

来自西尔斯山羊草的抗小麦白粉病基因 *Pm57* 抗性丧失突变体的筛选与鉴定

马 超,董振杰,田修斌,王贝麟,张玥琦,李欢欢,刘文轩
(河南农业大学生命科学学院,郑州 450002)

摘要: 小麦近缘种属来源的抗白粉病基因是培育小麦抗病品种,防治白粉病危害的最重要基因来源。*Pm57* 是位于西尔斯山羊草 2S^{*}#1 染色体长臂上的一个外源基因,对小麦白粉病具有苗期和成株期广谱抗性。为了创制 *Pm57* 白粉病抗性丧失突变体,利用基于基因突变体的植物抗病基因克隆新技术分离 *Pm57* 基因,选用 0.625% 的甲基磺酸乙酯 (EMS) 对 1 万粒小麦-西尔斯山羊草 *Pm57* 易位系 89(5)69 种子进行了诱变处理, M₁ 大田密播种植,收获了 1598 个 M₂ 可育株系。初步对其中 300 个 M₂ 株系进行苗期白粉病抗性接种鉴定,并利用 2 个 *Pm57* 基因特异分子标记 *X2L4g9P4/HaeIII* 和 *X284274* 及小麦全国区试品系 DUS 测试所用的 42 对 SSR 核心引物对 *Pm57* 抗性丧失突变体进行鉴定,筛选出来自 27 个 M₂ 株系的真实抗性丧失突变体 70 个, *Pm57* 基因抗性丧失突变体频率达到 9.0%。本研究获得的白粉病抗性丧失突变体为 *Pm57* 基因的后续克隆与抗白粉病分子机理研究提供了重要的材料基础。

关键词: 小麦白粉病; *Pm57*; 甲基磺酸乙酯; 抗性丧失突变体; 分子标记

Screening and Identification of *Pm57* Mutants with Loss of Resistance to Powdery Mildew Derived from *Aegilops searsii*

MA Chao, DONG Zhen-jie, TIAN Xiu-bin, WANG Bei-lin, ZHANG Yue-qi, LI Huan-huan, LIU Wen-xuan
(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: Wheat relatives-derived alien genes provide most important resource to develop resistant varieties and protect wheat from the damage of powdery mildew. *Pm57*, a gene resided on the long arm of chromosome 2S^{*}#1 from *Aegilops searsii* caused broad-spectrum resistance against powdery mildew isolates at seedling and adult plant stage. In order to develop *Pm57* mutants with loss of resistance to powdery mildew for further gene isolation using susceptible mutant-based resistant gene cloning approach, 10000 seeds of 89(5)69, a wheat-*Ae. searsii* recombinant stock containing *Pm57* genes, were treated using 0.625% ethyl methane sulfonate (EMS). M₁ seeds were then dense sowed in experiment station, and 1598 M₂ lines were harvested. Of which 300 M₂ lines randomly selected were used for resistance test by inoculation at seedling stage. After further validation of susceptible individual plants using two *Pm57* specific molecular markers (*X2L4g9P4/HaeIII* and *X284274*) and 42 pairs of core primers, which are applied in DUS identification of wheat lines, 70 *Pm57* mutants with loss of resistance to powdery mildew from 27 independent M₂ lines were identified, with a mutant ratio as high as 9.0%. Thus, the newly-identified resistance-compromised mutants might lay a foundation for further cloning of the *Pm57* gene.

Key words: wheat powdery mildew; *Pm57*; Ethyl methane sulfonate; mutant; molecular markers

收稿日期: 2019-04-17 修回日期: 2019-05-17 网络出版日期: 2019-06-06

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190417001>

第一作者研究方向: 植物分子细胞遗传学, E-mail: 15838209602@163.com

通信作者: 刘文轩, 研究方向为植物分子细胞遗传学研究, E-mail: wxliu2003@hotmail.com

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31571658); 河南省科技重大专项 (161100110400)

Foundation project: The National Natural Science Foundation of China (31571658), Science and Technology Major Project of Henan Province (161100110400)

小麦白粉病是由子囊菌亚门真菌布氏白粉菌 (*Bgt*, *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*) 小麦专化型引起的小麦三大病害之一, 可导致小麦减产 20%-50%。小麦白粉病防治最为经济、安全、有效的措施是抗病品种的培育和利用^[1]。目前, 有效正式命名的抗白粉病主效基因至少有 80 个 (编号从 *Pm1* 到 *Pm64*), *Pm1* 到 *Pm5* 和 *Pm24* 等 6 个编号含有多个复等位基因, 其中有 43 个 (56.6%) 是来自 19 类小麦近缘种属的外源基因, 这些基因为小麦的安全生产起到了十分重要的作用^[2-4]。近年来, 随着普通小麦及其基因组供体基因组测序技术的不断进步, 小麦抗白粉病基因的克隆取得了突破性进展。目前已经成功克隆了 *Pm2*, *Pm3b*, *Pm8*, *Pm21*, *Pm35*, *Pm60* 等至少 6 个正式命名的抗病基因^[5-11], 为解析小麦抗白粉病分子机理, 加快抗白粉病新基因的发掘与利用进程奠定了重要基础。

目前, 已经克隆的抗病基因绝大多数是利用基于基因精细定位的图位克隆法获得的。但是, 由于普通小麦中严格控制同源染色体联会基因 (*Ph*) 的存在, 导入小麦背景中的外源抗病基因所在染色体片段很难与部分同源小麦染色体之间发生交换与重组^[12], 对抗病基因进行精细定位利用图位克隆法进行分离难度极大。近年来, 随着基因组测序技术的发展和测序成本的降低, 涌现出了多种基于基因组测序、适用于复杂基因组植物抗病基因克隆的新技术^[13]。如, 基于抗病基因甲基磺酸乙酯 (EMS, ethyl methane sulfonate) 诱变与突变体染色体分选测序的 MutChromSeq 法^[6], 以及基于抗病基因抗性丧失突变体的抗病基因富集与测序的 MutRenSeq 方法^[14]等, 并分别成功克隆了小麦抗叶锈病基因 *Lr22a*, 抗白粉病基因 *Pm2* 以及来自一粒小麦和粗山羊草的抗秆锈病外源基因 *Sr22* 和 *Sr45* 等。这类基因克隆技术避开了对外源基因精细定位冗长而繁琐的过程, 但抗性丧失突变体的诱导、筛选与鉴定, 以及突变体的真实可靠性都直接关系到抗病基因分离的成功与否。

EMS 是一种烷化剂, 能够引起 DNA 单一碱基对的替换而形成点突变, 在短时间内获得大量的优良变异^[15]。与物理诱变方法相比, EMS 诱变产生的变异以点突变为主, 染色体结构变异比较少^[16], 被广泛应用于小麦^[17]、大麦^[18]、水稻^[19]、玉米^[20]、大豆^[21]等作物中。以 EMS 诱导突变体为基础, 快速诱导目的基因变异, 挖掘新基因, 已成为开展功能基因研究的重要技术手段^[22-23]。如, 马燕欣

等^[24]采用 EMS 诱变方法, 创造 *Pm21* 感白粉病突变体 NM14, 并对抗、感材料差异表达基因进行数字表达谱分析, 为进一步揭示 *Pm21* 的抗病机理提供了依据。陈洋等^[25]利用 EMS 诱导获得感黄矮病 YW642 突变体, 并利用分子标记对突变基因进行了检测, 筛选到 18 个黄矮病抗性丧失程度不等的突变体, 为抗黄矮病基因 *Bdv2* 的精细定位、克隆与功能基因组学研究提供了基础材料。

Pm57 是位于小麦近缘物种西尔斯山羊草 (*Aegilops searsii* Feldman & Kislev ex Hammer) 2S[#]1 染色体长臂上的一个广谱抗小麦白粉病基因, 由本实验室通过利用部分同源染色体重组高频诱导基因 (*ph1b*) 诱导西尔斯山羊草 2S[#]1 染色体与小麦部分同源染色体进行重组导入到了普通小麦^[26]。其中材料 89(5)69 是一个小麦 - 西尔斯山羊草 2S[#]1 小片段易位系 (T2BS. 2BL-2S[#]1L), 其小麦 2B 长臂末端约 33% 部分被携带 *Pm57* 的 2S[#]1 染色体长臂片段所取代。经白粉菌分菌株接种鉴定, 89(5)69 对所有 9 个河南白粉菌菌株和 24 个全国其他地方的流行菌株都具有抗性, 表明 *Pm57* 是一个广谱抗性基因。本研究的目的是利用 EMS 处理 89(5)69 易位系种子, 筛选鉴定 *Pm57* 白粉病抗性丧失突变体, 为利用突变基因染色体分选测序或突变抗病基因富集测序分离 *Pm57* 基因和进行 *Pm57* 抗白粉病的分子机理解析提供关键材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

研究所用小麦材料为普通小麦中国春 (CS, Chinese Spring), 小麦 - 西尔斯山羊草易位系 89(5)69 (T2BS. 2BL-2S[#]1L)。其中中国春从美国堪萨斯州立大学小麦遗传资源中心 (WGRC) 引进; 89(5)69 易位系由河南农业大学和美国堪萨斯州立大学遗传资源中心共同培育。所有小麦在河南农业大学试验农场繁殖保存。

89(5)69 易位系 EMS 诱变后代白粉病抗性鉴定接种所用的白粉菌为河南省主要流行菌株混合菌, 由河南农业科学院植物保护研究所宋玉立研究员提供, 由本实验室在感病品种中国春上活体繁殖保种。

1.2 EMS 诱变处理

1.2.1 EMS 剂量与诱变种子发芽率关系分析

挑选饱满、健康的 89(5)69 种子共 1200 粒, 分成 6 份, 分别放置于 6 个 100 mL 三角瓶中。每瓶加 35 mL 无菌蒸馏水, 室温 (23~25 °C) 浸泡

30 min; 用 5% NaClO 溶液(有效氯含量 2.5%~3.0%)消毒 15 min; 冲洗干净后室温 170 r/min 震荡浸泡 5 h; 倒掉蒸馏水, 分别加入 35 mL 浓度为 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 和 1.0% 的 EMS (Sigma 公司, 货号 SIGMA-M0880-25G) 水溶液, 于室温 150 r/min 震荡处理 16 h; 自来水冲洗 6 h, 控干水分, 播种于发芽盘中, 10 d 后统计发芽苗数(苗长大于种子长度), 计算发芽率。

1.2.2 EMS 诱变处理

挑选饱满、健康的 89(5)69 种子 1 万粒, 等量分装到 5 个 2 L 的三角瓶中, 每瓶加入 0.625% EMS 溶液 350 mL, 按上述 EMS 适宜剂量预处理步骤进行 EMS 诱变处理。

诱变处理后的 M_0 种子 4 °C 过夜, 第 2 天按 80 粒/1.8 m 行长点播于试验田, 以未诱变的 89(5)69 种子作为对照。 M_1 植株常规管理, 成熟后每个 M_1 植株单株收获和脱粒, 获得 M_2 种子。

1.3 M_2 感白粉病个体的筛选

M_2 株系种子播种于育苗盆(7×7 cm)中, 至第 1 片叶完全展开时, 采用人工抖落白粉菌孢子方法进行白粉菌接种。以 89(5)69 和中国春分别做为抗病和感病对照。接种后的植株于 18~20 °C, 16/8 h(光照/黑暗)光照培养箱内发病, 接种后 7 d, 待感病对照中国春充分发病时(3-4 级), 观察所有 M_2 植株, 参考盛宝钦^[27]的鉴别方法挑选出感病 M_2 个体。

1.4 M_2 感病株的特异性分子标记鉴定

1.4.1 感病株 *Pm57* 基因特异分子标记鉴定

采集 M_2 感病单株叶片, 利用 CTAB 法提取基因组 DNA, 利用 *Pm57* 特异标记 *X2L4g9P4/HaeIII*(5'-GCTGGCTTATCGATGGCACT-3', 5'-GCAAGCAAAAGACCAACCCG-3') 和 *X284274*(5'-GGGTCTCCGGCCTGGT-3', 5'-CGATTTGTGGCAGCACAGG-3') 进行 *Pm57* 基因分子标记鉴定。其中 *X2L4g9P4/HaeIII* 位于易位染色体 2BS.2BL-2S*#1 长臂末端, 而 *X284274* 定位在易位染色体长臂中部。PCR 反应体系 15 μL, 含 2×EsTaq MasterMix(康为世纪)7.5 μL, 引物 2 μL(5 mmol/L), DNA(100-200 ng)2 μL, ddH₂O 3.5 μL。PCR 反应条件为 T-down63: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 20 s, 63 °C 退火 20 s, 每个循环退火温度降低 0.5 °C, 72 °C 延伸 2 min, 共 10 个循环; 随后 94 °C 变性 20 s, 58 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最终 72 °C 延伸 10 min。标

记 *X2L4g9P4* PCR 扩增产物用限制性核酸内切酶 *HaeIII* 进行酶切。酶切体系 5 μL, 含 10×Smartcut buffer 2.0 μL, ddH₂O 2.85 μL, Enzyme *HaeIII* 0.15 μL, 37 °C 下酶切 4 h。PCR 产物及酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳(120 V, 60 min)中分离, EtBr 染色检测。

1.4.2 感病株遗传背景分子标记鉴定

利用全国小麦区试品系 DUS 测试所用的两套共 42 对核心引物对筛选出来的 *Pm57* 感病突变体进行遗传背景真实性鉴定。PCR 体系同 1.4.1, PCR 反应条件为 F50SSR: 95 °C 预变性 5 min, 96 °C 变性 1 min, 68 °C 退火 3 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 5 个循环, 每个循环退火温度降低 2 °C; 然后 96 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 2 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 5 个循环, 每个循环降低 2 °C; 然后 96 °C 变性 20 s, 50 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 最终 72 °C 延伸 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳(120 V, 60 min)检测 PCR 结果。

2 结果与分析

2.1 EMS 处理浓度对 89(5)69 种子发芽率的影响

采用 0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 共 6 种不同浓度的 EMS 溶液对 89(5)69 种子进行了处理。室温发芽 10 d 后对各处理浓度下种子发芽率进行了统计, 结果如图 1 所示。EMS 处理剂量与种子发芽率之间的回归方程为 $Y = -104.68X + 100$ 。其中 Y 为种子发芽率, X 为 EMS 剂量。图 1 表明: 随着 EMS 处理浓度的增大, 种子发芽率逐渐降低; 当 EMS 浓度达到 1.0% 时, 处理种子全部丧失了发芽能力。根据回归方程计算, EMS 半致死剂量为 0.47%; 当 EMS 浓度为 0.625% 时, 种子发芽率应为 34.6%。

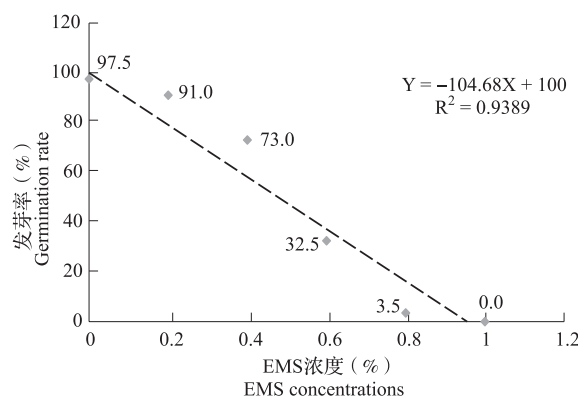


图 1 不同 EMS 浓度处理下 89(5)69 的种子发芽率
Fig.1 Germination rate of 89(5)69 treated by different EMS concentrations

2.2 89(5)69 EMS 诱变与感小麦白粉病突变体的筛选

用 0.625% EMS 处理 89(5)69 种子共 1 万粒, M_0 种子大田播种, 出苗 2211 个, 成熟后按单株收获脱粒, 最终得到可育 M_1 单株 1598 个。

随机抽取 300 个 M_1 单株, 在温室内进行了 M_2 株系苗期白粉病抗性接种鉴定, 结果 39 个 M_2 株系后代出现抗病和感病单株分离, 从中筛选到感病单株 135 个(图 2)。根据统计结果, 不同 M_2 株系出现感病株的频率有明显差异, 其中 M_2 -57 和 M_2 -233 两个株系的感病株出现频率超过 50%, M_2 -47 等 22 个株系的感病株频率达到超过 20% 但低于 50%, 而 M_2 -51 等 15 个株系感病株频率在 20% 以下。除了这 39 个 M_2 株系外, 还发现 1 个 M_2 株系后代全是感病单株, 这应该是由机械混杂所致, 不进行后续鉴定。



47-R 47-S1 50-R 50-S1 60-R 60-S1 89(5)69 CS

47-R、47-S1、50-R、50-S1、60-R、60-S1 分别代表编号 47、50、60 的 M_2 株系中的抗病单株(R)和感病单株(S)

47-R, 47-S1, 50-R, 50-S1, 60-R, and 60-S1 represent disease-resistant plant (R) and susceptible plant (S) in M_2 lines numbered by 47, 50 and 60, respectively

图 2 89(5)69 EMS 诱变 M_2 株系中感白粉病突变体的筛选

Fig.2 Screening of susceptible M_2 plants derived from EMS-treated 89(5)69

2.3 感病单株 *Pm57* 特异分子标记鉴定

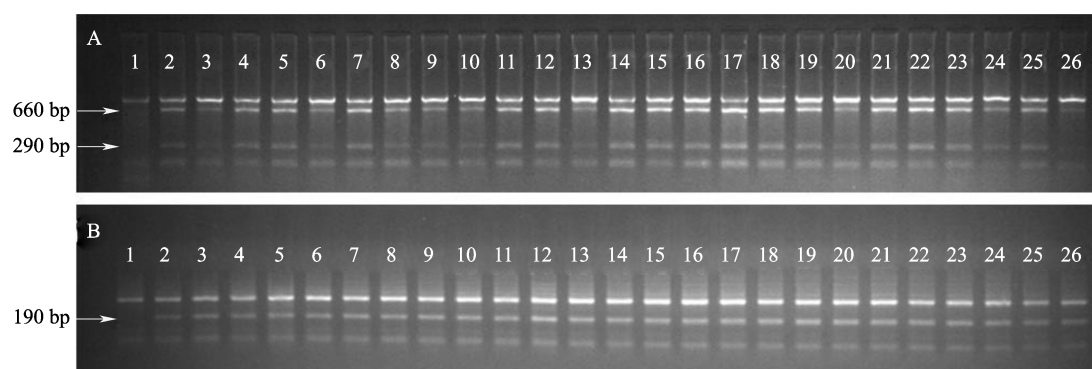
以中国春和含有 *Pm57* 基因的中国春-西尔斯山羊草 T2BS. 2BL-2S[#]1L 易位系 89(5)69 分别做阴性和阳性对照, 用 2S[#]1 外源染色体片段特异标记 *X2L4g9P4/HaeIII* 和 *X284274* 对来自后代有抗、感单株分离的 39 个株系中的感病单株及抗病单株都进行了 2S[#]1 外源染色体片段的鉴定。结果显示, 39 个株系中的感病个体出现 3 种类型: 类型 I

包括 16 个 M_2 株系, 其 M_2 感病株和抗病株 *Pm57* 特异标记同 89(5)69 一致, 2 个 *Pm57* 特异分子标记都有特异性片段 PCR 扩增(图 3A, B), 这样的感病突变体共有 45 个(表 1)。类型 II 有 13 个株系, 其抗病株均有 2 个 *Pm57* 特异分子标记的特异性片段扩增, 但同一个 M_2 株系中感病株之间有些单株能扩增出 2 个 *Pm57* 标记的特异性片段, 但有些只具有易位染色体 2BS. 2BL-2S[#]1 长臂中部特异标记 *X284274*(表 1)。前者共有 37 个感病单株, 后者有 30 个感病单株。只能扩增出 *X284274* 特异性片段的感病株可能是 2S[#]1L 染色体片段发生了染色体顶端缺失或重新易位所致, 不按 *Pm57* 突变体对待。类型 III 有 10 个 M_2 株系, 其抗病株所用 2 个 *Pm57* 标记都有特异性片段 PCR 扩增, 但感病株同中国春一样, 不能扩增出任何一个 *Pm57* 特异标记的 PCR 片段。这类感病个体极有可能是 89(5)69 中杂合单株出现后代分离所致, 也不计入 *Pm57* 感病突变体类型。最终共筛选保留 29 个 M_2 株系 82 株同时具有 2 个 *Pm57* 特异分子标记的感病突变体进行后续遗传背景真实性鉴定。

2.4 *Pm57* 感白粉病突变体遗传背景真实性鉴定

以 89(5)69 为对照, 利用全国小麦区试品系 DUS 测试所用的 2 套共 42 对小麦 SSR 核心引物, 对上述 29 个 M_2 株系的 82 个 *Pm57* 白粉病抗性丧失突变体进行了遗传背景真实性鉴定。结果表明, 除突变体 M_2 -216 和 M_2 -223 两个株系的感病株在 4B 染色体上的标记 *Xgwm513* 和 6B 染色体上的标记 *Xbarc14* 在 PCR 产物的弱带上与 89(5)69 有些许差异外(图 4A, B), 其余突变体 42 对 SSR 引物扩增结果均与易位系 89(5)69 相同。根据王立新的小麦种子纯度的分子标记检测标准^[28], 当植株间 SSR 差异位点 ≥ 3 , 可判定两株间遗传背景不同。因此, 综合两套核心引物鉴定结果, 本研究筛选获得的突变体都与亲本 89(5)69 遗传相似性高度一致, 可以进一步确认上述 82 个感病单株都是来源于 89(5)69 的真实白粉病抗性丧失的突变体。但是, 为确保突变体的真实可靠性, 这两个 M_2 株系筛选到的感病株全部不计入 *Pm57* 感病突变体总数。

综上所述, 本研究利用 0.625% 的 EMS 浓度处理了含有 *Pm57* 基因的易位系 89(5)69 种子 1 万粒, 成苗 2211 株, 收获可育 M_1 单株 1598 个。对其中 300 个 M_2 株系进行苗期接种白粉菌鉴定, 筛选出 39 个 M_2 株系中的 135 株感病个体。利用 *Pm57*



A、B 分别为 *Pm57* 特异分子标记 *X2L4g9P4/HaeIII* 和 *X284274* 检测结果,箭头所示为 *Pm57* 基因特异 PCR 扩增条带。
1~2 分别为中国春 (CS) 和中国春 - 西尔斯山羊草易位系 89 (5) 69; 3~26: M_2 感病突变体单株 47-1, 50-1, 51-1, 53-1, 57-1, 59-1, 60-1, 66-1, 71-1, 80-1, 83-1, 93-1, 104-1, 120-1, 137-1, 141-1, 142-1, 145-1, 183-1, 184-1, 195-1, 209-1, 216-1, 223-1
Picture A and B show the results of the *Pm57*-specific molecular markers *X2L4g9P4/HaeIII* and *X284274*, respectively, and the arrows indicate the *Pm57* gene-specific PCR amplificants. line1-2: Chinese Spring (CS), CS-*Ae. searsii* translocation line 89 (5) 69, line3-26: M_2 susceptible mutants 47-1, 50-1, 51-1, 53-1, 57-1, 59-1, 60-1, 66-1, 71-1, 80-1, 83-1, 93-1, 104-1, 120-1, 137-1, 141-1, 142-1, 145-1, 183-1, 184-1, 195-1, 209-1, 216-1, 223-1

图 3 感病突变体 *Pm57* 基因特异性分子标记鉴定

Fig.3 Identification of susceptible mutants using *Pm57* gene-specific molecular markers

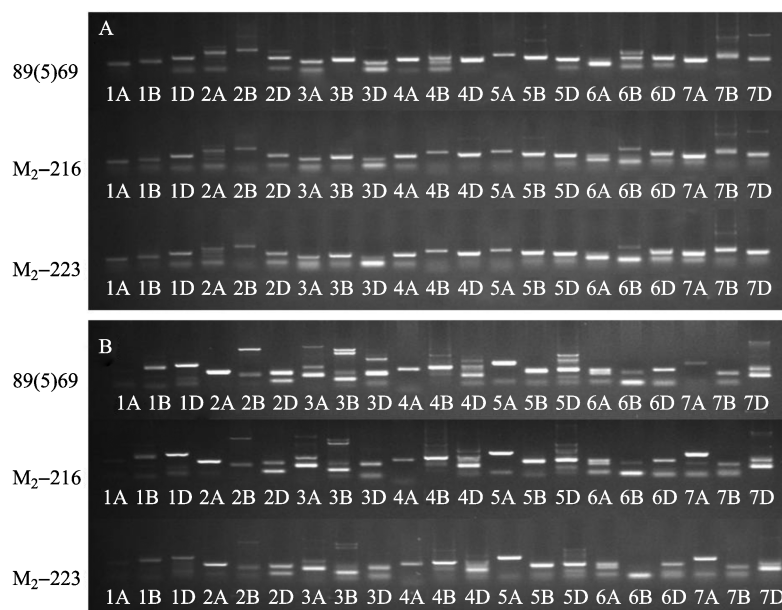


图 A 和图 B 分别为感病突变体 M_2 -216 和 M_2 -223 株系中的抗性丧失突变体单株
利用全国小麦区试品系 DUS 检测第 1 套和第 2 套核心引物 PCR 检测结果

Figure A and Figure B show the results of PCR detection of the resistance-loss mutants in the 216 and 223 M_2 lines using the first and the second set of core primers for the DUS detection in national wheat region test

图 4 *Pm57* 感病突变体遗传背景真实性分子标记鉴定

Fig.4 Identification of genetic background authenticity of *Pm57* susceptible mutants by molecular markers

基因特异标记 *X2L4g9P4/HaeIII* 和 *X284274* 从 29 个 M_2 株系中鉴定出同时能扩增出 2 个 *Pm57* 特异标记 PCR 产物的感病株 82 个。进一步利用全国小麦区试品系 DUS 检测第 1 套和第 2 套核心引物对这 29 个 M_2 株系的 82 个感病突变体进行遗传背景

真实性鉴定,最终获得了来自 27 个 M_2 株系的真实 *Pm57* 抗性丧失突变体 70 个 (表 1)。*Pm57* 基因抗性丧失突变频率 (分离出 *Pm57* 感病株的 M_2 株系数量 / 鉴定 M_2 株系总数) 达到 9.0%。

表 1 突变体鉴定结果

Table 1 The results of mutant identification

序号 No.	M ₂ 株系编号 M ₂ line No.	感病株频率 (%) Susceptible plant ratio	真实突变体个数 Number of real mutants
1	51 ^a	10	8
2	53 ^a	20	2
3	60 ^a	5	5
4	71 ^a	20	4
5	110 ^a	20	2
6	137 ^a	15	3
7	141 ^a	12	7
8	142 ^a	10	2
9	145 ^a	10	1
10	183 ^a	10	1
11	184 ^a	10	1
12	195 ^a	30	3
13	216 ^a	30	3*
14	264 ^a	10	1
15	268 ^a	10	1
16	275 ^a	10	1
17	47 ^b	20	3
18	50 ^b	20	2
19	57 ^b	50	1
20	59 ^b	20	3
21	66 ^b	25	2
22	79 ^b	20	1
23	80 ^b	20	1
24	83 ^b	30	2
25	93 ^b	35	6
26	104 ^b	35	2
27	120 ^b	30	4
28	179 ^b	30	1
29	223 ^b	65	9*

^a: 同一株系中感病株都能同时扩增出具有 *Pm57* 特异性分子标记 *X2L4g9P4/HaeIII* 和 *X284274* 标记的突变体株系; ^b: 同一株系中有感病株缺失 *Pm57* 特异分子标记 *X2L4g9P4/HaeIII* 标记的突变体株系; *: 株系中的所有感病株不计入 *Pm57* 感病突变体总数的突变体株系

^a: mutant lines of which all susceptible individuals amplify markers *X2L4g9P4/HaeIII* and *X284274* of *Pm57* -specificity, ^b: mutant lines of which some susceptible individuals lack of *Pm57* specific marker *X2L4g9P4/HaeIII*, *: lines of which all individuals are susceptible are not included in total number of mutant lines

3 讨论

EMS 诱变是进行植物功能基因组学研究的重要手段,而 EMS 处理浓度是影响目的基因突变频率的重要因素。在 EMS 诱变研究文献中,EMS 诱

变的最适剂量大多选用半致死剂量。但半致死剂量不仅因基因型不同而异,还受 EMS 处理时间、温度以及 EMS 处理前种子浸泡时间和处理后种子洗脱时间与温度等多重因素的影响,不同报道中 EMS 最适剂量有较大差异。本研究用 0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 6 个浓度梯度对易位系 89(5)69 进行预处理,确定了小麦-西尔斯山羊草 T2BS.2BL-2S[#]1L 易位系 89(5)69 半致死 EMS 浓度为 0.47%。但在对 89(5)69 进行大规模 EMS 处理时,我们选用了 65% 致死剂量(0.625% EMS)处理种子,并将 1 万粒种子按 80 粒/1.8 m 行长密播,共种植了 125 行,比常规种植密度(20 粒/1.8 m 行长)节省了 375 行土地,可育 M₁ 株系频率为 15.98%。尽管获得 M₁ 数量减少,但 *Pm57* 基因抗性丧失突变体频率高达 9.0%。除 89(5)69 外,本实验室还用相同的程序和剂量对另外 5 个小麦品种和高代品系(平安 0518、平安 602、天民 198、花培 11113-5 和大粒小麦)进行了诱变处理,不同品种最终获得的可育 M₁ 株系频率都稳定在 15% 左右。

大田种植条件下,机械混杂、田间串粉等都会影响突变体的真实可靠性,需要排除这些非突变因素的干扰^[29]。本研究利用 *Pm57* 特异性分子标记 *X2L4g9P4/HaeIII* 和 *X284274*,结合遗传背景 DUS 测试 42 对核心引物对 M₂ 株系的感病个体进行材料真实性鉴定,发现大多数 M₂ 株系的感病突变体都具有 *Pm57* 特异分子标记,感病株遗传背景与 89(5)69 相同。但是,还有部分 M₂ 株系中抗病单株两个 *Pm57* 标记都存在,但感病株都只具有位于易位染色体 2BS. 2BL-2S[#]1L 长臂中部的 *Pm57* 特异标记 *X284274*,而缺失了 2S[#]1 长臂末端标记 *X2L4g9P4/HaeIII*,这可能是由于 EMS 诱变导致标记 *X2L4g9P4/HaeIII* 引物互补序列区域发生了碱基突变或缺失,但也可能是 89(5)69 中有杂合单株,易位染色体 2BS. 2BL-2S[#]1L 发生了末端缺失或新的交换重组,致使 *X2L4g9P4/HaeIII* 标记所在的 2S[#]1L 区段丢失所造成。这部分突变体不能用于基于突变体测序进行的 *Pm57* 基因克隆,但可用来对 *Pm57* 进行进一步定位。在本研究中,只将来自发生抗、感单株分离 M₂ 株系,具有 2 个 *Pm57* 特异标记且通过遗传背景 DUS 测试的感病株作为今后利用基于抗性丧失突变体测序技术克隆 *Pm57* 基因的 *Pm57* 突变体,确保突变体的真实可靠。

据报道,小麦等多倍体作物 EMS 诱变的突变密度相对较高,每 Mb 中可以得到 20-42 个 SNP^[30-31]。

最近, Feiz 等^[32-33]利用 EMS 诱变技术创建了普通软质小麦突变体库, 每 12 kb 有 1 个突变产生。但是, 小麦为异源六倍体, 当某一基因发生突变时, 位于另外两个部分同源染色体上的同源基因会弥补突变基因的效应, 给突变表型鉴定造成不便。本研究所用到的材料为中国春 - 西尔斯山羊草易位系, 抗白粉病基因 *Pm57* 来自于西尔斯山羊草 2S^s#1 染色体, 在中国春中无同源基因, 不存在同源基因遮盖 *Pm57* 突变基因表型的情况, 更容易获得 *Pm57* 基因突变的抗性丧失突变体。本研究通过 M₂ 后代抗感分离分析, *Pm57* 所在外源染色体片段分子标记检测和遗传背景 DUS 检测三个方面确保筛选鉴定到 *Pm57* 真实感病突变体。所获得的来自 27 个 M₂ 株系的 70 个 *Pm57* 抗性丧失突变体除了源自于 *Pm57* 基因点突变或微小缺失外, 也不排除 89(5)69 中其他白粉病抗性相关基因的突变引起的抗性丧失。但基于突变体测序克隆抗病基因的技术都要根据多个突变体的序列变化来分离基因, 能够排除非抗病基因突变的干扰。

总之, 本研究通过高剂量 EMS 处理结合外源染色体片段和小麦遗传背景真实性分子标记检测, 鉴定到一批 *Pm57* 真实白粉病抗性丧失突变体。为进一步对 *Pm57* 基因进行精细定位, 利用突变基因染色体分选测序 MutChromSeq 和突变体抗病基因富集与测序 MutRenSeq 技术克隆该基因, 解析 *Pm57* 小麦抗白粉病基因分子机理奠定了坚实的材料基础。

参考文献

- [1] Wan P, Ling L J, Cao S H, Wang X P, Zhang W J, Ling H Q, Zhu L H, Zhang X Q. Isolation, chromosomal location, and expression analysis of putative powdery mildew resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 2007, 155 (1-2): 125-133
- [2] Tan C C, Li G Q, Christina C, Brett F C, Xu X Y. Characterization of *Pm59*, a novel powdery mildew resistance gene in Afghanistan wheat landrace PI 181356. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131 (5): 1145-1152
- [3] Tan C C, Li G Q, Christina C, Brett F C, Xu X Y. Characterization of *Pm63*, a powdery mildew resistance gene in Iranian landrace PI 628024. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 132 (4): 1137-1141
- [4] Zhang D Y, Zhu K Y, Dong L L, Liang Y, Li G Q, Fang T L, Guo G H, Wu Q H, Xie J Z, Chen Y X, Lu P, Li M M, Zhang H Z, Wang Z Z, Zhang Y, Sun Q X, Liu Z Y. Wheat powdery mildew resistance gene *Pm64* derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) is tightly linked in repulsion with stripe rust resistance gene *Yr5*. *The Crop Journal*, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.cj.2019.03.003>
- [5] Javier S M, Burkhard S, Sreya G, Gerhard H, Severine H, Nikolai A, Jan V, Marie K, Simon G K, Thomas W, Jaroslav D, Beat K, Brande B H W. Rapid gene isolation in barley and wheat by mutant chromosome sequencing. *Genome Biology*, 2016, 17 (1): 221
- [6] Nabila Y, Payorm S, Robert D, Beat K. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *The Plant Journal*, 2004, 37 (4): 528-538
- [7] Severine H, Susanne B, Gabriele B, Gerhard H, Tina J, Patricia K, Thomas W, Nabila Y, Rohit M, Beat K. Rye *Pm8* and wheat *Pm3* are orthologous genes and show evolutionary conservation of resistance function against powdery mildew. *The Plant Journal*, 2013, 76 (6): 957-969
- [8] 胡立芹, 唐恒, 马信, 王宏伟, 孔令让. 粗山羊草抗白粉病基因 *Pm35* 的图位克隆及利用. 第八届全国小麦基因组学及分子育种大会摘要集. 石家庄: 中国作物学会, 2017: 1
- [9] Hu L Q, Tang H, Ma X, Wang H W, Kong L R. Map-based cloning and utilization of *Pm35* resistance gene from *Aegilops tauschii*. 8th National Wheat Genomics and Molecular Breeding Conference Summary. Shijiazhuang: China Crop Society, 2017: 1
- [9] Xing L P, Hu P, Liu J Q, Witek K, Zhou S, Xu J F, Zhou W H, Gao L, Huang Z P, Zhang R Q, Wang X, Chen P D, Wang H Y, Jonathan D G J, Miroslava K, Jan V, Jan B, Jaroslav D, Cao A Z. *Pm21* from *Haynaldia villosa* encodes a CC-NBS-LRR that confers powdery mildew resistance in wheat. *Molecular Plant*, 2018, 11 (6): 874-878
- [10] He H G, Zhu S Y, Zhao R H, Jiang Z N, Ji Y Y, Ji J, Qiu D, Li H J, Bie T D. *Pm21*, encoding a typical CC-NBS-LRR protein, confers broad-spectrum resistance to wheat powdery mildew disease. *Molecular Plant*, 2018, 11 (6): 879-882
- [11] Zou S H, Wang H, Li Y W, Kong Z S, Tang D Z. The NB-LRR gene *Pm60* confers powdery mildew resistance in wheat. *New Phytologist*, 2017, 218 (1): 298-309
- [12] Koo D H, Liu W X, Friebe B, Gill B S. Homoeologous recombination in the presence of *Ph1* gene in wheat. *Chromosoma*, 2017, 126 (4): 531-540
- [13] Bettgenhaeuser J, Krattinger S G. Rapid gene cloning in cereals. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 132 (3): 699-711
- [14] Steuernagel B, Periyannan S K, Hernández-Pinzón I, Witek K, Rouse M N, Yu G T, Hatt A, Ayliffe M, Bariana H, Jones J D G, Lagudah E S, Wulff B B H. Rapid cloning of disease resistance genes in plants using mutagenesis and sequence capture. *Nature Biotechnology*, 2016, 34 (6): 652-655
- [15] Greene E A, Codomo C A, Taylor N E, Henikoff J G, Till B J, Reynolds S H, Enns L C, Burtner C, Johnson J E, Odden A R, Comai L, Henikoff S. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*, 2003, 164 (2): 731-740
- [16] 赵天祥, 孔秀英, 周荣华, 高双成, 贾继增. EMS 诱变六倍体小麦偃展 4110 的形态突变体鉴定与分析. *中国农业科学*, 2009, 42 (3): 755-764
- [16] Zhao T X, Kong X Y, Zhou R H, Gao S C, Jia J Z. Morphological identification and analysis of EMS mutants from hexaploid wheat cultivar Yanzhan 4110. *Scientia Agricultura*

- Sinica, 2009, 42(3): 755-764
- [17] Slade A J, Fuerstenberg S I, Loeffler D, Steine M N, Facciotti D. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(1): 75-81
- [18] Riccardo B, Valentina T, Salvi S, Maria C S, Paolo T, Francesca S, Roberto T. Starch metabolism mutants in barley: a TILLING approach. *Plant Genetic Resources*, 2011, 9(2): 170-173
- [19] Joong H L, Seung Y L. Selection of stable mutants from cultured rice anthers treated with ethyl methane sulfonic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, 71(2): 165-171
- [20] Till B J, Reynolds S H, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E, Codomo C A, Enns L C, Odden A R, Greene E A, Comai L, Henikoff S. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biology*, 2004, 4(1): 12
- [21] Liu S, Kandath P K, Warren S D, Yeckel G, Heinz R, Alden J, Yang C L, Jamai A, El-Mellouki T, Juvala P S, Hill J, Baum T J, Cianzio S, Whitham S A, Korkin D, Mitchum M G, Meksem K. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature*, 2012, 492(7428): 256-260
- [22] 闫智慧, 郭会君, 徐荣旗, 刘录祥. TILLING 技术的发展及其在不同植物中的应用. *核农学报*, 2014, 28(2): 224-233
- Yan Z H, Guo H J, Xu R Q, Liu L X. The development of TILLING technology and its application in different plants. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(2): 224-233
- [23] McCallum C M, Comai L, Greene E A, Henikoff S. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology*, 2000, 123(2): 439-442
- [24] 马燕欣. 南农 9918 感白粉病突变体 NM14 的创制及在抗病机理研究中的应用. 南京: 南京农业大学, 2013
- Ma Y X. Creation of powdery mildew mutant NM14 from Nannong 9918 and its application in disease resistance mechanism study. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013
- [25] 陈洋, 高兰英, 邵艳军, 张增艳. EMS 诱导小麦易位系 YW642 突变体的鉴定与分子标记分析. *核农学报*, 2011, 25(4): 617-621, 651
- Chen Y, Gao L Y, Shao Y J, Zhang Z Y. Phenotypic identification and molecular analysis of a wheat line mutant YW642 induced by EMS. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2011, 25(4): 617-621, 651
- [26] Liu W X, Koo D H, Xia Q, Li C X, Bai F Q, Song Y L, Friebe B, Gill B S. Homoeologous recombination based transfer and molecular cytogenetic mapping of powdery mildew resistant gene *Pm57* from *Aegilops searsii* into wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2017, 130(4): 841-848
- [27] 盛宝钦. 用反应型记载小麦苗期白粉病. *植物保护*, 1988, 14(1): 49-49
- Sheng B Q. Recording powdery mildew in wheat seedling by reactive type. *Plant Protection*, 1988, 14(1): 49
- [28] 王立新, 常利芳, 李宏博, 葛玲玲, 信爱华, 高世庆, 季伟, 孙辉, 赵昌平. 小麦种子纯度的分子标记检测方法. *麦类作物学报*, 2009, 29(1): 1-8
- Wang L X, Chang L F, Li H B, Ge L L, Xin A H, Gao S Q, Ji W, Sun H, Zhao C P. Method of wheat seeds purity testing by molecular markers. *Journal of Triticeae Crops*, 2009, 29(1): 1-8
- [29] 耿皆飞, 王娜, 蒋宏宝, 刘录祥, 许喜堂, 魏红升, 王成社, 谢彦周. 利用 SSR 标记和 SNP 芯片对小麦 EMS 突变体进行真实性鉴定. *核农学报*, 2019, 33(1): 7-12.
- Geng J F, Wang N, Jiang H B, Liu L X, Xu X T, Wei H S, Wang C S, Xie Y Z. The authenticity of wheat EMS mutants was identified by SSR markers and SNP chips. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33(1): 7-12
- [30] Henry I M, Nagalakshmi U, Lieberman M C, Ngo K J, Krasileva K V, Vasquez-Gross H, Akhunova A, Akhunov E, Dubcovsky J, Tai T H, Comai L. Efficient genome-wide detection and cataloging of EMS-induced mutations using exome capture and next-generation sequencing. *The Plant Cell*, 2014, 26(4): 1382-1397
- [31] Krasileva K V, Vasquez-Gross H A, Howell T, Bailey P, Paraiso F, Clissold L, Simmonds J, Ramirez-Gonzalez R H, Wang X D, Borrill P, Fosker C, Ayling S, Phillips A L, Uauy C, Dubcovsky J. Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(6): E913-E921
- [32] Feiz L, Beecher B S, Martin J M, Giroux M J. *In planta* mutagenesis determines the functional regions of the wheat puroindoline proteins. *Genetics*, 2009, 183(3): 853
- [33] Feiz L, Martin J M, Giroux M J. Creation and functional analysis of new puroindoline alleles in *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 118(2): 247-257