

抗根腐病小麦突变体的诱发 和离体筛选体系的研究

孙光祖 陈义纯 张月学 王广金 唐凤兰 阎文义 李忠杰

(黑龙江省农科院作物育种研究所)

张景春 朱秀廷 卢海涛

(黑龙江省农科院植物保护研究所)

摘要 利用辐射与离体培养相结合的方法,在 37 份材料上进行了离体筛选。研究了辐射对离体培养的影响和毒素的筛选效果,初步建立了诱发突变和离体筛选体系。获得了三个抗根腐病的小麦突变系。

根腐病是小麦的主要病害之一,危害日益严重,一般引起减产 10~15%,有时高达 30%,迄今尚无有效的防治方法。抗病育种被认为是一种有效的防治途径。

电离辐射可以引起生物的广泛变异,国内外利用辐射以及辐射与其它因子结合的方法选出了许多新品种,在生产上发挥了重大作用;选出的突变体丰富了种质资源。离体培养扩大了变异来源,增加了选择机遇,为作物育种开辟了更广阔的发展前景。利用离体培养和筛选技术,可以在人为控制的精密条件下对较大的群体进行不同水平的抗性选择,大大提高了育种水平和效率。在各种抗性的离体筛选中,抗病性筛选尤为重要。Carlson (1973)首次利用烟草野火病(*Pseudomonas syringae* PV. *tabaci*)致病毒素的类似物做为选择因子,成功的获得了抗野火病的突变体。随后,国外许多学者用类似的方法相继得到了抗玉米大斑病(Gengenbach, 1977)、抗油菜黑

脚病(Sacristan, 1982)、抗甘蔗眼点病(Larkin 和 Scowcroft, 1983)和洋葱抗 *P. terrestris* (Goad, 1986)等 10 多种抗病突变体。我国从八十年代初开始了抗病性的离体筛选研究,在水稻抗稻瘟病和玉米抗小斑病上取得了初步成果。利用离体培养技术筛选小麦抗根腐病的研究国内外均有报导,但尚未获得实际的育种效果。我们自 1986~1990 年间利用辐射诱变与生物技术相结合进行了抗根腐病小麦突变体的诱发和离体筛选体系的研究,获得了初步结果。

材料与 方法

1. 供试材料

22 份小麦纯系材料和 15 份杂交低代材料。

2. 外植体的辐射处理

(1)幼穗二棱期 开始用⁶⁰Co —γ 射线照

注:本课题为国家自然科学基金资助项目

射植株,连续照射5天,每天200Rad,总剂量1000Rad。

(2)花药 A. 用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线照射减数分裂期的植株,剂量500~700Rad。B. 照射离体培养后两天的花药,剂量600~800Rad。

(3)幼胚 A. 开花后24小时照射植株,连续5天,每天200Rad,总剂量1000Rad。B. 剥取适龄幼胚用X射线照射,剂量为1000Rad、3000Rad、5000Rad和7000Rad。

(4)成熟胚 A. 用1000Rad和1500Rad的 γ 射线照射干种子。B. 剥胚接种后用500~2500Rad γ 射线照射。

3. 接种方法

(1)幼穗取护颖分化期的幼穗用0.1%升汞浸泡10分钟,无菌水冲洗,在无菌条件下接种。

(2)花药取单核靠边期的麦穗,在冰箱中(3~5℃)保存2~3天,次氯酸钠溶液消毒,无菌水冲洗,在无菌条件下取中部小穗的花药接种。

(3)幼胚取开花后13~16天的麦穗,用0.1%升汞浸泡10分钟,无菌水冲洗。在无菌条件下取中部小穗的颖果,剥出胚接种。

(4)成熟胚精选的干种子在蒸馏水中浸泡4小时,用0.1%升汞浸泡10分钟,无菌水冲洗,在无菌条件下剥胚接种。

4. 愈伤组织诱导

诱导培养基为MS+2,4-D 2mg/L,蔗糖30g/L,琼脂8g/L,pH5.8。在黑暗条件下培养20~30天,室温 $26\pm 1^\circ\text{C}$ 。统计诱导频率,并对愈伤组织进行细胞学观察。

5. 愈伤组织继代

培养基同诱导培养基。愈伤组织在黑暗中生长20~25天后,挑取正常的愈伤组织,接在新的培养基中继续在黑暗中培养。

6. 植株分化

分化培养基为MS+0.5mgkT/L,蔗糖30g/L,琼脂8g/L,pH5.8。每天光照16小时,光照强度约1500LX,室温 $26\pm 1^\circ\text{C}$ 。统计分化频率。

• 2 •

7. 幼苗移栽

待幼苗长到5~10厘米时,将三角瓶放到室温下炼苗3天左右,然后移入小塑料盒中,在光照恒温箱内保湿培养10~15天,再移入大花盆中,精心管理,直至成熟。

8. 根腐病菌毒素提取与活性测定

(1)根腐病菌毒素提取 从黑龙江省产的小麦黑胚病粒上分离出根腐病菌 *Bipolaris Sorokiniana*,经斜面培养后,接在Fries培养液中搅拌,恒温培养3周,将培养菌液过滤、脱色和浓缩,得粗毒素,贮存在冰箱中备用。

(2)活性测定 将粗毒素高压灭菌后,取5毫升放入培养皿中,用感病品种新曙光一号种子做发芽试验。 26°C 下培养72小时后,检查发芽情况,根据发芽率、胚芽和根的长度确定粗毒素活性。

9. 无性系植株抗根腐病鉴定

(1)成株鉴定 将无性系后代植株种在病圃内,常规管理。孕穗期和开花期用根腐病菌孢子悬浮液接种(10×10 ,孢子数不低于20),注意保湿。灌浆期按5级标准调查旗叶发病情况,计算病情指数和反应指数。

(2)苗期鉴定 将无性系后代种在温室内,三叶期用根腐病菌孢子悬浮液接种,注意保湿。调查叶片的发病情况,计算发病率和反应指数。

试验结果

1. 辐射处理对幼穗离体培养的影响

由试验结果表明,不同基因型在辐射作用下有不同的诱导分化效果。一般来说,低剂量照射(1000Rad以下),可提高诱导频率和分化频率。高剂量照射则降低诱导和分化频率,其中对分化频率的影响尤为明显。

2. 辐射处理对花药离体培养的影响

辐射对花药离体培养的诱导频率和分化频率结果的表明,无论是照射减数分裂期的植株还是离体花药,诱导频率和分化频率大体上随剂量的增加而降低。不同基因型对电

离辐射的反应也不相同。相同剂量下,照射减数分裂植株对花药培养的影响,比照射离体花药小。

3. 辐射对幼胚离体培养的影响

(1) γ 射线照射的影响

γ 射线照射原胚期幼胚,诱导频率比对照平均降低 42.1%,分化频率比对照平均降低 63.3%。经 u 值测定,差异均达到极显著水平。

(2) 软 X 射线照射的影响

低剂量(1 000~3 000rad)软 X 射线照射能刺激愈伤组织的产生和生长,诱导频率和分化频率均高于对照。而且愈伤组织块大,呈乳白色,再生植株健壮,得苗率高。随着剂量增加,诱导频率和分化频率都逐渐降低。高剂量(5 000~7 000rad)照射下愈伤组织块小,表面有褐色斑点,再生植株纤弱。另外,辐射效应与基因型之间有明显的交互作用。克 87-64 1 000rad 处理的得苗率最高,而克 85-616 以 3 000 处理时得苗率最高。表明不同基因型有不同的辐射敏感性。

4. 辐射对成熟胚离体培养的影响

照射种子取成熟胚的接种试验表明,辐射抑制了愈伤组织的形成和植株再生,对后者影响更为严重。低剂量(500~2 500rad) γ 射线对愈伤组织的形成无明显影响,但显著抑制了幼苗分化。

5. 不同外植体的离体培养效果

以龙辐麦 3 号和黑 85-6497 为材料,同时将其成熟胚、幼穗和幼胚做为外植体进行离体培养。从培养效果看出,成熟胚和幼胚的诱导频率很高,都在 90%以上,幼穗较低,平均为 52.8%,分化频率幼穗则最高,幼胚次之,成熟胚最低。这表明,成熟胚和幼胚容易脱分化,幼穗容易再分化。细胞学观察发现,不同外植体产生愈伤组织的部位不同。成熟胚和幼胚的愈伤组织最初从胚根鞘和胚轴产生,幼穗愈伤组织可以在幼穗不同部位同时产生。

6. 根腐病菌毒素对愈伤组织的诱导和幼苗分化的影响

18 份材料上所做的幼胚培养试验表明,75ml/L 毒素加在诱导培养基中时,50%的材料诱导频率高于对照;同样含量的毒素加在分化培养基中时,只有 16.7%的材料分化频率高于对照。可见,毒素对幼苗分化的影响比愈伤组织的诱导要严重。将原胚期 1000rad γ 射线照射的幼胚及其未照射的幼胚同时接在含毒素的诱导培养基上,30 天后将诱导出的愈伤组织再接到无毒素的分化培养基上培养,结果表明,在含毒素的诱导培养基上, γ 射线辐照使幼胚的诱导频率降低 40.6%,分化频率提高 6.8%。

M_1 种子的成熟胚愈伤组织在含毒素的分化培养基上培养的效果是毒素含量越高,成苗率越低。

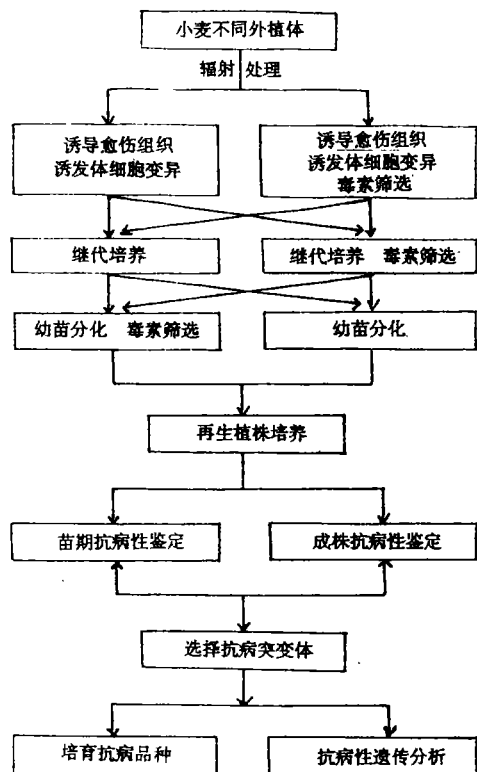
经毒素筛选出的 S_1M_1 及其原亲本的成熟胚分别接到含毒素的培养基上培养,结果表明,经毒素筛选的 S_1M_1 成熟胚愈伤组织的增重比原亲本多,分化频率也较原亲本高。可见,经毒素筛选出的 S_1M_1 ,其成熟胚对毒素有一定耐力。

7. 抗根腐病离体筛选的初步结果

8 个品系的不同外植体,在含根腐病菌毒素的培养基上离体筛选后所得到的 S_2 植株,在接菌条件下与原亲本比,病情指数降低 0.7~21.3%,从中选出的 RB400-1、RB400-2 和 RB400-3 等三个抗病突变系,经连续两年田间和温室的抗病性鉴定,它们的平均反应指数分别为 1.53、1.59 和 1.41,亲本则为 2.85,抗根腐病能力提高了 1 级。这些品系正要进行异地鉴定和产量对比试验。

8. 抗病突变体的诱发和离体筛选程序

利用辐射诱变与离体筛选技术相结合的方法,可以获得小麦抗病性变异并可在人为控制的精密条件下尽快筛选出来。根据多年的研究结果可以提出如下抗病突变体的诱发和离体筛选程序:



讨 论

许多研究指出,植物外植体在离体培养

中会产生体细胞无性系变异,辐射处理外植体或离体培养物能提高变异频率。辐射诱变与离体培养结合可以得到更为丰富的变异。

病原菌产生的毒素做为离体筛选因子,已在玉米、水稻和甘蔗等的抗病育种中得到成功应用。小麦根腐病虽然是一种非专化的真菌病害,以其粗毒素做为选择因子进行离体筛选,可提高后代的抗病水平,有可能选出抗病突变系。粗毒素可以加在诱导培养基中,也可以加在继代和分化培养基中。毒素在抗病性筛选中不仅起一种选择作用,而且影响离体培养的效果。这种影响还与试材的基因型有关。毒素浓度直接关系到离体筛选成效。根据我们的试验,所加的毒素浓度应使愈导频率或分化频率降低 40~50%左右为宜。

抗病突变体的诱发和离体筛选的技术体系应该包括:诱变处理、离体培养、抗毒素筛选、再生植株培养、对后代进行苗期和成株期抗性鉴定和抗病突变体的选育以及抗病性的遗传分析等。应用该体系,可在试验室内周年进行抗病突变体筛选,使作物的抗病育种从植株深入到细胞水平,大大提高了育种效率。

低温对玉米光合和呼吸作用的影响 及与冷害关系的研究

李月梅 马莹莹 杨英良 孟 良

(黑龙江省农业科学院栽培所)

摘要 低温降低玉米植株的光合强度和呼吸强度。低温持续时间越长,玉米植株光合、呼吸强度下降的幅度就越大,发生低温冷害的机率也就越高。影响最大的时期为二展叶期,其次为四展叶期,再次为灌浆期。早熟玉米品种对低温的反应比晚熟玉米品种更为敏感。试验结果还表明,生育期越早和温度越低就会出现光合强度下降幅度大于呼吸强度下降幅度的“逆反现象”,因而这也是最易发生低温冷害的关键时期。