

马铃薯抗青枯病体细胞变异体 离体筛选研究初报

何礼远

(中国农科院植保研究所)

摘 要

本试验证明了青枯菌活菌作为马铃薯细胞变异体离体筛选的选择压力是适宜的。明确了活菌压力的最适浓度、愈伤组织接种的最适龄期和接种的方法。愈伤组织培养皿内继代培养重复接种筛选是快速而有效的筛选方法。从近2万块马铃薯叶圆片愈伤组织中, 经重复接种筛选获得了6块抗菌愈伤组织(比率为0.03%左右)。并经过分化诱导培养获得了再生苗。初步的抗性鉴定结果表明, 再生苗抗1(PSS—1)比母体(米拉脱毒试管苗)的抗病性有显著提高。

1 前 言

马铃薯青枯病是一种世界性细菌病害[1, 2]。在我国中原和南方马铃薯二季栽培地区以及西南一、二季混作区普遍发生, 危害日益加重[2]。采用抗病品种是防治此病最经济有效的办法[3]。在美国和国际马铃薯研究中心从60年代起就开始了杂交育种, 获得了一些抗病品种和大批抗病无性系材料[4]。近年我们从国际马铃薯研究中心引进了一些抗病品种和无性系材料, 然而经过鉴定这些抗青枯病材料, 大部分在我国的菌系和环境条件下表现不抗青枯, 有少数材料如MS—42.3, MS—1 C.2等, 具有良好抗性, 但农艺、经济性状很差, 不能直接在生产上利用, 作为抗原亲本也不理想。为此, 十分有必要探索其它的获得抗原材料或抗病品种的途径。

Carlson (1973) 首次采用了植物体细胞离体筛选的方法, 并成功地选出了烟草抗野火病的突变体[5]。近10年期间, 抗病突变筛选研究有很大进展, 现已相继选出了抗马铃薯晚疫病、玉米小斑病、稻瘟和白叶枯病、水稻胡麻叶斑病、小麦根腐病、烟草黑胫病等抗病突变体[4, 6~16]。

在植物青枯病方面, 迄今国内外还没有抗性变异体离体筛选的报道, 本文是我们在马铃薯上开展这一研究的初步结果。

2 材料与方 法

2.1 供试菌种

马铃薯青枯菌野生型菌株PO₄₁及该菌株的无毒突变株AP₄₁。

2.2 供试马铃薯

品种为米拉脱毒试管苗。

2.3 培养基

青枯菌培养基为牛肉汁蛋白胨培养基(或加TZC)。马铃薯愈伤组织培养基为MS基本培养基加入一定量的2,4-D和KT。

2.4 马铃薯愈伤组织接种青枯菌的方法

a. 点滴法 将菌悬液滴在马铃薯愈伤组织块上。

b. 培养基表面涂菌法 将一定量的浓度的菌悬液涂在平板上。然后将愈伤组织块放于平板培养基上面。

c. 培养基混菌法 将一定量菌悬液与培养基混和后制成培养基平板。再将愈伤组织块放其上培养。

d. 愈伤组织块病情评价方法 发病程度的分级标准为: 0——健康; 1——愈伤组织块开始变褐; 2——愈伤组织块的1/2变褐; 3——愈伤组织块1/2以上变褐; 4——整个愈伤组织变褐。根据不同级数计算出病情指数。

2.5 青枯菌培养滤液对马铃薯的毒力测定方法

a. 滤液滤液的获得 经3天振荡培养的1000毫升的菌悬液(约 1×10^{10} cell/ml) 8000转/分离心15分钟取上清液。浓缩1倍或2倍, 过滤灭菌, 用于毒力测定。

b. 对马铃薯植株的致萎作用测定方法(略)

c. 对马铃薯叶片的毒害作用测定方法(略)

d. 对愈伤组织生长影响的测定方法(略)

2.6 马铃薯抗菌愈伤组织重复接种筛选方法

将培养生长30天的愈伤组织块移植在含 1.5×10^3 细胞/毫升的培养基上, 培养30天, 然后将其中未死亡的愈伤组织块挑选出来, 移植到上述含有 1.5×10^3 细胞/毫升的

新鲜培养基上, 培养15天, 之后再将其存活的愈伤组织块挑选出, 并随即移植于含 1.5×10^3 细胞/毫升的培养基上, 生长15天。其中未死亡的愈伤组织块用于测定群体病情指数,

2.7 马铃薯抗菌愈伤组织的再生菌分化培养方法

将经3次接种青枯菌筛选存活下来的愈伤组织块进行表面消毒, 移放到分化培养基上诱导分化再生苗, 并进行快繁。

2.8 马铃薯抗病变异体再生菌的抗性鉴定方法

a. 试管苗鉴定法 取 3×10^8 细胞/毫升菌悬液1ml移入有5个叶片幼苗的三角瓶内, 用剪刀把幼苗根部剪伤, 在25℃下培养, 在第5, 7, 10, 15, 21天观察记录发病情况。

b. 针刺接种法 将盆栽生长的马铃薯植株于顶端第3片叶叶腋用针刺伤, 取30微升含 3×10^8 细胞/毫升的菌悬液滴入伤口, 放在30℃左右下生长, 在接种后3, 5, 7, 10, 15, 21天观察发病情况。

3 结 果

3.1 青枯菌活菌对马铃薯愈伤组织的作用

3种方法接种马铃薯愈伤组织的结果列于表1, 表2和表3。此3种接种方法都可以引起愈伤组织发病。点滴法所用的3种接种浓度引起的发病程度有一定差异, 但在接种后7天病情都相当严重(病指在53以上); 培养基表面涂菌法和培养基混菌法的发病情况相似, 2个高浓度处理的病情都很严重, 而浓度 1.5×10^3 个细胞/毫升则发病较轻, 在接种后15天病情方达50以上, 比较适宜于筛选。而混菌法又比涂菌法简便易行。因此以混菌法作为筛选变异体的方法比较适宜, 接

种浓度以 1.5×10^3 个细胞/毫升为宜。

表1 点滴法接种愈伤组织的病情指数

浓 度 (cell/ml)	接种后 3天	接种后 5天	接种后 7天	接种后 10天	接种后 15天
1.5×10^3	12.5	43.8	53.1	58.2	80
1.5×10^4	12.5	47.5	65.0	75.0	80
1.5×10^5	26.7	63.3	77.5	83.3	85

表2 涂菌法接种愈伤组织的病情指数

接种体浓度 (cell/ml)	接种后 3天	接种后 5天	接种后 7天	接种后 10天	接种后 15天
1.5×10^3	0	6.7	13.3	25	58.3
1.5×10^4	10	36.7	55.0	65	76.7
1.5×10^5	3.3	38.3	53.3	78.3	96.7

表3 混菌接种法接种后各阶段愈伤组织的病情指数

接种体浓度 (cell/ml)	接种后日数				
	3天	5天	7天	10天	15天
1.5×10^3	17.5	30	35	48.3	58.3
1.5×10^4	5.0	37.5	60	65.0	87.5
1.5×10^5	25.0	50.0	62.5	67.5	83.3

3.2 青枯菌培养滤液对马铃薯的作用

a. 对植株离体的致萎作用 试验结果(见表4)表明,青枯菌的有毒菌株PO₄₁和无毒菌株AFO₄₁的培养滤液对马铃薯植株都有致萎作用,而且随着培养滤液浓缩倍数加大,致萎程度亦随之加重,但FO₄₁培养滤液比AFO₄₁培养滤液致萎作用更强一些。

b. 青枯菌培养滤液对叶片的作用 青枯菌培养滤液注射叶片的结果表明,无论原液还是浓缩液都对马铃薯叶片无任何毒害作用,即滤液对马铃薯不能致病。

c. 青枯菌培养滤液对愈伤组织生长的影响 试验结果见表5, PO₄₁培养滤液在5天后开始引起愈伤组织变褐。各浓度表现的

毒害作用也不规律。

以上3个试验的结果表明,青枯菌的培养滤液不宜用作筛选马铃薯抗病变异体的选择压力。

表4 不同滤液处理植株的病情指数

滤 液	处 理 12小时	处 理 24小时	处 理 48小时	处 理 72小时
CK(培养基1, 2, 3)*	0	0	0	0
APO ₄₁ 滤液1	0	0	5	5
APO ₄₁ 滤液2	0	5	45	50
APO ₄₁ 滤液3	0	0	55	70
PO ₄₁ 滤液1	0	0	45	70
PO ₄₁ 滤液2	0	0	70	100
PO ₄₁ 滤液3	50	100	100	100
水	0	0	0	0

* 1代表菌培养原液; 2代表浓缩1倍液; 3代表浓缩2倍液

表5 培养滤液处理的病情指数

处 理	接 种 后			
	3天	5天	7天	10天
CK(培养基1, 2, 3*)	0	0	0	0
APO ₄₁ 滤液1, 2, 3	0	0	0	0
PO ₄₁ 滤液1	0	4.2	12.5	14.6
PO ₄₁ 滤液2	0	0	10.4	10.4
PO ₄₁ 滤液3	0	16.7	42.5	52.5

* 1代表菌培养原液; 2代表浓缩1倍液; 3代表浓缩2倍液

3.3 抗青枯病变异体筛选的最适接种时期试验

试验结果表明(见表6),采用叶圆片和生长15天的愈伤组织块作为接种材料, 1.5×10^3 细胞/毫升浓度的菌悬液接种后21天病情指数已达90以上,说明这样的材料不适合用于抗病变异体筛选。而生长30天和45天的愈伤组织块在接种21天后病情指数都在60左右,因此采用这样龄期的愈伤组织作为筛选材料是适宜的。但为了缩短筛选周

期, 应当以生长30天的愈伤组织块作为筛选抗病变异体的材料。

表6 叶圆片和不同龄期愈伤组织接种后各时期的病情指数

接种材料	接种后					
	3天	5天	7天	10天	15天	21天
叶圆片	25	37.5	65.0	87.5	96.5	100
15天愈伤块	10.0	22.5	37.5	57.5	76.0	91.3
30天愈伤块	5.0	22.5	32.5	37.5	47.0	58.0
45天愈伤块	5.0	25.0	28.3	35.0	38.5	60.0

注: 菌液浓度为 1.5×10^3 细胞/毫升

3.4 抗菌愈伤组织的筛选

先后进行20次19200块愈伤组织的活菌接种筛选, 第1次接种后存活的愈伤组织有220块, 若不算第15~20次的污染, 结果筛选率约为1.5%。经过第2, 3次重复接种后仍有6块愈伤组织存活, 筛选率约为0.015%, 结果见表7。

表7 愈伤组织抗病变异体筛选

筛选次数	接种愈伤组织块数	第1次	第2次	第3次
		接种筛选后存活块数		
20	1000	15	0	0
2	2000	40	10	1
3	1500	15	2	0
4	500	0	0	0
5,6	3000	50	2	2
7,8,9	3000	40	4	0
10,11	1000	10	1	1
12,13,14	2500	30	3	1
15,16,17,18	2200	污染	—	—
19,20	2500	部分污染	3	0

3.5 再生苗的诱导分化

6块抗青枯菌的愈伤组织再分化培养基上进行诱导培养后, 获得了2株再生苗, 分别编号为抗1(PSR—1)和抗2(PSR—2)。

3.6 再生苗抗青枯病的初步鉴定

a. 试管苗接种鉴定 结果(表8)表明, 再生苗抗1与米拉苗在5, 7, 15, 21, 30天内病情指数差异极显著。

表8 伤根接种后各时期试管苗抗1的病情指数

处 理	5天	7天	10天	15天	21天	30天
抗1	2.5	2.5	7.5	12.5	32.5	34
米拉(试管苗)	10	17.5	37.5	67	83.5	96.0

b. 针刺茎部接种鉴定 结果(见表9)可看出再生苗抗1与米拉对青枯菌的抗性有一定程度的差别。不过, 一般是不用这种高强度接种方法来鉴定抗病性差异的, 尽管这样再生苗抗1仍表现出一定的抗病性。

表9 温室栽培条件下接种后各时期再生苗抗1的病情指数

处 理	3天	5天	7天	10天	15天	21天
抗1	6.8	36.4	45.5	72.7	81.8	90.9
米拉(薯块苗)	25	66.7	82.1	98.8	100	100

c. 对再生苗抗1的愈伤组织进行接种 结果(见表10)表明, 抗1再生苗的愈伤组织与母体米拉的愈伤组织的病情指数在21天内差异极显著。

表10 抗病变异体再生苗的后愈伤组织与米拉愈伤组织在接种青枯菌后各时期病情指数的比较

处 理	3天	5天	10天	15天	21天
抗1	3.2	11	24	53.3	59.8
米拉	33.3	50.8	69.2	97.5	100

4 讨 论

a. 农作物体细胞抗病变异体离体筛选

一般多采用病原物毒素为选择压力。本研究中测试了青枯菌培养滤液对马铃薯离体植株、叶片和愈伤组织块的毒性作用。结果表明青枯菌的培养滤液对马铃薯叶片和愈伤组织都没有作用, 它只对离体植株有致萎作用; 野生型菌株和无毒变异菌株基本上没有差别, 这与青枯菌活菌对马铃薯植株、叶片和愈伤组织的致病作用显然不同, 说明青枯菌的培养滤液不宜用于抗病突变体筛选。

b. 关于采用活菌压力进行抗青枯病变异体的筛选, 过去国内外都未有报道, 有人亦曾怀疑用这种方法来筛选抗青枯病这类系统感染病害的突变体的可能性。本研究已初步揭示存在这种可能性, 通过对马铃薯叶圆片愈伤组织进行反复接种筛选, 可选出抗菌的愈伤组织; 本试验已初步证明由抗菌愈伤组织分化产生的再生植株对青枯病具有一定的抗性, 当然这种抗病性还需要通过田间试验加以验证。

c. 马铃薯愈伤组织在诱导培养中除了发生抗病性变异外, 还可能产生其它性状的变异。本研究所获得抗青枯病再生苗虽然是来源于优良品种米拉, 但其它的优良性状是否发生了变异, 是否应保持甚至提高了生产利用的价值, 尚需进一步试验和观察。

参考文献

- 1 华静月等. 我国植物青枯病的生化型和其它生理差异. 植物保护学报, 1984, 11 (1): 43~50
- 2 华静月等. 我国马铃薯青枯菌菌系的初步研究. 植物病理学报, 1985, 15 (3): 181~184
- 3 何礼远等. 我国植物青枯菌的发生及防治. 植物保护, 1983, (3): 11~13
- 54 Schmiediche P. Breeding Potatoes for Resistance to Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. ACIAR Proceedings, 1986, 13: 105~110
- Carlson PS. Methionine Sulfoximine—resistant Mutants of Tobacco. Science, 1973, 180: 1366~1368
- 6 周嘉平. 高等植物抗病突变体的细胞水平选择. 遗传, 1983, 5(6): 46~48
- 7 凌定厚. 运用植物毒素离体筛选水稻抗胡麻叶斑病种质的研究. 遗传学报, 1986, 13 (3): 194~200
- 8 Behnke M. Selection of Potato Callus for Resistance to Culture Filtrates of *Phytophthora Infestans* and Regeneration of Resistant plants. Theor Appl Genet, 1979, 55: 69~71
- 9 Behnke M. Selection of Dihaploid Potato Callus for Resistance to the culture filtrate of *Fusarium Oxysporum*. Z Pflanzenzuecht, 1980, 85: 254~25
- 10 Erettell RIS et al. Selection of Tmscytoplasm Maize Tissue Culture Resistant to *Drechslera Maydis* T-toxin. Maydis, 1979, 24: 203~213
- 11 Daub ME. Tissue Culture and the Selection of Resistance to Pathogens. Ann Rev Phytopathol, 1986, 24: 159~186
- 12 Genenbach EG et al. Inheritance of Selected Pathotoxin Resistance in Maize Plants Regenerated from Red cultures. Proc Natl Acad Sci, 1978, 74: 5113~5117
- 13 Kallak HI et al. Mutat Res, 1985, 147: 51~53
- 14 Matera U et al. Proc Natl Acad Sci (U. S. A.), 1978, 75: 4935~4939

A PRELIMINARY STUDY ON SCREENING POTATO SOMATIC VARIANT IN VITRO FOR RESISTANCE TO BACTERIAL WILT

He Liyuan

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

ABSTRACT

(下转45页)

表 9 土 壤 微 量 元 素 含 量 (有效态: ppm)

采样深度(cm)	Cu	Zn	Fe	Mn	B	Mo
0~10	14.1	0.56	12.99	13.79	0.39	0.09
10~20	1.38	0.54	12.56	13.64	0.52	0.08
20~30	1.63	0.87	12.16	10.92	0.36	0.09

表10 微 量 元 素 余 缺 评 价 指 标 (有效态: ppm)

评价	Zn	Mn	Mo	B	Cu	Fe
丰富 (不可施)	>1.25	>16	>0.2	>1.0	>2.0	>10
缺乏边缘值 (应该施用)	0.5~1.25	7~15	0.15~0.2	0.5~1.0	0.2~2.0	2.5~10
缺乏临界值 (必须施用)	<0.5	<7.0	<0.15	<0.5	<0.2	<2.5

4 结 论

- a. 多元微肥以 100 克/亩·次在现蕾期和终花期叶面喷施增产作用较大, 并有助于淀粉积累; 在用90克/亩微肥拌种时结合块茎膨大初期叶面喷施微肥, 增产作用也较大, 并能提高淀粉产量。
- b. 多元微肥用量过大, 施肥时间过于集中, 会影响马铃薯产量。施用时应根据当地土壤条件, 因地制宜。叶面喷施以 2 次为

- 宜, 在已拌种时应注意在生长后期叶面喷施。
- c. 微量元素肥料有很强的针对性, 应立足找到与土壤条件和作物相适宜的肥料配方, 分门别类、有针对性地施用, 方能取得较好增产效果。
 - d. 就本试验来看, 尽管多元微肥的增产作用不太大, 但随着耕作技术的改进, 作物生产能力不断提高, 对土壤微量元素的消耗不断增大, 补充作物所需的微量元素势在必行。

(上接第18页)

This study revealed that the culture suspension of *Pseudomonas Solanacearum* could be used as selecting pressure for screening resistant potato somatic variant in *vitro*. The optimum concentration of the bacterial suspension, optimum age of callus and the methods of inoculation were illustrated. About 20,000 leaf-calli were reinoculated and screened, among which six calli showed resistance and plantlets were regenerated from them. Tested by inoculation with pathogen, the regenerated plantlet PSR-1 was more resistant to *Pseudomonas solanacearum* than the parent (mila, virus-free plantlet in *vitro*). The system of screening potato somatic variant in *vitro* for resistance to bacterial wilt has preliminarily been established.