

烟草种间体细胞杂交育成新品系^①

龚明良 卜锅章 丁昌敏

中国烟草总公司青州烟草研究所

摘 要

1980年通过原生质体融合获得普通烟草与黄花烟草(*N. tabacum*+*N. rustica*)、普通烟草和粉蓝烟草(*N. tabacum*+*N. glauca*)种间体细胞杂种植株,对其后代连续9年进行遗传性状观察和选育。结果表明:杂种一代呈典型的双亲中间型,杂种三代和回交二代开始分离,也有一直不分离的稳定株系和雄性不育株系,杂种后代育性差,回交能转育并逐步累积轮回亲本性状,染色体数目逐渐减少;在杂种后代选育中,获得了抗黑胫病、耐CMV并且具有天然优质香味的新品系和一些具有特殊利用价值的稳定株系。

近年来,国内外植物体细胞杂交的研究已获得约80多个组合的种内、种间、属间杂种植株。然而有关体细胞杂种后代的遗传性状观察和选育方面报道不多。1981年以来,我们对普通烟草与黄花烟草^[2](简称TR)、普通烟草与粉蓝烟草^[3](简称TG)两组合的体细胞杂种自交和回交后代进行遗传性状观察和选育,初步选育出有一定应用价值的烟草新品系,把体细胞杂交工作向生产应用推进了一大步。

1 材料和方法

1.1 材料

普通烟草(*N. tabacum*.L.): 革新一号 Speight G-140

黄花烟草(*N. rustica*): 黑老虎

野生烟: 粉蓝烟草(*N. glauca*)

1.2 原生质体融合技术

1.2.1 原生质体制备 供试验用的烟草种子,播种和移栽于温室内,当烟苗进入旺长期前后,取上部功能最强的全展叶片。经洗涤和置培养室内稍萎蔫后,用70%酒精消毒15分钟,迅速撕去下表皮,漂浮在混合酶液上降解原生质体,酶液组分为:2% (W/V) onozuka R-10; 0.5% (W/V) Macryrozyme R-10; 0.2% (W/V) 葡聚糖硫酸钾; 5mM CaCl₂·2H₂O; 0.7M 甘露醇; pH5.8。通过0.4μm的微孔过滤器,抽滤灭菌。将含有叶肉的酶液放置在28℃培养箱,静置培养4—6小时后,便可释放许多园形的、绿色的、单个分离的原生质体,用赛氏过滤器(内附孔径240目的不锈钢网),滤去残渣,将两种原生质体按1:1的比例混合后,再低速离心洗涤,洗涤3次,获得纯化悬浮的烟草原生质体,制备5%的原生质体悬浮液大约 5×10^5 /ml原生质体,洗液组分为:0.7M甘

①本文作者还有姚绍满、张历历。

露醇: $5\text{mM}\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $1\text{mM}\text{KH}_2\text{PO}_4$; $\text{pH}5.8$ 。

1.2.2 诱导融合 将洗涤好的原生质体混合液用吸管移在直径 6cm 的表面皿上, 进行融合处理; 每皿滴入 6—10 滴原生质体混合液, 让其自然沉降 5 分钟, 在其周围缓慢加入等量的 50% (W/V) 聚乙二醇 (PEG), 处理 15 分钟; 再加入等量的高钙、高 pH 溶液处理 10 分钟, 高钙、高 pH 液组分为: $55\text{mM}\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.375% (W/V) GLY; 9.1% (W/V) 甘露醇, $\text{pH}10.5$ 。紧接着用洗液冲洗 3 次, 再用 NT-6 培养基冲洗 2 次, 最后加入 0.5ml NT-6 培养基, 即可进行培养。

1.2.3 融合体培养和分化 融合体培养, 根据 Nagata 和 Takebe (1971) 的培养基稍加修改后的 NT-6 培养基^[2]提高 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 到 1000mg/l ; 降低 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 740mg/l ; 提高 VB_1 到 10mg/l , 并添加甘氨酸, VB_6 椰乳, 三碘苯甲酸、玉米素。

融合体培养 15 天, 加入等量的 NT-7 培养基以保持相对稳定的 pH 的充足的养分, 促进小细胞团迅速生长。NT-7 与 NT-6 基本培养基相同, 只将蔗糖的浓度由 1% 提高到 2%, 不加甘露醇。再培养 15—20 天后, 肉眼可见细胞团, 长成小米粒或高粱粒大小时, 转移到固体培养基 NT-10, 进行芽分化培养。NT-10 培养基是以 NT-6 为基础, 无机盐类不变, 有机物质主要改动激动素和维生素的浓度, 将 IAA 改为 0.5mg/l , VB_1 、 VB_6 分别降为 2 和 0.5mg/l , 去掉椰乳和三碘苯甲酸, 外加水解乳蛋白 250mg/l , 碳原用蔗糖 2%; 琼脂 0.8%。经过芽分化培养出绿色的, 簇生的芽, 普遍没有根, 从试管直接转入土壤, 成活率很低, 必须进行根分化培养, 将芽从基部切下, 转移到附加 0.2mg/l IAA 的 Nitsch-T 培养基^[3]诱导根, 小苗生根后转移到土壤。

1.3 遗传性状观察和选育

以杂种植株的自交株系和用普通烟草回交的株系为材料, 以普通烟草 SpeightG-140 (北方烟区、区试对照品种) 为对照。单行区, 每行 24—30 株, 观察选育出优良单株, 对连续两年以上遗传性状稳定的株系进行产量、品质和抗性测定。

2 试验结果

2.1 体细胞杂种后代遗传性状观察

2.1.1 体细胞杂种及杂种后代生物学性状观察, 通过对融合杂种分析, 杂种植株可分三大类。

(1) 对称杂种类: 在两个组合 (TR、TG) 各发现 1 株, 如 TR_4 和 TG_{32} 杂种苗期叶片畸型, 叶脉不规则, 叶色浓淡不匀, 毛长而密; 成株后, 植物的形态、营养器官和生殖器官都呈双亲中间型, 雌雄蕊齐全, 有相当的育性, 正常花粉粒占 32%, 染色体是双亲之和, 分别是 96 和 72, 对其后代观察至第十代, 形态特征仍保持双亲的中间型, 稳定而不发生分离。

(2) 胞质杂种类: 在 TG 组合中, 得到 1 株 TG_8 , 其形态近似于普通烟草 (花红色、叶大而无柄) 染色体数 $2n=48$, 雄性器官退化, 无花药或花药中无花粉粒, 或者柱头花丝不等长、自交不实, 用普通烟草或粉蓝烟草的花粉与之授粉都能结果, 用普通烟草回交后代不发生分离。

(3) 非对称杂种: 这类植株出现的比率较大, 在植株形态上及营养器官或生殖器官有的象典型中间类型的杂种, 也有的偏向某一亲本的形态, 根尖染色体数, TG 组合大多数

在 46—64, TR 在 60—90, 这类杂种异常不稳定, 育性很低。对杂种自交与普通烟草回交各五个世代的连续观察, 其数量性状变异结果列于表 1, 性状分离情况主要表现如下。

表 1 体细胞杂种各世代与回交各世代变异系数 (C.V%)

项 目	杂种代数 SH	TR ₇	TG ₃₂	T	回交代数	TR × T	TG × T
株高	2	10.69	13.45	8.72	1	22.83	10.14
	3	23.58	35.45	6.27	2	12.69	13.16
	4	26.90	12.49	4.45	3	15.18	8.86
	5	22.13	14.15	13.74	4	8.72	7.19
	6	18.19	7.93	10.04	5	8.02	6.22
叶数	2	13.34	14.96	7.75	1	8.14	16.16
	3	25.60	36.29	5.32	2	12.70	8.17
	4	33.94	18.10	7.69	3	18.10	11.34
	5	24.76	22.76	5.11	4	5.27	5.01
	6	21.99	10.39	5.74	5	7.53	5.99
叶长	2	7.57	9.15	11.33	1	4.67	7.19
	3	14.01	15.15	4.35	2	15.90	14.63
	4	6.90	12.23	1.61	3	10.78	4.26
	5	23.47	16.16	8.30	4	7.16	7.49
	6	21.78	8.31	6.41	5	2.33	6.18
叶宽	2	10.56	8.77	15.22	1	9.40	11.60
	3	11.38	22.49	6.07	2	17.20	7.67
	4	11.87	14.03	3.42	3	13.09	8.47
	5	28.72	9.71	11.07	4	10.34	5.12
	6	25.59	12.78	11.16	5	16.61	9.03
侧翼宽	2	17.25	28.20	16.41	1	18.70	14.95
	3	50.90	111.23	11.16	2	22.00	17.64
	4	78.75	40.37	10.77	3	28.40	21.34
	5	71.79	42.81	22.18	4	34.30	6.29
	6	32.35	28.75	28.75	5	32.87	11.17

体细胞杂种二代和回交一代: 株系间植株形态基本整齐, 其变异系数大多数近似于亲本品种, 没有分离现象, 通过回交, 累加回交亲本的数量性状, 如同普通烟草回交, 则侧翼加宽, 叶片增大, 花冠颜色变红, 花冠筒增长。

体细胞杂种自交三代和回交二代: TR 和 TG 两组合出现分离现象, 从有分离的 TG 组合的花器官特征看大致可分近普通烟草的宽翼型和近粉蓝烟草的窄翼型。由表 1 的几个数量性状的变异系数可以看出, 侧翼的宽窄变异幅度最大, 其次为株高、叶数等。

体细胞杂种四代和回交三代: 继续分离, 分离现象变得更加复杂, 如 TR 组合的花器官分离为红花和黄花两种类型。从红花中选的单株其后代又分离出红、黄两种类型。叶型

的分离也有两种以上的类型，混播的株系分离类型更多。几个数量性状的变异系数变化和上代一样。

体细胞杂种五代和回交四代：两组合的分离现象同上代一样，继续分离，其分离的类型和复杂程度以及几个数量性状的变异系数除与上代相似外，从这一代开始，各株系生长整齐度出现不同情况，分离株系进入高度分离时期，分离类型多而复杂，没有发现生长整齐的的株系，而回交四代大多数仍然分离外，少数株系生长整齐，生长整齐的株系从大田长相看，同普通烟草几乎相差不大，两组合的株系中都有整齐类型出现。

体细胞杂种六代和回交五代：在杂种三代出现分离的株系至第六代仍为高度分离时期，这在有性杂交中尚属少见，回交株系中回交五代比回交四代有更多株系趋向稳定，但仍有较多株系继续分离。

2.1.2 体细胞杂种后代的育性 杂种后代的育性很低，但不同株系间稍有差异。各自交或回交后代结实性，各年度间表现不一，有提高也有下降，连续 3 年调查结果列于表 2。

表 2 杂种后代的结实性

杂种和亲本	单 株 产 果 数			单果种子数	千粒重(mg)
	1981	1982	1983		
TR ₄	105.0	151.0	75.67	257	186.3
TR ₁₃	108.0	9.86	45.33	121	150.6
TR13×T	极少	0.7	18.30		70.6
TR23×T	极少	0.7	31.60	34.68	83.6
TG7	10.3	3.5	18.10	131	40.0
TG13	28.7	10.7	27.6	211	70.6
TG32	25.7	4.5	13.30		
TG2×T	0	0			
P.T			107.1	1612	70.9
R			63.0	447	218.3
G			29.0	732	56.3

由表 2 可以看出，两个组合体细胞杂种植株的座果率有一定的差异，TR 组合座果较多，TG 座果较少，不论哪一个组合，蒴果小而瘪，种子量少，一般在 200 粒左右，只相当于普通烟草的 1 / 10。

用普通烟草初次回交座果率低，回交 2—3 次，有的座果率已接近轮回亲本，种子量亦与轮回亲本相当。

烟草种间体细胞杂种植株育性低的主要原因，根据我们观察是雄性器官发育不正常，花粉母细胞不能进行正常减数分裂，往往不能形成正常花粉粒，绝大多数是败育的花粉粒⁽¹⁾。

2.1.3 体细胞杂种后代的染色体数目变化普通烟草和黄花烟草的体细包染色体数都是 2n = 48，而体细胞杂种植株的染色体数是 60—90 多条，多数为非整倍体不是双亲染色体数之和，粉蓝烟草染色体数是 2n = 24，TG 杂种植株的染色体数多数是 36—72 条，其中

以 42—64 条之间者多,也多属非整倍体。自交世代保持非整倍性,各世代间有所波动; $TR_4(2n=96)TG_{32}(2n=72)$ 均为双亲之和,属双二倍体型的对称杂种,染色体数随自交世代的增加也不发生变化。杂种植株的回交世代,随着回交世代的增加,最后趋向轮回亲本的染色体数 $2n=48$ 。

2.3 体细胞杂种后代改良和新品系选育

几年来,通过对烟草种间体细胞杂种后代观察,杂种后代变异类型比较丰富,有的变异性状属于育种研究所希望的有利变异如粉蓝烟草高抗黑胫病和叶斑病能力,黄花烟草高尼古丁含量和粉蓝烟草低尼古丁含量,可在杂种植株中表现,但有些不良性状在杂种中也得到了表现,烟叶难变黄,烟叶烤后颜色暗,呈青褐色,缺乏油性;烟叶化学成分不协调,总糖、还原糖偏低,蛋白质含量偏高(表 3)。所以杂种植株不能直接利用,必须改进。

表 3 烟草体细胞杂种植株后代化学成份分析

材料	还原糖%	总糖%	尼古丁%	总氮%	蛋白质%	施木克值
TR54	12.18	16.96	2.52	3.01	16.08	1.06
TG7	8.12	9.32	0.41	2.89	17.89	0.54
TG13	5.00	5.46	0.37	2.40	14.58	0.37
大白筋 599	12.18	16.96	1.78	2.09	11.14	1.52
革新 一号	15.32	23.17	0.72	2.45	13.04	1.78

2.3.1 回交改良选育出烟草新品系 通过用综合性状表现较好的烤烟品种作轮回亲本回交的方法,逐步累积烤烟的优良性状,对烟叶品质进行改良,并提高其育性,能选育出一些遗传性状稳定、育性正常的株系。如对杂种 TR_{13} 用优质烤烟品种进行回交改良,获得了具有黄花烟草高尼古丁含量,高抗黑胫病,赤星病,花叶病轻,香气质好的烤烟香型新品系。

2.3.2 新品系特性 新品系具有广泛的抗性,如黑胫病连续三年鉴定试验都表现较高的抗性(表 4),新品系对烟草黄瓜花叶病病毒(CMV)表现有抗病能力,1989 年山东烟区由于干旱的影响,烟田普遍感黄瓜花叶病,据田间调查,新品系发病均较轻,说明新品系还对黄瓜花叶病有一定抗性,在南方烟区调查,新品系对烟草叶斑病有一定抗性,抗蛙眼病能力很强。

表 4 黑胫病抗性测定

材 料	病情指数%		
	1987	1988	1989
88—4	26.67	7.5	33.5
革新 3 号(抗病 CK)	0	12.00	38.50
小黄金 1025(感病 CK)	0.082	72.90	97.90

新品系经过连续两年产量、品质测定如表 5,产量、级指和产值均高于生产上推广对

对照品种 Speight G-140，每亩产量高 4.5%，级指高 18.2%，产值高 23.6%；1989 年在广西小面积示范，产量、品质、产值增高于当地对照品种（G-28）。

表 5 产量、品质测定

材 料	产 量 kg	级 指 %	产 值
88—4	124.2(+4.5%)	0.376(+18.29%)	130.176(+23.6%)
Speight G140 (CK)	118.8	0.318	105.8

烤后原烟色泽金黄或桔黄，油分足，组织细致，结构疏松，吃味醇和，香气量足，香气质好，燃烧性好，内在成分比较协调，糖碱比 5.6，达到了美国和加拿大等优质烤烟生产所公认的最佳比值范围，且有较高的尼古丁含量（表 6）。

表 6 烟叶化学成分

材料	还原糖%	总糖%	尼古丁%	总氮%	蛋白质%	施木克值	糖 / 碱
88—4	13.35	17.12	3.07	2.27	11.95	1.43	5.6
G-140(CK)	20.21	24.68	1.92	2.10	11.07	2.23	12.90

3 讨论

(1) 体细胞杂种与有性杂种之间的遗传差异；体细胞杂种与有性杂种比较，由于杂种形成时核内的遗传物质前者是以偶倍体、后者是以单倍体为单位参与结合的；胞质内的遗传物质，前者多为合二为一，而后者则以母性为主，因此体细胞杂种蕴有比有性杂交更丰富的遗传背景。

有性杂种在 F₁ 代遗传表现一致，F₂ 代分离，F₃ 代后性状逐渐趋于稳定；但体细胞杂种在杂种一代即有不同类型的表现，杂种二代的性状基本整齐一致，杂种三代开始分离，杂种六代以后，分离仍然继续。杂种后代的分离类型较有性杂种要多，分离的幅度呈“疯狂”型。

值得指出的是，在体细胞杂种后代中还有始终不发生分离的株系，这可能是体细胞融合时形成的异源基因组偶倍性的对称杂种，这种类型在 TG、TR 组合中均有出现，可称为新的生物类型^[4, 7]。

在 TG 杂种组合中，还有雄性不育的株系，保持十一代，雄性不育性的遗传仍然稳定。

由体细胞杂种后代的遗传行为和细胞学鉴定看出，体细胞杂种后代有遗传性相对稳定的偶倍性异源基因组的多倍体，有遗传性不稳定的非整倍体的多倍体类型，也有异体质核代换形成的新质核关系类型。从而造成体细胞杂种的分离和变异范围超越了有性杂种。

(2) 通过两个不同物种的原生质体融合，获得体细胞杂种，克服远缘杂种间的不新和性，扩大遗传重组的范围，增加变异，创造新的种质资源^[6]，例如烟草属的不少野生种，具有显性单基因支配的抗病性，而且许多是免疫的。将野生烟草的抗性转移到栽培烟草（栽培烟草缺乏其抗性）可以解决常规有性杂交由于种间、属间杂交的不新和性而难得到

杂种。实践证明：利用野生烟草与普通烟草、黄花烟草与普通烟草原生质体融合，能把野生烟草的抗性性状和黄花烟草高尼古丁含量转移给栽培烟草。

从文献报道和我们研究结果看，体细胞杂交虽然也存在着杂种育性低的问题，但通过回交可使杂种逐渐恢复育性，回交也能改良某些不利性状^[4, 5]，现已选育出几个稳定株系，经过2年以上产量、品质和抗病性测定，筛选出具有抗黑胫病、耐CMV，并有天然优质香味的新品系，有很大的应用前景，这一成果，属于我国首次采用原生质体融合技术改良农作物品种。

参考文献

- 1 卜锅章等. 烟草种间体细胞杂种当代细胞学观察. 中国烟草, 1984, (2): 1—3.
- 2 中国农业科学院烟草研究所体细胞杂交课题组. 烟草种间体细胞育成植株. 中国烟草, 1980, (4): 1—10.
- 3 中国农业科学院烟草研究所体细胞杂交课题组. 普通烟草与野生烟草体细胞杂种植株育成. 中国烟草, 1981, (3): 14—17.
- 4 龚明良等. 烟草体细胞杂种后代的初步研究. 中国农业科学, 1987, 专辑: 135—139.
- 5 Pandey.R.S.etal. Z.Planzenticht, 1986. 96:346—352.
- 6 Dudits.E.et al., Mol Gen Genet 1980.
- 7 Kumashiro T. etal. Plant sci, 1988, 55: 247—254.

Bred New Strain by Interspecific Somatic Hybrid in Tobacco

Gong Mingling Bu Guozhang Ding Changmin

Qingzhou Tobacco Research Institute of CNTC

Abstract

The somatic hybrid plant were obtained through protoplast fusion of *N. tabacum* L. and *N. rustica* L. *N. tabacum* L. and *N. glauca* L. in 1980. The performace of hybrid plants are typical intermediate of their two parental lines. Segregation of most characters of hybrid plants begin in SH3 and (SH)B2 generagation. However, there are a few stable hybrids and some male sterile plants . The fertility of hybrid progenies is generally poor. The character of recurrent parent can be accumnlated gradually via back crosses and the number of chromosome in hybrid plants are gradually reduced. After nine years selection, some new stable breeding strains with black shank resistance, CMV—tolerance, good flavor and some valuable charecteristics were obtained.

Note: The authors of this article include also: Yao Shaoman Zhang Lili.