

水稻稻瘟病菌粗毒素对水稻幼穗组织培养的影响及抗性筛选

高立宏¹, 袁业琴²

(1. 长春师范学院生命科学学院, 吉林长春 130032; 2. 长春市土壤肥料工作站, 吉林长春 130000)

[摘 要] 利用目前稻瘟病不同的优势小种菌株的液体培养提取的粗毒素对水稻幼穗进行处理, 稻瘟病菌粗毒素对幼穗的愈伤诱导和分化有强烈的破坏作用, 并且随着处理时间的增加或毒素浓度的增大受到破坏的程度愈深。用稻瘟病菌粗毒素浸泡幼穗对其愈伤诱导和分化都产生很强的抑制作用, 能够起到抗性筛选的目的, 处理的时间在 24h 以内可以得到胚性愈伤和分化成苗; 筛选时毒素的浓度以 30% 为宜; 用粗毒素直接浸泡幼穗愈伤组织对愈伤的伤害很大, 得到的分化植株相对较少, 但仍可作为一种抗性愈伤筛选的方法, 其处理时间以 24h 较好; 而且不同的水稻品种产生的耐性不同, 并可以同时筛选出抗稻瘟病的突变体。

[关键词] 水稻; 稻瘟病菌粗毒素; 幼穗; 愈伤组织; 抗性筛选

[中图分类号] Q943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-178X(2007)02-0091-05

水稻稻瘟病 (*pyricularia.orycae.cav.*) 是世界性病害, 每年都发病较重, 农业一般减产 10% ~ 20%, 严重的田块颗粒不收, 是我国农业生产的毁灭性病害。长期的生产实践证明, 水稻抗瘟性品种的选育和利用是防治稻瘟病最经济、最有效、最直接的措施。利用稻瘟病菌培养液提取粗毒素作为选择压, 在细胞水平上进行筛选突变体^[1-2]。并把生物技术和常规育种技术结合, 培育新的抗病品种。利用目前稻瘟病不同的优势小种菌株进行液体培养, 然后提取粗毒素。利用不同稻瘟病菌粗毒素提取液的混合液对水稻幼穗进行处理, 包括对外植体的处理、对愈伤组织的处理、对分化的处理, 研究稻瘟病菌粗毒素提取液对水稻组织培养的影响, 同时进行抗稻瘟病菌突变体的筛选^[3-8], 为东北粳稻抗稻瘟病突变体筛选和水稻抗病品种的选育做一些工作。

1 材料及方法

1.1 供试品种 丰优 301、丰优 307、优 93-8、农大 3、农大 19。由吉林农业大学水稻研室提供。

1.2 稻瘟病菌的培养

1.2.1 进行预培养的菌种及来源 33-1, A7, 177-1-2, 990303-2, 990201-2, 991603-2, w9, z48, 163-1-4, 由吉林省农业科学院植保所提供。

1.2.2 利用 MS 培养液培养稻瘟病菌

1.3 稻瘟病菌粗毒素对水稻幼穗处理的影响 水稻幼穗组织培养的操作方法: 取处于分化期的长 1-2cm 的水稻幼穗, 先用 70% 的酒精消毒 3min, 再用 1‰ 的升汞消毒 15min, 灭菌后, 剪成 2-3mm 的小段, 接种于 MS 诱导培养基上, 每瓶接种 12 个, 共接种 4 瓶, 在 26℃ 条件下暗培养 30d, 统计其诱导率; 再把愈伤组织转入分化培养基中培养 28d, 统计分化成苗率。

1.3.1 稻瘟病菌粗毒素浸泡幼穗后对诱导及分化的影响 把灭菌后的幼穗于 26℃ 条件下用稻瘟病菌粗毒素分别浸泡 0h、4h、8h、12h、24h、48h, 然后接种于 MS 培养基上, 每瓶接种 12 个, 共接种 4 瓶, 在 26℃ 条件下暗培养 30d, 统计其诱导率; 再把愈伤组织转入分化培养基中培养 25d, 光强 2000Lux, 统计分化成苗率。

1.3.2 培养基中加入稻瘟病菌粗毒素对幼穗诱导及分化的影响

1.3.2.1 将灭菌后的幼穗小段分别接种于含稻瘟病菌粗毒素的浓度分别为 0、1%、5%、10%、20%、

[收稿日期] 2006-12-11

[作者简介] 高立宏 (1977-), 女, 吉林公主岭人, 长春师范学院生命科学学院讲师, 博士研究生, 从事植物遗传学研究。

25%、30%的诱导培养基上，每瓶接种 12 个，共接种 4 瓶，在 26℃条件下暗培养 30d，统计其诱导率；再把愈伤组织转入分化培养基中培养 25d，统计分化成苗率。

1.3.2.2 将幼穗的愈组织分别接种于含稻瘟病菌粗毒素的浓度分别为 0、1%、5%、10%、20%、25%、30%的分化培养基中，每瓶接种 12 个，共接种 4 瓶，26℃条件下培养 25d，统计分化成苗率。

1.3.3 用稻瘟病菌粗毒素浸泡水稻幼穗愈伤组织对分化率的影响 在无菌条件下用稻瘟病菌粗毒素分别浸泡水稻幼穗愈伤组织 0min、10min、30min、1h、2h，然后接种于分化培养基中，每瓶接种 12 个，共接种 4 瓶在 26℃、2000lux 光照条件下培养 25d，统计出苗率。

1.4 再生植株的抗病性鉴定 经毒素筛选获得的再生绿苗收获的 R1 种子播于秧盘或小钵中，在三叶一心期，进行人工接种鉴定，采用各种菌株的分生孢子悬浮液（ 2×10^5 孢子/ml）进行喷雾接菌，每 100 株苗喷 ml，保湿 7-10 天后观察植株发病率。

表 1 幼穗诱导、分化筛选培养基成分（单位：毫升）

培养基	基本培养基	2, 4 - D	6 - BA	NAA	毒素浓度
		mg/ml			
诱导培养基	MS	1.5	2.0	0	0、1%、5%、10%、20%、25%
分化培养基	MS	0	2.0	0.2	0、1%、5%、10%、20%、25%

2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌粗毒素提取液对水稻幼穗组织培养的研究

2.1.1 毒素浸泡水稻幼穗对愈伤诱导的影响（见表 2、3，图 1）

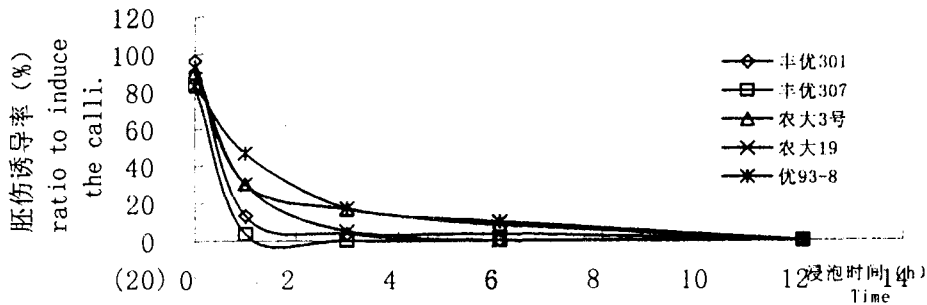


图 1 用毒素浸泡幼穗后愈伤诱导率

表 2 用毒素浸泡不同品种的水稻幼穗对愈伤诱导影响的方差分析

品种间	均 值	5%显著水平	1%显著水平
优 93 - 8	26.23	A	A
农大 3 号	24.13	A	AB
农大 19	21.94	AB	AB
丰优 301	18.84	B	BC
丰优 307	14.44	C	C

表 3 用毒素浸泡不同的时间对水稻幼穗的愈伤诱导影响的方差分析

处理时间 (h)	均值	5%显著水平	1%显著水平
CK	89.33	a	A
1	24.61	b	B
3	8.48	c	C
6	4.29	d	CD
12	0.00	d	D
24	0.00	d	D

用粗毒素浸泡水稻幼穗对幼穗有严重的伤害作用。随着毒素浓度的增大，幼穗的诱导迅速降低，当浸泡时间为1h时，愈伤诱导率由89.33%迅速降至24.61%，当处理时间大于6h时，基本上没有胚性愈伤生成。

毒素幼穗愈伤诱导呈现显著性差异。在品种上，幼穗愈伤诱导也表现极显著性的差异，其中优93-8、农大3号、农大19的平均诱导率较好，而丰优301和丰优307的平均诱导率较低，存在极显著性的差异，说明幼穗的愈伤诱导、毒素毒性表现受水稻基因型影响较明显。不同时间的粗毒素处理之间也存在极显著的差异，在处理时间≥12h时，没有幼苗产生，其它的处理时间存在显著性差异。

与用粗毒素提取液处理成熟胚对比，幼穗受到的影响更为严重，可能是因为幼穗组织是幼嫩的分生组织，易受外界因素的毒素侵害。

2.1.2 培养基中含有毒素对幼穗组织培养的影响（见表4、5，图2）

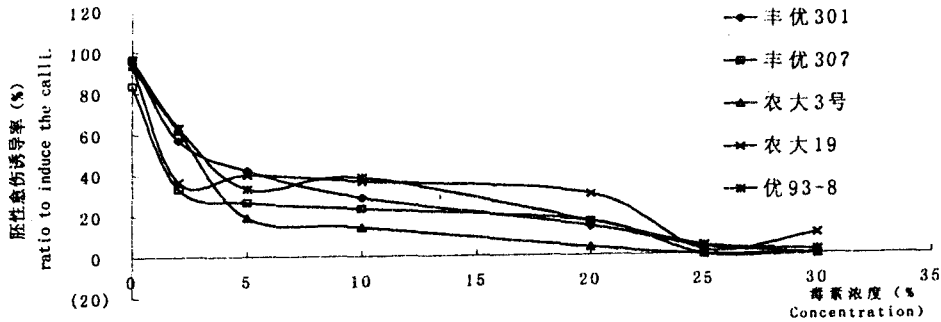


图2 培养基中加入毒素的幼穗培养状况

表4 含毒素培养基对不同水稻幼穗愈伤诱导影响的方差分析

品种间	均 值	5%显著水平	1%显著水平
优93-8	36.44	a	A
农大19	35.54	a	A
丰优301	34.64	a	A
农大3号	27.48	b	B
丰优307	26.19	b	B

表5 含不同浓度毒素的培养基对水稻幼穗愈伤诱导影响的方差分析

毒素浓度	均 值	5%显著水平	1%显著水平
CK	92.67	a	A
2%	50.41	b	B
5%	32.26	c	C
10%	28.29	c	C
20%	16.30	d	D
25%	2.42	e	E
30%	2.05	e	E

培养基中加入毒素对幼穗组织培养具有明显的影响，当毒素浓<5%时，其诱导率迅速下降，当5%<毒素浓度<20%时，胚性愈伤诱导率降得较为缓慢，当毒素浓度>25%时，胚性愈伤诱导率极度下降并达到极限值。

不同浓度毒素培养基与愈伤诱导间存在着极显著水平的差异。不同品种之间与存在着显著性差异，农大3号和丰优307的愈伤诱导率较差，与其它品种存在着极显著性差异。

2.1.3 用稻瘟病菌粗毒素液浸泡处理后的幼穗愈伤的分化出苗（见表6）

表 6 用稻瘟病菌粗毒素液浸泡处理后的幼穗愈伤的分化出苗统计表

品种	处理时间 (h)					
	0	1	3	6	12	24
丰优 301	15	1	0	2	0	0
丰优 307	12	3	2	0	1	1
农大 3 号	15	6	3	5	0	0
农大 19	13	1	1	5	1	0
优 98-8	15	3	1	0	0	4

用稻瘟病菌粗毒素浸泡水稻的幼穗后, 对其分化产生很大的抑制作用。处理 1h 后, 分化得苗数为对照的 21.43%, 处理时间 > 24h, 不再有苗分化; 在处理区间内, 随着处理时间的增加, 苗数迅速下降。

2.1.4 含有不同浓度毒素的诱导培养基中幼穗愈伤分化成苗情况 (见表 7)

表 7 含有不同浓度毒素的诱导培养基中幼穗愈伤分化成苗情况的统计

品种	处理浓度 (V/V%)						
	0	2%	5%	10%	20%	25%	30%
丰优 301	6	4	8	0	2	0	1
丰优 307	5	3	1	2	1	0	0
农大 3 号	7	3	10	6	3	0	0
农大 19	5	3	1	0	5	0	6
优 98-8	5	1	0	2	3	2	0

把幼穗放在含有毒素的培养基中进行愈伤诱导, 得到的愈伤组织的分化数迅速下降。随着毒素浓度的升高, 分化成苗数不断下降。但在高浓度的分化培养基中, 仍能分化出幼苗。可以看出, 在含毒素的培养基上进行突变体的选择是有可能的。

2.1.5 含有不同浓度毒素的分化培养基中幼穗愈伤分化成苗情况 (见表 8)

表 8 含有不同浓度毒素的分化培养基中幼穗愈伤分化成苗情况的统计

品种	处理浓度 (V/V%)						
	0	2%	5%	10%	20%	25%	30%
丰优 301	7	2	2	1	2	0	
丰优 307	6	3	2	2	1	0	0
农大 3 号	8	4	5	4	3	0	0
农大 19	5	3	2	1	1	0	0
优 98-8	6	1	0	2	3	2	1

用含有毒素的分化培养基分化幼穗的愈伤组织, 分化成苗数随毒素浓度的增加而降低, 在高浓度下分化成苗数很低, 在 25% - 30% 浓度下仅 3 株幼苗产生。

3 抗病性鉴定

在所获得的分化苗中, 含有各种畸形苗, 如成簇生长苗、矮化苗、白化苗等, 其中白化苗在培养中逐渐死亡, 还有一些苗在培养过程中逐渐褐化死亡。

本实验根据国家统一标准规定的鉴定方式、方法, 利用稻瘟病菌孢子悬浮液进行苗期鉴定。鉴定时选用部分材料进行, 鉴定用 3 号和 9 号稻瘟病菌。将所选材料的种子发芽栽培于培养钵中, 于三叶期进行鉴定。

鉴定结果如下:

生理小种	外植体类型	株数	高抗	抗	中抗
3 号	幼穗	35	2	4	6
9 号	幼穗	35	4	5	9

4 结论与讨论

不同的水稻品种在毒素作用下进行组织培养时存在着差异性。本研究所用品种均为非抗病品种,但仍存在着差异性,甚至是极显著性差异,因此在进行抗稻瘟病筛选时所选用的毒素的浓度应和品种的抗性相对应,对不同的品种应选用不同浓度的毒素作为选择压。

由于在做实验时使用的粗毒素提取液是十种稻瘟病菌提取液的混合液,所以其产生的突变体可能只抗其中一种毒素的突变体,少部分可能含有一种以上的突变体,但频率会很低。因此在获得的突变体中,应该是几种突变体的混合。在抗性鉴定过程中由于时间关系,本实验只采用了一种稻瘟病菌孢进行鉴定,没有对每一种生理小种分别进行鉴定和田间抗性鉴定,以后有时间会进行进一步的鉴定。

在产生的抗性植株中应进行田间分离实验,以区分适应性的抗性改变和抗性突变,并挑选出具有良好家艺性状的抗性突变体进行繁育和推广。在最近的抗稻瘟病研究中,认为多种基因型的水稻混合栽培在整体上具有有效的抗病性,同时可防止稻瘟病菌生理小种的退化和突变;不会产生强的优势小种,防止了对水稻造成严重的损害。通过本实验会得到含有一系列不同突变的突变系,把它们进行混合栽培就会起到相同的效果,而且也会避免不同的水稻品种混合栽培在生产上带来的不便。

[参 考 文 献]

- [1]何月秋,唐文华.水稻抗稻瘟病突遗传研究进展[J].云南农业大学学报,2002,(4).
- [2]Kozaka T,Tsuchizawa M,HanaveM,etal. 1985:phytoxin glycopeptide inducing white head of rice planr produced by *Pyricularia oryzae* Cav Am.Phtopath Soc.Japan,5(2):199-204.
- [3]水稻抗瘟病研究进展[J].农业生物技术学报,2000,(1).
- [4]袁洁,裴桦.稻瘟病菌粗毒素在水稻稻瘟病中的作用[J].西南农业学报,1999,(4).
- [5]陈启峰,陈璋,王金陵.运用致病毒素筛选抗稻瘟质细胞突变体[J].遗传学报,1993,(4):340-347.
- [6]于翠梅,张月杰,曹萍.水稻抗稻瘟病突变体筛选初报[J].沈阳农业大学学报,2000,(2):153-157.
- [7]石戊渊.水稻组织培养与变异体筛选[J].辽宁农业科学,1996,(1).
- [8]朴钟泽,牛景等.利用病菌培养液离体筛选水稻抗稻瘟病植株的研究[J].华北农学报,2002,(3):94-98.

Effect of Crude Toxin from the *Pyricularia Oryzae* on the Tissue Culture of Young Panicles Rice and the Screening of Anti - Blast Mutant

GAO Li - hong¹, YUAN Ye - qin²

(1. Institute of Life Science, Changchun Normal University, Changchun 130032, China;

2. Soil and Fertilizer Workstation of Changchun, Changchun 130000, China)

Abstract: The growth of the young head induction, callus subculture and differentiation were strong. Inhibited by the crude toxin filtration, contrasted with CK, the results were significant different, and the result was different with toxin concentration changing. With the increasing of the toxin concentration and the prolonging the impact time, the inhibiting was stronger. 30% was the better toxin concentration when screening of rice blast - resistant mutant from the mature embryo culture; mutant was hurt strongly, when it was immersed directly in the toxin, and the differentiation seeding was got little, but this methods still can be used to screening of resistant mutant, 24h was the apposite time.

Key words: rice; crude toxin; *pyricularis oryza*; callus; resistant - screening