

# 应用浸种法导入外源 DNA 转化烤烟 遗传性状变异初探(II)

朱生伟<sup>1</sup>, 徐 仲<sup>2</sup>, 张寒霜<sup>3</sup>, 史芝文<sup>2</sup>

(1 中国科学院植物所, 北京 100093; 2 东北农业大学 生物工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

3 河北省农林科学院棉花所, 河北 石家庄 050031)

摘要: 对应用浸种处理获得的变异后代, 进行了叶绿素、糖、蛋白质、维生素 C 及株高、叶面积、生育期等的测定。试验表明: 该方法对株高、叶面积、生育期等性状的影响较为显著, 对叶绿素、糖、蛋白质及维生素 C 等的改变不明显。

关键词: 烤烟; 浸种法; 外源 DNA 导入; 变异

中图分类号: S572.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2001)01-0073-05

外源 DNA 处理可以导致植物形态和生理特征的变异<sup>[1]</sup>。本文研究了应用外源 DNA 处理烤烟萌发种子后代的若干形态特征和生理特征的遗传变异。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试品种有: 受体 Ne89 株型塔形, 叶片长椭圆形, 叶色深绿, 株高 110 cm 左右, 早熟(110~120 d), 易感赤星病, 较耐花叶病。供体 Cv87 株型筒形, 叶片椭圆形, 叶色浅绿, 株高 120 cm 左右, 早熟(110 d), 高抗赤星病、花叶病。由东北农业大学农学院烟草教研室提供。

### 1.2 方法

1.2.1 外源 DNA 的提取及导入方法 见参考文献[2]。

1.2.2 生化指标检测 依据株高、株型、叶片颜色、叶面积、生育期及抗病性等田间农艺性状表现, 筛选出表型良好烟株, 进行生化指标测定。称取洗净吸干表面水分的腰叶(去叶脉和叶缘)0.2~2.0 g, 分别采用丙酮法、3,5-二硝基水杨酸法、半微量滴定法、考马斯亮兰 G-250 法<sup>[3,4]</sup>进行叶绿素、维生素 C、蛋白质、总糖及还原糖等含量的测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源 DNA 导入对植株生长发育影响

浸种处理后, 处理株在生长发育方面与对照株存在着显著的差异。对株高、腰叶长和宽

周期性调查结果表明, 处理与对照的株高、叶面积(腰叶长 $\times$ 宽 $\times 0.6345$ )基本符合 Logistic 方程生长规律, 整个生长过程呈慢—快—慢的“S”型曲线(见表 1, 图 1, 2)。在 9 月 6 日前生长较缓慢, 9 月 13 日至 10 月 18 日这段时期生长较快, 10 月 25 日之后生长又变得缓慢。通过对处理和对照各时期株高平均数差异显著性比较, 看出浸种处理株高在 9 月 6 日至 10 月 18 日明显高于对照, 并且达到显著或极显著差异, 在 10 月 25 日至 11 月 15 日处理与对照无显著差异。对照之间差异不显著, 处理比对照早进入旺长、现蕾、开花(近 7~10 d)。

表 1 浸种处理后植株生长发育状况

日 期 (月—日)	Cv 87DNA 浸种		未处理(ck1)		1 $\times$ SSC 处理(ck2)	
	株高 (cm)	叶长 $\times$ 叶宽 (cm $\times$ cm)	株高 (cm)	叶长 $\times$ 叶宽 (cm $\times$ cm)	株高 (cm)	叶长 $\times$ 叶宽 (cm $\times$ cm)
09—06	21.7 <sup>*</sup>	16.8 $\times$ 8.3 <sup>*</sup>	17.7	12.6 $\times$ 6.4	17.3	12.8 $\times$ 6.3
09—13	28.5 <sup>**</sup>	26.8 $\times$ 13.2 <sup>**</sup>	22.5	19.9 $\times$ 10.2	22.1	19.4 $\times$ 10.2
09—20	40.1 <sup>**</sup>	27.7 $\times$ 13.4 <sup>**</sup>	31.7	22.0 $\times$ 11.2	31.9	21.7 $\times$ 11.7
09—27	50.7 <sup>**</sup>	29.6 $\times$ 13.8 <sup>**</sup>	42.9	22.9 $\times$ 11.2	43.3	22.7 $\times$ 11.2
10—04	60.2 <sup>**</sup>	29.9 $\times$ 13.6 <sup>**</sup>	53.8	25.6 $\times$ 11.4	53.8	25.4 $\times$ 11.3
10—11	68.6 <sup>**</sup>	31.1 $\times$ 13.8 <sup>**</sup>	60.0	25.7 $\times$ 11.7	59.6	25.8 $\times$ 11.6
10—18	74.2 <sup>**</sup>	31.0 $\times$ 14.0 <sup>**</sup>	67.6	26.8 $\times$ 12.1	67.3	26.9 $\times$ 12.0
10—25	75.2	31.5 $\times$ 14.3	70.2	27.3 $\times$ 12.3	70.0	27.3 $\times$ 12.2
11—01	76.4	31.5 $\times$ 14.3	73.4	27.3 $\times$ 12.3	73.1	27.4 $\times$ 12.2
11—08	77.5	31.6 $\times$ 14.4	74.8	27.4 $\times$ 12.3	75.6	27.5 $\times$ 12.4
11—15	77.9	31.7 $\times$ 14.4	75.1	27.4 $\times$ 12.2	75.8	27.5 $\times$ 12.4

注: \*, \*\* 分别代表 5%, 1% 显著水平。

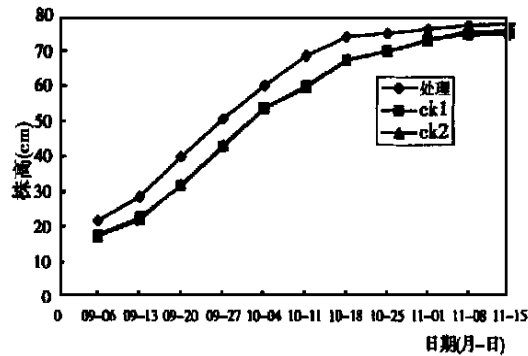


图 1 浸种处理株高生长曲线

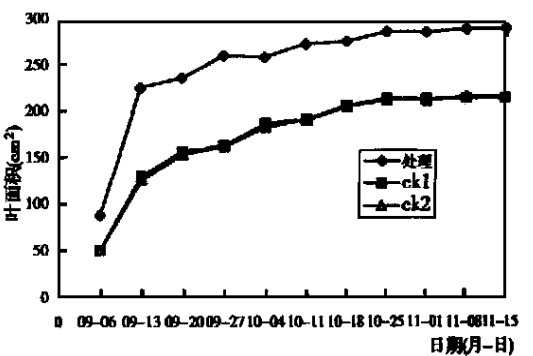


图 2 浸种处理腰叶叶面积生长曲线

叶片在整个生长发育过程中, 前期(09—06 前)生长缓慢, 进入团棵期(09—06)后生长加速, 直到现蕾、开花(处理 10—11), 对照(10—25)生殖发育阶段, 生长又非常缓慢, 可以看出叶片生长主要集中在营养生长阶段。处理和对照的叶面积生长规律和株高比较一致, 处理比对照提早达到最大生长值, 成熟期提前(见图 2)。通过对处理和对照各时期叶面积平均数差异显著性比较, 发现处理叶面积明显大于对照, 并且达到极显著差异, 对照间无差异。

从以上图 1, 2 可以看出, 处理株较对照发育明显提前, 提早达到最大生长值, 从而使处理成熟期提前。株高与叶面积生长规律基本一致, 大略呈“S”型, 几乎同时达到最大生长值, 这也可能是与叶片提供给植株有机营养有关。

2.2 外源 DNA 导入后叶绿素含量变化

烟叶中含有大量叶绿素, 少量胡萝卜素和叶黄素, 在烟叶成熟过程中, 叶绿素不断降解,

颜色发生变化, 如果叶绿素含量很高, 分解不充分, 就会使烟叶不能正常落黄, 烤后容易成青烟, 品质下降, 青杂气重, 刺激性强, 可用性差<sup>[5, 6]</sup>。

从表 2 及图 3 可以看出, 在烟株生长发育过程中, 叶绿素含量(以鲜重计)变化呈递减趋势, 处理株叶片颜色与对照没有明显差异。

2.3 外源 DNA 导入后总糖、还原糖含量变化

糖类物质具有促进烟叶香气的作用, 使吃味醇和。质量好的烤烟, 含糖量都比较高, 当然如果超出一定范围, 反而会使品质下降<sup>[5~7]</sup>。

在烟株生长发育过程中, 叶片中总糖、还原糖含量随着叶片生长而增加(见表 2), 浸种处理与对照相比, 总糖及还原糖含量稍高(见图 4)。

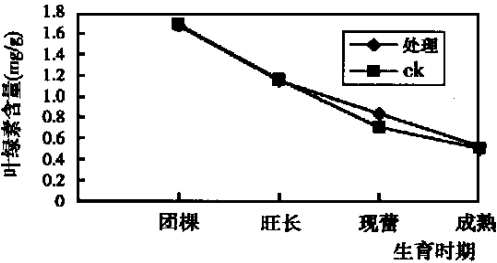


图 3 浸种处理叶绿素含量变化动态

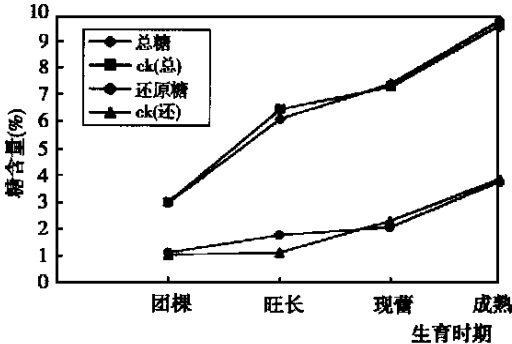


图 4 浸种处理总糖、还原糖变化动态

2.4 外源 DNA 导入后蛋白质含量变化

烟叶中蛋白质含量与烟草品质也是密切相关的。蛋白质含量过高, 烟叶燃烧性不良, 刺激性增加, 吸味苦涩, 杂味重, 是产生恶劣烟气的主要物质之一。只有与糖等成分比例协调, 才能使烟叶吃味醇和, 苦味、辣味减少, 杂气少, 香气足<sup>[5~7]</sup>。

从表 2 数据也可以看出, 烟株在大田生长期, 从团棵、旺长、现蕾到成熟期, 叶片蛋白质含量呈递增趋势。处理要略低于对照(见图 5)。

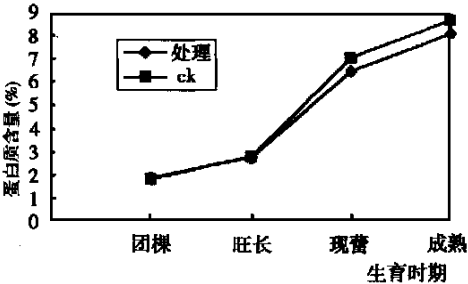


图 5 浸种处理蛋白质含量变化动态

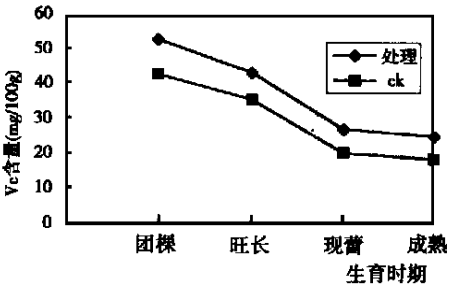


图 6 浸种处理 Vc 含量变化动态

2.5 外源 DNA 导入后 Vc 含量变化

烟叶质量除了与烟碱、蛋白质、糖等化学成分有关外, 微量成分 Vc 能够影响气味、香气,

更重要的是 Vc 能减少烟碱、焦油的不利影响,有解毒作用,有益健康<sup>[7]</sup>。

从表 2 及图 6 可以看出,烟株在大田生长时期,从团棵、旺长、现蕾到成熟期, Vc 含量变化呈递减趋势,各时期 Vc 含量处理明显高于对照。

通过对叶片的叶绿素、总糖、还原糖、蛋白质及 Vc 含量等生化指标的测定看出:烤烟在生长发育过程中,糖与蛋白质含量呈递增趋势,叶绿素和 Vc 含量呈现递减趋势,处理与对照之间无显著差异。从试验测定结果也可以看出,处理与对照相比,品质没有下降,起码是品质不变或是得到改善。

表 2 浸种处理后烟株叶绿素、总糖、还原糖、蛋白质及维生素 C 含量

处	理	团棵期	旺长期	现蕾期	开花期
叶绿素含量(mg/g)	Nc89+ Cv87DNA	1.672	1.155	0.842	0.536
	ck	1.686	1.167	0.709	0.521
总糖含量(%)	Nc89+ Cv87DNA	3.001	6.124	7.454	9.810
	ck	1.047	6.496	7.344	9.639
还原糖含量(%)	Nc89+ Cv87DNA	1.140	1.830	2.150	3.880
	ck	1.076	1.180	2.400	3.980
蛋白质含量(%)	Nc89+ Cv87DNA	1.915	2.722	6.427	8.050
	ck	1.834	2.765	7.007	8.634
维生素 C 含量(mg/g)	Nc89+ Cv87DNA	52.70	43.18	27.20	25.16
	ck	42.60	35.36	20.41	18.70

3 结论与讨论

烤烟作为一种特殊食品,以采叶为主。烟草品质(或质量),包括色、香、味与其化学成分、物理性状、外观特征密切相关,比较复杂<sup>[5]</sup>。烟叶品质好坏受化学成分组合的影响,所以通常根据烟叶分析结果,用化学成分某些组合比例作为衡量品质高低的标准,如施木克值(糖蛋比 2~2.5)。

应用浸苗法将外源 Cv87DNA 导入 Nc89,受体后代变异率达 21.2%,所引起的变异性状,如生育期、株高、叶色、株型、抗病性等多是由微效多基因控制的数量性状及少量基因控制的质量性状;而对叶绿素、糖、Vc 及蛋白质含量等数量性状改变不明显。这可能是由于受、供体之间这些生化指标差异不大所致<sup>[8]</sup>。变异的发生可能通过受、供体基因同源重组这一整合途径外,还可能通过供体 DNA 片断插入到受体基因组中<sup>[9~11]</sup>,从而导致受体性状的变异,当然也有可能产生嵌合体,还需要进一步分子验证。

将外源 DNA 直接导入烟草,后代变异范围大,变异率高,但未发现致死现象。利用该方法与常规育种相结合,引入远缘或超远缘遗传物质,丰富了烟草的遗传基础。由于变异后代稳定快,育种年限短<sup>[12,13]</sup>,因而这条新的育种途径有利于克服烟草育种工作目前的徘徊局面,为烟草育种创造新种质开创了新途径。

## 参考文献:

- [1] 雷勃钧, 李希臣, 卢翠华. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆及 RAPD 分子检测[J]. 中国科学(B 辑), 1994, 24(6): 596—601.
- [2] 朱生伟, 张寒霜, 徐 仲, 等. 应用浸种法导入外源 DNA 转化烤烟遗传性状变异的初步研究(I)[J]. 华北农学报, 1999, 14(增刊): 107—111.
- [3] 北京大学生物系化学教研室编. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1984.
- [4] 史芝文, 徐 仲, 高继国, 等. 植物生理生化实验技术[M]. 沈阳: 东北农业大学, 1993. 29—131.
- [5] 钟庆辉. 烟草化学基本知识[M]. 北京: 轻工出版社, 1985. 110—119.
- [6] 郭月清, 刘国顺, 杨铁钊, 等. 烟草栽培技术[M]. 北京: 金盾出版社, 1995.
- [7] 徐淑芬, 史芝文, 白宝璋, 等. 烟草栽培与病害防治[M]. 黑龙江: 黑龙江人民出版社, 1995. 1—144.
- [8] 王 贵, 王庆君, 尚庆昌, 等. 八个烤烟品种(系)特性比较试验[J]. 烟草科技, 1995, (4): 38—40.
- [9] Potrykus I. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer[J]. Mol Gen Genet, 1985, 199: 169—172.
- [10] Guang Yu-Zhou. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Methods in Enzymology, 1983, 101: 433—448.
- [11] Ledoux L. Uptake of DNA by living cells[J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1965, (4): 231—267.
- [12] 周光宇. 植物分子育种的兴起与展望, 农业分子育种研究进展[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1993. 1—6.
- [13] 周光宇. 远缘杂交的分子基础—DNA 片段杂交假设的一个论证[J]. 遗传学报, 1979, 6(4): 405—413.

## A Preliminary Study by Using Seed Soaking Method of Introduce Exogenous DNA to Induce the Genetic Characters in Flue-cured Tobacco( II )

ZHU Sheng-wei<sup>1</sup>, XU Zhong<sup>2</sup>, ZHANG Han-shuang<sup>3</sup>, SHI Zhi-wen<sup>2</sup>

(1 Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100093, China; 2 Northeast Agricultural University,

Harbin 150030, China; 3 Cotton Institute, Heibei Academy of Agricultural and Forestry Sciences,

Shijiazhuang 050031, China)

**Abstract:** In this experiment, the variant materials obtained by seed soaking method were tested for biochemical indices such as chlorophyll, soluble sugar, reducing sugar, protein and Vitamin C contents, as well as plant height, plant type, leaf area and growth period. The results showed that plant height, plant type, leaf area, growth period and disease resistance were significantly affected. However, the contents of chlorophyll, soluble sugar, reducing sugar, protein and Vitamin C were not. The method has the advantages of high ratio of variation (21.2%), easy to operate, and the separations stabilize quickly.

**Key words:** Flue-cured tobacco; Seed soaking method; Exogenous DNA Introduction; Variance