

小麦单倍体无性系抗镰刀菌毒素细胞系的筛选

陈耀锋 韩德俊 闵东红 任惠利 李春莲

(西北农业大学农学系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 1989~1992年以禾谷镰刀菌 F₁ 号菌种的粗毒素为选择剂, 采用多步正筛选法, 从来源于同一个花粉胚的单倍体细胞无性系 H₁₆ 中筛选出三个抗性细胞系——H₁₆¹, H₁₆² 和 H₁₆³。与亲本系相比, 这些变异系具有较强的抗毒素毒害能力, 在继代培养 6 次后, 其抗性性状表现稳定。

关键词 突变体筛选, 单倍体无性系, 禾谷镰刀菌, 毒素, 小麦

中图分类号 S336, S512.103.52

进行作物抗病育种, 除传统的通过杂交导入抗病基因外, 目前已建立起一种新的运用植物病原菌毒素和组织培养技术进行离体筛选抗病突变体的方法, 而这种突变体被认为是最有希望的突变体之一。以植物病原菌毒素、毒素类似物或病原菌的培养滤液为选择剂, 进行抗病突变体的筛选已在烟草、玉米、马铃薯、油菜、水稻和小麦等^[1~6]作物上有所研究, 并取得了一些有实用价值的突变体。利用镰刀菌粗毒素或培养滤液进行小麦抗赤霉细胞筛选工作已在国内普遍展开^[6~9]。我们于 1989~1992 年, 以禾谷镰刀菌粗毒素为选择剂, 对来自一个花粉胚、基因型完全一致的小麦单倍体细胞无性系 H₁₆^[10]进行了多步正筛选, 获得了 3 个稳定的抗毒素细胞系, 并对抗性系的抗毒素特性进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料和培养基

试验材料是从普通小麦杂种抗盐 O₃×No. 18 组合中通过培养得到的, 起源于一个花粉胚, 经细胞学鉴定为单倍体细胞的无性系 H₁₆^[10]。继代培养基以 MS 为基本培养基, 附加 1.5 mg·L⁻¹ 2,4-D, 0.25 mg·L⁻¹ KT, 2.5% 蔗糖, 0.5% 麦芽糖, 500 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白; 选择培养基为继代培养基中附加不同浓度的粗毒素。

1.2 抗毒素细胞变异系的筛选及鉴定

用文献[10]报道的方法粗提并鉴定粗毒素。将 H₁₆ 单倍体细胞无性系经扩繁后分成两部分, 一部分用于进行抗毒素的多步正筛选, 一部分与筛选的无性系进行同步继代。对筛选出的变异系进行抗毒素鉴定和稳定性测定。

2 结 果

2.1 粗毒素对小麦单倍体细胞无性系生长的影响

将已稳定生长的小麦单倍体细胞无性系 H₁₆ 的愈伤组织分别转到含不同浓度毒素的无性系继代培养基上, 每处理接种 5 块愈伤组织, 30 d 后称重, 计算愈伤组织的平均生长

收稿日期: 1994-03-15

量。结果(表 1)表明,随着继代培养基中粗毒素浓度的提高,愈伤组织的生长量迅速降低,当毒素浓度达到 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织全部竭化死亡。

表 1 毒素浓度对 H_{16} 无性系生长的影响

毒素浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	每块愈伤组织鲜重		愈伤组织生长 (%)
	0 d	30 d	
0(CK)	100.0 ± 12.1	843.2 ± 43.1	100
1.5	100.0 ± 12.1	454.1 ± 40.0	48
3.0	100.0 ± 12.1	243.2 ± 27.1	17
6.0	100.0 ± 12.1	98.7 ± 38.0	—
9.0	100.0 ± 12.1	92.5 ± 17.1	—
12.0	100.0 ± 12.1	87.2 ± 14.1	—

2.2 抗毒素变异细胞系的分离和选择

H_{16} 无性系充分扩繁后,首先将 700 块愈伤组织转入到含 $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 毒素的选择培养基上筛选,无性系愈伤组织在选择培养基上的生长出现了块间和块内细胞间的差异。30 d 后,选择生长正常、旺盛的愈伤组织转入到 $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 粗毒素选择培养基上进行第二次筛选,以后每代逐步提高选择压力,每次挑选生长旺盛的愈伤组织转移筛选,以消除可能逃脱选择剂抑制而漏网的野生细胞。无性系愈伤组织经过 $6.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $9.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 毒素选择培养基逐步筛选之后,转入到无选择剂的培养基上继代 2 次,以消除对选择剂可能“上隐”的野生型细胞。后经 $12.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $15.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高浓度粗毒素的选择培养基的再筛选,获得了 3 个抗赤霉粗毒素的细胞变异系 H_{16}^* 、 $H_{16}^{\#}$ 和 H_{16}^{Δ} 。同时,一部分与筛选同步培养继代的 H_{16} 无性系标记为 H_{16}^* ,作为抗性变异系的对照系或亲本系。

2.3 抗毒素细胞变异系的抗性特性

将 3 个抗毒素细胞系在 $9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 粗毒素的继代培养基上扩繁两代后,与亲本系 H_{16}^* 同时转入到含不同浓度粗毒素的继代培养基上。结果(表 2)表明,3 个抗毒素变异系在不同浓度粗毒素培养基上对毒素毒害的抗性比亲本系有显著提高。在 $15.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高浓度毒素的培养基上,3 个抗毒素细胞系仍然有一定的生长。

表 2 抗性变异系的抗毒素特性

毒素浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	愈伤组织增加的鲜重			
	H_{16}^*	$H_{16}^{\#}$	H_{16}^{Δ}	H_{16}^*
0(CK)	680.0 ± 87.1	589.0 ± 60.7	609.5 ± 65.1	659.3 ± 38.9
1.5	245.3 ± 41.0	567.8 ± 59.2	504.1 ± 59.2	589.7 ± 72.1
3.0	60.2 ± 13.2	494.0 ± 42.1	412.6 ± 50.2	499.6 ± 64.0
6.0	—	368.3 ± 43.1	288.2 ± 39.4	369.7 ± 60.1
9.0	—	218.3 ± 30.1	154.5 ± 18.1	225.9 ± 11.4
12.0	—	73.5 ± 13.0	45.0 ± 9.5	110.1 ± 23.4
15.0	—	18.7 ± 9.4	13.7 ± 5.8	79.7 ± 10.1
18.0	—	—	—	—

2.4 抗性系和亲本系在不同培养基上的生长特性

将抗性系 $H_{16}^{\#}$ 和亲本系 H_{16}^* 分别转入到无毒素继代培养基和含 $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 粗毒素的继代培养基上,观察了不同生长时期抗性系和亲本系愈伤组织的生长特性。结果(表 3)表明,抗性系 $H_{16}^{\#}$ 在 $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 粗毒素培养基上的生长趋势和在无毒素继代培养基上的生

长趋势基本一致,毒素对其影响很小;而对照系 H_1^* 在两种培养基上生长差异显著。差异随培养天数的增加而增大。

表 3 抗性系和亲本系的生长特性

生长天数 d	H_1^*		H_{18}	
	A 培养基 ¹⁾	B 培养基 ²⁾	A 培养基	B 培养基
0	0	0	0	0
5	13.1±18 ³⁾	12.1±2.0	11.5±2.8	12.1±13.2
10	51.0±1.4	42.4±4.8	47.6±3.7	51.3±17.0
15	120.1±17.5	50.2±5.8	99.1±8.5	95.3± 7.8
20	230.1±42.3	57.3±7.8	180±32.1	150.2±27.1
25	503.1±32.1	64.2±14.5	461.2±42.3	390.4±29.1
30	712.0±65.0	67.4±12.1	693.0±40.1	487.2±61.1

注:1)A 培养基:无毒素继代培养基;2)B 培养基:含 $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 毒素的继代培养基;3)愈伤组织增加的鲜重。

2.5 抗毒素变异系抗性的稳定性

将抗性系 H_{18} 和亲本系 H_1^* 在无毒素的继代培养基上同步继代培养 6 次后,与在 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 粗毒素培养基上继代的 H_{18} 变异系一起,分别转入到含不同浓度粗毒素的继代培养基上。30d 后,分析其愈伤组织的生长情况,结果(表 4)表明,抗性系经连续 6 次继代培养之后,对粗毒素仍然保持很强的抗性能力。说明抗性系对毒素的抗性特性在无性繁殖过程中能稳定地传递。

表 4 抗毒素变异系抗性的稳定性

毒素浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	H_1^*	H_{18}	
		C 培养基	A 培养基
0 (CK)	796.1±54.1 ²⁾	670.0±80.9	720.1±89.1
1.5	203.1±38.2	591.2±67.8	582.1±70.1
3.0	67.8± 6.1	480.1±73.1	469.2±63.1
6.0	—	350.2±61.2	317.5±53.2
9.0	—	235.1±12.1	209.7±13.2
12.0	—	98.1±10.7	74.2±15.4
15.0	—	56.4± 3.2	22.6± 8.7
18.0	—	—	—

注:1)C 培养基:含 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 毒素的继代培养基;2)愈伤组织增加的鲜重;3)在 A,C 培养基上均继代 6 次。

3 讨 论

小麦赤霉病抗性属多基因控制的数量性状遗传^[11]。多步筛选有利于多基因性状中抗性基因的累积,增加抗性基因的拷贝数。欧阳俊闻等^[17]以镰刀菌的培养滤液为选择剂,在花药诱导和分化的两个水平上进行了抗性筛选,获得了很好的结果。张炎等^[6]以小麦幼胚和幼穗为材料在诱导和分化培养基中加入了镰刀菌培养滤液进行筛选,证明在分化培养基中加入毒素能累积和加强愈伤组织抗毒素筛选效果。李静^[2]以小麦幼穗愈伤组织为材料,应用多步选择系统,在较短时间内获得了较理想的材料。本研究通过间隙多步筛选系统,选出的 H_{16} 、 H_{18} 和 H_{19} 三个抗性变异细胞系,其抗性特性有极显著的提高,其抗性特性在 $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 粗毒素培养基上比对照分别高出 8.2、6.9 和 8.3 倍,证明利用间隙多步正筛选体系,获得稳定的、抗性基因累积的高抗镰刀菌毒素细胞系是可能的。大量研究^[6~9]

已经证明,小麦品种细胞水平上对镰刀菌毒素的抗性和个体水平上对赤霉病的抗性有一定相关性。因而,以镰刀菌毒素为选择剂进行抗赤霉细胞工程育种是完全可行的。对于那些具有全能性并有良好继代性状的无性系,以镰刀菌毒素为选择剂,采用多步筛选系统,有可能获得理想的抗赤霉病基因型。

参 考 文 献

- 1 Carlosn P S. Methionine Sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science*, 1973,180:1366~1368
- 2 Gengenbach B G, Green C E. Selection of T-cytoplasm maize callus cultures resistant to *Helminthosporium maydis* race T pathotoxins. *Crop Science*, 1975, 15:645~647
- 3 Behnke M. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *phytophthora infestans* and regeneration of resistant plant. *Theor Appl Genet*, 1977, 55:69~71
- 4 Cacristan M D. Resistance responses to *phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic culture of haploid *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*, 1982, 61:193~220
- 5 孙立华,余建民,吕学锋.用组织培养法筛选水稻抗叶枯病突变体.遗传学报,1986,13(3):189~193
- 6 张炎,张翠兰,吴郁文等.抗赤霉小麦细胞工程育种,见:胡含,王恒立主编.植物细胞工程与育种.北京:北京工业大学出版社,1990.303~307
- 7 欧阳俊闻,周嘉平,贾双娥等.应用花药培养体系筛选小麦抗赤霉突变体的研究,见:胡含,王恒立主编.植物细胞工程与育种.北京:北京工业大学出版社,1990.254~260
- 8 曹清波,余毓君.小麦幼胚愈伤组织培养和抗赤霉体细胞筛选.华中农业大学学报,1991,10(1):9~15
- 9 陈耀锋,朱庆麟,杨祥.镰刀菌粗毒素的特性及对小麦幼胚愈伤组织生长的影响.西北农业学报,1992,1(3):81~84
- 10 陈耀锋.普通小麦单倍体细胞无性系的建立.西北农业学报,1993,2(3):15~18
- 11 陈楚和.小麦抗赤霉病遗传的研究.浙江农业大学学报.1983,9(2):115~126
- 12 李静.应用组织培养方法诱发小麦抗赤霉毒素突变体研究初报.河北农业大学学报,1992,5(1):47~51

Selection of *Fusarium graminearum* Toxin-Resistance of Wheat Haploid Clone

Chen Yaofeng Han Dejun Min Donghong Ren Huili Li Chunlian

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

Abstract Three *Fusarium graminearum* toxin-resistant variants, designated as H_{16}^I , H_{16}^{II} and H_{16}^{III} , have been selected from a wheat haploid clone H_{16} with the use of the crude toxin of *Fusarium graminearum* No. 4 and the multi-step selection system. The resistance ability of variant lines against the crude toxin of *Fusarium graminearum* is stronger than that of the parent and the resistance property of variant lines keeps stable after the variant lines have been cultured in a medium lacking the crude toxin for 6 generations.

Key words mutant selection, haploid clone, *Fusarium graminearum*, toxin, *Triticum aestivum*