

# 人工培养基上稻曲病菌拟菌核诱导的初步研究

刘亦佳, 陈天琪, 吕楚阳, 梁五生, 胡东维\*

(浙江大学生物技术研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310058)

**摘要:** 稻曲病菌在水稻孕穗期侵染水稻小花, 在水稻灌浆后期只在个别稻曲球上形成菌核。因此, 稻曲病菌菌核分化与发育基因功能研究的相关试验难度较高。为了探究稻曲病菌在人工培养基上能否形成菌核, 本文利用低温或杀菌剂环境对稻曲病菌进行了筛选。结果发现, 在 81 个菌株中有 13 个在人工培养基上形成拟菌核组织, 且它们可在低温处理时稳定地产生拟菌核组织。这些拟菌核组织在结构上与菌核类似, 但体积较小且组织较为疏松, 无法像菌核一样越冬和完成有性生殖。

**关键词:** 稻曲病菌; 拟菌核; 低温

**Primary study on induction of the para-sclerotia of *Villosiclava virens* in artificial medium** LIU Yi-jia, CHEN Tian-qi, LÜ Chu-yang, LIANG Wu-sheng, HU Dong-wei\* (State Key Laboratory of Rice Biology, Biotechnology Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** *Villosiclava virens*, the pathogen of rice false smut, attacks rice florets at rice booting stage, and forms sclerotia in few false smut balls at the late stage of rice filling. This makes it difficult to assay the bio-function of the genes related to sclerotial differentiation and development. In this study, the attempt to induce the sclerotia formation in artificial medium was carried out with stress by tricyclazole, a fungicide, and low temperature. Among 81 isolates of the pathogen in the test, the para-sclerotia appeared in 13 isolates. The para-sclerotia were similar to the sclerotia in false smut balls both in morphology and ultra-structure, although they were small in size and loose in structure. However, they could not overwinter and complete the sexual reproduction.

**Key words:** *Villosiclava virens*; para-sclerotia; low temperature

中图分类号: S432.44

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)05-0594-07

稻曲病在全世界的发生呈现不断蔓延和加重的趋势, 已经成为影响水稻生产的主要病害之一<sup>[1-5]</sup>。稻曲病菌侵染稻穗后可产生稻曲球, 其上有大量的厚垣孢子, 其中少部分稻曲球上也有菌核形成。对于稻曲病菌在自然状态下以哪种形式越冬和完成生活史存在争议<sup>[6, 7]</sup>。稻曲球上厚垣孢子数量很多, 但似乎难以在土壤环境中长期存活<sup>[8]</sup>。稻曲病菌的菌核虽然可安全越冬, 并在来年萌发生成大量的子囊孢子, 继而萌发产生分生孢

子<sup>[7, 9-13]</sup>, 但大部分学者认为菌核形成受到环境限制且形成率低, 往往只形成在温带和高海拔地区的少数稻曲球上<sup>[14, 15]</sup>, 在我国南方稻区菌核非常罕见<sup>[16, 17]</sup>。然而也有研究发现, 即使在我国南方稻区, 稻曲球上菌核的数量也非常庞大, 甚至远远超过温带稻区菌核的数量; 且菌核往往形成于水稻成熟后期<sup>[5, 18]</sup>。田间观察和室内试验也表明, 在稻曲病发生中期时, 相对的低温环境可促进菌核的分化形成<sup>[5]</sup>。田间试验也表明减少稻田菌核数量可

收稿日期: 2017-11-23; 修回日期: 2018-01-25; 网络出版时间: 2018-01-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20180126.0953.001.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31671969); 浙江大学新农村发展研究院农业技术推广专项(2017ZDNT014); 国家重大专项(2016YFD0300706); 浙江省三农六方农业科技协作计划项目(CTZB-F160728AWZ-SNY1)

通讯作者: 胡东维, 研究员, 主要从事植物与病原真菌互作研究; Tel: 0571-86971667, E-mail: hudw@zju.edu.cn

第一作者: 刘亦佳, 女, 硕士研究生, 主要从事水稻稻曲病菌研究; E-mail: 11j2012@126.com。

有效降低稻曲病的发生<sup>[20]</sup>。因此,稻曲病菌菌核在稻曲病菌完成生活史上发挥了重要作用<sup>[19, 20]</sup>,研究稻曲病菌菌核形成的分子机制对研究稻曲病的成灾规律具有重要的理论价值。

稻曲病菌核相关试验受到多方面因素的限制。在正常的人工培养条件下,稻曲病菌菌落生长缓慢,可产生分生孢子和厚垣孢子,但不产生菌核;田间自然条件下稻曲病菌在水稻孕穗期侵染水稻花器,并在水稻灌浆期间形成稻曲球<sup>[19, 21, 22]</sup>。但菌核组织在稻曲球上所占的比例比较小;受水稻生长周期的限制,稻曲病菌核相关试验往往周期特别长,同时还受接种效率和菌核诱导效率的制约<sup>[5]</sup>。因此,稻曲病菌菌核诱导试验难度大、周期长,且人工接种与菌核诱导效率均存在很大的不确定性。故而探索人工培养基上菌核的诱导,不仅在一定程度上可大幅度缩短试验进程,而且能够排除取样时来自寄主组织的一些干扰。为此,本研究利用低温处理和杀菌剂处理对稻曲病菌菌核的形成进行了初步的诱导试验。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 稻曲病菌菌株的分离

供试菌核 2015 年采自浙江象山县咸祥镇稻田,充分干燥后 4℃ 保存。稻曲病菌核经充分水洗后,依次用 0.1% 升汞、75% 酒精各消毒 1 min,然后用无菌水冲洗数次,用无菌刀片将菌核切成约 5 mm 长的小块,贴于 PSA 平板上,28℃ 黑暗条件下培养。为了排除培养皿中杂菌污染,待菌核边缘有白色菌丝长出时,挑取白色菌丝块转到 PSA 培养基继续培养。所有分离的菌株经 rDNA-ITS 和 rDNA-IGS 测序确认后,用做供试菌株。

### 1.2 病原菌的 rDNA-ITS 和 rDNA-IGS 序列分析

将分离得到的稻曲病菌菌株活化后转接到 PS 培养基中,在 28℃、160 rpm 黑暗条件下振荡培养 7 d 后;经双层纱布过滤收集菌丝体;蒸馏水洗涤 3 次后置于研钵中,加入液氮研磨,然后按照相关试剂盒说明用植物 DNA 提取试剂盒(Omega Bio-tec 公司)提取 DNA。经检测合格的 DNA 用于稻曲病菌的 PCR 鉴定。稻曲病菌 rDNA-ITS 的 PCR 扩增引物为通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTC-

GTAACAAGG-3'); rDNA-IGS 的扩增采用引物 UIGS III (5'-GGCGAAGTTGGCGGTAAGA-3') 和 UIGS IV (5'-CCACCATTTCGTATCTAAGTCGG-3')<sup>[23]</sup>。扩增后的片段直接由上海铂尚生物技术有限公司进行双向测序,每个菌株重复测序 3 次。所获得的 ITS 和 IGS 重复区序列利用 Blast 软件 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对分析。

### 1.3 稻曲病菌的低温处理

将稻曲病菌转接到直径为 9 cm 的 PSA 培养基平板中,28℃ 黑暗培养 21 d 后,转移至 4℃ 黑暗条件下继续培养,期间观察菌落形态变化。

### 1.4 稻曲病菌的杀菌剂处理

供试的三环唑原药为苏州市奥特莱化工有限公司产品。首先以丙酮作为溶剂配制成浓度为 10<sup>5</sup> mg · L<sup>-1</sup> 的母液,然后用无菌水分别稀释成 2 × 10<sup>4</sup> mg · L<sup>-1</sup>、10<sup>4</sup> mg · L<sup>-1</sup> 和 5 × 10<sup>3</sup> mg · L<sup>-1</sup> 3 个浓度梯度的杀菌剂。将 PSA 培养基融化,待冷却到室温后,每 100 mL PSA 中加入 1 mL 不同浓度梯度的药剂,即可得到三环唑浓度分别为 200、100 和 50 mg · L<sup>-1</sup> 的 PSA 平板。

稻曲病菌在 28℃ 黑暗条件下在不加杀菌剂的 PSA 培养基中培养 20 d 后,用直径为 5 mm 的打孔器在培养菌落的最边缘打孔,转接到不同浓度梯度的带药 PSA 平板中,于 28℃ 黑暗条件下培养。以不加农药的培养基作为对照。期间观察并记录菌落的生长情况。

### 1.5 拟菌核的萌发试验

在 450 mL 的塑料盆中装入 2~3 cm 厚的河沙,加水至刚好没过沙面。在其表面放置数个拟菌核,盖上盖子,放置到光照恒温培养箱中培养;培养温度为 26℃,光周期为 12 h,光照强度为 13 400 lux。

### 1.6 扫描电子显微镜制样与观察

用刀片切取 PSA 平板上的拟菌核结构,在 4% 的戊二醛中 4℃ 保存固定过夜。将固定好的样品用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 漂洗 3 次,每次 15 min;然后用 1% 的锇酸在室温下固定 2 h。用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 漂洗 3 次,每次 15 min,依次用浓度为 30%、50%、70%、

80%、90%、95%的乙醇溶液进行脱水处理,每步15 min,再用100%的乙醇处理2次,每次20 min。然后将样品进行二氧化碳临界点干燥,喷金镀膜处理后,利用日本日立 TM-1000 型扫描电镜观察、分析和拍照。

### 1.7 透射电子显微镜制样与观察

用刀片切取 PSA 平板上的拟菌核结构,大小约2 mm×2 mm×3 mm,小心地将其在4%的戊二醛中4℃保存固定过夜。将固定好的样品用0.1 mol·L<sup>-1</sup>的磷酸缓冲液(pH 7.0)漂洗3次,每次15 min;然后用1%锇酸在室温下固定2 h。用0.1 mol·L<sup>-1</sup>的磷酸缓冲液(pH 7.0)漂洗3次,每次15 min,依次用浓度为30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇溶液对样品进行脱水处理,每步20 min;之后用100%的丙酮处理20 min;然后 Spurr 树脂渗透和包埋,70℃聚合16 h。Reichert-Jung 切片超薄片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后,最终在 Hitachi H-7650 透射电镜下进行超微结构分析和拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 正常培养条件下稻曲病菌的惰性菌株

在以往研究中,我们发现绝大部分稻曲病菌的

菌株在 PSA 培养基上培养14 d 菌落直径可达约4 cm,同时可检测到分生孢子的形成;培养约30 d 时菌落直径6~8 cm,菌落开始变黄,肉眼可见菌落靠近外围处出现黄色直径约1~2 mm 大小突起的厚垣孢子堆;此后生长速度变得非常缓慢。在 PS 液体培养基上,稻曲病菌的菌落呈现白色球状,培养7 d 直径达到3~5 mm,此后生长缓慢并开始大量产生分生孢子;稻曲病菌在液体培养基中一般不产生厚垣孢子。

我们还发现有极个别的菌株生长明显缓慢,并且在 PSA 培养基上5~7 d 后菌落生长停滞,整个菌落或菌落边缘的菌丝出现黑色素的积累(图1-A、B),光镜检测发现有少量厚垣孢子产生(图1-C),且部分菌丝细胞变粗变短,其表面有类似于稻曲球孢子梗上的疣状突起形成(图1-D)。将其转到液体培养基上,菌丝球生长缓慢并呈现黑色(图1-E、F),菌丝细胞形态上与固体培养基类似(图1-G)。同时,我们发现这种菌株的产孢能力较弱,液体培养基中培养7 d 后孢子浓度约为 $3 \times 10^5$ 个·mL<sup>-1</sup>,而一般菌株可达 $50 \sim 200 \times 10^5$ 个·mL<sup>-1</sup>。对上述所有菌株的 rDNA-IGS 进行 PCR 扩增和测序,发现以上菌株均为稻曲病菌,其 rDNA-IGS 序列均为常见类型,长度388 bp(图2)。据此推断,这些菌株是一类特殊的、易休眠的稻曲病菌菌株。

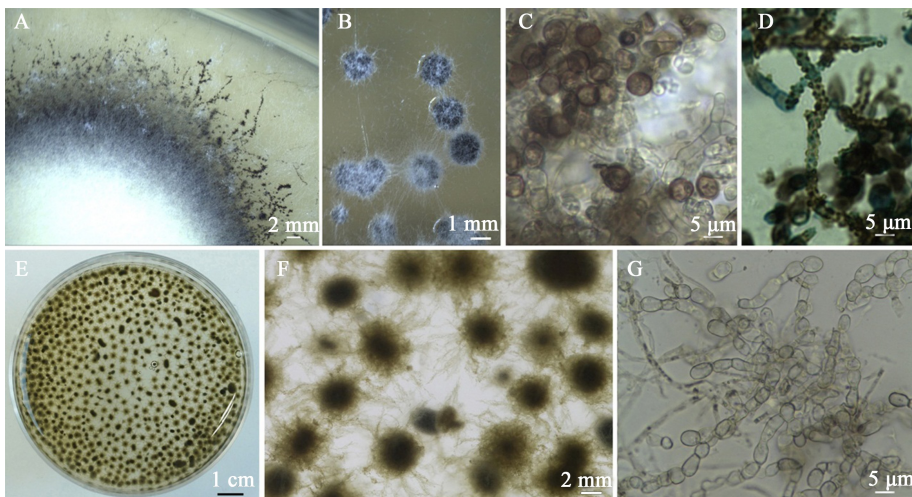


Fig. 1 Morphological features of *Villosiclava virens* dominant isolate

A & B: The colonies of dormant isolate on PSA for 20 days; C: At the edge of the colonies, the hyphae were black and some chlamydospores appeared; D: Great amount of verrucous depositions appeared on the hyphae in the center of colonies like in the mature false smut balls; E&F: The colonies of dormant isolate in PS for 7 days; G: The amplified hyphae.

## 2.2 杀菌剂对稻曲病菌菌核形成的影响

为了测试不同稻曲病菌菌株对杀菌剂的敏感性,检测了 81 个新分离的稻曲病菌菌株。结果发现,在培养基中添加不同浓度的三环唑后,所有菌株的生长均受到明显抑制。其中 13 个菌株(图 3-B)的生长速率明显低于其他 68 个菌株(图 3-A);在 200 ppm 浓度下,这些菌株的菌丝伸长几乎完全被抑制;培养皿中部老的菌丝变成黑色。在 50 ppm 浓度下,这些菌株可缓慢生长,但菌落菌丝往往很快变成黑色,并出现疑似菌核的团块。说明这

13 个菌株对该杀菌剂表现更加敏感。

以上 B 组菌株在 PSA 固体培养基和 PS 液体培养基中正常条件下培养时,这些菌株的老菌丝中往往很快就出现了黄色色素和黑色素的积累。PSA 平板上培养 50 d 时,菌落内部老菌丝颜色变成深黑色(图 4-A、B)。在 PS 培养基上培养 5~7 d 菌丝球开始逐渐变黑,生长变得缓慢(图 4-C);10 d 时检测发现只有极少的分生孢子产生。说明这些菌株不论在什么环境下都表现早衰或休眠,在杀菌剂处理时表现更明显而已。

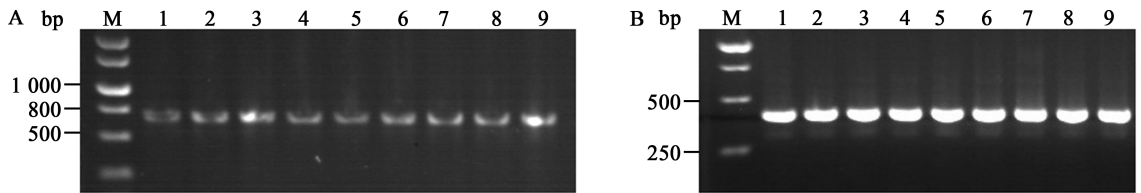


Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR products of rDNA-ITS and rDNA-IGS of *Villosiclava vires* isolates

M: Marker; 1-9: Different isolates; A, B: The rDNA-ITS and rDNA-IGS, respectively.

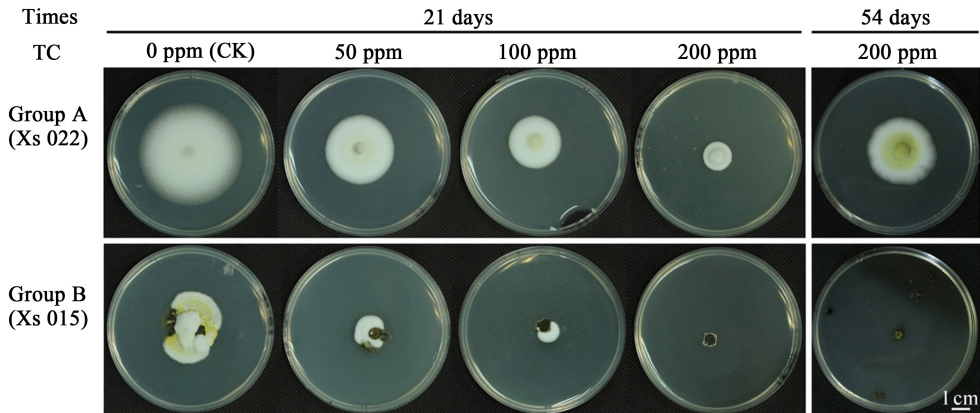


Fig. 3 The morphology of *Villosiclava vires* isolates in tricyclazole-containing PSA

TC: Tricyclazole concentration. The isolates in group B were more susceptible to tricyclazole.

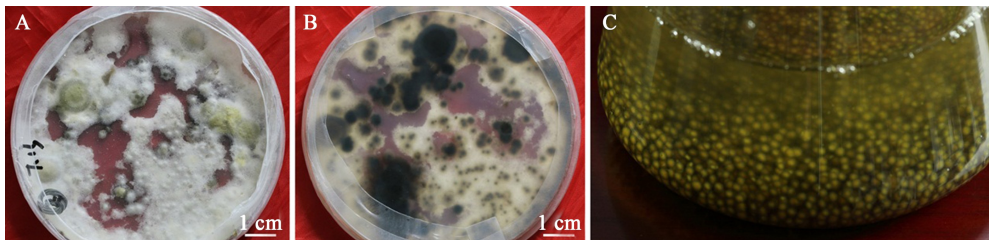


Fig. 4 The morphology of *Villosiclava vires* isolates in group B in PSA and PS

A, B: The colonies on PSA for 50 days; C: The colonies on PS for 10 days.

将以上 B 组菌株在 PSA 固体培养基形成的拟菌核组织进行再次涂板培养,与正常转接一样,PSA 平板上很快长出菌丝,但同样表现出较早的衰老并出现新的拟菌核。而 A 组的常见菌株则只有黄色色素积累和少量黑色色素积累,没有明显的拟菌核出现。

### 2.3 低温对稻曲病菌菌核形成的影响

将上述两组菌株正常条件下培养 20 d 后再转置到 4℃ 的低温环境中继续培养。结果发现, A 组的菌株不产生拟菌核组织;而 B 组对三环唑敏感的菌株在菌落中陆续出现大量的黑色颗粒状拟菌核组织(图 5-A、B)。说明不同稻曲病菌菌株在低温诱导下产生拟菌核组织的能力明显不同, B 组菌株对低温和杀菌剂都相对敏感,在不利环境中似乎更容易产生拟菌核。

### 2.4 拟菌核的组织结构

通过半薄切片和扫描电子显微镜观察拟菌核的组织结构,均可见黑色拟菌核的菌丝交织十分紧密,部分菌丝细胞短,直径粗,且隔膜处收缩明显

(图 6-A、B),与正常菌核表面(图 6-C)非常相似。进一步的透射电子显微镜观察发现,拟菌核外部的菌丝细胞紧密排列,细胞直径介于 7~11 μm 之间;细胞壁增厚至 0.5~1 μm;这些菌丝细胞内含物少,细胞器数量较少(图 7-A)。说明这些菌丝细胞老化。在拟菌核中,除老化的菌丝细胞外,在拟菌核中部存在一些代谢比较活跃的菌丝细胞。这些菌丝细胞排列较为疏松且内含物多,细胞直径为 2~3 μm;菌丝细胞壁较薄,为 0.1~0.2 μm。在这些拟菌核中常常有类似成熟稻曲球中的结晶体形成(图 7-B)。说明拟菌核结构上与菌核类似,但菌丝排列却没有菌核那么致密。

### 2.5 拟菌核越冬能力研究

将低温培养 107 d 的拟菌核晾干,4℃ 冰箱放置 15 d 后,进行沙培萌发试验。整个试验 100 多个拟菌核均没有发现类似菌核的萌发过程,即不产生黄色的菌丝和子实体。放置 20 d 后检测发现,拟菌核腐烂解体。其原因可能是拟菌核体积小,组织结构疏松,难以抵御环境微生物的降解。

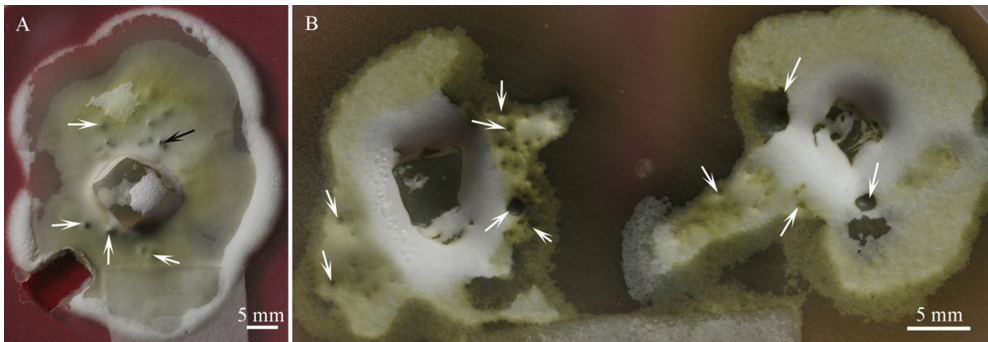


Fig. 5 The para-sclerotia (arrowed) in group B isolates induced by low temperature for 30 days

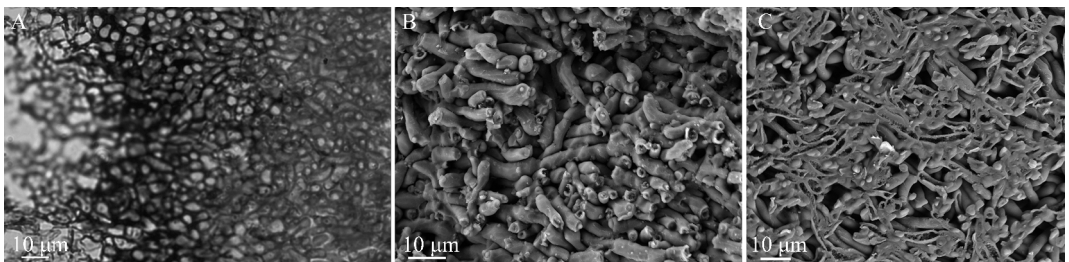


Fig. 6 Light microscopic and SEM photographs of para-sclerotia in group B isolates

A, B: The light microscopic and scanning electron microscopic photographs of the para-sclerotia;  
C: The scanning electron microscopic photograph of the nature sclerotia in rice false smut.

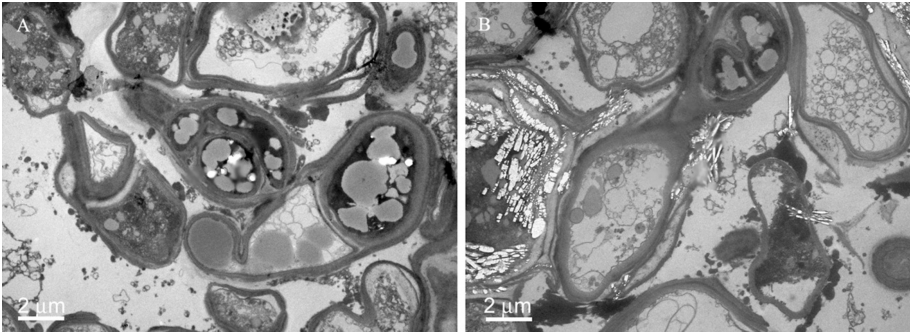


Fig. 7 Ultra-structure of the para-sclerotia induced by low temperature

### 3 讨论

形成菌核是许多真菌渡过不良环境和完成生活史的手段,这些不良环境因素也是菌核分化形成的基本条件<sup>[24]</sup>。很多产菌核的真菌在人工培养基上很容易形成菌核,有些真菌则只在寄主上才能形成。而稻曲病菌即使在寄主上,往往也只有少数稻曲球上可产生菌核<sup>[13-15, 25, 26]</sup>。事实上, Jin 等<sup>[18]</sup>早在 1987 年就发现,即使在亚热带地区稻曲病菌也可产生大量菌核,只不过产生于稻曲病发生的后期,因而只有在水稻收获前期调查才能发现;日本学者也得出了类似的结论<sup>[26]</sup>。最近我们的一系列研究均表明,稻曲病菌的菌核在稻曲病流行过程中发挥了重要作用<sup>[5, 20, 27]</sup>。因此研究菌核形成基因的功能具有重要的理论和应用价值。在查阅对比多年的气象资料与稻曲病菌发生严重程度及菌核数量后,我们设计了水稻上稻曲病菌的菌核人工诱导,发现低温确实是水稻植株上稻曲病菌菌核形成的重要条件<sup>[5]</sup>。2015 年水稻灌浆期浙江气温较常年严重偏低,稻曲病菌菌核大比例形成,也佐证了这一观点。本文利用从菌核分离得到的稻曲病菌菌株,发现部分菌株甚至可以在人工培养基上形成拟菌核,这为研究稻曲病菌菌核形成提供了新的方法。如何优化稻曲病菌菌核形成的条件,并且利用转录组学方法对比人工培养基上菌核与天然条件下菌核代谢的一致性,可能是进一步的工作方向。

有关稻曲病菌有性生殖的分子机制研究发现,稻曲病菌属于异宗配合真菌,由一个交配位点控制<sup>[28, 29]</sup>,且稻曲病菌为单倍体菌丝,子囊孢子的产生需要 2 个含不同交配型基因的菌株。因此,理论而言,一个稻曲病菌菌核中可能具有至少 2 个稻曲

病菌株。本文所使用的菌株均从菌核中分离而来,这无法排除可产生拟菌核的菌株本质上不是单一菌株而是具备两种交配型基因的混合菌株的可能性。由此可见,稻曲病菌的侵染与菌核形成机制可能比其他常见植物病原真菌更加复杂,稻曲病菌的田间变异速度也更快。

**致谢:**浙江大学电子显微镜中心徐颖老师和戎念杭老师在电镜分析方面提供帮助。

### 参考文献

- [1] Rush M C, Shahjahan A K M, Jones J P, *et al.* Outbreak of false smut of rice in Louisiana [J]. *Plant Disease*, 2000, 84 (1): 100.
- [2] Yaegashi H, Fujita Y, Sonoda R. Severe outbreak of false smut of rice in 1988 (in Japanese) [J]. *Plant Protection Tokyo*, 1989, 43(6): 311-314.
- [3] Ikegami H. 2016a. Hyphal growth, invasion and pathogenesis of *Ustilaginodea vires* under artificial inoculation (1) (in Japanese) [J]. *Agriculture and Horticulture*, 2016, 91(2): 285-293.
- [4] Ikegami H. 2016b. Hyphal growth, invasion and pathogenesis of *Ustilaginodea vires* under artificial inoculation (2) (in Japanese) [J]. *Agriculture and Horticulture*, 2016, 91(3): 340-343.
- [5] Fan L L, Yong M L, Li D Y, *et al.* Effect of temperature on the development of sclerotia in *Villosiclava vires* [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15 (11): 2550-2555.
- [6] Padwick G W. *Manual of rice diseases* [M]. London: CAB Press, 1950: 88-92.
- [7] Sakurai M. On the causal fungus of rice false smut (in Japanese) [J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1934, 3(1): 70-71.

- [8] Fan R H, Wang Y Q, Liu B, *et al.* Asexualspore formation of *Ustilaginodea virens* in artificial medium and their germination features (in Chinese) [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2010, 29: 188-192.
- [9] Fujita Y, Sonoda R, Yaegashi H. The fruiting body formation in the sclerotia of *Ustilaginodea viren* and the effect by light (in Japanese) [J]. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, 1990, 41: 205.
- [10] Singh R A, Dubey K S. Effect of different treatments on the dormancy of sclerotia of *Claviceps oryzae-sativae* [J]. *Current Science*, 1980, 49(3): 115-116.
- [11] Singh R A, Dubey K S. Sclerotial germination and ascospore formation of *Claviceps oryzae-sativae* in India [J]. *Indian Phytopathology*, 1984, 37: 168-170.
- [12] Yamamoto S, Yoshino J. Storage period of sclerotia of *Ustilaginodea virens* (in Japanese) [J]. *Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society*, 1955, 2: 10.
- [13] Dong K, Fu S Y. Sprouting test on sclerotia of rice false smut (in Chinese) [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University* (沈阳农业大学学报), 1989, (3): 359-362.
- [14] Singh R A, Dube K S. Occurrence of true sclerotia in *Claviceps oryzae-sativae* causal organism of false smut of rice [J]. *Current Science*, 1976, 45(21): 772-773.
- [15] Miao Q M. Studies on the sclerotium of *Ustilaginodea virens* (Cooke) Tak (in Chinese) [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University* (云南农业大学学报), 1994, 9(2): 101-104.
- [16] Li Y G, Kang B J, Zhang B L, *et al.* Primary studies on rice false smut (in Chinese) [J]. *Guangdong Agricultural Sciences* (广东农业科学), 1986, (4): 45-47.
- [17] Liu S F, Chen Z J. Studies on primary infection source and infection route of rice false smut (in Chinese) [J]. *Tianjing Agricultural Sciences* (天津农业科学), 1995, 1(1): 9-11.
- [18] Jin M Z, Li Y. Survey on the sclerotia of *Ustilaginodea virens* in the paddy field (in Chinese) [J]. *Zhejiang Agricultural Sciences* (浙江农业科学), 1987, 5(11): 238-239.
- [19] Fan J, Yang J, Wang Y Q, *et al.* Current understanding on *Villosiclava virens*, a unique flower-infecting fungus causing rice false smut disease [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(9): 1321-1330.
- [20] Li D Y, Deng Q D, Yong M L, *et al.* Screening of biocontrol fungi against sclerotia of *Villosiclava virens* and their mechanisms (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Biological Control* (中国生物防治学报), 2016, 32(2): 258-264.
- [21] Fujita Y, Sonoda R, Yagashi H. Inoculation with conidio spores of false smut fungus to rice panicles at the booting stage [J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1989, 55(5): 629-634.
- [22] Tang Y X, Jin J, Hu D W, *et al.* Elucidation of the infection Process of *Ustilaginodea virens* (Cooke) Tak. (Teleomorph: *Villosiclava virens*) in rice spikelets [J]. *Plant Pathology*, 2013, 62(1): 1-8.
- [23] Wang Y Q, Fan R H, Liu B, *et al.* Preliminary analysis of rDNA-IGS of *Ustilaginodea virens* isolates from different geographical regions in China (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2010, 40(2): 214-216.
- [24] Willetts H J, Bullock S. Developmental biology of sclerotia [J]. *Mycological Research*, 1992, 96(10): 801-816.
- [25] Yan W Z, Wang Y H, Qian J D. Preliminary observation on the sclerotium of *Ustilaginodea virens* (Cooke) Tak (in Chinese) [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University* (云南农业大学学报), 1993, 8(3): 206-207. (short communication).
- [26] Ikegami H. Studies on the False smut of rice. IX. Occurrence and development of sclerotia of the rice false smut fungus [J]. *Research Bulletin of the Faculty of Agriculture, Gifu University*, 1963, (18): 47-53.
- [27] Yong M L, Deng Q D, Fan L L, *et al.* The role of *Ustilaginodea virens* sclerotia in increasing incidence of rice false smut disease in the subtropical zone in China [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2018, 150(3): 669-677.
- [28] Yu J J, Sun W X, Yu M N, *et al.* Characterization of mating-type loci in rice false smut fungus *Villosiclava virens* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(9), pii: fnv014.
- [29] Yu J J, Yu M N, Nie Y F, *et al.* Comparative transcriptome analysis of fruiting body and sporulating mycelia of *Villosiclava virens*, reveals genes with putative functions in sexual reproduction [J]. *Current Genetics*, 2016, 62(3): 575-584.