

禾谷镰刀菌毒素对小麦花药培养特性的影响研究^{*}

郭新梅, 陈耀锋, 任慧莉, 郭东伟, 李春莲

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 用不同浓度的禾谷镰刀菌毒素对离体培养的小麦花药进行胁迫。结果表明, 在低浓度(质量浓度)时毒素具有类激素活性效应, 能够促进小麦花药组织脱分化, 形成愈伤组织; 高浓度时毒素表现毒害作用, 抑制花药的脱分化和愈伤组织的形成。当毒素质量浓度大于 0.5 g/L 时, 随着胁迫浓度的增加, 毒素的毒害作用增强, 小麦花药的脱分化和形成愈伤组织的能力迅速下降, 表现在降低花药反应率和愈伤组织诱导率 2 个方面。同时毒素的这种效应, 因供试材料基因背景的不同而有一定差异。比较而言, 含感病基因的杂种花药对毒素敏感。

[关键词] 禾谷镰刀菌; 粗毒素; 小麦花药; 类激素活性; 花药反应率; 愈伤组织诱导率

[中图分类号] S512.103.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0005-04

随着植物细胞与组织培养技术的发展, 利用离体培养的植物细胞在细胞水平上直接进行遗传修饰已成为作物改良的一个重要生物技术手段^[1]。禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)是引起小麦赤霉病的 18 种镰刀菌种或变种的主要病原菌^[2], 它不仅使小麦罹病而减产, 而且罹病麦粒中产生并累积病原菌毒素, 导致人畜中毒, 危害甚大。据估计, 在目前的商品小麦籽粒中, 有 83% 的小麦穗粒均不同程度地带有禾谷镰刀菌毒素。因此, 小麦抗赤霉育种已引起科学工作者的广泛关注。迄今为止, 在小麦及其亲缘植物中无免疫品种, 已有的抗源只是抗性程度上的差异^[3]。因而寻找新的抗源, 提高丰产品种的抗性已成为生产上迫切需要解决的问题。利用赤霉病主要病原菌产生的粗毒素作为筛选剂, 进行小麦抗赤霉基因型筛选的生物技术育种, 已是当今小麦抗赤霉育种的重要课题^[4]。小麦感抗赤霉病材料杂交一代的小孢子含有丰富的重组基因型, 利用小麦抗赤霉育种的细胞具有抗镰刀菌毒素且细胞水平上的抗性与植株水平的抗性一致的特点^[5], 以镰刀菌毒素直接胁迫小麦花药组织, 就可能使抗赤霉毒素的小孢子得以选择, 并经一定技术诱导分化成株, 再经染色体加倍后获得纯合的抗毒素二倍体, 进而筛选出抗赤霉基因型。在这些方面, 虽有些实践上的工作, 但现在人们还没有搞清楚镰刀菌毒素胁迫下小麦的培养特性^[6]。本研究的目的在于通过镰刀菌毒素胁迫

具有不同抗性特性的杂种一代花药细胞, 研究毒素胁迫条件下的小麦雄核发育特性, 为抗赤霉细胞工程育种中抗赤霉基因型的筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为西北农林科技大学植物细胞工程研究室提供的 3 个普通小麦杂种一代材料: 小偃 22 × 西农 1376, 西农 1376 × 苏麦三号和苏麦三号 × 西农 85。其中亲本的抗赤霉病特性依苏麦三号, 西农 85, 小偃 22, 西农 1376 依次降低。

1.2 粗毒素的制备

称取 500 g 禾谷镰刀菌麦粒干培养物, 加 2 500 mL 体积分数 85% 乙醇提取 5 d (每天搅动 1~2 次), 将浸提液倒入三角瓶中, 培养物再按上述方法提取 1 次。将 2 次的提取液混合, 放置常温下自然挥发至体积不再变化后, 将提取液用纱布过滤, 再用滤纸过滤, 即可得到粗提毒素。将粗提毒素加蒸馏水定容至 1 000 mL, 配成浓度为 0.5 g/L 的粗毒素母液。

1.3 材料处理

4 月初, 取大田中不同材料的小麦幼穗中部花药做醋酸洋红镜检, 选择花药小孢子处于单核靠后期的幼穗^[7], 置于 4℃ 冰箱低温处理 24~48 h。低温处理后的小麦幼穗除去叶片, 用体积分数 75% 酒精

^{*} [收稿日期] 2002-11-07

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2002K01-G01); 陕西省分子生物学重点实验室项目(2002-7)

[作者简介] 郭新梅(1978-), 女, 河南鲁山人, 在读硕士, 主要从事农业生物技术研究。

[通讯作者] 陈耀锋(1956-), 男, 陕西岐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种研究。

擦拭进行表面消毒, 在无菌条件下剥取幼穗中部的花药, 接种于对照和含毒素胁迫的 5 种小麦花药愈伤组织诱导培养基中。

1.4 培养基及培养条件

愈伤组织诱导培养基为附加 2 mg/L 2, 4-D, 0.5 mg/L KT, 100 g/L 蔗糖和 5.5 g/L 琼脂的 W₁₄ 培养基。在此培养基中分别附加 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 g/L 6 种不同质量浓度的粗毒素母液, 共制成 6 种处理。每处理接种 10~12 瓶, 每瓶接种 80~100 枚花药。接种后, 将培养瓶置于散光, 25~28 条件下诱导愈伤组织。培养 45~60 d 时, 统计反应的花药数(即产生愈伤组织的花药数)及愈伤组织数。

花药反应率和愈伤组织诱导率分别用下式计算:

花药反应率/% = (反应的花药总数/总花药数) × 100%;

愈伤组织诱导率/% = (产生愈伤组织数/总花药数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 禾谷镰刀菌粗毒素对小麦花药培养特性的影响

小麦花药组织在脱分化过程中, 对镰刀菌毒素的胁迫具有很强的敏感性。诱导培养基中附加 0.5 g/L 的粗毒素后, 花药组织的花药反应率和愈伤组织诱导率均比不加毒素的对照略有升高(表 1), 之后随着诱导培养基中毒素胁迫浓度的增加, 小麦花药组织的花药反应率和愈伤组织诱导率迅速下降, 在 6.0 g/L 时, 多数花药变褐死亡, 不产生愈伤组织, 花药反应率和愈伤组织诱导率都极低。表明镰刀菌毒素在低浓度时促进花药组织脱分化和形成愈伤组织, 但在高浓度时, 对小麦花药组织脱分化能力有抑制作用, 且随胁迫浓度提高, 这种作用愈加显著。

表 1 禾谷镰刀菌粗毒素对小麦花药培养特性的影响

Tabel 1 The effect of the crude toxin of *Fusarium graminearum* on wheat anther culture characteristic

毒素质量浓度/ (g · L ⁻¹) Concentration of toxin	接种花药数 No. of anthers planted	出愈花药数 No. of anthers giving calli	花药反应率/% Reponse frequency of anthers	产生愈伤组织数 No. of calli	愈伤组织诱导率/% Induction frequency of pollen calli
0.0	1 290	131	10.16	158	12.25
0.5	1 204	125	10.38	150	12.46
1.0	1 488	91	6.12	103	6.92
2.0	1 572	76	4.98	97	6.35
4.0	1 458	42	2.88	48	3.29
6.0	1 508	1	0.06	1	0.06

注: 表中数据为总体平均值。

Note: The data in the table are the total average

2.2 禾谷镰刀菌毒素对不同基因型小麦花药培养特性的影响

研究 3 种具有不同抗感赤霉基因型的 F₁ 代花药组织在镰刀菌毒素胁迫下的培养特性结果表明: 3 种具有不同抗感赤霉病遗传背景的小麦花药组织在脱分化过程中, 对镰刀菌毒素胁迫的反应具有一定的差异。不同基因型杂交一代小麦花药反应率和愈伤组织诱导率差异很大, 而且每种基因型在各自敏感浓度范围内, 随着毒素胁迫浓度的增加, 花药组织的花药反应率和愈伤组织诱导率的变化趋势也不同(图 1, 图 2)。苏麦三号 × 西农 85 和西农 1376 × 苏麦三号杂交组合在 0.5 g/L 低毒素质量浓度胁迫下, 小麦花药的花药反应率和愈伤组织诱导率比无毒素胁迫的对照略有升高, 之后随着毒素胁迫浓度的升高, 花药反应率和愈伤组织诱导率缓慢下降。而小偃 22 × 西农 1376 在低毒素浓度 0.5 g/L 胁迫

下, 花药反应率和愈伤组织诱导率比对照略低, 之后随着毒素胁迫浓度的增加, 花药反应率和愈伤组织诱导率迅速下降。亲本为 2 个抗性杂交组合时, F₁ 代花药组织对毒素的敏感性低, 在各个毒素浓度上, 苏麦三号 × 西农 85 杂交组合的 F₁ 代花药组织对毒素的敏感性低, 花药反应率和愈伤组织诱导率都明显高于其他材料, 随着毒素胁迫浓度增大, 花药反应率和愈伤组织诱导率下降平缓, 并且在 6.0 g/L 时仍有少量花药具有脱分化能力, 产生愈伤组织, 表明其抗性优于其他杂交组合。亲本为两感病材料时, 如杂交组合小偃 22 × 西农 1376, 在低毒素浓度下, 花药反应率和愈伤组织诱导率比对照略低, 随毒素胁迫浓度的增加, 花药反应率和愈伤组织诱导率迅速下降, 且在 4.0 g/L 时, 花药组织已完全变褐死亡, 受到抑制, 无脱分化能力, 表明其对毒素胁迫非常敏感。而亲本为抗感杂交组合的西农 1376 × 苏麦三号

对毒素的敏感性恰好居二者之间, 在毒素胁迫下, 随毒素胁迫浓度的增加, 花药反应率和愈伤组织诱导

率下降较为平缓, 在 40 g/L 仍有 2% 的花药反应率和 22% 的愈伤组织诱导率。

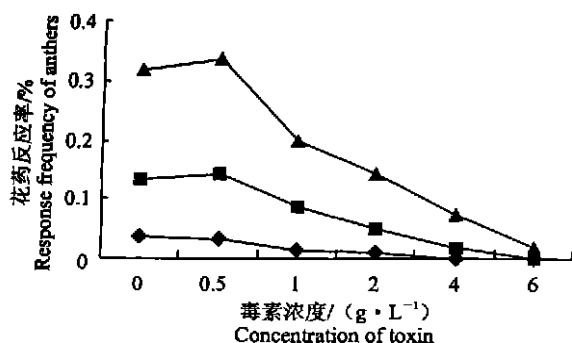


图 1 不同基因型在不同毒素浓度胁迫下的花药反应率

- ▲ - . 苏麦三号 × 西农 85; - □ - . 西农 1376 × 苏麦三号;
- ◆ - . 小偃 22 × 西农 1376

Fig 1 Response frequency of anther of variant wheat genotype to different concentration of the crude toxin

- ▲ - . Sumai No. 3 × Xinong 85;
- □ - . Xinong 1376 × Sumai No. 3;
- ◆ - . Xiaoyan 22 × Xinong 1376

由于 3 种材料的抗病基础不同, 对毒素的敏感有一定差异, 对毒素胁迫的拮抗能力不同, 相对而言, 抗性杂交组合的杂种一代花药对毒素胁迫不敏感, 耐受能力强。

3 讨论

欧阳俊闻等^[1]首次以镰刀菌培养滤液为筛选剂, 在诱导和分化 2 个水平上进行抗赤霉的离体筛选, 并获得 2 个对赤霉病抗性有明显提高的突变系。Fadel 等^[8]使用具有不同抗性特性亲本的 8 个杂交 F_1 代进行花药培养, 证明在镰刀菌毒素胁迫的诱导培养基上, 花粉胚和愈伤组织形成的数目有所减少。同时注意到, 当供体杂种 F_1 的亲本材料为感病材料时, 其对低浓度的镰刀菌毒素很敏感。刘宗镇等^[9]研究证明, 禾谷镰刀菌毒素的主要成分 DON 具有类生长素活性, 能提高赤霉病菌的侵染能力和病情严重程度, 并对小麦愈伤组织的生长和分化产生影响。本研究证实, 在花药组织离体培养中, 毒素具有类激素

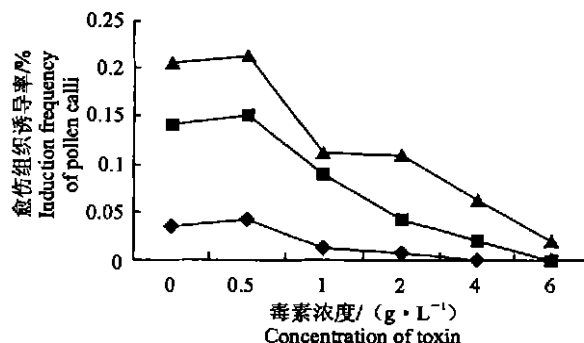


图 2 不同基因型在不同毒素浓度胁迫下的愈伤组织诱导率

- ◆ - . 小偃 22 × 西农 1376; - □ - . 西农 1376 × 苏麦三号;
- ▲ - . 苏麦三号 × 西农 85;

Fig 2 Induction frequency of pollen calli of variant wheat genotype to different concentration of the crude toxin

- ◆ - . Xiaoyan 22 × Xinong 1376;
- □ - . Xinong 1376 × Sumai No. 3;
- ▲ - . Sumai No. 3 × Xinong 85;

活性和毒害双重作用, 在低浓度时能促进小麦花药组织脱分化形成愈伤组织, 高浓度时表现出毒害作用, 抑制花药的脱分化和愈伤组织的形成, 并且随毒素胁迫浓度的增加, 毒害作用增强, 小麦花药反应率和愈伤组织诱导率下降。同时毒素的这种效应因供试材料具有不同的抗感赤霉病基因型而有一定差异。亲本含感病材料的杂种花药对毒素敏感, 对毒素的这种效应表现明显, 而亲本为两抗性材料的杂种花药对毒素不敏感, 且有一定的抗性。本试验还表明, 毒素胁迫可以作为筛选抗赤霉细胞工程育种的筛选剂。用传统育种方法获得抗赤霉材料是可能的, 但需要相当大的群体和较长时间。小麦感抗赤霉材料杂交 F_1 代的小孢子含有丰富的重组基因型, 用镰刀菌毒素直接胁迫小麦花药组织, 使对毒素敏感的基因类型首先被淘汰, 缩小筛选群体, 这样一方面有利于选择抗赤霉的细胞突变体, 另一方面更有利于定向选择那些具有高抗赤霉毒素能力的基因型, 从而提高抗赤霉基因型的筛选率。

[参考文献]

- [1] 欧阳俊闻, 周嘉平, 贾双娥. 应用花药培养体系筛选小麦抗赤霉突变体的研究[J]. 胡含, 王恒立. 植物细胞工程与育种[C]. 北京: 北京工业大学出版社, 1990. 254-260.
- [2] 唐风兰, 王广金, 李忠杰, 等. 提高小麦幼胚离体培养效率的研究[J]. 黑龙江农业科学, 1994, (4): 36-39.
- [3] 姚金保, 陆维忠. 中国小麦抗赤霉病育种研究进展[J]. 江苏农业学报, 2000, 16(4): 242-248.

- [4] 夏奇梅. 小麦抗赤霉病杂种花药的花培研究[J]. 南京农业大学学报, 1988, 11(2): 30- 34
- [5] 陆维忠, 程顺和, 沈晓蓉, 等. 细胞工程在小麦抗赤霉病育种中的利用[J]. 江苏农业学报, 1998, 14(1): 9- 14
- [6] 陈耀锋, 韩德俊, 李春莲, 等. 普通小麦抗赤霉细胞工程育种研究[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(3): 217- 221
- [7] 何定钢, 欧阳俊闻. 小麦不同发育时期花药对离体培养的反应[J]. 遗传, 1984, 6(2): 609- 612
- [8] Fadel F, Wenxel G. *In vitro* selection for tolerance to *Fusarium* in *F₁* microspore population of wheat[J]. Plant Breeding, 1993, 110(2): 89- 95
- [9] 刘宗镇, 陆仕华, 黄晓敏, 等. DON 毒素的类生长激素活性与小麦赤霉病[J]. 上海农业学报, 1993, (增刊): 56- 62

Studies of the effect of *Fusarium graminearum* toxin on wheat anther culture characteristic

GUO Xin-mei, CHEN Yao-feng, REN Hui-li, GUO Dong-wei, LI Chun-lian

(College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Response of *in vitro* wheat anther to *Fusarium graminearum* toxin was studied using induction medium containing *Fusarium graminearum* crude toxin. The results showed that the toxin had the hormone-like activity and promoted wheat anther tissue to differentiate and form anther callus in the low concentration. At the same time, the toxin had toxicity and affected differentiation of wheat anther and formation of anther callus in the high concentration. When the concentration of the toxin was higher than a certain degree, crude toxin had stronger toxicity with the increasing of the concentration. The abilities of wheat anther differentiation and forming callus fell down quickly and the effects existed in such aspects as reducing the response frequency of wheat anther and induction frequency of anther callus. In addition, the effect of crude toxin was different among variant genotype. In general, anthers from susceptible cultivars/hybrids were easier to be killed by lower toxin concentrations than those from cultivars/hybrids of less susceptible parents.

Key words: *Fusarium graminearum*; crude toxin; wheat anther; the hormone-like activity; response frequency of wheat anther; induction frequency of anther callus