

百合抗尖孢镰刀菌无性系的离体筛选

丁丁^{1,2,3}, 吕长平³, 王继华^{1,2}, 崔光芬^{1,2}, 吴学尉^{1,2}, 张芝萍^{1,2*}

(1. 云南省农业科学院 花卉研究所, 云南 昆明 650205; 2. 云南省花卉育种重点实验室, 云南 昆明 650205; 3. 湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 以百合品种元帅(Acapulco)、卡萨布兰卡(Casablanca)的愈伤组织为试验材料, 附加不同浓度的枯萎病菌毒素粗提液, 用于抗尖孢镰刀菌无性系的离体筛选。结果表明, 以体积分数 75% 的毒素培养基上培养 10 d 作为百合抗尖孢镰刀菌无性系筛选的选择压比较适宜, 抗镰刀菌无性系的再生苗生长正常, 叶片中过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)活性均比未经筛选的对照株高, 经人工接种枯萎病菌鉴定, 2 个百合品种抗尖孢镰刀菌无性系的再生植株均表现中抗枯萎病。

关 键 词: 百合; 尖孢镰刀菌; 无性系; 枯萎病

中图分类号: S644.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0034-05

In vitro selection for lily clonal lines with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* toxin

DING Ding^{1,2,3}, LÜ Chang-ping³, WANG Ji-hua^{1,2}, CUI Guang-fen^{1,2}, WU Xue-wei^{1,2}, ZHANG Yi-ping^{1,2*}

(1. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 2. Yunnan Flower Breeding Key Laboratory, Kunming 650205, China; 3. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to obtain anti-*Fusarium* clones of lily, callus of Acapulco and Casablanca were employed as material for the selection of anti-*Fusarium* clones by adding various concentrations of toxin in MS medium. The result showed that medium containing 75% of the toxin and 10 d culture can be used as selection pressure for screening lily anti-*Fusarium* clones and its regeneration plants of disease-resistance had healthy growth. It was found that activity of three enzymes, POD, PPO and SOD, in screened plants was higher than that of control and the screened plants were healthy. Lily anti-*Fusarium* clones showed a middle level of resistance to lily blight disease by identification of disease-resistance levels.

Key words: lily; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*; clones; wilt

百合是世界上重要的商品花卉之一, 近年来的生产和消费呈逐年上升趋势。据统计, 目前全球百合种球的贸易额达 20 多亿美元^[1]。病虫害问题一直是制约切花百合质量提高的首要因素。由尖孢镰刀菌百合专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*)土

传真菌引起的枯萎病是百合最严重的土传病害之一^[2], 在全世界百合种植区均有感染和为害。为有效控制百合枯萎病, 多年来, 国内外科研工作者对这种病害的病原生物学、病害流行病学、防治方法等进行了研究, 摸清了百合枯萎病菌的习性和

收稿日期: 2010-06-11

基金项目: 云南省科技计划项目(2006NG14); 国家科技支撑计划项目(2006BAD01A1803, 2007BAD45B01); 云南省社会发展科技计划项目(2009ZC140M)

作者简介: 丁丁(1980—), 女, 河北赵县人, 硕士, 助理工程师, 主要从事观赏植物栽培及生理生化研究, zhengzheng2201@126.com;

*通信作者, blackfarinj@126.com

枯萎病的发生规律,认为选育和合理利用抗病品种是有效防治该病的手段之一^[3-5]。常规杂交选育百合新品种是一个漫长的过程,通常需要10年以上的时间,而采用体细胞无性系变异离体筛选技术,可加速抗性育种进程。利用病原菌毒素或类似物质作为选择剂,已筛选出抗甜菜褐斑病^[6]、抗油菜黑胥病^[7]、抗烟草野火病^[8]、抗水稻纹枯病^[9]、抗玉米小斑病^[10]、抗小麦赤霉病^[11]、抗茄子黄萎病^[12]、抗番茄晚疫病^[13]、抗西瓜枯萎病^[14]和抗香蕉枯萎病^[15]等突变体,但还没有关于百合等花卉的尝试。笔者以百合为试验材料,附加不同浓度的镰刀菌毒素粗提液进行抗性突变体的筛选,以期获得百合抗镰刀菌的育种中间材料。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为元帅(Acapulco)、卡萨布兰卡(Casablanca)2个百合商业品种的愈伤组织。所用尖孢镰刀菌百合转化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*) lily-F菌株由农业部花卉产品质量监督检验测试中心(昆明)提供。

主要仪器为日立S-3000N型扫描电镜和美国贝克曼库尔特公司的DU640型紫外分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 尖孢镰刀菌粗毒素的制备

将马铃薯蔗糖培养基上的尖孢镰刀菌落切成约5 mm×5 mm的方块,接种于装有150 mL 马铃薯蔗糖培养液的三角瓶中,每瓶3块,置于控温摇床上,振荡培养15 d。摇床转速120 r/min,温度25℃。待菌丝体长出,且营养液由混浊变为澄清时,用双层纱布过滤掉菌丝和孢子,滤液300 r/min离心20 min后,去沉淀,上清液煮沸15 min,冷却后,用细菌过滤器过滤灭菌,即得到无菌毒素粗提液^[16]。

1.2.2 尖孢镰刀菌毒素活力的测定

1) 用幼苗浸渍法测定:取Acapulco的愈伤组织再生组培苗,洗净根部培养基,分别用体积分数100%、80%、60%、40%、20%的毒素粗提液浸泡根部,放25℃光照培养箱,逐日观察幼苗失水萎

蔫情况。以无菌水浸泡为对照。病情分级标准:0级为健康无病;1级为1~2片叶片叶缘卷曲萎蔫;2级为3~4片叶片卷曲萎蔫;3级为5~6片叶片卷曲萎蔫;4级为叶片几乎全部萎蔫,甚至死亡。

2) 用愈伤组织浸渍法测定:用毒素粗提液原液浸泡Casablanca的愈伤组织,分别在浸泡后24、48 h取样,在扫描电镜上观察、拍照。以未用毒素原液处理的愈伤组织为对照。

1.2.3 抗病突变体的筛选

1) 筛选压的确定。分别配制体积分数20%、40%、60%、75%的毒素粗提液。愈伤组织继代培养基(经前期试验确定)为MS+2 mg/L Picloram + 0.03 mg/L TDZ +500 mg/L水解酪蛋白+500 mg/L酵母提取物。以不添加毒素的愈伤继代培养基为对照。分别将Acapulco、Casablanca的愈伤组织接种到上述培养基上,培养10 d,观察、统计愈伤组织的存活率。以存活率为10%~30%的毒素浓度为临界致死浓度^[17]。

2) 毒素粗提液的加压筛选。采用一步选择法,将上述试验中确定为临界致死浓度的毒素粗提液附加到愈伤继代培养基中,此培养基即为抗病筛选的选择培养基。将Acapulco、Casablanca的愈伤组织接种于选择培养基上,10 d后将存活的愈伤组织转入未添加毒素的愈伤组织继代培养基上培养10 d,再转入选择培养基进行筛选,如此反复筛选3次。将最终存活的愈伤组织转入再生培养基(经前期试验确定)MS+1.0 mg/L BA +0.1 mg/L KT +0.1 mg/L IBA中诱导分化,30 d后统计分化率。

1.2.4 抗尖孢镰刀菌无性系再生苗防御酶活性测定和抗病性鉴定

对Acapulco、Casablanca抗病愈伤组织再生苗人工接种百合枯萎病菌孢子悬浮液(孢子 5×10^5 个/mL),每处理5株,重复3次,每重复2株。以未经筛选的再生百合组培苗为对照。分别在接种后0、12、24、36、48 h取样,在紫外分光光度计上测定过氧化物酶(POD)^[18]、超氧化物歧化酶(SOD)^[19]、多酚氧化酶(PPO)^[20]的活性。7 d后观察筛选株的感病情况。病情分级与1.2.2分级标准相同。病情指数 $=\Sigma((\text{病级植株数} \times \text{病级代表数值})/(\text{总植株数} \times \text{最高病$

级代表数值)) $\times 100^{[21]}$ 。按样本的病情指数划分抗性等级:高抗 20,中抗 $>20\sim 50$,中感 $>50\sim 80$,高感 >80 。

1.2.5 数据处理

用Excel 2000和SPSS 13.0分析处理数据。

2 结果与分析

2.1 尖孢镰刀菌毒素粗提液的活性和筛选压

2.1.1 尖孢镰刀菌毒素粗提液的活性

百合幼苗经尖孢镰刀菌毒素粗提液处理后,叶片逐渐萎蔫致死。从表 1 可以看出,毒素体积分数 100%时,2 d 后幼苗开始萎蔫,5 d 后死亡;毒素体积分数 40%时,3 d 后幼苗叶片轻度萎蔫。可见毒素浓度越高,幼苗萎蔫越快,程度越重;毒素体积分数 20%时,4 d 幼苗叶片只有轻度萎蔫。

经毒素处理的 Casablanca 愈伤组织细胞的电镜扫描结果(图 1)表明,镰刀菌毒素对愈伤组织细胞产

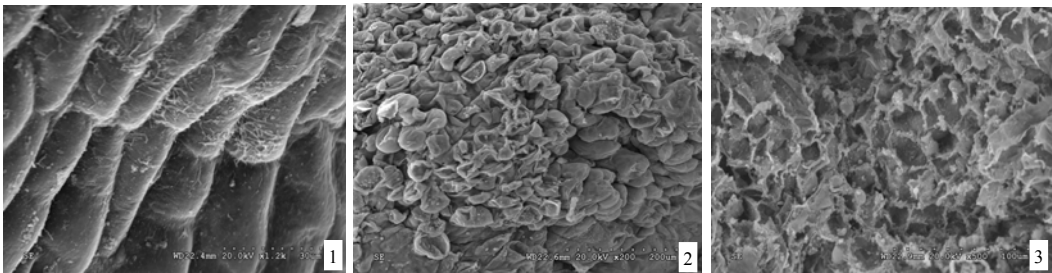
生毒害,且随着处理时间的延长,毒害加重:未经毒素处理的愈伤组织细胞排列紧密,细胞内含物丰富;处理 24 h 后,愈伤组织细胞出现破裂和塌陷现象;处理 48 h 后,愈伤组织细胞所受毒害加重,出现蜂窝状大面积塌陷,细胞解体。

表 1 不同体积分数尖孢镰刀菌粗毒素对百合再生苗的影响

Table 1 Effects of *Fusarium* toxin concentration on plantlet regeneration

毒素体积 分数/%	再生苗萎蔫程度						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
100	-	+	+++	+++	++++	++++	++++
80	-	+	++	+++	+++	++++	++++
60	-	+	+	++	+++	++++	++++
40	-	-	+	+	++	+++	+++
20	-	-	-	+	+	++	+++
CK	-	-	-	-	-	-	-

“-”无反应,植株正常;“+”轻度反应,1~2 片叶片叶缘卷曲萎蔫;“++”中度反应,大部分叶片卷曲萎蔫;“+++”重度反应,全部叶片卷曲萎蔫;“++++”全部死亡。



1 未经毒素处理;2 毒素处理 24 h;3 毒素处理 48 h。

图 1 卡萨布兰卡愈伤组织细胞的电镜扫描结果

Fig.1 Scanning electron micrographs on callus of Casablanca

幼苗浸渍法和愈伤组织浸渍法对镰刀菌毒素活力的测定结果表明,无论在细胞水平,还是在植株水平,镰刀菌毒素都对百合产生毒害,且随处理时间的延长,毒害加重,说明在发酵培养过程中镰刀菌毒素已充分释放到培养原液中,用此原液作为选择剂,对抗镰刀菌无性系进行筛选是可行的。

2.1.2 筛选压

由表2可看出,毒素对2个品种愈伤组织的生长均表现抑制作用。随着毒素体积分数的增大,愈伤组织存活率降低,抑制效果愈明显。75%毒素粗提液下,2个品种愈伤组织的存活率分别为20%和25%。

表 2 不同体积分数尖孢镰刀菌粗毒素对百合愈伤组织生长的影响

Table 2 Effects of different concentrations of *Fusarium* toxin on lily callus

品种	毒素体积分数/%	接愈伤数/块	存活数/块	存活率/%
元帅	0	60	60	100.00
	20	60	60	100.00
	40	60	55	92.00
	60	60	26	43.00
	75	60	12	20.00
卡萨布兰卡	0	60	60	100.00
	20	60	60	100.00
	40	60	45	75.00
	60	60	32	53.33
	75	60	15	25.00

从愈伤组织表现状态上看,10 d 时,75%毒素粗提液处理的愈伤组织松散,褐化死亡,只有极少数存活,因此,75%毒素体积分数处理 10 d 可视为大部分细胞生长的 1 个拐点,在抗尖孢镰刀菌无性系筛选试验中,75%毒素体积分数就是临界致死浓度,可使用含此浓度毒素的培养基作为选择培养基。

2.2 抗尖孢镰刀菌无性系的获得

经体积分数 75%的尖孢镰刀菌粗毒素筛选后,240 块 Acapulco 愈伤组织有 28 块存活,存活率为 11.67%,其中又有 10 块分化出了不定芽,分化率为 35.71%,突变率为 4.17%;240 块 Casablanca 愈伤组织有 47 块存活,存活率为 19.58%,其中有 14 块分化出了不定芽,分化率为 29.79%,突变率为 5.83%。Casablanca 的存活率和分化率都比 Acapulco 高。以上结果表明,经体积分数 75%的毒素处理过的细胞已经发生突变,并且部分抗镰刀菌毒素的突变基因得到表达,从而使愈伤组织能在镰刀菌毒素的临界致死浓度下生存下来。

2.3 抗尖孢镰刀菌无性系人工接种的抗病性

与对照株相比,Acapulco和Casablanca抗尖孢镰刀菌无性系人工接种镰刀菌孢子悬浮液后7 d,其植株正常生长,对枯萎病表现出一定的抗性。抗性鉴定结果(表4)表明,Acapulco和Casablanca的抗病突变株均达到中抗水平。

表 3 抗尖孢镰刀菌无性系人工接种对枯萎病的抗性
Table 3 The evaluation of lily plantlets regenerated for resistance to *Fusarium* wilt

品 种	病情指数	抗性
元帅抗尖孢镰刀菌无性系	35	中抗
元帅	74	中感
卡萨布兰卡抗尖孢镰刀菌无性系	28	中抗
卡萨布兰卡	64	中感

2.4 抗尖孢镰刀菌无性系人工接种后的防御酶活性

从图 2 和图 3 可以看出 经孢子悬浮液接种后,2 品种抗尖孢镰刀菌无性系的 POD、PPO 活性均呈先升高后降低的变化趋势。2 品种抗尖孢镰刀菌无性系的 POD、PPO 活性比其对照株均有所提高,

Acapulco 抗尖孢镰刀菌无性系的 POD 变化明显,峰值比对照株提高了 106.54 U/(g·min);其 PPO 活性比对照株也有明显增长。Casablanca 抗尖孢镰刀菌无性系的 POD 活性变化幅度比 Acapulco 抗尖孢镰刀菌无性系小,但峰值比对照株也提高了 20.13 U/(g·min);在整个测试过程中,抗尖孢镰刀菌无性系 PPO 活性的变化明显,但其对照的变化不大。

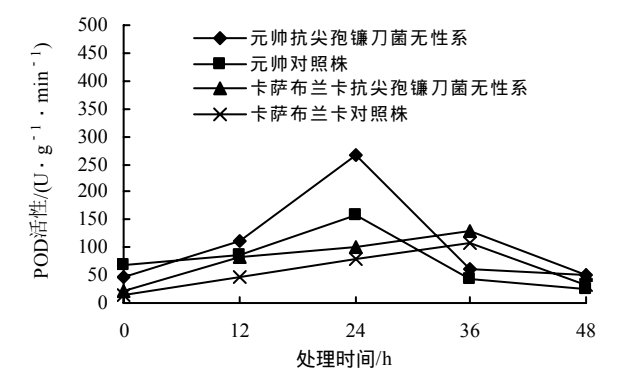


图 2 人工接种枯萎病菌后不同时间再生百合苗叶片的 POD 活性

Fig.2 POD activity of leaves of lily regeneration plants at different time after inoculation of *Fusarium*

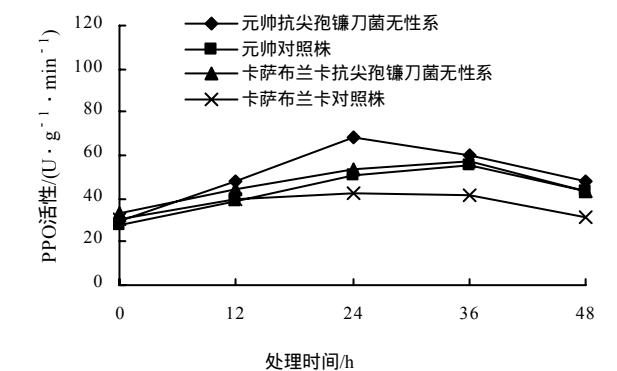


图 3 人工接种枯萎病菌后不同时间再生百合苗叶片的 PPO 活性

Fig.3 PPO activity of leaves of lily regeneration plants at different time after inoculation of *Fusarium*

从图 4 可以看出,接种孢子悬浮液后,2 品种抗尖孢镰刀菌无性系的 SOD 活性升高,但 Casablanca 对照株的 SOD 活性在 36 h 后下降。2 品种抗尖孢镰刀菌无性系 SOD 活性比其对照株均有提高。SOD 活性随着处理时间的延长而增加,说明经孢子悬浮液处理后百合植株清除氧自由基的能力增强。

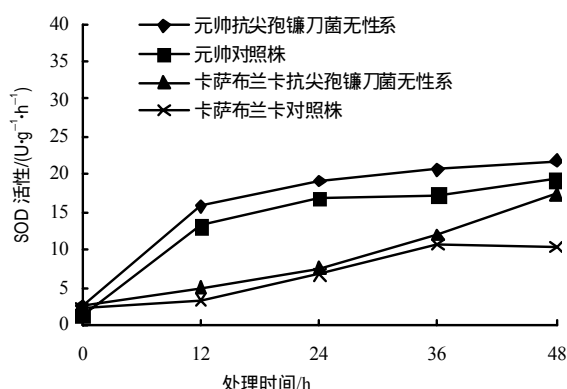


图4 人工接种枯萎病菌后不同时间再生百合苗叶片的SOD活性

Fig.4 SOD activity of leaves of lily regeneration plants different time after inoculation *Fusarium*

3 结论与讨论

a. 采用一步选择法,将百合愈伤组织接种在含临界致死浓度镰刀菌毒素粗提液的培养基上,反复筛选最终得到了抗尖孢镰刀菌无性系植株。利用真菌毒素作为选择剂,必须注意适宜的筛选浓度和筛选周期,同时在起始筛选时,必须有较大的供选群体。采用适宜毒素浓度是抗病筛选的关键,浓度过高,不易得到数量较多的愈伤组织或细胞;浓度过低,不易筛选出抗性材料。

b.用镰刀菌孢子悬浮液接种百合抗尖孢镰刀菌无性系植株之后,Acapulco和Casablanca的对照株与抗尖孢镰刀菌无性系植株叶片内的SOD、POD、PPO活性均先升高后降低,但抗尖孢镰刀菌无性系植株的变化更为明显,酶活性保持较高水平,可见,SOD、POD、PPO活性可以作为初步鉴定抗性突变体的指标。

参考文献:

- [1] 唐开学. 关于云南花卉产业发展战略的思考[J]. 西南农业学报, 2005, 18(1): 95-100.
- [2] van Heusden A W, Jongerius M C, van Tuyl J M, et al. Molecular assisted breeding for disease resistance in lily[J]. Acta Hort, 2002, 572: 131-138.
- [3] 梁巧兰, 徐秉良, 刘艳梅. 观赏百合根腐病原鉴定及药剂筛选[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 39(1): 25-28.
- [4] 潘其云, 朱明德, 邓建玲, 等. 百合镰刀菌枯萎病的

发生与防治[J]. 上海农业科技, 2004(3): 103-104.

- [5] Loffer H J M, Meijer H, Straathof T H P, et al. Segregation of *Fusarium* resistance in an interspecific cross between *Lilium longiflorum* and *Lilium dauricum* [J]. Acta Hort, 1996, 414: 203-208.
- [6] 马龙彪, 张悦琴, 吴则东. 抗甜菜褐斑病体细胞无性系变异的研究[J]. 中国糖料, 2001(1): 1-5.
- [7] Sarritan D J. Resistance response to phoma lingum of plant regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassia napus*[J]. Thero Appl Genet, 1982, 61: 193-200.
- [8] Carlson P S. Mehionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco[J]. Science, 1973, 180: 1366-1368.
- [9] 唐定中, 王金陵, 李维明. 水稻纹枯病体细胞突变体的离体筛选[J]. 福建农业大学学报, 1997, 26(1): 8-12.
- [10] 张举仁, 高树芳, 杨爱芳. 利用组织培养技术选育玉米抗小斑病突变体[J]. 生物工程学报, 1998, 14(4): 457-459.
- [11] 曹清波, 余毓君. 小麦幼胚愈伤组织培养和抗赤霉病体细胞筛选[J]. 华中农业大学学报, 1991, 10(1): 9-19.
- [12] 刘君绍, 田时炳, 皮伟, 等. 茄子抗黄萎病突变体离体筛选 II. 突变体筛选[J]. 西南农业学报, 2003, 16(4): 102-106.
- [13] 张喜春, Lutova LA, 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.
- [14] 黄河勋, 魏振承, 张孝祺, 等. 西瓜抗枯萎病突变体离体筛选技术的研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2004(3): 4-5.
- [15] 漆艳香, 谢艺贤, 蒲金基, 等. 海南省香蕉枯萎菌nit突变体的筛选及鉴定[J]. 热带作学, 2007, 28(3): 93-96.
- [16] 台莲梅, 许艳丽, 高凤昌. 尖孢镰刀菌毒素的初步研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2004, 16(4): 9-12.
- [17] 查夫拉HS. 植物生物技术导论[M]. 许亦农译. 北京: 化学工业出版社, 2005: 104.
- [18] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-165.
- [19] 高俊凤. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 120-121.
- [20] 梁小红. 三种草坪草耐 NaCl 变异细胞的筛选及再生植株生理生化特性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2005.
- [21] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1998: 63-64.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠