</sup>, 常爱霞<sup>1</sup>, 杨爱国<sup>1</sup>, 冯全福<sup>1</sup>, 罗成刚<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; <sup>2</sup> 四川省烟草技术中心, 西昌 615000)

**摘要:**为更好地利用抗 TMV 烤烟种质资源, 提高烤烟抗 TMV 育种效率, 对烤烟品系 CV87、FC8、抗 88 的 TMV 抗性遗传规律及抗性来源进行了研究。利用抗病烤烟品系 CV87、FC8、抗 88 分别与感病品种云烟 87、中烟 100 配置杂交组合, 构建 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 群体, 并利用 TMV-C 菌株进行抗性鉴定; 同时, 设计 *N* 基因引物对参试烤烟品种(系)的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。经抗性鉴定, CV87、FC8、抗 88 及 F<sub>1</sub> 群体对 TMV 免疫, 云烟 87、中烟 100 感 TMV, 卡方( $\chi^2$ ) 检验证明 F<sub>2</sub> 群体抗感分离比为 3:1, 符合显性单基因遗传; PCR 结果表明, 抗病品系 CV87、FC8、抗 88 基因组内存在 *N* 基因序列, 感病品种云烟 87、中烟 100 基因组内未发现。本研究表明, CV87、FC8、抗 88 烤烟品系的 TMV 抗性来源于 *N* 基因。

**关键词:**烟草; TMV; 抗性; 遗传分析

## Inheritance for Resistance to TMV in Three Tobacco Lines

ZHANG Yu<sup>1</sup>, JIANG Cai-hong<sup>1</sup>, FENG Li<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, YIN Ying<sup>2</sup>,

CHANG Ai-xia<sup>1</sup>, YANG Ai-guo<sup>1</sup>, FENG Quan-fu<sup>1</sup>, LUO Cheng-gang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101;

<sup>2</sup> Tobacco Technology Center of Sichuan Province, Xichang 615000)

**Abstract:** For effective use of tobacco germplasm resources resistant to TMV, and improve resistance breeding efficiency against TMV, the inheritance for TMV resistance and resistance gene in three flue-cured tobacco lines, CV87, FC8 and Kang88, were studied. CV87, FC8 and Kang88 were crossed with YunYan87 or ZhongYan100, respectively, and F<sub>1</sub> plants were self-pollinated to produce F<sub>2</sub> populations, then the TMV resistance of CV87, FC8, Kang88 and there F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> populations were identified by inoculating TMV-C strain; In addition, *N* gene primers were used to detect *N* gene sequence in genomic DNA of CV87, FC8, Kang88, YunYan87 and ZhongYan100. Resistance identification showed that CV87, FC8, Kang88 and F<sub>1</sub> group were immune to TMV, YunYan87 and ZhongYan100 were susceptible to TMV, and Chi-square ( $\chi^2$ ) tests proved that the separation ratio of F<sub>2</sub> groups were 3:1, in accordance with the dominant single gene inheritance; PCR results found that *N* gene was present in resistant lines, CV87, FC8, Kang88, did not exist in susceptible materials, YunYan87 and ZhongYan100. The results indicated that the TMV resistance of CV87, FC8 and Kang 88 were controlled by single dominant gene *N*.

**Key words:** tobacco; TMV; resistance; genetic analysis

烟草普通花叶病(TMV, tobacco mosaic virus) 是全世界烟草栽培区发生普遍、危害严重的一大病害<sup>[1-2]</sup>。发病后, 烟叶产量降低, 品质变劣, 给烟叶

生产带来极大危害。目前, 对于 TMV 的防治没有效果较好的药剂, 只能采取提前预防、综合防治等措施, 由于受耕地资源紧张、连作的影响, 培育抗 TMV

收稿日期: 2012-12-11 修回日期: 2013-05-04 网络发表日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1448.034.html>

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31240013); 中国烟草总公司科技重点项目(110201002002); 中国农业科学院烟草研究所所长基金(TR20115); 四川省烟草专卖局项目(201101004)

第一作者主要从事烟草遗传育种研究, E-mail: zhy160@163.com; 蒋彩虹为并列第一作者

通信作者: 罗成刚, 主要从事烟草遗传育种研究, E-mail: ctsqz@163.net

的烤烟品种在生产中显得尤为迫切和重要<sup>[3]</sup>。*N* 基因起源于野生种黏烟草 (*Nicotiana glutinosa*), 是目前已经明确的烟草抗 TMV 基因, 是烟草抗 TMV 育种的主要抗源<sup>[4]</sup>。1938 年, F. O. Holmes<sup>[5]</sup> 研究表明, 黏烟草对 TMV 的抗性是由显性单基因 *N* 控制的; 1994 年, S. Whitham 等<sup>[6]</sup> 通过转座子标签法克隆得到 *N* 基因, 并证明其介导的 TMV 抗性可以产生过敏性坏死反应。国外已经利用 *N* 基因介导的 TMV 抗性育成了一批高抗 TMV 的品种, 包括 Ky56、By21、NC75、VA770、TN86、Coler176、Coker86 等。我国也利用该抗源培育了一系列抗 TMV 品种(系), 如: 利用 Ky56 作为亲本育成了辽烟 8 号、辽烟 10 号等抗 TMV 品种; 利用 Coker86 的抗病性, 育成了辽烟 13、辽烟 14 等抗 TMV 品种<sup>[7]</sup>。这些品种在我国的烤烟生产中发挥了重要作用。

除 *N* 基因外, 研究者还发现了其他抗 TMV 基因, 普通烟草中的安巴里玛 (Ambalema) 品种对 TMV 表现出抗病性<sup>[8]</sup>, 其抗性是由隐性等位基因 *rm1* 和 *rm2* 控制的, 而且抗病基因与不良性状基因有连锁关系<sup>[9]</sup>; 引进品种 TI245 对 TMV 表现出抗侵染, 其抗性是由隐性基因 *tl1tl2tl2* 控制的<sup>[10]</sup>。我国具有丰富的烟草种质资源<sup>[11-12]</sup>, 但一些优良的抗 TMV 材料的抗性规律及来源还未见明确的研究报道, 如, CV87、FC8、抗 88 等, 一定程度上阻碍了其抗性在烤烟育种中的应用。另外, 利用 *N* 基因序列开发分子标记, 可以快速高效地检测 *N* 基因控制的 TMV 抗性, 加快抗 TMV 种质资源筛选和育种效率。因此, 本研究的开展对于深入了解抗 TMV 烟草种质资源的抗性遗传规律和抗性来源, 发掘和利用抗 TMV 种质资源, 加快烟草抗 TMV 育种具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

抗 TMV 品系 CV87、FC8 和抗 88 及感病品种中烟 100 和云烟 87 由中国农业科学院烟草研究所育种中心提供; 烟草普通花叶病毒普通株系 TMV-C 毒源由中国农业科学院烟草研究所植保室提供。

### 1.2 群体构建

根据参试烤烟品种(系)对 TMV 的抗感特性, 配置抗 88 × 云烟 87、中烟 100 × FC8、云烟 87 × CV87 杂交组合, 获得 F<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> 自交获得 F<sub>2</sub> 群体。

### 1.3 TMV 抗性鉴定

TMV 抗性鉴定在中国农业科学院烟草研究所温室内进行, 室内温度控制在 25 °C 左右, 湿度保持

在 50% ~ 60% 之间。烟草普通花叶病毒株系 TMV-C 保存在 NC89 植株上, 接种时取发病的鲜烟叶研磨、过滤, 用蒸馏水稀释, 按质量体积比 (W:V) 1:100 配置成接种液供接种用。在烟苗 5 ~ 6 叶期, 对 CV87、FC8、抗 88、中烟 100、云烟 87 及 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 群体利用摩擦法进行接种, 接种后 30 d 统计发病率, 采用卡方 (χ<sup>2</sup>) 检验对 F<sub>2</sub> 群体的抗感比例进行适合性分析。

### 1.4 *N* 基因 PCR 扩增

已有研究人员开发了检测 *N* 基因的分子标记引物<sup>[13-14]</sup>, 为更准确检测 *N* 基因控制的 TMV 抗性, 开发新的分子标记, 本研究根据从 NCBI 得到的 *N* 基因 DNA 序列结构特点, 应用 Primer 5.0 软件设计了 3 对特异引物, 引物序列及扩增片段大小见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	扩增片段大小 (bp) PCR fragment length
NM1	F: TGATGCAGACTGTATTTCGAC R: GTGTGTTGCTCATCACCTTC	1092
NM2	F: GCATGTAGATTGTCATATGGCTC R: CTTGTTTATTGGCCACCGGA	969
NM3	F: GGAGAACGTAGCAGACTATG R: GGTCGATGACATCCCTATGT	1022

PCR 扩增反应体系为 20 μL, 扩增条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化, 将 PCR 产物纯化后连接到 pEASY-T1 克隆载体上。连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 37 °C 培养 14 ~ 16 h, 挑取单菌落培养、测序。

试验材料基因组 DNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司, pEASY-T1 cloning Kit、2 × EasyTaq PCR superMix、TOP10 感受态细胞以及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, PCR 扩增序列由深圳华大基因研究院测序, 利用 DNAMAN 软件对扩增序列和目标序列进行比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本及 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 群体 TMV 抗性鉴定

参试烤烟品种(系)亲本及 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 群体接种 TMV 后发病情况见表 2。除 CV87 的 1 个植株、抗 88 × 云烟 87 组合 4 个 F<sub>1</sub> 植株及云烟 87 × CV87 组合 2 个 F<sub>1</sub> 植株出现花叶症状外,所有 CV87、FC8、抗 88 及 3 个杂交组合 F<sub>1</sub> 植株接种叶均产生枯斑,表现出过敏

表 2 亲本及 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 群体 TMV 抗性鉴定结果

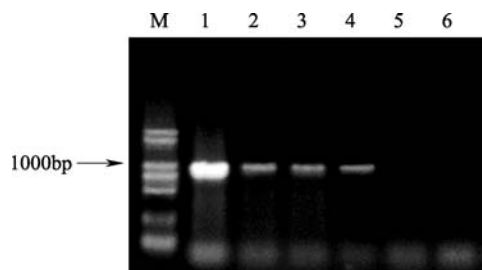
Table 2 Segregation ratio of resistance and susceptible in different combinations

亲本/组合 Parent/Combination	世代 Generation	株数 Tobacco number		感病率/抗感比 Susceptible rate/Ratio of resistance to susceptible	理论比 Theoretical ratio	χ <sup>2</sup> Chi-square	P 值 P value
		枯斑反应 Hypersensitive reaction	花叶症状 Mosaic symptoms				
抗 88		66	0	0			
FC8		51	0	0			
CV87		58	1	1.69%			
云烟 87		10	50	83.33%			
中烟 100		14	48	77.42%			
抗 88 × 云烟 87	F <sub>1</sub>	50	4	7.41%			
	F <sub>2</sub>	111	39	2.85:1	3:1	0.08	>0.05
中烟 100 × FC8	F <sub>1</sub>	57	0	0			
	F <sub>2</sub>	112	29	3.86:1	3:1	1.48	>0.05
云烟 87 × CV87	F <sub>1</sub>	45	2	4.25%			
	F <sub>2</sub>	112	35	3.20:1	3:1	0.11	>0.05

### 2.2 N 基因 PCR 扩增

用本研究设计的 N 基因引物对 CV87、FC8、抗 88、Coker176、云烟 87、中烟 100 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增(图 1),Coker176 为阳性对照,是已明确的含有 N 基因的抗 TMV 烤烟品种<sup>[15]</sup>。扩增结果发现,引物 NM1、NM3 扩增效果不理想;NM2 扩增效果较好,其扩增结果如图 1 所示,CV87、FC8、抗 88、Coker176 的基因组 DNA 中扩增出了片段大小为 1000 bp 左右的条带,与预期片段大小相吻合,云烟 87、中烟 100 基因组 DNA 中未出现条带。对扩增出的条带进行测序,发现扩增序列与 N 基因的目标片段一致性均达到了 99% 以上,仅有个别碱基存在差异,说明扩增序列为 N 基因序列片段。试验结果表明,CV87、FC8、抗 88 基因组内存在 N 基因序列,3 个烤烟品系的 TMV 抗性来源于 N 基因。

性坏死反应(HR, hypersensitive reaction),说明对 TMV 免疫;云烟 87 和中烟 100 的发病率分别为 83.33% 和 77.42%,为感 TMV 材料;F<sub>2</sub> 群体抗感性状出现了分离,对不同组合 F<sub>2</sub> 群体抗感分离比进行卡方(χ<sup>2</sup>)检验,结果显示所有组合的 P 值均大于 0.05,差异不显著,说明 F<sub>2</sub> 群体抗病、感病植株的分离比符合 3:1 的比例,表明 3 个烤烟品系对 TMV 的抗性受显性单基因控制。



M: DL 2000 DNA maker; 1: CV87; 2: FC8;  
3: 抗 88; 4: Coker176; 5: 云烟 87; 6: 中烟 100

图 1 N 基因序列 PCR 扩增结果

Fig. 1 The PCR result of N gene sequence

## 3 讨论

本研究从抗感性状分离和分子水平上证明了 CV87、FC8、抗 88 的 TMV 抗性来源于 N 基因,云烟 87 和中烟 100 两个感 TMV 品种基因组内不存在 N

基因序列。当 TMV 侵染不含 *N* 基因的烟草时, TMV 会在植株内系统的传播, 引发全株性的花叶症状, 而当 TMV 侵染含有 *N* 基因的烟草时, 48 h 以内会产生过敏性坏死反应, 在侵染位点形成枯斑, 限制病毒的扩散<sup>[16]</sup>。在 CV87、FC8、抗 88、中烟 100、云烟 87 及 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 群体的发病率统计中, 云烟 87 和中烟 100 分别有 16.67% 和 22.58% 的烟株未表现出花叶症状, 可能与接种条件和培养环境有关, 导致其部分烟苗未发病; CV87、FC8、抗 88 及 F<sub>1</sub> 群体绝大多数植株表现出过敏性坏死反应, 符合 *N* 基因控制的 TMV 抗性特点, 但是有少数烟株表现出了花叶症状, 可能原因是收种时混进了少量其他品种(系)的种子。

CV87、FC8、抗 88 的 TMV 抗性来源于 *N* 基因, 属于显性单基因控制, 为高效利用这些种质材料提供了依据。一方面, 可以通过杂种优势与优质高产种质进行杂交, 直接利用 F<sub>1</sub>, 将会大大缩短获得抗病优质烤烟新品种(系)的时间; 另一方面, 还可通过回交的方式获得优质抗病品种(系), 以优质品种(系)为父本, 连续回交, 对后代进行严格的抗性鉴定, 保持父本的优异品质性状, 并结合抗 TMV 性状; 此外, 还可以通过聚合杂交等育种方法, 将多个抗源的抗性基因聚合在一起, 创造高抗 TMV 兼抗其他病原的烟草品种或种质。

在传统的抗 TMV 育种中, 需要对育种材料进行单株接种并创造合适的发病条件, 接种不成功或条件不合适会影响选择效率, 而分子标记辅助育种可以克服这些限制, 极大地加速材料的选育过程, 缩短育种周期, 提高育种效率<sup>[17]</sup>。因此, 利用 *N* 基因开发分子标记可以为烤烟抗 TMV 育种提供一条快捷有效的方法。高玉龙等<sup>[13]</sup>根据 *N* 基因序列发明了一种检测烟草 TMV 抗性基因 *N* 的检测方法(专利公开号: CN101892304A), 并利用该发明的分子标记对 84 份烤烟品种(系)进行检测, 结果与品种(系)的 TMV 抗性相吻合。刘磊等<sup>[14]</sup>利用 *N* 基因的 cDNA 序列设计出 2 对用于分子标记辅助育种的引物, 成功建立了 *N* 基因 cDNA 序列 PCR 检测体系, 证明在 *N* 基因 cDNA 序列上设计引物扩增 DNA 序列的目的基因辅助育种技术也是可行的。

在本研究中, 为开发新的检测 *N* 基因控制 TMV 抗性的分子标记, 使检测更加快速、准确, 共设计了 3 对引物用于 *N* 基因序列的 PCR 扩增, 只有 NM2 引物具有较好的扩增效率和准确率, 由此可见, 引物的设计对于 PCR 扩增具有关键性的作用。下一步将针对该引物扩大试验材料数量, 进一步分析该对引物的扩增特异性及正确率, 开发用于快速检测 *N* 基因控制 TMV 抗性的新的有效分子标记, 提高烤烟抗 TMV 育种效率。

#### 参考文献

- [1] 刘艳华, 王志德, 钱玉梅, 等. 烟草抗病毒病种质资源的鉴定与评价[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(5): 1-4
- [2] 许美龄, 赵立红, 段玉琪, 等. 抗 TMV 烟草种质资源材料的筛选和综合评价[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(1): 29-31
- [3] 陈庆园, 陆宁, 高胜华, 等. 烤烟品种 K326 突变株抗烟草普通花叶病(TMV)的研究初报[J]. 中国烟草学报, 2010, 16(1): 58-62
- [4] Marathe R, Anandalakshmi R, Liu Y L, et al. The tobacco mosaic virus resistance gene, *N* [J]. Plant Pathol, 2002, 3(3): 167-172
- [5] Holmes F O. Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in tobacco [J]. Phytopathology, 1938, 28: 553-561
- [6] Whitham S, Dinesh-Kumar S P, Choi D, et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor [J]. Cell, 1994, 78: 1101-1115
- [7] 许石剑, 肖柄光, 李永平. 抗 TMV 育种研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(16): 91-94
- [8] Holmes F O. Control of TMV in tobaccos [J]. Phytopathology, 1955, 45: 224-225
- [9] 中国农业科学院烟草研究所. 中国烟草栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 152-153, 176-178
- [10] 杨铁钊. 烟草育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 231
- [11] 刘艳华, 王志德, 牟建民, 等. 烟草种质更新理论与技术[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(4): 618-622
- [12] 许美玲, 肖炳光, 李祥. 20 份新编目入国家烟草种质库的烤烟种质的鉴定和分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 671-678
- [13] 高玉龙, 肖炳光, 童治军, 等. 烟草抗 TMV 基因连锁分子标记的筛选及在抗病资源筛选中的应用[J]. 分子植物育种, 2011, 9(5): 585-591
- [14] 刘磊, 郭兆奎, 万秀清, 等. *N* 基因标记基因 PCR 检测方法的建立及其在遗传育种中的应用[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 167-171
- [15] 李梅云, 冷晓东, 肖炳光, 等. 烟草抗黑胫病和 TMV 种质资源的鉴定与评价[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(23): 11678-11680
- [16] Reona T, Shigemi S, Ichiro M, et al. Accumulation of the two transcripts of the *N* gene, conferring resistance to tobacco mosaic virus, is probably important for *N* Gene-dependent hypersensitive cell death [J]. Plant Cell Physiol, 2006, 47(2): 254-261
- [17] 曹秀霞, 吴建勇, 邢朝柱, 等. 棉花细胞质雄性不育性恢复基因的定位及分子标记辅助育种研究进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(6): 8-13