

利用双层培养基筛选烟草抗赤星病突变体*

吴中心 姚根怀 张同庆 李扬立 刘凤兰 王素芹 宋会远

(河南省农科院烟草研究所, 许昌 461000)

摘 要 在接种赤星病菌的双层培养基上, 成功地从高感赤星病烟草品种 NC89 的花药中诱导出突变体苗。对这些突变体苗进行离体抗病性鉴定结果, 有 70% 的植株不同程度地表现出对赤星病抗性, 部分表现高度抗性。

关键词 烟草赤星病 双层培养基 抗性筛选

近年来, 烟草赤星病在河南、山东等烟区连续大面积发生, 危害甚大^[1]。为迅速改良烟草当家品种的抗赤星病性状, 我们开展了利用细胞工程技术筛选烟草抗赤星病突变体的研究。据报道, 在花药培养过程中, 利用病原菌毒素作为选择压力筛选抗病突变体, 已在许多作物中获得成功^[2-67], 但目前尚不能分离、制备烟草赤星病菌毒素。为此, 我们建立了双层培养基筛选系统, 其选择压力较毒素培养基更强。本文报道利用该筛选系统, 从高感赤星病烟草品种 NC89 的花培苗中筛选高抗赤星病突变体的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料来源

烟草品种 NC89、净叶黄由本所提供。赤星病菌-C 株系是从河南省内不同赤星病发病区采集的样品中分离出的毒力最强的菌株。

1.2 双层培养基的制备

先倒一层厚约 1.5cm 的土豆蔗糖培养基, 接种赤星病菌-C 株, 待菌丝长满培养基表面后, 立即倒一层约 2.5cm 厚的 MS 培养基(其中含多抗霉素 3.5g/L)。

1.3 接种花药

按常规方法将 NC89 花药接种于上述双层培养基上, 置 26℃ 低光照培养。待花培苗长至 3~5 片叶时, 转至 T 壮苗培养基上, 壮苗培养基的成分是: KNO₃ 95mg/L, NH₄NO₃ 82.5mg/L, CaCl₂·2H₂O 8.8mg/L, MgSO₄·7H₂O 7.4mg/L, KH₂PO₄ 3.4mg/L, MnSO₄·4H₂O 0.5mg/L, H₃BO₃ 0.2mg/L, FeSO₄·7H₂O 27.8mg/L, Na₂EDTA, 37.3mg/L, 蔗糖 10g/L, 琼脂 6g/L, pH5.8。

1.4 突变体苗的抗赤星病性状的离体叶片法鉴定

1.4.1 接种体的制备 采用整体接种法, 即将赤星病菌-C 菌株接种在 PDA 上, 于 28℃ 培养 15d, 加入无菌的 1% 葡萄糖溶液 5~10ml, 浸 30min, 用接种针锯下孢子和菌丝体配成悬浮液, 调节孢子含量至 1.0×10^5 /ml 备用。

1.4.2 播种方法 当花培苗长至9~10叶期时,取其第4、5片叶,置含适量MS液的培养皿中,按悬滴法^[3]在其表面接7滴赤星菌悬浮液,于温室(24℃)内培养,6d后计测叶片发病率及病级。发病率计算方法是:接种后发病位点数/接种位点数;病级则按有关文献分级^[4],设高感及高抗赤星病烟草品种NC89、净叶黄为对照。

2 结果与讨论

2.1 花培突变体苗的诱导

在双层培养基上共接种NC89花药120个,培养40d后,其中有两个花药出苗,分别出苗7和11株。待长至3~5片叶时,转至壮苗培养基上,一个月后,可基本长9~10片叶。

2.2 花培突变体苗的赤星病抗性表现

对得到的18株突变体苗全部进行了离体叶片的抗病性鉴定,结果如表1所示,其中样品号为1~7号的植株来自同一花药,8~18号来自同一花药,叶片号为1、2的分别取自第4、5片叶。

由表1可以看出,通过双层培养基筛选系统获得的单倍体苗大部分(66.7%)对赤星病菌的抗性有所提高,其中有3株(株号3、6、13)表现高度抗性,其抗性水平已基本接近赤星病抗源材料净叶黄。这表明:①利用该系统定向筛选抗病突变体是完全可行的;②烟草在双层培养基上获得的细胞水平上抗赤星病菌毒素的能力,与烟草植株水平上抗赤星病的能力有一定的相关性,且较采用毒素培养基筛选的结果更为明显^[2,6]。与毒素培养基相比,在双层培养基筛选系统中,开始时选择压力很小,以后随培养时间的延长而逐渐增强,直至毒力超过毒素培养基^[5],这可能是其筛选效率较高的原因。

经过双层培养基筛选的突变体苗中,有近30%仍高感赤星病,而表现抗性的突变体苗的抗性水平也高低不一,这说明烟草对赤星病的抗性很可能是由多基因控制的。由于高等植物遗传背景极其复杂,我们认为经过同一次筛选获得的高抗突变体(3、6、13号植株),虽然表型一致,即都表现对赤星病有高度抗性,但很可能具有完全不同的基因型,即基因突变位点不同。进一步研究这些高抗突变体各自的遗传行为,将有助于深入了解烟草对赤星病产生抗性的遗传机制。

同时我们也注意到,如果考虑突变体材料的来源,那么来源于同一个花药的1~7号植株中,有6株表现抗性(占86%),其中2株表现高抗(占28.6%);而来源于另一个花药的8~18号植株中,6株表现抗性(占55%),其中1株高抗(占9.1%)。这种差别是否说明突变体的突变机制与其花药来源有一定关系,还有待进一步了解。

另外,由表中还可看出,在用赤星病菌接种后,同一植株不同部位叶片的抗病能力也存在一定差异,即一般第5片叶的抗病性较第4片叶稍强,这表明材料本身的生理状况对其抗病能力有一定的影响。因此,在进行抗病性鉴定时,尽可能选取生理状况相同的材料是必要的。

表 利用双层培养基筛选的突变体的赤星病抗性鉴定结果

样品株号	叶片号	单叶发病率 (%)	单叶病级	平均发病率 (%)	平均病级	抗性评价
1	1	100	2	100	2	抗
	2	100	2			
2	1	100	4	100	3.5	高感
	2	100	3			
3	1	14.1	0	14.1	0	高抗
	2	14.1	0			
4	1	100	2	78.6	1.5	抗
	2	57.1	1			
5	1	100	2	92.8	2	抗
	2	85.7	2			
6	1	14.1	0	14.1	0	高抗
	2	14.1	0			
7	1	100	2	92.8	2	抗
	2	85.7	2			
8	1	100	2	78.6	1.5	抗
	2	57.1	1			
9	1	100	2	100	2	抗
	2	100	2			
10	1	100	4	100	4	高感
	2	100	4			
11	1	100	2	85.7	1.5	抗
	2	71.4	1			
12	1	100	3	100	3	感
	2	100	3			
13	1	42.8	0	35.7	0	高抗
	2	28.6	0			
14	1	100	2	100	2	抗
	2	100	2			
15	1	100	3	100	3	感
	2	100	3			
16	1	100	4	100	3.5	高感
	2	100	3			
17	1	100	3	100	3	感
	2	100	3			
18	1	100	2	78.6	1.5	抗
	2	57.1	1			
净叶黄 1	1	0	0	7.5	0	高抗
	2	14.1	0			
净叶黄 2	1	14.1	0	14.1	0	高抗
	2	14.1	0			
净叶黄 3	1	14.1	0	7.5	0	高抗
	2	0	0			
NC89-1	1	100	4	100	3.5	高感
	2	100	3			
NC89-2	1	100	4	100	4	高感
	2	100	4			
NC89-3	1	100	4	100	3.5	高感
	2	100	3			

参 考 文 献

- 1 陈瑞泰. 世界烟草病害形势. 中国烟草, 1989, (3): 5
- 2 周俭民. 烟草抗黑胫病突变体的细胞筛选. 遗传学报, 1990, 17(3): 180
- 3 董汉松. 烟草赤星病致病力测定方法的研究. 山东农业大学学报, 1989, 20(4): 1
- 4 方中达. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, 1979, 79
- 5 任树新. 中国科学院遗传所研究工作年报. 北京工业大学出版社, 1990, 64
- 6 Carlson PS. Methionine Sulfoximine Resistant Mutants of Tobacco. Science, 1973, 180: 1366
- 7 Chawla HS et al. *In vitro* selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum*. Theor Appl Genet, 1987, 74: 841

Selection of Mutants Resistant to Tobacco Brown Spot by Double-Medium

Wu Zhongxin Yao Genhuai Zhang Tongqing
Li Yangli Liu Fenglan Wang Suqin Song Huiyuan

(Tobacco Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Xuchang 461000)

Abstract The mutants were successfully induced from the anthers of tobacco variety NC89 highly sensitive to tobacco brown spot disease by using the double-medium in which *Alternaria alternata* was inoculated. The resistance of these mutants to *Alternaria alternata* was tested *in vitro*. The results indicated that 70% of these mutants showed resistance to tobacco brown spot to varying degrees, while some of them were of high resistance.

Key words: Double-medium; Resistance selection; Tobacco brown spot; *Alternaria alternata*