

文章编号:1000-8551(2005)03-172-03

不同基因型大麦离体培养花药对 赤霉病菌粗毒素的反应

孙月芳 陆瑞菊 王亦菲 周润梅 黄剑华

(上海市农业科学院生物技术研究中心/上海市农业遗传育种重点实验室 上海 201106)

摘要:研究了在离体培养条件下,大麦耐、感赤霉病基因型花药对赤霉病菌粗毒素的反应。结果表明:随着赤霉病菌粗毒素预处理浓度的提高,大麦花药愈伤组织诱导率降低,愈伤组织的绿苗分化率降低。抗病基因型的愈伤组织诱导率和绿苗分化率的降低幅度均小于感病材料。说明大麦个体水平的耐、感赤霉病性与花药水平对赤霉病粗毒素反应具有一致性。

关键词:大麦;基因型;花药;赤霉病;粗毒素

RESPONSE OF BARLEY ANTHHER in vitro CULTURE FROM DIFFERENT GENOTYPES TO CRUDE TOXIN OF *Fusarium graminearum*

SUN Yue-fang LU Rui-ju WANG Yi-fei ZHOU Run-mei HUANG Jian-hua

(Biotech Research Center, Shanghai Academy of Agricultural Sciences/Shanghai Key

Lab of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai, 201106)

Abstract: Response of barley anthers of 3 genotypes with higher tolerance and 1 genotype with susceptibility *in vitro* culture and callus derived to crude toxin of *Fusarium graminearum* was investigated. The results showed that with the increase of the concentration of the crude toxin in culture media, the frequency of callus induction and green plant regeneration was decreased. Comparing the two genotypes, the frequency of callus induction and green plant regeneration was less affected for tolerance-genotype. So a conclusion can be made that anther tolerance or susceptibility to *Fusarium graminearum* toxin is correlated with barley genotype.

Key words: barley; genotype; anther; *Fusarium* head blight; crude toxin

麦类赤霉病不仅导致大面积减产和品质下降,含有赤霉病菌毒素的病麦粒还会对人畜产生毒害^[1]。随着啤酒工业和饲料工业的发展,大麦赤霉病菌毒素将是我国啤、饲大麦发展的重要制约因素。培育抗赤霉病新品种是最为有效的减少毒素危害的途径。抗病育种的一项重要技术措施就是通过多元杂交,将分布在不同材料上的抗源聚集一起,然后从中选择高抗重组体。F₁代花药含有丰富的基因重组配子体。如能证明花药/小孢子水平的抗赤霉病菌粗毒素性与植株个体水平抗病性相关,将为花药/小孢子培养技术筛选抗病材料提供理论依据。在小麦上,已有不同抗感赤霉病材料花药离体培养的研究报道^[2,3]。在大麦上,未见类似的报道。本文研究报道不同耐、感赤霉病大麦的离体培养花药及其愈伤组织对赤霉病菌粗毒素预处理的反应。

收稿日期:2005-03-09

作者简介:孙月芳(1969-),女,上海人,助理研究员,从事植物生物技术方面的研究。黄剑华为通讯作者,021 62201032,

Email:swl@saas.sh.cn

1 材料与方法

1.1 材料 耐赤霉病大麦种质“ND14049”二棱中熟(以下简称 ND)、“WDM3649”多棱早熟(以下简称 WDM)、“老脱穗”(以下简称 LTS)二棱中熟;感赤霉病材料“Harrington”二棱晚熟(以下简称 Har)由中国农业科学院品质资源研究所张京研究员提供;赤霉病粗毒素由南京农业大学王秀娥教授提供。

1.2 方法

1.2.1 播种与取材 供体材料于秋季播种于上海市农科院农试场的大田内,第2年的春季取中部小花小孢子发育处于单核期的麦穗。

1.2.2 培养基 液体诱导培养基为 $N_6 + 2,4,5-T 3.0\text{mg/L} + KT 0.5\text{mg/L} + CH 800\text{mg/L} + \text{麦芽糖}$,分化培养基以 MS 为培养基,添加 $KT 1.5\text{mg/L}$ 、 $BA 0.5\text{mg/L}$ 、 $NAA 0.05\text{mg/L}$ 及 30g/L 的麦芽糖。

1.2.3 预处理液 按处理要求配制浓度分别为 3.9×10^{-5} 、 7.8×10^{-5} 和 $1.95 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 的赤霉病粗毒素液,以无菌水为对照。

1.2.4 花药离体培养 离体麦穗用 75% 的酒精灭菌,在超净台上取中部花药,投入有不同粗毒素的培养皿中,每一处理接 10 皿,对照接 5 皿,每皿接种 40 枚花药,3d 后吸出粗毒素液或无菌水,加入液体培养基,放置于暗培室,22℃ 培养 30~40d,愈伤组织形成后转入分化培养基,在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光强 1800lx 、每天光照 12h、黑暗 12h 的光周期下培养。

1.2.5 数据统计

花药反应率(%) = (形成的愈伤组织数/培养花药数) $\times 100\%$

绿苗分化率(%) = (绿苗数/转分化愈伤组织数) $\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 粗毒素预处理对花培出愈率的影响

由表 1 可以看出:1) 未经粗毒素预处理,各供试基因型的花培出愈率以“ND”最高(287.0%),其次为“WDM”(221.0%)、“Har”(208.0%)、“LTS”(135.0%),这种出愈率可以看作各基因型的花药离体培养反应值,与它们的抗感病性似乎无关。2) 经粗毒素预处理后,除“LTS”以外,其余 3 份供试基因型的花培出愈率均随着毒素浓度的升高而下降。3) “LTS”经低浓度处理后,其出愈率比未经处理的高,从 135.0% 升至 148.5%,经中、高毒素浓度处理后的出愈率均比对照的低。似乎表明低浓度粗毒素对该基因型的出愈率无抑制作用。4) 经毒素处理后,感病材料出愈率的降幅比耐病材料的大,尤其是在高浓度下。5) 经毒素处理后,3 份耐病材料的出愈率存在差异,“LTS”的降幅最小,其次为“WDM”、“ND”,3 份耐病材料个体水平的耐赤霉病性也是“ND”较差。推测花药水平的耐毒素性可以在一定程度上反映出大麦个体水平的抗赤霉病能力。

2.2 粗毒素预处理对绿苗分化率的影响

将不同浓度毒素处理花药后获得的愈伤组织置入分化培养基,比较它们的绿苗分化率,由表 1 可知:1) 未经毒素处理获得的愈伤组织的绿苗率以“WDM”最高(18.6%),其次为“LTS”(17.0%)、“ND”(11.6%),最低的是“Har”(9.1%)。这可以看作各供试基因型愈伤组织的绿苗分化值。2) 经毒素处理后获得的愈伤组织的绿苗分化率大幅下降,且随着处理浓度的提高,其愈伤组织的绿苗分化率不断下降。3) 各基因型绿苗分化率的下降幅度存在差异,结果为:低浓度($3.9 \times 10^{-5}\text{mol/L}$)时,“LTS”降幅最大,其次是“WDM”、“Har”、“ND”;中浓度($7.8 \times 10^{-5}\text{mol/L}$)时,降幅由小到大依次为“WDM”、“Har”、“LTS”、“ND”;高浓度($1.95 \times 10^{-4}\text{mol/L}$)时,除“WDM”外,其余 3 份供试材料的绿苗分化频率均为 0。

表 1 赤霉病粗毒素预处理对不同基因型花药培养愈伤组织诱导率和绿苗分化率的影响
Table 1 Effects of *Fusarium* head blight crude toxin pretreatment on callus induction of anther culture and green plant regeneration of callus from different genotypes

| 材料 material | 粗毒素浓度 concentration of crude toxin (mol/L) | 形成愈伤组织数 number of callus formed | 愈伤组织诱导率 freq. of callus induction (%) | 绿苗数 number of green plant | 绿苗分化率 freq. of green plant regeneration (%) |
|----------------|---|---------------------------------------|---|---------------------------------|---|
| ND14049 | CK | 574 | 287.0 | 33 (284 [*]) | 11.6 |
| | 3.9 ×10 ⁻⁶ | 681 | 170.0 | 9 (340) | 2.7 |
| | 7.8 ×10 ⁻⁶ | 363 | 90.8 | 0 (180) | 0 |
| | 1.95 ×10 ⁻⁵ | 179 | 44.8 | 0 (89) | 0 |
| WDM3649 | CK | 442 | 221.0 | 41 (220) | 18.6 |
| | 3.9 ×10 ⁻⁶ | 703 | 175.0 | 12 (350) | 3.4 |
| | 7.8 ×10 ⁻⁶ | 456 | 114.0 | 5 (226) | 2.2 |
| | 1.95 ×10 ⁻⁵ | 240 | 60.0 | 1 (120) | 0.8 |
| 老脱穗 Laotuosui | CK | 270 | 135.0 | 23 (135) | 17.0 |
| | 3.9 ×10 ⁻⁶ | 594 | 148.5 | 8 (295) | 2.7 |
| | 7.8 ×10 ⁻⁶ | 408 | 102.0 | 1 (200) | 0.5 |
| | 1.95 ×10 ⁻⁵ | 126 | 31.5 | 0 (63) | 0 |
| Har rington | CK | 416 | 208.0 | 19 (208) | 9.1 |
| | 3.9 ×10 ⁻⁶ | 441 | 110.3 | 4 (220) | 1.8 |
| | 7.8 ×10 ⁻⁶ | 260 | 65.0 | 1 (130) | 0.8 |
| | 1.95 ×10 ⁻⁵ | 78 | 19.5 | 0 (39) | 0 |

注:对照的培养花药数为 200 ,各不同浓度粗毒素处理的培养花药数均为 400 ; * 括号内的数据为转分化愈伤数。
Note :Number of cultured anthers of per CK sample is 200 ,and number of per crude toxin pretreatment sample is 400 ; * data in brackets are number of callus cultured for regeneration.

3 结论与讨论

欧阳俊闻等首先报道了应用花药培养体系筛选小麦抗赤霉病的研究^[4]。Fadel 等的研究表明了双亲对赤霉病耐性低的 F₁ 花药比双亲对赤霉病耐性高的对离体培养中粗毒素更敏感^[3]。郭新梅等的研究也证实了含感病基因的小麦杂种花药对禾谷镰刀菌毒素更敏感^[5]。本研究证实,供试大麦离体花药经粗毒素预处理后,花药培养的愈伤组织诱导率下降,表明毒素具有毒害作用,但在低浓度时,对个别基因型的花培出愈率无抑制作用,这与小麦在诱导培养基中添加粗毒素得出的结果^[5]有一定的类似之处,但本研究表明,这种作用因供试基因型而异。不同供试基因型离体花药经粗毒素预处理后,它们的花培出愈率和而后的绿苗分化率存在差异,且与个体水平的耐赤霉病性大致吻合。相比而言,花培出愈率更易判断供体材料的耐病性。粗毒素处理花药后,花培愈伤组织的绿苗率也大幅下降,依此可以推测:粗毒素预处理对小孢子脱分化和再分化二个过程均产生影响。本研究使用了液体培养,致使花药培养的绿苗分化率较低。相信通过进一步优化培养技术,可以建成花药/小孢子离体培养筛选大麦抗赤霉病材料的有效技术程序。

参考文献:

[1] 李斌. 镰刀菌毒素 DON、NIV 的细胞毒性和致变、致畸、致癌研究进展. 癌变、畸变、突变, 1999, 11(4) :206 ~ 207
[2] 夏奇梅. 小麦抗赤霉病杂种花药的花培研究. 南京农业大学学报, 1988, 11(2) :30 ~ 34
[3] Fadel F, Wenxel G. *In vitro* selection for tolerance to *Fusarium* in F₁ microspore population of wheat. Plant Breeding, 1993, 110(2) :89 ~ 95
[4] 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病突变体的研究. 见“植物细胞工程与育种”(胡含,王恒立主编). 北京:北京工业出版社, 1990, 254 ~ 260
[5] 郭新梅,陈耀锋,陆慧莉,等. 禾谷镰刀菌毒素对小麦花药培养特性的影响研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(5) :5 ~ 8