

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

朱生伟

张寒霜

(中国科学院植物研究所, 北京 100093) (河北省农林科学院棉花研究所, 石家庄 050031)

徐 仲 史芝文

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘 要 针对严重威胁烤烟大田生产的赤星病病害, 培育抗病品种。以烤烟品种 Nc89 为受体, 具有选择标记性状的 Cv87 为供体, 采用浸种法将供体总 DNA 导入受体, 获得具有目的性状的变异材料。实验结果表明: 该方法可有效转移株高、株型、叶色、叶面积、生育期及抗病性等性状, 并获得了较高转化率(21.2%)。

关键词 烤烟 赤星病 浸种法 外源 DNA 导入 变异

中图分类号 S572.035 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7091(1999)增刊-0107-05

烟草是重要的经济作物之一, 在世界范围内广泛种植。随着烟草赤星病病害发生的逐年上升, 该病害已成为影响烟草生产的一个限制因子, 给烟叶生产带来了巨大的经济损失^[1]。传统的常规育种方法在烟草品种繁育及改良中发挥了巨大的作用, 但远缘杂交的不亲合性, 及其过程的繁杂与缓慢特性阻碍了育种工作的深入开展。外源 DNA 直接导入作物的研究, 自 70 年代开始, 已在棉花、水稻、小麦、大豆、玉米、高粱等作物上取得了较好的进展^[2]。在烟草方面, 外源 DNA 直接导入仅有花粉管通道法的应用报道^[3, 10~12]。本研究的目的是利用浸种法将外源 DNA 直接导入烤烟, 研究烤烟某些性状转化的可能性, 以探索烤烟育种的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

供试品种有: Cv87, 株型筒形, 叶片椭圆形, 叶色浅绿, 株高 120 cm 左右, 优质, 早熟(110 d), 高抗赤星病、花叶病; Nc89, 株型塔形, 叶片长椭圆形, 叶色深绿, 株高 110 cm 左右, 优质, 早熟(110~120 d), 易感赤星病, 较耐花叶病。由东北农业大学农学院烟草教研室提供。

1.2 方法

1.2.1 供体 DNA 制备 供体 DNA 的提取、纯化、检测方法参见文献[4]。从幼嫩烟草叶片中提取、纯化所得总 DNA 溶于适量 1×SSC 溶液中, 于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 供体 DNA 导入 将受体 Nc89 种子用 1.0% 硫酸铜溶液浸种 10 min, 用清水将药液冲洗干净, 在温水(20~25℃)中浸泡 12 h, 取出搓种, 于 25℃~28℃ 恒温箱内催芽。每天换水

两次,直至“露白”。

取“露白”种子 60 粒,用浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 供体 DNA 浸泡 36 h,播种。对照(1)使用受体“露白”种子不经任何处理,对照(2)使用 $1\times\text{SSC}$ 缓冲液同样条件下处理,经过假植、定植、移栽到栏内盆中,在烤烟生长过程中,不打顶,其他管理措施同一般大田,筛选变异,成熟后各单株分收。

1.2.3 检测 表型检测:植物田间农艺性状是进行品种选育最基础,最直接的依据。本试验从株高、株型、叶片颜色、叶面积、生育期及抗病性等田间农艺性状。对处理烟株进行筛选,淘汰劣杂,保留表型良好烟株,挂牌,成熟后各单株分别采收种子。

赤星病抗性检测:使用接种离体叶片法^[5],采用六级分级标准,调查发病率及病情指数。

(1)接种体制备:赤星病菌由东北农业大学农学院植病教研室提供,以无菌的 1% 葡萄糖溶液配成悬浮液,调节孢子浓度至 1.0 $\mu\text{L/L}$ 备用。(2)接种方法:从烟株(成苗期)采下的叶片(直径 110 mm),浸入饱和漂白溶液约 15 min,后用无菌水冲洗三次,置含适量 MS 营养液的 120 mm 培养皿中,按悬滴法在其表面上接 7 滴赤星病悬浮液。于 25~28℃ 温度下透光保湿培养,7 d 后计测叶片发病率,并记录病级。

同工酶检测:采用薄层垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[6],对花期不同处理的变异株腰叶进行过氧化物酶及酯酶同工酶检测。浓缩胶浓度 3.1% (pH6.7),分离胶 7.5% (pH8.9),电极缓冲液为 Tris-Gly (pH8.3),点样量 60 $\mu\text{L/孔}$,电流 2~3 mA/孔,历时 3~4 h,采用联苯胺法染色,7% 醋酸溶液固定,照相。

2 结果与分析

2.1 外源 DNA 导入后引起烤烟田间农艺性状变异

浸种处理 60 粒,成苗 52 棵,成活率 86.7%。对照(1)和(2)未出现变异,而使用浸种法导入 Cv87DNA 的处理,后代出现了变异,变异率分别达到 21.2%,由此看出,采用浸种法处理其变异率较高(表 1)。经过外源 DNA 浸种后,处理在当代(D_0)即出现变异,主要表现在株高、株型、叶片颜色、叶面积大小,生育期及抗病性等方面(表 2)。

表 1 当代处理烤烟出现的变异率

处 理 组 合		处理株数	变异株数	变异率(%)
Nc89	未处理	67	0	0
Nc89 + $1\times\text{SSC}$	浸种	50	0	0
Nc89 + Cv87DNA	浸种	52	11	21.2

外源 DNA 导入后,当代处理烤烟即表现出多种性状变异。在处理中,株高性状表现出高秆与矮秆差异(大于 10 cm);生育期出现早熟(提早成熟 5~14 d)和晚熟(推迟 5~7 d)的变异。株型出现了塔型和筒型变异。在抗病性方面,对照不发病株数为 0,而处理不发病株数为 3。从中可以推测,供体 DNA 可能导入受体基因组中,从而可以排除由于供体 DNA 起有激素作用所致的看法。

表 2 当代处理烤烟出现的变异性状

处理	变异株数		株高(cm)		株型	颜色	生育期		抗病性	叶面积(cm ²)	
	总数	株数	高	矮			早熟	晚熟		较小	较大
浸种	11	1		+	+	+	+		+		+
		2			+	+	+		+		+
		3	+		+		+			+	
		2		+	+	+	+				
		3		+		+		+			+

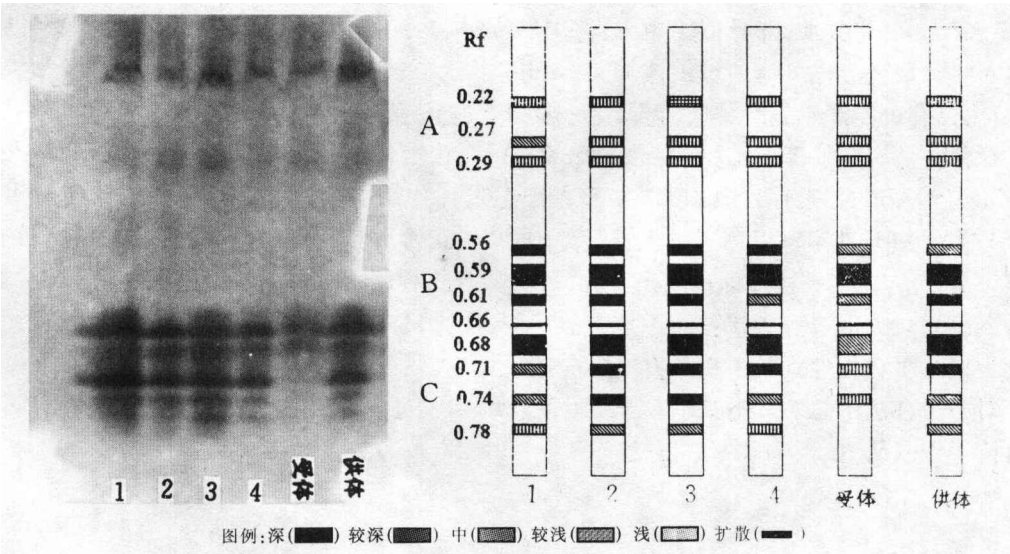
2.2 赤星病抗性检测

采用离体叶片法接种,3 d后叶片即有病变迹象发生。最初叶片边缘 2~3 cm 内失绿变黄;随后接种位点产生病斑,同时伴随整个叶片的黄化;最终接种位点变成枯死斑,严重者各枯死斑相联而叶片枯死。接种 1% 葡萄糖液的对照叶片均不发生病变(表 3)。

表 3 离体叶片接种赤星病菌后的发病情况

材 料	离体叶片数	发 病 株 数						病情指数
		0	1	2	3	4	5	
JZ96004	10		2	6	1	1		42
JZ96005	10	2	2	6				28
JZ96027	10	1	3	4	1	1		36
NC89	10				2	7	1	78
CV87	10	1	3	6				30

注:0~1 级:高抗;2 级:抗;3 级:感;4~5 级:高感。 病情指数 = $\sum(\text{病情指数} \times \text{该级病叶数}) \times 100 / \text{总叶片数} \times 5$



1. JZ96004 2. JZ96005 3. JZ96027 4. JZ96001
图 1 浸种处理株过氧化物酶同工酶谱带分析

从表 3 可以看出,浸种处理病指比受体有所降低,除 JZ96005 外,其余的病指介于受、供体之间。在 D₁ 抗病性状即发生分离(而常规育种在 F₁ 个体间表现杂合一致)。

2.3 对当代烟株同工酶分析

过氧化物酶在植物机体防御中起重要作用,可用来作为烟草品种抗赤星病的生化指标^[7]。试验对当代(D₀)处理烟株,经过表型、抗病性筛选后,对其进行过氧化物酶同工酶谱分析。

从图1可以看出,浸种处理1、2、3、4号烟株的过氧化物酶同工酶谱带根据Rf值不同划分为A、B、C三区。1、2、3、4号株谱带数与供体(11条)相同,均比受体(10条)多Rf 0.78酶带,2号株Rf 0.22谱带比3号株相应谱带颜色较深其余谱带相同,1号株Rf 0.56、Rf 0.59、Rf 0.61、Rf 0.68谱带均比受体相应酶带深。4号株Rf 0.56、Rf 0.59、Rf 0.68、Rf 0.71谱带颜色均比受体相应酶带颜色深。

1、2、3、4号株是从浸种处理中,经表型、抗病性筛选得到的变异植株,它们的性状差异在酶谱上也得到反映。在进行过氧化物酶同工酶试验中,选择在花期对变异株叶片进行酶谱分析,其重复性非常高,其中最显著的差异是Rf 0.78谱带的有无及一些谱带颜色深浅的变化,植株抗病与否可能与控制这些谱带的基因有关。

2 结论与讨论

从试验结果可以看出,浸种法可有效转移生育期、株高、叶色、株型及抗病性等性状,变异率高达21.1%。从中选出三棵符合实验目的变异植株,变异率为5.8%。我们通过表型、抗性、同工酶等检测,也都得到了肯定结果。

同时,对对照(1)、对照(2)也进行了性状观察,没有发现变异。烟草属自交作物,天然杂交率和自发突变的机率都很低。在试验中采取了一些相应措施尽量保证处理水平一致性,如施肥、灌水等。由此看来,变异似确由外源DNA导入所引起。变异的发生可能通过受、供体间基因的同源重组。也可能通过供体DNA片段插入到受体基因组中,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。

浸种法是应用外源DNA溶液浸泡发芽种子,在当代植株上即表达外源DNA导入的影响,外源DNA通过发芽种子的顶端生长点细胞发挥作用^[7]。该方法当种子萌动时就可以用外源DNA处理,甚至可以用干种子进行处理^[8],按正常育苗程序进行,而且效果也比较显著,变异率高达21.2%。当代即表现出变异,可直接获得种子,对其后代的生产价值进行考察,使实验室研究与大田选育直接挂钩。该方法简便,快捷,易于掌握,单、双子叶植物都可应用。我们认为该技术在抗性育种上更具有实际应用价值。

对于浸种法中总DNA如何穿越细胞壁及细胞膜进入受体生长点细胞和实现遗传转化,尚有待于深入研究。

参 考 文 献

- 1 黄海棠等.平原烟草赤星病发生规律、损失估计及防治研究.河南农业大学学报.1992(增刊):73~78
- 2 陈启峰等.论DNA直接导入植物——一项育种新途径的建立与评述.福建农业大学学报.1993,22(1):1~11

- 3 吴中心 等. 外源 DNA 导入转移烟草抗赤星病性状的研究. 河南农业大学学报. 1995, 29(1): 71~75
- 4 朱生伟 等. 快速提取烟草 DNA 的方法. 东北农业大学学报. 1998, 29(3): 275~278
- 5 郭永峰. 烟草赤星病抗性鉴定新方法. 中国烟草, 1995(3): 44~47
- 6 胡能书 等. 同工酶技术及应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985
- 7 陈惠明 等. 烤烟感染赤星病后 4 种酶动态研究. 云南农业大学学报, 1995, 10(1): 1~5
- 8 周光宇. 植物分子育种的兴起与展望. 见: 农业分子育种研究进展. 北京: 中国农业科技出版社, 1993. 1~6
- 9 于元杰 等. 应用植物分子育种技术选育小麦种质系. 见: 麦棉分子育种研究. 成都: 四川科学技术出版社, 1995. 1~5
- 10 Caligari P D S, *et al* . Gene transfer in *Nicotiana rustica* by means of irradiated. *Heredity*, 1981, 47(1): 17~26
- 11 Engvild K C. Pollen irradiation and possible gene transfer in *Nicotiana* species. *Theor Appl Genet*. 1985, 69(5/6): 457~462
- 12 Jinks, J L, *et al* . Gene transfer in *Nicotiana rustica* using irradiated Pollen. *Nature*. 1981, 291(5816): 586~588

A Preliminary Study on Using Germination Seed Soaking Method to Induce the Genetic Characters in Flue-cured Tobacco

Zhu Shengwei

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100093)

Zhang Hanshuang

(Cotton Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031)

Xu Zhong Shi Zhiwen

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract This research was aimed at cultivating disease-resistant varieties. In this experiment, the method of germination seed soaking was used to study the way of exogenous DNA introduction into flue-cured tobacco with Cv87 as the donor and Nc89 as the receptor. By means of phenotype, disease-resistance and isozyme test, disease-resistant variation materials were selected. The result showed that exogenous DNA introduction could effectively transfer the character of plant height, plant type, leaf area, growth period and disease resistance, meanwhile obtained higher transformation ratio (21.2%). Its operation rule was simple, and it was proved an effective method.

Key words: Flue-cured tobacco; *A. alternata*; Germination seed soading method; Exogenous DNA introduction; Variation