

许换平,郭慧杰,张林,等.紫外线对小麦叶锈病菌流行学因素的影响[J].江苏农业科学,2018,46(6):91-94.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.023

# 紫外线对小麦叶锈病菌流行学因素的影响

许换平,郭慧杰,张林,闫红飞,孟庆芳

(河北农业大学植物保护学院/国家北方山区农业工程技术研究中心/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心,河北保定 071000)

**摘要:**研究紫外线对小麦叶锈病菌 12-5-1384-1 菌株和其诱变菌株 1384-B-10-1 孢子萌发率和流行学因素的影响。结果表明,紫外线对这 2 个菌株的影响表现一致,紫外线处理均使夏孢子萌发率降低,潜育期延长,侵染效率、产孢量及病情发展曲线下面积(area under disease-progress curve,简称 AUDPC)显著下降,病斑扩展率最大值下降;紫外线处理后,与原始菌株相比,诱变菌株夏孢子的相对萌发率较高,侵染效率提高,病斑扩展率最大值延迟,产孢量和 AUDPC 升高。以上结果表明,诱变菌株对紫外线的容忍度比原始菌株大,即诱变菌株更适宜在紫外线越来越强的自然环境中生存。

**关键词:**紫外线;小麦叶锈病菌;孢子萌发率;潜育期;侵染效率;产孢量;病斑扩展率;AUDPC

**中图分类号:** S435.121.4<sup>+</sup>3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)06-0091-04

由专性寄生菌小麦隐匿柄锈菌(*Puccinia triticina*)引起的小麦叶锈病是小麦生产上的重要病害之一,是世界上分布范围较广的病害,一般造成产量损失 5%~45%,有时甚至更高<sup>[1]</sup>。我国曾在 1969 年、1973 年、1975 年、1979 年、1990 年发生流行小麦叶锈病<sup>[2]</sup>。2015 年、2016 年,笔者所在研究室的人员在采集小麦叶锈病菌标样的过程中发现,小麦叶锈病发病率较高,尤其是 2015 年的发病率较高,发病面积较广。尤其是在淮河以南地区,小麦叶锈病发病早,严重度高,严重影响了小麦的产量。

小麦叶锈病在我国的侵染循环包括越冬、秋苗发病、越冬、春季流行等 4 个过程。小麦叶锈病菌可以产生性孢子、锈孢子、夏孢子、冬孢子、担孢子等 5 种孢子,其中夏孢子在病害循环中占有重要的地位,我国小麦叶锈病的发生主要依靠夏孢子的侵染和传播,在夏孢子传播和侵染过程中,环境条件的改变会影响其存活及病害的发生情况,特别是紫外线会导致毒性的变化<sup>[3-5]</sup>和病菌的死亡<sup>[6-7]</sup>。但由于人为原因导致臭氧层空洞,使得地球表面上的紫外线强度越来越强,不断加强的紫外线会影响植物病原菌、寄主植物和植物病害<sup>[8]</sup>。当前,紫外线已经被认为是影响植物病害发生和流行的最重要的环境因素之一<sup>[9-10]</sup>。因此,加强研究紫外线对植物病原菌和植物病害的影响,已经成为控制植物病害和保证粮食安全的中中之重。紫外线诱变也是获得锈菌突变菌株的重要手段。Flor 等采用紫外诱变的方法,获得了致病性发生变化的亚麻锈菌菌株<sup>[11-12]</sup>。Maddison 等研究了自然条件下紫外线对锈病菌远距离传播的影响<sup>[13]</sup>。紫外线诱变在条锈病菌研究中的应用较多,商鸿生等通过紫外线诱变获得了多个毒性发生突变的菌株<sup>[3,14]</sup>;黄丽丽等对突变菌株进行了随机

扩增多态性 DNA 标记遗传多样性分析,初步认为紫外线可以使小麦条锈病菌基因组 DNA 发生较大的变化<sup>[4]</sup>。在小麦叶锈病菌研究中,鹿巍对小麦叶锈病菌 05-5-46 单孢菌株进行紫外诱变,获得了 3 株稳定遗传的小麦叶锈病菌突变菌株 Mut1、Mut2、Mut3<sup>[15]</sup>。本研究采用紫外诱变法,获得毒性发生变异的突变菌株,并进一步探究紫外线对小麦叶锈病菌孢子萌发和流行学因素的影响,以期小麦叶锈病菌致病性的研究提供材料和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 小麦叶锈病菌单孢菌株 12-5-1384-1 和诱变菌株 1384-10-B-1,由河北农业大学小麦叶锈病研究室保存。其中,单孢菌株 12-5-1384-1 在鉴别寄主 TcLr1 上的侵染型为“;”,诱变 1384-10-B-1 菌株是由菌株 12-5-1384-1 在 1 600  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  紫外强度下照射 10 min 后筛选得到,在鉴别寄主 TcLr1 上的侵染型为“3”。

1.1.2 供试小麦品种 小麦品种为郑州 5389,由河北农业大学小麦叶锈病研究室保存。

1.1.3 试验时间与地点 试验于 2015 年 11 月至 2016 年 5 月,在河北农业大学植物保护学院分子植物病理学与生物防治实验室完成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 诱变剂量及方法 取 10 mg 新鲜的小麦叶锈病菌夏孢子,置于直径为 9 cm 的培养皿中,保湿水化 12 h 后,在 1 600  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  紫外强度下,分别照射 10、20、30 min,以未照射处理作为对照,照射后用毛笔收集夏孢子,均匀抖落在 1% 的水琼脂培养基(10 g 琼脂粉+1 L 蒸馏水)平板上,加盖后放在 20  $^{\circ}\text{C}$  黑暗环境中,6 h 后显微镜下检查夏孢子的萌发情况。每个处理随机检查 300 个孢子,以夏孢子芽管长度超过夏孢子直径一半作为萌发的记载标准<sup>[16]</sup>,每个处理重复 3 次。计算孢子萌发率和相对萌发率,孢子萌发率=萌发孢子数/检查孢子总数 $\times 100\%$ ,相对萌发率=处理组孢子萌发率/

收稿日期:2016-10-31

基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2013CB127700)。

作者简介:许换平(1990—),女,山东济宁人,硕士研究生,主要从事小麦叶锈病研究。E-mail: xuhuanping901005@163.com。

通信作者:孟庆芳,硕士,副教授,主要从事小麦叶锈病研究。E-mail: qingfangmeng500@126.com。

对照组孢子萌发率  $\times 100\%$ 。根据前人对最适诱变剂量的研究,原始菌株的夏孢子经紫外线照射后,致死率为 90% 左右时确定为最适诱变剂量。

1.2.2 诱变菌株和原始菌株流行病学研究 将 10 mg 诱变菌株和原始菌株的夏孢子分别水化后,在  $1\ 600\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$  紫外强度下分别照射 0、10、20、30 min,将处理后的新鲜夏孢子收集于装有 10 mL 稀释 1 000 倍的吐温-20 溶液的小喷壶中,均匀喷洒于郑州 5389 小麦幼苗叶片上,叶片旁边放置载玻片,以观察记录单位面积喷洒小麦叶锈病病菌的夏孢子数。16~20 ℃ 黑暗保湿 14~16 h 后,移入 16~20 ℃ 的温室内培养。观察并记录流行病学指标[潜育期、侵染效率、病斑扩展率、产孢量、病情发展曲线下面积(area under the disease-progress curve,简称 AUDPC)等]。试验设置 3 次重复。

1.2.2.1 潜育期的标准 将夏孢子接种于叶片至叶片上第 1 个夏孢子堆突破表皮时的时间为潜育期,在叶片出现褪绿斑后,每天观察叶片病斑的变化,记录第 1 个夏孢子堆突破表皮的时间。

1.2.2.2 侵染效率的计算 显微观察记录载玻片上单位面积喷洒的夏孢子数量,作为喷洒于叶片上的单位面积的夏孢子数量。用毫米尺测量叶片的长度和最宽处的宽度,计算叶片面积。当叶片上出现侵染点后,统计叶片上侵染点的数量,并计算侵染效率。叶片面积=叶片长 $\times$ 叶片宽 $\times 0.8$ ;侵染效率=叶片上侵染点数量/(单位面积接种夏孢子的数量 $\times$ 叶片面积)。

1.2.2.3 病斑扩展率计算 在接种夏孢子的叶片刚刚出现孢子堆时,选择只有单个孢子堆的叶片,用电子游标卡尺测量孢子堆的长、宽,并记录,计算病斑面积,每 2 d 测 1 次,直到孢子堆不再扩展为止。

病斑扩展率=(第 2 天病斑面积-第 1 天病斑面积)/第 1 天病斑面积。

1.2.2.4 产孢量 待叶片上的孢子堆突破表皮后,每 2 d 收集 1 次夏孢子,直至不再产生新的夏孢子,将收集的夏孢子悬浮于 10 mL 无菌水中,用血球计数板统计每个处理的产孢量。

1.2.2.5 AUDPC 的计算 每 4 d 调查 1 次各处理的小麦叶锈病发病率、严重度、病情指数。发病率是指发病叶片数占调查总叶片数的百分率;严重度即叶片上锈菌夏孢子堆所占面积与叶片总面积比值。病情指数=发病率 $\times$ 平均严重度 $\times 100$ ;平均严重度= $\sum(\text{各级严重度} \times \text{各级严重度的叶片数})/\text{调查叶片总数} \times 100$ 。根据病情指数计算 AUDPC,  $AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{DI_i - DI_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$ , 其中,  $DI_i$  是接种后第  $i$  天的病情指数,  $t_i$  是接种后第  $i$  天,  $n$  是所有感病叶片数。

2 结果与分析

2.1 紫外线对小麦叶锈病病菌夏孢子萌发率的影响

由表 1 可知,在同一紫外线强度下,随着紫外线照射时间的延长,2 种菌株的相对萌发率均在逐渐降低。处理时间为 0 min 时,菌株 12-5-1384-1 夏孢子的萌发率为 96.98%,而诱变菌株 1384-10-B-1 夏孢子的萌发率仅为 72.94%;当处理时间为 10 min 时,菌株 12-5-1384-1 夏孢子的萌发率低于诱变菌株 1384-10-B-1 夏孢子的萌发率,说明原

始菌株对紫外线较敏感。随着处理时间的延长,2 种菌株的相对萌发率逐渐接近,说明随着照射时间的延长,突变菌株的抗紫外线能力逐渐降低。

表 1 紫外线对小麦叶锈病病菌夏孢子萌发率的影响

照射时间 (min)	12-5-1384-1 菌株		1384-10-B-1 菌株	
	萌发率(%)	相对萌发率(%)	萌发率(%)	相对萌发率(%)
0	96.98	100.00	72.94	100.00
10	13.60	14.02	18.62	25.53
20	5.23	5.39	6.39	8.76
30	2.27	2.34	2.10	2.88

2.2 紫外线对小麦叶锈病病菌流行病学参数的影响

2.2.1 紫外线对小麦叶锈病病菌潜育期的影响 由图 1 可知,处理时间为 0 min 时,菌株 12-5-1384-1 的潜育期为 9 d,诱变菌株 1384-10-B-1 的潜育期为 7 d,潜育期缩短 2 d;处理时间为 10、20、30 min 时,菌株 12-5-1384-1 的潜育期分别为 10、10、11 d,每个处理中,诱变菌株 1384-10-B-1 的潜育期均缩短 2 d。随着处理时间的延长,2 种菌株的潜育期均延长,说明紫外线可以延长小麦叶锈病病菌的潜育期。

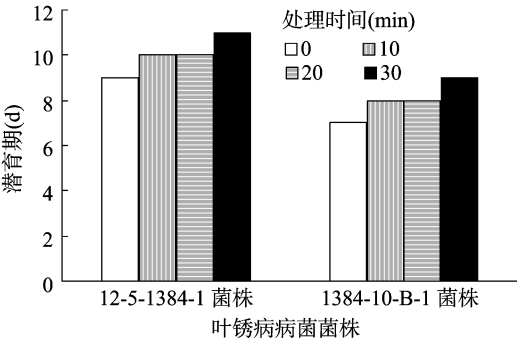
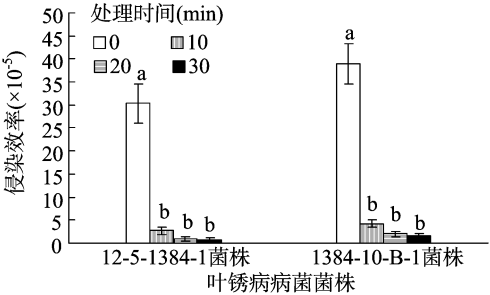


图 1 紫外线对小麦叶锈病病菌潜育期的影响

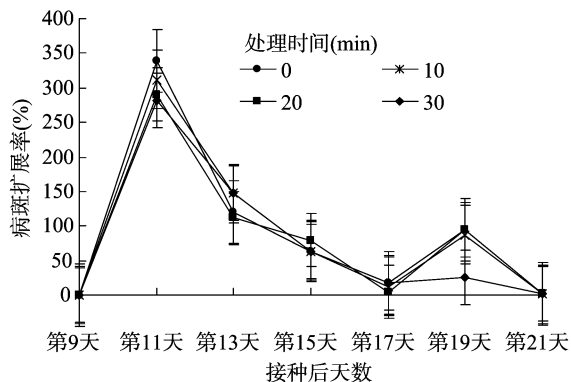
2.2.2 紫外线对小麦叶锈病病菌侵染效率的影响 由图 2 可知,处理时间为 0 min 时,菌株 12-5-1384-1 的侵染效率为  $30.33 \times 10^{-5}$ ,诱变菌株 1384-10-B-1 的侵染效率为  $38.96 \times 10^{-5}$ ,诱变菌株的侵染效率提高了 28.45%。处理时间从 0 min 增加到 10 min 时,菌株 12-5-1384-1 的侵染效率降低了 89.17%,诱变菌株 1384-10-B-1 的侵染效率降低了 91.13%。随着处理时间的进一步增加,2 种菌株的侵染效率均逐渐降低,对照组(处理 0 min)与各处理组之间差异显著( $P < 0.05$ ),各处理组之间差异不显著;处理时间相同时,诱变菌株的侵染效率总是高于原始菌株。



不同小写字母表示同一菌株不同处理时间的结果在 0.05 水平上差异显著,图 4、图 5 同

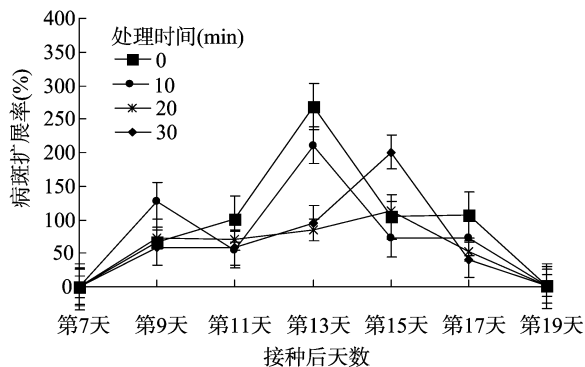
图 2 紫外线对小麦叶锈病病菌侵染效率的影响

2.2.3 紫外线对小麦叶锈病菌病斑扩展率的影响 由图 3 可知,菌株 12-5-1384-1 的病斑扩展率变化较规律,各处理之间的变化趋势一致,病斑扩展率均在接种后第 11 天达到最高,之后随着时间的增加,病斑扩展率逐渐降低,至第 19



a. 紫外线对菌株 12-5-1384-1 病斑扩展率的影响

天时又出现 1 个小高峰。菌株 1384-10-B-1 处理 0 min 组和 10 min 组的最大病斑扩展率均出现在接种后第 13 天,且在第 17 天时又出现 1 个小高峰;处理 20 min 组和 30 min 组,最大病斑扩展率均出现在第 15 天,后期没有出现小高峰。



b. 紫外线对菌株 1384-10-B-1 病斑扩展率的影响

图3 紫外线对小麦叶锈病菌病斑扩展率的影响

2.2.4 紫外照射对叶锈病菌产孢量的影响 由图 4 可知,处理时间为 0 min 时,菌株 12-5-1384-1 的产孢量为  $116.39 \times 10^4$  个,诱变菌株 1384-10-B-1 的产孢量为  $145.46 \times 10^4$  个,诱变菌株的产孢量提高了 24.98%。处理时间从 0 min 增加至 10 min 时,菌株 12-5-1384-1 和诱变菌株 1384-10-B-1 的产孢量分别降低了 84.11%、83.83%;随着处理时间的进一步增加,2 种菌株的产孢量均逐渐降低,对照组(处理 0 min)与处理组之间差异显著( $P < 0.05$ ),各处理组之间差异不显著;处理时间相同时,诱变菌株的产孢量总是高于原始菌株。

2.2.5 紫外线对小麦叶锈病菌 AUDPC 的影响 由图 5 可知,随着接种后时间的延长,各处理的 AUDPC 均在增加,且对照组(处理 0 min)显著高于各处理组( $P < 0.05$ )。就同一菌株而言,接种后相同时间内随着照射时间的延长,菌株的 AUDPC 逐渐降低。同一菌株接种后相同时间内对照组的

AUDPC 与各处理组之间差异显著( $P < 0.05$ ),各处理组之间差异不显著。紫外线照射时间相同时,原始菌株 12-5-1384-1 的 AUDPC 总是低于诱变菌株 1384-10-B-1 的 AUDPC。

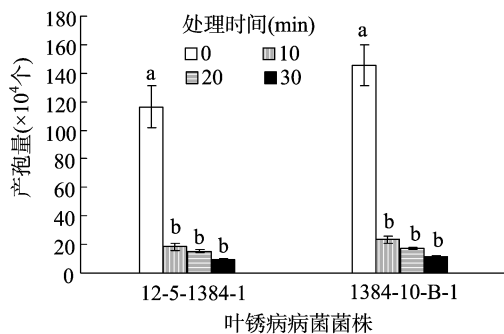
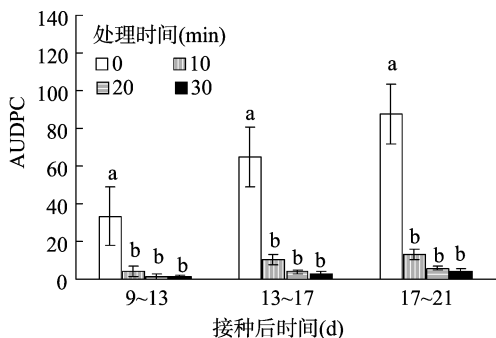
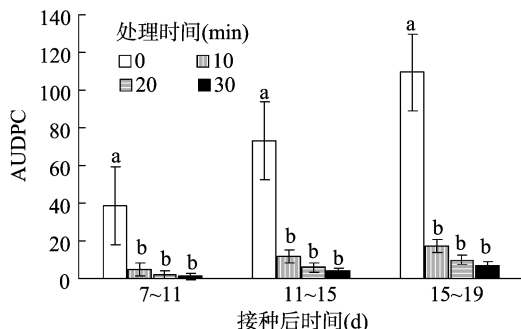


图4 紫外线对小麦叶锈病菌产孢量的影响



a. 紫外线对菌株 12-5-1384-1 AUDPC 的影响



b. 紫外线对菌株 1384-10-B-1 AUDPC 的影响

图5 紫外线对小麦叶锈病菌 AUDPC 的影响

### 3 结论与讨论

突变是促使病原菌发生遗传多样性变化的基本因素,因此在研究中,对菌株进行诱变,筛选突变体是研究致病机制和某些基因功能的基本方法<sup>[17-18]</sup>。紫外线导致 DNA 发生变异的根本在于入射光子的波长<sup>[19-23]</sup>,紫外线诱导的 DNA 变异可以由紫外线 B 或紫外线 A 吸收,以及光敏作用直接触

发<sup>[19,22,24]</sup>,发生的变异是非定向的,正向的毒性突变是导致抗病品种丧失抗锈性的原因,而反向的非毒性变异在筛选过程中容易丢失。本研究采用紫外诱变的方法,以 TeLr1 为鉴别寄主,选择在 TeLr1 上侵染型为“;”的 12-5-1384-1 单孢菌株为原始菌株,经紫外线诱变后,筛选出侵染型变为“3”的菌株,进一步研究紫外线对其流行病学参数的影响。

本研究的结果表明,紫外线照射会抑制叶锈病菌夏孢

子的萌发,2 株叶锈病病菌对紫外线照射的容忍度是不同的,诱变菌株的容忍度大于原始菌株;在紫外线照射之后,菌株的侵染效率、病斑扩展率、产孢量和 AUDPC 均下降,潜育期增长,紫外线照射在某种程度上伤害了叶锈病病菌夏孢子,导致一部分夏孢子不能萌发、甚至死亡,但即便如此,仍有一些幸存的夏孢子能够萌发,曾有多名研究者报道过紫外线辐射可以延迟幸存真菌分生孢子的萌发<sup>[25-27]</sup>;另外,真菌孢子自身的某些生理条件可能会帮助其抵抗紫外照射的伤害并修复其带来的伤害<sup>[28]</sup>,但这个过程需要时间,这可能是处理时间越长,潜育期越长的原因。这些结果表明,诱变菌株和原始菌株相比,原始菌株对紫外线照射更加敏感,在同样的紫外线照射条件下,突变菌株更具生存优势。在此研究中突变菌株被命名为诱变菌株 1384-10-B-1,自然界中该生理小种的毒性高于单孢菌株 12-5-1384-1 这一生理小种,近几年诱变菌株 1384-10-B-1 出现的比例高于单孢菌株 12-5-1384-1,可能是因为诱变菌株 1384-10-B-1 比单孢菌株 12-5-1384-1 更适合现在的生存环境。因此,可以初步认为紫外线可能是造成叶锈病病菌生理小种不断进化的一个重要因素,但还须做进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Kolmer J A. Genetics of resistance to wheat leaf rust[J]. Annual Review of Phytopathology, 1996, 34: 435-455.
- [2] 董金皋. 农业植物病理学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 57-61.
- [3] 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.
- [4] 黄丽丽, 王欣丽, 康振生, 等. 紫外线诱导小麦条锈菌毒性突变及突变体的 RAPD 分析[J]. 菌物学报, 2005, 24(3): 400-406.
- [5] 王欣丽, 朱 飞, 黄丽丽, 等. 紫外线诱变对小麦条锈菌致病性突变的影响[J]. 核农学报, 2009, 23(3): 375-379.
- [6] Rotem J, Wooding B, Aylor D E. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores[J]. Phytopathology, 1985, 75(5): 510-514.
- [7] Raviv M, Antignus Y. UV radiation effects on pathogens and insect pests of greenhouse - grown crops[J]. Photochemistry and Photobiology, 2004, 79(3): 219-226.
- [8] Manning W J, Tiedemann A V. Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), ozone (O<sub>3</sub>), and ultraviolet - B (UV - B) radiation on plant diseases[J]. Environmental Pollution, 1995, 88(2): 219-245.
- [9] Willocquet L, Colombet D, Rougier M, et al. Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelial growth of grape powdery mildew[J]. European Journal of Plant Pathology, 1996, 102(5): 441-449.
- [10] 吴杏春, 林文雄, 郭玉春, 等. 植物对 UV - B 辐射增强响应的研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2001, 9(3): 52-55.
- [11] Flor H H. Mutations in flax rust induced by ultraviolet radiation[J]. Science, 1956, 124(3227): 888-889.
- [12] Schwinghamer E A. The relation between radiation dose and the frequency of mutations for pathogenicity in *Melampsora lini*[J]. Phytopathology, 1959, 49: 260-269.
- [13] Maddison A C, Manners J G. Sunlight and viability of cereal rust uredospores[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1972, 59(3): 429-443.
- [14] Johnson R, Priestley R H, Taylor E C. Occurrence of virulence in *Puccinia striiformis* for Compair wheat in England[J]. Cereal Rusts Bulletin, 1978, 6: 11-13.
- [15] 鹿 巍. 紫外线及 EMS 方法诱导小麦叶锈菌毒性突变研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2007.
- [16] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 146-155.
- [17] 郭宏文, 王 艳, 江成英, 等. 酸性  $\alpha$  - 淀粉酶菌种的诱变选育[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 356-357.
- [18] 任友花, 王羿超, 李 娜, 等. 微生物肥料高效解磷菌筛选及解磷机理探究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 537-540.
- [19] Kielbassa C, Roza L, Epe B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light[J]. Carcinogenesis, 1997, 18(4): 811-816.
- [20] Douki T, Reynaud - Angelin A, Cadet J, et al. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation[J]. Biochemistry, 2003, 42(30): 9221-9226.
- [21] Schuch A P, Galhardo R D, de Lima - Bessa K M, et al. Development of a DNA - dosimeter system for monitoring the effects of solar - ultraviolet radiation[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2009, 8(1): 111-120.
- [22] Cadet J, Mouret S, Ravanat J L, et al. Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions[J]. Photochemistry and Photobiology, 2012, 88(5): 1048-1065.
- [23] Karentz D. Beyond xeroderma pigmentosum: DNA damage and repair in an ecological context. A tribute to James E. Cleaver[J]. Photochemistry and Photobiology, 2015, 91(2): 460-474.
- [24] Cadet J, Douki T, Ravanat J. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation[J]. Photochemistry and Photobiology, 2015, 91(1): 140-155.
- [25] Rasanayagam M S, Paul N D, Royle D J, et al. Variation in responses of spores of *Septoria tritici*, and *S. nodorum*, to UV - B irradiation *in vitro*[J]. Mycological Research, 1995, 99(11): 1371-1377.
- [26] Nascimento É, Silva S H D, Marques E D R, et al. Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UVB radiation in conidia of the fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii*[J]. Photochemistry & Photobiology, 2010, 86(6): 1259-1266.
- [27] Costa L B, Rangel D E, Morandi M A. Impact of UV - B radiation on *Clonostachys rosea* germination and growth[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(7): 2497-2504.
- [28] 赵 颖, 祖艳群, 李 元. UV - B 辐射增强对水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 生长和产孢的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(增刊 1): 1-5.