

• 遗传快报 •

从感染黄瓜花叶病毒的烟草叶筛选抗病毒细胞突变体^①

陈廷俊^②

(合肥经济技术学院原料学系, 合肥 230052)

摘要 用绿岛法从感染 CMV 的普通烟草(G140)叶筛选到抗病毒细胞突变体 R_{CMV-2, 6}, 其当代无性系群体病情指数较对照降低 41.5~45.2%。

关键词 烟草, 绿岛, 抗 CMV 细胞突变

Selection of Virus-resistant Cell Mutants from CMV-infected Tobacco Leaves

Chen Tingjun

(Department of Leaf Tobacco Science, Hefei Institute of Economics and Technology, Hefei 230052)

Abstract The 2 CMV-resistant-cell mutants, R_{CMV-2, 6}, were selected by using the method of culturing dark green island from CMV infected tobacco (*N. tabacum* cv G140) leaves. The disease index of R_{CMV-2, 6}'s was decreased by 41.5~45.2% in comparison with that of the control(G140).

Key words Tobacco, Dark green island, CMV-resistant-cell mutants

黄瓜花叶病毒(简称 CMV)有植物界的“流感”与“癌症”之称,迄今无有效防治方法。裘维蕃指出^{〔1〕},筛选抗性细胞突变体可能是抗病毒的有效途径之一。Carlson^{〔2〕}曾设想,如果将植物的叶片比作培养皿,则经诱变处理过叶片上的亿万个叶肉细胞及其克隆就是该器皿中的选择培养基,一定条件下病原物可以在上面侵染危害或遭到抵抗而呈现“绿岛”(正常深绿色区域),截取绿岛进行组织培养并再生完整植株,很可能就是我们所需要的抗性突变。据此作者开展了烟草抗 CMV 细胞突变体筛选的研究并取得初步结果。

1 材料与 方法

1.1 供试品种

普通烟草(*N. tabacum* L.)品种 G140,系我院烟草育种室提供,连年套袋自交留种,用当年收获 6 月后种子,常规方法灭菌后播于经高压灭菌过的钵土中,防虫温室栽培,4~6 叶期接种 CMV。

1.2 供试毒源及其保存

①国家自然科学基金资助项目。

本工作进行中曾得到中国科学院植物所王敬驹教授的鼓励与指导,顺致谢忱。

②陈廷俊,男,55岁,大学毕业,副教授;专业方向为遗传学教学与科研。

CMV 强优势株系由中国科学微生物研究病毒室惠赠。在严格隔离条件下,待烟苗发病后截取病株茎节,常规方法进行表面灭菌后植于 1/2 MS 无机盐固体培养基,使腋芽萌生成苗,以后每 40~70 天选取具有典型感 CMV 症状的试管烟苗转管 1 次;36 月后按常规方法⁽⁵⁾制作病叶超薄切片作透射电镜观察,检查病毒纯度。

1.3 临界选择压的确定

于烟苗 4~6 叶期按常规摩擦法接种 CMV 后分别置不同温度、光照、营养等条件下(每处理 30 盆),定期观察记载病情,以寻找一个使病株叶片全部畸变退绿的临界条件。

1.4 烟苗诱变

烟苗 3~4 叶期在毒气橱中用脱脂棉包住心叶,每 2h 滴注一次新配制的 0.3% EMS,连续 4 次。

1.5 绿岛培养

用前文⁽³⁾已报道的方法。

1.6 突变体对 CMV 的抗性鉴定

截取突变体当代带叶茎节沙床快繁⁽⁴⁾,使每个株系达 25~30 株,4 叶期接种 CMV 后置 $28 \pm 2^\circ\text{C}$,自然光照条件下使其充分发病,按田波⁽⁵⁾的方法调查单株病级并计算病情指数,比较其与亲本对照间的差异。

2 结果与讨论

2.1 试管烟苗保存 CMV 的效果

CMV 在 G140 试管烟苗上经 24 次继续繁殖,历时 42 月。这段时间内作者先后 12 次取毒源接种带枯斑基因的三生烟或 G140 盆栽烟苗,病株率均在 91.5~100% 之间,且症状典型,未见枯斑反应,表明无 TMV 污染;透射电镜观察,未见异常,与前人报道一致⁽¹⁾。结果说明采用试管烟苗保存 CMV 纯度可靠,活性正常。

CMV 一般常采用盆栽烟苗来繁殖和保存毒源。但是能够侵染烟苗的病毒种类和途径很多,易导致毒源混杂。前人⁽⁵⁾曾试图用愈伤组织或原生质体来繁殖和保存病毒,但效果均不够理想,因为:(1)烟草外植体在形成愈伤组织的过程中往往有脱毒作用;(2)在原生质体或愈伤组织的培养过程中有较高频率的变异,一个变异了的细胞通过对环境的适应往往可以取代原来的类型,可能导致毒源丢失。对试管烟苗来说,体细胞变异只占局部,总体遗传性十分稳定,所以我们采用的试管苗保存毒源技术是一个理想的 CMV 保存繁殖体系。

2.2 CMV 侵染后烟叶上的绿岛形成规律

接种 CMV 后的 G140 烟苗分别置不同温度、光照、营养条件下定期观察病情变化,结果如下:

(1) 每日 6h 以上的自然光照、 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 、适光增施氮肥的条件下,4 叶期接种,最适合 CMV 的侵染与烟苗发病。

(2) 有 3 种类型的叶片: a. 正常叶片; b. 畸变退绿的病叶上有数量、大小分布不等的绿岛; c. 叶片全部畸变退绿(图 1)。

(3) 在 2.2.1 的条件下,4 叶期接种 CMV,烟苗发病后 1~4 位叶正常,5 或 6 位叶全部畸变退绿,没有绿岛(图 1),其余叶片为 a、c 两种类型。重复性极好,很有规律,这就为用绿岛法筛选抗 CMV 突变体提供了理想的临界选择压力。



图1 特定叶片全部畸变退绿

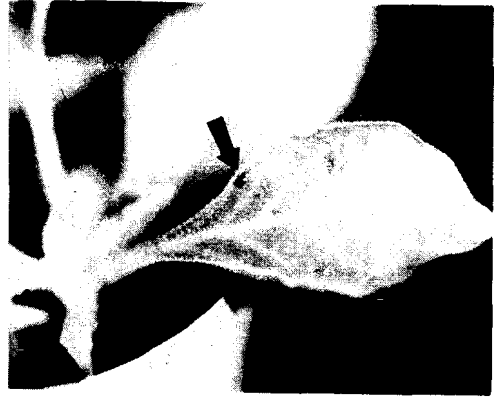


图2 全部畸变退绿的叶片上只有1个绿岛

2.3 抗 CMV 细胞突变体的选择

将3~4叶期经0.3%EMS诱变处理、4叶期接种CMV的G140烟苗置2.2.1的条件下使其充分发病,40~45天后从892株病烟上得到1240张全部畸变退绿的病叶,其中118张叶片上有1~2个绿岛/叶(图2)。取绿岛培养获得98株无症状烟苗。移栽钵钵后第7天接种CMV,45天后得6株无症状烟苗。分别取其带叶茎节连续2次沙床快繁,得到6个株系的烟苗,于网室中再接种CMV。鉴定结果表明,与原亲本相比,除 R_{CMV-1} 外,其余5个株系均表现一定抗病性,其中 R_{CMV-2} 、6较好(表1),病指较对照低41.5~45.2%,当代均正常开花结实,并稳定传递到 M_2 代,但 M_2 中抗病性出现分离,进一步研究工作正在进行中。

表1 抗CMV细胞突变系当代抗性鉴定结果

处 理	植 株 数	接种CMV后45天病情	
		病株率(%)	病指(%)
对照(原亲本)	30	100	45.2
R_{CMV-1}	31	100	44.7
R_{CMV-2}	27	7.4	3.7
R_{CMV-3}	28	100	25.0
R_{CMV-4}	25	100	30.2
R_{CMV-5}	25	100	32.3
R_{CMV-6}	24	0	0

参 考 文 献

- 1 裴维蕃. 植物病毒学. 北京: 科学出版社, 1985, 32
- 2 Carlson P S. 植物遗传工程. 遗传, 1983, 5(2): 45~47
- 3 陈廷俊等. CMV侵染的烟草叶片绿岛组织培养. 安徽农业大学学报, 1992, 19(4): 313~315
- 4 陈廷俊等. 烟苗茎节无性繁殖及其遗传稳定性研究. 安徽农业大学学报, 1993, 20(增刊): 34~37
- 5 田 波, 裴美云编. 植物病毒研究方法. 北京: 科学出版社, 1987, 295~307
- 6 中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译. 植物组织和细胞培养. 上海: 上海科学技术出版社, 1987, 190~213

1996-11-12 收稿, 1997-01-02 修回.