

# 利用组织培养技术选育玉米抗小叶斑病突变体

张举仁 高树芳 杨爱芳 于家驹

(山东大学生命科学院 济南 250100)

大叶斑病和小叶斑病是玉米最严重的病害,选育抗大、小叶斑病优良自交系及单交种是提高玉米产量的重要措施。Gengenbach 等以玉米 A619cms-T 愈伤组织为材料,筛选出对小叶斑病毒素具有抗性的愈伤组织与再生植株<sup>[1,2]</sup>,开辟了玉米抗病育种的新途径。由于从商品玉米自交系和单交种诱导能长期培养的胚性愈伤组织难度较大,该技术的实际应用未有长足的进展。到目前为止,还未见用组织培养技术选育出生产上可用的抗病自交系的报道。1989 年起,我们开展了筛选玉米抗小叶斑病毒素的愈伤组织及再生植株的工作,并从再生植株的后代中选育出了抗小叶斑病的优良育种材料<sup>[3,5]</sup>。

## 1 材料与方 法

材料为玉米自交系黄早 4,胚性愈伤组织的诱导和继代同李世润等的报道<sup>[4]</sup>。胚性愈伤组织继代半年后,转入筛选培养基上筛选。筛选培养基为加有 5%~30% 体积小叶斑病菌培养液的改良 MS 培养基<sup>[3]</sup>。2,4-D 浓度为 1mg/L。小叶斑病菌(*Helminthosporium maydis*)由山东省农科院植保所提供,从上年的病叶上分离,致病力强。病菌的基本培养基和培养方法同 Gengenbach 等采用的<sup>[2]</sup>。病菌培养 20d 后,取 4/5 体积的培养液贮于冰箱待用。剩余的培养液加入新鲜培养液,分成两瓶培养。菌液为深褐色,避光保存,贮藏期不超过 2 个月,在玉米培养基灭菌前加入。

$$\text{愈伤组织增殖率}(\%) = \frac{\text{培养后愈伤组织量} - \text{转入愈伤组织量}}{\text{转入愈伤组织量}} \times 100\%$$

再生植株及其后代的抗病性鉴定采用人工接种法。在喇叭口期分 2 次(间隔 1d)喷雾接种小叶斑病菌孢子悬浮液,孢子浓度为  $1.2 \times 10^6$  个/ml。调查项目包括病叶率、病叶严重程度、单位叶面积病斑数、病斑长度、褪绿点密度及面积等。其中病斑和褪绿点仅测定穗下一叶中段区。植株感病程度参照山东省玉米新杂交种全省多点联合鉴定试验制定的标准记载。发病级数分 0.5、1、2、3、4 五个等级。在再生植株后代的抗病性遗传分析中,以 R4 代植株为父母本,与对照黄早 4 回交。

## 2 实验结果

### 2.1 小叶斑病菌毒素对愈伤组织增殖的影响

浅黄色的胚性愈伤组织转移到加有小叶斑病菌液的培养基上,生长变慢,颜色变褐。浓度越高,褐变越深,愈伤组织增殖率逐渐下降(表 1)。在菌液浓度  $\geq 15\%$  的培养基上,愈伤组织局部死亡。在高浓度菌液的培养基上,部分愈伤组织块死亡。经初次筛选后存活的愈伤组织转入菌液浓度不变的培养基上再次筛选,愈伤组织死亡率高,增殖率大幅度下降。菌液浓度越高,增殖率越低。当菌液浓度为 15% 时,增殖率为 230.8%;菌液浓度为 20% 时,增殖率为 214.7%。而对照增殖率达 1204.1%。第 2 次筛选存活的愈伤组织转入菌液浓度不变的培养基上继续筛选,愈伤组织增殖率继续下降,在高浓度菌液的培养基上只有少数愈伤组织存活生长,增殖率很低。看来,用一定浓度的菌液杀死耐性较差的细胞需要较

收稿日期:1997-07-14,修回日期:1998-05-10。

长的培养时间。菌液浓度以 15% 或 20% 为宜,筛选次数以 2~3 次为佳。

表 1 小叶斑病菌液对愈伤组织增殖的影响\*

筛选次数	愈伤组织	菌液浓度/%						
		0	5	10	15	20	25	30
1	接种量/g	1.35	1.51	1.49	1.37	1.64	1.58	1.46
	增殖量/g	14.85	12.47	9.31	7.16	5.03	3.92	2.39
	增殖率/%	1100.0	825.8	624.8	522.6	306.7	248.1	163.7
2	接种量/g	1.21	2.32	2.06	2.37	2.25	1.97	2.14
	增殖量/g	14.57	10.31	7.86	5.47	4.83	3.12	1.94
	增殖率/%	1204.4	444.4	381.6	230.8	214.7	158.4	90.7
3	接种量/g	1.38	2.09	2.43	1.91	2.27	2.19	2.71
	增殖量/g	3.84	6.45	4.13	3.07	1.83	0.97	0.21
	增殖率/%	1002.9	308.6	170.0	160.7	80.6	44.3	7.7

\* 愈伤组织在继代后 25d 时称重。

## 2.2 小叶斑病菌毒素对愈伤组织分化的影响

在加 2,4-D 1mg/L 的改良 MS 培养基上,黄早 4 胚性愈伤组织可长期继代培养。去掉 2,4-D 后,产生大量成熟胚状体并再生出健壮植株。培养基中加入小叶斑病菌液,显著影响愈伤组织的分化。当愈伤组织转入 2,4-D 1mg/L 的筛选培养基上,20d 后分化出较多小苗(表 2)。小苗长势弱,叶色发黄。在第 2 次筛选中,愈伤组织只产生少量植株。在无 2,4-D 的培养基上,经过筛选的愈伤组织在无毒素的条件下,每瓶分化 12 株小苗。在加入 10%~20% 小叶斑病菌液的培养基上,每瓶分化苗数显著增多,比对照增加 40% 以上。当菌液达 25%~30% 时,分化苗数明显减少(表 2)。看来,适宜浓度的菌液在无 2,4-D 的条件下能促进玉米植株的再生。从筛选 3 代的愈伤组织再生植株,培养基中加入菌液的最适浓度为 20%。

表 2 小叶斑病菌毒素对愈伤组织分化的影响\*

2,4-D /mg·L <sup>-1</sup>	菌液浓度/%	0 (CK)	5	10	15	20	25	30
0	每瓶苗数	12.00	12.13	16.88	19.00	18.25	9.13	5.13
		±2.88	±3.72	±3.14	±2.78	±2.49	±1.25	±1.46
	对照%	100.0	101.1	140.7	158.3	152.1	76.1	42.8
1.0	每瓶苗数	0.38	0.88	1.63	4.38	9.75	4.88	1.63
		±0.74	±1.13	±1.77	±1.92	±1.67	±1.46	±1.77
	对照%	100.0	231.6	428.9	1152.6	2565.8	1284.2	428.9

\* 各处理统计 8 瓶,愈伤组织在菌液浓度不变的培养基上已筛选 2 代。

## 2.3 小叶斑病菌毒素对再生植株的影响

由耐毒素愈伤组织再生的植株,一般长势差,丛生叶苗比例高。在加有菌液的培养基上,植株生长慢,叶片窄短,根系不发达。转入无毒素的壮苗培养基上后,植株生长仍较慢。即使是生长正常的植株,移栽成活的频率也很低。未经筛选的愈伤组织再生的植株,在适宜条件下的移栽成活率达 80% 以上,

而经 20% 菌液筛选 3 次后的愈伤组织再生的植株, 移栽成活率只有 30%。

移栽成活的植株生长在适宜的季节(济南地区 5~9 月间), 长势弱, 叶片数少, 雌、雄器官发育不良。从加有 15% 或 20% 菌液培养基上筛选出的植株, 在接种小叶斑病菌孢子后, 有 26 株表现出抗病性。其中 4 株在抽穗前死亡; 14 株株高不足 70cm, 未产生生殖器官; 3 株果穗吐丝后授对照花粉未结籽; 其余 5 株长势较好, 自交后有 3 株结籽, 分别结籽 1、3、9 粒, 籽粒干秕。从未筛选的愈伤组织再生的植株, 自交及回交结实率达 30%。

由筛选 1 代的愈伤组织再生的植株, 移栽成活后的形态特征和抗病性与未经筛选的愈伤组织再生的植株相似。

#### 2.4 再生植株后代的抗病性

抗小叶斑病再生植株的种子播种到大田后, 只有 1 株的种子出苗 2 株( $R_2$  代)。小苗长势弱, 株型、叶片数、叶鞘色、花丝色、花药色等性状相同于对照黄早 4, 但抗病性明显高于对照, 生育期比对照长 10d。自交结实的果穗小, 穗行不整齐, 多数籽粒小而皱缩。次年播种后, 出苗 16 株。植株生长发育正常, 抗小叶斑病, 主要性状与对照相同或相近, 但叶形、叶片夹角和果穗性状等彼此间有差异。选 5 株自交结实。

$R_4$  代的植株按穗系种植。同一穗系内的植株差异较小, 不同穗系间可出现明显差异。如  $R_{4.1}$  和  $R_{4.2}$  与黄早 4 的形态特征相似。但  $R_{4.1}$  的籽粒为黄色,  $R_{4.2}$  的籽粒为浅黄色。人工接种小叶斑病菌孢子后, 通过统计褪绿斑点、病斑数目、长度和病叶率, 可知  $R_{4.2}$ 、 $R_{4.3}$  和  $R_{4.5}$  植株的抗病性显著高于黄早 4,  $R_{4.1}$  和  $R_{4.4}$  也有较好的抗病性(表 3)。

表 3 再生植株后代的抗病性鉴定\*

穗行	褪绿斑			病叶频率 /%	病斑		
	出现时间 /d	斑点密度 个/cm <sup>3</sup>	面积 /%		出现时间 /d	斑点密度 个/cm <sup>2</sup>	长度/cm
$R_{4.1}$	4	1.91 ± 0.32	11.27	58.67	8	1.90 ± 1.37	1.85 ± 0.69
$R_{4.2}$	3	2.21 ± 0.61	17.49	30.67	9	0.40 ± 0.70	1.05 ± 0.38
$R_{4.3}$	3	2.14 ± 0.42	14.81	26.00	9	0.80 ± 0.79	1.37 ± 0.55
$R_{4.4}$	4	2.09 ± 0.53	17.12	47.33	8	2.75 ± 1.49	1.67 ± 0.71
$R_{4.5}$	3	2.27 ± 0.38	16.32	22.00	9	0.70 ± 0.68	1.25 ± 0.27
Control	4	0.51 ± 0.47	3.08	86.00	7	9.22 ± 0.29	3.73 ± 0.29

\* 褪绿点数和面积在接种后 5d 统计, 病叶率和病斑在接种后 13d 统计。

选  $R_{4.2}$  和  $R_{4.3}$  植株自交或与黄早 4 回交, 其后代均表现出良好的抗病性, 自交植株抗性最强, 其次为回交植株, 黄早 4 抗性差(表 4), 即存在着抗性显性效应。同一基因型的植株发病级数在不同个体间有差异, 但相对较小。在同一回交组合中, 无论再生植株后代作父本或母本, 抗病性差异不显著, 即无明显的母体遗传效应。可肯定  $R_{4.2}$  和  $R_{4.3}$  及其后代的抗小叶斑病性状是稳定遗传的(表 4)。

### 3 讨 论

通过筛选耐病愈伤组织并再生植株来提高生产上常用自交系的抗病性具有针对性强、周期短等优点, 本工作以对小叶斑病抗性较弱的玉米自交系为材料, 获得了抗性突变系, 证实了该途径是行之有效的。

本工作表明, 小叶斑病菌培养液能明显影响愈伤组织生长和存活, 只有在菌液浓度和筛选次数适宜时才能选出耐毒素的愈伤组织并再生植株。由于低浓度菌液只抑制愈伤组织生长, 很难选出高抗病性

表 4 回交植株的抗小叶斑病鉴定(1994)\*

基因型	发病级数					鉴定植株数
	0.5	1	2	3	4	
R <sub>4.2</sub> × Huangzao4	1	7	43	6	0	57
Huangzao4 × R <sub>4.2</sub>	0	6	38	10	0	54
R <sub>4.3</sub> × Huangzao4	0	24	31	6	0	61
Huangzao4 × R <sub>4.3</sub>	0	20	30	8	0	58
Huangzao4	0	0	11	39	9	59
R <sub>4.2</sub>	5	38	17	0	0	60
R <sub>4.3</sub>	8	30	16	0	0	54

\* 接种后 25d 统计。1995 年重复试验得出相近的结果。

的细胞系,菌液浓度过高或筛选时间过长,则筛选出的愈伤组织长势很差,不易再生出健壮植株。看来筛选培养基中合适的菌液浓度和筛选次数是获得耐毒素植株的重要条件。

一些耐毒素愈伤组织再生的植株即使在无菌液的壮苗培养基上也生长很慢,很可能这些愈伤组织细胞已发生了后成变异(Epigenetic variation),从而导致再生植株长势差,移栽后新根发生慢。因此,要获得较多生长正常的抗病植株,应设法逆转毒素的不良作用。

### 参 考 文 献

- 1 Gengenbach B G, Green C E. Crop Sci, 1975, 15: 645 ~ 649
- 2 Gengenbach B G, Green C E. Proc Natl Acad Sci(USA), 1977, 74: 5113 ~ 5117
- 3 张 炎,张翠兰,吴郁文等.见:陈 英等主编,植物体细胞无性系变异与育种.南京:江苏科学技术出版社,1991, pp.248-253
- 4 李世润,张举仁,陈惠民.山东大学学报(自然科学版),1990,25(1):116 ~ 124
- 5 Chawla H S Wenzel G. Theor Appl Genet, 1987, 74: 841 ~ 845

## Selection of Resistant Mutants for *Helminthosporium maydis* via Tissue Culture in Maize

Zhang Juren Gao Shufang Yang Aifang Yu Jiaju  
(The Faculty of life Science, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract** Embryogenic calli derived from the commercial selfline Huangzhaosi of maize were transferred to medium supplemented with toxin from *Helminthosporium maydis* for the selection of resistant cells. After three selections, toxin-resistant calli were produced. The toxin showed obviously effects on the proliferation and differentiation of callus cells. On the medium added the toxin, plantlets were regenerated from toxin-resistant calli. The progenies of one regenerated plant showed significantly stronger resistance than Huangzhaosi, It was concluded that the toxin-resistant character could be stably inherited by the analyses of data from backcross plants.

**Key words** Maize, tissue culture, resistant mutant for *Helminthosporium maydis*