

用无性系变异获得抗条锈小麦新品系 4-8 研究

杨随庄¹, 叶春雷¹, 曹世勤²

(1. 甘肃省农业科学院生物技术研究中心, 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 兰州 730070)

摘要 以永良 4 号春小麦幼胚为外植体进行组织培养, 将获得的愈伤组织经过继代培养、分化培养后获得 45 株移栽成活的再生植株, 通过田间条锈病诱发鉴定选择, 获得了抗条锈病小麦种质资源材料 4-8。研究结果表明, 4-8 在田间连续 5 个世代中均表现对当前流行的条锈菌混合菌系(条中 31 号、条中 32 号、水-4、水-5、水-7、水-14)免疫; 人工接种鉴定中, 在苗期对上述混合菌系表现免疫, 成株期分小种和混合菌系鉴定中仍表现免疫, 说明通过组织培养获得的小麦种质材料 4-8 具有稳定遗传的条锈病抗性变异, 从而为利用体细胞无性系变异进行小麦抗条锈病新种质创制提供了可能。

关键词 小麦条锈病; 小麦体细胞无性系; 抗条锈病新种质

中图分类号 S 435.121

Stripe rust-resistant wheat germplasm 4-8 obtained via somaclonal variation

Yang Suizhuang¹, Ye Chunlei¹, Cao Shiqin²

(1. Research Centre of Biotechnology, Gansu Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730070, China;

2. Plant Protection Institute, Gansu Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract Wheat germplasm 4-8, a new somaclonal germplasm derived from the immature embryos of spring wheat variety Yongliang4, displayed immunity to yellow rust *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in fields for five generations identified by induction method. The components of yellow rust included equally mixed physiological races Tiaozhong31, Tiaozhong32, Shui4, Shui5, Shui7 and Shui14, which have been prevalent in Gansu Province and all over China currently. Artificial inoculation of mixed races with different virulence at seedling stage and adult stage, and inoculation of physiological races of yellow rust at adult stage demonstrated that the variant germplasm was immune to the mixed races of stripe rust with different virulence at seedling stage and adult stage, and also immune to physiological races of yellow rust at adult stage. It was concluded that it is possible to obtain wheat germplasm resistant to stripe rust via somaclonal variation.

Key words wheat stripe rust disease; wheat somaclone; new germplasm resistant to stripe rust

小麦条锈病是由条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)引起的一种世界性重要病害, 在我国也是发生范围最广、危害最重的小麦病害之一, 是限制小麦生产的重要生物因素之一, 曾多次大流行并造成巨大损失^[1]。化学防治虽能降低条锈病的危害, 但从资源节约、环境友好、绿色发展的角度来看, 选育和推广种植抗病品种才是最为经济、安全和有效的控制途径。因此, 抗锈育种

是一项长期而重要的工作。选育新品种的根本在于种质资源的发掘、创造、研究和利用, 已通过常规育种、染色体工程、外源 DNA 导入等方法获得了小麦抗锈种质资源和品种^[2], 为促进小麦生产作出了重要贡献。本文通过组织培养方法获得了抗条锈病小麦种质资源, 为利用体细胞无性系变异进行小麦抗条锈病育种提供参考。目前未见类似报道。

1 材料与方法

1.1 组织培养获得无性系植株

将永良4号小麦授粉(自花授粉)后14 d的幼胚接种在MS+2,4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+AgNO₃ 8 mg/L+CH 300 mg/L+蔗糖3%+琼脂粉0.5%培养基上,在25℃条件下暗培养30 d获得愈伤组织,挑选新鲜的愈伤组织接种在MS+2,4-D 1~2 mg/L+KT 0.5 mg/L+CH 300 mg/L+ABA 0.5 mg/L+蔗糖6%+谷氨酰胺0.5 g/L+琼脂粉0.5%继代培养基上进行继代培养,每25~30天继代培养1次,培养6个月后(培养温度为25℃,自然散射光照),将继代培养的愈伤组织转接到分化培养基(MS+KT 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+CH 300 mg/L+蔗糖3%)上,在25℃、2 000~3 000 lx、16 h(光)//8 h(暗)条件下进行分化培养获得再生植株(R₁代植株),练苗后移栽到温室中,同时种植供体亲本永良4号为对照,常规管理,抽穗后套袋自交,成熟后按单株收获种子。

1.2 无性系株系抗条锈病田间诱发鉴定

田间试验于2002—2006年在甘肃农科院兰州试验农场进行。按行长1.80 m、行距0.20 m、株距0.04 m点播种植(南北方向),每行点播46粒,R₂代材料种子全部播种,R₃代及其以后各世代材料播种2行,每10份无性系材料设一原供体亲本永良4号为对照(种2行)。在试验小区的垂直方向(东西方向)两边种植铭贤169作为诱发行,每年4月底~5月初用心叶涂抹法在铭贤169上接种当前流行混合条锈菌系,于6月20日左右观察记载条锈病发病情况。对获得的抗锈新品系再送本院植保所进行专门鉴定。田间观察记载和考种项目按常规育种要求进行,系谱法选择,各种材料按种植小区和株系收获。

1.3 无性系品系抗条锈病人工接种鉴定

抗条锈病人工接种鉴定试验于2006年在甘肃省农业科学院植保所兰州温室和甘谷试验站进行。种植及接种方法参照文献[3]进行,每处理重复3次。

1.4 条锈病记载标准

条锈病的记载采用全国统一的0、0;、1、2、3、4六级记载标准,0~2表示抗病,3~4表示感病。

1.5 供试条锈菌种

诱发鉴定中将条中31号、条中32号、水-4、水-5、水-7、水-14菌系等量混合后接种铭贤169;将上述菌系等量混合,在苗期人工接种供试材料;在成株

期,分别将各菌系和等量混合菌系接种供试材料。所有菌系均由本院植保所提供。

2 结果与分析

2.1 组织培养及再生植株表现

2000年接种永良4号幼胚500个,获得愈伤组织491块,愈伤组织诱导率为98.2%,继代培养后进行再分化培养获得再生植株55株,植株再生率为11.2%。55株再生植株移栽到温室内,成活45株。这些再生当代植株(R₁代)总体表现为:株高显著降低,约为对照的30%~70%,叶片变窄变短,株型小而紧凑,穗长变小,小穗数减少,抽穗期和成熟期显著提前或推迟,有的R₁植株移栽成活30 d后即抽穗,有的植株比对照晚熟20 d以上。所表现的这些变异除包含有可遗传变异外,也有组织培养的生理效应。

2.2 无性系株系抗条锈病诱发鉴定

2002年将45个再生株系(R₂)全部种植在田间,其中代号为4-8、4-21、4-27的株系中出现抗病植株和感病植株两种类型,4-8株系中出现了19株一致的抗条锈病变异类型(反应型为0型),而另外2个株系中出现了分离的抗病变异类型(4-21株系中出现3株抗锈单株,4-27株系中出现4株抗锈单株,各单株的条锈病反应型为1~2型,原供体亲本永良4号的反应型为4型)。将R₂代中抗病的32个单株全部收获,考种,在R₃代中种植为32个株系,这32个株系间条锈病抗性发生分离,其中19个株系表现一致抗条锈病(反应型为0型,对照品种永良4号为4型),占观察株系数的59.4%,1个株系抗病性表现分离(其中出现3个抗锈单株,反应型为2型,其余为3~4型),占观察株系数的3.1%,其余12个株系表现不抗条锈病(反应型为4型),占观察株系数的37.5%。说明R₂代中出现的大部分抗条锈病性状能够遗传到R₃代,37.5%的株系在R₂代中出现的抗病变异性状不能传递到R₃代,或者是由突变获复而表现为亲本的抗性水平。

根据R₃代抗锈材料的田间农艺性状表现和考种结果,从中入选253个单株种植成R₄株系进行鉴定观察,其中来源于R₃代中19个株系表现一致抗锈的250个单株株系间抗病性一致(反应型为0型,对照品种永良4号为3型),说明这些株系的抗病变异性状已稳定,并能传递,而另外3个株系表现为不抗条锈病(反应型为3~4),说明这些抗病变异性状

不能遗传或发生了突变获复。根据田间观察和考种评价,这些材料的农艺性状基本稳定,株系内整齐一致,各株系间在株高、株形、穗长、抗锈性方面相似,在有效分蘖、穗粒数、千粒重方面差异明显,与原供体亲本之间差异明显。从R₄代中入选45个抗条锈病株系(均来源于R₂代的4-8株系)进入R₅代进行抗锈性鉴定和农艺性状观察,在R₅和R₆代中,这45个株系的抗锈性和农艺性状在株系内表现稳定一致,株系间及与原供体亲本对照间差异明

显,并保持了R₄代中的特性,说明抗锈性及其他农艺性状变异在R₃代已稳定,并能遗传到以后的3个世代。

根据无性系材料历代田间表现和考种分析结果,从中决选一个株系,定名为4-8,其生物学特性见表1(R₆代结果)。与原供体亲本永良4号相比较,4-8对条锈病免疫,落黄熟相好,叶片变小,上举,叶功能期延长,株高降低,生育期提前,有效分蘖和结实小穗数增加,穗长、穗粒数和千粒重变小。

表1 抗条锈小麦新品系4-8与其供体亲本的生物学特性比较

名称	生育期/d	株高/cm	穗长/cm	有效分蘖/个	千粒重/g	结实小穗数/个	穗粒数/粒
永良4号	102	85.0	12.3	3.2	38.7	20.2	48.8
4-8	98	82.0	11.8	3.6	37.2	21.0	46.3

2.3 无性系株系抗条锈病人工接种鉴定

2006年将4-8及其原供体亲本永良4号一并送本院植保所进行条锈病抗性人工接种鉴定,鉴定结果表明(表2),4-8在苗期和成株期对目前流行小种

混合菌免疫,成株期对各生理小种也表现免疫,这一结果和田间诱发鉴定的结果相同,进一步说明了获得的抗条锈病变异性状遗传到R₆代中,4-8具有良好的条锈病抗性。

表2 抗锈小麦新品系4-8抗条锈性鉴定结果

名称	成株期							
	苗期 混合菌	条中31号	条中32号	水-4	水-5	水-7	水-14	混合菌
永良4号	3/40/50	3/30/50	3/60/80	3/25/40	3/40/40	3/30/60	3/25/80	3/25/50
4-8	0	0	0	0	0	0	0	0

3 讨论

体细胞无性系变异是植物组织培养过程中的一种普遍现象,已从组织培养再生植株的形态、生理生化、分子水平上得到验证^[4-5]。有关体细胞无性系抗病性的变异已在小麦^[6-7]、大麦^[8]、水稻^[9]、珍珠粟^[10]、亚麻^[11]等作物中得到证实。用体细胞无性系变异方法进行作物抗病性改良一般有两种方法,一是在组织培养的培养基中加入病原物(或病原物毒素)作为筛选剂进行胁迫选择而获得抗病突变体,二是利用组织培养过程中的自然变异,通过抗病性鉴定而获得抗病无性系种质。本项研究中的4-8小麦品系就是通过后一种方法获得再生植株,在田间诱发鉴定中选择得到的无性系后代材料,通过连续5个世代田间诱发鉴定选择及人工接种鉴定,对当前流行的条中31号、条中32号、水-4、水-5、水-7、水-14条锈病菌系表现免疫,证明其抗锈性能稳定遗传,这是利用体细胞无性系变异的前提条件。说明了利用体细胞无性系变异创造抗条锈小麦种质资源的可行性,而且该方法简便、时间短,同时也可进行其他农艺性状改良。目前未见有关小麦体细胞无性系抗条锈病的报道。

由于植物体细胞无性系变异的随机性,既有正

向变异,又有负向变异,而且往往有几个性状同时发生变异^[12],在一个无性系材料中同时出现目标性状的变异频率低,因此,从育种的观点出发,为了达到目标性状综合改良的目的,就要保证足够多的再生植株,这样才有可能得到理想的突变体。目前,就小麦组织培养再生体系来说,总的情况是组织培养植株再生率比较低,因此研究和优化小麦组织培养再生体系,提高组织培养植株再生率是小麦体细胞无性系变异育种的一项重要工作。本研究中只获得了45个再生植株,从中决选出1个品系,虽然该品系在株高、生育期、株型、抗锈性、有效分蘖方面优于原供体亲本,但穗长、穗粒数和千粒重方面出现了不利变异,其生产利用价值有待进一步鉴定。

体细胞无性系中,上一代中表现出的变异在下一代不表现,出现这种现象的原因一方面是由组织培养的生理效应引起,另一方面与突变的恢复有关。在其他作物体细胞无性系变异中也有类似的报道^[4]。本研究中,R₂代中获得32个抗锈单株,最终只有19个单株的抗锈变异性状遗传到R₆代,这种现象在研究其他农艺性状时也出现,是体细胞无性系变异中的一个普遍现象^[13]。

变异性状稳定速度快是体细胞无性系变异的一个特点^[13]。本文研究中,4-8的抗条锈病变异在R₃代中已稳定,并能传递到以后的3个世代,进一步证实了前人的研究结果。

有关4-8品系的抗锈性遗传学研究目前着手开始组配杂交组合(正反交),拟对其抗条锈性遗传基础进行研究。

参考文献

- [1] 李继平,金社林,曹世勤,等.1996年甘肃陇南麦区小麦条锈病发生特点及今后的防治策略[J].植物保护,1998,24(1):22~24.
- [2] 倪建福,欧巧明,令利军,等.小麦抗条锈新品系89144抗锈机理研究[J].植物保护,2006,32(1):30~34.
- [3] 曹世勤,金社林,贾秋珍,等.小麦慢条锈品种成株期抗性组分分析[J].植物保护,2006,32(4):39~42.
- [4] Jain S M. Tissue culture-derived variation in crop improvement [J]. Euphytica, 2001, 118:153~166.
- [5] 王立新,颜暘,石海波,等.小麦体细胞无性系的DNA突变[J].分子植物育种,2005,3(6):857~863.
- [6] 陆维忠,蒋宁,周楠,等.小麦抗赤霉病无性系变异的研究与应用[J].农业生物技术学报,1995,3(2):7~11.
- [7] Aruni B, Joshi A K, Chand R, et al. Wheat somaclonal variants showing earliness, improved spot blotch resistance and higher yield[J]. Euphytica, 2003, 132:235~241.
- [8] Li J C, Choo T M, Ho K M, et al. Barley somaclones associated with high yield or resistance to powdery mildew[J]. Euphytica, 2001, 121:349~356.
- [9] 高东迎,许志刚,陈志谊,等.体细胞突变体HX-3抗水稻白叶枯病基因的鉴定[J].遗传学报,2002,29(2):138~143.
- [10] Umeha S, Nagarathnal K C, Sudheer A, et al. Selection of downy mildew resistant somaclones from a susceptible B line of pearl millet[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 58:159~162.
- [11] Rutkowska Krause I, Mankowska G, Lukaszewicz M, et al. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*[J]. Plant Cell Rep, 2003, 22:110~116.
- [12] 高东迎,孙立华,朱永兰,等.水稻细胞突变体HX-3无性系的变异[J].江苏农业学报,2002,18(2):65~70.
- [13] 梁竹青,高明尉,成雄鹰,等.普通小麦体细胞无性系R2代变异发生的特点[J].作物学报,1995,21(1):49~56.