

来源于同一穗不同稻曲球的稻曲病菌的致病性及遗传多样性

俞咪娜, 陈志谊, 于俊杰, 胡建坤, 尹小乐, 聂亚锋, 刘永锋*

(江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

摘要:本研究从源于6穗稻曲病穗的48个稻曲球中分离获得稻曲病菌(*Ustilaginoidea virens*)48株,从3个稻曲球的不同部位分离获得稻曲病菌23株。用注射接种法将菌株分别接种到水稻品种两优培九(感病品种)、淮稻5号(中抗品种)和武育粳3号(抗病品种)上,结果显示分离的菌株致病力分化较大,而菌株在水稻品种上的致病力强弱与已知水稻品种对稻曲病菌的感、抗性趋势基本一致。相同孢子量接种水稻,不同分离菌株之间仍有致病力分化,生长速率测定也发现菌株之间可能存在差异。利用REP-PCR(repetitive extragenic palindromic sequence PCR)技术进行菌株遗传多样性分析表明,同穗不同稻曲球分离的菌株中,1号穗分离的4个菌株聚在同一簇群,其余5穗的菌株分别聚在3~5个簇群;同一稻曲球不同部位分离的菌株中,一个稻曲球分离的8个病菌聚在同一簇群,而其余2个稻曲球分离的病菌则分别聚在2~3个簇群。由此推测同一稻穗上不同稻曲球可能是由来源不同的稻曲病菌侵染所形成;而一个稻曲球可以由同一稻曲病菌引起,也存在多个侵染源共同侵染的可能。

关键词:稻曲病菌;致病力;REP-PCR

Genetic diversity and pathogenicity of *Ustilaginoidea virens* isolated from different rice false smut balls of a diseased spike YU Mi-na, CHEN Zhi-yi, YU Jun-jie, HU Jian-kun, YIN Xiao-le, NIE Ya-feng, LIU Yong-feng (Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Rice false smut, caused by *Ustilaginoidea virens*, is one of the main diseases of rice. We obtained 48 *U. virens* strains from different rice false smut balls of 6 diseased spikes and 23 *U. virens* strains from different parts of 3 smut balls, examined the pathogenicity of the strains on three rice cultivars Liangyoupeijiu (susceptible cultivar), Huaidao No.5 (medium resistant cultivar) and Wuyujing No.3 (resistant cultivar), growth rate and analyzed their genetic variability using REP-PCR. The strains isolated from different false smut balls of a diseased spike had an evident pathogenicity differences on the three cultivars, and were grouped into 3~5 clusters with REP-PCR, except the four strains isolated from the No.1 disease spike. In clustering analysis, the isolates of one smut ball clustered together in the same group, and the strains isolated from the other two smut balls in 3 clusters. When inoculated rice with the same amount of conidium, an evident pathogenicity difference of different strains were still found, and the growth rates also showed the difference of the strains. Thus, different strains can infect the same grain or different grains, and a grain also can be infected by the same strain or different strains. However, there was little relationship between groups of strains, based on REP-PCR and pathogenicity.

Key words: *Ustilaginoidea virens*; pathogenicity; REP-PCR

收稿日期: 2012-02-13; 修回日期: 2013-08-27

基金项目: 江苏省农业自主创新基金(CX12-5005); 农业部公益性行业专项项目(200903039)

通讯作者: 刘永锋, 研究员, 主要从事水稻病害病理学及其生物防治技术研究; Tel: 025-84391002, E-mail: liuyf@jaas.ac.cn

第一作者: 俞咪娜, 女, 浙江萧山人, 主要从事水稻稻曲病菌病理学研究。

中图分类号: S435.111

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2013)06-0561-13

水稻稻曲病是由稻曲病菌[*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak.] 侵染引起的一种水稻真菌病害,在全世界各主要水稻产区都有发生,已成为世界性的水稻病害^[1-4]。稻曲病的发生会造成稻穗空秕率增加,水稻产量下降;同时,形成的稻曲球混杂于谷粒中影响稻米色泽,而其中含有的稻曲菌毒素,更能强烈抑制微管蛋白组装,干扰细胞骨架形成,引起人畜病变^[5-8]。在我国,特别是 20 世纪 80 年代以后,随着优质高产水稻品种的选育和推广、施肥量增加、气候变暖等因素的影响,稻曲病呈现发生范围扩大、产量损失加重的趋势^[7,9]。

目前对稻曲病菌的传播和侵染过程已有大量研究报道,较为认可的观点是,稻曲病菌以菌核和厚垣孢子的形式在田间、稻种或其他寄主上越冬,翌年在适宜条件下再萌发侵染水稻,稻曲球包含的大量厚垣孢子,为稻曲病的侵染和传播提供了菌源^[7,10]。许多研究从组织病理学和细胞学角度对稻曲病菌的扩展方式进行了分析,认为稻曲病菌具有系统性侵染的可能^[4,11,12]。稻曲病菌以菌丝形态潜伏于种子内越冬,播种后菌丝生长侵入幼苗导致水稻后期发病^[13]。研究者采用巢式 PCR 检测接种植株的水稻芽期、苗期和孕穗期,皆可检测到样品中稻曲病菌的存在,说明稻曲病菌能在不同生育期侵染水稻,然后随着植株的生长而向上迁移^[4,14]。而从解剖学的角度分析稻曲球,认为稻曲病菌的各种形式的孢子可随风雨飞散传播,落在孕穗期叶鞘内或直接侵染花器而致病,属于局部性侵染^[7,15]。已有研究报道稻瘟病菌在同一叶片不同病斑,甚至同一病斑上可同时存在多个生理小种^[16]。而对于稻曲病菌,由于可能存在多种侵染方式,加之对稻曲球形成机制尚不清楚^[17],因此同一病穗的不同稻曲球,甚至同一稻曲球的不同部位是否存在来源不同的稻曲病菌是本研究希望能揭示的。同时,明确同一穗上不同稻曲球和同一稻曲球的病原菌的来源和变化,对认识稻曲病菌侵染过程,制定该病害的防控技术,指导病害测报和抗病育种都具有重要意义。

Rep-PCR (repetitive DNA PCR-based genomic fingerprinting) 是基于基因组重复序列的一种指纹分析方法,具有操作简便、分辨效果好的特点,其中

保守重复序列 REP 在分化和进化过程中相对保守,较常用于揭示病原菌的群体遗传多样性^[18,19]。本文通过对分离于同一病穗的不同稻曲球、同一稻曲球上不同部位的稻曲病菌进行分子鉴定和致病力测定;利用 REP-PCR 分子指纹图谱技术,分析上述病原菌的群体遗传多样性,以期探索稻曲病菌的侵染为害的行为特点,为认识稻曲病菌的侵染源和侵染过程提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株的分离与培养

2010 年秋在江苏省农科院水稻试验田,分别从 6 个不同水稻品种中,采集 6 穗稻曲病病穗,每穗均有多个稻曲球。作为寄主的 6 个水稻品种为江苏省水稻中间试验品种,包括 2010-284 (中杂粳),2010-303 (晚杂粳),2010-357 (中粳),2010-347 (杂粳),2010-385 (晚粳),2010-352 (中粳),由于品种保密,具体品种未知,但各水稻品种发病程度均较重。采用组织解剖法,从 6 个病穗不同稻曲球中分离 48 个菌株;从源于不同病穗的 3 个稻曲球的不同部位分离 23 个菌株,并将上述分离菌株进行单孢纯化(表 1)。纯化菌株转接到 PS 培养液(马铃薯 200 g,蔗糖 20 g)中,在 28℃,130 rpm 振荡培养 5~7 d。取含有菌丝和孢子的混合培养液,-70℃保存于终浓度为 20% 的甘油中备用。

1.2 供试菌株基因组 DNA 的提取及鉴定

采用 EasyPure Plant Genomic DNA Extraction kit (Transgen, Beijing, China),按照说明书提供的方法提取供试菌株基因组 DNA。DNA 溶于超纯水后,用琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和质量,并于 -20℃ 保存。为保证供试菌株的可靠性,根据 Zhou 等^[20]的方法,采用稻曲病菌特异的专化性引物 (ITS1: 5'-CAATGCATGTCTGAGTGGATTTTTG-3'; ITS2: 5'-CCAACACCAAGCGCAAGACAGA-3') 对所有分离的菌株进行分子鉴定。

1.3 菌株的致病力测定

1.3.1 接种体的培养和接种 挑取保存的单孢菌株至 PSA 培养基(马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,琼脂 20 g),28℃ 培养 15 d。取生长条件一致的菌碟(打

孔器直径为 3.5 mm) 6 个,置于含有 20 mL PS 培养液的 50 mL 离心管中,28℃、130 rpm 振荡培养,7 d 后将含有孢子和菌丝的混合液接种水稻。参考 Zhang 等^[21]的稻曲病菌接种方法,选择水稻破口前 7 d 接种。每个菌株每个水稻品种各接 10 穗,每穗接种 1 mL 菌丝和孢子混合液。

2011 年,在南京溧水基地试验田,8 月 17 日接种水稻品种淮稻 5 号(中抗)、武育粳 3 号(抗病),

8 月 26 日接种两优培九(感病);2012 年在农科院内试验田,9 月 6 日接种两优培九,接菌的孢子量统一调整为 1×10^6 个孢子/mL(有 10 个菌株的产孢量小于 5×10^4 个孢子/mL,未作调整),以接 PS 培养液(马铃薯 200 g,蔗糖 20 g)为空白对照。表 1 为 2011 年 8 月 12 日~9 月 12 日、2012 年 8 月 31 日~10 月 1 日接菌地的气候情况。

Table 1 The climate condition in Nanjing area on Aug. 12- Sep. 12, 2011 and Aug. 31- Oct. 1, 2012

Date	Weather	Temperature/℃	Date	Weather	Temperature/℃
8-12	thundershowers	31-25	8-31	cloudy	31-25
8-13	thundershowers ~ cloudy	33-26	9-1	cloudy	30-23
8-14	thundershowers ~ cloudy	34-27	9-2	cloudy ~ T-Storms	32-22
8-15	thundershowers ~ cloudy	35-27	9-3	moderate rain ~ overcast	25-20
8-16	cloudy	36-29	9-4	overcast ~ cloudy	26-19
8-17	thundershowers	34-27	9-5	cloudy	29-20
8-18	cloudy	35-27	9-6	cloudy	29-21
8-19	cloudy	33-25	9-7	showers ~ cloudy	27-22
8-20	thundershowers	32-24	9-8	showers ~ moderate rain	26-21
8-21	moderate rain	30-23	9-9	rain showers ~ overcast	23-19
8-22	thundershowers	27-23	9-10	overcast ~ cloudy	27-20
8-23	showers	25-20	9-11	cloudy ~ thundershowers	27-21
8-24	showers	26-22	9-12	showers	25-18
8-25	showers	25-21	9-13	light rain ~ cloudy	22-16
8-26	showers	26-22	9-14	cloudy ~ sunny	25-16
8-27	showers	28-23	9-15	sunny	27-16
2011 8-28	T-Storms ~ showers	31-24	2012 9-16	sunny	27-17
8-29	thundershowers	31-25	9-17	cloudy	25-16
8-30	showers ~ light rain	30-24	9-18	sunny	27-17
8-31	cloudy	30-24	9-19	sunny ~ cloudy	28-17
9-1	cloudy ~ sunny	31-24	9-20	sunny ~ cloudy	28-19
9-2	sunny	31-23	9-21	showers	24-19
9-3	sunny ~ cloudy	31-22	9-22	cloudy	27-18
9-4	cloudy	28-20	9-23	sunny	27-18
9-5	cloudy	29-20	9-24	sunny	28-18
9-6	cloudy ~ overcast	29-22	9-25	sunny ~ cloudy	27-18
9-7	showers	26-21	9-26	cloudy	26-19
9-8	thundershowers	25-20	9-27	cloudy	27-18
9-9	showers	24-21	9-28	cloudy ~ sunny	24-13
9-10	showers	24-21	9-29	sunny	24-13
9-11	overcast ~ cloudy	26-21	9-30	sunny	25-13
9-12	cloudy	29-22	10-1	sunny	25-13
Rainy days	20 days (62.5%)		Rainy days	9 days (28.1%)	

1.3.2 病情调查统计方法 在水稻蜡熟期调查接种结果,每个处理共调查 8 穗,记录其病穗数及每穗病粒数。2011 年在接种供试菌株的同一田块,随机调查 5 处,每处 8 穗,共 40 穗没有接种的同品种水稻的病穗数及每穗病粒数做为对照。2012 年调查接种 PS 培养液的水稻为对照。由于 2011 年田间气候湿润(表 1),较适于稻曲病的发生,调查结果显示整体发病较重,因此,本研究参考以前研究的分级标准^[22, 23],将病级分为 11 级(表 2)。病情指数计算公式:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级病穗数} \times \text{相应的级数})}{(\text{调查总穗数} \times \text{最大病级数})} \times 100$$

1.4 菌株生长速率和菌落色泽

取直径为 3.5 mm 的菌碟,接种至含有 PSA 培养基的平板中央(培养皿直径为 6 cm),28℃下培养 15 d,每个菌设 3 个重复。用十字交叉法测量菌落直径,并记录菌落背面的色泽。色泽分类标准参考 Li 等^[24]。

1.5 REP-PCR 分子指纹图谱分析

PCR 采用 REP (REP1R: 5'-III CGICGICATCIGGC-3'; REP2I: 5'-ICGICTTATCIGGCC-TAC-3') 寡核苷酸引物^[25],引物由上海生工有限公司合成(Sangon, Shanghai, China)。REP-PCR 反应条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min,40℃ 1 min,72℃ 4 min,40 个循环;72℃ 10 min。取 5 μL PCR 产物用进行电泳检测(5%的聚丙烯酰胺凝胶)。

1.6 数据分析

各菌株的 PCR 扩增电泳图中,每条带均作为一个分子标记,代表一个位点。根据 PCR 产物指纹带位的有无,分别赋值 1 或 0,制成 1-0 表,用于数据处理分析。采用 NTSYS-pc1.7 版软件包,计算各菌株间的相似性系数,对结果以非加权算术平

均数配对法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages, UPGMA)进行聚类分析,生成相似性矩阵和树状图。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的形态观察及分子鉴定

为保证供试菌株的可靠性,对分离菌株的菌落形态、分生孢子形态等性状观察,发现供试菌株与本实验室保存的其他稻曲病菌菌株相似。进一步根据 Zhou 等^[20]的方法,对分离的病原菌采用稻曲病菌特异的检测引物进行分子鉴定,所有分离菌株与强致病力稻曲菌株 P1 一致,均在约 230 bp 处出现目的片段,以此判断分离菌株均为稻曲病菌。

2.2 分离菌株在不同水稻品种上的致病力分析

2.2.1 分离菌株在不同水稻品种上的致病力分化显著 分析 2011 年测定的分离菌株的病情指数,发现菌株在不同水稻品种上的致病力强弱与已知该水稻品种对稻曲病菌的感、抗性趋势基本一致。随着水稻品种抗性增加,病情指数逐渐递减的菌株有 61 个,占总分离菌数的 85.92%。以菌株 2-1 为例,在两优培九上的病情指数为 23,淮稻 5 号上的病情指数为 6,武育梗 3 号上的病情指数为 1。而有 9 个菌株的病情指数与水稻品种抗性并无明显相关性,占总分离菌数的 12.68%。以菌株 2-5 为例,在两优培九上的病情指数为 8,淮稻 5 号上病情指数为 15,武育梗 3 号上病情指数为 9(图 1 B)。菌株 6-7 则在 3 个水稻品种上均表现为不致病。

在 3 个不同抗性水稻品种上,分离菌株的致病力分化十分显著(图 1 A)。69 个菌株能在两优培九上致病,病情指数范围为 1~92,平均值为 45,其中病情指数在 25.1~50 之间的菌株最多有 24 个,占总分离菌株数的 33.80%。菌株在淮稻 5 号上

Table 2 Classification standard of rice false smut

Classification	Number of smut balls per spike	Classification	Number of smut balls per spike	Classification	Number of smut balls per spike
0	0	4	6-9	8	30-39
1	1	5	10-15	9	40-49
2	2	6	16-19	10	≥50
3	3-5	7	20-29		

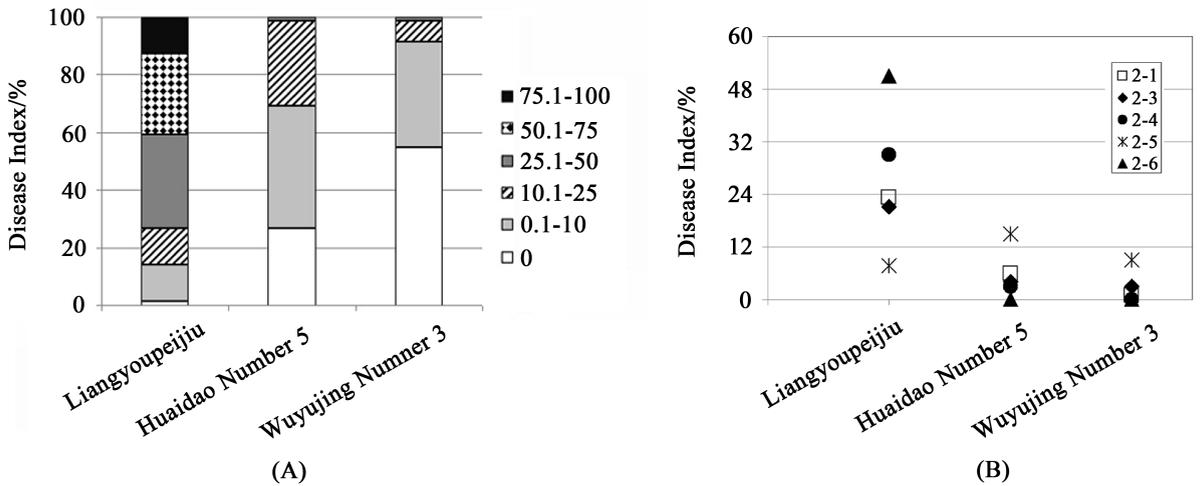


Fig. 1 Pathogenicity differentiation of *Ustilaginoidea virens* on 3 rice cultivars

A: The pathogenicity differentiation of *Ustilaginoidea virens* on 3 rice cultivars. B: Disease index of the five strains isolated from the No.2 disease spike. Five different shapes represent five strains respectively.

的致病力相对较弱,病情指数范围为0~28,平均病情指数为6,病情指数在0.1~10之间的菌株最多有30个,占总分离菌株数的42.25%。在武育梗3号上,分离菌株的整体致病力最弱,病情指数范围为0~31,平均值为2,不发病的菌株最多,达39株,占总分离菌株数的54.93%。

2.2.2 同一分离菌株在相同水稻品种上的致病能力基本稳定 以菌株在感病品种两优培九上的致病力为例,菌株5-1的致病力最强,病情指数为92,调查的10穗中有9穗病级为10级,1穗病级为3级;致病力较弱的菌株6-6病情指数为7,调查的10穗中有5穗未发病,4穗病级为1,1穗病级为2;病情指数为59的菌株5-14,调查的10穗中,病级为4和8的各有一穗,其余都集中在5~7级之间。由此分析表明,不同分离源的稻曲病菌,部分在相同水稻品种上的致病力分化较大,而同一菌株在同一水稻品种上的致病力基本稳定,可以推测这些分离菌株的来源可能是不同的。

2.3 分离的稻曲病菌存在致病力分化

2.3.1 同一穗来源的不同稻曲菌存在致病力分化为进一步验证不同分离源菌株的来源差异,本研究在2012年将各个菌的接种孢子浓度调整至 $1 \times$

10^6 个孢子/mL后再接种两优培九。虽然结果显示2012年的发病程度受气候等因素影响,整体较2011年有所下降,但从同一稻穗不同稻曲球分离的稻曲病菌,接种水稻后仍表现出较大的致病力差异(表3)。以从2号病穗的5个不同稻曲球分离的5株稻曲菌为例,病情指数分别为1、13、14、38和76;从3号病穗的8个不同稻曲球分离的8株稻曲菌,致病力差异也较大,病情指数最大值为87,最小值为10,平均值为40(图2)。因此推测,同一稻穗上不同稻曲球很可能是由多个不同稻曲病菌侵染源共同侵染引起的。

2.3.2 同一稻曲球来源的不同稻曲菌也存在致病力分化 从同一稻曲球不同部位分离的稻曲病菌在两优培九上也有较大的致病力差异。如2号病穗同一稻曲球分离的菌株在两优培九上的病情指数为2~40;4号病穗同一稻曲球不同部位分离的8个菌株,在两优培九上的病情指数为0~37,与4号病穗不同稻曲球分离菌株的病情指数5~34相近。而3号病穗同一稻曲球不同部位分离的8个稻曲病菌,在两优培九上的病情指数范围为0~41,显著小于3号病穗不同稻曲球分离的菌株(病情指数为10~87)(图2)。

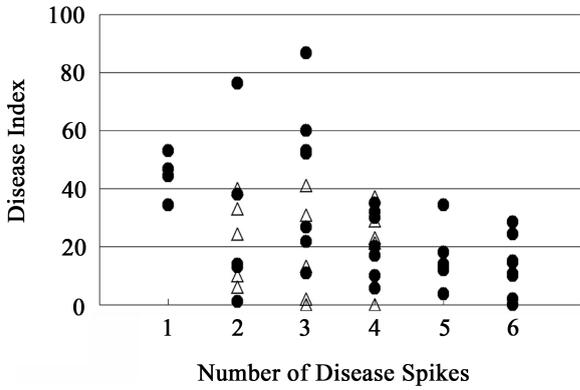


Fig. 2 Pathogenicity differentiation of *Ustilaginoidea virens* isolated from different rice spikes in Liangyoupeijiu

●: the disease index of strains isolated from different smut balls. △: the disease index of strains isolated from different parts of different smut balls.

2.4 分离菌株的生物学表型差异

供试菌株在 PSA 培养基上的菌落直径、菌落形态和菌落背面的色泽也有差异(图 3,表 3)。以 6 号病穗不同稻曲球分离的稻曲菌株为例,菌株 6-1 的菌落直径值为 23.39 ± 2.12 mm,菌丝较致密,

背面有黄色色素沉淀在菌碟周围;菌株 6-5 的菌落直径平均值为 44.90 ± 2.95 mm,菌丝较疏散,背面呈白色;菌株 6-7 的菌落表面则形成了黄色的厚垣孢子。在同一稻曲球不同部位分离的稻曲菌中,也可以观察到类似的现象。而试验结果表明,稻曲病菌的生长速率在相同的培养条件下稳定,由此推测,一个稻曲球很可能由多个稻曲病菌共同侵染形成,但也存在由单个稻曲病菌侵染形成的情况。

2.5 分离菌株的 REP-PCR 分子指纹图谱及聚类分析

REP-PCR 扩增供试菌株基因组,得到的片段大小在 250~5 000 bp 之间,主要指纹条带有 18 条(图 4 C)。其中 1 号病穗分离的 4 个稻曲菌电泳条带完全相同,不存在图谱差异。6 号病穗分离的 11 个稻曲菌菌株之间相似性系数达 0.76,以相似带位 90% 为界,将亲缘关系分为 5 个簇,且菌株的对应簇群构成比例不相同。第 1 簇有 3 个菌株,占总数的 27.27%;第 4 簇有 5 个菌株,占 45.45%;第 2,3,5 簇各有 1 个菌株,均占总菌株数的 9.09%。5 号病穗分离的 11 个菌株聚类情况与 6 号病穗分离的菌株相似,分在 3 个不同簇群中。

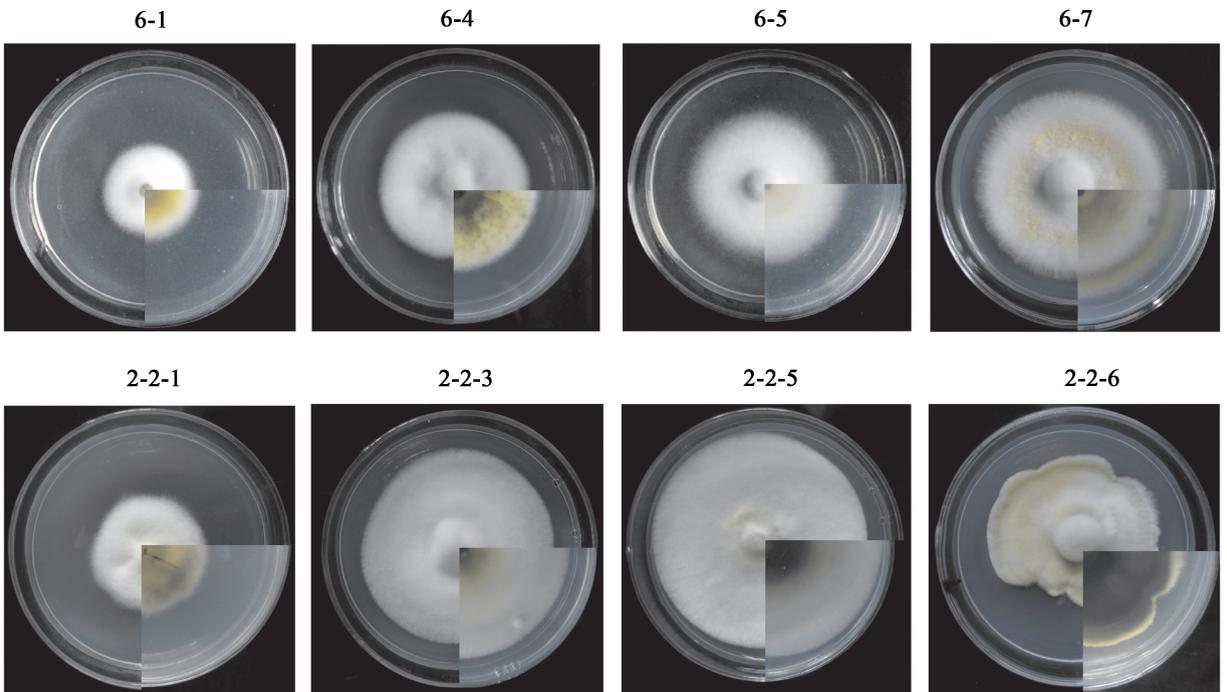


Fig. 3 Colony morphology and pigment are different on PSA plate

Table 3 Analysis of pathogenicity and colony morphology in the 71 different isolates from different rice false smut balls

Strain	Spike Number	Smut ball Number	part of the same smut ball	Rice variety	Colony /mm	Pigment	Disease index	
							2011	2012
1-1	1	1	-	2010-284	27.80±2.36	White	32.22	46.67
1-2	1	2	-	2010-284	25.38±1.07	Yellow green	57.78	53.00
1-4	1	4	-	2010-284	30.00±0.63	White	55.55	34.29
1-5	1	5	-	2010-284	37.67±1.33	Yellow green	78.75	44.44
2-1	2	1	-	2010-303	28.89±2.08	Yellow	15.00	* 5.00
2-3	2	3	-	2010-303	23.83±1.21	Yellow	23.33	13.00
2-4	2	4	-	2010-303	26.89±4.65	Yellow green	21.11	* 14.00
2-5	2	5	-	2010-303	26.57±0.49	Yellow	33.00	* 38.00
2-6	2	6	-	2010-303	34.22±0.92	Yellow green	7.78	76.25
2-7	2	7	-	2010-303	46.67±1.89	Yellow green	51.00	1.00
2-2-1	2	2	1	2010-303	32.33±1.15	Yellow	28.00	40.00
2-2-2	2	2	2	2010-303	28.17±1.21	Yellow green	52.50	24.44
2-2-3	2	2	3	2010-303	41.67±0.94	White	40.00	* 33.00
2-2-4	2	2	4	2010-303	35.43±0.49	Yellow green	44.29	6.00
2-2-5	2	2	5	2010-303	52.63±1.11	White	30.00	6.00
2-2-6	2	2	6	2010-303	30.78±2.66	Dark green	51.11	2.00
2-2-9	2	2	9	2010-303	45.00±2.50	Yellow green	9.00	10.00
2-2-10	2	2	10	2010-303	32.50±1.12	Yellow green	27.78	12.86
3-1	3	1	-	2010-357	20.44±3.86	Dark green	63.75	86.67
3-3	3	3	-	2010-357	34.33±1.63	Yellow green	33.00	53.00
3-6	3	6	-	2010-357	39.13±4.14	Yellow green	12.50	21.67
3-8	3	8	-	2010-357	51.22±1.23	White	53.00	10.91
3-9	3	9	-	2010-357	44.33±2.40	White	7.14	52.22
3-10	3	10	-	2010-357	32.00±0.00	Yellow green	31.43	10.00
3-11	3	11	-	2010-357	32.89±0.57	White	34.29	26.67
3-12	3	12	-	2010-357	26.13±0.78	Yellow green	43.33	60.00

Table 3 Analysis of pathogenicity and colony morphology in the 71 different isolates from different rice false smut balls Continued

Strain	Spike Number	Smut ball Number	part of the same smut ball	Rice variety	Colony /mm	Pigment		Disease index	
								2011	2012
3-13-1	3	13	1	2010-357	36.67±2.43	Yellow green	Yellow green	35.00	13.33
3-13-2	3	13	2	2010-357	27.11±0.74	Yellow green	Yellow green	46.25	2.00
3-13-3	3	13	3	2010-357	22.40±0.49	Yellow green	Yellow green	18.89	0.00
3-13-4	3	13	4	2010-357	23.50±1.26	Yellow green	Yellow green	40.00	41.00
3-13-5	3	13	5	2010-357	47.56±2.59	White	White	25.56	0.00
3-13-6	3	13	6	2010-357	23.78±3.01	Yellow	Yellow	26.67	11.11
3-13-8	3	13	8	2010-357	28.33±2.67	Yellow	Yellow	0.00	30.91
4-3	4	3	-	2010-347	27.00±0.00	Yellow green	Yellow green	54.44	35.00
4-4	4	4	-	2010-347	41.30±1.68	Yellow green	Yellow green	78.75	5.56
4-5	4	5	-	2010-347	48.67±1.25	White	White	91.25	30.00
4-6	4	6	-	2010-347	28.33±2.05	Yellow	Yellow	14.00	20.00
4-7	4	7	-	2010-347	33.00±0.71	Yellow green	Yellow green	27.78	32.00
4-10	4	10	-	2010-347	34.70±1.35	Yellow green	Yellow green	73.00	17.00
4-11	4	11	-	2010-347	35.00±1.41	Yellow green	Yellow green	10.00	10.00
4-13	4	13	-	2010-347	35.33±1.25	Yellow green	Yellow green	23.00	34.44
4-8-1	4	8	1	2010-347	30.86±1.81	Yellow	Yellow	43.00	28.89
4-8-2	4	8	2	2010-347	47.22±1.03	White	White	35.56	37.14
4-8-3	4	8	3	2010-347	37.83±4.14	White	White	80.00	0.00
4-8-4	4	8	4	2010-347	N	N	N	68.33	0.00
4-8-5	4	8	5	2010-347	N	N	N	66.67	23.00
4-8-7	4	8	7	2010-347	41.33±1.89	White	White	60.00	8.00
4-8-8	4	8	8	2010-347	38.50±0.71	White	White	38.75	21.25
4-8-9	4	8	9	2010-347	40.50±2.22	White	White	57.50	0.00
5-1	5	1	-	2010-385	27.33±1.41	White	White	92.22	14.00
5-2	5	2	-	2010-385	34.67±1.49	White	White	76.25	* 12.22
5-4	5	4	-	2010-385	38.38±3.43	White	White	66.67	3.64

Table 3 Analysis of pathogenicity and colony morphology in the 71 different isolates from different rice false smut balls Continued

Strain	Spike Number	Smut ball Number	part of the same smut ball	Rice variety	Colony /mm	Pigment	Disease index	
							2011	2012
5-6	5	6	-	2010-385	28.40±1.20	White	81.11	34.00
5-8	5	8	-	2010-385	27.67±1.70	Yellow green	20.00	34.44
5-13	5	13	-	2010-385	N	N	67.50	* 12.00
5-10	5	10	-	2010-385	40.83±9.39	White	56.00	* 12.00
5-11	5	11	-	2010-385	33.33±0.67	Yellow	24.44	12.50
5-12	5	12	-	2010-385	46.33±2.98	White	83.33	0.00
5-14	5	14	-	2010-385	36.50±3.69	White	59.00	18.00
5-15	5	15	-	2010-385	35.63±3.67	Yellow green	51.00	11.82
6-1	6	1	-	2010-352	23.39±2.12	Yellow green	21.43	10.70
6-3	6	3	-	2010-352	35.20±3.66	White	1.67	2.00
6-4	6	4	-	2010-352	44.00±2.31	Yellow green	57.14	10.00
6-5	6	5	-	2010-352	44.90±2.95	White	45.00	28.57
6-6	6	6	-	2010-352	33.83±1.46	White	7.50	0.00
6-7	6	7	-	2010-352	52.00±0.67	Yellow green	0.00	0.00
6-9	6	9	-	2010-352	34.75±1.56	White	28.75	14.55
6-10	6	10	-	2010-352	40.33±3.62	Yellow	8.33	2.00
6-11	6	11	-	2010-352	35.00±1.00	White	48.75	24.35
6-12	6	12	-	2010-352	29.43±1.68	White	7.14	* 15.00
6-13	6	13	-	2010-352	42.00±5.93	White	21.00	* 10.00
Total		71						

N: no data.

*: Number of conidia were less than 5×10^4 per milliliter.

3号病穗共分离得到菌株15个,相似性系数为0.81,以相似带位90%为界,将亲缘关系分为3个簇(图4A)。从不同稻曲球分离的8个稻曲菌被分在2个簇中,第1簇有6个菌,占75.00%。从同一稻穗不同部位分离的7个稻曲菌也被分在2个簇中,其中第1簇有6个,占85.71%。

4号病穗不同稻曲球、同一稻曲球不同部位分离的菌株共16个,相似性系数为0.80,以相似带位

90%为界,将亲缘关系分为3个簇(图4B)。从不同稻曲球分离的8个稻曲菌被分在3个簇中,第1簇有6个菌,占75.00%,;其他两簇各有1个菌;从同一稻曲球不同部位分离的8个稻曲菌被分在1个簇中,带位完全相同。2号病穗以相似带位90%为界,不同稻曲球分离的6个菌株也被分在2个簇中,同一稻曲球分离的8个菌株则被分在3个不同簇群。

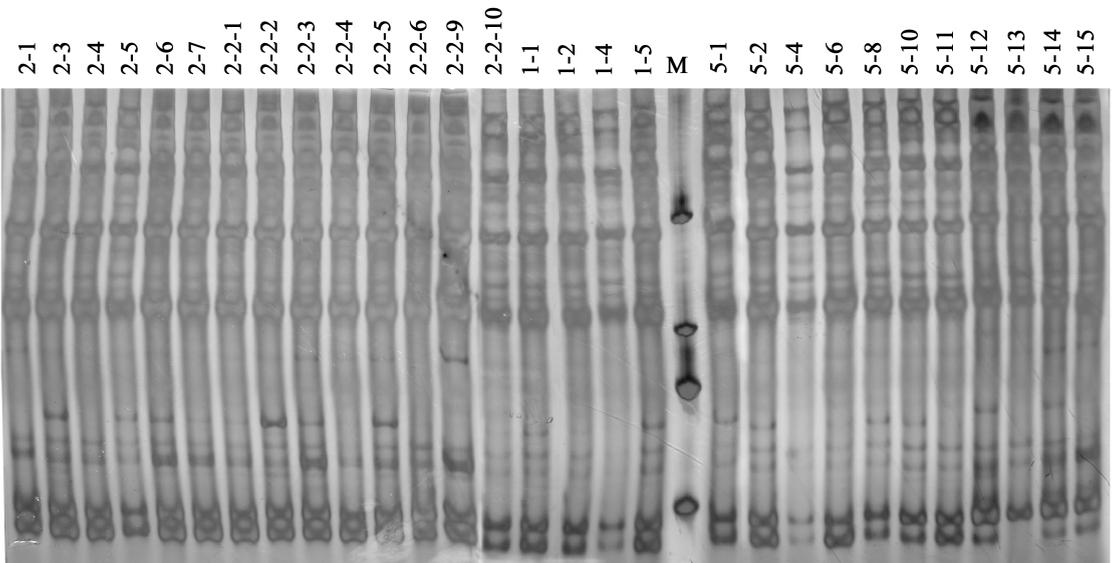
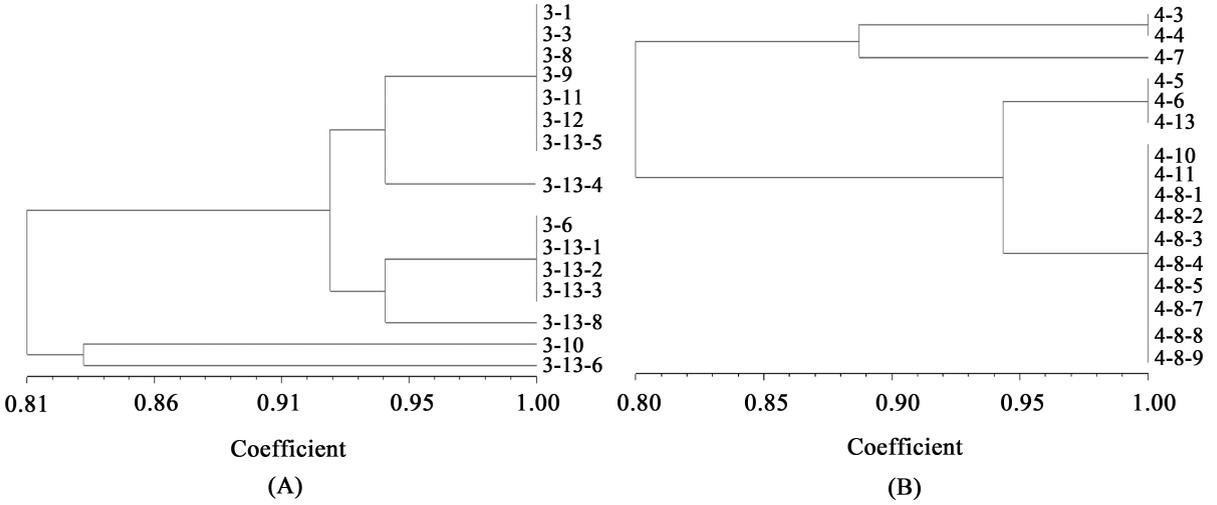


Fig. 4 Dendrogram constructed with UPGMA on the molecular fingerprinting patterns with REP-PCR of some strains of *Ustilaginoidea virens*

A: The strains isolated form the No. 3 disease spikes. B: The strains isolated form the No. 4 disease spikes. C: REP-PCR molecular fingerprinting patterns of the genomic DNA from some strains of *Ustilaginoidea virens*.

综上所述,从同一病穗不同稻曲球分离的稻曲病菌或是从同一稻曲球不同部位分离的稻曲病菌,都可能在谱图分析时分在同一簇群中或不同簇群中。根据指纹图谱簇群分析,在同一簇群中的 3 号病穗分离的 6 个菌株,2012 年接种调查的病情指数范围为 11~87;而 4 号病穗不同稻曲球分离的 8 个菌株,被分在 3 个簇群中,2012 年接种调查的病情指数范围却仅为 6~35,说明分离的稻曲病菌簇群分类与致病力不存一一对应关系。

3 讨论

稻曲病菌的侵染源和侵染过程是明确稻曲病菌侵染为害的研究内容。许多科学家在这方面做了大量的研究工作,认为病原菌能以菌核和厚垣孢子的形式在土壤中越冬,翌年萌发侵染水稻,但目前对稻曲病菌侵染来源的研究仍然缺乏直接证据,各学者对初侵染源也持有不同观点^[4, 26]。本研究对分离的 71 个菌株进行了致病力测定、生物学表型测定和 REP-PCR 分子指纹图谱分析,结果初步证明同一稻穗不同稻曲球、同一个稻曲球都很可能是由不同的侵染源共同侵染形成的,在田间可能存在多个稻曲病菌侵染源共同完成侵染过程。首先,分离菌株的致病力分化显著。稻曲病菌的发生受到接种孢子量、接种时间、气候、土壤肥力等多种因素的影响,然而在同一水稻品种上,同一个稻曲病菌接种的 10 穗稻穗,发病后形成稻曲球数差异不大。由此判断,在接种的孢子量相同的情况下,在一定程度上可以认为稻曲病菌的致病力具有稳定性,致病力差异较大的菌株具有不同的遗传背景。其次,稻曲病菌的生长速率差异和 REP-PCR 的簇群分类都证明稻曲病菌种群复杂,存在遗传分化。另一方面,稻曲球包含大量的厚垣孢子,为病原菌侵染提供了丰富多样的菌源。不同厚垣孢子萌发通过根部共同进入水稻,最终侵染稻粒;或是不同遗传背景的孢子直接随风雨传播至叶鞘或花器,都对造成不同侵染源在同一稻穗不同稻曲球、同一个稻曲球中出现的现象提供了条件^[4, 7]。

已有研究报道,在同一个稻瘟病病斑上,也存在不同类型的稻瘟病菌小种类型,这种现象可能来自于病菌的复杂变异性,或是自然状态下不同遗传背景菌株同时侵染造成^[15, 27],此外稻瘟病菌对接种孢子量也有要求,达到 100 倍显微镜下 20 个孢

子/视野以上,田间稻瘟病菌的致病存在不同致病生理小种之间的协同互作^[28]。水稻白叶枯病菌的母株也是由遗传上有不同程度差异的细胞组成的混合体,与其分离的单细胞系也存在毒力差异^[29]。本研究中每一个稻曲球可以看做是一个定殖系统,同一稻曲球中分离的不同菌株,其致病力强弱和指纹图谱簇群分类有一致性,也有存在差异,进一步说明稻曲球的产生存在由一个或多个背景不同的侵染源侵染形成的可能。不同遗传背景的稻曲病菌侵染同一粒谷粒时,可能也存在协同互作,而表现出更强的致病力,实现田间成功侵染和发病。

本研究结果显示从稻曲病穗分离获得的稻曲单胞病菌存在致病力分化和遗传多样性。根据稻曲病菌致病力与指纹图谱分类,4 号病穗不同稻曲球的分离 8 个稻曲球分离的稻曲病菌的病情指数范围为 6~35,分在 3 个簇群中;而病情指数范围为 11~87 的 3 号病穗分离的 6 个菌株, DNA 指纹图谱也一致,即 REP-PCR 能够把不同致病力的分离菌株聚在同一个簇当中,而具有相似致病力的分离菌株则可能分布于不同的簇当中,说明分离的稻曲病菌簇群分类与致病力有一定的吻合度,但相关性不显著,这与 Li 等^[24]的研究结果一致。

对于本研究选用的 3 个水稻品种,近 90% 的菌株在抗稻曲病品种上表现出弱致病力,在感病品种上表现出强致病力,但超过 10% 的菌株则表现出不符甚至相反的情况,这可能与菌株在水稻内的产孢能力、稻曲菌素分泌量和毒力、菌丝生长速率等都有关系^[30]。因此,明确稻曲病菌的侵染源和侵染过程,深入研究稻曲病的致病力差异,有助于稻曲病抗病品种的选育,也是综合防控的基础性工作。同时,本研究也表明采样地区的稻曲病菌种群较丰富,具有不同的遗传背景,那么长期单一种植某种遗传背景较近的水稻品种,有利于一种病原菌成为地区优势种群。因此在采用传统方法选育抗稻曲病水稻品种时,全面了解当地稻曲病菌的种群多样性,对筛选适合本地的水稻品种具有重要指导意义。

参考文献

- [1] Atia, M M M. Rice false smut (*Ustilaginoidea virens*) in Egypt [J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2004, 111(1): 71-82.

- [2] Abbas H K, Sciumbato G, Keeling B. First report of false smut of corn (*Zea mays*) in the Mississippi delta [J]. Plant Disease, 2002, 86(10): 1179.
- [3] Asahizawa T, Takahashi M, Moriwaki J, et al. Quantification of the rice false smut pathogen *Ustilagoideia virens* from soil in Japan using real-time PCR [J]. Eur. J. Plant Pathol., 2010, 128: 221-232.
- [4] Gao B D, Zhong J. Research advances in infection process of *Ustilagoideia virens* (in Chinese) [J]. Hunan Agricultural Sciences (湖南农业科学), 2011, 3: 93-97.
- [5] Li P X, Evans C D, Wu Y Z, et al. Evolution of the total syntheses of ustiloxin natural products and their analogues [J]. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130(7): 2351-2364.
- [6] Lv S Q, Liu H, Zhao J L, et al. Research progress of ustiloxins (in Chinese) [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin (中国农学通报), 2010, 26(14): 265-268.
- [7] Yang J Y, Zeng X L, Chen S, et al. Research advance on rice false smut (*Ustilagoideia virens*) in China (in Chinese) [J]. Guangdong Agricultural Sciences (广东农业科学), 2011, 2: 77-79.
- [8] Jiang S, Tang C S, Tan Z Q. Advances on studies about false smut of rice (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture (热带农业科学), 2010, 30(3): 62-66.
- [9] Jan L W R, Bart H, Frank J L, et al. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system [J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2000, 50: 665-677.
- [10] Liu J P, Tang T, Zhang S B. Preliminary studies on initial infection sources and pathogen-infecting favorable stage for rice false smut (in Chinese) [J]. Hybrid Rice (杂交水稻), 2009, 24(1): 74-77.
- [11] Dai G H, Zhao J, He R M, et al. Histochemical observation on the resistant and susceptible varieties to *Ustilagoideia virens* (Cooke) Tak and the way of infection of conidia (in Chinese) [J]. Acta phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2005, 35(1): 37-42.
- [12] Huang S W, Yu L Q. Present situation of studies on rice false smut (*Ustilagoideia virens*) in China (in Chinese) [J]. Acta Agriculturae Jiangxi (江西农业科学), 2002, 14(2): 45-51.
- [13] Chen Z Y, Nie Y F, Liu Y F. Identification of rice resistant to rice false smut and the virulence differentiation of *Ustilagoideia virens* in Jangsu province (in Chinese) [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences (江苏农业学报), 2009, (4): 737-741.
- [14] Ashizawa T, Kataoka Y. Detection of *Ustilagoideia virens* in rice [*Oryza sativa*] panicles before and after heading in the field using nested-PCR technique with species specific primers [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 2005, 71(1): 16-19.
- [15] Huang F, Cheng K L, Luo Q M, et al. Pathogenicity variation of rice blast fungus (in Chinese) [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences (西南农业学报), 1999, 12(4): 69-73.
- [16] Chen L, Hu D W, Chen M J, et al. SEM observation of rice false smut balls and colony microstructure of *Ustilagoideia virens* (in Chinese) [J]. Mycosystema (菌物学报), 2007, (1): 89-96.
- [17] Zhang Z, Ye S H, Cai R Y, et al. Infect period and position of the fungus *Ustilagoideia virens* baesd on the structure analysis of rice false smut balls (in Chinese) [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis (浙江农业学报), 2010, 22(2): 207-210.
- [18] Joana G V, Steven J R. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR [J]. Eur. J. Plant Pathol., 2007, 117: 383-392.
- [19] Hahm B K, Maldonado Y, Schreiber E, et al. Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP [J]. J. Microbiol. Methods, 2003, 53(3): 387-399.
- [20] Zhou Y L, Izumitsu K, Sonoda R, et al. PCR-based specific detection of *Ustilagoideia virens* and *Ephelis japonica* [J]. Phytopathology, 2003, 151(9): 513-518.
- [21] Zhang J C, Chen Z Y, Zhang B X, et al. Study on biology of conidia of *Ustilagoideia virens* (in

- Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2004, 34(5): 463-467.
- [22] Tang C S, Sang J Z, Cao G P, *et al*. Research and application of classificatin standard of rice false smut (in Chinese) [J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (湖南农业大学学报), 2000, 26(2): 122-124.
- [23] Li X J, Liu E M, Xiao Q M, *et al*. Rating of rice resistance against *Ustilaginoidea virens* and relationship between resistance and yield loss (in Chinese) [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)* [湖南农业大学学报(自然科学版)], 2011, 37(3): 275-279.
- [24] Li Y, Yin X L, Liu Y F, *et al*. Relativity of biological characteristics and pathogenicity of *Ustilaginoidea virens* (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2012, 42(4): 353-364.
- [25] Cristina R, Jaime C, Paloma M. Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR analysis [J]. *Mycopathologia*, 2009, 168: 11-22.
- [26] Wang H K, Lin F C. Research advances in rice false smut, *Ustilaginoidea virens* (in Chinese) [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis* (浙江农业学报), 2008, 20(5): 385-390.
- [27] Zhou Y J, Cheng Z B, Fan Y J, *et al*. Genetic variation of *Magnaporthe grisea* isolated from signal rice blast lesion (in Chinese) [J]. *Acta Phytophylacica Sincia* (植物保护学报), 2003, 30(4): 337-342.
- [28] Liu Y F, Chen Z Y, Hu M, *et al*. Distribution of *Magnaporthe grisea* populations and virulence of predominant races in Jiangsu Province (in Chinese) [J]. *Chinese J. Rice Sci.* (中国水稻科学), 2004, 18(4): 351-356.
- [29] Zheng W, Liu X H, Cheng G Y, *et al*. The variation of genetic and virulent of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* strains and mono-cell-clones from China, Japan and the Philippines (in Chinese) [J]. *Microbiology* (微生物学报), 2008, 35(12): 1892-1898.
- [30] Li Y, Yu J J, Liu Y F, *et al*. Determination of sporulation and pathogenicity of *Ustilaginoidea virens* (in Chinese) [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2012, 45(20): 4166-4177.

责任编辑:张宗英