

离体培养条件下小麦不同外植体 对赤霉病菌粗毒素的反应

朱昌祺¹⁾ 朱庆麟 段振锋²⁾

(西北农业大学农学系 陕西杨陵·712100)

S435.121.4

摘 要 研究在离体培养条件下小麦抗、感赤霉病品种不同外植体对赤霉病菌粗毒素的反应。结果表明,随着赤霉病菌粗毒素浓度的提高,小麦幼穗及花药的出愈率降低,幼穗愈伤组织生长量减少,分化能力降低;抗赤霉病品种幼穗愈伤组织的存活率、相对生长量和分化频率降低的幅度均小于感病品种,抗病品种幼穗愈伤组织的抗坏血酸氧化酶及多酚氧化酶活性受粗毒素影响的程度小于感病材料,说明小麦成株抗赤霉病和幼穗愈伤组织抗赤霉粗毒素具有一致性。

关键词 小麦,赤霉病菌,粗毒素,组织培养

中图分类号 S435.121.45, S532.21, S336

迄今,抗病突变体离体筛选主要以致病毒素作为选择剂,而以毒素作为选择剂筛选的抗毒素细胞系能否分化为抗病植株,也就是细胞水平抗毒素和成株抗病性是否相关,是目前众多研究者关注的问题。已有研究表明,非寄主专化病菌禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)可产生数种毒素^[1],且毒素与禾谷镰刀菌致病作用有一定关系^[2,3]。郑元梅^[9]研究结果,小麦赤霉病菌粗毒素对小麦芽尖及子房愈伤组织有不同程度的抑制作用。翁益群等^[5]报道,抗赤霉病小麦苏麦3号愈伤组织对粗毒素毒害的抵抗能力比感赤霉病小麦中国春要强。本试验旨在进一步深入研究不同抗性小麦品种的不同组织对赤霉病菌粗毒素的反应,以期利用粗毒素进行小麦抗赤霉病突变体离体筛选提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试小麦材料 抗病品种:苏麦3号和望水白;感病品种(系):806, No18及丰a-2;杂合材料:(苏麦3号×小偃6号)F₁, (苏麦3号×No18)F₁, (苏麦3号×WT₂₀₋₁)F₁, (望水白×No18)F₁, (望水白×矮丰3号)F₁, ((望水白×No18)×Autus-s)F₁, (丰b-2×望水白)F₁。

1.1.2 赤霉病菌株 陕西省农科院植保所提供的禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)4号菌株。

文稿收到日期: 1991-09-20

1)现在陕西省农牧厅工作; 2)现在山东省济南市农牧局工作。

1.2 方法

幼穗 3月底至4月初选长度约0.6~1 cm, 处于雄蕊形成期的小麦幼穗, 作为体细胞愈伤组织诱导的外植体。接种按常规方法进行。

花药 取小孢子处于单核中晚期的花药诱导花粉愈伤组织, 接种按常规方法进行。

粗毒素的提取 参照刘思衡等报道的方法^[6]。

毒素处理 ①粗毒素对幼穗及花药诱导愈伤组织的影响 将幼穗、花药分别接种于含不同浓度粗毒素的诱导培养基上, 经一个月培养, 统计出愈率及愈伤组织的鲜重。幼穗诱导培养基为 MS 培养基, 附加 2,4-D 2 mg/L, KT 0.5 mg/L, 蔗糖 3%, 琼脂 0.7%, pH5.8, 花药诱导培养基为 C₁₇ 培养基, 附加 2,4-D 2 mg/L, KT 0.5 mg/L, 蔗糖 9%, 琼脂 0.6%, pH5.8; ②粗毒素对幼穗愈伤组织生长和分化的影响 将愈伤组织分别接种于含不同浓度粗毒素的继代和分化培养基上, 经一个月培养, 统计存活率及分化频率。继代培养基同幼穗诱导培养基, 分化采用大量元素减半的 MS 培养基, 附加 6-BA 1 mg/L, NAA 0.5 mg/L, 蔗糖 20 g/L, 琼脂 0.7%, pH5.8。

愈伤组织抗坏血酸氧化酶及多酚氧化酶活性的测定 按文献〔7〕报道的方法进行。

2 结果与分析

2.1 粗毒素对诱导小麦幼穗及花药愈伤组织的影响

2.1.1 对幼穗形成愈伤组织的影响 赤霉粗毒素对小麦幼穗出愈率具有明显的抑制作用。由表 1 资料可以看出, 随着赤霉粗毒素浓度的增加, 各品种幼穗出愈率逐渐降低。

表 1 赤霉粗毒素对小麦幼穗出愈率及生长量的影响

品 种	粗毒素 浓度(%)	接 种 幼穗数	形成愈伤 组织穗数	出愈率(%)	品 种	粗毒素 浓度(%)	接 种 幼穗数	形成愈伤 组织穗数	出愈率(%)
No18	0	20	20	100	丰 a-2	0	20	20	100
	0.5	20	15	75		0.5	20	15	75
	1.0	20	14	70		1.0	20	15	75
	2.0	20	9	45		2.0	20	1	5
	3.0	20	0	0		3.0	20	0	0
望水白	0	20	20	100	苏麦 3 号	0	20	20	100
	0.5	20	15	75		0.5	20	12	60
	1.0	20	15	75		1.0	20	8	40
	2.0	20	6	30		2.0	20	1	5
	3.0	20	0	0		3.0	20	0	0

有趣的是, 除丰 a-2 外, 其他 3 个品种的愈伤组织增重在低浓度粗毒素水平比对照都有不同程度地提高, 然后随粗毒素浓度的增加, 愈伤组织增重依次降低。说明低浓度粗毒素似乎刺激幼穗愈伤组织生长, 但愈伤组织多表现为畸形状态。

比较抗病品种苏麦 3 号、望水白与感病品种 No18 及丰 a-2 在各粗毒素浓度水平的出愈率可以看出, 品种之间有差异, 但抗感品种之间无规律性变化, 抗病品种的出愈率在各粗毒素浓度水平并不比感病品种的高(表 1)。

2.1.2 对诱导小麦花药愈伤组织的影响 由表 2 可以看出, 粗毒素对诱导花粉愈

伤组织具有抑制作用。除(苏麦3号×小偃6号) F_1 组合外,其余材料均随粗毒素浓度的增加,花药出愈率依次降低。各组合材料受抑制的程度有所差异。

表2 赤霉粗毒素对花药出愈率的影响

接种材料	粗毒素 浓度(%)	接 种 花药数	出 愈 花药数	出愈率 (%)
(望水白×No18) F_1	0.00	336	5	1.5
	0.05	157	1	0.6
	0.20	210	1	0.5
	0.40	163	0	0.0
[(望水白×No18)×Autus-s] F_1	0.00	232	23	9.9
	0.05	384	10	2.6
	0.20	337	4	1.2
	0.40	534	0	0.0
(苏麦3号×WT ₂₀₋₁) F_1	0.00	546	5	0.9
	0.05	440	3	0.7
	0.20	513	1	0.2
	0.40	505	0	0.0
(苏麦3号×小偃6号) F_1	0.00	399	2	0.5
	0.05	607	0	0.0
	0.20	723	0	0.0
	0.40	629	1	0.16

在较高粗毒素浓度水平产生的花粉愈伤组织,可被视为抗毒素愈伤组织,将其分离出来供进一步测试。看来,花粉对粗毒素反应远较幼穗敏感,用0.2%~0.4%粗毒素一步筛选抗毒素花粉愈伤组织较为合适。

2.2 粗毒素对幼穗愈伤组织生长和分化的影响

2.2.1 对幼穗愈伤组织生长的影响 实验结果表明,在各粗毒素浓度水平上,抗病材料(望水白和苏麦3号)的幼穗愈伤组织存活率均高于感病材料(806和No18)(如图1)。苏麦3号幼穗愈伤组织在各粗毒素浓度水平上的相对生长量皆大于806,在2.5%粗毒素水平差异最为显著,苏麦3号的相对生长量为40.5%,而806只有3.1%(图2)。

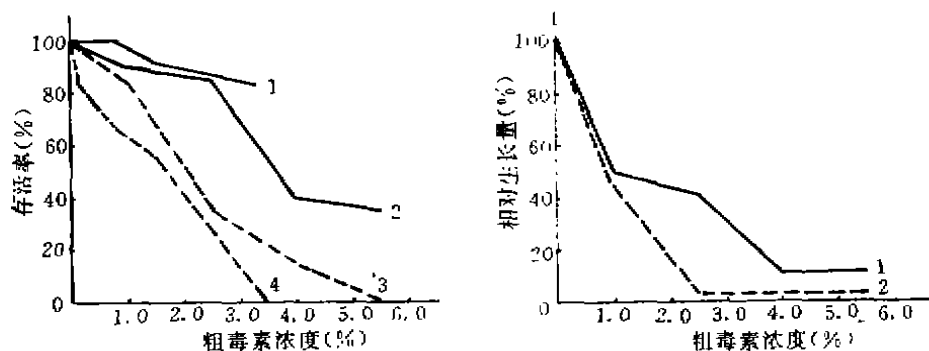


图1 赤霉粗毒素对幼穗愈伤组织存活率的影响 图2 赤霉粗毒素对幼穗愈伤组织相对生长量的影响

1. 望水白; 2. 苏麦3号; 3. 806; 4. No18

1. 苏麦3号; 2. 806

从图 3 可以看出幼穗愈伤组织在赤霉粗毒素培养基上的动态变化情况。在一定粗毒素浓度水平下, 随着时间的推移, 望水白和 No18 幼穗愈伤组织存活率逐渐下降。赤霉毒素浓度越高, 幼穗愈伤组织变褐而死亡的速度越快; 随着时间的延长, 存活率亦随之下降。从图 3 还可以看出, 在一定浓度粗毒素作用下, 于同一时间内, 望水白的愈伤组织存活率皆高于 806。

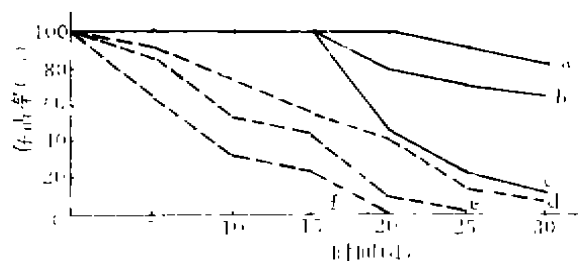


图 3 在不同粗毒素浓度下小麦幼穗愈伤组织存活率的动态变化

以上实验结果说明, 抗赤霉病品种幼穗愈伤组织比感病品种愈伤组织更抗毒素, 愈伤组织抗赤霉毒素与植株对赤霉病的抗性是一致的。

2.2.2 对幼穗愈伤组织分化的影响 由表 3 可以看出, 随着赤霉粗毒素浓度的提高, 幼穗愈伤组织出苗率呈下降趋势, 说明粗毒素对幼穗愈伤组织的分化具有抑制作用。

从表 3 资料还可以看出, 在 1.0% 及 2.5% 粗毒素水平, 抗赤霉病材料望水白和苏麦 3 号分化频率均高于感病材料 No18 和 806, 说明苏麦 3 号和望水白幼穗愈伤组织在分化过程中抗赤霉粗毒素能力比 No18 和 806 的强。

表 3 赤霉粗毒素对幼穗愈伤组织分化频率的影响 表 4 粗毒素对愈伤组织 ASO 和 PPO 活性的影响

粗毒素 浓度(%)	分化频率(%)			
	望水白	苏麦 3 号	No18	806
0.0	83.3	100	80.0	100
0.5	7.7	66.7	10.0	25.0
1.0	46.1	88.9	0.0	0.0
2.5	36.4	11.1	0.0	0.0
5.0	12.5	0.0	0.0	0.0

品种	粗毒素 浓度(%)	mg · g ⁻¹ 克鲜重 · min ⁻¹	
		ASO 活性 抗坏血酸氧化酶	PPO 活性 多酚氧化酶
苏麦 3 号	0.0	0.016 5	0.047 7
	1.0	0.011 0	0.038 5
	2.5	0.000 0	0.011 0
806	0.0	0.014 7	0.77 0
	1.0	0.000 0	0.00 0

2.3 粗毒素对愈伤组织抗坏血酸氧化酶(ASO)及多酚氧化酶(PPO)活性的影响

在各毒素浓度水平上, 对抗病品种苏麦 3 号和感病品种 806 幼穗愈伤组织的抗坏血酸氧化酶与多酚氧化酶活性测定结果表明, 随培养基中粗毒素浓度的增加, 两品种的 ASO 和 PPO 活性都急剧下降, 而抗病品种苏麦 3 号的 ASO 和 PPO 活性降低的幅度均小于感病品种 806。在 1.0% 粗毒素水平, 苏麦 3 号愈伤组织的 ASO 活性较对照下降了 33.3%, 而 806 的酶活性较对照下降了 100%; 苏麦 3 号的 PPO 活性较对照下降了 19.2%, 而 806 较对照下降了 88.1%(表 4)。以上结果说明, 赤霉粗毒素对抗病品种苏麦 3 号愈伤组织的 ASO 和 PPO 活性的影响小于品种 806, 表明苏麦 3 号愈伤组织比

806 愈伤组织更耐毒素, 是具有一定的生理代谢基础。

3 讨 论

赤霉病菌毒素在致病过程中是否起作用, 细胞水平抗毒素和成株抗病是否相关, 是采用细胞培养技术进行抗赤霉病筛选的两大问题。有关毒素与禾谷镰刀菌致病作用的关系已有一些研究。匡开源等^[8]从禾谷镰刀菌的大米培养物中提取的粗毒素可抑制豌豆发芽, 王裕中等^[2]通过生物测定证明禾谷镰刀菌的纯毒素对小麦黄化芽鞘有抑制作用, 其中以脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的活性最强, 并证实小麦对DON的敏感性与品种的抗赤霉病特性呈负相关。Miller等^[3]用禾谷镰刀菌的单菌株接种一批春性禾谷类作物, 表现了抗病品种具有较低的菌体生长量和较低的DON浓度, 认为某种植物酶可能会影响DON和镰刀菌产生的其他毒素, 并提出了小麦品种对赤霉病的第三种类型抗性降解DON的概念。在翁益群等^[5]及我们的试验中, 都发现赤霉粗毒素能引起和赤霉分生孢子相似的症状。

有关细胞水平抗赤霉毒素和成株抗病是否相关的研究报道较少。郑元梅^[4]及翁益群等人^[5]做了初步研究。本文的研究结果表明, 抗赤霉病材料幼穗愈伤组织的存活率、相对生长量、分化频率以及抗坏血酸氧化酶和多酚氧化酶的活性受赤霉粗毒素的影响程度均小于感病材料, 说明小麦成株抗赤霉病和幼穗愈伤组织抗赤霉粗毒素具有一致性。

参 考 文 献

- 1 李克昌. 小麦赤霉病及其防治(第2版). 上海: 科技出版社, 1982: 106~122
- 2 王裕中, Miller J D. 小麦品种对禾谷镰刀菌毒素的抗性研究. 植物病理学报, 1989; 19(2): 105~108
- 3 Miller J D. Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *Phytopath Z.* 1985, 113(4): 359~367
- 4 郑元梅. 小麦赤霉病致病物提取与致病力测定. 福建农业科学, 1980; (3): 11~12
- 5 翁益群, 刘大钧. 用病原粗毒素对小麦赤霉病抗性的生物学测定. 南京农业大学学报, 1989; 12(4): 116~118
- 6 刘思衡, 廖海林, 潘祥华. 应用赤霉毒素测定小麦品种抗赤霉病性的初步研究. 福建稻麦科技, 1989; 1: 35~39
- 7 西北农业大学植物生理生化教研组. 植物生理学试验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987: 89~92
- 8 匡开源, 陆仕华, 史士英等. 镰刀菌毒素的研究 I 毒素产生菌株的筛选. 真菌学报, 1985; 3: 193~196

Reaction of Different Tissues of Wheat Cultured
invitro to Crude Toxin Produced
by *Fusarium Graminearum*

Zhu Changqi Zhu Qinglin Duan Zhenfeng

(Agronomy Department, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Reaction of different tissues of wheat cultured *invitro* to crude toxin of *Fusarium graminearum* was studied in this experiment. The results showed as follows: as the concentration of the crude toxin increases, the percentage of callus formation of wheat inflorescences and anthers decreases; and the percentage of surviving inflorescence calli growth and relative growth of wheat inflorescence callus decrease; and the ability of differentiation of wheat inflorescence callus became weak. The crude toxin influences the enzyme activity of ASO and PPO of wheat inflorescence callus greatly. Wheat calli were treated with different concentration of crude toxin, the percentage of surviving inflorescence calli, relative growth, the percentage of differentiation, the enzyme activity of ASO and PPO of inflorescence calli of scab-resistant wheat cultivars were less affected than those of scab-susceptible wheat cultivars. This indicates that the resistance of wheat calli to crude toxin of *Fusarium graminearum* coelates with the resistance of wheat plants to *Fusarium graminearum*.

Key words wheat, *Fusarium graminearum*, crude toxin, tissue culture