

化学诱变剂 EMS 对小麦条锈菌 夏孢子萌发率的影响^{*}

王国芬, 井金学, 王美南, 王 阳

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用3个pH值缓冲液, 4个浓度甲基磺酸乙酯(EMS)溶液及6个时间处理, 对小麦条锈菌夏孢子的诱变条件进行优化。结果表明, 在室温条件下缓冲液pH值为7.0时, 经0.03 mol/L EMS溶液处理6~8 min, 小麦条锈菌条中27号小种夏孢子的死亡率达83.6%~85.8%, 符合微生物诱变经验指数最佳诱变剂量的选择标准。不同毒性的小麦条锈菌生理小种对EMS的敏感性不同, 且在离体培养条件下, 毒性较弱小种的生活能力及抗逆能力明显强于毒性较强的小种。

[关键词] 化学诱变剂; EMS; 诱变条件; 小麦条锈菌; 夏孢子萌发

[中图分类号] S435.121.4⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)07-0053-04

烷化剂甲基磺酸乙酯(EMS)是化学诱变剂的一种, 因其诱变效率高、恢复突变少而被广泛用于微生物的诱变育种中, 从而有力地促进了微生物诱变育种的研究。

在植物和病原菌的研究领域, 各种突变体的应用, 使病原菌和寄主之间互作机制的分子生物学基础得以建立^[1]。所以, 诱变剂的利用和突变菌系的选育, 对病原菌与寄主相互识别信号转导的进一步研究显得尤为重要^[2]。

小麦条锈病是由(*Puccinia striiformis* West f. sp. *tritici*)引起的一种世界范围内的小麦流行性病害。迄今尚未找到其有性世代, 且不能在人工培养基上进行培养, 对其毒性基因突变的研究一直未能深入进行, 大量的相关性研究仅限于20世纪七八十年代国外研究者对小麦秆锈、叶锈、燕麦冠锈菌及亚麻锈菌的各种突变研究^[3~7]。Luig等^[6]和Waston^[8]用单基因系筛选经EMS溶液处理过的秆锈菌夏孢子, 鉴定了不同抗病基因的抗病性寿命。Teo等^[9]用同样的方法对燕麦秆锈菌进行诱变处理, 发现颜色突变的菌株在遗传学上是稳定的。

本试验在前人研究的基础上, 对化学诱变剂EMS诱导小麦条锈菌毒性变异的条件进行了初步探索, 旨在建立一套合理、科学的化学诱变体系, 为进一步的深入研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

菌种和品种 所有供试菌种均为西北农林科技大学植保研究室提供的新鲜单孢菌系。经鉴别寄主鉴定无误后, 在感病品种上隔离繁殖。繁殖小麦品种为感病品种辉县红。

化学诱变剂 甲基磺酸乙酯(EMS), 由上海化学试剂厂生产, 化学纯, 原液浓度为10 mol/L。

缓冲液 采用0.2 mol/L磷酸缓冲液。 Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , 分析纯, 西安试剂厂生产。

培养基 质量分数0.1%琼脂糖培养基。

其他试剂 吐温-20, 化学纯, 上海三浦化工有限公司生产。

1.2 方 法

(1) 菌种的繁殖和保存。涂抹法接种, 挑选生长整齐一致的一叶期辉县红幼苗, 脱蜡后, 用接种针将孢子悬浮液均匀涂满各叶片。接种后保湿24 h, 移至地下隔离温室中培养。繁殖后的菌种于4℃冰箱中干燥保存, 本试验用的菌种收存时间一般不超过10 h。

(2) 0.5 mol/L EMS溶液的配制。EMS原液浓度为10 mol/L, 易挥发, 所有的操作都在冰水中进行, 所用的仪器和试剂也都应提前在冰箱中预冷。吸

* [收稿日期] 2003-12-30

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2201BA509B03)

[作者简介] 王国芬(1978-), 女(哈尼族), 云南镇沅人, 在读硕士, 主要从事植物病理学研究。

取 500 μL EM S 原液, 混入装有 9 500 μL 磷酸缓冲液(0.2 mol/L pH = 7.0 吐温-20 磷酸缓冲液)的试管中, 用封口膜封住试管口, 轻轻转动试管, 使溶液充分溶解。EM S 溶液需现用现配, 不宜长时间放置。

(3) 试验设 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mol/L 4 个 EM S 浓度, 2, 4, 6, 8, 10, 12 min 6 个时间梯度, 共 24 个处理组合。用 1 500 μL 离心管配制溶液, 总体积为 1 000 μL 。每管称取 6 mg 菌种混入溶液中, 菌种浓度为 10^7 mL^{-1} , XW-80A 涡旋混和器于常温下混和相应处理时间, 于 6 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 以大量稀释法(用磷酸缓冲液稀释 100 倍)终止诱变。离心洗涤 3 次后接种培养基。

(4) 接种后的培养基于 8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保湿培养 6 h 取出, 于尼康 FX-35 显微镜下观察夏孢子萌发情况, 每处理观察 3 个视野, 并计算其相对存活率。

1.3 供试菌种的选择

根据室内繁殖情况, 选用以下几个菌株: CY32-23, CY31-1, CY31-6, CY30, CY29-1, CY25, CY27, CY28-5, CY29-mut3 和 CY29-mut6。每个菌株分别于 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mol/L EM S 溶液中常温

处理 6~8 min 后, 按 1.2 所述的方法接种观察。

1.4 pH 值对夏孢子萌发率的影响

缓冲液的 pH 值分别设为 6.5, 7.0, 8.0 3 个处理, 分别于不同 pH 值缓冲液配制的 0.03 mol/L EM S 溶液处理 6~8 min 后, 按 1.2 所述的方法接种观察。

2 结果与分析

2.1 EM S 浓度与处理时间对夏孢子相对存活率的影响

由表 1 可以看出, 小麦条锈菌夏孢子的相对存活率随 EM S 浓度和处理时间的增加而减少, 致死率升高。在 EM S 0.02~0.03 mol/L 处理 6~8 min 时, 都分别有一个比较明显的下降幅度区。在 EM S 0.02 mol/L 处理 2, 4, 6, 8, 12 min 时, 不同时间小麦条锈菌夏孢子的相对存活率下降幅度分别为 12.0%, 11.1%, 33.5%, 25.0% 和 2.1%; 处理 6 min 时, 不同 EM S 浓度小麦条锈菌夏孢子的相对存活率下降幅度分别为 13.7%, 17.0%, 42.4% 及 16.1%。

表 1 不同浓度 EM S 及不同处理时间下小麦条锈菌夏孢子的相对存活率

Table 1 Relative survival rate of urediospore treated with different concentration EM S in different setting time %

处理时间/min Time	EM S 处理浓度/(mol · L ⁻¹) EM S concentration				
	CK	0.01	0.02	0.03	0.04
2	99.6	98.1	83.7	30.6	8.7
4	97.4	89.6	71.7	14.2	3.6
6	91.3	77.6	60.6	18.2	2.1
8	57.7	55.8	27.1	13.5	1.1
10	55.8	40.6	2.1	0.0	0.0
12	48.2	39.5	0.0	0.0	0.0

2.2 EM S 浓度对不同菌种夏孢子相对萌发率的影响

由表 2 可见, 不同的小麦条锈菌生理小种对化学诱变剂 EM S 的敏感性不同。在本试验中, CY31-3, CY31-6, CY32-23, CY30 和 CY29 等 5 个菌株的生存能力均很弱, 在琼脂糖培养基上的萌发率为 0, 在对照中只有 CY29 小种有少量存活; 而 WV-6,

WV-3, CY25, CY27 和 CY28-5 的存活力较高, 对照的萌发率分别为 85.0%, 93.1%, 95.0%, 90.0%, 83.2%。鉴别寄主接种鉴定表明, 相对于我国目前种植的小麦抗病品种, 前 5 个小种的致病能力要比后者强; 后 5 个小种中致病能力最弱的是 CY25, 其夏孢子相对萌发率最高。

表 2 不同浓度 EM S 对小麦条锈菌不同生理小种夏孢子相对萌发率的影响

Table 2 Effect of different concentration EM S on urediospore relative germinating rate in different wheat stripe rust physiological race %

EM S 处理浓度/ (mol · L ⁻¹) EM S concentration	CY29	WV-6	WV-3	CY25	CY27	CY28-5
CK	8.0	85.0	93.1	95.0	90.0	83.2
0.01	0	52.3	48.6	57.4	47.5	44.0
0.02	0	25.1	30.1	31.0	28.1	17.3
0.03	0	13.8	12.4	14.3	11.2	1.1
0.04	0	4.5	3.5	9.4	7.2	0

2 3 缓冲液 pH 值对夏孢子萌发率的影响

孢子对 EM S 溶液的敏感性增大, 即副反应大, 毒性由表 3 可以看出, 缓冲液偏酸或偏碱都能使夏大, 而诱变效应低。

表 3 不同 pH 值缓冲液对夏孢子相对萌发率的影响

Table 3 Effect of different buffer pH on the urediospore relative geminating rate %			
处理 Treatment	缓冲液 pH 值 Buffer pH		
	6.5	7.0	8.0
CK	0	87.4	4.1
0.03 mol/L EM S	0	14.6	0

2 4 优化条件下小麦条锈菌夏孢子的萌发率

采用 CY27 小种, 于室温条件下用 pH 7.0, 浓度分别为 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mol/L 的 EM S 溶液分别处理 6, 7, 8 min, 其结果列于表 4。由表 4 可见, 当处理时间为 6~ 8 min, EM S 浓度为 0.03 mol/L 时, 致死率为 83.6%~ 85.8%, 符合生物化学诱变最佳诱变剂量的选择标准。所以, 对小麦条锈菌 CY27 小种, 采用 0.03 mol/L 的诱变剂量处理 6~ 8 min, 可达到最佳的诱变效果。

表 4 不同浓度 EM S 处理 6~ 8 min 时 CY27 小种夏孢子的萌发率和致死率

Table 4 Relative geminating and death rate of CY27 treated with different concentration EM S for 6- 8 min %										
处理 时间/min Time	EM S 处理浓度/(mol · L ⁻¹) EM S disposal concentration									
	CK		0.01		0.02		0.03		0.04	
	萌发率 Geminating rate	致死率 Mortality	萌发率 Geminating rate	致死率 Mortality	萌发率 Geminating rate	致死率 Mortality	萌发率 Geminating rate	致死率 Mortality	萌发率 Geminating rate	致死率 Mortality
6	94.5	5.5	45.2	54.8	25.6	74.4	16.4	83.6	3.2	96.8
7	94.1	5.9	36.2	63.8	19.8	80.2	16.3	83.7	1.8	98.2
8	85.3	14.7	32.5	67.5	17.4	82.6	14.2	85.8	2.1	97.9

3 结论与讨论

Teo 等^[10]曾报道, 用 5~ 15 mmol/L EM S 处理燕麦秆锈菌 (*Puccinia graminis avenae*), 可诱导其颜色突变。Luig^[6]用 12 mmol/L 的 EM S 处理小麦秆锈菌诱发了其毒性的突变, 但未见其试验过程的详细报道。而近几十年来的相关研究也比较少, 本试验是在溶液条件下对小麦条锈菌夏孢子悬浮液所作的处理试验。因为水溶液对夏孢子有一定的致死作用, 故为减少夏孢子的自然死亡率, 所设的处理时间相对其他微生物诱变处理时间要短, EM S 处理浓度相对较大。试验结果显示, 在 EM S 溶液浓度为 0.03 mol/L 时, 处理 6~ 8 min 可获得较好的生物学致死效应, 即致死率可达 83.6%~ 85.8%, 在此死亡率的基础上, 可筛选出高质量的生物学突变体。

处理缓冲液的 pH 值对诱变剂的性质和夏孢子的存活有很大影响。据章名春^[11]报道, 低 pH 值缓冲液会阻碍 EM S 有效基团进入夏孢子的细胞膜, 从而阻碍有效诱变反应的进行; pH 值偏碱, 则会导致夏孢子蛋白质结构的改变, 从而引起蛋白质的变性死亡。而且, pH 值与诱变剂的稳定性也有关系, 烷化剂容易与水合成只有细胞毒性而无诱变活性的产物, 有资料^[12]证明, 此分解作用可用缓冲液调节 pH 值来加以控制。所以, 本试验选择在中性环境条件下对夏孢子的悬浮液进行诱变处理, 有望获得较高的诱变效率。

本试验发现, 处理过程中的温度控制也很关键, 高温不利于夏孢子的生存(高温高湿), 而且, 烷化剂的水解也和温度有关^[10, 11]。所以, 操作时温度应控制在室温条件下。

[参考文献]

[1] Pierre J G, DeWit M. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition[J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(12): 452-458

[2] 王洪凯, 林福生, 李德葆. 稻瘟病菌致病相关基因研究进展[J]. 菌物系统, 2002, 21(3): 459- 464

[3] Flor H H. Mutation to wider virulence in *Melampsora lini*[J]. Phytopathology J, 1958, 48: 297- 301

[4] Schwinghamer E A. The relation between radiation dose and the frequency of mutations for pathogenicity in *Melampsora lini*[J]. Phytopathology J, 1959, 49: 260- 269

[5] Statler G D. Mutations to virulence and avirulence in *Melampsora lini*[J]. Phytopathology J, 1985, 75: 771- 773

- [6] Luig N H. A high reversion rate for yellow urediospore color in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* [J]. *Phytopathology* J, 1967, 57: 1091-1093
- [7] Statler G D. Mutations affecting virulence in *Puccinia recondite* [J]. *Phytopathology* J, 1985, 75: 565- 567.
- [8] Watson I A. changes in virulence and population shifts in plant pathogens [J]. *Ann Rev Phytopathology* J, 1970, 8: 209- 230
- [9] Teo C E, Baker P. Mutants of *Puccinia graminis avenae* induced by Ethyl Methane Sulphonate [J]. *Nature* J, 1966, 2(207): 632- 633
- [10] Teo C E, Baker P M. Mutagenic effects of ethyl methane sulphonate on the oat stem rust pathogen (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae*) [J]. *Proc Linn Soc N SW*, 1975, 99: 166- 173
- [11] 章名春. 工业微生物诱变育种 [M]. 北京: 科学出版社, 1984
- [12] 祝丽英, 池书敏. 甲基磺酸乙酯 (EMS) 在创造玉米新种质中的应用 [J]. *玉米科学*, 2001, 9 (3): 14- 17.

Influence of chemical mutagen ethyl methyl sulfonate (EMS) on germination rate of wheat stripe rust (*Puccinia striiformis* West)

WANG Guo-fen, JING Jin-xue, WANG Me-nan, WANG Yang

(College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Three pH value of phosphate buffer, four concentrations of EMS solution, and six treatments at different time were used to optimize mutagenic condition of wheat stripe rust urediospore. The results showed that when the pH value was 7.0 in the normal temperature conditions, and urediospores of CY27 disposed for 6- 8 minutes with 0.03 mol/L EMS solution, the mortality has reached 83.6% to 85.8%. This result fitted with the selection standards of the optimum mutagenic dose of the microbe chemical mutagenesis. Different rust physiological race has the different sensitivity to the EMS solution. The survival ability of low virulence races were stronger than that of the high virulence in *in vitro* condition.

Key words: chemical mutagen; EMS; mutagenic condition; *Puccinia striiformis* West; urediospores germination

(上接第 52 页)

Fumigation effect and symptom of terpinen-4-ol against several insects

CHEN Gen-qiang^{1,2}, FENG Jun-tao¹, MA Zhi-qing¹, ZHANG Xing¹

(1 Bio-rational Pesticide Research and Development Center, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Horticulture and Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: The fumigation effect of terpinen-4-ol is very effective against many kinds of insects. To 3rd-instar larvae of *Plutella xylostella*, *Leucania separata* and *Helicoverpa armigera*, LC_{50} was 1.832 1, 5.347 3, 46.380 1 $\mu\text{L/L}$, respectively. To the adults of *Musca domestica*, *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*, LC_{50} was 2.951 1, 27.968 8 and 136.497 5 $\mu\text{L/L}$, respectively. Symptom was characterized by a definite sequence of events, starting with excitation, convulsion, paralysis, and death. But some insects in paralysis could recover at a lower dose.

Key words: terpinen-4-ol; fumigation effect; symptom; *Sabina vulgaris* Ant essential oil