

CNIC—01201

CSANS—0117

利用体细胞无性系变异选育小麦 抗赤霉病新品系的研究

孙光祖

(黑龙江省农业科学院作物育种研究所, 哈尔滨)

摘 要

利用辐射与离体培养、细胞筛选相结合的方法进行小麦抗病体细胞无性系变异的筛选, 选出了4个抗赤霉病新品系。经多年田间接种鉴定和考察, 抗病品系的抗病能力较亲本提高1~2级, 一些主要农艺性状也发生了变异。在病原菌或毒素作用下, 研究了抗病品系及其亲本过氧化物同工酶、超氧化物歧化酶、细胞表面糖蛋白层和细胞超微结构的变化, 获得了抗病性的生化标记, 并分析了抗病机理。

**Selection of Wheat Lines with
Resistance to *Fusarium graminearum*
by Somaclonal Variation**

(In Chinese)

SUN Guangzu

(Institute of Crops Breeding, Helongjiang Academy
of Agricultural Sciences, Harbin)

ABSTRACT

The screening wheat new lines which have the resistance to *Fusarium graminearum* were completed by *in vitro* induced mutation and cell screening. Four new lines with resistance to *Fusarium graminearum* were obtained. The field inoculating determination in 1990~1996 showed that their resistance was 1~2 degree higher than that of parents, and there were variations in main agronomical traits between the new lines and their parents. Changes of the defensive enzymes (SOD, POD), sugar-protein on cell surface, and ultra-structure were investigated by using new lines and their parents under the action of toxin of *Fusarium graminearum*. The new lines under the action of toxin of *Fusarium graminearum* have the ability to increase the defensive enzyme activity and thickness of sugar protein on cell surface and to reduce the damage of cell membrane system that would result in resistance increasing.

前 言

许多研究表明,禾谷类作物的细胞和组织在离体培养中会产生许多体细胞无性系变异,并可用于品种改良^[1~4]。离体诱变可以扩大体细胞无性系变异,为作物育种提供更多的变异来源。

小麦赤霉病是世界性病害,在中国长江中下游和华北冬麦区以及东北春麦区危害严重,不仅使小麦减产,而且使品质变坏,失去使用价值。抗赤霉病育种已成为当今小麦育种的重要课题。从1988年起,我们利用辐射与离体培养和细胞筛选相结合的方法,研究了抗小麦赤霉病细胞无性系变异,选出了抗赤霉病的小麦新品系。

1 试验简述

1.1 辐射处理和组织培养

以60余份品种、品系和杂交后代为试材,取其幼穗、幼胚进行组织培养。辐射处理主要采取下列方式:(1)在小麦植株不同生育期以0.6,1.0和14 Gy ^{60}Co γ 射线进行活体照射,取幼穗和幼胚接种;(2)用0.5~15 Gy ^{60}Co γ 射线辐照风干种子,播于田间,取幼胚接种;(3)取幼穗、幼胚接种3 d后用0.5~10 Gy ^{60}Co γ 射线照射。诱导培养基为MS+2,4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L,蔗糖30 g/L,琼脂8 g/L,pH值为5.8。在室温 $24\pm 1^\circ\text{C}$ 条件下培养20~30 d。分化培养基除不加2,4-D外,其它同诱导培养基。壮苗培养基为大量元素减半的MS+MET 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L。每天光照16 h,光照强度20 klx。当再生苗高10~15 cm时,炼苗3~5 d,然后移入小盆内置于光照培养箱内培养7 d左右,再移到大花盆内,精心管理,直至成熟。

1.2 细胞筛选

以赤霉病菌粗毒素作为筛选因子进行筛选,筛选方法有两种:(1)直接法:将粗毒素加入诱导培养基中,选择压力为25~100 mg/L。将存活的愈伤组织移入继代培养基或分化培养基中。分化出的再生苗经炼苗后移入大花盆中,精心培育,直至成熟。(2)间歇法:在含毒素的培养基上培养两代(每代20~25 d)后,在无毒素培养基上巩固一次,然后转分化。

用常规方法统计愈伤组织诱导率和得苗率。接种后第40天,统计愈伤组织存活率。根据正交多项式回归分析,在对各效应指标趋势比较的基础上,依最小二乘法原理,建立 γ 射线(x_1)和毒素浓度(x_2)和各效应指标(y)的回归方程。经逐步回归,依次剔除偏回归平方和不显著项,求取最优多项式回归方程。最后将各变量的值代入该方程进行 γ 值拟合性测验。

1.3 植株赤霉病的抗性鉴定

S_2 植株以穗行种植,开花期用孢子悬浮液(在 10×10 视野下有30~50个孢子)喷雾接种。乳熟期调查穗部发病情况,并进行初选,成熟后结合农艺性状选择优良的抗病单株。 S_3 代以上的植株用孢子悬浮液进行定位单花注射接种,成熟前按五级标准调查发病情况,计算反应指数,结合农艺性状选择优良单株和株系。

1.4 抗病品系产量及其主要农艺性状测定

入选的优良抗病品系依照常规参加各级产量鉴定试验。另外,成熟后随机取抗病品系及其亲本各20株,进行考种。求其株高、穗长和主穗小穗数等平均值以及标准差和变异系数,并用 t 值测定差异显著性。

1.5 抗病品系及其亲本过氧化物同工酶、超氧化物歧化酶分析

将抗病品系及其亲本的精选种子表面消毒后,播在铺有湿滤纸的培养皿中,置于 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温箱中发芽。露白时,一部分种子每天用20%的赤霉病菌粗毒素液浇灌,另一部分用蒸馏水浇灌。发芽4 d后,取0.5~1.0 cm幼芽进行过氧化物同工酶(POD)测定。称取1 g样品,加入4 ml

0.3 mol/L蔗糖、0.01 mol/L KCl、0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=7.2), 在冰浴上研磨成浆, 以 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于冰箱中备用。采用薄层垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 分离胶浓度 7.5%, 浓缩胶浓度 2.8%。电泳为不连续系统, 电极缓冲液系统为 Tris-甘氨酸缓冲液, 在 4℃ 冰箱中电泳。醋酸苯胺染色, 胶板在 7% 醋酸中保存并进行拍照。

超氧化物歧化酶活性分析的样品处理同过氧化物同工酶, 但测定样品为 1.0~2.0 cm 的幼根。称 2 g 样品, 加 4 ml 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=7.8), 在冰浴上研磨成浆。匀浆以 14 000 r/min 冷冻离心 20 min, 取上清液。在 3 ml 反应液 (1.3 μmol/L 核黄素, 13 mmol/L 甲硫氨酸, 63 μmol/L NBT (氮蓝四唑), 0.05 mol/L pH=7.8 的磷酸缓冲液) 中加酶液后光照 20 min, 560 nm 下测光密度。以缓冲溶液代替酶液作对照。抑制 50% NBT 光化还原为 1 个酶单位, 计算 SOD 活性。

1.6 抗病品系及其亲本细胞表面糖蛋白观察

将抗病品系及其亲本播于田间。在开花期用赤霉病菌孢子悬浮液 (在 10×10 视野下有 50~60 个孢子) 喷雾接种。12, 24 和 36 h 后分别取小穗中间的内颖。以未接种穗作对照。把上述内颖中部切成 0.5×1.0 mm 的小块, 用含有 1 mg/L 钨红的 2.5% 戊二醛固定染色 2 h, 再用含有 0.5 mg/L 钨红的钨酸后固定 3 次, 共计 3 h。常规方法脱水, Epon812 树脂包埋, 超薄切片, 干燥后用透射电镜观察并摄影。

1.7 抗病品系及其亲本细胞超微结构的观察

在小麦开花时, 拨取抗病品系及其亲本的内颖, 分别浸在蒸馏水和 70% 的赤霉病菌毒素中, 减压浸透使材料下沉。在 24℃ 条件下分别处理 2, 10 和 20 h。将毒素和蒸馏水浸泡过的样品用 4% 的戊二醛固定 3~4 h, 再用钨酸后固定, 常规方法脱水, Epon812 树脂包埋, 超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, 透射电镜观察并摄影。

2 主要结果

2.1 γ 射线与毒素复合处理对愈伤组织诱导率和存活率的影响

研究表明 (见图 1), 愈伤组织的诱导率基本上随毒素浓度和 γ 射线剂量的提高而下降, 毒素的抑制作用大于 γ 射线, 50 Gy 照射处理的诱导率与对照相差无几, 100 Gy 照射处理的诱导率明显下降。培养基中的毒素浓度为 50 ml/L 时, 诱导率降低较少, 超过 50 ml/L 时, 诱导率随毒素浓度增加明显下降。

剂量效应方程与上述结论一致 (见表 1)。低剂量照射对愈伤组织的抑制作用较小, 随剂量升高, 抑制作用迅速增加。照射与毒素复合处理的影响大于相应的单一处理, 两因素在龙辐麦 3 号上独立效应, 在黑 85-6497 上为负协同效应。

γ 射线与毒素处理均降低了愈伤组织的存活率, 但射线的作用远低于毒素 (见图 2)。对照 85-6497, 两因素处理间为独立效应; 而对龙辐麦 3 号, γ 射线的作用很小, 在逐步回归中被剔除 (见表 1)。

γ 射线与毒素复合处理的愈伤组织存活率显著低于相应处理的愈伤组织诱导率 (见图 1, 2), 这是由于复合处理使部分愈伤组织在筛选过程中逐步变褐死亡所致。较高浓度 (100~200 ml/L) 下, 龙辐麦 3 号的存活率显著低于黑 85-6497。说明试材不同, 其愈伤组织抗毒素的能力也不同, 而且在耐辐射能力上也存在差异。

表 1 愈伤组织诱导率 (y_1)、接种后第 40 天愈伤组织存活率 (y_2) 及愈伤组织平均生长量 (y_3) 依 γ 射线 (x_1) 和毒素浓度 (x_2) 的回归方程

Table 1 Regression Equation for Induction Frequency of Callus (y_1), Survived Rate (y_2) and Mean Growth Amount (y_3) of Callus 40 Days after Inoculation with Respect to γ -ray (x_1) and Concentration of Toxin (x_2)

材料 Materials	回归方程 Regression equation	F 测验 F test	复相关系数 Multiple correlation coefficient
龙辐麦 3 号 Longfu 3	$y_1 = 101.65230 - 0.00101 x_1^2 - 0.46060 x_2$ $y_2 = 98.79002 - 0.74863 x_1^2$ $y_3 = 0.14147 + 0.00058 x_1 - 0.00001 x_1^2 - 0.00067 x_2$	126.8369** 77.2182** 145.4980**	0.977155 0.96328 0.98763
黑 85-6497 Hei 85-6497	$y_1 = 104.50170 - 0.00292 x_1^2 - 0.29825 x_2 - 0.00060 x_1^2$ $+ 0.00001 x_1^2 x_2$ $y_2 = 100.86080 - 0.00233 x_1^2 - 0.53640 x_2$ $y_3 = 0.14911 + 0.00136 x_1 - 0.00002 x_1^2 - 0.00051 x_2$	114.0324** 60.50081* 274.8293**	0.98922 0.97107 0.99819

* 差异显著; ** —— 差异极显著。

* —— Difference is significant at 0.05 level; ** —— Difference is significant at 0.01 level.

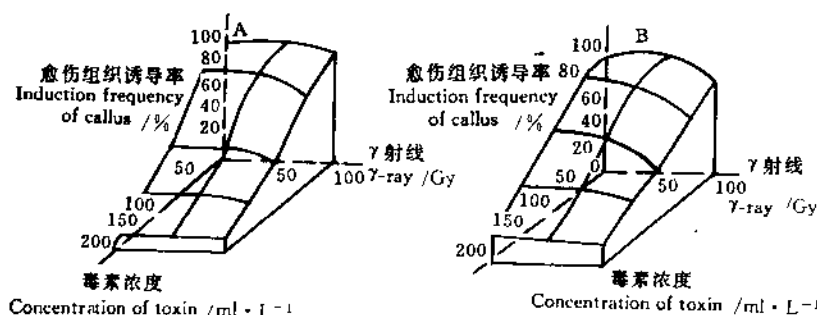


图 1 ^{60}Co γ 射线与赤霉菌毒素对愈伤组织诱导率的影响

Fig. 1 Influence of ^{60}Co γ -ray combined with *F. graminearum* toxin on induction frequency of callus

A: 龙辐麦 3 号 Longfu 3; B: 黑 85-6497 Hei 85-6497.

2. 2 抗赤霉病品系的获得

经多年研究, 选出了 RB976, RB325, RB320 和 RB383 等 4 个抗赤霉病品系。RB976 (决选系号 92K809, 92K803) 是由新克早 9 号的 M_1 幼胚在含赤霉菌粗毒素 (75 ml/L) 的诱导培养基上经离体筛选得到的。RB325, RB320 和 RB383 是用 γ 射线分别辐照龙 83-6516 的幼穗、克丰 3 号的幼胚和克 838 的幼穗后, 在含赤霉菌粗毒素 (100 ml/L) 的诱导培养基上经离体筛选而得到的。经 3 年接菌鉴定, 4 抗病品系的平均抗病反应指数分别为 1.1 (亲本为 4.3)、1.4 (亲本为 3.4)、1.5 (亲本为 3.0) 和 1.2 (亲本为 3.9), 抗病能力较亲本提高 1~2 级。另外, 抗病品系与亲本相比, 在株高、穗长和主穗小穗数等数量性状上也发生了正负两个方向的变异 (见表 2), 经 t 值检测, 除主穗粒数外, 其它数量性状的差异均达到显著或极显著水平。

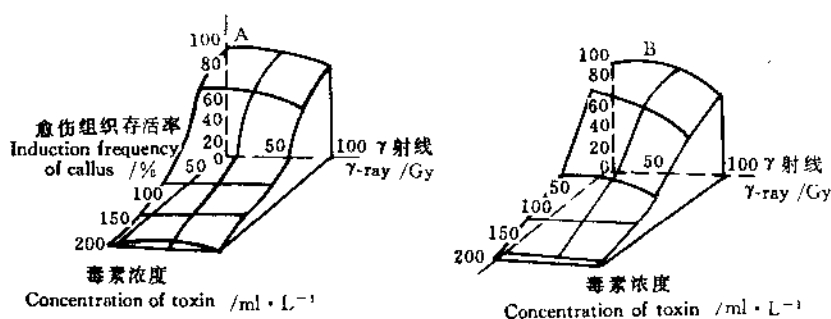


图 2 ^{60}Co γ 射线与赤霉菌毒素接种后第 40 天愈伤组织存活率的影响

Fig. 2 Influence of ^{60}Co γ -ray combined with *F. graminearum* toxin on survived rate of callus 40 days after inoculation

A: 龙辐麦 3 号 Longfu 3; B: 黑 85-6497 Hei 85-6497.

表 2 抗赤霉病品系及其亲本的主要农艺性状

Table 2 Major Agronomical Trait of the Resistant Lines and Their Parents

抗病品系 及其亲本 Resistant lines and their parent	株 高 Height of plant cm			穗 长 Length of spike cm			主穗不穗数 Spikelets per spike			主穗粒数 No. of Kernel/spike			不育 小穗率 Sterility of spikelet %	千粒重 Weight of 1000 kernels g
	$\bar{X}$	σ	c.v/ %	$\bar{X}$	σ	c.v/ %	$\bar{X}$	σ	c.v/ %	$\bar{X}$	σ	c.v/ %		
RB976	99.3**	2.3	2.32	12.0**	0.6	5.00	2.9**	1.9	6.68	53.4	11.8	22.10	6.85	34.7
Xinkehan No. 9	94.0	4.9	5.21	10.4	0.9	8.65	19.2	1.0	5.21	43.2	8.6	19.90	4.16	35.5
RB325	113.1**	3.7	3.27	12.8*	0.7	5.27	23.5**	1.6	6.81	61.5	10.1	16.42	7.66	35.2
Long83-6515	98.4	4.5	4.57	12.1	0.6	4.96	20.5	1.4	6.83	62.0	8.5	13.70	14.15	39.9
RB325	82.0**	4.9	5.98	11.6*	0.7	6.03	20.5*	1.0	4.88	52.9	9.4	17.77	3.94	27.4
Kefen No. 3	86.7	4.0	4.62	12.5	1.0	8.00	18.9	1.7	9.00	53.3	14.5	27.21	6.35	34.4
RB383	112.1**	2.4	2.14	12.1*	0.6	4.96	18.3	0.7	3.83	48.3	10.1	20.91	3.28	39.1
Ke858	106.6	5.1	4.78	12.7	0.6	4.72	19.9	2.6	13.07	56.6	11.4	20.14	2.63	37.4

* — 差异显著; ** — 差异极显著.

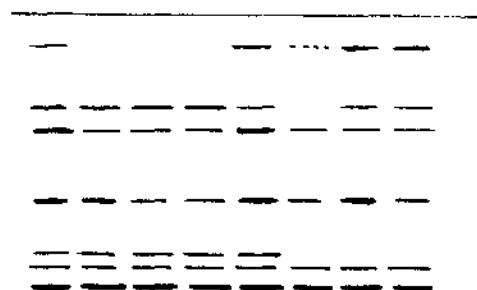
* — Difference is significant at 0.050 level; ** — Difference is significant at 0.01 level.

2. 3 抗病品系及其亲本过氧化物同工酶的变化

分析表明,抗病品系及其亲本过氧化物同工酶的谱带不同。例如抗病品系 RB325 有 6 条谱带,亲本有 7 条谱带;经赤霉病菌毒素处理后,抗病品系的谱带数未发生变化,而亲本却少了一条谱带,且第 5 和第 6 条谱带的强度也较抗病品系高。又如 RB383 有 6 条谱带,亲本有 7 条谱带,而且第 5 条谱带的强度也较抗病品系高;经赤霉病菌毒素处理后,抗病品系的谱带数未发生变化,亲本不仅丢失了第 3 和第 6 条谱带,而且第 7 条谱带的强度减弱(见图 3)。

2. 4 抗病品系及其亲本超氧化物歧化酶的变化

由抗病品系 RB325 和 RB383 及其亲本幼根的超氧化物歧化酶(SOD)活性变化可以看出,在赤霉病菌毒素作用下,除龙 83-6516 的 SOD 活性较未经毒素处理的对照稍低外,其它供试材料的 SOD 活性均高于对照。此外,抗病品系的 SOD 活性增长均比亲本高,其中 RB325 比亲本高 8.58%,RB383 比亲本高 24.14%。这与其抗病性相一致(见表 3)



CK Tri CK Tri CK Tri CK Tri
Long 83-654 RB325 Ke858 RB383

图 3 抗病品系及其亲本的过氧化物同工酶谱
Fig. 3 Isoperoxidase zymograms pattern
of the resistant lines and their parents

表 3 抗赤霉病品系及其亲本超氧物歧化酶活性

Table 3 Superoxide Dismutase Activity of the Resistant Lines and Their Parents

抗病品系及其亲本 Resistant lines and their parents	处 理 Treatment	X_{OD}	单位活力数 - Unit of activity	活力增长 activity increased %
RB325	CK	0.034	155.2	7.58
	Toxin	0.0193	167.0	
Long83-6516	CK	0.034	155.2	-1.03
	Toxin	0.036	153.6	
RB83	CK	0.082	116.8	28.10
	Toxin	0.041	149.6	
KE858	CK	0.026	161.6	3.96
	Toxin	0.018	168.0	

2. 5 抗病品系及其亲本细胞表面糖蛋白的变化

电镜观察表明,在未接种条件下,92K809 与其亲本新克早 9 号内颖细胞表面糖蛋白的位置、结构和厚度都没有区别。接种 12 h 后,92K809 内颖细胞表面的糖蛋白变厚、加密,而亲本却未出现变化。接种 24 h 后,92K809 内颖细胞表面糖蛋白高度变厚、加密,而亲本的糖蛋白虽开始变厚,细胞内却出现了大量菌丝。接种 36 h 后,92K809 内颖细胞表面糖蛋白层起伏不平,某些地方已与细胞壁脱离,但细胞内未发现菌丝。亲本的糖蛋白大片脱落,成球状或块状游离于细胞间隙。

2. 6 抗病品系及其亲本细胞超微结构的变化

电镜观察表明,经蒸馏水处理后,抗赤霉病品系 92K809 及其亲本新克早 9 号内颖细胞的超微结构正常,细胞核及核仁清晰可见,细胞壁及细胞核周围有大小不一、圆型和椭圆型的线粒体及粗糙的内质网。成熟的叶绿体具有淀粉颗粒,叶绿体基粒排列有序,膜清晰可见,其形状为纺锤型或半月型。

经 2 h 赤霉病菌粗毒素处理后,抗病品系内颖细胞的超微结构基本正常,细胞核、叶绿体、线粒体的电子密度仍很高,与对照相比变化不大。新克早 9 号的线粒体模糊不清,叶绿体基质片层排列不整齐,基质电子密度下降,细胞质膜局部出现质壁分离,核质电子密度下降。

经 10 h 毒素处理后,新克早 9 号的线粒体、细胞质膜、核膜、核质及少数细胞中的叶绿体均

受到严重破坏。线粒体完全消失,形成空泡,细胞质膜及核膜破裂,有些细胞中核质从内向外分解。叶绿体膜解体,基粒排列紊乱。而抗病品系 92K809 经 10 h 毒素处理后,叶绿体、线粒体破坏不严重,叶绿体基质片层排列不整齐,膜仍清晰可见,核膜也发生破裂,但这样的细胞为数很少。变形的线粒体仍具有内含物,细胞中的电子密度降低较小。

经 20 h 赤霉病菌粗毒素处理后,新克早 9 号大部分细胞的细胞器消失,只剩下破碎的叶绿体沉积物堆集在细胞中间。叶绿体基质片层消失,基粒片层之间分成一条条丝状体,绝大多数细胞中的叶绿体膜消失,有的细胞壁局部凸凹不平,呈现疏松破坏。抗病品系 92K809 的叶绿体部分遭到破坏,基质片层和基粒片层呈无序状态分布在其中,大多数细胞的叶绿体膜破坏较轻。

3 讨 论

(1) 辐射处理和组织培养可以诱发小麦的体细胞无性系变异,为改良品种提供了更多的选择机遇。在赤霉病毒素压力下进行细胞的抗性筛选,提高了抗赤霉病育种的效率,可加快育种进程^[5~7]。

(2) γ 射线辐照与毒素处理都能影响离体培养效果,并在一定程度上抑制愈伤组织的生长和存活,复合处理的效应不是两因素单一处理的简单相加。因此,在利用辐射诱变技术进行抗病突变体离体筛选时,应根据材料的基因型、外植体种类和毒素效价等综合考虑所要采取的辐照剂量、毒素浓度、筛选方式和鉴定方法等。

(3) 抗赤霉病品系 RB976 (决选号 92K809, 92K803) 经多年接种鉴定,已被证明具有较高且稳定的整体抗性,同时通过研究也获得了一些抗病的生化标记。92K809 在病原菌的作用下,细胞表面糖蛋白层迅速加厚增密,而且能较长时间地附着在细胞壁上,有效地阻止了菌丝的入侵,保证了细胞正常的代谢活动。而亲本新克早 9 号在病原菌作用下,细胞表面的糖蛋白层形成较晚,较薄,而且易于脱落,不能对菌丝入侵造成“屏障”。因此,在病原菌的作用下,细胞表面糖蛋白层的形成特征可以作为鉴定抗病性的一项生化标记^[8]。另外,在赤霉病菌毒素作用下,抗病品系超氧化物歧化酶的活性显著增高,可有效地清除细胞内因毒素作用而产生的 O_2^- , OH^- 等超氧离子,进而阻止或减缓了超氧自由基对膜系统的破坏。因此,在毒素作用下,植株体内超氧化物歧化酶的活性变化也可作为一项鉴定抗病性的生化标记。

(4) 在毒素作用下,抗病品系 92K809 及其亲本新克早 9 号内颖细胞的超微结构都发生了变化,叶绿体和线粒体及其膜系统都受到不同程度的破坏,而且随处理时间的延长,破坏程度加剧。但是在相同的处理时间内,92K809 细胞器及其膜系统的破坏程度较亲本小得多。细胞内能量转换的中心环节是光合作用和呼吸作用,叶绿体与线粒体是这两种作用的重要场所。抗病品系 92K809 的叶绿体、线粒体及其膜系统较亲本破坏较轻,在同样遭受毒素危害的情况下,能够保持较强的代谢活动,因此具有较强的抗病能力。

参 考 文 献

- 1 孙光祖等. 核农学报, 1995, 9 (1): 1~6
- 2 李杜荣等. 核农学报, 1996, 10 (3): 155~160
- 3 郭丽娟等. 遗传学报, 1992, 19 (3): 259~265
- 4 陆维忠等. 见: 陈英主编. 植物体细胞无性变异与育种. 南京: 江苏科学出版社, 1991. 112~166
- 5 Chawla H S, et al. Theoretical and Applied Genetics, 1987, 74: 841~845
- 6 Wenzel G, et al. Theoretical and Applied Genetics, 1990, 80 (3): 359~365
- 7 Warren G S, et al. Journal of Biotechnology, 1992, 22 (3): 171~200
- 8 李志杰等. 核农学通报, 1997, 18 (1): 5~7