

利用母本来源的单倍体技术获得双抗 TMV 和 PVY 烟草株系

刘勇, 陈学军, 肖炳光, 李永平

云南省烟草农业科学研究院, 云南昆明圆通街 33 号 650021

摘要: 为选育双抗烟草花叶病毒 (TMV) 和马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的烟草材料, 采用 Coker176 与 NC55 杂交后代 F₁ 与非洲烟杂交获得单倍体苗, 经过苗期抗性鉴定、分子标记辅助选择和叶脉培养加倍, 获得母本来源的双抗 TMV 和 PVY 的双单倍体。通过人工接种抗性鉴定、标记检测和田间株系比较, 获得抗性、植物学性状稳定的双单倍体第三代种子。与常规杂交系统选育相比较, 双单倍体方法的获得后代变异更大、性状更容易稳定。

关键词: 非洲烟; 单倍体; TMV; PVY; 育种

doi:10.3969/j.issn.1004-5708.2014.03.014

中图分类号: S435.72

文献标志码: A

文章编号: 1004-5708 (2014) 03-0084-05

Tobacco lines resistant to TMV and PVY obtained by maternal-derived haploid breeding methods

LIU Yong, CHEN Xuejun, XIAO Bingguang, LI Yongping

Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Science, Kunming 650021, China

Abstract: Doubled haploid (DH) technique can accelerate traits stabilization in hybridization offspring. In the breeding of variety resistant to Tobacco mosaic virus (TMV) and Potato virus Y (PVY), haploids were obtained from F₁ hybrids between Coker176 and NC55 crossing as female to *Nicotiana africana*. TMV and PVY resistant haploids were selected by seedling resistance identification and molecular marker test. DH plants were regenerated from leaf mid-vein culture method. Artificial inoculated resistance evaluation, markers detection, and field comparison were conducted. The third generation seed of DH lines which showed stable resistance and botanical characters were harvested. Compared to conventional hybrid breeding methods, DH breeding method showed greater variation between offspring lines and objective traits were relatively more stable.

Keywords: *Nicotiana africana*; haploid; breeding

烟草常规杂交育种由于性状分离, 需要经过 4~5 代的连续选择, 才能获得性状稳定的品系。理论上, 加倍单倍体的纯合只需要 1 个世代, 就能获得性状稳定株系。因此, 采用单倍体育种技术, 可明显缩短育种年限^[1]。烟草单倍体诱导有来源于雄配子和雌配子 2 条途径, 诱导来源于雄配子的单倍体的常用方法为花药培养, 具有步骤简便, 单倍体苗易获得等优点^[2]。采用花粉离体培养或者游离小孢子培养获得雄

核发育的单倍体也有报道^[2]。但利用雄配子来源的单倍体育成的烟草品种存在产量降低等劣势, 美国等烟草育种先进国家, 并不采用雄配子来源的单倍体用于育种^[3]。我国只有单育一号等几个烟草品种曾在生产上推广利用^[4]。来源于雌配子的烟草单倍体育成的品种, 无产量降低的劣势^[5]。采用未授粉子房、胚珠离体培养可诱导来源于雌配子的单倍体植株^[6], 但步骤复杂, 难以满足育种的需求。利用远源杂交产生母本来源的单倍体, 在玉米育种中应用广泛^[7]。利用烟草野生种非洲烟 (*Nicotiana africana*) 和烤烟杂交, 产生母本来源的单倍体在美国育种应用广泛^[8-9]。美国著名的烤烟品种 NC71 等, 在选育过程中采用了母本来源的双单倍体技术。烟草单倍体加倍常用秋水仙碱处理生长点, 存在加倍效率较低的问题^[10]。叶脉组织

基金项目: 中国烟草总公司云南省公司科技项目 (2010YN01, 2012YN02); 云南省社会发展科技计划 (2010CD127)

作者简介: 刘勇 (1970—), 博士, 副研究员, 主要从事烟草病害防治与抗病育种研究, Tel: 0871-65106352, Email: yliu@yntsti.com

通讯作者: 李永平 (1967—), 硕士, 研究员, 主要从事烟草育种研究, Email: liyongping@yntsti.com

收稿日期: 2013-06-03

培养加倍烟草单倍体,在美国应用较早。肯塔基大学的 M.J.Kasperbauer 等(1972)研究发现,利用叶片中脉组织培养方法^[11],可以获得加倍单倍体植株,随着筛选方法的提高,目前国外同行的单倍体叶脉培养加倍率已达到 80% 左右。

烟草马铃薯 Y 病毒病(PVY)和烟草花叶病(TMV)是危害烟草的重要病毒病害,通常混合发生^[12]。烟草种质资源中,已鉴定出携带抗 PVY 基因 *va* 的烟草种质 NC55^[13]和携带抗 TMV 基因 *N* 的烟草种质 Coker176^[14]。但缺乏双抗 PVY 和 TMV 的烟草抗源。本文采用组合 F₁ 与非洲烟杂交产生母本来源的单倍体,苗期接种筛选抗病株,利用叶脉组织培养加倍等技术,获得双抗 TMV 和 PVY 的烟草育种中间材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

烟草种质 Coker176(抗 TMV)、NC55(抗 PVY)和非洲烟(*N. african*)由本院提供。TMV 和 PVY 毒源分别在防虫网室内繁殖保存。

1.2 杂交组合配制

利用常规方法配制 Coker176 和 NC55 的 F₁ 杂交组合。F₁ 在塑料大棚内移栽,开花时,人工去雄,取非洲烟的花粉授粉。授粉后套袋,单株收种得到种子(F₁-Naf)。去雄、授粉和收种要仔细操作,防止污染。

1.3 单倍体苗挑选与抗性鉴定

在塑料盘或育苗盘上密集播种 F₁-Naf。烟苗 2 片真叶时,用牙签标记类似单倍体的单株。烟苗 4-5 片真叶时,再次挑选类似单倍体的烟苗盆栽,成活后,混合接种 TMV 病叶汁液 1000 倍和 PVY 病叶汁液 100 倍。定期调查病害症状。筛选抗病的苗,淘汰感病苗。同时采用 *N* 基因^[15]和 *Va* 基因的分子标记^[16],检测验证类似单倍体苗的抗性。

1.4 叶脉组织培养加倍

开花时根据花的形态和是否结实,在抗病单株中挑选单倍体植株的中部叶片,取中脉组织培养。方法为:取主脉约铅笔粗细的中部叶片,剪取叶基部约 5 cm 长主脉,用自来水冲洗干净。用 75 % 乙醇消毒 1 min,无菌水冲洗 2 次,再用 0.1 % 升汞消毒 10 min,无菌水冲洗 5 ~ 6 次,将主脉切成小段。接种到 MS+2.0 mg/L KT+0.2 mg/L NAA 的培养基上诱芽,待芽长到 2 cm 高时,接种到 1/2 MS 培养基+IBA 0.5 mg/L 中诱根培养,烟苗 3 cm 高时,假植至漂浮盘中,成活后盆栽或移栽大田。开花后选取可育单株套袋留种。对来源于同一个单倍体的加倍单株混合收种(DH₁)。

1.5 加倍单株抗性鉴定与农艺性状观察

对双单倍体第 1 代材料(DH₁),每份盆栽 60 株左右,苗期人工混合接种 TMV 和 PVY,方法同上。调查发病情况,验证抗性是否稳定。对双单倍体第 1 代和第 2 代材料(DH₂)进行株系比较试验,方法为大田双行区移栽 60 株,初步观察植物学性状和农艺性状,挑选表现较好的单株留种。

2 结果与分析

2.1 双抗 TMV 与 PVY 单倍体单株的获得与加倍

在 Coker176(抗 TMV)与 NC55(抗 PVY)的杂交的 F₁ 植株上,用非洲烟花粉授粉,2009 年 8 月获得杂交种子(F₁-Naf)。2009 年 9 月播种,挑选出类似单倍体的烟苗约 20 株。苗期混合接种 TMV/PVY,根据接种后第 5 d 至开花期的病害调查结果,筛选出 3 株双抗的单倍体和 1 株单抗 TMV 的单倍体(表 1)。与 PVY 抗性相关的 *Va* 标记和与 TMV 抗性相关的 *N* 基因标记检测结果表明(表 1),3 个双抗单株携带分别来源于双亲的 *va* 位点和 *N* 基因。通过叶脉组织培养加倍,2010 年底获得双单倍体种子(双单倍体第 1 代株系(DH₁))。

表 1 单倍体苗抗性鉴定与标记检测

Tab. 1 Haploid seedlings resistance identification and marker detection

单倍体单株编号	接种 PVY 症状	Va 标记检测	接种 TMV 症状	N 基因标记检测	加倍成功的苗数
V8-N1	花叶	阳性	枯斑	阳性	-
V8-N2	无症状	阴性	枯斑	阳性	1
V9-N1	无症状	阴性	枯斑	阳性	7
V9-N2	无症状	阴性	枯斑	阳性	2
对照 NC55	无症状	阴性	花叶	阴性	-
对照 Coker 176	花叶	阳性	枯斑	阳性	-

注:“-”表示未测定。

2.2 双单倍体第1代株系抗性鉴定与性状观察

2011年防虫温室内,每个双单倍体株系盆栽60株的苗期抗性鉴定结果表明:接种后5d,3个株系的单株全部表现TMV枯斑;接种后21d调查,V8-N2和V9-N2的PVY发病率为0,V9-N1的PVY发病率为6.35%(表2)。表明3个双单倍体第1代

株系的对TMV和PVY的抗性稳定。大田株系比较试验表明,双单倍体株系间的植物学性状和农艺性状出现较明显的分离(表3)。V8-N2株系的叶片数少,叶片窄;V9-N1和V9-N2株系现蕾期的株高、叶型出现明显的宽叶与窄叶分离,挑选株型较好的单株留种,获得双倍体第2代(DH₂)种子。

表2 双单倍体第1代株系抗性鉴定

Tab. 2 Resistance identification of first generation double-haploid lines

双单倍体第1代株系(DH ₁)	株数	PVY发病率/%	TMV枯斑率/%
V8-N2	65	0	100
V9-N1	63	6.35	100
V9-N2	66	0	100
对照 NC55	30	0	0
对照 Coker 176	30	100	100

表3 双单倍体第1代株系的植物学与农艺性状

Tab. 3 The botanical and agronomic traits of first generation double-haploid lines

株系与株号	总叶数	腰叶长/cm	腰叶宽/cm	自然株高/cm	打顶株高/cm	有效叶数/片	茎围/cm	节距/cm	原烟外观质量
V8-N2	15	-	-	-	-	-	-	-	-
V9-N1 (8)	22	58.0	20.0	174.0	121.0	15	7.9	5.6	中上
V9-N1 (9)	23	62.0	35.0	179.0	127.0	12	6.0	4.6	中
V9-N1 (10)	22	64.5	30.0	159.0	97.5	15	6.8	4.9	中
V9-N2 (12)	21	67.0	24.0	202.0	175.0	16	7.7	7.4	上
V9-N2 (13)	25	79.0	27.5	196.0	169.0	20	8.1	6.3	上
V9-N2 (14)	28	79.5	35.0	167.0	147.5	24	7.6	8.3	上

注:“-”表示未测定。

2.3 双单倍体第2代株系比较

2012年大田株系比较试验表明,双单倍体第2代株系的植物学性状和农艺性状出现趋于稳定(表

4)。其中V9N2-12和V9N2-13与对照品种NC55的亩产量相当,在这两个株系中挑选株型较好的单株留种,获得双倍体第3代(DH₃)种子。

表 4 双单倍体第 2 代株系的植物学与农艺性状

Tab. 4 The botanical and agronomic traits of second generation double-haploid lines

双单倍体第 2 代株系 (DH ₂)	株数	植物学性状	换算亩产量 /kg	常规化学成分	
				还原糖 %	烟碱 /%
V9N1-8	33		95.0	16.44	2.96
V9N1-9	33	叶片中等大小, 皱折, 茎叶角度小	94.3	-	-
V9N1-10	33		74.8	19.67	3.01
V9N2-12	30		101.0	20.4	2.33
V9N2-13	32	叶片大, 厚, 稍光滑, 茎叶角度大	109.4	19.57	2.61
V9N2-14	32		88.7	26.78	2.39
对照 NC55	50		104.3	16.46	3.13
对照 Coker 176	48		45.6	21.55	3.30
对照 K326			-	25.69	2.45

注: “-”表示未测定。

2.4 双单倍体抗病育种的特点

以聚合 TMV 抗性 (Coker 176 的 *N* 基因) 和 NC55 的 PVY 抗性 (*va* 位点) 为例, 双单倍体方法和常规杂交方法的程序差异较大 (表 5)。采用冬季加代, 从 F₁ 种子开始至获得双抗且抗性纯合的种子, 两种方法均需要 18 个月左右时间。双单倍体方法的工作量主要为配制 F₁ 与非洲烟杂交的种子、单倍体

苗获得和单倍体加倍, 技术难点为单倍体苗获得和加倍。常规杂交方法的工作量主要为 F₂ 抗病单株筛选和 F₃ 测交。双单倍体株系的抗性和农艺性状相对稳定, 获得性状稳定的品系预计可比常规杂交方法缩短 1~2 年。双单倍体株系之间的叶片数和叶片大小等性状的变异较大。

表 5 双单倍体与常规育种的程序比较

Tab. 5 Comparison between double-haploid disease-resistance breeding methods and conventional disease-resistance breeding methods

时间	双单倍体育种	常规杂交育种
第 1 年 2 月	播种 F ₁	播种 F ₁
第 1 年 8 月	F ₁ 与非洲烟杂交	F ₁ 自交
第 1 年 9 月	获得 F ₁ -Naf 种子	获得 F ₂ 种子
第 2 年 1 月	约 20 株类似单倍体苗接种 TMV/PVY	约 800 株苗接种 TMV/PVY
第 2 年 2 月	双抗单倍体苗 3 株	双抗 F ₂ 单株 (N 杂合) 10 份
第 2 年 8 月	叶脉培养	获得 F ₃ 种子 10 份
第 3 年 5 月	30 株组培苗移栽	F ₃ 苗期接种 TMV/PVY, 确定双抗纯合的 F ₃ 株系
第 3 年 9 月	获得双抗的双单倍体种子 (DH ₁) 3 份	获得双抗纯合的 F ₄ 种子 3 份

3 结论与讨论

双单倍体方法在聚合两种或多种抗性方面, 具有后代目标性状容易稳定的优点, 但同时存在技术较为复杂, 获得单倍体和单倍体加倍的难度较大的问题, 可通过增加 F_1 与非洲烟的杂交种子数量及采用流式细胞仪辅助筛选单倍体的方法加以解决。本文采用叶脉培养加倍方法, 该方法具有加倍效率较高的优点, 但从叶脉培养至获得种子, 需要 12 个月左右的时间。通过采用苗期鉴定单倍体苗, 秋水仙碱处理腋芽^[17] 等加倍方法, 预计可缩短加倍时间 7 个月左右。

致谢: 感谢杨华兵和杨彦明在温室管理和组织培养中的帮助。

参考文献

- [1] 佟道儒. 烟草育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 466-469.
- [2] 朱惠琴, 戴文新. 烟草加倍单倍体群体的构建及其在遗传育种中的应用 [J]. 青海大学学报 (自然科学版), 2003,21(6):20-23.
- [3] 任学良, 李继新, 李明海. 美国烟草育种进展简况 [J]. 中国烟草学报, 2007,13(6):57-64.
- [4] 佚名. 烟草单倍体育种 [J]. 农业科技通讯, 1978,7:1.
- [5] 冉邦定. 从未受精的烟草胚珠诱导出单倍体植株 [J]. 中国烟草, 1980,3:25-26.
- [6] 祝仲纯, 吴海珊, 安庆坤. 大叶黄烟未传粉子房培养及其细胞学研究 [J]. 遗传学报, 1984, 11(4): 281- 287.
- [7] 杜何为, 戴景瑞, 李建生. 玉米单倍体育种研究进展 [J]. 玉米科学, 2010, 18(6): 1-7.
- [8] Burk L G, Gerstel D U, Wernsman E A. Maternal haploids of *Nicotiana tabacum* L. from seed[J]. Science. 1979,206:585
- [9] Daryl T Bowman , Verne Sisson. A historical overview of flue-cured tobacco breeding in the USA[J]. Tobacco Science, 2000, 44:59-64
- [10] 戴冕, 吕华玉, 邵秀梅. 烟草花粉胚状体染色体加倍的研究 [J]. 作物学报, 1984, 10(1): 19-23.
- [11] Kasperbauer M J, Collins G B. Reconstitution of diploids from leaf tissue of anther-derived haploid in tobacco[J]. Crop Science, 1972,12: 98-101.
- [12] 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.
- [13] 林志文, 刘勇, 李梅云, 等. 烟草种质资源抗马铃薯 Y 病毒病鉴定方法比较 [J]. 中国农学通报, 2010,26(19):269-274.
- [14] 解芬, 肖炳光, 高玉龙, 等. 烟草品种 Coker176 和 Ti245 抗 TMV 的遗传分析 [J]. 云南农业大学学报, 2010,25(2):170-172,182.
- [15] Lewis R S, Milla S R, Levin J S. Molecular and genetic characterization of *Nicotiana glutinosa* L.chromosome segments in tobacco mosaic virus-resistant tobacco accessions[J]. Crop Science, 2005, 45(6):2355-2362.
- [16] 王贵, 刘勇, 卢秀萍, 等. 烟草 PVY 抗性的遗传分析与分子标记筛选 [J]. 分子植物育种, 2012,10(1):97-103.
- [17] 佚名. 烟草单倍体育种技术的研究 [J]. 中国农业科学, 1975:1:50-58.