小麦禾谷镰刀菌毒素抗性系的筛选及抗性特性

傅雪琳[1] 何 平[2] 朱庆麟[3]
(1,3西北农业大学农学系,2西北农业大学基础课部,陕西杨陵 712100)

摘 要 以稳定生长的小麦(抗盐 03×No18) F_1 花药愈伤组织为材料,小麦强致病禾谷镰刀菌的粗毒素为选择剂,进行抗毒素变异细胞系的离体筛选。结果从多步正筛选系统和一步正筛选系统分别获得抗性变异细胞系 KN^r-a和 KN^r-b.抗性系的毒素抗性具有显著提高,且其细胞膜透性、硝酸还原酶活性、苯丙氨酸解氨酶活性、游离氨基酸组成均发生了明显变化。据此提出了细胞水平上禾谷镰刀菌毒素作用的机理及抗性变异细胞系对毒素表现出一定抗性的可能原因。

关键词 小麦抗病育种,禾谷镰刀菌,抗性变异细胞系,抗性特性
中图分类号 S512.103.4

赤霉病是小麦的重大病害,其危害遍及世界各小麦产区,严重影响其产量、品质及使用价值[1]。通过传统的育种方法选育抗赤霉病品种的工作近年来虽有一些进展,但未有大的突破。近几年在细胞水平上利用毒素筛选小麦抗赤霉病突变体的研究工作已陆续展开,主要集中在毒素筛选的可行性、材料及方法的研究上,也有对抗性遗传与表达方面的研究[2-4],但缺乏对抗性变异体生理生化特性与细胞水平上抗性机理的系统研究。本文报道作者在这方面的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材 料

从小麦杂交组合(抗盐 03×No18) F_1 花药诱导的愈伤组织中挑选生长旺盛、稳定、一致的经扩繁培养 4代后,用作筛选材料。禾谷镰刀菌由陕西省农科院植保所提供。

1.2 方 法

1.2.1 禾谷镰刀菌毒素的提取 参考文献[5]的方法,按 100 g干病菌麦粒培养物加 500 mL 85%乙醇的比例,浸泡干麦粒培养物 700 g,10 d后过滤浸提并浓缩成粗毒素液约 300 mL,用蒸馏水定容至 1000 mL作为母液,贮于冰箱备用。

1.2.2 毒素抗性变异细胞系的离体筛选 根据毒理试验结果,多步正筛选分别以 3.5, 7.0, 10.5, 14.0 g·L^{-1} 4个水平的毒素浓度为起始选择压,分别接种 118, 148, 290和 320块大小基本一致的愈组。4个相应的筛选程序[以毒素浓度(g·L^{-1})表示]为:Ⅰ. 3.5–7.0–14.0–21.0–28.0, Ⅱ. 7.0–14.0–21.0–28.0–0.0–28.0, Ⅲ. 10.5–17.5–

收稿日期: 1995-04-18
作者 1,2现分别在华南农业大学农学系和农业生物系工作,广州五山 510642
?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

28.0– 0.0– 28.0,Ⅳ. 14.0– 21.0– 28.0– 0.0– 28.0.一步正筛选从近致死浓度 17.5和 21.0 g° L⁻¹作起始选择压, 选择程序分别为: 17.5– 0.0– 28.0– 0.0– 28.0和 21.0 – 0.0– 28.0– 0.0– 28.0.每选择代挑选存活或生长相对旺盛的愈伤组织进入下代筛选.以同步继代的无毒素正常条件下的愈伤组织作亲本系.

愈组继代和筛选用营养培养基为 MS基本培养基+ 1.5~ 2.0 mg° L⁻¹ 2,4-D+ 6-BA0.5 mg° L⁻¹+ 3.0 g° L⁻¹蔗糖+ 7.0 g° L⁻¹琼脂.

1.2.3 抗性细胞系的毒素抗性鉴定　将抗性系在无选择压正常培养基上继代培养至第 3代日龄 15 d时,与亲本系愈组一起转入相同梯度浓度毒素培养基上培养, 30 d后统计愈组存活率和鲜重变化. 设置的浓度梯度有 0.0(CK), 7.0, 14.0, 21.0, 28.0, 35.0, 42.0 g° L⁻¹,每处理接种 10块愈组,重复 3次.

1.2.4 抗性细胞系的生理生化特性分析　细胞膜相对透性测定采用紫外分光光度计法[6],重复 2次. 硝酸还原酶活性测定用磺胺显色法[7],重复 3次. 苯丙氨酸解氨酶活性测定参考文献[8]的方法,以消光值 O.D变化 0.01为一个酶活性单位,重复 2次. 游离氨基酸组分用 121-MB型氨基酸分析仪测定.

2 结果与分析

2.1 多步正筛选系统

从继代培养的第 5代开始抗毒素变异细胞系的离体筛选. 4个选择程序各选择代愈组存活率(入选率)为: 程序Ⅰ 第 1~ 5代分别为 98.3%, 68.1%, 46.9%, 48.3%和 23.1%; 程序Ⅱ 第 1~ 6代为 66.9%, 32.5%, 29.6%, 29.7%, 98.5%和 39.0%;程序Ⅲ第 1~ 5代为 49.3%, 41.1%, 18.9%, 100.0%和 26.0%; 程序Ⅳ 为 26.9%, 20.5%, 22.5%, 42.4%和 24.6%.说明随选择代数增加和选择压升高,愈组存活率下降. 经无选择压条件缓冲培养后又升入高选择代筛选后,愈组存活率又有所提高,且其生长势也较好. 由于 4个程序各代入选愈组生长状况基本相似,最高选择代存活愈组外观特征相同,故将最高选择代入选愈组暂作为抗性变异细胞系,标记为 KN^r-a.

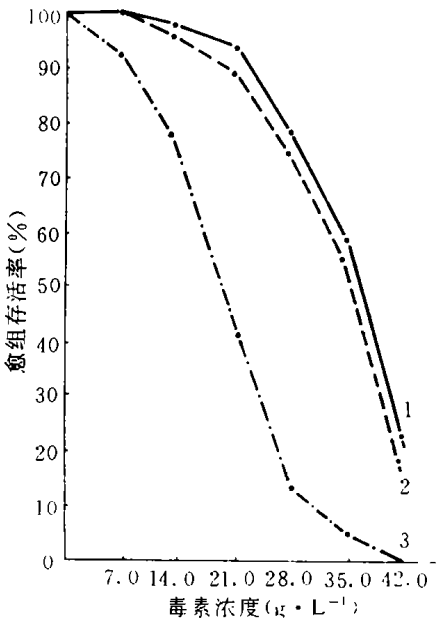

图 1 抗性系与亲本系愈组存活率的变化

1. KN^r-a; 2. KN^r-b; 3. KN^w (下图同)

2.2 一步正筛选系统

将筛选第 1代入选愈组经在无选择压和高选择压条件轮换培养筛选后,在最高选择代下存活的愈组即暂作为抗性变异细胞系,标记为 KN^r-b.在此系统中, 2个选择程序的筛选率分别达到 6.1×10^{-3}和 1.6×10^{-4}.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

2.3 抗性变异细胞系的毒素抗性鉴定

由图 1看,毒素对抗性系和亲本系愈组的生长有明显影响。随毒素浓度升高,其愈组存活率显著下降,但与亲本系相比,抗性系仍有较大的存活数,尤其是在较高的毒素浓度水平上。若以 35.0 g·L^{-1}毒素浓度水平上的愈组存活率为标准来衡量各材料的毒素抗性强弱,则抗性系 KN^r-a和 KN^r-b的毒素抗性强度分别是亲本系 KN^w 的 9.2和 8.9倍。

表 1 抗性系与亲本系愈组鲜重增量变化

g·块$^{-1}$

毒素(g·L^{-1})	KN^r-a	KN^r-b	KN^w
0.0(CK)	1.268	0.869	0.676
7.0	1.350	1.196	0.880
14.0	1.262	0.707	0.642
21.0	0.756	0.451	0.215
28.0	0.712	0.361	0.131
35.0	0.177	0.156	-0.071
42.0	0.137	0.116	-0.149

从表 1也可看出,随毒素浓度不断提高,抗性系愈组鲜重增量仍呈较大幅度的正向增长,而亲本系则表现出负向增大。说明了抗性系的毒素抗性较亲本明显提高。

2.4 抗性系细胞膜相对透性变化

将在梯度浓度毒素培养基上培养至第 12 d的抗性系和亲本系,进行膜透性测定的结果表明(图 2),随毒素胁迫水平提高,虽然抗性系与亲本系的膜透性均增大,但抗性系膜透性变化较为平缓,且始终低于亲本系。说明抗性系对毒素的忍耐力大于亲本系。

2.5 硝酸还原酶(NR)活性特点

分析抗性系 NR活性的结果表明,正常培养条件下,KN^r-a、KN^r-b的 NR活性分别是 2.55,3.53个酶活性单位,比亲本系 KN^w 高 0.79,1.77个酶活性单位;在 28.0 g·L^{-1}的毒素培养条件下,KN^r-a、KN^r-b的 NR活性分别为 0.80和 0.93,而 KN^w 则仅为 0.11.可见,毒素使愈组细胞内 NR活性降低,但解除毒素抑制后的抗性系愈组在正常条件下利用氮素的能力较亲本系增强。

2.6 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性特点

由图 3可见,无论在正常培养或毒素作用下,抗性系 KN^r-a、KN^r-b的 PAL活性均高于 KN^w,随毒素作用浓度由低升高,各系材料均表现出酶活性先升高后降低,酶活性高峰均出现在毒素浓度 14.0 g·L^{-1};在酶活性降低过程中,抗性系的降幅显著低于亲本系。

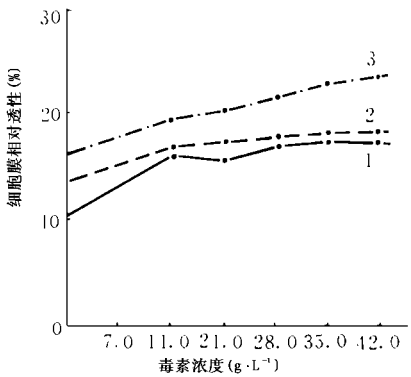

图 2 抗性系细胞膜相对透性变化

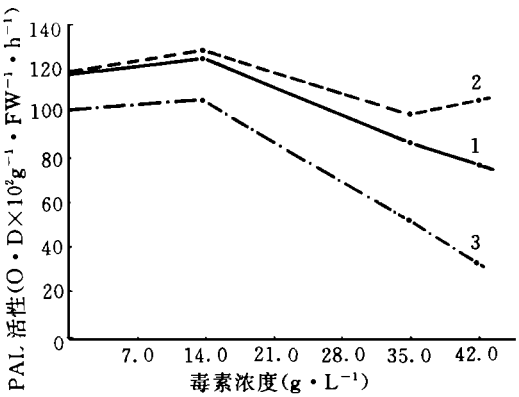

图 3 抗性系 PAL活性曲线

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

薛应龙等 (1991)在马铃薯晚疫病和玉米小斑病菌 T小种及大斑病对 PAL活性影响的研究中认为,用病原菌毒素处理同病菌接种感染一样能刺激 PAL活性升高,而且毒素的作用显得更强烈,一般 PAL活性与抗病性表现为正相关性。这从本研究中的抗性系 PAL活性变化特点中也能反映出来。

2.7　游离氨基酸组分分析

由表 2看出,抗性系的氨基酸总量水平下降,从游离氨基酸组分来看,抗性系的天冬氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的含量有所增多,苏氨酸+ 丝氨酸、谷氨酸、蛋氨酸、组氨酸的含量均有不同程度的减少;此外,胱氨酸虽是 2个抗性系氨基酸组分中含量最少的,但亲本系中未测出,胱氨酸可能属抗性系在毒素筛选中诱导产生的。故此认为,抗性系的生化代谢过程发生了变化,导致代谢产物也发生相应的改变,而这种次级代谢的变化属遗传上的变化。

表 2　抗性系的游离氨基酸组分

氨基酸	KN^r-a		KN^r-b		KN^w	
	绝对含量 ($mg \cdot kg^{-1}$)	相对含量 (%)	绝对含量 ($mg \cdot kg^{-1}$)	相对含量 (%)	绝对含量 ($mg \cdot kg^{-1}$)	相对含量 (%)
天冬氨酸	304.6	15.40	214.1	8.74	209.5	8.22
甘氨酸	91.8	4.64	156.1	6.37	75.1	2.95
缬氨酸	174.8	8.84	222.3	9.07	135.5	5.32
亮氨酸	75.1	3.80	59.1	2.41	57.9	2.27
苯丙氨酸	59.7	3.02	70.2	2.87	33.4	1.31
酪氨酸	48.1	2.43	28.1	1.15	26.4	1.04
苏氨酸+ 丝氨酸	446.8	22.60	530.3	21.65	735.0	28.84
谷氨酸	251.8	12.73	164.6	6.72	303.7	11.92
蛋氨酸	22.1	1.12	14.3	0.58	26.3	1.03
组氨酸	32.4	1.64	33.8	1.38	41.3	1.62
赖氨酸	25.5	1.29	80.0	3.27	79.5	3.12
胱氨酸	5.2	0.26	1.5	0.06	–	–
脯氨酸	120.6	6.10	85.0	3.47	157.8	6.19
丙氨酸	217.6	11.00	658.3	26.87	491.8	19.30
异亮氨酸	71.3	3.61	43.2	1.76	59.6	2.34
精氨酸	30.0	1.52	89.2	3.64	115.5	4.53
总　量	1977.4	100.00	2450.2	100.01	2548.3	100.00

3　结论与讨论

1)在众多的植物病害以毒素为选择压的抗病突变体离体筛选研究中,以生理生化指标作为间接证据对变异体或突变体的鉴定是一个重要的鉴定指标和手段。如水稻稻瘟病[9],玉米小斑病[10]、小麦根腐病[11]、马铃薯晚疫病[12]等的研究中均揭示了其生理生化代谢途径和产物的变化与抗毒素性或抗病性间的关系,而且本文对小麦禾谷镰刀菌毒素抗性变异细胞系的生理生化特性研究与以上各类作物的研究有一定程度的相似性。

2)通过抗性系生理生化特性的分析,初步揭示出细胞水平上禾谷镰刀菌毒素的作用机理为: 破坏细胞膜结构,使原生质等外漏,导致细胞坏死;减弱受害细胞 NR活性,使其利用培养基中硝酸盐 (主要氮源)的能力降低,生长受抑;较高浓度毒素为害时,使细胞内

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

PAL活性减弱,从而削弱苯丙酸类物质代谢,影响“植保素”类物质的产生,降低细胞的生活力和抗性;使细胞本身具有的保护系统的防御机理受损;毒素还影响细胞的物质代谢过程,导致某些代谢产物发生变化。

3)抗性变异细胞系对毒素表现出一定抗性的可能原因是:① 加强细胞膜渗透调节功能,使物质外漏量减少,保证细胞生长所需的正常环境条件;② 硝酸还原酶活性增强,使氮代谢功能加强;③ 通过调节激活苯丙氨酸类物质的代谢,苯丙氨酸和酪氨酸等苯丙酸类物质的合成与分解的酶促反应活动剧烈,但始终保持合成代谢强于分解代谢,使细胞内有较多的苯丙氨酸、酪氨酸等,利于形成木质素,从而形成发达的导管系统,改善营养物质供给,促进细胞旺盛代谢,如此次生代谢发生了遗传上的改变,导致细胞抗毒素性的增强。

参 考 文 献

1 李克昌.小麦赤霉病及其防治.上海: 上海科技出版社, 1982

2 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病突变体的研究.见: 胡含,王恒之主编.植物细胞工程与育种.北京: 北京工业大学出版社, 1990, 254~ 260

3 李静,黄梧芳.应用组织培养方法诱发小麦抗赤霉菌毒素突变体研究初报.河北农业大学学报, 1992, 5(1): 47~ 51

4 孙光祖,王广金,陈义纯等.小麦抗赤霉病突变体的选育及其变异研究.核农学通报, 1995, 9(1): 1~ 6

5 刘思衡,廖海林,潘祥华.应用赤霉病菌粗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

6 西北农业大学主编.植物生理学实验指导.西安: 陕西科学技术出版社, 1986 149~ 151

7 陈 薇,张德颐.植物组织中硝酸还原酶的提取测定及纯化.植物生理学通讯, 1980(4): 45~ 49

8 薛应龙,欧阳光察,澳绍根.植物苯丙氨酸解氨酶的研究.植物生理学报, 1983, 9(3): 301~ 305

9 张江涛,段光明,于泽英等.苯丙氨酸解氨酸(PAL)与水稻抗稻瘟病的关系.植物生理学通讯, 1987(6): 34~ 37

10 Gengenbach B G, Rines H W. Use of phytotoxins in selection of disease resistence mutents in tissue culture. Iowa state Journal of Research, 1986, 60(4): 449~ 476

11 孙光祖,陈义纯,王广金等.辐射与离体培养结合选育小麦根腐病突变系的研究.见: 陈英主编.植物体细胞无性系变异与育种.南京: 江苏科学技术出版社, 1991, 262~ 270

12 王敬文,薛应龙.植物苯丙氨酸解氨酶的研究.植物生理学报, 1982, 8(1): 35~ 43

Selection of the Wheat Variant Cell Lines Resistant to *Fusarium graminearum* Toxin

Fu Xuelin He Ping Zhu Qinglin

(*Northwestern Agricultural University*, *Yangling*, *Shaanxi*, 712100)

Abstract The wheat variant cell lines resistant to *Fusarium graminearum* toxin, KN^r-a and KN^r-b, were selected through multi-step selection system and one-step selection system from stably-growing wheat (Kangyan 03× No18) F_1 generation anther. Resistance character analysis showed these two resistance lines had raised their toxin resistance to *Fusarium graminearum* significantly. Their plasma membrance permeability, NR activity, PAL activity, free amino acid contents and peroxidese isozyme bands were all changed. Hence, the mechanism of the toxic effect at cell level was primarily put forward, explaining in some degree some of the reasons why the resistance variant cell lines had certain resistance to the toxin.

Key words Wheat, *Fusarium graminearum*, resistance variant cell lines, resistance character

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w