

## 烟草抗马铃薯 Y 病毒(PVY)病突变体筛选与鉴定

乔婵<sup>1</sup>, 万秀清<sup>1\*</sup>, 李若<sup>1</sup>, 魏亭宇<sup>2</sup>, 吴国顺<sup>2</sup>, 都兴洋<sup>3</sup>, 黄磊<sup>4</sup>

(1. 黑龙江省牡丹江烟草科学研究所, 黑龙江牡丹江 157011; 2. 黑龙江省牡丹江烟叶公司, 黑龙江牡丹江 157011; 3. 广州出入境检验检疫局, 广东广州 510000; 4. 黑龙江省牡丹江铁路公安处, 黑龙江牡丹江 157011)

**摘要** [目的]筛选与鉴定烟草抗 PVY 病突变体, 为寻找抗 PVY 的基因奠定基础。[方法]通过苗期对烟草突变材料进行 PVY 接种鉴定, 肉眼对材料进行初步筛选, 对筛选到的抗性材料进一步荧光定量鉴定, 对筛选鉴定的抗性材料进行苗期鉴定及田间抗性鉴定。[结果]2011 年筛选获得 2 个高抗 PVY 的突变体 MZE2-15 和 MZE2-16, 以及 3 个耐 PVY 突变体 MZE2-70、MZE2-207 及 MZE2-228; 2012 年进一步筛选鉴定, 突变体材料 MZE2-407 和 MZE2-428 感 PVY, MZE2-16 和 2 份 MZE2-15 突变体材料抗 PVY。[结论]试验结果为控制烟草 PVY 病的危害提供了理论依据。

**关键词** 烟草; PVY; 突变体**中图分类号** S572 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)03-099-03**Selection and Identification of Tobacco Mutants with PVY Resistance****QIAO Chan, WAN Xiu-qing<sup>\*</sup>, LI Ruo et al** (Mudanjiang Tobacco Research Institute, Mudanjiang, Heilongjiang 157011)

**Abstract** [Objective] Tobacco mutants with PVY resistance were selected and identified to lay the basis for finding PVY resistant genes. [Method] Different tobacco mutants were inoculated with PVY in seedling stage and were preliminarily selected by naked-eye observation. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), realtime fluorescence quantitative PCR and test strip assay were performed to further identify pre-selected mutants. Finally, resistance of these identified mutants was evaluated by pot culturing in green house and in the open field. [Result] Two mutants MZE2-15 and MZE2-16 showing high PVY resistance and three mutants MZE2-70, MZE2-207 and MZE2-228 with tolerant PVY resistance were obtained in 2011. These mutants were further identified in 2012, and results showed that MZE2-407 and MZE2-428 were PVY susceptible, whereas MZE2-16 and MZE2-15 were PVY resistant. [Conclusion] The results provide theoretical basis for the control of tobacco PVY.

**Key words** Tobacco; PVY; Mutants

烟草 PVY 病又称为叶脉坏死病、烟草脉带病、黄斑病, 是能系统侵染烟草的病害<sup>[1-2]</sup>。烟草 PVY 病在我国分布广, 危害重, 对烟草生产的危害正逐年加重, 近年来更是在多个烟区呈急剧上升趋势, 已成为危害我国各烟区烟草的主要病毒病害之一<sup>[3-4]</sup>。烟草一旦感染 PVY, 整片叶子几乎失去烘烤价值, 严重情况下烟茎坏死、叶片坏死, 每公顷产值减少 11%~18%; 除影响产量外, 被 PVY 侵染后的烟叶全氮含量增加, 烟碱含量升高, 尼古丁含量增加, 糖氮比降低, 还原糖减少, 烤晒后的色泽及气味等品质均大大降低, 烟叶等级指数也降低 36%~62%<sup>[5-6]</sup>; PVY 侵染烟草引起的 PVY 病严重影响烟叶的产量和质量, 并造成较大的经济损失, 严重影响烤烟生产的可持续发展<sup>[7]</sup>。

烟草基因组重大专项项目“烟草突变体库创制、筛选与分析”实施以来, 通过化学和生物学方法创制和收获了 15 万份烟草突变二代种子, 建立了 10 个表型筛选方法和 2 个序列筛选方法<sup>[8]</sup>。笔者以此为基础, 开展了烟草抗 PVY 病突变体筛选与鉴定, 旨在为控制烟草 PVY 病的危害提供理论依据。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** 230 份中烟 100 的 EMS 突变材料(山东省青州烟草研究院提供), PVY 抗性对照品种 VAM, PVY 感病对照

品种 NC95。LJ925(抗 TMV, 感 PVY)接种毒源。PVY 检测试纸条及 PVY 株系检测试剂盒; 分子生物学试验试剂材料。

**1.2 方法**

**1.2.1 PVY 毒源的采集、鉴定及繁殖。**

**1.2.1.1 毒源的采集。**从黑龙江省哈尔滨烟叶产区和牡丹江烟叶产区采集疑似 PVY 样品, 置于冰箱冷冻保存。

**1.2.1.2 毒源的分子鉴定。**通过从 Genbank 上下载的 PVY 各株系序列的比对, 设计合成 PVY 通用鉴定引物, 引物设计于 P1 基因, PCR 扩增片段为 730 bp 左右; 10.0 μl 的 PCR 扩增体系为: 2.5 mmol/L dNTPs 1.0 μl, 10 × PCR buffer 1.0 μl, Taq 酶 0.2 μl, 引物各 0.5 μl, 超纯水 5.8 μl, 菌液模板 1.0 μl。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1.2 min, 循环 36 次; 72 °C 延伸 10 min。引物序列: PVY-F, 5' TGC/TTA/TCCA/GTACTCACCC/AGC3'; PVY-R, 5' CCACG/ACACTATGAAT/CAA/GGCC3'。利用该引物对保存的毒源进行鉴定, 对特异条带进行回收测序。

**1.2.1.3 PVY 毒源的繁殖。**将通过生物学鉴定方法分离出纯的 PVY 病毒烟叶剪成碎片研成汁液, 加入汁液体积 10 倍的 PBS 缓冲液(pH 7.27)。在烤烟品种 LJ925 烟草困棵期, 选取中上部 2 片叶子进行病毒摩擦接种, 接种 20 d 左右表现明显的 PVY 症状。

**1.2.2 突变体烟苗种植方法。**2011 年 4 月 8 日播种 230 份突变体材料种子、感 PVY 的烟草品种 NC95 和抗 PVY 的烟草品种 VAM 作为对照品种, 2011 年 5 月 4 日假植, 每份材料假植 20 株, NC95 和 VAM 各假植 2 盘。

**基金项目** 国家局烟草基因组计划重大专项突变体项目[110201201004(JY-04)]。

**作者简介** 乔婵(1978-), 女, 黑龙江双城人, 农艺师, 硕士, 从事烟草分子生物学和病理学研究。\* 通讯作者, 高级农艺师, 硕士, 从事烟草分子生物学和病理学研究。

**收稿日期** 2014-12-03

**1.2.3 苗期 PVY 接种鉴定方法。**在烟苗 4 片真叶时期(2011 年 5 月 23 日),采用毛刷蘸取新鲜 PVY 汁液进行接种,接种后 20 d 烟苗显症,以抗病品种 VAM 外观形态及感病品种 NC95 PVY 症状为对照,拔除感病的烟苗(2011 年 6 月 15 日),剩余未显症烟苗喷肥后继续观察,7~10 d 后第 2 次将感病烟苗拔除(2011 年 6 月 26 日)。剩余没有明显 PVY 症状的烟苗成苗后移栽至大田进行进一步鉴定。

**1.2.4 大田期 PVY 接种鉴定方法。**经苗期筛选后移栽至大田的烟苗,生长至团棵期后接种 PVY 病毒,接种方法同“1.2.3”。接种后 20~30 d 以抗病品种 VAM 外观形态及感病品种 NC95 PVY 症状为对照,调查各材料发病情况,现蕾期对没有明显 PVY 症状的烟苗套袋留种。

**1.2.5 PVY 抗性材料抗性遗传稳定性鉴定方法。**对 2011 年最终筛选出的 5 份无 PVY 症状及症状不明显的突变体材料在 2012 年进行进一步的筛选鉴定。2012 年 3 月 30 日对 5 份材料进行播种,2012 年 4 月 19 日假植,每个材料假植 1 盘。2012 年 5 月 14 日利用繁殖的 PVY 毒源第 1 次进行苗期 PVY 接种,2012 年 5 月 27 日第 2 次进行苗期 PVY 接种,2012 年 6 月 18 日进行移栽,每个材料选择无明显 PVY 症状的烟苗移栽 24 株,田间正常农业管理。

## 2 结果与分析

### 2.1 PVY 毒源的采集样品、分子鉴定及繁殖样品

**2.1.1 PVY 毒源的采集样品。**采集的毒源样品见图 1。



图 1 采集的毒源样品

**2.1.2 PVY 毒源的分子鉴定。**毒源测序比对结果如下:

```
CCACGCACTATGAATAGGCCCTCCGAGCTTCTCCCAAAGTTTCTTGGATTAGTATTACTCAATATA
ACTCCACTATCGCCCTTGGTAGATCAGTAGCAGCAACTTGGTTAGTCCACTTGTCCGTCCTGGCGAGC
TGCTGTAGACGACACAACGGTCCATTATCACACCGAAAGTCCACTCTCTTTTCGTAACCTCTCATATGT
CGAGTGAACAACTGCGGATGTGATCCAAAACCTCTTTGTAGTGAACATGGGTACTTTTCTTGCTA
ATCAGTTGAACAGACCCTCCTTTGGTTGACATAATTTGCTTCACTGCTGTGATAAGGTGGTTTCAATTGT
CCCTCTGTCAACTTTGGCGTGTGATATGTTTTTGGTGTGCGCATCTTGGAGTTGTGTGGATGACACCC
CTCCGCACTGTGATTCAAGTTTTGAAGTGGCTCTCCACAGCAATAGTAATCTTGCACACAACACTT
GACGCAAGCAATTTGAAAATATATATCTCTCTTTCTCTTTCTCGGCTCTTTCGAATGGCGGCAATC
TGGACATCAGTCTTGTATCGATACATGCAAGTACCACCTCTTGGATGTTGCAATGGTTGGCAACTCTTGC
CTTCTGTAATCGCGCACTAAGCTGCATCTCCAAGCTTGGCAAGGGTTCAGTGGTGGTGAACACTCTCGT
TTCCCGCAACGAGCCAAAAGGAGCGGGTGTAGTACGGTAGCA
```

利用设计的引物对繁殖的 PVY 毒源及其他保存的毒源进行了鉴定,对特异条带进行了回收测序。由表 1 可知,该毒源与 PVY NE-11 分离物具有 99% 的同源性,证实为 PVY 病毒。

**2.1.3 PVY 毒源的繁殖样品。**PVY 突变体繁殖的毒源见

图 2。

表 1 PVY 毒源与几种病毒分离物的同源性比较

GenBank 登录号	名称	最大得分	总得分	序列覆盖率/%	期望值	最大一致度/%
DQ157180.1	PVY 分离物 NE-11 多聚蛋白基因完全编码序列	1 312	1 312	76	0	99
AY745494.1	PVY 分离物 N:O-Mb146 多聚蛋白基因部分编码序列	1 284	1 284	76	0	98
AY745491.1	PVY 分离物 N:O-Mb112 多聚蛋白基因完全编码序列	1 284	1 284	76	0	98



图 2 PVY 突变体繁殖的毒源

### 2.2 PVY 突变体材料苗期及大田期筛选鉴定

**2.2.1 PVY 突变体材料苗期筛选。**230 份突变体材料,其中有 3 份材料未发芽,其他材料生长良好(图 3~6)。苗期经过观察筛选,最终筛选出 314 株突变体材料进行田间种植。

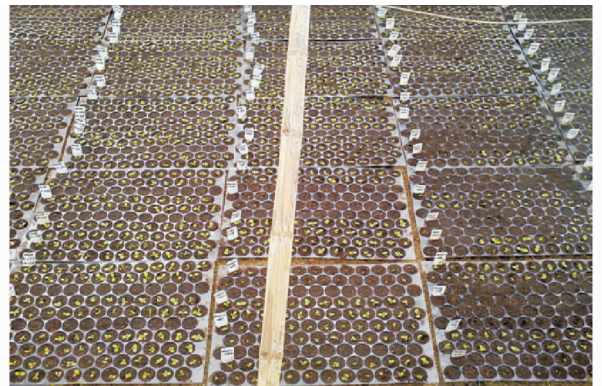


图 3 各材料育苗情况

**2.2.2 PVY 突变体材料大田期筛选鉴定。**将苗期筛选出的烟苗进行田间种植,在团棵期进行了 PVY 症状调查,筛选出 16 株无 PVY 症状或症状不明显的烟苗,对其重新进行 PVY 接种,8 月末再次进行 PVY 调查,最终筛选出 5 份无 PVY 症状及症状不明显的烟苗,其中 2 份基本看不到任何 PVY 症状,另外 3 份症状较轻(图 7~9)。其中,MZE2-16、MZE2-15 达到高抗,MZE2-70 及 MZE2-407 达到中抗水平,MZE2-428 为中感。利用 RT-PCR 方法对上述几份材料进行 PVY 病毒检测,结果表明各样品均感染 PVY 病毒,只是程度有所不同。

**2.2.3 大田期 PVY 抗性稳定性鉴定结果。**2012 年 7 月 23



图 4 感病突变体幼苗拔除



图 8 田间感病突变体材料



图 5 感病突变体幼苗



图 9 田间健康突变体材料



图 6 VAM 对照幼苗

材料 MZE2-407(图 10)和 MZE2-428 出现了感 PVY 的症状, MZE2-16 和 2 份 MZE2-15(图 11)突变体材料对 PVY 病毒具有抗性。因为该次试验的 PVY 株系致病性较强,导致烟苗死亡的发生。

表 2 田间 PVY 抗性调查

品种	编号	移栽数	存活数	PVY 感病数	PVY
		棵	棵	棵	抗性评价
MZE2-407	130	24	19	7	感病
MZE2-16	72	24	21	3	抗病
MZE2-15	91-1	24	19	4	抗病
MZE2-15	91-2	24	20	2	抗病
MZE2-428	98	24	14	8	感病



图 7 无 PVY 症状的突变体材料种植



图 10 MZE2-407(感病)

日进行田间 PVY 抗性调查。由表 2 可知,5 份突变体材料都移栽了 24 棵,其中 MZE2-428 存活的棵数最少,为 14 棵, MZE2-16 存活的棵数最多,为 21 棵;从抗病性来看,突变体

### 3 讨论

烟草感染 PVY 后,因品种和病毒株系的不同所表现的  
(下转第 112 页)

⑬、⑭极显著高于处理④、①、③、⑬、②、⑧、⑥、⑤、⑨、⑦。从芝麻菜全株干重来看,处理⑪、⑫、⑮极显著高于处理⑬、③、⑬、④、⑤、⑥、⑨、⑧、②、⑦、①,处理⑩、⑭极显著高于处理⑤、⑥、⑨、⑧、②、⑦、①。

表4 氮钾施肥对芝麻菜产量的影响 g/株

处理	组合	全株鲜重	处理	组合	全株干重
⑪	N <sub>3</sub> K <sub>3</sub>	9.346 ± 0.275Aa	⑪	N <sub>3</sub> K <sub>3</sub>	0.856 ± 0.020Aa
⑫	N <sub>3</sub> K <sub>4</sub>	8.877 ± 0.188ABab	⑫	N <sub>3</sub> K <sub>4</sub>	0.761 ± 0.017Bb
⑬	N <sub>4</sub> K <sub>4</sub>	8.007 ± 0.434BCbc	⑬	N <sub>4</sub> K <sub>3</sub>	0.683 ± 0.012BCc
⑮	N <sub>4</sub> K <sub>3</sub>	7.530 ± 0.255CDcd	⑮	N <sub>4</sub> K <sub>4</sub>	0.672 ± 0.010CDcd
⑩	N <sub>3</sub> K <sub>2</sub>	6.788 ± 0.142CDEde	⑩	N <sub>3</sub> K <sub>2</sub>	0.610 ± 0.037CDEde
⑭	N <sub>4</sub> K <sub>2</sub>	6.652 ± 0.373DEFdef	⑭	N <sub>4</sub> K <sub>2</sub>	0.592 ± 0.006DEe
④	N <sub>1</sub> K <sub>4</sub>	6.120 ± 0.359EFGefg	③	N <sub>1</sub> K <sub>3</sub>	0.575 ± 0.019Efe
①	N <sub>1</sub> K <sub>1</sub>	5.622 ± 0.413EFGfgh	⑬	N <sub>4</sub> K <sub>1</sub>	0.542 ± 0.012EFGef
③	N <sub>1</sub> K <sub>3</sub>	5.481 ± 0.318FGgh	⑭	N <sub>1</sub> K <sub>4</sub>	0.539 ± 0.037EFGefg
⑬	N <sub>4</sub> K <sub>1</sub>	5.470 ± 0.444FGgh	⑤	N <sub>2</sub> K <sub>1</sub>	0.495 ± 0.026FGHfgh
②	N <sub>1</sub> K <sub>2</sub>	5.333 ± 0.401Ggh	⑥	N <sub>2</sub> K <sub>2</sub>	0.491 ± 0.008FGHfgh
⑧	N <sub>2</sub> K <sub>4</sub>	5.054 ± 0.359GHgh	⑨	N <sub>3</sub> K <sub>1</sub>	0.469 ± 0.026GHfgh
⑥	N <sub>2</sub> K <sub>2</sub>	5.022 ± 0.349GHh	⑧	N <sub>1</sub> K <sub>4</sub>	0.453 ± 0.014HHhi
⑤	N <sub>2</sub> K <sub>1</sub>	5.008 ± 0.653GHh	②	N <sub>1</sub> K <sub>2</sub>	0.396 ± 0.029Iij
⑨	N <sub>3</sub> K <sub>1</sub>	3.851 ± 0.163Hii	⑦	N <sub>2</sub> K <sub>3</sub>	0.360 ± 0.047Jj
⑦	N <sub>2</sub> K <sub>3</sub>	2.974 ± 0.170Ii	①	N <sub>1</sub> K <sub>1</sub>	0.339 ± 0.016Jj

### 3 结论

(1)在试验条件下:处理⑪即 N<sub>3</sub>K<sub>3</sub> (N<sub>3</sub>:7.5 mmol/L, K<sub>3</sub>:4.5 mmol/L)、处理⑫即 N<sub>3</sub>K<sub>4</sub> (N<sub>3</sub>:7.5 mmol/L, K<sub>4</sub>:6.0 mmol/L)、处理⑮即 N<sub>4</sub>K<sub>3</sub> (N<sub>4</sub>:10.0 mmol/L, K<sub>3</sub>:4.5 mmol/L)水平下芝麻菜蔗糖与还原糖含量较高;处理⑥即 N<sub>2</sub>K<sub>2</sub> (N<sub>2</sub>:5.0 mmol/L, K<sub>2</sub>:3.0 mmol/L)、处理⑦即 N<sub>2</sub>K<sub>3</sub> (N<sub>2</sub>:5.0 mmol/L, K<sub>3</sub>:4.5 mmol/L)、处理⑧即 N<sub>2</sub>K<sub>4</sub> (N<sub>2</sub>:5.0 mmol/L, K<sub>4</sub>:6.0 mmol/L)水平下芝麻菜可溶性蛋白质含量与维生素C含量较高,是促进芝麻菜品质性状形成较适宜的氮钾配比比例。

(2)在试验条件下:处理⑪即 N<sub>3</sub>K<sub>3</sub> (N<sub>3</sub>:7.5 mmol/L, K<sub>3</sub>:

(上接第101页)

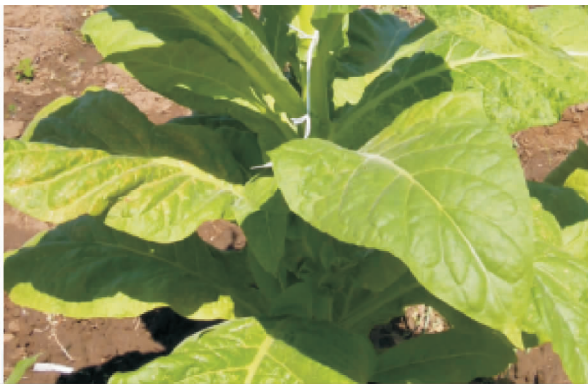


图11 M2E2-15(抗病)

病状特点亦有明显差异,所以对于PVY毒源的选择也很重要,要选择点刻条斑症的毒源,该种毒源发病初期病叶先形成褪绿斑点,之后叶肉变成红褐色的坏死或条纹斑,叶片呈青铜色。是PVY区别于其他病害独有的症状,利于接种后烟株的观察和选择,以防误判,影响最终突变体的筛选。

烟草苗期(4叶期)接种PVY后,症状一般在15d左右显现,症状是否明显与烟苗的营养状况有直接关系,烟苗萎

4.5 mmol/L)、处理⑫即 N<sub>3</sub>K<sub>4</sub> (N<sub>3</sub>:7.5 mmol/L, K<sub>4</sub>:6.0 mmol/L)、处理⑮即 N<sub>4</sub>K<sub>3</sub> (N<sub>4</sub>:10.0 mmol/L, K<sub>3</sub>:4.5 mmol/L)水平下芝麻菜全株鲜重、全株干重较高,可有效促进芝麻菜产量形成。

(3)综合芝麻菜品质性状和产量数据分析,试验中所选取的营养液以处理⑪即 N<sub>3</sub>K<sub>3</sub> (N<sub>3</sub>:7.5 mmol/L, K<sub>3</sub>:4.5 mmol/L)、处理⑫即 N<sub>3</sub>K<sub>4</sub> (N<sub>3</sub>:7.5 mmol/L, K<sub>4</sub>:6.0 mmol/L)相对比较适宜。

### 参考文献

- [1] 朱士农,张先才.南京市八卦洲乡发展野生蔬菜效益高[J].长江蔬菜,1998(3):8.
- [2] 赵恒田,王新华,沈云霞,等.我国野菜资源人工开发利用及可持续发展[J].农业系统科学与综合研究,2004,20(4):300-302,305.
- [3] 廉华,马光恕,李梅,等.山野菜开发利用现状及发展趋势[J].北方园艺,1999(3):13-14.
- [4] 龙荣华.云南野生蔬菜的开发利用[J].中国蔬菜,2000(5):33-36.
- [5] 冯均科.芳香保健特菜芝麻菜栽培技术[J].上海农业科技,2007(1):80.
- [6] 雷娟利,寿伟松,董文其,等.芝麻菜硝酸盐含量基因型差异研究[J].中国农学通报,2007,23(6):195-197.
- [7] 石鸿文,王小为.芝麻菜的开发利用及栽培技术[J].河北农业科技,2002(8):14.
- [8] 何永梅,李建国.芝麻菜无公害栽培技术[J].农家科技,2010(6):40.
- [9] 何永梅.芝麻菜主要病虫害防治技术[J].农药市场信息,2010(11):42.
- [10] 刘世哲.现代实用无土栽培技术[M].北京:中国农业出版社,2001:144.
- [11] 张志良.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2001:35-36.
- [12] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000:197-199.
- [13] 邹琦.植物生理生化实验指导(高校教材)[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [14] 李振国.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学出版社,1999:302-303.

焉、弱小、黄化等均不利于症状观察,因此需要加强苗期管理,保证烟苗不脱水、脱肥(10d左右喷施一次烟草叶面肥),但过量的水肥会造成烟苗根部滋生真菌,需要密切注意。一般可考虑10d左右喷施一次烟草叶面肥。另外,要防止烟苗发生其他病害(野火病、炭疽病、TMV等),这些病害也会给PVY症状鉴定带来影响。

### 参考文献

- [1] 朱贤朝,王彦亭,王智发.中国烟草病害[M].北京:中国农业出版社,2002:209-216.
- [2] 高正良.烟草马铃薯Y病毒(PVY)的研究现状与防治对策[J].安徽农学通报,2003,9(5):75-77.
- [3] 朱贤朝,王彦亭,王智发.中国烟草病虫害防治手册[M].北京:中国农业出版社,2002:48.
- [4] 杨庆东,吴兴泉,陈士华,等.PVY株系间的分子变异及分子鉴定方法[J].中国马铃薯,2011,25(3):166-169.
- [5] 余春英,张西仲,王定福,等.黔南烟区烟草马铃薯Y病毒病发病原因及防治措施[J].安徽农业科学,2010,38(10):5110-5112.
- [6] 谢思,易图永,肖启明.马铃薯Y病毒的株系分化及检测方法研究进展[J].中国农学通报,2011,27(5):40-43.
- [7] 陆新莉,钱凤英,黄刚,等.黔南烟草马铃薯Y病毒(PVY)株系的分子鉴定[J].烟草农学,2013(8):71-74.
- [8] 刘贯山.烟草突变体的筛选与鉴定[J].中国烟草科学,2012(33):102-103.