

## 生物技术

黄昌军, 陈学军, 于海芹, 等. 烟草野生种*eIF4E1-S*同源基因的多样性与马铃薯Y病毒抗性分析[J]. 中国烟草学报, 2021, 27(3). HUANG Changjun, CHENG Xuejun, YU Haiqin, et al. The diversity of *eIF4E1-S* gene in tobacco wild species and the resistance to Potato virus Y[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2021, 27(3). doi: 10.16472/j.chinatobacco.2020.150

# 烟草野生种 *eIF4E1-S* 同源基因的多样性与 马铃薯 Y 病毒抗性分析

黄昌军, 陈学军, 于海芹, 袁诚, 刘勇\*

云南省烟草农业科学研究院/烟草行业烟草生物技术育种重点实验室/国家烟草基因工程研究中心, 昆明, 650021

**摘要:**【背景和目的】在栽培烟草中, 真核生物翻译起始因子 (Eukaryotic translation initiation factor 4E1, *eIF4E1-S*) 的缺失或突变能够抗马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 侵染。为了解烟草野生种 *eIF4E1-S* 同源基因的多样性和 PVY 抗性状况, 预测野生种含有抗 PVY 新基因 (即不同于 *eIF4E1-S* 基因缺失或突变的基因) 的可能性。【方法】本文设计了普通烟草 *eIF4E1-S* 和其同源基因 *eIF4E1H-T* (非感病基因) 的特异引物, 扩增测定了 34 个烟草野生种的同源基因 cDNA 序列, 分析了野生种 PVY 抗性与感马铃薯 Y 病毒属病毒 *eIF4E* 蛋白关键结构域序列 (loop1 和 loop2) 的相关性。【结果】在 *eIF4E1-S* 同源基因的系统进化树上, 绒毛烟草组 (Tomentosae) 的 4 个抗 PVY 野生种 *Nicotiana otophora*、*N.setchelli*、*N.tomentosa*、*N.tomentosiformis* 聚成一组, loop1 和 loop2 的氨基酸序列与 *eIF4E1H-T* 一致, 这 4 个野生种对 PVY 的抗性可能与 *eIF4E1* 进化为 *eIF4E1H-T* 有关, 包含抗 PVY 新基因的可能性较低。圆锥烟草组 (Paniculatae) 的 4 个抗 PVY 野生种 *N.benavidesii*、*N.raimondii*、*N.cordifolia*、*N.knightiana* 聚成一组, 同源基因氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 一致率高于 *eIF4E1H-T*, 但 loop1 和 loop2 氨基酸序列相互之间差异较大, 这 4 个野生种包含抗 PVY 新基因的可能性中等。与 *eIF4E1-S* 聚成一个小分支的 *N.glauca*、*N.noctiflore*、*N.africana* 高抗 5 个 PVY 分离物 (包含可克服 *va* 抗性的 PVY 分离物), 其中 *N.glauca*、*N.noctiflore* 的同源基因 loop1 氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 相同, loop2 与 *eIF4E1-S* 之间只有 1-2 个氨基酸差异, *N.africana* 同源基因 loop1 与 *eIF4E1-S* 和 *eIF4E1H-T* 差异较大, loop2 与 *eIF4E1-S* 之间只有 1 个氨基酸差异 (V97M)。推测这 3 个野生种的 PVY 抗性与 *eIF4E1* 的突变无关且含有新的抗 PVY 基因可能性高, 可作为重点抗源研究利用。【结论】根据 PVY 侵染栽培烟草所利用的寄主因子 *eIF4E1-S* 基因的同源基因的多样性, 抗 PVY 烟草野生种存在抗 PVY 新基因的可能性划分为高、中和低三档。*N.glauca*、*N.noctiflore*、*N.africana* 含有新的抗 PVY 基因可能性高于其他供试野生种。

**关键词:** 烟草; 野生种; *eIF4E* 基因; 马铃薯 Y 病毒; 抗性

马铃薯 Y 病毒病 (*Potato virus Y*, PVY) 是我国烟草上的重要病害, 每年造成的损失位列十大烟草侵染性病害名单前列<sup>[1-2]</sup>。种植抗病品种是防控 PVY 最根本和最经济有效的措施, 但我国烤烟主栽品种云烟 87、K326、红花大金元、云烟 97 和中烟 100 等均不抗 PVY<sup>[3]</sup>。优良抗源是选育高抗且丰产优质品种的关键之一。目前烟草育种利用的 PVY 抗源主要来源于普

通烟草 (*Nicotiana tabacum*) Virgin A mutant (VAM), 是由 Virginia A 经 X-射线辐射诱变而来<sup>[4]</sup>。诱变导致包含 *eIF4E1-S* 基因的染色体片段缺失 (以 *va* 表示)。普通烟草 *eIF4E1-S* 突变也能获得 PVY 抗性<sup>[5]</sup>。普通烟草为异源四倍体, 具有 *N.sylvestris* 和 *N.tomentosiformis* 两套基因组, 其中 *eIF4E1-S* (感病基因) 来源于 *N.sylvestris*, 可被 PVY 利用, 完成病

**基金项目:** 中国烟草总公司云南省公司科技项目 (2017YN02) 和国家自然科学基金 (31860490)

**作者简介:** 黄昌军 (1980—), 博士, 副研究员, 主要从事烟草病毒病育种与防治研究

**通讯作者:** 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: 645312752@qq.com

**收稿日期:** 2020-05-26; **网络出版日期:** 2021-04-21

毒的侵染循环；同源基因 *eIF4E1H-T*（非感病基因）来源于 *N.tomentosiformis*，不能被 PVY 利用<sup>[6]</sup>。刘勇等根据 *eIF4E1-S* 基因及其家族基因的序列信息，开发出分子标记 CF2GR11，利用该标记明确普通烟草常见抗源缺失 *eIF4E1-S* 基因<sup>[7]</sup>。普通烟草中 PVY 抗源稀少<sup>[8-9]</sup>，而烟草野生种中 PVY 抗源较多。Sievert（1972）<sup>[10]</sup> 采用一个 PVY 分离物接种 62 个野生种、14 份可育的种间杂交种和近 1000 份 TI 编号的美国外引种质，筛选出 11 个野生种和 TI 1406 抗 PVY，其他材料均感 PVY。Burk（1982）<sup>[11]</sup> 采用 3 个 PVY 株系 PVY M<sup>S</sup>M<sup>R</sup>、M<sup>S</sup>N<sup>R</sup> N<sup>S</sup>N<sup>R</sup> 接种，从 40 个野生种、99 个烟草品系中，筛选出 5 个野生种对 3 个株系免疫、1 个品系（VY32）具有对 PVY 的抗性。Dijk and Cuperus（1989）<sup>[12]</sup> 采用 3 个 PVY 株系 PVY<sup>O</sup>、PVY<sup>N</sup>、PVY<sup>C</sup> 的 3 个分离物鉴定了 60 个烟草野生种的抗性。提出安第斯山脉中部（PVY 病毒可能起源地）的圆锥烟草组（*Paniculatae*）的野生种对 PVY 的抗性较强。Doroszewska and Depta（2011）<sup>[13]</sup> 采用 3 个 PVY 株系 PVYNW、PVYNZ、PVYNTN（分别包含可克服和不能克服 *va* 抗性分离物）鉴定了包含 68 个野生种的 96 份资源的抗性。其中 *N. raimondii*, *N. knightiana*, *N. glauca*, *N. benavidesii*, *N. wigandioides*, *N. noctiflora* 和 *N. africana* 抗所有实验株系。由于 PVY 分离物不同和种质的“同名异物”现象，不同研究者对野生种的 PVY 抗性评价结果可能存在一些差异，但普遍认为野生种中存在较多 PVY 抗源。发掘利用上述野生种中的 PVY 抗性，可丰富栽培烟草抗 PVY 基因资源。

由于野生种与普通烟草的染色体倍性和数量存在较大差异，野生种与普通烟草之间普遍存在生殖隔离，将野生种的抗性转育至普通烟草中难度大、工作量大。因此，首先确定野生种中是否存在抗 PVY 新基因，再对包含抗 PVY 新基因的野生种进行抗性转育，可显著提高育种效率。烟草野生种 PVY 抗性包括三种可能：感病基因 *eIF4E1-S* 缺失 / 突变、存在新抗病基因、二者共存。普通烟草 *eIF4E1-S* 蛋白能被 PVY 利用而完成病毒侵染循环（*eIF4E1-S* 可当成感病基因），*eIF4E1H-T* 蛋白不能被 PVY 利用（*eIF4E1H-T* 可当成“非感病基因”），植物感马铃薯 Y 病毒属病毒（Potyviruses）的 *eIF4E* 蛋白存在保守的关键结构域（loop1 和 loop2）<sup>[5,14]</sup>。可通过比较烟草野生种 loop1 和 loop2 氨基酸序列来判断是否含有感病基因。本文采用普通烟草 *eIF4E1-S* 和 *eIF4E1H-T* 基因 cDNA 特异引物扩增测序，分析了 34 个野生种 *eIF4E1* 同源基因的多样性、感马铃薯 Y 病毒属病毒关键结构域

（loop1 和 loop2）氨基酸差异；鉴定了 PVY 抗性。提出假说“在存在 *eIF4E1-S* 感病基因的情况下，抗 PVY 野生种携带抗 PVY 新基因的可能性高；在不存在 *eIF4E1-S* 感病基因（包括存在 *eIF4E1H-T*）的情况下，抗 PVY 野生种携带抗 PVY 新基因的可能性较低”。根据假说预测了抗 PVY 野生种含有抗 PVY 新基因的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

34 个烟草野生种由云南省烟草农业科学研究院保存（见表 1）。野生种采用漂浮盘育苗，3~4 片叶时，移栽到装填育苗基质的直径 10 cm 的塑料花盆中。4-5 片叶时，采集幼叶提取核酸。

### 1.2 抗性鉴定

在防虫塑料大棚内进行。按常规方法漂浮育苗，在 15 孔的苗盘中，每份资源定植 15 株苗，苗龄 60 d 左右，采用高压喷枪摩擦接种 PVY 坏死株系（ZT-5）。方法如下：采集经免疫检测试纸条检测为 PVY 的新鲜病叶，在无菌研钵中，加接种缓冲液（0.01 mol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液）研磨，双层纱布过滤，调整接种液的浓度至 1:100 重量体积比，在病叶汁液中加入 1% 过孔径 0.075 mm 筛孔的化学纯二氧化硅。高压喷枪喷射压力为 1 kg/cm<sup>2</sup>，喷枪口距离接种叶 20 cm 左右，每株苗喷射接种时间约为 0.5 s。接种后立即用喷壶喷少量自来水，提高接种效率。烟苗接种后 14 d 开始调查发病情况，每 7 d 一次，连续调查 3 次，计算发病率。最后一次调查发病率小于或等于 35% 判断为抗病；发病率大于或等于 50% 判断为感病。发病率在 35%~50% 之间的野生种判断为中抗，本文剔除了中抗的野生种。部分野生种的 PVY 抗性引自 Doroszewska（2011）<sup>[13]</sup>，R 表示抗 PVYNW(-) 分离物和 / 或 PVYNTNPol(-) 分离物，S 表示感 PVYNW(-) 分离物且感 PVYNTNPol(-) 分离物。

### 1.3 核酸提取与 cDNA 合成

每份野生种挑选 3 个单株，分别取幼叶提取 DNA 和 RNA。DNA 提取采用 CTAB 法或者 Qiagen DNA 提取试剂盒。RNA 提取采用 Trizol 方法。采用 Nanodrop 测定 DNA 浓度和质量。将质量和浓度合格的 DNA 稀释至 100 ng/μL 备用。采用 TAKARA 公司的反转录试剂盒，进行 cDNA 合成。

### 1.4 *eIF4E1* 引物设计与 PCR 扩增

*eIF4E1-S* cDNA（GenBank 序列号 KF155696.1，MN896999）全长 660 bp。*eIF4E1H-T* 的 cDNA

(GenBank 序列号 KM202068; MN897010) 全长 657 bp。通过比对 *eIF4E1-S* 和 *eIF4E1H-T* 的 cDNA 序列, 设计可特异扩增 *eIF4E1-S* cDNA 全长的引物 CF3/CR3, 上游引物 CF3 位于 *eIF4E1-S* cDNA 起始密码子 ATG 前第 15-37 个碱基, 下游引物 CR3 位于 *eIF4E1-S* cDNA 起始密码子后第 654-674 个碱基。同样设计扩增 *eIF4E1H-T* 同源基因 cDNA 部分序列的引物 CF4/CR4: 上游引物 CF4 位于 *eIF4E1H-T* cDNA 起始密码子 ATG 前第 22-67 个碱基, 下游引物 CR4 根据 *eIF4E1H-T* 的 cDNA 序列起始密码子 ATG 后第 608-629 位碱基设计。CF3/CR3 可特异扩增出 *eIF4E1-S*, CF4/CR4 可同时扩增出大部分供试野生种 *eIF4E1* 同源基因。对野生种首先采用 CF3/CR3 扩增, 若 CF3/CR3 扩增阴性则采用 CF4/CR4 扩增。剔除 CF3/CR3 和 CF4/CR4 都无扩增产物的野生种。

扩增 *eIF4E1* 基因 cDNA 全长序列的引物对为 CF3: 5'-TAAAATCTATAACTAAGTACATA-3', CR3: 5'-CCATTGTAGCAAGAAA ACTAT-3', 扩增片段大小约为 715 bp, 退火温度 48℃。扩增 *eIF4E1H-T* 基因 cDNA 部分序列的引物对为 CF4: 5'-GAAAACACACGAAAATGGCAGAG-3', CR4: 5'-CTGCCGAGCCTCATTGAGTCGT-3', 扩增片段大小约为 645 bp, 退火温度 48℃。扩增烟草内参基因 Actin 的特异引物为 Actin-F: 5'-AAGGGATGCGAGGATGGA-3', Actin-R: 5'-CAAGGAAATCACCGCTTTGG-3', 扩增片段大小为 160 bp, 退火温度 58℃。PCR 反应体系总体积均为 20 μL, 其中 30~50 ng/μL cDNA 样品 2.5 μL、10×PCR buffer 2.0 μL, dNTPs 1.2 μL, 引物各 1.5 μL, rTaq DNA 酶 0.3 μL, ddH<sub>2</sub>O 12.6 μL。所用试剂购自宝生物公司。PCR 反应在 Eppendorf 梯度扩增仪上 (Master Cycler) 上进行。扩增的程序为: 1) 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 退火温度 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 28 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存; 采用 2% 的琼脂糖凝胶进行检测。

### 1.5 测序与序列分析

采用 PCR 产物直接测序或者克隆测序。每份野生种取 3 个单株叶片样品作为 3 个生物学重复样品, 分别提取总 RNA, 随机引物反转录成 cDNA 并进行 PCR 扩增。每个样品 PCR 胶回收产物或者一个克隆双向测序。采用 MEGA6 比对序列, 手工校正 3 次重复测序中个别差异碱基, 确定 3 次测序结果一致的一条序列, 代表该野生种的 *eIF4E1* 同源基因的 cDNA 序列。采用 MEGA6 软件 UPGMA 方法构建 cDNA

或推导氨基酸的系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生种 *eIF4E1-S* 同源基因扩增与 PVY 抗性

*eIF4E1-S* 基因的特异引物 CF3/CR3 可特异扩增普通烟和 *N.sylvestris* 的 *eIF4E1-S* 基因 cDNA 全长。CF4/CR4 引物可同时扩增出 *N.tomentosiformis* *eIF4E1H-T* 基因和 *N.sylvestris* 的 *eIF4E1-S* 基因 cDNA 部分序列。34 个烟草野生种可扩增出目标条带如表 1 所示。其中 19 个野生种至少抗一个 PVY 分离物, 11 个野生种同时感供试的 6 个 PVY 分离物, 4 个野生种的 PVY 抗性不明。感 PVY 的野生种能扩增出 *eIF4E1-S* 基因, 而抗 PVY 的野生种有的扩增出 *eIF4E1-S* 基因、有的扩增出其同源基因。

### 2.2 抗 PVY 野生种 *eIF4E1-S* 同源基因的多态性与含有抗 PVY 新基因的可能性

通过测序获得野生种 *eIF4E1-S* 同源基因的 cDNA 序列和推导的氨基酸序列, 如果同一个野生种同时扩增出 *eIF4E1-S* 和 *eIF4E1H-T* 的同源基因, 选用 *eIF4E1-S* 同源基因构建系统进化树。文献报道植物 eIF4E 蛋白表面帽结合袋 (cap binding pocket) 附近的 2 个结构域决定其对 PVY 属病毒的感病性<sup>[15]</sup>。普通烟草感 PVY 基因 *eIF4E1-S* 编码的 loop1 氨基酸序列为 WFDNPM AKSRQA AWGSS (第 53-69 位氨基酸)、loop2 为 INHPSKLVVG (第 89-98 位氨基酸)<sup>[14]</sup>。在 MEGA6 软件 UPGMA 方法构建的系统进化树上 (图 1), 绒毛烟草组 (Tomentosae) 的 4 个抗 PVY 野生种 *N.otophora*、*N.setchelli*、*N.tomentosa*、*N.tomentosiformis* 的同源基因与 *eIF4E1H-T* 聚成一组。上述 4 个野生种同源基因编码的 loop1 与 *eIF4E1H-T* 的一致、loop2 与 *eIF4E1-S* 和 *eIF4E1H-T* 仅存在 V97A, M, N, T 差异。推测这 4 个野生种的 *eIF4E1-S* 同源基因进化为 *eIF4E1H-T*, 获得对 PVY 部分株系的抗性。且这 4 个野生种都不抗可克服 va 抗性的 PVY 突变株系<sup>[13]</sup>, 因此, 这 4 个野生种包含抗 PVY 新基因的可能性较小。圆锥烟草组 (Paniculatae) 的 4 个抗 PVY 野生种 *N.benavidesii*、*N.raimondii*、*N.knightiana* 聚成一组、*N.cordifolia* 在较远分支, 同源基因的氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 一致率高于 *eIF4E1H-T*。上述 4 个野生种 loop1 和 loop2 氨基酸序列相互之间差异较大, 与 *eIF4E1-S* 和 *eIF4E1H-T* 都不相同, 这 4 个野生种的 PVY 抗性既可能来源于 *eIF4E1-S* 基因突变又可能来源于抗 PVY 新基因。因此, 这 4 个野生种包含抗 PVY 新基因的可能性中等。

表 1 烟草野生种的 PVY 抗性与 *eIF4E1-S* 同源基因的 cDNA 检测  
 Tab. 1 PVY resistance of wild species and *eIF4E1-S* homologs cDNA detection

分组	cDNA 编号	名称 <sup>1</sup>	配子染色体数	PVY 抗性 <sup>2</sup>	CF3CR3 扩增 <sup>3</sup>	CF4CR4 扩增	loop1, loop2 分析
<i>Alatae</i> (具翼烟草组)	GN3	<i>N. alata</i>	9	S	-	+	+
	GN28	<i>N. longiflora</i>	10	<b>R</b>	+	nd	+
<i>Noctiflorae</i> (夜花烟草组)	GN18	<i>N. glauca</i>	12	<b>R</b>	+	nd	+
	GN33	<i>N. noctiflora</i>	12	R	+	+	+
<i>Paniculatae</i> (圆锥烟草组)	GN24	<i>N. knightiana</i>	12	<b>R</b>	+	nd	+
	GN8	<i>N. benavidesii</i>	12	R	+	nd	+
	GN13	<i>N. cordifolia</i>	12	<b>R</b>	+	nd	+
	GN46	<i>N. raimondii</i>	12	R	+	nd	+
<i>Petunioides</i> (渐尖叶烟草组)	GN1	<i>N. acuminata</i>	12	S	+	nd	+
	GN6	<i>N. attenuata</i>	12	<b>S</b>	-	+	+
<i>Polydicliae</i> (多室烟草组)	GN12	<i>N. clevelandii</i>	24	<b>S</b>	+	+	nd
	GN45	<i>N. quadrivalvis</i>	24	nd	-	+	+
<i>Repandae</i> (残波烟草组)	GN47	<i>N. repanda</i>	24	<b>S</b>	+	-	+
<i>Rusticae</i> (黄花烟草组)	GN51	<i>N. rustica</i>	24	nd	-	+	+
<i>SuaaveoleNtomes</i> (香甜烟草组)	GN15	<i>N. debneyi</i>	24	<b>S</b>	-	+	+
	GN29	<i>N. maritima</i>	16	<b>S</b>	-	+	nd
	GN2	<i>N. africana</i>	23	R	+	nd	+
	GN21	<i>N. gossei</i>	18	S	+	+	nd
	GN22	<i>N. ingulba</i>	20	S	-	+	+
	GN39	<i>N. occidentalis</i>	21	S	+	+	+
	GN66	<i>N. velutina</i>	16	<b>S</b>	-	+	+
<i>Sylvestres</i> 林烟草分组	GN69	<i>N. sylvestris</i>	12	<b>S</b>	+	+	+
<i>Tomentosae</i> (绒毛烟草组)	GN23	<i>N. kawakamii</i>	12	R	-	+	nd
	GN62	<i>N. Tomentosa</i>	12	<b>R</b>	+	nd	+
	GN40	<i>N. otophora</i>	12	R	+	nd	
	GN53	<i>N. setchellii</i>	12	<b>R</b>	+	nd	+
	GN70	<i>N. Tomentosiformis</i>	12	<b>R</b>	+	nd	+
<i>Trigonophyllae</i> (三角叶烟草组)	GN36	<i>N. obtusifolia</i>	12	R	+	+	+
	GN63	<i>N. trigonophylla</i>	12	<b>R</b>	+	+	nd
<i>Undulatae</i> (波叶烟草组)	GN19	<i>N. glutinosa</i>	12	<b>S</b>	-	+	+
	GN65	<i>N. undulata</i>	12	R	+	+	+
	GN5	<i>N. arentomsii</i>	24	<b>R</b>	+	+	nd
	GN67	<i>N. wigandioides</i>	12	R	+	+	+
<i>Noctiflorae</i> (夜花烟草组)	GN7	<i>N. acaulis</i>	12	<b>R</b>	+	+	nd

注: 1: 名称加粗表示该野生种的 loop1 氨基酸序列与 eIF4E1-S 一致, loop2 氨基酸序列差异为 V97A, M。2: PVY 抗性非加粗字体表示本文鉴定抗性结果与 Doroszewska T(2011) 报道一致。加粗表示 PVY 抗性引自 Doroszewska T(2011)。R: 抗 PVY<sup>N</sup>W(-) 分离物和 / 或 PVY<sup>NTN</sup>Pol(-) 分离物, S: 感 2 个分离物, nd: 未检测。3: 扩增与分析 +: 扩增阳性, -: 扩增阴性, nd: 未检测。

其他抗 PVY 和感 PVY 野生种聚为一个大的分支。该分支中与 *eIF4E1-S* 聚成一个小分支的 *N.glauca*、*N.noctiflora*、*N.africana* 高抗供试的 5 个 PVY 分离物（包含可克服 *va* 抗性的 PVY 分离物）。氨基酸序列比对结果表明 *N.glauca* 和 *N.noctiflora* 的同源基因与 *eIF4E1-S* 蛋白分别只有 7 个和 4 个氨基酸差异，其中 loop1 氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 相同，loop2 与 *eIF4E1-S* 之间只有 1-2 个氨基酸差异（*N.glauca* 为 K94E+V97M，*N.noctiflora* 为 V97M），*N.glauca* 和 *N.noctiflora* 之间只有一个相同的差异位点（未列出数据）。推测 *N.glauca* 和 *N.noctiflora* 的 PVY 抗性与 *eIF4E1-S* 的氨基酸突变无关，存在新的抗 PVY 基因的可能性高。*N.africana* 同源基因编码的 loop1 与 *eIF4E1-S* 和 *eIF4E1H-T* 差异较大、loop2 与 *eIF4E1-S* 之间只有 1 个氨基酸差异（V97M）。*N.africana* 存在抗 PVY 新基因的可能性稍低于 *N.glauca* 和

*N.noctiflora*。Lewis 等报道<sup>[16]</sup> *N.africana* 存在与 *va* 不同的 PVY 抗性。*N.longiflora* 的同源基因与 *eIF4E1-S* 聚成一个小分支，loop1 氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 相同，loop2 只存在 V97M 差异，但只抗 PVYNW(-) 分离物。*N.longiflora* 存在抗 PVY 新基因的可能性高，但育种价值较小。

### 2.3 感 PVY 野生种关键结构域高度保守

文献报道普通烟草感 PVY 蛋白 *eIF4E1-S* 的 loop1 和 loop2 与 VPg 诱饵蛋白 *eIF4E1H-T* 存在较大差异（图 2）。本文 11 个感病野生种的 loop1 氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 一致、且其中 8 个感病野生种的 loop2 只存在 V97M/A 差异，*N.glutinosa* 的 loop2 只存在 G98N 差异，*N.repanda* 的 loop2 只存在 H89L 差异。表明感 PVY 野生种 *eIF4E-S* 蛋白关键结构域高度保守。

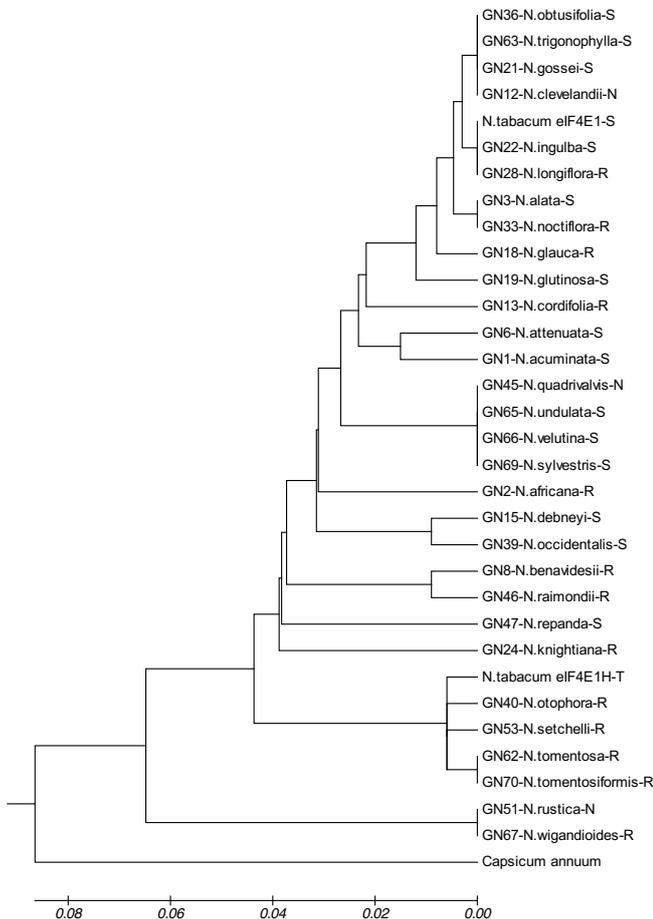


图 1 烟草野生种 *eIF4E1-S* 同源基因推导氨基酸序列构建的系统进化树 (UPGMA)

Fig. 1 System Evolution tree (UPGMA) for *eIF4E1-S* homologs deduced amino acid sequences of tobacco wild species

种名_抗性	loop1	loop2
<i>N. tabacum eIF4E1-S</i>	WFDNPMKSR QAAWGSS	INHPSKLVVG
GN1 <i>N. acuminata-S</i>	.....	..... A.
GN3 <i>N. alata-S</i>	.....	..... M.
GN6 <i>N. attenuata-S</i>	.....	..... A.
GN15 <i>N. debneyi-S</i>	.....	..... M.
GN19 <i>N. glutinosa-S</i>	.....	..... AN
GN22 <i>N. ingulba-S</i>	.....	..... M.
GN36 <i>N. obtusifolia-S</i>	.....	..... A.
GN39 <i>N. occidentalis-S</i>	.....	..... M.
GN45 <i>N. quadrivalvis-N</i>	.....	..... A.
GN65 <i>N. undulata-S</i>	.....	..... A.
GN66 <i>N. velutina-S</i>	.....	..... A.
GN69 <i>N. sylvestris-S</i>	.....	..... A.
GN47 <i>N. repanda-S</i>	.....	.. L. .... M.
GN18 <i>N. glauca-R</i>	.....	..... E. . M.
GN28 <i>N. longiflora-R</i>	.....	..... M.
GN33 <i>N. noctiflora-R</i>	.....	..... M.
<i>N. tabacum eIF4E1H-T-R</i>	. Y. KN. T. . . . . F	..... T.
GN70 <i>N. tomentosiformis-R</i>	. Y. KN. T. . . . . F	..... T.
GN51 <i>N. rustica-N</i>	. . . KN. T. . G . IP. . . G	..... M.
GN67 <i>N. wigandioides-R</i>	. . . KN. T. . G . IP. . . G	..... M.
GN40 <i>N. otophora-R</i>	. Y. KN. T. . . . . F	..... T.
GN53 <i>N. setchelli-R</i>	. Y. KN. T. . . . . F	..... T.
GN62 <i>N. tomentosa-R</i>	. Y. KN. T. . . . . F	..... T.
GN2 <i>N. africana-R</i>	. . . T. VN. . . D. . . .	..... M.
GN8 <i>N. benavidesii-R</i>	. . . S. I. . . . . T. . . .	..... N.
GN13 <i>N. cordifolia-R</i>	..... E. . . . .	..... A.
GN24 <i>N. knightiana-R</i>	. . . . . K. . . T . . . . . F	. . R. . E. . A.
GN46 <i>N. raimondii-R</i>	. . . S. I. . . . .	. . P. . . . . I.

注：R：表示抗 PVY，S 表示感 PVY，N 表示抗性未测定。

图 2 抗感 PVY 野生种的 loop1 和 loop2 氨基酸比较

Fig. 2 Comparison of loop1 and loop2 amino acids of wild species with PVY resistance

### 3 讨论

#### 3.1 烟草野生种 PVY 抗性与 *eIF4E1-S* 基因的关系

烟草育种长期利用 *eIF4E1-S* 缺失的抗源 (*va*)，田间已出现可克服 *va* 抗性的突变病毒<sup>[14, 17-19]</sup>，表明 *va* 品种的抗性持久性不够高；*eIF4E1-S* 基因移码突变体或无义突变体的抗性持久性低于 *va*，不能满足抗病育种需要。因此，有必要在野生种中发掘不同于 *eIF4E1-S* 基因缺失或者突变的新抗病基因。鉴定筛选抗 PVY 的野生种相对容易，采用常规的摩擦接种抗性鉴定即可。但分析抗 PVY 野生种是否存在新抗病基因难度很大，因为大部分野生种与普通烟草、野生种之间存在生殖隔离，几乎不可能利用常规杂交方法分析抗病基因是否等位。野生种 PVY 抗性包括三种可能：感病基因缺失 / 突变、存在新抗病基因、二者共存。本文尝试利用同源基因克隆测序方法预测野生种存在新抗病基因的可能性，并提出如下假说：在存在 *eIF4E1-S* 感病基因的情况下，抗 PVY 野生种携带抗 PVY 新基因的可能性高；在不存在 *eIF4E1-S* 感病基因（包括存在 *eIF4E1H-T*）的情况下，抗 PVY 野生种携带抗 PVY 新基因的可能性较低。

几篇文献报道感 PVY 属病毒的 *eIF4E* 蛋白表面存在 loop1 和 loop2 关键氨基酸结构域<sup>[14-15, 21-22]</sup>，如：抗 PVY 辣椒种质资源的 2 个 loop 存在非同义突变、这些氨基酸突变与抗性有关<sup>[23]</sup>。感病辣椒的这两个结构域的单个或几个关键氨基酸突变可获得 PVY 抗性。通过比较野生种 loop1 和 loop2 氨基酸序列来判断野生种是否含有感病基因。本文再进一步推测：抗 PVY 野生种的 loop1 和 loop2 氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 基因相同，则该野生种含有抗 PVY 新基因的可能性高；抗 PVY 野生种的 loop1 和 loop2 氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 基因不同（包括与 *eIF4E1H-T* 相同），则该野生种含有抗 PVY 新基因的可能性较低。在排除个别野生种 *eIF4E1-S* 同源基因缺失 / 突变、且含有抗 PVY 新基因的情况下，某个野生种 loop1 和 loop2 氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 的多样性越高，则越可能丧失 PVY 感病性，含有新抗病基因的可能性较低。

#### 3.2 野生种 *eIF4E1-S* 同源基因多样性与抗 PVY 新基因可能性

本文分析了 34 个抗 / 感 PVY 野生种的 *eIF4E1-S* 同源基因的推导氨基酸序列，表明野生种 *eIF4E1-S* 同源基因之间存在较大的多样性，感 PVY 属病毒的 *eIF4E1* 蛋白关键结构域 loop1 和 loop2 的氨基酸序列高度保守。其中 10 个感 PVY 野生种 loop1 氨

基酸序列与 *eIF4E1-S* 一致、其中 8 个野生种 loop2 仅在 V97M, A 存在差异。表明感 PVY 野生种 loop1 和 loop2 的保守性显著高于抗 PVY 野生种。根据以上假说，本文预测了野生种中存在抗 PVY 新基因的可能性高低。绒毛烟草组 (*Tomentosae*) 的 4 个野生种 *N.otophora*、*N.setchelli*、*N.tomentosa*、*N.tomentosiformis* 的 PVY 抗性可能与 *eIF4E1* 进化为 *eIF4E1H-T* 有关，其育种利用价值不大。因为感 PVY 的普通烟中存在 *eIF4E1H-T*。圆锥烟草组 (*Paniculatae*) 的 4 个抗 PVY 野生种 *N.benavidesii*、*N.raimondii*、*N.cordifolia*、*N.knightiana* 推导的氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 一致率高于 *eIF4E1H-T*，loop1 和 loop2 与 *eIF4E1-S* 存在较为随机的 2-6 个氨基酸差异，这些氨基酸变异可能导致与 PVY VPg 不能互作，获得 PVY 抗性。因此，圆锥烟草组 4 个抗 PVY 野生种包含抗 PVY 新基因的可能性中等。

根据 loop1 和 loop2 的变异较小且抗多个 PVY 分离物，推测 *N.glauca*、*N.noctiflore* 存在新的高抗 PVY 基因的可能性高、*N.africana* 其次。*N.africana* 作为父本可与普通烟杂交结实，产生母本来源的单倍体和混倍体，其 PVY 抗性已经部分转育至普通烟中<sup>[16]</sup>，可增强 *va* 抗性，对可克服 *va* 抗性的 PVY 突变株系也有一定的抗性。尚未见 *N.glauca*、*N.noctiflore* 的 PVY 抗性转育至普通烟草中的报道，发掘利用烟草野生种的抗 PVY 新基因推荐以 *N.glauca*、*N.noctiflore*、*N.africana* 为重点。

PVY 抗性不明确的 *N.quadrivalvis* 的 loop1 和 loop2 氨基酸序列与 *eIF4E1-S* 一致，推测其不是感 PVY 就是存在新抗病基因。PVY 抗性不明确的 *N.rustica*、*N.wigandioides* 的 loop1 与 *eIF4E1H-T* 一致率较高，与 *eIF4E1H-T* 存在 5 个氨基酸差异，如果抗 PVY，则其抗性可能与同源基因进化为 *eIF4E1H-T* 有关，因此，含有抗 PVY 新基因的可能性中等。

#### 3.3 感 PVY 同源基因克隆测序法的可行性与局限性

烟草属野生种大部分为二倍体，少数为异源四倍体。高质量的全基因组数据或者全长转录组数据，可从全局上分析野生种 *eIF4E1-S* 同源基因。但因为烟草基因组巨大和重复序列多，导致近期内难以获得 30 多份野生种的基因组数据或全长转录组数据。本文尝试采用同源基因克隆测序方法预测野生种存在抗 PVY 新基因的可能性，为目前可行的尝试。我们根据普通烟草的 *eIF4E1-S*、*eIF4E1H-T* 和祖先种同源基因设计引物扩增测序，本文获得了 34 个野生种 *eIF4E1* 同源基因的 cDNA 序列。其他 3 个野生种

(*N. auculis* 和 *N. sanderae*, *N. petuniodes*) 供试引物扩增不成功、7 个野生种的个别氨基酸存在疑问, 未采用同源基因分析方法预测抗 PVY 野生种是否存在新的抗 PVY 基因。*eIF4E1-S* 同源基因克隆测序法的局限性在于, 野生种同源基因的变异较大, 难以设计可扩增所有野生种的通用引物。四倍体野生种的同源基因可能存在两个拷贝, 导致克隆测序时个别氨基酸序列不一致。

#### 4 结论

根据 *eIF4E1-S* 同源基因的多样性, 将抗 PVY 烟草野生种存在抗 PVY 新基因 (即不属于 *eIF4E1-S* 基因缺失或突变) 的可能性划分为高、中和低三档。*N. glauca*、*N. noctiflore*、*N. africana* 含有新的抗 PVY 基因可能性高于其他供试野生种, 可作为重点抗源研究利用。

#### 参考文献

- [1] 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发, 等. 全国 16 个主产烟省 (区) 烟草侵染性病害调查报告 [J]. 中国烟草科学, 1997, 4:1-7.  
CHEN Ruitai, ZHU Xianchao, WANG Zhifa, et al. A report of investigating and studying tobacco infectious diseases of 16 main tobacco producing provinces region in China[J]. China Tobacco Science, 1997, 4:1-7.
- [2] 刘勇, 莫笑晗, 余清, 等. 云南、福建、湖南烟区烟草花叶病主要病毒种类检测及黄瓜花叶病毒亚组鉴定 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(4): 310-313.  
LIU Yong, MO Xiaohan, YU Qing, et al. Virus detection of tobacco mosaic disease and subgrouping of Cucumber mosaic virus (CMV) in Yunnan, Fujian and Hunan Provinces [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(4):310-313.
- [3] 陈荣平, 焦庆明, 兰荣利, 等. 烟草抗 PVY 育种材料的筛选与应用 [J]. 中国烟草科学, 2000, 21(1): 1-4.  
CHEN Rongping, JIAO Qingming, LAN Rongli, et al. Selection and utilization of resistant tobacco materials to PVY [J]. China Tobacco Science, 2000, 21(1): 1-4.
- [4] Burk L G, Gooding G V, Chaplin J F. Reaction of Nicotiana species and cultivars or breeding lines of Nicotiana tabacum to three strains of potato virus Y [J]. Tobacco Science, 1982, 28: 82-88.
- [5] Julio E, Cotucheau J, Decorpis C. et al. A Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the “va” tobacco recessive resistance to Potyvirus [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33 (3), 609-623.
- [6] Sierrro N, Battey J N, Ouadi S. et al. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato [J]. Nature Communications, 2014, 5:3833, 1-9.
- [7] 刘勇, 宋中邦, 童治军, 等. 烟草 PVY 隐性抗病基因的分子标记及其适用性 [J]. 中国烟草学报, 2015, 21(1):76-81.  
LIU Yong, SONG Zhongbang, TONG Zhijun, et al. Molecular marker from recessive gene resistant to potato virus Y of tobacco and its suitability [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2015, 21(1):76-81.
- [8] 刘艳华, 王志德, 钱玉梅, 等. 烟草抗病病毒病种质资源的鉴定与评价 [J]. 中国烟草科学, 2007, 28(5):1-4,8.
- [9] LIU Yanhua, WANG Zhide, QIAN Yumei, et al. Resistance identification and evaluation of tobacco germplasm to tobacco virus diseases [J]. China Tobacco Science, 2007, 28(5):1-4,8.  
陈荣平, 冯春才, 王春军, 等. 部分烟草种质资源的 PVY 抗性鉴定 [J]. 中国烟草科学, 2009, 30 (增): 56-58.  
CHEN Rongping, FENG Chuncai, WANG Chunjun, et al. Resistance identification to PVY of some tobacco germplasm resources [J]. China Tobacco Science, 2009, 30:56-58.
- [10] Sievert R C. Sources of resistance to potato virus Y in the genus Nicotiana [J]. Tobacco Science 1972, 106: 92-94.
- [11] Burk L G, Gooding G V. and Chaplin J F. Reaction of Nicotiana species and cultivars or breeding lines of Nicotiana tabacum to three strains of potato virus Y [J]. Tobacco Science, 1982, 26: 85-88.
- [12] Dijk P, Van and Cuperus C. Reactions of Nicotiana species to potato viruses A, X and Y and tobacco mosaic virus in relation to their taxonomy and geographical origin [J]. Netherland Journal of Plant Pathology, 1989, 95:343-356.
- [13] Doroszewska T and Depta A. Resistance of wild Nicotiana species to different PVY isolates [J]. Phytopathologia, 2011, 59:9-24.
- [14] Michel V, Julio E, Candresse, T, et al. A complex eIF4E locus impacts the durability of va resistance to Potato virus Y in tobacco [J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(8):1051-1066.
- [15] German-Retana S, Walter J, Doublet B, et al. Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and Potyvirus infection [J]. Journal of Virology, 2008, 82, 7601-7612.
- [16] Lewis R S. Transfer of resistance to potato virus Y (PVY) from Nicotiana Africana to Nicotiana tabacum: possible influence of tissue culture on the rate of introgression [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110: 678-687.
- [17] Masuta C, Nishimura M, Morishita H, et al. A single amino acid change in viral genome-associated protein of potato virus Y correlates with resistance breaking in ‘Virgin A Mutant’ tobacco [J]. Phytopathology, 1999. 89:118-123.
- [18] Lacroix C, Glais L, Verrier J L, et al. Effect of passage of a Potato virus Y isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene *va*<sup>2</sup> on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2. European Journal of Plant Pathology [J]. 2011, 130(2):259-269.
- [19] Janzac B, Tribodet M, Lacroix C, et al. Evolutionary pathways to break down the resistance of allelic versions of the PVY resistance gene *va* [J]. Plant Disease, 2014, 98:1521-1529.
- [20] Takakura Y, Udagawa H, Shinjo A, et al. Mutation of a Nicotiana tabacum L. eukaryotic translation-initiation factor gene reduces susceptibility to a resistance-breaking strain of potato virus Y [J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19:2124-2133.
- [21] Robaglia C and Caranta C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection [J]. Trends in Plant Science. 2006, 11: 40-45.
- [22] Bastet A, Lederer B, Giovinazzo, et al. Trans-species synthetic gene design allows resistance pyramiding and broad-spectrum engineering of virus resistance in plants [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16:1569-1581.
- [23] Charron C, Nicolai M, Gallois J L, et al. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg: Coevolution between eIF4E and VPg [J]. Plant Journal, 2008, 54:56-68.

## The diversity of *eIF4E1-S* gene in tobacco wild species and the resistance to *Potato virus Y*

HUANG Changjun, CHENG Xuejun, YU Haiqin, YUAN Cheng, LIU Yong\*

Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tobacco Biotechnological Breeding,  
National Tobacco Genetic Engineering Research Centre, Kunming 650021, China

**Abstract:** [Background and Objective] Eukaryotic translation initiation factor 4E1(*eIF4E1-S*) is tobacco recessive resistance gene to *Potato virus Y* (PVY). Elucidating the *eIF4E1-S* diversity and PVY resistance of tobacco wild species is helpful for finding new resistant resources for tobacco breeding. [Methods] In this paper, the *eIF4E1* gene cDNA and deduced amino acid sequence of 34 tobacco wild species were determined by *eIF4E1* gene amplifying and sequencing, and the phylogenetic tree was constructed by MEGA6 software UPGMA. [Results] In phylogenetic trees, for the four PVY resistant wild species in the Tomentosae group, such as *N.otophora*, *N.setchelli*, *N.tomentosa*, *N.tomentosiformis*, their resistance to PVY may be related to the evolution from *eIF4E1-S* to *eIF4E1H-T*; for the 4 PVY resistant wild species *N.benavidesii*, *N.raimondii*, *N.cordifolia*, *N.knightiana* in Paniculatae group, their homologous gene amino acid sequence was more consistent with *eIF4E1-S* than with *eIF4E1H-T*. The *N.glauca*, *N.africana*, and *N.noctiflore*, which have resistance to 5 PVY isolates (including PVY isolates that can break *va* resistance) were clustered into a small branch with *eIF4E1-S*. It was speculated that the PVY resistance of these 3 wild species was independent of *eIF4E1* variation and may contain new PVY resistance gene(s). The wild species with PVY resistance, which is different from *eIF4E1-S* deficiency or variant homologous, is of great breeding value. [Conclusion] According to the diversity of the host factor *eIF4E1-S* gene used by PVY infection, the probability of the presence of new PVY resistant gene (i.e. not belonging to *eIF4E1-S* gene loss or mutation) in the tobacco wild species can be divided into high, medium and low third grades. *N.glauca*, *N.noctiflore*, and *N.africana* are more likely to contain new PVY resistant genes than other wild species.

**Keywords:** tobacco; wild species; *eIF4E* gene; *Potato virus Y*; resistance

\*Corresponding author. Email: 645312752@qq.com

### 摄氏温度计量单位的我国法定符号是什么？

摄氏温度 (Celsius temperature) 的计量单位是 ISO 80000-1: 2009《量和单位 第1部分: 总则》发布的 22 个具有专门名称的 SI 导出单位之一, 其英文名称为 degree Celsius, 国际符号为 °C; 并指出 °C 是一个整体符号, 如 “ $t=23.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ”, 不得写为 “ $t=23.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ”。

最近在微信朋友圈里读到的一篇短文宣称: “中文的摄氏度是 1 个字符”, 即 °C; “英文的摄氏度 °C 却是 2 个字符, 前面一个表示英文中的度, 后面一个表示摄氏 (Celsius)”。

短文还教大家怎样排出这个由 “°+C” 组成的符号, 并告诫 “大家在写英文文章时一定要用正确的写法, 不要用中文的摄氏度”。

在这里, “英文摄氏度 °C 是 2 个字符” 的说法和写法都是错误的。按标准规定, 无论中文还是英文, 摄氏度的国际符号都是一个整体符号, 只是在中文中

为 °C, 英文中为 °C, 从形式上看起来不一样罢了。你把 “°C” 转换为英文状态, 便变为 “°C”; 反之亦然。平时有人先入为主, 只从表面形式去判断, 或者不知字库中有整体符号, 打字时用 “°” 与 “C” 组合成 “°C”, 鉴于其与正确符号 “°C” 视觉印象很接近, 就错误地认为 °C 不是一个整体符号了。

既然 “°C” 和 “°C” 都是摄氏度的国际符号, 原则上在英文论文中用中文状态的符号, 或在中文论文中用英文状态的符号, 只要是前后统一的, 都不应判定其为错误; 但如果使用了由 2 个符号组合成的 “°C”, 则违反了强制性标准 GB 3100—1993 和 ISO 80000-1:2009 的规定, 是错误的符号。

(摘自: 《编辑学报》 作者: 陈浩元)