

稻瘟菌粗提物对水稻成熟胚愈伤组织培养的影响

黄红梅^{1,2}, 赵志祥², 李小娟², 刘二明²

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128;

2. 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要:以感病主栽品种 C039、丽江新团黑谷为材料, 观察稻瘟病菌粗提物处理对水稻成熟胚愈伤组织培养的影响, 以期筛选抗稻瘟病细胞突变体。试验结果表明: 粗提物处理, 对水稻成熟胚的愈伤组织诱导和分化都有一定的抑制作用, 但愈伤组织再生植株的蛋白质含量显著提高。

关键词:水稻; 稻瘟菌; 愈伤组织

中图分类号: S482.891; S511.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-060X(2006)04-0032-03

Effect of *Magnaporthe Grisea* Crude Extraction on the Tissue Culture from Rice Mature Embryos

HUANG Hong - mei^{1,2}, ZHAO Zhi - xiang², LI Xiao - juan², LIU Er - ming²

(1. The College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, PRC;

2. The College of Bio - Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, PRC)

Abstract: Using C039 and lijiangxintuan black rice which was sensitive to rice blast as study material, the effect of *Magnaporthe grisea* crude extraction on the tissue culture from rice mature embryos were studied in order to screen the rice blast resistance mutants. The results indicated that the crude extraction inhibited the callus inducement and differentiation of the rice mature embryos. The inhibition significantly increased the plant protein content in the regeneratal plants.

Key words: rice; *Magnaporthe grisea*; callus

水稻稻瘟病又称稻热病、火烧瘟、麻叶子、刻颈瘟、黑节瘟等, 是由子囊菌 (*Magnaporthe grisea* Barr) 引起的, 是水稻的三大病害之一。稻瘟病菌是一种真菌, 属半知菌类丛梗孢科梨孢属。在田间, 水稻稻瘟病菌侵染水稻叶片进行繁殖并产生毒素, 对水稻产生毒害作用, 造成水稻植株的死亡, 给农业生产带来巨大的损失。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。而利用稻瘟病菌培养液提取粗毒素作为选择压, 在细胞水平上通过组织培养途径对水稻抗瘟性进行细胞突变体筛选^[1], 并把生物技术和常规育种技术相结合培育新的抗病品种的方法, 程序简便、快捷, 而且不涉及安全性问题, 是抗病育种的一种新方法, 并已经培育出一些新的水稻品种。利用稻瘟病菌粗毒素提取

液作为选择压, 进行水稻抗瘟性筛选的尝试, 在国际上起始于 70 年代初, 在我国则起始于 80 年代中期。kozaka et al 等从培养的稻瘟病菌的孢子萌发液、菌丝培养液和重病稻叶组织中分离出多种稻瘟病毒素, 如 a - 吡啶羧酸 (Picolinic acid)、稻瘟菌素 (Piricularin)、稻瘟醇 (Pyriculid)、细交链菌酮酸 (Tenuazonic acid)、糖肽类物质 (Glycopeptide) 等, 并测出分离的毒素对水稻的毒性^[2]。郑祖玲^[3]在水稻愈伤组织及花粉分化培养的培养基中加入稻瘟病菌粗毒素后, 发现毒素能抑制愈伤组织的器官分化和形态形成, 并证明获得的突变体花粉植株的幼苗对毒素的抗性较其亲本强。李朝灿^[4]发现粗毒素对不同的水稻品种愈伤组织的作用存在差异, 不同生理小种的菌株所产生的粗毒素对同一水稻品种的愈伤组织的抑制作用也不同。陈启峰^[5]讨论了抗性筛选方法程序, 认为抗感品种间差异显著, 并以诱导、分化均加入毒素的筛选效果好, 同时筛选出 13 个高抗 P₄ 株系。辽宁省的赵海岩^[6]以成熟胚和花粉为外植体, 在培养基中加入粗毒素进行筛选, 得到了辽宁 2 号和辽宁

收稿日期: 2006 - 06 - 22

基金项目: 湖南农业大学人才引进科研启动基金 (05YJ09)

作者简介: 黄红梅 (1978 -), 女, 江西新余人, 硕士, 主要从事生化与分子生物学研究。

7号等新品种。本实验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提物的混合液对不含任何主效抗病基因的感病水稻品种成熟胚进行处理,研究稻瘟病菌粗提物对水稻组织培养的影响,为进行抗稻瘟病菌突变体的筛选和水稻抗病品种的选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 稻瘟菌的培养

所用菌株为稻瘟菌 103、193、195,湖南农业大学植物病理系提供。将保存的菌种接种在 PDA 固体培养基上,置于 28℃ 恒温培养箱中,培养 7~10 d 后,将复活培养中生长良好的菌种分别接种于 PDA 的液体培养基中。具体操作如下:利用打孔器($d=2\text{ cm}$)给培养同样天数的平板培养的病菌进行打孔定量,取下 5 片同样大小的菌片置于 60 ml 培养液中,每个生理小种做 4 个重复,在 27~30℃ 条件下振荡(160~220 r/min)培养 15 d。

1.2 稻瘟菌粗提物的制备

将上述的菌丝培养液混合,用几层纱布滤出菌丝,将菌丝于研钵中研磨成匀浆,倒回原培养液中振荡 10 min,再用二层纱布过滤,滤液经 4 000 r/min 离心 30 min,取上清液,然后用过滤器做无菌过滤。滤液贮于冰箱中备用。

1.3 稻瘟病菌粗提物对水稻成熟胚组织培养的影响

1.3.1 供试水稻品种 C039,丽江新团黑谷,本实验室保存。

1.3.2 测定稻瘟病菌粗提物浸泡水稻成熟胚对水稻出芽及组织培养的影响 取成熟饱满水稻籽粒去壳,用 70% 的酒精消毒 3 min,再用 1% 的次氯酸钠消毒 15 min,无菌水洗净,于 26℃ 条件下用稻瘟病菌分别浸泡 0 h、8 h、24 h、48 h、72 h,然后用解剖刀切下种胚,接种于 MS 培养基上,每皿接种 12 个,共做 4 皿,7 d 后调查其出芽率;出芽后,在 28℃ 条件下暗培养 28 d,统计其愈伤组织诱导率,再把愈伤组织转入分化培养基中培养 28 d,统计分化成苗率。

1.3.3 稻瘟病菌粗提物浸泡水稻成熟胚后的水稻诱导分化苗的蛋白质含量测定 (1)蛋白质的提取:准确称取水稻叶片 1.0 g,剪碎,放入研钵中,加 2~4 ml pH7.0 磷酸钠缓冲液,在冰浴上将其充分研磨成匀浆,在冷冻离心机上以 4 000 r/min 的速度离心 10 min,上清液转入 50 ml 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻

度,摇匀后备用。(2)测定:采用考马斯亮蓝 G-250 法测定。

2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌粗提物对水稻出芽率的影响

从表 1 中我们可以得出,稻瘟病菌浸泡水稻成熟胚,粗提物对成熟胚的芽的生长有明显的抑制作用,其抑制程度随着处理时间的增加而增强。在处理时间 < 8 h 时,成熟胚的发芽率下降较少,在 8~24 h 内发芽率下降较为缓慢,> 24 h 时发芽率快速下降,处理时间超过 48 h 时,芽枯萎或根本不产生芽。不同时间的处理存在着显著性差异。

表 1 稻瘟病菌粗提物对水稻出芽率的影响

处理时间(h)	外植体总数	出芽外植体数	出芽率(%)
0	48	47	97.9
8	48	45	93.8
24	48	37	77.1
48	48	10	20.8
72	48	3	6.25

2.2 稻瘟病菌粗提物对水稻愈伤组织诱导率的影响

表 2 是稻瘟病菌粗提物浸泡水稻成熟胚对水稻愈伤组织诱导率的影响结果。用稻瘟病菌粗提取液处理后的成熟胚诱导愈伤,其愈伤组织的生长趋势同其发芽的趋势有完全的一致性。即经粗提物处理不同时间后的成熟胚之间的愈伤生长量存在着明显差异,尤其是在处理时间大于 24 h 时,愈伤的生长

表 2 稻瘟病菌粗提物对水稻愈伤组织诱导率的影响

处理时间(h)	外植体总数	诱导出愈伤组织的外植体数	诱导率(%)
0	48	47	97.9
8	48	45	93.8
24	48	44	91.7
48	48	12	25.0
72	48	5	10.4

量和胚活性明显下降。同样,C039 水稻的愈伤诱导率在处理时间小于 48 h 时,其胚性愈伤明显高于丽江新团黑谷,说明不同水稻品种与稻瘟病菌粗毒素之间的作用存在着基因型间的差异。在愈伤培养中,胚性愈伤的发生频率比粗毒素浸泡成熟胚时的发芽率略有上升,有部分未发芽的成熟胚产生了愈伤组织,可能由于有些胚没有发芽,保存了营养,在去除毒素后,没有抑制因素,胚活性有所恢复,营养全部用来形成愈伤组织。

2.3 稻瘟病菌粗提物对水稻愈伤组织分化率的影响

从表3中可以看出,处理时间对愈伤组织分化有明显影响,但是处理小于8 h的分化率较处理24 h的低,可能是由于前者的发芽率高,愈伤胚性不好,导致分化率更低。处理时间48~72 h以上时,由于胚损伤较大,分化率大大降低。

表3 稻瘟病菌粗提物对水稻愈伤组织分化率的影响

处理时间 (h)	诱导出愈伤组织 的外植体数	分化出幼苗 的外植体数	分化率 (%)
0	47	46	97.9
8	45	43	95.6
24	44	44	100.0
48	12	11	91.7
72	5	3	60.0

2.4 稻瘟病菌粗提物对水稻诱导分化苗的蛋白质含量的影响

从表4可以看出,在本实验中,用稻瘟菌粗提物

表4 稻瘟菌粗提物对水稻诱导分化苗蛋白质含量的影响

处理时间(h)	0	8	24	48	72
蛋白质含量(%)	18.4	19.9	26.8	30.4	33.5

处理水稻成熟胚的时间越长,成熟胚组培诱导的分化苗蛋白质含量越高,并且处理时间小于24 h的蛋白质含量增加幅度更高,从24 h到72 h,蛋白质含量增加幅度更低。

3 讨论

稻瘟病菌粗提液处理对水稻组织培养能产生明显的作用。并且随着粗提液处理时间的增加,蛋白质含量逐渐增加,这是由于在粗毒素的逆境下水稻愈伤组织内各种抗病相关的酶类(如PAL、几丁质酶、POD、SOD等)的活性迅速上升,水稻愈伤组织抗

逆性也随着上升;或是由于在粗毒素选择压的作用下,诱导某些沉默基因的表达,增强了愈伤组织的抗性。当粗提液处理时间超过48 h,愈伤组织的产量、质量迅速下降,甚至不产生愈伤组织或愈伤组织全部褐化,只是在某一块微褐化的愈伤组织上偶尔产生生长旺盛的白色的愈伤。推测这是在高选择压条件下产生了抗稻瘟病的突变体。以成熟种胚为外植体进行组织培养,易于诱导愈伤组织,取材不受生长季节的影响,是筛选抗性突变体的理想材料。稻瘟病菌粗提液是稻瘟病菌侵染并致使寄主发病的一个决定性因素,与稻瘟病原菌具有相似的致病性。同时,提取方法简便易行,并且可消除病原菌干扰和污染等复杂情况。郑祖玲等^[3]以水稻花药培养作起始材料,经水稻稻瘟病菌粗毒素提取液筛选出抗病突变体,经苗期鉴定表现明显抗性,田间试验同样具有抗性表达。但是其花药培养程序复杂,难度大。本试验在前人工作的基础上,初步获得了抗稻瘟病的细胞突变体筛选体系。我们将继续研究分化苗的抗病性,以获得新的抗病种质资源和抗性系,实现其在生产中的应用价值。

参考文献:

- [1] 何月秋,唐文华.水稻抗稻瘟病突变体研究进展[J].云南农业大学学报,2002,15(4):12.
- [2] Kozaka T, Tsuchizawa M, Hanave M, et al. Phytotoxin glycopeptide inducing white head of rice plant produced by *Piricularia oryzae* Cav Am [J]. Phtopath Soc. Japan, 1985, 5(2):199-204.
- [3] 郑祖玲,褚启人,张承妹.稻瘟病原菌粗毒素对水稻的致病性[J].上海农业学报,1985,(2):85-90.
- [4] 李朝灿,甘代耀.水稻抗稻瘟突变体筛选的初步研究[J].福建农业科技,1985,(6):34-44.
- [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,1993,20(4):340-347.
- [6] 赵海岩,郑文静.水稻抗稻瘟病突变体离体筛选及在育种中应用[J].辽宁农业科学,2001,(3):21-25.

(上接第15页)在提高稻米卫生品质和商品价值,减少农药残留,保护环境,解决贫困山区人民吃饭问题和确保干旱地区水稻高产稳产等重大问题上有新的突破,充分说明了“双胁迫法”筛选优良水稻品种(组合)是一种非常有效的方法,若与其它技术相结合,特别是与杂交育种技术相结合,育种效果更佳。

本研究运用“双胁迫法”从64个品种(组合)中筛选出了5个抗瘟、耐旱优良品种(组合)中86-76、大白谷、魔王谷、64S/大白谷和64S/魔王谷。三个旱稻品种主要米质指标达到部颁二级优质米标准,

耐旱性极强、抗稻瘟病、中抗白叶枯病和褐飞虱,其中中86-76通过了湖南省农作物品种审定委员会审定;杂交组合64S/大白谷和64S/魔王谷植株较矮,分蘖力与抗旱力较强,抗稻瘟病,是在双胁迫病圃中具有较好综合农艺性状的苗头组合。

参考文献:

- [1] 肖放华,罗赫荣,李友荣,等.优良旱稻中86-76的特征特性与栽培要点[J].中国稻米,2004,(2):22.
- [2] 肖放华,罗赫荣,李友荣,等.优良多抗旱稻品种的筛选、栽培技术及生产应用[J].湖南农业科学,2001,(6):11-13.