

水稻抗纹枯病突变体的离体筛选

敖世恩, 杨 媚, 周而勋, 唐倩菲, 潘汝谦

(华南农业大学植物病理学系, 广东 广州 510642)

摘要:以水稻成熟胚培养产生的愈伤组织和悬浮细胞为筛选材料,以广东省水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* Kuhn 强致病力菌株 GD-11和 GD-118产生的粗毒素为选择压力,从水稻品种的选择、粗毒素致病力的鉴定、突变体的筛选方法、突变体的再生以及突变体再生植株对粗毒素的抗病性鉴定等方面展开研究,建立了水稻抗纹枯病突变体的筛选体系并获得了抗病突变体。筛选体系为:两步筛选法,即以粤香占的愈伤组织和悬浮细胞为筛选材料,以 ψ (粗毒素)为 3.5%和 4.0%分别作为第 1、2步的处理浓度,每一步处理的时间为 20 d;筛选出的突变体再生苗的病情指数为 37.55,而原始型再生苗的病情指数为 87.50,抗病效果达 57.08%。

关键词:水稻纹枯病;水稻纹枯病菌;粗毒素;抗病突变体

中图分类号: S435.111.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2006)01-0047-04

Screening of Rice Somatic Mutants Resistant to Rice Sheath Blight in vitro

AO Shi-en, YANG Mei, ZHOU Er-xun, TANG Qian-fei, PAN Ru-qian

(Department of Plant Pathology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Rice somatic mutants resistant to rice sheath blight were screened in vitro with calli and suspension cells derived from rice mature embryo culture and by using pathogen crude toxin extracted from the culture filtrates of strong virulent isolates GD-11 and GD-118 of rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn collected from Guangdong Province. In this thesis, studies were carried out on the choice of rice cultivars, virulence identification of crude toxin on detached rice leaves, mutant screening methods, regeneration of mutant plant, and resistance identification of regenerative plant to crude toxin. Thus, the system of in vitro screening somatic mutants for rice sheath blight resistance was established, and the mutants resistant to rice sheath blight were gained through this study. The screening system is two-step method, i. e. resistant somatic mutants were screened with calli and suspension cells of rice cultivar Yuexiangzhan and by using pathogen crude toxin concentration of 3.5% and 4.0% for the first- and second-step respectively, the treatment time for each step was 20 days; The disease index of regenerative plant of mutant was 37.55, while that of regenerative plant of original rice was 87.50, the effect of resistance was 57.08%.

Key words: rice sheath blight; *Rhizoctonia solani*; crude toxin; resistant mutant

由立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* Kühn 引起的水稻纹枯病 (rice sheath blight) 广泛分布于世界各稻区,是世界性的水稻三大病害之一^[1-2]。该病在我国从南到北均有分布,在我国南方某些地区已位于水稻三大病害之首,给我国水稻生产造成了严重的经

济损失^[2]。多年来,国内外学者在水稻抗纹枯病选育种等方面做了很多工作,并已取得了一些进展^[2-6],但由于水稻资源中缺乏高抗纹枯病的品种,加上常规杂交育种周期长,工作量大,所以,常规抗水稻纹枯病育种工作至今未能取得突破性进展。与

收稿日期:2005-11-08

作者简介:敖世恩(1978-),女,助理工程师,硕士,现在贵州省环境科学研究设计院环境科学咨询中心工作;通讯作者:周而勋(1963-),男,教授,博士,E-mail: exzhou@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(39870438);广东省自然科学基金(950383)

常规育种方法相比,利用植物组织培养技术离体筛选抗病突变体具有简便、快速、省地、易于在人工控制条件下定向选择等优点,是一条可行的抗病育种新途径^[7]. 1973年,Carlson^[8]首次将烟草野火病菌(*Pseudomonas tabaci*)致病毒素类似物加入培养基中作为选择剂,筛选到能稳定遗传的抗病突变体. 此后各国学者相继在玉米、油菜、小麦、番茄和水稻等作物上筛选出了抗病突变体^[9-13]. 近年来我国水稻纹枯病的发生范围不断扩大,水稻资源中缺乏相应的抗源,抗病品种甚少,本研究以目前广东省生产上大面积推广种植的、综合性状优良的不同水稻品种(系)为材料,利用组织培养技术,以水稻纹枯病菌毒素作为选择剂,定向筛选抗纹枯病的体细胞突变体,以期获得理想的抗纹枯病品种或抗性资源.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病原菌菌株 水稻纹枯病菌 *R. solani* Kühn 菌株 GD-11 和 GD-118,由华南农业大学真菌研究室保存,经致病性测定均为强致病力菌株^[14].

1.1.2 水稻品种 华航1号、华航3号(由华南农业大学农学院提供)以及丰华占、粤香占、培杂双七、矮秀占、II优128(由广东省农科院水稻研究所提供).

1.1.3 培养基 病原菌培养和毒素产生的培养基分别为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基和改良的Richard产毒培养液^[14];水稻组织培养基^[15-16].

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导培养 挑选色泽深黄、健康成熟的水稻种子并脱谷壳,取含一半胚的种子,作为外植体,经表面消毒处理后接种到含诱导培养基的培养皿内,25℃黑暗条件下培养直至长出愈伤组织.

1.2.2 愈伤组织的继代增殖培养 诱导培养14d后,水稻外植体的胚部长出了愈伤组织,将其切成绿豆大小的颗粒.适当风干处理后即可接入继代增殖培养基表面,25℃黑暗条件下培养.

1.2.3 菌株的活化及粗毒素的制备 将水稻纹枯病菌接种到PDA培养基上活化培养2d后,用打孔器($d=5\text{ mm}$)打取菌丝块,接种到改良的Richard产毒培养液中(150 mL的三角瓶装100 mL培养液),每瓶接种5块菌丝块,25℃下,光暗交替培养20d,每天手摇晃动1次,然后用8层纱布过滤,8 000 r/min离心30 min后取上清液,上清液经120℃高温高压灭菌20 min后,旋转蒸发浓缩到原体积的1/12,4℃保存备用.

1.2.4 粗毒素致病力的测定 参考董金皋等^[17]的方法,进行适当的改进.采用离体叶片接种的方法,以浓缩的粗毒素为原液,配制成体积分数(φ)为0、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%、9.0%、10.0%、12.0%和14.0%共10个处理.将4~5叶期水稻的第2、3片叶片剪成 $l=4\text{ cm}$ 的叶段供接种使用,叶片接种后置于28℃恒温培养箱中,10 000 lx光暗交替(12 h光/12 h暗)光照,24 h后观察叶片发病情况.根据病斑大小将病情分为0~5级,然后计算病情指数,以空白的Richard产毒培养液处理叶片为对照.病斑分级标准如下:0级—无任何病斑;1级—病斑大小占叶片总面积的1/8以下;2级—病斑大小占叶片总面积的1/8~1/4(不包括1/4);3级—病斑大小占叶片总面积的1/4~2/4(不包括2/4);4级—病斑大小占叶片总面积的2/4~3/4(不包括3/4);5级—病斑大小占叶片总面积的3/4及以上.

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病级叶片数} \times \text{该病斑级值})}{\text{叶片总数} \times \text{病斑最高级值}} \times 100$$

1.2.5 悬浮细胞系的诱导 挑选颗粒状明显,颜色淡黄至乳白,质感较干且硬的愈伤组织,从外植体上切下后再将其尽量切成比较小的颗粒,接种到悬浮细胞诱导培养基中,每瓶大约接种1 g左右,在25℃、弱光、120 r/min的漩涡式摇床上震荡培养,10 d继代1次.2代后进行抗病突变体的筛选.

1.2.6 抗病突变体的筛选 (1)固体筛选法:用继代了2次的愈伤组织作为筛选材料.本研究采取两步法,即第1次接种于 $\varphi=3.5\%$ 粗毒素培养基上,第2次接种到 $\varphi=4.0\%$ 粗毒素培养基上,每次培养时间为20 d,中间间隔1次接种到无毒培养基上恢复生长14 d,之后在无毒培养基上进行增殖培养,获得大量的突变型愈伤组织.(2)液体筛选法:用继代了2次的悬浮细胞作为筛选材料.与(1)相同,每次处理中间换1次培养基,中间间隔的恢复生长为10 d,最后在无毒的培养液中恢复培养10 d,得大量的突变型悬浮细胞.

1.2.7 再生植株的获得 参考叶娟^[16]的方法,从悬浮细胞获得再生植株.将悬浮细胞接到悬浮细胞预分化培养基中,25℃,每天光照10 h,预分化6 d,然后接种到悬浮细胞再生培养基上再生培养,25℃,每天光照10 h,培养30 d,让其长成植株.

1.2.8 再生植株的早期抗病性鉴定 同1.2.4,抗病效果以病情指数下降的百分率表示:

$$\text{抗病效果} = [(\text{对照的病情指数} - \text{突变体的病情指数}) / \text{对照的病情指数}] \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 供试水稻品种愈伤组织诱导率的差异

粤香占的愈伤组织诱导率最高,达61.85%,该品种的愈伤组织色泽淡黄,质地干爽,生长旺盛,是本研究其后各项试验的材料;矮秀占、华航1号、II优128、培杂双七、丰华占和华航3号的诱导率均较低,分别为26.91%、25.25%、15.06%、5.10%、5.41%和2.86%,且诱导的愈伤组织质量较差,在诱导培养基上继代一二次后会生根,不适合做后期的筛选工作。

2.2 粗毒素致病力测定结果

经水稻纹枯病菌粗毒素处理24 h后能够使水稻叶片在离体条件下产生与病菌引致基本相同的症状(表1)。从表1可看出,处理24 h后,随着粗毒素体积分数的增加病情指数呈逐渐上升的趋势, φ (粗毒素)为4.0%、5.0%、6.0%处理时,病斑局限在叶片的两端; φ (粗毒素)=7.0%时,病斑向水稻叶片的中部扩展; φ (粗毒素)=10.0%时,整个叶片被病斑布满,没有任何绿色可见,病情指数达到100。

2.3 粗毒素对愈伤组织处理时间的选择

在预备试验的基础上,本试验用 $\varphi=5.0\%$ 的粗毒素进行处理,以全部愈伤组织变褐为死亡,从第6 d开始进行统计,每隔1 d观察记录1次。结果(表1)表明,在第6 d时,愈伤组织的存活率已经明显低于对照,6~14 d这段时间存活率变化不大,保持在40%

表1 粗毒素的致病力及不同处理愈伤组织的存活率¹⁾

Tab.1 Virulence of crude toxin and livability of callus under different treatments n=3

φ (粗毒素 crude toxin)	病情 指数	t (处理 treatment)	存活率 livability	φ (粗毒素 crude toxin)	存活率 livability
/%	ID	/d	/%	/%	/%
0.0	0 H	6	45.88A	1.0	93.67A
4.0	20.33C	8	44.13B	1.5	94.17A
5.0	22.50F	10	43.75B	2.0	83.00C
6.0	25.50E	12	41.31C	2.5	75.00D
7.0	38.17D	14	40.13C	3.0	51.00E
8.0	52.00C	16	35.56D	3.5	39.00G
9.0	86.00B	18	17.38E	4.0	44.00F
10.0	100.00A	20	14.13F	4.5	26.83H
12.0	100.00A	22	13.38F	5.0	16.00I
14.0	100.00A	24	13.19F	6.0	4.50J
		CK	100.00	7.0	0.00K
				CK	92.17B

1) 同列数据后字母不同者示在0.01水平差异显著(Duncan's法)

以上,16 d时愈伤组织的存活率下降到35.56%。第18 d后明显下降,愈伤组织存活率为17.38%,20~24 d的愈伤组织存活率之间的差异不显著,说明在处理时间达到20 d以后存活的愈伤组织已经对该粗毒素浓度不敏感,所以,在其后的抗病突变体的筛选试验中,每次培养时间为20 d。

2.4 粗毒素对愈伤组织处理浓度的选择

将愈伤组织接种到含不同体积分数粗毒素的培养基上培养20 d后观察。结果(表1)表明,愈伤组织在 φ (粗毒素)为1.0%和1.5%的培养基中的存活率与对照基本一致,且愈伤组织生长明显比对照旺盛。从 φ (粗毒素)=2.0%开始,随着 φ (粗毒素)增大,愈伤组织的存活率急剧下降,至 φ (粗毒素)=3.5%时,愈伤组织的存活率下降到39%, φ (粗毒素)=4.0%时,愈伤组织的存活率略有上升(为44%),这可能是因为极少的细胞(通过肉眼是观察不到的)对该粗毒素浓度不敏感而存活下来,之后不断的分裂生长直到肉眼可见。当 φ (粗毒素)=4.5%时,愈伤组织的存活率又开始急剧下降,说明4.5%这个压力已经超过了大多数愈伤组织的耐受范围, φ (粗毒素)=7.0%时,愈伤组织全部死亡。

2.5 突变体筛选

经过2次筛选,获得了在 φ (粗毒素)=4.0%下可以稳定存活并生长的悬浮细胞和愈伤组织,本研究称之为突变型悬浮细胞和突变型愈伤组织。并对它们进行再生培养产生再生植株,获得了突变型再生苗。

2.6 突变型再生苗的抗病性鉴定

本研究采用离体叶片接种粗毒素的方法,以 φ (粗毒素)=9.0%接种,结果表明,24 h后,原始型再生苗的叶片布满病斑,而突变型再生苗的叶片仍未见明显的病斑;28 h时,发现在突变型再生苗叶片的两端即被剪刀剪过的地方开始有病斑出现。空白Richard产毒培养液处理的幼苗在28 h时仍然为绿色,无任何变化。原始型再生苗的病情指数87.50,突变型再生苗的病情指数为37.55,抗病效果达57.08%。表明本研究已经成功地筛选到了具有较强抗水稻纹枯病菌粗毒素能力的再生植株,尽管这些抗粗毒素再生植株在田间的抗病性如何还有待进一步研究,但它们无疑是水稻抗纹枯病育种以及进一步研究的宝贵资源。

3 讨论与结论

在抗病突变体的筛选中,选择一个合适的水稻

品种是筛选能够成功进行的基本条件. 本研究选用目前广东省大面积推广种植的7个水稻品种作为初选材料,最后筛选出粤香占为本研究其后各项试验的良好材料.

Yoder^[18]认为,毒素是否为致病的关键因子,是保证用毒素筛选出的突变体再生植株具有抗病性的必要条件之一. 但任春梅等^[4]认为,利用纹枯病菌的主要代谢产物或非主要致病代谢产物,都有可能筛选出抗病突变体. 本研究中,水稻纹枯病菌粗毒素能够使水稻叶片在离体条件下产生与病菌引致的基本相同的症状,说明本研究所采用的粗毒素含有主要的致病因子,从而也表明了本研究结果的可靠性. 本研究筛选出的突变型再生苗的抗病效果达到了57.08%.

选择一个适当的压力(即毒素浓度)是保证筛选出真正的抗病突变体的关键. 在耐受范围内选择最大的压力(即毒素浓度)可以有效地筛选出抗病突变体细胞. 此外,毒素处理时间的长短也是筛选成败的关键因素之一,本研究将毒素的处理体积分数定在愈伤组织的存活率为40%左右的毒素体积分数,即3.5%~4.0%,培养时间为20 d.

在抗病突变体的筛选中,与毒素处理的最佳浓度和最佳处理时间一样,筛选的次数也是一个非常重要的因素,它决定了试验中筛选出的抗病突变体的抗病性是否稳定. 有研究认为,对于生化背景不详,且可能比较复杂的性状,用多步法筛选突变体更有效,因为经过多步法筛选出来的突变体一般是多基因的突变^[7]. 所以本研究采用两步法,在第1次筛选时 φ (粗毒素)为3.5%,第2次筛选 φ (粗毒素)为4.0%,其目的方面是对第1次筛选获得的变异体进行抗病性稳定鉴定,另一方面是对其进行进一步的再筛选,以期获得抗病程度更高的抗病突变体. 本研究采用两步法所获得的每株突变型再生苗都具有不同程度的抗性,为将来各项深入研究提供了宝贵的水稻纹枯病抗性资源.

参考文献:

- [1] LEE F N, RUSH M C. Rice sheath blight: a major rice disease[J]. *Plant Disease*, 1983, 67(7): 829-832.
- [2] 孟庆忠,刘志恒,王鹤影,等. 水稻纹枯病研究进展[J]. 沈阳农业大学学报,2001,32(5):376-381.
- [3] 潘学彪,陈宗祥,张亚芳,等. 水稻抗纹枯病育种成效的初步评价[J]. *中国水稻科学*,2001,15(3):218-220.
- [4] 任春梅,高必达,何迎春. 水稻抗纹枯病的研究进展[J]. *植物保护学报*,2001,27(4):32-36.
- [5] EIZENGA G C, LEE F N, RUTGER J N. Screening *Oryza* species plants for rice sheath blight resistance[J]. *Plant Dis*, 2002, 86(7): 808-812.
- [6] PINSON S R M, CAPDEVIELLE F M, OARD J H. Conferring QTLs and finding additional loci conditioning sheath blight resistance in rice using recombinant inbred lines[J]. *Crop Sci*, 2005, 45: 503-510.
- [7] 赵蕾,梁元存,张天宇. 利用致病毒素筛选植物抗病突变体的研究进展[J]. *生物技术*,2001,11(3):41-44.
- [8] CARLSON P S. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco[J]. *Science*, 1973, 180: 1 366-1 368.
- [9] GENGENBACH B C, GREEN C E, DONOVAN C H, et al. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell culture[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5 113-5 117.
- [10] 李社荣,张敬,李安生,等. 小麦抗赤霉菌毒素细胞变异的筛选及再生植株生化特性分析[J]. *农业生物技术学报*,1997,5(3):216-220.
- [11] 吴力游,刘学端,黄红,等. 油菜抗菌核病突变体筛选方法研究[J]. *湖南农业大学学报*,1997,23(6):515-519.
- [12] 张喜春, LUTOVA L A, 韩振海,等. 利用细胞筛选方法获得番茄抗晚疫病突变体的研究[J]. *园艺学报*, 2000,27(5):377-379.
- [13] 于翠梅,张月杰,曹萍,等. 水稻抗稻瘟病突变体筛选初报[J]. *沈阳农业大学学报*,2000,31(2):153-157.
- [14] 徐海涛. 水稻纹枯病菌致病相关因子的研究[D]. 广州:华南农业大学资源环境学院,2003.
- [15] 潘瑞炽. 植物组织培养[M]. 2版. 广州:广东高等教育出版社,2001:25-36.
- [16] 叶娟. 水稻(*Oryza sativa* L)组织培养方法的比较研究[D]. 广州:华南农业大学生命科学学院,2002.
- [17] 董金皋,王江柱. 植物病原真菌毒素活性测定方法[M]//董金皋,李树正. 植物病原真菌毒素研究进展:第1卷. 北京:中国科学技术出版社,1997:61-74.
- [18] YODER O C. Toxin in pathogenesis[J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1990, 18: 103-129.

【责任编辑 周志红】