

EMS 诱导小麦条锈菌毒性突变的研究^{*}

姚秋燕, 王国芬, 徐智斌, 王美南, 王 阳, 井金学

(西北农林科技大学 植保学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以化学诱变剂 EMS 处理小麦条锈菌 CY17 和 CY31 的夏孢子诱发其毒性突变, 用抗条锈 Y_r 近等基因系筛选毒性突变体, 建立了 4 个 CY17 和 1 个 CY31 的突变菌株, 各筛选品种上的病菌突变频率明显不同, 突变率在 $2.14 \times 10^{-6} \sim 3.68 \times 10^{-5}$ 。对突变菌株的毒性测定结果表明, CY17 的所有突变菌株对 Y_r12 发生了毒性突变, 且 CY17 和 CY31 的所有突变菌株对 Y_r5, Y_r10, Y_r15 和 Y_r24 等 4 个抗病基因表现无毒性。研究证实毒性突变是小麦条锈菌毒性变异的重要途径。

[关键词] 小麦条锈菌; EMS 诱导; 毒性突变

[中图分类号] S435.121.4⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0120-04

小麦条锈病是由小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis* West f. sp. *tritici*) 引起的气流传播性病害, 遍及世界各主要麦区, 也是我国小麦上最重要的病害和主要监控研究对象。国内外研究和生产实践证明, 种植抗锈良种是综合控制小麦条锈病最经济、有效、易行和对环境安全的核心措施。但是, 小麦条锈菌毒性变异频繁, 可以通过变异产生新的毒性小种, 导致小麦品种抗病基因失效, 引起小麦条锈病周期性流行危害。因此, 阐明小麦条锈病菌毒性变异的原因和规律, 提出有效对策, 以延长品种使用寿命, 是小麦条锈病防治和小麦育种中亟需解决的关键问题^[1]。病原菌毒性变异的机制有有性重组、突变、异核作用和适应性变异等多种途径, 其中突变尤为重要^[2-5]。人工突变研究的主要方法有物理诱变、化学诱变和插入突变等, 其中化学诱变应用最多的诱变剂是甲基磺酸乙脂 (EMS) 和亚硝基胍 (NTG), 其具有突变率高, 位点特异性强, 对材料损伤轻, 有迟效作用, 突变范围广等特点。用 EMS 处理小麦秆锈菌、叶锈菌及燕麦秆锈菌, 均诱导出了毒性、颜色和冬孢子发育速率等不同表型的突变体^[6-7]。小麦条锈菌是高度专性寄生菌, 迄今未发现有性时期, 不能在人工培养基上生长, 因此其毒性突变研究的难度和工作量较其他病菌更大。到目前为止, 对小麦条锈菌突变的研究仅局限于 X 射线和紫外线诱变效应研究, 并获得了规律性的研究成果^[8-10]。但有关化学诱

变剂 EMS 对小麦条锈菌的诱变研究国内外还未见报道。

本研究以 EMS 为诱变剂, 抗条锈 Y_r 近等基因系为毒性变异筛选和鉴别寄主, 弱毒性菌株 CY17 和强毒性菌株 CY31 为小种毒性突变的出发菌株, 研究了小麦条锈菌的毒性突变规律, 以为进一步克隆小麦条锈菌致病基因和无毒基因创建材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌种: 供试野生菌系选用西北农林科技大学植物免疫研究室保存的中国小麦条锈菌生理小种 CY17 和 CY31 的单孢菌系, 经多次鉴别寄主确定为纯系。

小麦品种: 以辉县红 (西北农林科技大学植物免疫研究室提供) 为病菌繁殖品种, 以抗条锈 Y_r 近等基因系 (near-isogenic lines, NILs) (澳大利亚悉尼大学提供) 为毒性突变体筛选和鉴别寄主, 均为遗传上的纯系。

化学诱变剂: EMS, 上海化学试剂厂生产, 化学纯, 原液浓度为 10 mol/L。试验时配制成 0.5 mol/L 溶液, 配制和使用方法参见参考文献^[11]。

0.2 mol/L 磷酸缓冲液: Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, 分析纯, 西安试剂厂生产; 吐温-20, 化学纯, 上海三浦化工有限公司生产。

^{*} [收稿日期] 2005-12-26

[基金项目] 陕西省科技攻关项目 (2005K02-G01-01); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目 (200558)

[作者简介] 姚秋燕 (1980-), 女, 陕西汉中, 在读硕士, 主要从事植物抗病性研究。E-mail: yqy800928@163.com

[通讯作者] 井金学 (1950-), 男, 陕西铜川, 教授, 主要从事植物抗病遗传研究。E-mail: jingjinxue@163.com

1.2 诱变和突变菌株筛选

将新鲜条锈菌夏孢子 50 mg 按照创建的小麦条锈菌毒性突变的最佳工作体系 (pH = 7.0, EM S 浓度为 0.03 mol/L, 室温下处理 6~8 min) 进行处理^[11], 用处理后的夏孢子接种感病品种辉县红, 接种后在光照 8 000~10 000 lx, 温度 (15 ± 1) ℃, 湿度 60%~80% 条件下培养, 收集存活下来的菌种进行繁殖。然后采用孢子沉降塔定量 (小麦条锈菌新鲜夏孢子 10 mg 与 60 倍滑石粉或者淀粉混合并充分分散) 喷粉接种筛选品种, 对照原始菌种的反应型, 筛选出与原始菌株有明显致病性差异的菌系 (包括毒性突变和无毒性突变), 并对其进行单孢子堆分离, 再经感病品种和筛选品种繁殖后接种鉴别寄主进行毒性变异鉴定。同时在感病品种中挑取部分单孢菌系, 以期能在这些分离系中找出发生非毒性突变的菌株。

整个试验在地下温室内进行, 以防止外界孢子进入和室内孢子逸出。野生菌株和各突变菌株分别在相互隔离的单间温室内进行试验; 筛选品种育苗在单间温室中进行。用具和盆钵均不混杂并实施严格消毒, 操作者严格执行无菌操作规定。

1.3 突变率计算

以接种叶面萌发孢子数为基数计算。每次均在筛选品种接种后 24 h 取样, 用显微镜直接检查叶片上的孢子数和萌发数 (芽管长度大于孢子长径者即记为萌发), 计算平均孢子萌发率。突变率= 感染孢子堆数/(接种叶片数 × 平均单叶孢子数 × 平均孢子萌发率)。叶片上感染孢子堆数为筛选品种叶片上出现并经检查确系毒性突变的, 且在潜伏期刚结束时所记载的孢子堆数。预试验表明此时叶面出现的孢子堆基本上为单个孢子侵入后所形成的第一个孢子堆, 而非叶内系统侵染扩增的孢子堆^[12]。

2 结果与分析

2.1 小麦条锈菌突变菌株的筛选

经 EM S 诱变处理的 CY17、CY31 夏孢子在 Yr 单基因系上筛选并鉴定确认, 结果分别获得了 4 个 CY17 突变体单孢子堆分离系, 即 1 个无毒性突变株 (M₁₇₋₁) 和 3 个毒性突变株 (M₁₇₋₂、M₁₇₋₃ 和 M₁₇₋₄); 1 个 CY31 毒性突变株 M₃₁₋₁ (表 1)。

2.2 小麦条锈菌突变菌株的突变率

由表 2 可以看出, 小麦条锈菌 CY17、CY31 经 EM S 诱变处理后, 突变菌株在各自筛选品种上的突变率大致在 2.14×10^{-6} ~ 3.68×10^{-5} , 因筛选品种

不同, 毒性突变的频率明显不同, 说明突变率与其所对应的抗条锈基因有关。

表 1 小麦条锈菌突变菌株毒性变异的反应型

Table 1 Variable reaction type of stripe rust mutants on N L

筛选品种 Screen cultivars	CK17	CY17 筛选菌系 Mutants of CY17	CK31	CY31 筛选菌系 Mutants of CY31
Yr6			0;	3(M ₃₁₋₁)
Yr7	4	2 ⁺ (M ₁₇₋₁)		
Yr12	0;	3(M ₁₇₋₂)		
Yr18	0;	3(M ₁₇₋₃)		
YrSp	0;	3(M ₁₇₋₄)		

注: M 代表 mutant, 即突变菌株, 下标的数字分别代表菌种的编号。

Note: M = virulent mutants, The numbers of subscript meaning the code of mutants

表 2 小麦条锈菌突变体的突变率

Table 2 Mutation rate of stripe rust mutants

筛选菌系 Mutants	筛选品种 Screen cultivars	突变率 Mutation rate
CY17	Yr7	2.14×10^{-6}
	Yr12	1.71×10^{-5}
	Yr18	5.26×10^{-6}
	YrSp	6.43×10^{-6}
CY31	Yr6	3.68×10^{-5}

2.3 小麦条锈菌突变菌系的毒性

以 CY17 和 CY31 的 5 个突变菌株分别接种抗条锈 Yr 近等基因系, 鉴别各突变菌株的毒性变异谱, 结果见表 3。表 3 结果表明, 各突变菌株的毒性均较出发菌系发生了明显改变。

由表 3 可见, 所有的 CY17 突变菌株均对 Yr12 发生了毒性增强的突变, 对 YrSk 发生了毒性减弱的突变。M₁₇₋₁ 菌株对 Yr12、YrSp 发生了毒性突变, 但对 Yr7 发生了无毒性突变; M₁₇₋₂ 菌株对 Yr12 发生了毒性突变, 对 Yr17 发生了无毒性突变; M₁₇₋₃ 菌株对 Yr12 发生了毒性突变, 对 Yr18 的反应型由原来的 0/3 转变为 2; M₁₇₋₄ 菌株对 Yr12、YrSp 发生了毒性突变; M₃₁₋₁ 菌株对 Yr6、Yr26 发生了毒性突变。

由表 3 还可以看出, 某些突变菌系对某些鉴定品种仅发生了毒性的较小变化, 虽未改变亲和性, 但反应型明显改变。如, M₁₇₋₁、M₁₇₋₂、M₁₇₋₃、M₁₇₋₄ 对 YrSk 发生的 2 到 0 的变化; M₁₇₋₂ 对 Yr17 发生的 2 到 1 的变化; M₁₇₋₃ 对 Yr12 发生的 0 到 2 的变化; M₃₁₋₁ 对 Yr8 发生的 1 到 2 变化。前人已有类似的报道, 归因于基因的微小变化, 遗传背景中修饰基因的作用或外界环境中未知因素的变化, 具体原因尚无定论^[13]。CY17 对 Yr18 表现为致病性分化, 而

CY17 的所有突变菌系对 Yr18 的毒性表现单一; EM S 诱导后发生了致病性的分化, 还有待进一步深入研究。
CY31 对 YrSp 表现为感病, 而其突变菌株对 YrSp 表现为毒性分化。这可能是由于某些毒性基因经

表 3 CY17 和CY31 突变菌系在抗条锈 Yr 近等基因系的鉴定结果

Table 3 Identification results of CY17 and CY31 mutants in rust resistant near-isogenic lines

单基因系 N L s	CY17 抗条锈单基因系筛选分离系 CY17 mutants isolated from N L s					CY31 抗条锈单基因系 筛选分离系 CY31 mutants isolated from N L s	
	CK17	M 17-1	M 17-2	M 17-3	M 17-4	CK31	M 31-1
Yr1	0;	0	0;	0;	0	3	4
Yr5	0;	0	0;	0;	0;	0;	0;
Yr6	4	4	4	4	4	0;	3
Yr7	4	2+	4	4	4	3	4
Yr8	4	4	4	4	4	1	2
Yr9	0;	0;	0;	0;	0;	4	3
Yr10	0;	0;	0;	0;	0;	0	0
Yr11	3	4	3	3	4	4	4
Yr12	0;	3	3	2	2/3	4	4
Yr15	0	0	0	0	0	0	0
Yr17	2	2	1	0;	0;	3	3
Yr18	0; /3	3	3	2	3	3	4
Yr24	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;
Yr26	0;	0;	0;	0;	0;	0;	3
YrSp	0;	3	0;	0;	3	3	0; /3
YrSk	2	0;	0;	0;	0;	3	3
辉县红(CK) Huixianhong	4	4	4	4	4	4	4

由表 3 可以看出, Yr5, Yr10, Yr15, Yr24 4 个抗病基因能抵抗原始野生菌株和所有突变菌系的毒性基因, 说明这 4 个抗病基因目前和今后一段时间仍可作为重要的抗条锈基因资源加以利用, 以期培育出一批优良的抗条锈性新品种应用于生产实践, 从而有效遏制我国小麦条锈病大流行, 减少危害损失。而 Yr1, Yr7, Yr9, Yr11, Yr17, Yr18 已对我国目前的小麦条锈菌流行小种 CY31 丧失抗性, 成为无效抗病基因; Yr6, Yr8 已对 CY17 及其各突变菌系丧失抗锈性, 同时也对 M 31-1 丧失抗病能力, 成为无效抗病基因。Yr12, Yr26 和 YrSp 可能对未来自然界条锈菌的自发变异菌系丧失抗性而成为无效抗病基因。

3 讨 论

小麦条锈菌毒性突变研究是揭示其毒性遗传变异规律的基础工作, 由于小麦条锈菌的生物学特性所增加的研究难度限制了其研究进展, 国外已报道的仅有几例, 且均为紫外线诱变^[9]。国内也只有商鸿生等^[12]用紫外线诱变技术对小麦条锈菌的一个优势小种进行了系统研究, 获得了 7 个突变菌系, 并首次提出了基因突变是我国小麦条锈病菌重要变异途

径的一个实验证据。本研究用 EM S 对我国小麦条锈菌 CY17 和 CY31 两个生理小种进行诱变处理后获得 5 个突变菌系, 为基因突变是我国小麦条锈菌毒性变异途径提供了又一个实验证据。

微生物毒性突变率依基因位点、遗传背景和诱变方法而变化, 试验材料、诱变方法和计算方法不同时突变率很难比较。据报道^[14], 紫外线诱变亚麻锈菌的最大突变率为 3×10^{-3} , 玉米瘤黑粉为 0.4×10^{-6} , 相差很大。Staler^[6]用化学诱变剂 NTG 诱导小麦叶锈菌毒性突变, 结果表明随基因位点不同, 毒性突变率为 $5.5 \times 10^{-5} \sim 9.1 \times 10^{-5}$ 。小麦条锈菌有系统侵染性, 因此不能依病斑数为基数计算毒性突变率, 本研究采用商鸿生等^[12]的计算方法, 其毒性突变率为 $2.14 \times 10^{-6} \sim 3.68 \times 10^{-5}$, 与商鸿生等的结论类似。

突变是遗传物质的变化通过表现型的改变而被识别。在研究突变时必须清晰且易于识别的遗传标记检出突变体。用于锈菌突变研究的主要标记有毒性标记。毒性标记是依据筛选品种上处理菌株较其亲本菌株的毒性增加或丧失评价毒性基因的变化。毒性标记大多以重要的抗病种质资源或生产上的优良抗病品种为筛选品种^[15], 但由于对这些品种

资源的遗传背景不清楚,很难对单位点突变或多位点突变作出准确判断。本研究选用抗条锈近等基因系作为筛选品种,结果发现与其对应的毒性基因位点的改变,应作为毒性标记研究的首选,为应用分子生物学方法研究毒性标记与分子标记间的关系提供了可靠材料,为克隆条锈基因奠定了基础。

研究小麦条锈菌的毒性基因变异,不仅可以估计获得的突变菌株所对应的小麦抗条锈病基因的寿命,评价有关抗源和品种的应用前景,而且可根据其突变规律对小麦条锈菌的群体变异动态进行预测。本研究以毒性突变菌株对 Yr5, Yr10, Yr15, Yr24 4

个抗病基因寿命的评估结果与其他研究结果类似,凸现了本研究结果的预见性。另外,可用获得的近等位毒性基因系作为工具,不经杂交便可探知寄主品种所含的抗条锈性基因,为抗病基因库构建提供了方便。利用这些还可将具有相同遗传背景的近等位毒性基因系作为抗病生理生化及抗病分子机制的研究材料,特别是作为克隆致病基因和无毒基因的材料,在不同水平上揭示寄主-病原物的互作关系及其机制。因此,本研究在理论和实践中具有重要的意义。

[参考文献]

- [1] 李振岐. 我国小麦品种抗条锈性丧失原因及其解决途径[J]. 中国农业科学, 1980(3): 72-76
- [2] 康振生, 李振岐, 商鸿生. 小麦条锈菌夏孢子阶段核相状况的研究[J]. 植物病理学报, 1994, 24(1): 26-31
- [3] 马青, 康振生, 李振岐. 小麦条锈菌夏孢子芽管在小麦叶片上结合现象的研究[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(2): 97-99
- [4] 李振岐, 陆和平, 马青. 小麦条锈菌夏孢子芽管染色方法改进研究[J]. 西北农业大学学报, 1985, 13(1): 1-13
- [5] Webster R K. Recent advances in the genetics of plant pathogenic fungi[J]. Ann Rev Phytopathology, 1974, 12: 331-353
- [6] Statler G D. Mutations affecting virulence in *Puccinia recondite*[J]. Phytopathology, 1985, 75: 565-567
- [7] Teo C E, Baker E P. Mutagenic effects of ethyl methane sulphonate on the oat stem rust pathogen (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae*) [J]. Proc. Ann Soc N. S. W., 1975, 99: 166-173
- [8] Griffiths D J, Carr J H. Induced mutation for pathogenicity in *Puccinia coronata avenae*[J]. Trans Br Mycol, 1961, 44: 601-607
- [9] Jonson R, Priestley T H, Taylor E C. Occurrence of virulence in *Puccinia striiformis* for compare wheat in England[J]. Cereal Rusts Bull, 1978, 6: 11-13
- [10] Luig N H. A high reversion rate for yellow urediospore color in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*[J]. Phytopathology, 1967, 57: 1091-1093
- [11] 王国芬, 井金学, 王美南, 等. 化学诱变剂 EM S 对小麦条锈菌夏孢子萌发率的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(7): 53-56
- [12] 商鸿生, 井金学, 李振岐. 紫外线诱导小麦条锈菌毒性突变的研究[J]. 植物病理学报, 1994, 24(4): 347-351
- [13] Little R. M. Sc (the master of science) Thesis[R]. Study on Virulent Mutant in Wheat Leaf Rust, University Southampton, 1965
- [14] Flor H H. Mutations in flax rust induce by ultraviolet radiation[J]. Science, 1956, 124: 888-889
- [15] 井金学, 商鸿生, 李振岐. 小麦重要抗源和后品种对条锈菌突变菌株抗性的研究[J]. 西北农业大学学报, 1994, 22(1): 18-25

Virulent mutant in *Puccinia striiformis* is induced by ethyl methyl sulfom ar (EM S)

YAO Qiu-yan, WANG Guo-fen, XU Zhi-bin, WANG Mei-nan, WANG Yang, JING Jin-xue

(College of Plant Protection, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Urediospores of CY17 and CY31 races of *Puccinia striiformis* were treated by ethyl methane sulfonate (EM S) and virulent mutants were screened on stripe rust resistant near-isogenic lines inoculated with treated spores. 4 virulent and avirulent mutants from CY17 and 1 virulent mutants from CY31 were established. Mutation rate ranged between 2.14×10^{-6} - 3.68×10^{-5} . Results indicated that mutants of CY17 were virulent to Yr12, but all mutants of CY17 and CY31 were avirulent to Yr5, Yr10, Yr15 and Yr24. The results suggested that mutation was important mechanism of virulence variation in rust fungi.

Key words: *Puccinia striiformis*; ethyl methane sulfonate (EM S) induction; virulent mutation