

抗稻瘟病细胞突变体筛选技术的研究进展

李楠,陈巧玲,李亚娟,郭海滨,罗玉容
(华南农业大学公共基础课实验教学中心,广东广州 510642)

摘要:稻瘟病是发生在世界各稻区最严重的真菌性病害,做好对该病的防治对水稻高产与稳产至关重要。随着生物技术的迅速发展,组织培养的离体筛选技术作为一种获得抗病突变体的高效手段而被广泛应用于水稻抗病育种研究。综述了抗稻瘟病细胞突变体筛选中愈伤组织的诱导、粗毒素的制备及毒素对材料抗性筛选等3个主要技术环节,并对抗病突变体在抗病育种中的应用提出问题及展望。

关键词:稻瘟病;组织培养;离体筛选技术

中图分类号:S435.111.4⁺1

文献标志码:A

论文编号:2011-0845

Research and Development of a Technical System for Screening Rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*) Somatic Mutant Resistance to Blast

Li Nan, Chen Qiaoling, Li Yajuan, Guo Haibin, Luo Yurong

(Center of Experimental Teaching for Common Basic Courses, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: Blast is the most serious rice diseases in the world. The prevention and controlling of it is therefore significant to the agriculture production. With the rapid development of bio-technology, an *in vitro* screening technique system in tissue culture for rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*) is widely applied as an effective method to the resistant breeding of rice. We review three main aspects of this technique: the callus induction, the preparation of crude toxin factor and the selection of toxin resistant materials. Furthermore, we introduce questions and prospects of the application of these mutants in rice resistant breeding.

Key words: rice blast; tissue culture; a technical system for screening rice somatic mutant

0 引言

稻瘟病(*Pyricularia oryzae* Cav.)是发生在世界各稻区最严重的真菌性病害,在水稻的整个生育期都可能发生,发病严重时可能造成稻株半饱和穗、白穗甚至死亡^[1-2]。每年稻瘟病的流行与爆发都会导致水稻产量的巨大损失,因此做好对该病的防治对农业生产和人民生活至关重要。

目前对该病的防治多采用化学防治和种植抗性品种加以控制,还没有对稻瘟病具有长期有效的抗菌剂。化学防治只能在一定程度上减轻发病程度,且化学药剂的施用会明显增加水稻的生产成本,造成环境的污染。而种植抗性品种在一定程度上与一定时限可以缓解稻瘟病的发生,但由于病原菌小种的遗传多样性和致病性快速衍变的特性,会在几年的时间里致使新

品种丧失抗性^[3]。尽管如此,长期的生产实践仍然表明,相对于化学防控,利用抗病品种来避免或减轻稻瘟病发生是最经济、最有效、最直接的途径之一^[4]。

在抗病育种中,传统育种方法周期长、人物力投入大,且易受气候条件的限制。随着生物技术的迅速发展,组织培养的离体筛选技术作为获得抗病突变体的重要手段之一而被广泛地应用于各种作物^[5-7]。与常规方法相比,它具有筛选群体大、效率高、时间短、操作简便易行、便于遗传分析等优点^[8]。虽然该技术的发展已有30年的历史,但在水稻的抗性筛选中,粗毒素浓度不易确定,后期所获得的抗性植株量少,遗传力较差等难题一直困扰该技术的发展^[9-10]。因此笔者对该技术的研究进展进行综述,旨在为以后技术难题的攻克提供参考,为生物学研究及获得抗病优良亲本应用于

基金项目:华南农业大学教育教学改革与研究项目“基于研究型的遗传学综合性实验教学改革”(JG09107)。

第一作者简介:李楠,女,1985年出生,重庆人,助理实验师,硕士,主要从事水稻遗传育种。通信地址:510642 广州市天河区五山华南农业大学公共基础课实验教学中心, Tel: 020-38634224, E-mail: linan060824@163.com.cn。

收稿日期:2011-03-28, **修回日期:**2011-05-25。

杂交育种奠定基础。

1 水稻愈伤组织的诱导

愈伤组织的形成是植物组织培养中最关键的技术环节。它主要是利用外植体活细胞潜在的全能性,将植物器官、组织、细胞在一定离体培养条件下转化为分生细胞,进而分化形成愈伤组织的一个过程^[1]。

1965年中国已开展了以水稻幼穗、幼胚、花粉粒和花药为材料的组织培养研究,并取得较大进展,在水稻的遗传转化、远缘杂交、种质资源离体保存、品种培育中具有重要作用^[2]。目前该技术发展虽然已经逐渐成熟,但在愈伤诱导的研究中还是存在不少难题有待进一步探索。首先,不同水稻品种间愈伤诱导率差异较大。赵海岩等^[3]发现‘辽农938’诱导率为83.0%,‘辽盐241’则为52.6%;李楠等^[4]研究表明‘缙2B’、‘缙恢36’和‘缙恢10’3种材料诱导率分别为58.1%、93.3%、85.4%,差异显著。其次,对于成熟胚、幼穗而言,花药愈伤组织的抗病性状能立刻纯合大大缩短育种年限,但诱导率较低且易产生白化苗。研究者发现成熟胚的愈伤诱导率一般高于50%,而花药的愈伤诱导率则低于20%^[15-17]。再次,不同品种间愈伤组织的诱导对培养基成分及培养条件要求不同。目前最常用MS、N₆和NB3种基本培养基^[18],庞冬辉等^[10]曾设计了基于MS和N₆的9种培养基对‘粳16’和‘白刚占’等水稻品种进行愈伤诱导,发现不同培养基间的诱导率差异显著,最终以MS+2,4-D 3 mg/L+蔗糖培养基诱导效果最好。李楠等^[4]曾发现相对MS、N₆培养基而言,选用经改良的NBD用于‘缙2B’、‘缙恢36’和‘缙恢10’的愈伤诱导和继代效果较好。在诱导愈伤的培养基中除了基本成分外还加有多种激素,激素的种类及配比对愈伤的诱导差异显著。目前普遍认为2,4-D是其中的关键因子,能提高内源ABA的水平,促进胚性能力的表达^[19],在一定的浓度范围内对愈伤组织具有诱导作用^[20]。但其浓度过高形成的愈伤组织结构疏松,易长出须根,器官的分化能力较差,过低则可能诱导不出愈伤,所以一般采用2 mg/L的浓度^[21];对某些材料而言,随着2,4-D浓度从2 mg/L提高到4 mg/L,诱导率也会有不同程度的提高^[4]。部分学者的研究还认为在含2,4-D的培养基中适当加入如NAA、IAA、ABA、6-BA、KT、细胞分裂素、蔗糖、铜元素等成分对愈伤质量、数量及再生都有一定促进作用^[16,22-23]。另外长期继代引起的愈伤组织褐化死亡等问题也一直影响着愈伤的诱导。

材料的基因型、外植体、培养基及条件是影响愈

伤诱导的关键因素。因此选择与研究目的相关且具有较高愈伤诱导率的材料是关键。虽然花药的愈伤诱导率较低,但研究发现其与成熟胚、幼穗间的愈伤诱导率存在显著正相关,所以可以参考具有较高诱导率的成熟胚材料进行花药愈伤诱导;同时花药培养中取单核靠边期、进行适当低温预处理,25℃左右的暗培养及采用液体培养基等条件对其愈伤诱导率都有一定的提高^[24-25]。另外在培养基中适当降低无机盐浓度和锰含量,添加VC、活性炭、ABA,适当降低培养温度等对防治愈伤组织褐化都有一定帮助^[24]。由于愈伤组织的诱导易受众多因素影响,因此研究者需要根据实验目的,选择适当材料的外植体,参考前人的研究设计不同的培养基及条件,确定真正适合本材料愈伤诱导的条件,适当扩大培养的数量,为进一步的研究做好准备。

2 粗毒素的制备

在抗稻瘟病细胞突变体筛选技术中粗毒素的制备是关键的中间环节,虽然目前毒素制备方法已经成熟,但制备过程中易受人为操作、实验条件、菌种来源等众多因素的影响,因此前人研究均表明粗毒素的制备和毒素浓度的确定是一个难点。稻瘟病菌的培养时间、培养温度、振荡频率及灭菌方式都影响稻瘟病菌的生长和致病毒素的分泌,不同条件下制备的粗毒素液的致病力在一定范围内呈现规律性变化^[26]。有研究发现,一般过滤灭菌的粗毒素毒性大于高压灭菌,由菌丝悬浮液制备的毒素比孢子悬浮液制备的毒性更强^[27];稻瘟病菌在山口富夫培养液中培养0~24天,其中12天提取的粗毒素毒性最强^[28]。在毒素浓度研究中发现适合用于抗病筛选的毒素浓度不易确定:(1)即使操作条件和菌种来源相同,不同时间重复提取的毒素毒性差异较大;(2)在抗病处理中若毒素浓度大,可大量淘汰感病的体细胞,获得可靠的抗病愈伤和再生植株的把握性较大,但植株再生率明显下降,影响选择效率。目前毒素提取与测定缺乏统一标准和定量分析,所以毒素浓度的界限只是相对值,随不同试验而异^[29]。有研究认为在一定范围内粗毒素浓度的增加其毒性也将增加,但二者并非完全正比关系^[3];同时材料不同,毒素浓度范围也有所差异^[10],因此需根据稻瘟病菌提取液毒性的测定结果,设立5种以上毒素浓度进行筛选^[17]。

3 粗毒素对材料的抗性筛选

利用稻瘟病菌产生的毒素作为选择压进行抗稻瘟病材料的筛选,国外始于20世纪70年代。一些学者先后从培养的稻瘟病菌孢子萌发液、菌丝培养液和重病稻叶组织中分离出 α -吡啶羧酸、稻瘟菌素、稻瘟醇、异

稻瘟醇、糖肽类物质等多种稻瘟病毒素,并测定其毒性,得到 α -吡啶羧酸处理水稻后其结果与田间接种稻瘟病相似,糖肽类物质可诱发水稻产生白穗,抗病品种对稻瘟病菌毒素有一定抑制作用等结论^[30-31]。陈璋等^[32]也得到类似结论,并表明 α -吡啶羧酸所诱导产生的稻瘟病菌变异体存在一定的小种特异性,同时稻瘟病菌在不同小种之间的致病毒素,在组成成分上存在明显差异。

中国最早利用粗毒素液对材料抗性进行筛选则始于20世纪80年代。郑祖玲^[9]、李朝灿^[33]等在水稻愈伤组织及花粉分化培养基中加入稻瘟病菌粗毒素,结果发现粗毒素能够抑制愈伤组织的分化和形态形成,并证明所获得的突变体花粉植株的幼苗对粗毒素的抗性比亲本强;且具有可遗传性。王金陵等^[34]研究表明不同材料对同一菌株提取的粗毒素抗性存在差异,稻瘟病菌粗毒素对水稻不同外植体愈伤组织的形成与分化均有明显的抑制作用。在水稻根冠细胞研究中发现不同致病小种之间对水稻根冠细胞死亡率差异达显著或极显著水平^[8],采用诱导与分化培养基均含毒素的处理方法筛选效果较好^[29,35]。水稻叶部及穗部受粗毒素的侵染与产毒菌株对水稻的致病力基本相似,产毒菌株对品种致病力强,粗毒素对其毒性也大^[36]。水稻种子经粗毒素浸泡3天,发现种子萌发受明显抑制,且催芽时有毒素接触比无毒素接触的种子受抑制更明显^[27]。在粳稻种的胚根、胚芽、愈伤组织成活率及分化率的研究中发现,毒素对它们有一定抑制作用,但愈伤组织再生植株的抗性会显著提高^[37-39]。毒素对体细胞和花药愈伤组织的诱导和植株再生有着明显的抑制作用,抑制程度随毒素浓度的增加而增大;花药的抑制程度大于种子胚愈伤组织,花药筛选系统的适宜毒素浓度低于体细胞筛选系统的毒素浓度^[17]。

近年来,研究者还采用了一些新的角度和方法展开对毒素抗性研究,发现不同浓度毒素对水稻幼苗的POD、SOD及可溶性蛋白均具有一定的诱导作用^[4,28]。高立宏等^[40-41]通过直接对愈伤组织滴加不同量的粗毒素及用毒素浸泡愈伤组织发现随着毒素量或浓度或处理时间的增加,水稻分化受到的抑制增强,最终得到毒素浓度在25%~30%、浸泡12~24 h和滴加浓度小于2.0 mL为最佳诱导条件的结论。周晓晔^[42]、张春燕^[43]等采用液体培养基建立了悬浮细胞的培养体系,认为悬浮细胞浸泡在处理液中,接触面大,毒素的作用力更强。

稻瘟病菌毒素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,可

以作为抗病筛选的选择压。其可能成功诱导突变体的原因:(1)愈伤组织细胞在培养和继代的过程中处于不断分化状态,因此很容易受培养条件和外加压力(如射线和化学物质)的影响而产生诱变;(2)稻瘟病菌粗毒素是稻瘟病菌生长过程中产生的有生物毒性的代谢产物,它能破坏寄主叶片的表皮组织,引起维管束系统的细胞坏死或失去功能,阻碍水稻呼吸系统,导致水稻不能正常发育,致使敏感细胞被杀死或淘汰,抗性较强的细胞得以保留^[39]。另外,粗毒素提取方法简便易行并且可消除病原菌间干扰和污染等复杂情况。因此,以稻瘟病菌粗提液作为外源胁迫因素,在愈伤组织和细胞水平上进行抗病筛选,可以获得抗稻瘟病的突变体^[38]。

4 问题及展望

利用抗病品种来避免或减轻稻瘟病发生是最经济、最有效、最直接的途径之一。目前利用组织培养的离体筛选技术获得抗病植株的研究已进行多年,但只有少数的抗病植株在实际中得到了利用,主要原因存在于3个方面:(1)粗毒素加入培养基中后,一方面改变了培养基的成分,不利于愈伤组织生长,容易造成愈伤组织感染及大量死亡;另一方面在继代过程中,逐步提高粗毒素浓度,虽可提高抗性细胞变异的频率,但降低生理适应型变异体的发生频率。(2)抗性植株获得量少且遗传力较差,筛选出的抗粗毒素的植株不等于抗稻瘟病的植株,有部分并不表现出抗性,这可能与植株本身的抗性机理有一定的关系^[10]。(3)多数情况下得到的抗性植株表现为单一抗性,而病原小种却高频率变异,间接导致植株抗性消失^[32]。

因此,如何改进抗性筛选技术,提高筛选效率,以得到真正具有可遗传的广谱抗性植株,还有待进一步的研究。目前随着生物技术的发展,分子标记辅助选择育种得到广泛的应用,相信将细胞离体筛选技术与分子标记技术相结合是未来水稻抗病育种发展的新趋势,期望更多的研究工作者能培育出优良的抗病品种,实现将实验推向实践应用的跨越式发展。

参考文献

- [1] 李继辉,杨隆维,向极钎,等.80年代以来抗稻瘟病育种主要成就[J].种子,2001,2:44-45.
- [2] 陈桂华,柏连阳,肖艳松.水稻稻瘟病诱导抗病性的研究进展[J].中国农学通报,2005,21(6):326-330.
- [3] 高立宏,李公美,王丕武.稻瘟病菌的液体培养及滤液毒性测定[J].长春师范学院学报,2004,23(2):71-74.
- [4] 黄红梅,赵志祥,李小娟,等.稻瘟菌粗提物对水稻成熟胚愈伤组织培养的影响[J].湖南农业科学,2006(4):32-34.

- [5] 李藤国,杨爱芳,张举仁,等.玉米抗茎腐病体细胞变异体的筛选及其后代抗病性研究[J].中国农业科学,2000,33(增刊):147-151.
- [6] 孙立华,续建明,吕学锋,等.用组织培养方法筛选水稻抗白叶枯病突变体 I.水稻愈伤组织抗白叶枯病原菌的选择及其再生植株的抗病性鉴定[J].遗传学报,1986,13(3):188-193.
- [7] 凌定厚.运用植物毒素离体筛选水稻抗胡麻叶斑病种质研究[J].遗传学报,1986,13(3):194-200.
- [8] 陈启峰,陈璋,王金陵.水稻抗稻瘟病细胞突变体筛选技术体系的建立及其在品种改良上的应用[J].中国农业科学,1992,25(5):50-57.
- [9] 郑祖玲,褚启人,张承妹.稻瘟病菌粗毒素对水稻的致病性[J].上海农业学报,1985,1(2):85-90.
- [10] 庞冬辉,岑秀芬.病原毒素诱导水稻抗稻瘟病突变体初探[J].广西农业科学,1995,1:6-8.
- [11] 曹春英.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2006:1-30.
- [12] 林艺.水稻组织培养的研究进展及存在问题[J].安徽农学通报,2010,16(1):78-79.
- [13] 赵海岩,郑文静,王德兴,等.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.
- [14] 李楠,凌英华,陈春燕,等.抗稻瘟病细胞突变体筛选技术体系的建立[J].西南师范大学学报,2008,33(3):52-56.
- [15] 王秀红,史向远,吴先军.水稻不同外植体培养效果及其相关性分析[J].中国水稻科学,2005,19(2):187-189.
- [16] 袁云香,张莹.水稻组织培养的研究进展[J].江苏农业科学,2010,1:83-86.
- [17] 朴钟泽,牛景,李艳萍,等.利用病菌培养液离体筛选水稻抗稻瘟病植株研究[J].华北农学报,2002,17(3):94-98.
- [18] 刘元凤,刘彦卓,贺红,等.几种影响籼稻成熟胚愈伤组织诱导及再生的因素[J].植物生理学通讯,2004,40(3):319-322.
- [19] 张东向,张崇浩,李杰芬,等.玉米叶片胚性愈伤组织诱导及其与内源 IAA 和 ABA 关系的初步研究[J].作物学报,2000,26(2):195-199.
- [20] 易自力,严钦泉,邓启云,等.几种水稻籼型恢复系和不育系离体培养和遗传转化的研究[J].湖南大学学报:自然科学版,2002,29(1):1-7.
- [21] 王子斌,潘学彪,唐克轩,等.提高籼稻品种组织培养效果的研究[J].扬州大学学报:自然科学版,2001,4(2):37-41.
- [22] 李代丽,康向阳.植物愈伤组织培养中内外源激素效应的研究现状与展望[J].生物技术通讯,2007,18(3):546-548.
- [23] 杨跃生,简玉瑜,郑迎冬.铜在水稻愈伤组织培养再生植株中的促进作用[J].中国水稻科学,1999,13(2):95-98.
- [24] 贺梅,宋冬明,张丽萍,等.水稻花药培养中常见问题及防治措施[J].北方水稻,2010,40(5):50-51.
- [25] 柴卫淑,谭学林,师佳,等.液体培养基在水稻花药培养中的应用研究[J].中国农学通报,2004,20(4):145-146.
- [26] 张君成,韦绍兴,张超冲.稻瘟病菌粗毒素的定量生物测定法研究[J].河北农业大学学报,1996,19(3):24-28.
- [27] 王金陵,许文耀,王允义.稻瘟病菌粗毒素的制备及其对水稻毒性的测定[J].福建农学院学报,1988,17(4):318-322.
- [28] 陈罡,钟鸣,侯玉柱,等.稻瘟病菌粗毒素的致病力测定及其对水稻幼苗生理生化的影响[J].种子,2006,25(5):20-23.
- [29] 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.
- [30] Kozaka T, Tsuchizawa M, Hanave M, et al. Phytotoxin glycopeptide inducing white head of rice plant produced by *Pyricularia oryzae* Cav Am[J]. Phtopath Soc.Japan,1985,5(2):199-204.
- [31] Arase S, Kinoshita S, Kano M, et al. Studies on host-selective infection mechanism of *pyricularia oryzae cavara*(2) production of susceptibility-inducing factor(s) from germinating spores and their phytotoxicity[J]. Ann. Phytopath. Soc. Japan.,1990,56(3):322-330.
- [32] 陈璋,陈启峰.运用 α -吡啶羧酸筛选水稻抗稻瘟病细胞变异体的研究[J].植物学报,1993,35(3):165-170.
- [33] 李朝灿,杨惠杰,甘代耀,等.水稻抗稻瘟病突变体的离体筛选与鉴定[J].福建省农科院学报,1987,2(2):1-9.
- [34] 王金陵,许文耀,黄碧丽.水稻品种(系)对稻瘟病菌粗毒素的抗性[J].福建农学院学报,1990,19(4):426-432.
- [35] 陈启峰,陈璋,王金陵. α -吡啶羧酸和致病毒素对水稻离体培养与幼苗生长的影响[J].植物学通报,1993,10(2):39-43.
- [36] 许文耀,王金陵.稻瘟病菌粗毒素对水稻品种的毒性与产毒菌株致病力间的关系[J].福建农业大学学报:自然科学版,1994,23(2):165-168.
- [37] 张君成,韦绍兴.稻瘟病菌粗毒素产生的影响因素探讨[J].广西农业大学学报,1996,15(3):221-224.
- [38] 刘文萍,刘丽艳,吕晓波,等.稻瘟病菌粗毒素的制备及其致病力的测定[J].黑龙江农业科学,1997,6:15-17.
- [39] 赵虔华,钟鸣,马慧,等.粳稻抗稻瘟病细胞突变体筛选技术体系的建立[J].安徽农业科学,2005,33(5):757-758.
- [40] 高立宏,汉丽萍,辛树权.稻瘟病菌粗毒素对水稻成熟胚愈伤组织诱导的影响及抗性筛选[J].长春师范学院学报,2007,26(5):72-76.
- [41] 高立宏,吕艳杰,汉丽萍.稻瘟病菌粗毒素对水稻成熟胚愈伤组织生长和分化的影响及抗性筛选[J].长春师范学院学报,2008,27(3):70-73.
- [42] 周晓罡,丁玉梅,孙茂林,等.24个水稻抗稻瘟病单基因鉴别品系悬浮细胞系的建立[J].西南农业学报,2008,21(3):642-647.
- [43] 张春燕,周明国,王建新,等.利用细胞和组织培养技术研究水稻抗稻瘟病机制[J].南京农业大学学报,2009,32(4):53-60.