

烟草突变体筛选与鉴定方法篇：

2. 烟草抗主要病虫害突变体的筛选与鉴定

申莉莉

(中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101)

参照烟草品种抗病性鉴定标准 GB/T 23224—2008, 烟草基因组计划重大专项“烟草突变体创制、筛选与分析”建立了烟草抗病毒病、青枯病、黑胫病、赤星病、烟蚜的高通量筛选方法, 将全面开展烟草抗主要病虫害突变体的大量筛选与鉴定工作。

1 抗主要病虫害突变体的高通量筛选

烟草品种抗病虫鉴定多采用温室苗期人工接种鉴定, 在品种推广前再经大田成株期鉴定。面对庞大的突变群体, 选择一种快速、准确的筛选方法是获得有益抗性突变体的核心。

1.1 病毒病

烟草病毒病抗性筛选主要采用田间病圃系统调查和温室苗期接种两种方法。通过对常规汁液摩擦接种、衣刷快速摩擦接种、喷枪接种和剪叶接种以及逐株调查病情、目测病情、ELISA、检测试纸条和 RT-PCR 等病毒检测方法比较发现, 刷接目测病情法省时省力且能准确反应品种抗性。即用塑料衣刷蘸取病毒汁液轻轻摩擦叶片接种, 根据每批次抗感品种的病情划分病害严重程度, 目测每个突变材料(盘)病情。

1.2 青枯病

烟草青枯病抗性筛选有田间病圃筛选和室内苗期接种筛选。苗期筛选接种方法主要有伤根灌菌法、菌液浸根法、茎部穿刺法、叶片注射法。烟草青枯病菌是从根部伤口侵入, 引起微管束变褐, 植株萎蔫, 为典型的微管束病害。经剪叶接种和茎枝菌液浸泡接种研究表明, 茎枝菌液浸泡法发病快, 幼苗抗病性与田间抗性一致, 易操作。即用手术刀垂直切取带有 3~4 片展叶的主茎, 标记、浸于盛有青枯病菌菌液的容器内 5 d, 逐茎调查病情。根据抗感品种发病期和病情, 划分突变材料病害严重程度。

1.3 黑胫病

烟草黑胫病抗病性筛选有田间病圃筛选、室内接种筛选和离体叶片接种筛选 3 种方法; 苗期筛选又分为根接种和茎接种, 根接种的接种体有孢子悬浮液和菌谷两种。用烟草黑胫病菌粗毒素浸种, 经发芽率、根冠细胞、叶片和电解质渗透等测定法比较发现, 经粗毒素浸种, 种子发芽率与抗病性呈正相关, 且与大田抗性表现一致。试验占空间少, 周期短(15 d)。即用无菌毒素液浸泡种子 4~8 h, 选取饱满的种子置于无菌的水琼脂培养皿平板上保湿培养, 于 25 °C 培养箱中促其萌发, 测定发芽率。

1.4 赤星病

烟草赤星病抗性筛选有大田筛选、温室筛选、离体叶片筛选和毒素筛选。根据毒素作用部位的不同, 又分为离体叶片法、幼苗浸根法、种子根处理法等。而离体叶片法又分为悬滴法、喷雾法和针刺法^[1]。烟草不同品种对毒素的敏感程度与对病原菌的敏感程度密切相关, 经不同抗感品种幼苗用赤星病菌毒素浸根

研究发现,根长与抗病性呈正相关,与田间成株期抗性基本一致。即将每个突变材料2~3真叶期幼苗10~15株放入盛有赤星病菌无菌粗毒素稀释液的容器中浸根,25℃培养6d,测量根长。

1.5 烟蚜

烟蚜抗性筛选有常规苗期筛选和大田成株期筛选,也可根据植株受害症状等感官特征判定抗性。不同抗感品种苗期接蚜,通过蚜量比值法和模糊识别法研究显示,蚜量比值法能客观地比较所参试材料的抗感差别,消除蚜虫不均匀分布带来的误差。温室苗期蚜量比值法,即温室育苗,再自然感蚜或接蚜,于烟蚜盛发期逐株调查烟蚜数量。根据蚜量比值划分抗性,其中蚜量比值=某突变材料的蚜量/全部观测材料的平均蚜量。

2 抗主要病虫害突变体的鉴定

烟草植株的各种性状均受染色体上的基因控制。基因突变可通过田间表型、细胞组织学、生物化学、蛋白质组学呈现,最终经基因定位鉴定突变。

对上述通过正筛选体系获得的抗病虫突变材料,经连续2年种植鉴定,剔除环境影响和差异不明显株系,获得可遗传变异的突变体,以野生型中烟100及其他抗感品种为对照,进行鉴定。

2.1 田间表型鉴定

结合田间(自然)和温室(人工接种),对抗病虫突变材料进行至少2年以上(多点)的表型抗性鉴定。

2.2 细胞组织学鉴定

抗病虫突变材料经自然感病虫或人工接种,用电镜技术观察其组织病理学特征,进行细胞组织学鉴定^[2]。

2.3 生物化学鉴定

通过自然感病虫或人工接种,抗病突变材料用气相色谱(GC)检测水杨酸(SA,信号调节因子)水平,抗虫突变体用GC检测茉莉酸(JA,信号调节因子)或烟叶分泌物中 α,β -黑松三烯二醇(DVTS,吸引烟蚜产卵)水平,进行生物化学鉴定^[3]。

2.4 蛋白质组学鉴定

烟草品种的抗病虫性是一个复杂的信号转达和生理调控网络,以蛋白质差异表达的形式反馈^[2]。借助蛋白质双向电泳联用质谱技术,鉴定抗病虫突变材料与野生型及其他抗感品种的蛋白质组表达差异。

2.5 突变基因鉴定

2.5.1 突变体的遗传分析 突变体与野生型杂交,鉴定 F_1 抗感性以确定显隐性突变,分析 F_2 抗感分离规律,确定突变基因数目^[4-5]。质量性状突变符合孟德尔3:1遗传分离规律,多由一对(单)隐性核基因控制。数量性状突变为多基因控制,抗性突变呈连续累加效应。

2.5.2 突变基因定位 构建 F_2 定位群体,利用RFLP、SSR、RAPD、SNP等分子标记和混合群体分组分析法(BSA),对 F_2 分离群体和抗病虫突变体的目标基因(抗病虫)进行连锁分析,筛选出与目标基因紧密连锁的分子标记。根据 F_2 定位群体的表型和分子标记的分离数据构建目标基因所在区域的分子标记连锁图^[6-8]。

在连锁的分子标记附近设计新的分子标记,用高通量 DNA 提取方法提取大批 F₂ 遗传群体中的突变体单株 DNA,对这些植株进行基因型分析,通过遗传作图、筛选基因组文库、染色体步移等获得突变基因^[9]。

2.5.3 突变基因功能互补验证 以野生型中烟 100 和突变体为材料,经等位基因敲除和过表达技术,观察抗病虫突变性状变化,最终确定某一抗病虫突变体。

参考文献

- [1] 刘化冰,张小全,尚晓颖,等.烟草赤星病抗病性鉴定方法研究进展[J].中国农学通报,2009,25(21):261-265.
- [2] Aranjuelo I, Molero G, Erice G, et al. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. J Exp Bot, 2011, 62(1): 111-123.
- [3] Brodersen P, Petersen M, Bjorn Nielsen H, et al. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4[J]. Plant J, 2006, 47: 532-546.
- [4] 黄建昌,肖艳,夏有杰.番木瓜抗病突变体抗 PRSV 基因的 RAPD 标记分析[J].仲凯农业工程学院学报,2009,22(2): 1-4.
- [5] 尹静,王广金,张宏纪,等.小麦突变体 D51 抗秆锈病遗传分析及其抗性基因 SSR 标记[J].作物学报,2007,33(8): 1262-1266.
- [6] 张帆涛,方军,孙昌辉,等.水稻矮秆突变体 dt11 的分离鉴定及其突变基因的精细定位[J].遗传,2012,34(1): 79-86.
- [7] 向珣朝,李季航,张楷正,等.一个水稻抗纹枯病突变体的遗传分析及其基因的初步定位[J].西南科技大学学报,2007, 22(2): 76-81.
- [8] CHE K P, ZHAN Q C, XING Q H, et al. Tagging and mapping of rice sheath blight resistant gene[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106(2): 293-297.
- [9] Mori M, Tomita C, Sugimoto K, et al. Isolation and molecular characterization of a Spotted leaf 18 mutant by modified activation-tagging in rice[J]. Plant Mol Biol, 2007, 63(6): 847-860.