

抗花叶病烟草种质资源的鉴定与筛选

林龙云¹, 张燕云², 周以飞², 程崖芝³, 郭金平³, 潘大仁¹

(¹ 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002; ² 福建农林大学作物科学学院, 福州 350002; ³ 福建省烟草公司, 福州 350001)

摘要: 以不同来源、不同类型的 46 个烟草品种为试验材料, 进行抗烟草普通花叶病(TMV)特性的田间鉴定和分子鉴定, 为筛选抗病烟草种质奠定基础。结果表明, 22 个品种的烟草抗 TMV 特性田间鉴定结果与前人鉴定结果基本相同, 从 24 个前人未鉴定的烟草品种中初步筛选出 14 个中抗品种, 8 个中感品种和 2 个感病品种; 通过抗 TMV 基因(CN)的特异引物进行扩增, 35 个烟草品种的基因组 DNA 具有特异性片段; 通过分子鉴定和田间鉴定的结果比较, 在具有 CN 或其同源基因 35 个烟草品种中 62.9% 田间鉴定表现为抗或中抗, 83.3% 的具有 CN 或其同源基因的选育烤烟品种田间鉴定表现为抗或中抗; 结合两种方法, 初步确定了 3 个中感品种和 11 个中抗品种。

关键词: 烟草; TMV; 抗花叶病; 鉴定

Selection and Identification of Tobacco Germplasms Resistance Ability to TMV

LIN Long-yun¹, ZHANG Yan-yun², ZHOU Yi-fei², CHENG Ya-zhi³, GUO Jin-ping³, PAN Da-ren¹

(¹ College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; ² College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; ³ Fujian Tobacco Company, Fuzhou 350001)

Abstract: In this study, 46 different types and sources of tobacco germplasms were selected as experiment materials to screen disease resistant tobacco varieties through field investigation and molecular identification of resistance ability to TMV. The results of field investigation showed that 14 moderate resistant tobacco germplasms, 8 moderate susceptible germplasms, and 2 susceptible ones were screened out from 24 unidentified tobacco germplasms, while 22 tobacco germplasms were resistant to TMV which basically the same as previous results. Furthermore, specific fragments were amplified in 35 tobacco genomic DNA by PCR method of specific primers of TMV-resistant gene (CN). The results showed that 62.9% of 35 tobacco germplasms and 83.3% of bred varieties which had CN gene or homologous gene were resistant or moderate resistant to TMV by field investigation and molecular identification. Finally, 3 moderate susceptible and 11 moderate resistant tobacco germplasms were identified by combining both the above two methods.

Key words: Tobacco; tobacco mosaic virus (TMV); resistance to TMV; identification

烟草普通花叶病 (TMV, tobacco mosaic virus) 在世界各地普遍发生, 已经成为危害严重的世界性病害之一。以我国为例, 烟草花叶病在南北烟区都会发生, 但是在南方烟区的发病情况相对比较严重。一般情况下田间发病率达 5% ~ 20%, 严重时个别田块高达 90% ~ 100%, 如果早期开始

发病则危害严重, 造成的损失可达 50% ~ 70%, 甚至绝收^[1-2]。烟株受到烟草花叶病的侵害后, 其烟叶烤晒后的颜色不均, 烟味差, 品质大幅度降低^[3]。总之, 烟草花叶病的危害日趋严重。因此, 筛选抗花叶病的烟草种质成为防治烟草花叶病最直接、最经济、最有效的措施, 其中鉴定烟草种质

收稿日期: 2013-04-02 修回日期: 2013-07-16 网络出版日期: 2013-10-22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131022.1651.032.html>

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2010J01070); 福建省烟草专卖局资助项目 (闽烟科 2008 (13) 号)

第一作者研究方向为分子生物学。E-mail: 9884318@qq.com

通信作者: 潘大仁, 研究方向为植物生物技术。E-mail: pandaren@yahoo.com.cn

对烟草花叶病 (TMV) 的抗病性情况则是必不可少的重要环节。

本研究选用 3 种不同来源和类型的烟草种质为材料,通过分子鉴定和田间鉴定 2 种方法鉴定抗花叶病的烟草种质,其中分子鉴定法是根据 Genbank 公布的烟草抗花叶病基因(单显性基因) *CN*^[4-5] 的核苷酸序列设计特异性引物来扩增出各个烟草种质间特异的抗病条带。田间鉴定法则是通过对各个烟草种质进行汁液摩擦接种 TMV 来鉴定其对 TMV 的抗病性。最后将分子鉴定结果和田间鉴定结果进行对比分析,以获得较科学可靠的鉴定结果,为烟草抗病育种提供有用的材料,也为进一步筛选优质抗病烟草品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选用 3 种不同来源、不同类型的烟草种质作为材料,分别是地方烤烟、地方晒烟和选育烤烟,其中地方烤烟有 18 个、地方晒烟有 11 个、选育烤烟有 17 个,具体品种名称见表 1。该试验材料由龙岩烟草公司提供,本实验室保存。

1.2 供试病毒源

烟草普通花叶病毒 (TMV) 从大田病株的新生毒源病叶中提纯检测后保存。

1.3 试验方法

1.3.1 烟草种质抗 TMV 特性的田间鉴定^[6-7]

1.3.1.1 田间种植 2009 年 12 月上旬,在福建农林大学基因工程实验室新网室内对不同来源、不同类型的 3 种烟草种质进行漂浮育苗,2010 年 3 月中旬烟苗移栽大田。每个烟草种质移栽 7 株(其中每个烟草种质各留 1 株不接种 TMV 作为对照,并与接种 TMV 的其他烟株隔离种植观察),移栽大田的烟苗共计 322 株,行间距约 50 cm × 45 cm,小区面积大约为 10 m²,栽培管理同大田生产。

1.3.1.2 汁液摩擦接种诱发 采集新鲜的新生毒源病叶放入研钵中,加入少许石英砂,将叶片快速研磨成匀浆,每克病叶大约加入 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH = 7.0) 8 mL,4 层纱布过滤残渣以获得新鲜病毒液。然后,在困棵期到旺长期前用毛刷摩擦接种烟株叶片,选择烟株的下部叶片进行均匀涂抹,叶片正面和背面都要均匀涂抹,并以叶片均布汁液且不流淌为度。最后,用清水冲洗叶片表面的残渣。为了保证植株均匀发病,在接种 3 d 后重复接种 1 次。对照株用缓冲液代替病毒汁液。

1.3.1.3 烟草普通花叶病的田间调查 按中华人民共和国烟草行业标准 YC/T39-1996(烟草病害分级及调查)进行烟草普通花叶病的病害调查和分级。在烟株叶片花叶病症状明显时(大约接种后 15 d)进行病害调查和计算,直到病情稳定为止。先调查病害严重度(取多次调查结果的平均值),然后计算病情指数^[8]。病情统计方法为:病情指数 = $[\sum(\text{各级病株数} \times \text{该病级数}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高病级数})] \times 100$ 。抗性划分标准为:抗 (R) 0 ~ 25.0、中抗 (MR) 25.1 ~ 50.0、中感 (MS) 50.1 ~ 75.0、感 (S) 75.1 ~ 100。

1.3.2 烟草种质抗 TMV 特性的分子鉴定 从同一品种的不同单株上摘取 2 g 幼嫩叶片混合后进行 DNA 提取,提取方法为改良过的 CTAB 法^[9],用全波段分光光度仪检测 DNA 的浓度和纯度,在 -20 °C 条件下保存。根据 Genbank 数据库公布的烟草抗花叶病基因 *CN* 的保守核苷酸序列设计 1 对特异引物 *CN-F* (5'-AGGAAGGAAAGCACCAAATGG-3') 和 *CN-R* (5'-CGCAACCCGTATTCAACTCC-3'),引物由上海生物工程有限公司合成。利用烟草抗花叶病基因 *CN* 的特异引物,进行 SCAR-PCR 分子检测,扩增条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 50 s,58 °C 复性 50 s,72 °C 延伸 90 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。根据 SCAR-PCR^[10-12] 扩增的结果统计特异条带,鉴定抗病性。

2 结果与分析

2.1 各供试烟草品种抗 TMV 特性的田间鉴定结果

如表 1 所示,经田间鉴定表明:46 个烟草品种中,4 个为感病品种,14 个为中感品种,25 个为中抗品种和 3 个为抗病品种。其中 22 个品种的烟草抗 TMV 特性田间鉴定结果与前人鉴定结果相同^[7,13-14]。其余 24 个品种未见田间鉴定报道,分别为 2 个感病品种,8 个中感品种和 14 个中抗品种。值得关注的是 3 个抗 TMV 品种,本次鉴定和前人鉴定结果表现相同,表明这 3 个品种对 TMV 的抗性是很稳定的,可作为抗 TMV 育种的亲本利用。

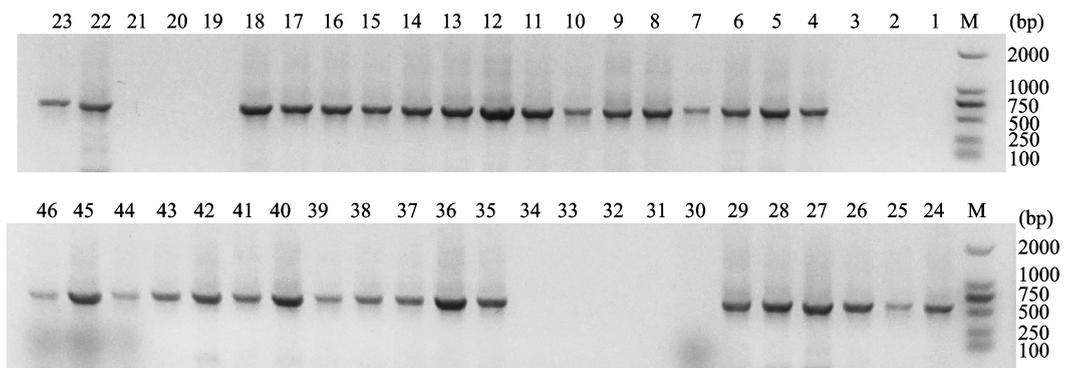
2.2 各供试烟草品种抗 TMV 特性的分子鉴定结果

根据 SCAR-PCR 扩增的特异条带结果显示:46 个烟草品种中,35 个品种基因组 DNA 扩增获得特异条带,具有 *CN* 或其同源基因。11 个品种未见特异条带,分别为地方烤烟阿乔密目、半斤黄和田心烟;地方晒烟黑骨种 B、黑骨种和大叶密目;选育烤烟 8501、龙岩 C2、特字 8 号、云霄 401 和罗 8701(图 1)。

表 1 各烟草种质抗 TMV 特性的总体评价

Table 1 Comprehensive evaluation of TMV-resistant characteristics of various tobacco germplasm

编号 No.	品种名称 Variety name	类型 Type	种质来源 Source	病情指数 Disease index	田间抗性评价 Resistance in field	前人鉴定结果 Previous results	编号 No.	品种名称 Variety name	类型 Type	种质来源 Source	病情指数 Disease index	田间抗性评价 Resistance in field	前人鉴定结果 Previous results
1	阿乔密目	烤烟	地方	21.4	抗	抗	24	黑骨种 C	晒烟	地方	67.9	中感	/
2	半斤黄	烤烟	地方	50.0	中抗	中抗	25	龙岩晒烟	晒烟	地方	46.4	中抗	/
3	田心烟	烤烟	地方	50.0	中抗	/	26	中秆晒烟	晒烟	地方	42.9	中抗	/
4	湖里种	烤烟	地方	78.6	感	感	27	永安晒烟	晒烟	地方	46.4	中抗	/
5	莲花墩密目	烤烟	地方	60.7	中感	/	28	松香种	晒烟	地方	50.0	中抗	/
6	小叶密目	烤烟	地方	53.6	中感	中感	29	黑骨种 A	晒烟	地方	39.3	中抗	/
7	适中北山密目	烤烟	地方	53.6	中感	中感	30	8501	烤烟	选育	46.4	中抗	/
8	有梅密目	烤烟	地方	78.6	感	感	31	龙岩 C2	烤烟	选育	46.4	中抗	中抗
9	水头选	烤烟	地方	67.9	中感	/	32	特字 8 号	烤烟	选育	60.7	中感	/
10	大黄金	烤烟	地方	57.1	中感	中感	33	云霄 401	烤烟	选育	64.3	中感	/
11	小片孜	烤烟	地方	60.7	中感	中感	34	罗 8701	烤烟	选育	53.6	中感	中感
12	疏目烟	烤烟	地方	42.9	中抗	中抗	35	云 80-1	烤烟	选育	78.6	感	/
13	尖叶密目	烤烟	地方	42.9	中抗	/	36	73-1-1	烤烟	选育	60.7	中感	/
14	圆叶密目	烤烟	地方	39.3	中抗	中抗	37	闽烟 4 号	烤烟	选育	50.0	中抗	中抗
15	大种	烤烟	地方	46.4	中抗	/	38	Y-1	烤烟	选育	14.3	抗	抗
16	伏市小片孜	烤烟	地方	50.0	中抗	/	39	Y-2	烤烟	选育	35.7	中抗	中抗
17	文堡烟	烤烟	地方	46.4	中抗	中抗	40	Y-3	烤烟	选育	46.4	中抗	中抗
18	密叶	烤烟	地方	50.0	中抗	中抗	41	永定 400	烤烟	选育	21.4	抗	抗
19	黑骨种 B	晒烟	地方	39.3	中抗	/	42	永定一号	烤烟	选育	50.0	中抗	中抗
20	大叶密目	晒烟	地方	60.7	中感	中感	43	4-4	烤烟	选育	46.4	中抗	/
21	黑骨种	晒烟	地方	67.9	中感	/	44	78-20	烤烟	选育	50.0	中抗	/
22	高秆晒烟	晒烟	地方	78.6	感	/	45	金烟六号	烤烟	选育	46.4	中抗	中抗
23	矮秆晒烟	晒烟	地方	57.1	中感	/	46	80-3	烤烟	选育	46.4	中抗	/



M: DL2000 ;品种编号同表 1

M: DL2000, Variety codes are the same as table 1

图 1 烟草抗花叶病基因 (CN) DNA 片段的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of DNA fragments of TMV-resistant gene (CN)

2.3 不同抗 TMV 特性烟草的分子鉴定与田间鉴定结果对比

从表 2 中可以看出,在 46 个供试品种中,3 个

抗性品种的分子鉴定与田间鉴定一致性比例为 66.7%;25 个中抗品种的分子鉴定与田间鉴定一致性比例为 80.0%;14 个中感品种的分子鉴定与田间

鉴定一致性比例为 35.7% ;4 个感性品种的分子鉴定与田间鉴定结果完全不一致。可见分子鉴定对抗病品种筛选的准确率更高。

在 46 个供试品种中,有 35 个品种通过 SCAR-PCR 扩增出特异条带,说明其具有烟草抗花叶病基因 *CN* 或其同源基因。在这 35 个品种

中,有 22 个品种分子鉴定与田间鉴定结果一致,比例为 62.9%。其余 11 个未扩增出特异条带的品种中,有 5 个品种分子鉴定与田间鉴定结果一致,比例为 45.5%。说明具有烟草抗花叶病基因 *CN* 或其同源基因的烟草品种,其抗 TMV 的可能性更高。

表 2 烟草种质抗 TMV 特性的分子鉴定结果与田间鉴定结果比较

Table 2 Comparison between molecular and field identification of tobacco germplasm resistance to TMV

品种名称 Variety name	田间抗 TMV 特性 Resistance to TMV in field	有无 <i>CN</i> 或同源基因 <i>CN</i> or homologous genes	一致性 Consistency	品种名称 Variety name	田间抗 TMV 特性 Resistance to TMV in field	有无 <i>CN</i> 或同源基因 <i>CN</i> or homologous genes	一致性 Consistency
阿乔密目	抗	无	×	松香种	中抗	有	√
Y-1	抗	有	√	密叶	中抗	有	√
永定 400	抗	有	√	金烟六号	中抗	有	√
半斤黄	中抗	无	×	80-3	中抗	有	√
田心烟	中抗	无	×	黑骨种 A	中抗	有	√
8501	中抗	无	×	莲花墩密目	中感	有	×
龙岩 C2	中抗	无	×	小叶密目	中感	有	×
黑骨种 B	中抗	无	×	适中北山密目	中感	有	×
疏目烟	中抗	有	√	水头选	中感	有	×
尖叶密目	中抗	有	√	大黄金	中感	有	×
圆叶密目	中抗	有	√	小片孜	中感	有	×
大种	中抗	有	√	矮秆晒烟	中感	有	×
伏市小片孜	中抗	有	√	73-1-1	中感	有	×
文堡烟	中抗	有	√	黑骨种 C	中感	有	×
闽烟 4 号	中抗	有	√	大叶密目	中感	无	√
Y-2	中抗	有	√	特字 8 号	中感	无	√
Y-3	中抗	有	√	云霄 401	中感	无	√
永定一号	中抗	有	√	罗 8701	中感	无	√
4-4	中抗	有	√	黑骨种	中感	无	√
78-20	中抗	有	√	湖里种	感	有	×
龙岩晒烟	中抗	有	√	有梅密目	感	有	×
中秆晒烟	中抗	有	√	高秆晒烟	感	有	×
永安晒烟	中抗	有	√	云 80-1	感	有	×

“√”表示分子鉴定结果与田间鉴定结果一致;“×”表示分子鉴定结果与田间鉴定结果不一致,下同

“√”shows the result of molecular identification is the same as field identification,

“×”shows the result of molecular identification is different from field identification, the same as below

2.4 不同种质来源及类型烟草的抗 TMV 分子鉴定与田间鉴定结果对比

从图 1 和表 3 中可以看出,18 个地方烤烟的分子鉴定与田间鉴定一致性比例为 38.9%,而其中具有烟草抗花叶病基因 *CN* 或其同源基因特异片段的 15 个品种的分子鉴定与田间鉴定一致性比例为

46.7%。11 个地方晒烟的分子鉴定与田间鉴定一致性比例为 63.6%,而其中具有烟草抗花叶病基因 *CN* 或其同源基因特异片段的 8 个品种的分子鉴定与田间鉴定一致性比例为 62.5%。17 个选育烤烟的分子鉴定与田间鉴定一致性比例为 76.5%,而其中具有烟草抗花叶病基因 *CN* 或其同源基因特异片

段的 12 个品种的分子鉴定与田间鉴定一致性比例为 83.3%。比较 3 种不同来源种质的抗 TMV 分子

鉴定与田间鉴定一致性,选育烤烟最高,地方晒烟次之,地方烤烟最低。

表 3 不同种质来源烟草抗 TMV 特性的分子鉴定结果与田间鉴定结果比较

Table 3 Comparison between molecular and field identification of different sources of tobacco germplasm resistance to TMV

种质来源 Sources	品种名称 Variety name	田间抗 TMV 特性 Resistance to TMV in field	有无 CN 或同源基因 CN or homologous genes	一致性 Consistency	种质来源 Sources	品种名称 Variety name	田间抗 TMV 特性 Resistance to TMV in field	有无 CN 或同源基因 CN or homologous genes	一致性 Consistency
地方烤烟	阿乔密目	抗	无	×	地方晒烟	黑骨种 C	中感	有	×
地方烤烟	半斤黄	中抗	无	×	地方晒烟	龙岩晒烟	中抗	有	√
地方烤烟	田心烟	中抗	无	×	地方晒烟	中秆晒烟	中抗	有	√
地方烤烟	湖里种	感	有	×	地方晒烟	永安晒烟	中抗	有	√
地方烤烟	莲花墩密目	中感	有	×	地方晒烟	松香种	中抗	有	√
地方烤烟	小叶密目	中感	有	×	地方晒烟	黑骨种 A	中抗	有	√
地方烤烟	适中北山密目	中感	有	×	选育烤烟	8501	中抗	无	×
地方烤烟	有梅密目	感	有	×	选育烤烟	龙岩 C2	中抗	无	×
地方烤烟	水头选	中感	有	×	选育烤烟	特字 8 号	中感	无	√
地方烤烟	大黄金	中感	有	×	选育烤烟	云霄 401	中感	无	√
地方烤烟	小片孜	中感	有	×	选育烤烟	罗 8701	中感	无	√
地方烤烟	疏目烟	中抗	有	√	选育烤烟	云 80-1	感	有	×
地方烤烟	尖叶密目	中抗	有	√	选育烤烟	73-1-1	中感	有	×
地方烤烟	圆叶密目	中抗	有	√	选育烤烟	闽烟 4 号	中抗	有	√
地方烤烟	大种	中抗	有	√	选育烤烟	Y-1	抗	有	√
地方烤烟	伏市小片孜	中抗	有	√	选育烤烟	Y-2	中抗	有	√
地方烤烟	文堡烟	中抗	有	√	选育烤烟	Y-3	中抗	有	√
地方烤烟	密叶	中抗	有	√	选育烤烟	永定 400	抗	有	√
地方晒烟	黑骨种 B	中抗	无	×	选育烤烟	永定一号	中抗	有	√
地方晒烟	大叶密目	中感	无	√	选育烤烟	4-4	中抗	有	√
地方晒烟	黑骨种	中感	无	√	选育烤烟	78-20	中抗	有	√
地方晒烟	高秆晒烟	感	有	×	选育烤烟	金烟六号	中抗	有	√
地方晒烟	矮秆晒烟	中感	有	×	选育烤烟	80-3	中抗	有	√

3 讨论

本试验对 46 个烟草品种分别选取 7 株材料进行传统田间抗 TMV 特性鉴定。其中所鉴定的病情指数 Y-1 14.3、阿乔密目 21.4 和疏目烟 42.9,与许美玲等^[7] 2004 年鉴定的病情指数 Y-1 13.8、阿乔密目 22.0 和疏目烟 31.7 在同一病情指数范围内。同时,22 个品种抗 TMV 的田间鉴定结果与许美玲等^[14] 2009 年出版的《烟草种质资源图鉴》中的相应

烟草品种抗 TMV 特性相同。可见,本试验对烟草抗 TMV 的田间抗性鉴定结果符合传统鉴定的要求,可以初步确定 24 种前人未鉴定的烟草品种抗 TMV 的抗性结果。

本试验以 3 种不同来源、不同类型的 46 个烟草品种作为材料,分别通过分子鉴定从分子水平来检测不同品种是否具有抗花叶病基因(CN)或其同源基因,通过田间鉴定在田间接种 TMV 的条件下确定不同品种对烟草花叶病感染的抗病反应情况,对 46

个烟草品种的抗 TMV 特性进行研究,建立二者之间的联系。在田间鉴定结果基础上,具有抗花叶病基因(*CN*)或其同源基因的烟草品种,其抗花叶病的概率较高,可见抗花叶病基因(*CN*)或其同源基因是烟草抗 TMV 的重要基因。这与 F. O. Holmes^[15]报道的黏烟草抗性基因显性单基因 *N* 控制,张改云等^[5]报道的黄花烟 HZNH 中克隆到与 *N* 基因和 *NH* 基因同源的 *CN* 基因相符合。而应用以 *CN* 基因为基础的分子鉴定方法作为进行烟草品种抗 TMV 特性鉴定的辅助方法是可行的,且可以有效地提高鉴定的速度。而作为高抗品种的地方烤烟阿乔密目^[7],未检测出抗花叶病基因(*CN*)或其同源基因,说明其可能具有其他类型的抗花叶病基因,有待进一步深入研究。

对选育烤烟的抗 TMV 特性进行分子鉴定与田间鉴定的一致性比例为 83.3%,而地方晒烟和地方烤烟较差。在 13 个感病品种中,发现同样存在 *CN* 或其同源基因,其中地方烤烟有 8 个,地方晒烟有 3 个。说明其抗花叶病基因(*CN*)在调控表达过程中出现部分核苷酸序列变异,也可能是因为地方品种的遗传背景较复杂,抗花叶病基因(*CN*)和环境共同作用的结果。目前应用于生产的烤烟品种多数通过已知优良品质和优良抗性的品种进行杂交育种选育获得,而 *N* 基因^[16]、*NH* 基因^[5]和 *CN* 基因作为目前烟草抗花叶病的主要基因,在选育父母本中存在的概率较大,因此选育的后代具有 *CN* 及其同源基因的可能性也增大。因此,在本研究的分子鉴定中,选育品种的抗性鉴定准确性较高。可见,本研究的分子鉴定方法,在对于已知含有 *CN* 及其同源基因的父母本选育后代的辅助筛选鉴定将有较大的应用前景。

同时,通过对 24 个前人未鉴定的品种研究,发

现 3 个中感品种(特字 8 号、云霄 401 和黑骨种)和 11 个中抗品种(尖叶密目、大种、伏市小片孜、4-4、78-20、龙岩晒烟、中杆晒烟、永安晒烟、松香种、80-3 和黑骨种 A)的田间鉴定和分子鉴定结果一致,为烟草抗病育种提供有用的材料,也为进一步筛选优质抗病烟草品种奠定基础。

参考文献

- [1] 戴培刚,王志德. 部分烟草种质主要病害抗性分析[J]. 中国烟草科学,2004(3):1-5
- [2] Slusarenko A J, Fraser R S S, Van Loon L C. Mechanisms of resistance to plant disease [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000:480
- [3] 朱小平,陈日羲,周冀衡,等. 转复制酶基因抗病毒烟草的研究[J]. 中国烟草学报,1998,4(1):20-23
- [4] Zhang G Y, Chen M, Guo J M, et al. Isolation and characteristics of the *CN* gene, a tobacco mosaic virus resistance *N* gene homolog, from tobacco [J]. Biochem Genet, 2009, 47:301-314
- [5] 张改云,熊腾飞,马有志,等. 烟草 *CN* 基因的 RNA 沉默载体构建与功能分析[J]. 中国烟草学报,2010,16(4):77-82
- [6] 蒋乾坤,田茂成,巢进,等. 烟草品种对普通花叶病的田间抗性鉴定[J]. 安徽农业科学,2010,38(29):16282-16283,16298
- [7] 许美玲,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]. 植物遗传资源学报,2004,5(2):142-146
- [8] 中国烟草总公司青州烟草研究所. YC/T 39-1996 烟草病害分级及调查方法[S]. 北京:中国标准出版社,2004
- [9] 梁景霞,祁建民,吴为人,等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立[J]. 中国烟草学报,2005,11(4):33-38
- [10] 李丹,袁成国,吴海彬,等. 普通小麦品种农大 399 抗白粉病基因 SSR 和 AFLP-SCAR 分子标记[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(1):104-108
- [11] 罗华元,罗昭标,王绍坤,等. 烟草 SCAR 标记技术的建立[J]. 生物技术通讯,2012,23(5):709-712
- [12] 郭金平,朱惠丽,周以飞,等. 部分烤烟种质遗传多样性与亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 中国烟草科学,2009,30(S1):15-18
- [13] 许美玲,赵立红,杨彦明,等. 抗主要病害烟草种质资源的筛选[J]. 种子,2005,24(7):59-61
- [14] 许美玲,李永平. 烟草种质资源图鉴[M]. 北京:科学出版社,2009
- [15] Holmes F O. Inheritance in tobacco of an improved resistance to infection by tobacco mosaic virus[J]. Virology, 1960, 12(1):59-67
- [16] 张恒木,陈剑平,程晔. 烟草抗烟草花叶病毒基因 *N* 的研究[J]. 浙江农业学报,2001,13(2):55-60