

小麦赤霉菌粗毒素的制备和活性测定 及其在抗病性鉴定中的应用

唐凤兰 李忠杰

(黑龙江省农科院作物育种研究所)

张景春 朱秀庭 郭 梅

(黑龙江省农科院植物保护研究所)

摘要 本文报道了小麦赤霉菌粗毒素的制备和活性测定。赤霉菌粗毒素对小麦胚根生长,离体麦穗病变和胚根浸出液的电导率都有明显影响,而且与品种抗病性密切相关。测定这些变化可以简便迅速地鉴定品种的抗病性。

禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)是引起小麦赤霉病的主要病原物,它不仅使小麦罹病而减产,其次生代谢产物还导致人畜中毒,失去食用价值。研究表明,小麦赤霉菌产生的毒素是小麦等禾谷类作物罹赤霉病的主要原因。随着生物技术的发展,离体筛选技术在抗病育种上得到了广泛应用,并在不少作物上取得成功^[1]。小麦赤霉病是小麦的主要病害之一,以赤霉菌粗毒素做为选择和鉴定抗性的压力,进行抗赤霉病的生物技术育种是当今小麦育种的重要课题。小麦赤霉菌粗毒素的提取,活性测定及其在抗性鉴定中的应用是抗赤霉病生物技术育种的重要组成部分。现将部分研究结果报道如下:

材料与方 法

一、小麦赤霉菌粗毒素的制备

从黑龙江省小麦赤霉病发病区采集的赤

霉病穗上收取病原菌,在 PDA 培养基上进行分离培养得到的纯化菌珠接种在 Richara 产毒培养基上扩大繁殖,Richara 培养基的主要成份是:硝酸钾 10 克,磷酸二氢钾 5 克,硫酸镁 2.5 克,氯化铁少许,葡萄糖 34 克,蒸馏水 1000 毫升。在 500 毫升三角瓶中装入 250 毫升菌液,置于 25℃ 恒温摇床上培养三周左右,待长满球状菌丝团后,将其菌液过滤,脱色,并浓缩,高压灭菌后放入冰箱备用。

二、小麦赤霉菌粗毒素的活性测定

取新克旱 9 号的精选种子 25 粒置于铺有滤纸的培养皿中,分别加入 5 毫升的粗毒素液和蒸馏水,每个处理重复三次。在 25℃ 的恒温箱中催芽,3 天后测定胚根长度,并按以下公式计算根长抑制率:

$$\text{根长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照胚根长} - \text{毒素处理的胚根长}}{\text{对照胚根长}} \times 100\%$$

以根长抑制率确定粗毒素的活性(效价)大小。

注:本文请孙光祖研究员审阅,特此致谢。

三、利用赤霉菌粗毒素进行品种的抗病性鉴定

1. 离体麦穗鉴定法

取抗性不同的 6 份材料,从穗颈 10 厘米处各剪取 60 个无病麦穗,分两半分别插入装有粗毒素溶液和蒸馏水的三角瓶中,每个处理重复三次。置于 25℃ 恒温室内每天光照培养 16 小时,每隔两天观察一次麦穗的变化。

2. 胚根长度鉴定法

在放有双层滤纸的培养器中分别加入浓度为 4%、8% 的粗毒素溶液和蒸馏水各 10 毫升,分别播入具有不同抗性的小麦品种种子 25 粒(种子预先用蒸馏水浸泡 20 小时),重复 2~3 次。在 25℃ 的恒温室内发芽 3 天,测定胚根长,计算胚根长抑制率。

3. 电导鉴定法

取具有不同抗性的小麦品种种子各 200 粒,在 25℃ 的恒温条件下发芽 5 天,剪取胚

根用滤纸吸干。每个品种各称取 1 克,分别装入盛有 8% 粗毒素液和蒸馏水的小烧杯中,在 25℃ 的恒温条件下浸泡 24 小时后,无离子水冲洗 3 次,用滤纸吸干水分,放入盛有 50 毫升无离子水的小烧杯中,在 25℃ 恒温条件下放置 24 小时。取出胚根后,用 DDS-11A 型电导仪测定胚根浸出液的电导率。

试验结果

一、不同批次小麦赤霉菌粗毒素活性

三个批次赤霉菌粗毒素的活性测定结果列入表 1,不同批次粗毒素的胚根长抑制率大约在 80% 左右。可见只要接的菌量和培养条件控制一致,所制取的赤霉菌粗毒素活性(效价)基本稳定。

二、小麦赤霉菌粗毒素做抗病性鉴定

表 2 是利用离体穗鉴定法获得的结果。

表 1 不同批次小麦赤霉菌粗毒素的活性测定

处 理	批 次 项 目	第一批次		第二批次		第三批次	
		胚根长(cm)	抑制率(%)	胚根长(cm)	抑制率(%)	胚根长(cm)	抑制率(%)
粗毒素液		1.6	81.2	2.0	78.3	1.7	80.1
蒸馏水		8.5	—	9.2	—	8.8	—

感病品种新曙光一号粗毒素液处理 2 天时,芒变白,颖壳开张,处理 4 天时,整穗变褐。抗病品种苏麦三号等粗毒素液处理 2 天时,芒

顶端开始变白,处理 4 天时,部分小穗开始变褐。中抗品种穗部病变介于两者之间。

从胚根长的测量结果看出(表 3)不论用

表 2 赤霉菌粗毒素处理离体麦穗的致病变化

材 料	处 理 天 数	粗 毒 素		蒸 馏 水		抗 性 水 平
		2 天	4 天	2 天	4 天	
新曙光一号		穗芒变白颖壳外张	整穗变褐	绿色	绿色	感病
KC-1		穗芒开始变白	部分小穗变褐	绿色	绿色	抗病
苏麦三号		芒顶端变白	部分小穗变褐	绿色	绿色	抗病
克 071		芒变白	穗变浅黄褐色	绿色	绿色	中抗
克 664		芒变白	穗变浅黄褐色	绿色	绿色	中抗
克 653		芒变白	穗变浅黄褐色	绿色	绿色	中抗

4% 还是用 8% 的粗毒素液处理,抗赤霉病系的胚根长抑制率明显低于相应的亲本,经 χ^2 值测定差异达到极显著或显著水平。

8% 赤霉菌粗毒素处理的胚根浸出液电

导率的测定结果列表 4。表 4 可见,抗赤霉病品系的电导率均低于相应的亲本。表明胚根浸出液的电导率与其抗病性有密切关系,通过测定电导率可鉴定材料的抗病能力。

表 3

小麦赤霉菌粗毒素对小麦胚根生长的抑制

材 料	毒素浓度	平均胚根长(cm)	胚根长抑制率(%)	抗病水平
苏麦三号	0	40.8	—	抗病
	4%	19.6	52.0	
	8%	13.6	65.9	
T 苏麦三号	0	30.9	—	高抗
	4%	27.0	12.6**	
	8%	16.5	46.6**	
龙 83-6516-19	0	32.4	—	中抗
	4%	18.5	42.9	
	8%	10.0	69.1	
T 龙 83-6516-19	0	29.8	—	抗病
	4%	18.0	39.6*	
	8%	11.7	60.7*	
克 858	0	24.5	—	中抗
	4%	9.85	59.7	
	8%	9.85	59.7	
T 克 858	0	26.1	—	高抗
	4%	21.6	17.4*	
	8%	15.0	42.5**	

表 4

小麦赤霉菌粗毒素对胚根电导率的影响

材 料	苏麦三号		T 苏麦三号		龙 83-6516-19		T 龙 83-6516-19		克 858		T 克 858	
毒素浓度	0	8%	0	8%	0	8%	0	8%	0	8%	0	8%
电导率($\mu\text{O}/\text{cm}$)	0.53	1.36	0.57	1.38	1.67	8.18	1.36	5.63	3.23	6.46	3.87	6.29
差 值	0.83		0.81		6.51		4.27		3.23		2.42	

讨 论

小麦赤霉菌产生的毒素是引起赤霉病的主要原因;利用赤霉菌毒素进行抗病筛选和鉴定可以获得与接种病原菌相同效果。

许多研究指出^[1,2],小麦品种对赤霉病的抗性与其对毒素的忍耐性呈正相关。由本研究得知,在毒素作用下,抗病品种(系)离体穗的致病变化,胚根长抑制率都较感病品种(系)小;这与前人的研究结果相一致。

在赤霉菌毒素作用下,抗病材料胚根浸出液的电导率较相应的亲本材料小。这是由于抗病材料的细胞膜系统对毒素有强的耐性,在毒素作用下,损伤较轻,细胞内电解质外渗较少。植物细胞膜系统对毒素的耐性与

其抗病性有关。

在毒素作用下,通过测定离体麦穗病变,胚根长抑制率和胚根浸出液电导率可以简便和迅速鉴定小麦品种的赤霉病抗性。

参 考 文 献

- [1] 张炎卿,植物体细胞无性系变异与育种,江苏科学出版社,1991
- [2] 徐雍泉,方中达,玉蜀黍赤霉对小麦品种致病力的测定方法和致病力分化,植物病理学报,1982,12(4)
- [3] Wang YZ and Miller JD. effect of *F. graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to fusarium head blight resistance. J Phytopathology, 1988,122
- [4] 刘惕若等,小麦品种对赤霉病扩展力的研究,植物病理学报,1988,18(2)
- [5] 徐雍泉等,禾谷镰刀菌培养滤液对小麦胚根毒性

活体照射对水稻愈伤组织诱导的影响

李希臣 雷勃钧 尹光初 卢翠华 周思君 钱 华

(黑龙江省农科院生物技术研究中心)

刘多颖 颜 华

(黑龙江省农业现代化研究所)

摘要 以几种日本优质稻为材料,研究了 γ -射线在不同生理时期(抽穗期、孕穗期)照射,对水稻成熟胚的愈伤组织的诱导率、增殖和耐碱筛选过程中的相对生长量的影响。结果表明:抽穗期照射处理的材料愈伤组织诱导率明显高于孕穗期处理的材料;抽穗期处理的材料在各培养过程中的相对生长量也高于其它试材。说明 γ -射线在不同生理时期的诱变效应是不同的。

早在六十年代末,Nishi 等就曾报道,在水稻体细胞无性系后代中发现许多变异类型。高等植物细胞全能性的证实和组织培养技术的发展,显示出组织培养技术可以从细胞水平上筛选突变体的可能性^[1,2]。以后许多人又证实了体细胞无性系变异可供作物改良利用。为进一步提高变异频率和扩大变异范围,研究者们又将人工诱变技术和组织培养结合起来,并在烟草、马铃薯和小麦上已取得了一定成绩。水稻不同状态的培养细胞进行照射处理也获可喜结果^[3]。我们利用 ^{60}Co γ -射线对处于抽穗期和孕穗期的水稻进行活体照射,并与耐盐碱筛选相结合。本文着重报道不同生理时期 ^{60}Co γ -射线的诱变作用对水稻愈伤组织诱导的影响。

材料和方法

1. 供试材料:越光 M_2 , 笹锦 M_2 (分别于

抽穗期和孕穗期进行 ^{60}Co γ -射线照射,剂量 $\gamma 0.2$ 万)。

2. 培养基:基本培养基均为 MS^[4]。

(1)诱导和增殖培养基(C):①MS 加 2,4-D 2 毫克/升(C_1),②MS 加 IBA 0.006 毫克/升,6-BA 0.4 毫克/升,2,4-D 2 毫克/升(C_2)。

(2)选择培养基(S):MS 加 2,4-D 2 毫克/升,不同浓度 NaCl (0, 1.0, 1.5, 2.0% w/v)。

(3)再生培养基(R):MS 加酵母提取物 3g/L,水解乳蛋白 3 克/升,激动素 $5 \times 10^{-5}\text{M}$, 萘乙酸 $2 \times 10^{-6}\text{M}$ 。

蔗糖 3%,琼脂 7.5 克/升,pH 5.8,热压 (1.1 公斤/平方厘米)灭菌 20 分钟。

3. 方法:(1)种子去皮,75%酒精浸泡 40~60 秒,再用 0.1%升汞溶液浸泡 20 分钟,然后用无菌水冲洗 3~5 次。

(2)接种于 C 培养基上,每瓶 3 粒,26 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养,4 周后调查愈伤组织诱导率,转