

运用致病毒素筛选抗稻曲病突变体的研究

马慧 张丽 钟鸣 郭志富 王学英 陈丽静*

(沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁省农业生物技术重点实验室, 辽宁沈阳110161)

摘要 通过4个品种水稻愈伤组织的诱导、继代与分化,研究了稻曲病病原菌粗毒素为选择压力进行抗稻曲病突变体的筛选的可行性。结果表明,供试的水稻各品种在细胞水平的抗性与田间的抗性相一致,因而可以以制备的稻曲病菌粗毒素为选择压力进行抗病突变体的筛选。对得到的抗性愈伤组织的抗性稳定性进行了鉴定。结果表明,继代后愈伤组织的抗性仍得到了保持并得到了分化植株。这说明毒素筛选体系是目前最成熟的一种方法。
关键词 水稻; 抗性筛选; 稻曲病; 突变体
中图分类号 S435.111.4⁺6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)16-04746-02

Screening Mutant against False Smut Disease by Using Pathotoxin
MA Hui et al (College of Biology Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Key Laboratory of Agricultural Botechnology of Liaoning Province, Shenyang, Liaoning 110161)
Abstract The induction, subculture and differentiation of the callus of four paddy rice varieties were conducted to study the feasibility of screening the mutant against false smut disease with the crude toxin of *Ustilaginoidea virens* (Cke.) Tak. as the selection pressure. The result indicated that the resistance of cell level was consistent with resistance in the field among the tested rice varieties. Thus, the prepared crude toxin of *Ustilaginoidea virens* could be used as selection pressure to screen the mutant with disease resistance. The identification on the resistance stability of the obtained callus with resistance showed that the resistance of callus after subculture could still be maintained and the differentiation plantlets were obtained, suggesting that the toxin screening system was the most mature method at present.
Key words Rice; Resistant screening; False smut disease; Mutant

稻曲病 *Ustilaginoidea virens*(Cke.) Tak.]是世界性水稻真菌病害。由于该病害多在丰产年份发生,所以一直未受到重视。20世纪70年代随着我国籼粳杂交栽培技术的变化以及高产感病品种的推广,稻曲病逐渐由南向北蔓延,并呈上升趋势,已成为我国北方稻区的主要病害之一。稻曲病不但造成减产,而且该病菌产生的有毒物质还会污染稻米,明显降低米质和精米率,危害人类健康。

选育抗病品种是防治该病的一项最经济有效的措施^[1-2]。自1973年,Calsen将烟草野火病菌毒素相似物混入培养基,以单倍体烟草叶片游离原生质体为材料,选育出世界上第一例抗病突变体^[3]。采用细胞选择方法,在玉米、甘蔗、油菜、马铃薯、燕麦、苜蓿、小麦及水稻等作物育种上陆续取得了成功。这表明以组织培养为基础,以毒素为筛选条件进行抗病育种是值得进一步探讨的。考虑到常规方法在抗稻曲病育种上的局限性,探索用细胞选择法筛选抗稻曲病突变体将有着重要的理论和实践意义。在研究稻曲病粗毒素的制备及生物测定方法的基础上^[4],笔者以制备的粗毒素为选择压力研究了水稻抗稻曲病突变体的筛选。

1 材料与方法

1.1 材料 以水稻品种辽粳244、秋光、沈农611、沈农129愈伤组织为试验材料。水稻愈伤组织的诱导、继代与分化按常规方法进行。诱导培养基为MS基本培养基,附加2,4-D 2 ng/L、KT 1 ng/L;继代培养基为MS基本培养基,附加2,4-D 2 ng/L、KT 0.5 ng/L;分化培养基为MS基本培养基,附加6-BA 2 ng/L IAA 1 ng/L。病原菌由田间自然发病株上采得,经室内分离纯化后制备成稻曲病菌粗毒素^[4]。

1.2 方法 将水稻成熟胚愈伤组织接种于含有毒素0、10%、20%、30%、40%及50%的诱导培养基上,比较不同品种

水稻的诱导率随粗毒素浓度的变化规律。运用间歇法,对在筛选培养基上得到的愈伤组织进行抗性鉴定。将从含粗毒素的培养基上获得的愈伤组织正常继代后,再转到含相应毒素的培养基上,以未经抗性选择的愈伤组织作对照,比较愈伤组织生长量的变化。

1.3 试验参数

$$\begin{aligned} \text{愈伤组织诱导率} &= \frac{\text{出愈的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\% \quad (1) \\ \text{愈伤组织相对诱导率} &= \frac{\text{各处理的实际愈伤组织诱导率}}{\text{对照的实际愈伤组织诱导率}} \times 100\% \quad (2) \\ \text{愈伤组织生长量} &= \text{愈伤组织的终重} - \text{愈伤组织的始重} \quad (3) \end{aligned}$$

2 结果与分析

2.1 粗毒素对水稻愈伤组织相对诱导率的影响 表1表明,随着粗毒素浓度的提高,各品种水稻愈伤组织的诱导率都呈下降趋势。秋光和沈农129相对诱导率的下降趋势要比辽粳244和沈农611平缓,尤其在粗毒素浓度超过30%时,更显示出这种趋势。

表1 粗毒素对水稻愈伤组织相对诱导率的影响 %				
粗毒素浓度 %	辽粳244	秋光	沈农129	沈农611
0	100.00	100.00	100.00	100.00
10	96.61	89.49	88.66	77.80
20	65.95	74.80	75.75	51.06
30	37.56	69.63	74.22	30.57
40	29.10	66.79	68.11	23.26
50	20.33	62.93	53.29	21.39

从诱导出的愈伤组织看,在粗毒素浓度较低时,不仅诱导率较高,而且愈伤组织的质量和对照不存在差异。随着粗毒素浓度的提高,诱导率下降,诱导出的愈伤组织也变小、变硬,颜色变黄。这种变化大致以30%粗毒素为界限,所以初步认为30%浓度为适宜浓度。

2.2 粗毒素对水稻愈伤组织相对生长量的影响 将在添加粗毒素的诱导培养基上得到的愈伤组织经常规继代后转入含有粗毒素的培养基上,测定愈伤组织的相对生长量。表2表明,愈伤组织的相对生长量随着粗毒素浓度的提高而下降。在高浓度粗毒素的作用下,田间感病的辽粳244 和沈农611 相对生长量明显低于抗病的秋光和沈农129。

表2 粗毒素对水稻愈伤组织相对生长量的影响 %				
粗毒素浓度 %	辽粳244	秋光	沈农129	沈农611
0	100	100	100	100
10	74	79	85	100
20	50	66	74	87
30	41	61	57	74
40	33	58	48	67
50	29	53	38	54

2.3 愈伤组织稳定性的鉴定 图1 ~3 表明,经过选择的愈伤组织的相对生长量普遍高于对照。这说明在粗毒素的作

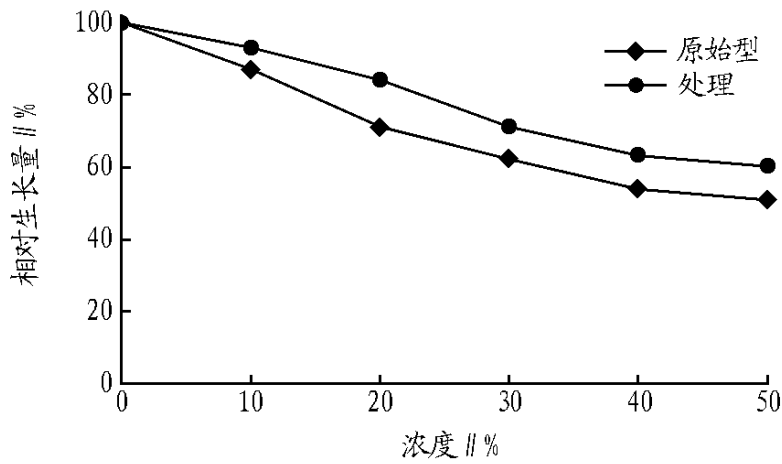


图1 沈农129 愈伤组织在毒素作用下的生长曲线

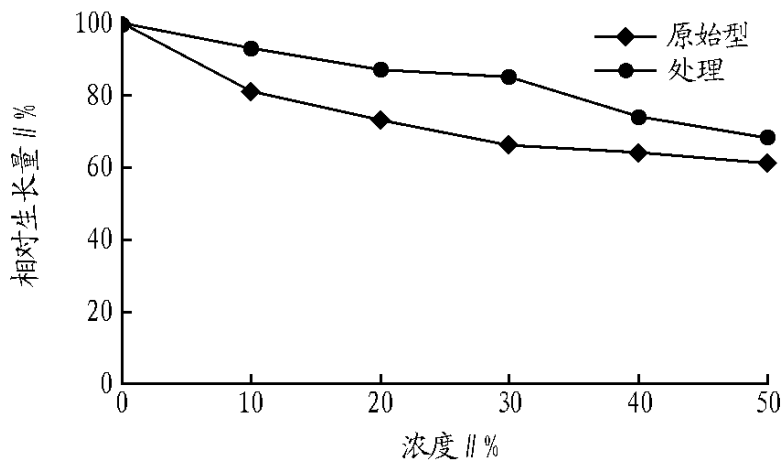


图2 秋光愈伤组织在毒素作用下的生长曲线

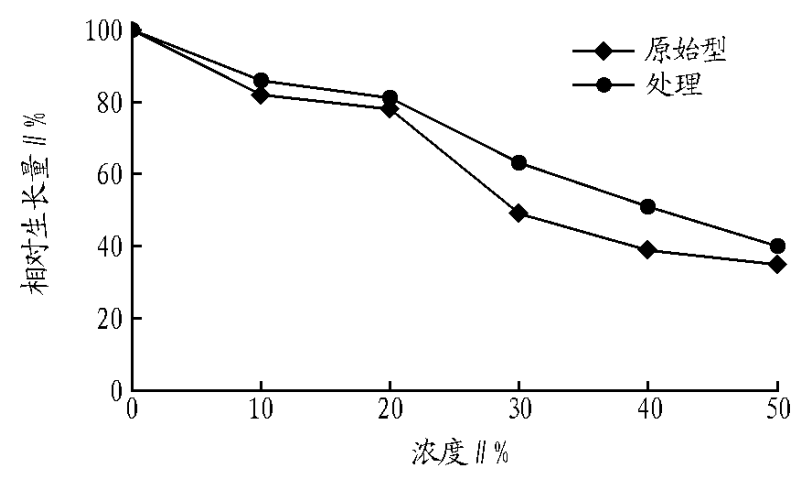


图3 辽粳244 愈伤组织在毒素作用下的生长曲线
用下,经选择得到的愈伤组织对粗毒素的抵抗能力增强了。

3 小结与讨论

(1) 为了提高抗病突变体的筛选效率,必须建立标准化的筛选体系。毒素筛选体系是目前最成熟的一种方法。将致病毒素混入培养基作为选择压力,可持续作用于培养物,而且可调节毒素浓度以分离抗病细胞。多数作物如玉米小斑病、水稻稻瘟病等突变体都是采用该法选出来的。将制备的毒素混入培养基,发现随着稻曲病粗毒素浓度的提高,愈伤组织的受抑制程度增大,且不同抗性品种的愈伤组织对粗毒素的反应不同。因此,抗毒素筛选法选择抗稻曲病细胞的一种有效方法。

(2) 在作物抗病育种筛选过程中,所用毒源依纯化程度可分为含毒培养基、粗毒素、纯化毒素3 类。该试验采用粗毒素为毒源。它对愈伤组织的诱导率、相对生长量都有明显的抑制作用,而且随着粗毒素浓度的增加抑制作用增强。试验表明,适宜的筛选浓度为30 %。

(3) 稻曲病菌能够产生毒素,并且不同水稻品种在细胞水平上对粗毒素的反应亦不相同。因此,运用粗毒素筛选水稻抗稻曲病细胞突变体在理论上和实践上都是可行的。

参考文献

[1] 朱秀英. 水稻体细胞无性系的建立及其遗传变异研究[J]. 遗传,1990, 12(6) :1 - 4.

[2] 陈章. 抗稻瘟病体细胞突变体的抗性遗传分析[J]. 遗传学报,1993,20 (4) :334 - 339.

[3] BEHNKE M. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of P. Infestans and regeneration of plant[J]. Theor Appl Genet,1979,55 :60 - 71.

[4] 马慧,刘培斌,刘少霞,等. 稻曲病菌粗毒素的初步研究[J]. 辽宁农业科学,2001 (2) :40 - 41.