

江苏省水稻赤霉病病原菌分离鉴定与致病力分析



陈祥祥¹ 吴季荣² 武德亮² 徐剑宏^{1,2} 史建荣^{1,2*} 董飞^{2*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 农业农村部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室, 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室, 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 南京 210014)

摘要: 为明确江苏省水稻赤霉病的病原菌组成及致病特征, 于2018—2019年从江苏省13个市41个县区采集341份水稻样品, 采用组织分离法对病原菌进行分离纯化, 基于翻译延伸因子(translation elongation factor-1 α , TEF-1 α)序列分析对分离菌株进行鉴定, 通过 *TRII* 基因序列鉴定及产毒力测定对其产毒化学型进行分析, 并按照柯赫氏法则对其致病力进行验证。结果显示, 从水稻样品中共分离获得病原菌392株, 其中亚洲镰刀菌 *Fusarium asiaticum* 为385株, 禾谷镰刀菌 *F. graminearum* 为7株。亚洲镰刀菌分为3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyldeoxynivalenol, 3ADON)化学型和雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)化学型菌株, 分别占亚洲镰刀菌总菌株数的66.8%和33.2%; 禾谷镰刀菌均为(15-acetyldeoxynivalenol, 15ADON)化学型。产3ADON的亚洲镰刀菌在全省范围内为优势群体, 而产15ADON的禾谷镰刀菌仅在淮北地区被发现; 产NIV的亚洲镰刀菌对水稻的致病性要显著高于产3ADON的亚洲镰刀菌。不同产毒化学型亚洲镰刀菌对水稻均有一定致病性, 但NIV化学型亚洲镰刀菌对水稻的致病力最强。

关键词: 水稻; 赤霉病; 禾谷镰刀菌; 亚洲镰刀菌; 产毒化学型; 致病性

Identification and pathogenicity test of *Fusarium* isolates causing *Fusarium* head blight in rice in Jiangsu Province

Chen Xiangxiang¹ Wu Jirong² Wu Deliang² Xu Jianhong^{1,2} Shi Jianrong^{1,2*} Dong Fei^{2*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China;
2. Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety; Key Laboratory for Agro-Product Safety Risk Evaluation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory for Control Technology and Standard for Agro-Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs;
Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences,
Nanjing 210014, Jiangsu Province, China)

Abstract: To clarify the composition and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from *Fusarium* head blight of rice, 341 rice samples were collected from 41 counties of 13 cities in 2018 and 2019 in Jiangsu Province. *Fusarium* isolates were identified with molecular method based on the translation elongation factor 1 α (TEF-1 α) gene sequence. According to *TRII* gene sequences and *in-vitro* toxin production, the chemotype of *F. graminearum* species complex was determined. Then, to complete Koch's postulate, the *F. asiaticum* isolates in different chemotypes were tested for pathogenicity. The results showed that a total of 392 isolates were obtained from rice samples, including *F. asiaticum* ($n=385$) and

基金项目: 国家重点研发计划战略性国际科技创新合作重点专项(2018YFE0206000), 国家自然科学基金(32001859), 江苏省农业科技自主创新项目(CX(21)1005, CX(22)3072)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: jianrong63@126.com, feidong1985@126.com

收稿日期: 2021-03-12

F. graminearum ($n=7$). Of them, 66.8% of *F. asiaticum* isolates were the 3-acetyldeoxynivalenol (3ADON) chemotype and the remainders were the nivalenol (NIV) chemotype. In addition, all the *F. graminearum* isolates were the 15-acetyldeoxynivalenol (15ADON) chemotype. Moreover, *F. asiaticum* with 3ADON chemotype was dominant in Jiangsu Province, while 15ADON chemotype of *F. graminearum* strains could only be found in the northern Jiangsu. The results of pathogenicity test showed that *F. asiaticum* isolates in the NIV chemotype were more virulent to rice than *F. asiaticum* isolates in 3ADON chemotype. Generally, *F. asiaticum* isolates in NIV chemotype had the strongest pathogenicity against rice, but variation existed within chemotypes of *F. asiaticum*.

Key words: rice; *Fusarium* head blight; *Fusarium graminearum*; *Fusarium asiaticum*; chemotype; pathogenicity

水稻是我国最为重要的粮食作物之一,水稻种植面积约占全国粮食作物种植面积的30%,产量约占粮食总产量的50%,全国超过65%的人口以此为主食(Sun et al., 2017)。江苏省位于长江中下游地区,粮食种植制度以水稻和小麦轮作为主,是我国第四大水稻主产区,年种植面积约为229万 hm^2 ,产量约为1 900万t(Dong et al., 2020a)。近年来,随着气候的变化和耕作制度的改变,江苏省已成为我国赤霉病发生最严重的地区之一(史建荣等, 2016)。

由禾谷镰刀菌复合种(*Fusarium graminearum* species complex, FGSC)感染小麦和大麦等作物引起的赤霉病是一种极具破坏性的真菌病害。该病害不仅造成作物产量和品质的降低,而且还可以产生以单端孢霉烯族化合物为主的多种镰刀菌毒素,严重威胁人畜健康,影响粮食产业的健康发展(史建荣等, 2016)。FGSC至少包含16个种(O'Donnell et al., 2008; Yli-Mattila et al., 2009),在我国南方麦区主要以亚洲镰刀菌*F. asiaticum*为主,在黄淮以北麦区主要以禾谷镰刀菌*F. graminearum*为主(Zhang et al., 2012; Yang et al., 2018; Qiu et al., 2019)。FGSC可产生以雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)、3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyldeoxynivalenol, 3ADON)及15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyldeoxynivalenol, 15ADON)等为主的3种典型产毒化学型(Miller et al., 1991; Ward et al., 2002; 马玉彤等, 2019)。我国江淮麦区分布的亚洲镰刀菌主要产3ADON,在黄淮海以北麦区分布的禾谷镰刀菌主要产15ADON,而在西南麦区分布的亚洲镰刀菌则主要产NIV和15ADON(Wang et al., 2010; Zhang et al., 2007; 2012; Liu et al., 2017)。

目前,国内对赤霉病病原菌的研究主要集中在小麦和大麦等作物上(Zhang et al., 2010; Jia et al., 2018),但关于引起水稻赤霉病病原菌的报道相对较

少。近年来,受扬花期高温高湿天气的影响,水稻赤霉病在江苏省普遍发生,发病面积不断扩大,危害程度逐年加重(Dong et al., 2020a, b)。为进一步明确江苏省水稻赤霉病病原菌的组成,本研究于2018—2019年分别从江苏省13个市41个县采集341份水稻样品,对病原菌进行分离纯化和分子生物学鉴定,并测定其产毒化学型和致病力,旨在明确江苏省水稻赤霉病致病镰刀菌种群的结构组成,以期为该地区水稻赤霉病的发生、流行规律调查及防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品和植物:2018—2019年分别自江苏省淮北(徐州、宿迁和连云港3市)、苏中(淮安、盐城、泰州、扬州和南通5市)和苏南(镇江、南京、常州、无锡和苏州5市)共41个县的水稻主产区采集341份水稻籽粒样品,将样品用纸袋分装后带回实验室备用。南粳9108是江苏省主导粳稻品种之一,由江苏省农业科学院粮食作物研究所提供,于6月25日种植,在江苏省农业科学院温室内自然条件下培育,于抽穗扬花期供试。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基成分为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15 g、去离子水1 L;羧甲基纤维素钠液体培养基成分为羧甲基纤维素钠15 g、硝酸铵1 g、磷酸二氢钾1 g、七水硫酸镁0.5 g、酵母提取物1 g、去离子水1 L;大米培养基成分为大米20 g、去离子水6 mL;以上培养基均于121℃高压灭菌60 min供试。

试剂及仪器:纯度 $\geq 99\%$ 的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、3ADON、15ADON、NIV及镰刀菌烯醇(fusarenon X, FUX)标准品, Romer国际贸易(北京)有限公司;DNA专用抽提试剂盒、

DNA 胶回收试剂盒和 DNA Marker, 生工生物工程(上海)股份有限公司; dNTP、*Taq* 酶、10×Buffer, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。SensoQuest Labcycler PCR 仪、Gel Dos 2000 凝胶成像系统, 美国伯乐公司; DNP-9162BS-III 恒温培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; CX21FS1 显微镜, 日本 Olympus 公司; DYY-8C 双稳定时电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 20ADXR 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; Qtrap 6500 质谱仪, 美国 AB SCIEX 公司; 5810R 离心机, 德国 Eppendorf 公司; N-WVAPTM112 氮吹仪, 美国 Organomation 公司。

1.2 方法

1.2.1 水稻赤霉病原菌的分离纯化

从采集的 314 份水稻样品中分别挑取发病籽粒, 用 75% 酒精处理 30 s, 5% 次氯酸钠处理 2 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 置于 PDA 平板上, 于 25℃、全黑暗条件下培养 5 d, 挑取菌落边缘菌丝转接至新鲜 PDA 平板上于相同条件下培养 5 d, 获得分离菌株。采用单孢分离法对所有分离菌株进行纯化(Dong et al., 2020b), 将纯化菌株转移到 PDA 斜面上, 于 4℃ 保存, 备用。同时, 分别于 30% 甘油中储存菌种, 并于 -80℃ 冰箱保存。

1.2.2 水稻赤霉病原菌的分子鉴定

为明确水稻赤霉病原菌的种群特征, 将单孢菌株纯化后分别接种到 PDA 平板上在 25℃、黑暗条件下活化 3 d 后, 切取 6 mm×6 mm 菌块将其接种至铺有灭菌玻璃纸的 PDA 平板上, 于 25℃ 黑暗培养 7 d 后, 将菌丝刮下置于灭菌研钵中加液氮研磨, 采用 DNA 专用抽提试剂盒分别提取所有菌株的 DNA, 于 -20℃ 保存备用。利用翻译延伸因子(translation elongation factor-1 α , *TEF-1 α*)基因序列对分离菌株进行鉴定, 所用引物序列为 EF1(5'-ATGGGTA-AGGARGACAAGAC-3')/EF2(5'-GGARGTACCA-GTSATCATGTT-3'), 所有引物均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。30 μ L 反应体系: 10×Buffer 3 μ L、10 mmol/L dNTP 2 μ L、正反向引物各 3 μ L、DNA 模板 50 ng、*Taq* 酶 0.2 μ L, 加双蒸水补足至 30 μ L。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 再延伸 10 min, 10℃ 保存。以无菌水作阴性对照, 采用相同反应体系进行扩增。利用 DNA 胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行回收纯化后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。从 GenBank

中下载亚洲镰刀菌和禾谷镰刀菌标准参考菌株的 *TEF-1 α* 序列(登录号分别为 KM062023.1 和 LT548510.1), 与本研究分离的病原菌测序序列进行 BLAST 同源性检索。基于培养性状对 1.2.1 分离菌株进行分类, 从每类中分别随机挑选 7 株菌株, 利用 MEGA 7.0 软件采用最大似然法构建系统发育树, 进行 1 000 次自检(Tamura et al., 2013)。

1.2.3 水稻赤霉病原菌的产毒化学型分析

为明确水稻赤霉病原菌的产毒化学型特征, 利用镰刀菌基因组内与毒素合成密切相关的 *TRI11* 基因信息设计 1 组多重 PCR 引物进行病原菌的产毒化学型分析(Wang et al., 2012), 公共引物为 Tri11-CON(5'-GACTGCTCATGGAGACGCTG-3'), 3 个产毒化学型特异性引物分别为 Tri11-3ADON(5'-TCC-TCATGCTCGGTGGACTCG-3')、Tri11-15ADON(5'-TGGTCCAGTTGTCCGTATT-3') 和 Tri11-NIV(5'-GTAGGTTCCATTGCTTGTTTC-3')。25 μ L 反应体系: 10×Buffer 2.5 μ L、10 mmol/L dNTP 2 μ L、正反向引物各 1.5 μ L、DNA 模板 50 ng、*Taq* 酶 0.2 μ L, 双蒸水补足至 25 μ L。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 再延伸 10 min, 10℃ 保存。以无菌水作阴性对照, 采用相同反应体系进行扩增。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段大小为 279 bp 的是 15ADON 化学型菌株, 扩增片段大小为 334 bp 的是 3ADON 化学型菌株, 扩增片段大小为 497 bp 的是 NIV 化学型菌株。

将 1.2.1 分离获得的所有单孢菌株分别接种到 PDA 平板上于 25℃、黑暗条件下活化 3 d 后, 在菌落边缘切取 5 块 6 mm×6 mm 菌块接种至大米培养基上, 于 25℃、黑暗条件下培养 21 d。采用高效液相色谱串联质谱法对大米培养基样品中 DON、3ADON、15ADON、NIV 和 FUX 的含量进行测定(Dong et al., 2020b)。色谱条件: 色谱柱为 Agilent XDB C₁₈(2.1 mm×150 mm, 3.5 μ m); 流动相 A 为含 5 mmol/L 的醋酸铵水溶液, 流动相 B 为甲醇溶液, 流速为 0.4 mL/min; 进样量为 3 μ L; 柱温为 40℃; 洗脱程序: 0~3 min, 85% 流动相 A; 3~7 min, 30% 流动相 A; 7~13 min, 10% 流动相 A; 13~16 min, 85% 流动相 A。质谱条件: 离子源为电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 扫描模式为正离子多反应监测模式; 气帘气为 30 psi, 碰撞气为氮气; 电喷雾电压为 5.5 kV; 离子源温度为 600℃; 雾化气为 55 psi; 辅助气为 60 psi; 碰撞室射出电压为 10 V。参照质谱数

据库对5种真菌毒素进行鉴定。同时,按照不同标准溶液浓度分别移取不同体积的5种真菌毒素标准溶液,配制成混合标准储液,以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算样品中5种真菌毒素的含量。

1.2.4 水稻赤霉病原菌的致病性测定

为明确水稻赤霉病原菌的致病性特征,于2020年9月初在温室内进行致病性测定,试验采用喷雾接种方式。温室面积为80 m²,自然光照,种植品种为南粳9108。将1.2.3鉴定出的不同产毒化学型的优势菌株各选10株,分别在PDA平板上于25℃、黑暗条件下培养7 d,切取6 mm×6 mm的菌块,接种至羧甲基纤维素钠液体培养基中,于25℃下振荡培养5 d,分别制成1×10⁵个/mL的孢子悬浮液。待水稻生长至扬花中期时,分别将2 mL病原菌的孢子悬浮液均匀喷雾接种至10株稻穗,塑料袋套袋保湿72 h后,去除塑料袋。以喷雾接种无菌水处理为对照,每个处理重复3次。接种7、10、14和21 d后观察病害发生情况,待稻穗发病后再次分离病原菌,将分离物与原接种菌株进行比较,观察培育性状是否一致。采用病情发展曲线下面积(area under the disease progress curve, AUDPC)来评估病害发生情况

(Nicolli et al., 2018)。 $AUDPC = \sum_{i=1}^{n_i-1} \frac{(X_{i+1} + X_i)/2}{t_{i+1} - t_i}$,

其中 n_i 代表病害调查次数, X_i 和 X_{i+1} 分别表示第 i 次和第 $i+1$ 次调查时的病害百分数, t_i 和 t_{i+1} 分别表示第 i 次和第 $i+1$ 次调查时的时间(以距离接种后的天数表示)。

1.3 数据分析

利用Excel 2016和SPSS 16.0软件进行数据统计分析,采用Welch T检验法进行差异显著性检验。

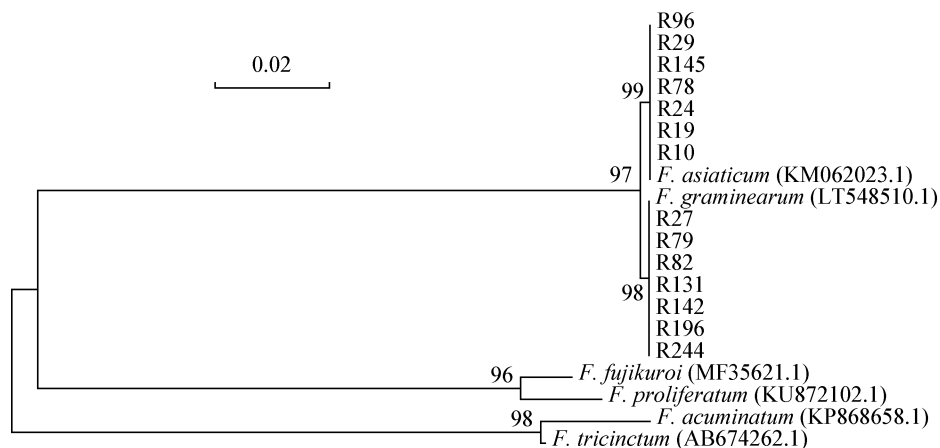


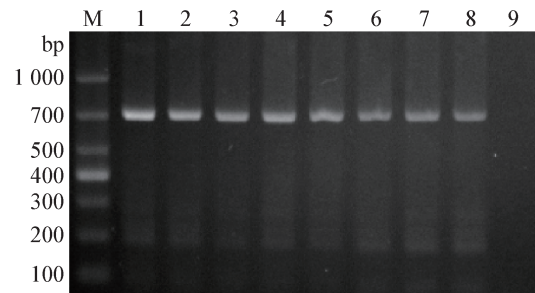
图2 基于 $TEF1-\alpha$ 序列采用最大似然法构建14株代表菌株及其近似种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of 14 *Fusarium* isolates and other related strains based on $TEF1-\alpha$ sequences by maximum likelihood method

2 结果与分析

2.1 水稻赤霉病原菌的分离及鉴定

2018年和2019年采集的水稻样品经分离纯化分别获得167株和225株镰刀菌,共392株。经过引物EF1/EF2扩增后,所有镰刀菌菌株均能扩增出单一、清晰、明亮的条带,长度在700 bp左右,而无菌水对照未能扩增出条带(图1)。对所有镰刀菌进行 $TEF1-\alpha$ 序列分析,并经过BLAST比对鉴定,同源性均在98%以上,所得结果与PCR分析结果一致。



M: DL1000标记; 1~8: 镰刀菌菌株; 9: 阴性对照。

M: DL1000 marker; 1~8: *Fusarium* isolates; 9: negative control.

图1 部分镰刀菌菌株 $TEF1-\alpha$ 序列片段的扩增

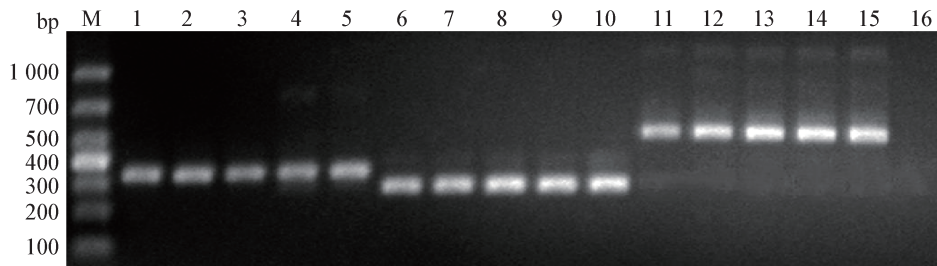
Fig. 1 Amplification of $TEF1-\alpha$ gene fragments of some *Fusarium* isolates

基于培养性状将分离菌株共分为2类,一类包含385株菌株,一类包含7株菌株,从中分别随机挑选7株共14株菌株构建系统发育树,发现菌株R10、R19、R24、R29、R78、R96和R145与亚洲镰刀菌(登录号KM062023.1)聚为一簇,将其鉴定为亚洲镰刀菌;菌株R27、R79、R82、R131、R142、R196和R244与禾谷镰刀菌(登录号LT548510.1)聚为一簇,将其鉴定为禾谷镰刀菌(图2),表明江苏省水稻赤霉病原菌主要为亚洲镰刀菌,其次为禾谷镰刀菌。

2.2 水稻赤霉病病原菌的产毒化学型分析

对 392 株病原菌 *TRI11* 基因序列的多重 PCR 扩增结果显示,其中有 260 株扩增出单一的 334 bp 条

带,为 3ADON 化学型;有 7 株扩增出单一的 279 bp 条带,为 15ADON 化学型;有 125 株扩增出单一的 497 bp 条带,为 NIV 化学型(图 3)。



M: DL1000 标记; 1~15: 镰刀菌菌株; 16: 阴性对照。M: DL1000 marker; 1~15: *Fusarium* isolates; 16: negative control.

图 3 基于 *TRI11* 基因序列的 15 株镰刀菌代表菌株产毒化学型 PCR 检测

Fig. 3 Identification of the trichothecene chemotypes of 15 *Fusarium* isolates based on *TRI11* sequences

结合病原菌种群信息分析发现,亚洲镰刀菌以 3ADON 化学型和 NIV 化学型为主,所属菌株数分

别占亚洲镰刀菌总菌株数的 66.8% 和 33.2%; 所有 7 株禾谷镰刀菌均为 15ADON 化学型(表 1)。

表 1 江苏省水稻赤霉病病原菌产毒化学型组成

Table 1 Chemotype composition of *Fusarium* isolates obtained from rice in Jiangsu Province

年份 Year	镰刀菌 <i>Fusarium</i>	产毒化学型 Chemotype		
		3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇 3-acetyldeoxynivalenol	雪腐镰刀菌烯醇 Nivalenol	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 15-acetyldeoxynivalenol
2018	亚洲镰刀菌 <i>F. asiaticum</i>	112	52	0
	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	0	0	3
2019	亚洲镰刀菌 <i>F. asiaticum</i>	148	73	0
	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	0	0	4

采用高效液相色谱串联质谱法对 392 株病原菌接种的大米培养基进行单端孢霉烯族化合物含量测定,其中有 260 株亚洲镰刀菌菌株可以产生 DON、3ADON 及少量 15ADON; 有 125 株亚洲镰刀菌菌株

可以产生 NIV 及 FUX; 而 7 株禾谷镰刀菌菌株仅能产生 DON 和 15ADON, 不能产生 3ADON(表 2), 检测结果与 PCR 扩增结果一致。

表 2 江苏省水稻赤霉病病原菌的体外产毒能力

Table 2 *In-vitro* toxin production by *Fusarium* isolates collected from rice cultures in Jiangsu Province

年份 Year	镰刀菌 <i>Fusarium</i>	产毒化学型 Chemotype	菌株数量 No. of isolates	不同镰刀菌毒素平均含量 Average contents of different mycotoxin/($\mu\text{g/g}$)				
				DON	3ADON	15ADON	NIV	FUX
2018	亚洲镰刀菌 <i>F. asiaticum</i>	3ADON 化学型 3ADON chemotype	112	72.3 $\pm$ 14.5	32.9 $\pm$ 7.5	1.2 $\pm$ 0.6	—	—
		NIV 化学型 NIV chemotype	52	—	—	—	28.7 $\pm$ 6.3	17.3 $\pm$ 4.4
	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	15ADON 化学型 15ADON chemotype	3	41.9 $\pm$ 13.3	—	28.4 $\pm$ 8.3	—	—
2019	亚洲镰刀菌 <i>F. asiaticum</i>	3ADON 化学型 3ADON chemotype	148	81.7 $\pm$ 17.2	37.3 $\pm$ 8.0	1.7 $\pm$ 0.5	—	—
		NIV 化学型 NIV chemotype	73	—	—	—	30.1 $\pm$ 8.2	16.4 $\pm$ 5.1
	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	15ADON 化学型 15ADON chemotype	4	38.7 $\pm$ 10.5	—	26.5 $\pm$ 7.0	—	—

DON: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 3ADON: 3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 15ADON: 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇; NIV: 雪腐镰刀菌烯醇; FUX: 镰刀菌烯醇。表中数据为平均数 $\pm$ 标准误。—: 未检出。DON: Deoxynivalenol; 3ADON: 3-acetyldeoxynivalenol; 15ADON: 15-acetyldeoxynivalenol; NIV: nivalenol; FUX: fusarenon X. Data are mean $\pm$ SE. —: Not detected.

2.3 水稻赤霉病病原菌的分布特征

从水稻赤霉病病原菌的种群分布来看,亚洲镰刀菌分布最为广泛,苏南和苏中地区水稻赤霉病病原菌均为亚洲镰刀菌;禾谷镰刀菌仅在淮北地区有分布;从水稻赤霉病病原菌的产毒化学型分布来看,

在苏南、苏中及淮北地区以3ADON化学型亚洲镰刀菌为优势群体,其次为NIV化学型亚洲镰刀菌,而15ADON化学型禾谷镰刀菌仅在淮北地区有分布(表3)。

表3 江苏省不同区域镰刀菌种群及产毒化学型组成

Table 3 Species and chemotype compositions of *Fusarium* isolates collected from different regions of Jiangsu Province

地区 Region	镰刀菌 <i>Fusarium</i>	2018			2019		
		3ADON 化学型 3ADON chemotype	15ADON 化学型 15ADON chemotype	NIV 化学型 NIV chemotype	3ADON 化学型 3ADON chemotype	15ADON 化学型 15ADON chemotype	NIV 化学型 NIV chemotype
苏南 Southern Jiangsu	亚洲镰刀菌 <i>F. asiaticum</i>	41	0	15	49	0	26
苏中 Middle Jiangsu	亚洲镰刀菌 <i>F. asiaticum</i>	38	0	14	53	0	22
淮北 Northern Jiangsu	亚洲镰刀菌 <i>F. asiaticum</i>	39	0	17	46	0	25
	禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	0	3	0	0	4	0

3ADON: 3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 15ADON: 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇; NIV: 雪腐镰刀菌烯醇。3ADON: 3-acetyldeoxynivalenol; 15ADON: 15-acetyldeoxynivalenol; NIV: nivalenol.

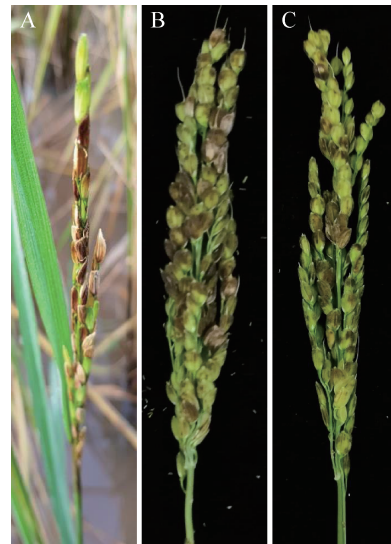
2.4 水稻赤霉病病原菌的致病性

比较不同产毒化学型亚洲镰刀菌侵染水稻后的AUDPC并经Welch T检验法检验发现,NIV化学型亚洲镰刀菌侵染水稻后AUDPC值平均为417.2,显著高于3ADON化学型亚洲镰刀菌侵染水稻后的AUDPC值251.4($P<0.05$)。

田间水稻赤霉病发病症状(图4-A)与温室条件下不同产毒化学型亚洲镰刀菌侵染后水稻的发病症状(图4-B~C)一致,在侵染初期水稻颖壳变褐,后期可见淡红色镰刀菌霉层,严重时整穗干枯。

3 讨论

明确赤霉病病原菌的种群、产毒化学型及致病性差异,对制定防治对策和指导作物抗病育种具有重要意义。但是,目前我国赤霉病研究重点主要围绕小麦和大麦等作物(Jia et al., 2018),关于水稻赤霉病及其病原菌的研究报道相对较少。目前,国际上关于水稻赤霉病及其病原菌的相关研究报道主要集中在韩国(Kim et al., 2018; Lee et al., 2009)、日本(Nakajima et al., 2008)和巴西(Gomes et al., 2015)等国家。本研究连续2年从江苏省13个市41个水稻主产县区采集感赤霉病水稻样品,明确了江苏省水稻赤霉病病原菌以亚洲镰刀菌和禾谷镰刀菌为主,其中最主要的是亚洲镰刀菌,占病原菌总数的98%以上。



B~C: 分别为雪腐镰刀菌烯醇化学型和3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇化学型亚洲镰刀菌侵染症状。B~C: *Fusarium* head blight of rice inoculated with *Fusarium asiaticum* isolates in nivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol chemotypes, respectively.

图4 水稻赤霉病田间症状(A)及温室内不同产毒化学型亚洲镰刀菌侵染后水稻发病症状(B~C)

Fig. 4 Symptoms of *Fusarium* head blight on rice in the field (A) and on rice plants inoculated with *Fusarium asiaticum* isolates in different chemotypes in greenhouse (B~C)

Qiu & Shi (2014)对我国东部部分地区水稻中禾谷镰刀菌复合种群及产毒化学型进行鉴定,发现72%的水稻赤霉病病原菌为3ADON化学型亚洲

镰刀菌,其余为NIV化学型亚洲镰刀菌。Dong et al. (2020a,b)对2017年采自江苏省部分水稻主产区的赤霉病病原菌进行了分离鉴定,同样发现约70%的水稻赤霉病病原菌为3ADON化学型亚洲镰刀菌,其余为NIV化学型亚洲镰刀菌。本研究在此基础上进一步分析了近年来江苏省水稻主产区赤霉病病原菌种群及产毒化学型特征,明确了江苏省水稻赤霉病的病原菌主要以3ADON化学型亚洲镰刀菌为主,其次为NIV化学型亚洲镰刀菌。但与江苏省小麦赤霉病病原菌不同的是,水稻中NIV化学型亚洲镰刀菌菌株所占比例要明显高于小麦中的(10%左右)(Dong et al., 2016),预示着NIV化学型亚洲镰刀菌对水稻可能有更高的适合度。

产毒化学型差异会显著影响禾谷镰刀菌复合种对宿主的致病力(Amarasinghe & Fernando, 2016; Nicolli et al., 2018; Yang et al., 2018),如3ADON化学型禾谷镰刀菌复合种对小麦的致病性要显著高于NIV化学型(Carter et al., 2002; Goswami & Kistler, 2005; Spolti et al., 2012)。尽管3ADON化学型和NIV化学型亚洲镰刀菌可以侵染水稻引起赤霉病,但不同产毒化学型之间的致病性没有显著差异(Desjardins et al., 2000; Goswami & Kistler, 2005; Gomes et al., 2015)。本研究结果与上述报道存在差异,3ADON化学型和NIV化学型亚洲镰刀菌不仅可以侵染水稻引起赤霉病,同时NIV化学型亚洲镰刀菌对水稻的致病性显著高于3ADON化学型亚洲镰刀菌。

本研究对江苏省水稻主产区的水稻赤霉病病原菌进行了分离鉴定与致病性测定,但是因为采集的样品仅来自2018年和2019年,且抽取的样品数量及区域有限,因此对江苏省水稻赤霉病病原菌的时空动态演变规律研究仍是下一步工作的重点。江苏省作为我国典型的稻麦轮作区之一,不仅是小麦赤霉病的常发区、重发区,水稻赤霉病也呈现出扩大趋势,因此明确该地区赤霉病病原菌在不同粮食作物上的群体共性和特性,将为赤霉病防控提供新思路,使镰刀菌毒素闭环式精准科学防控成为可能。

参 考 文 献 (References)

- Amarasinghe CC, Fernando WGD. 2016. Comparative analysis of deoxynivalenol biosynthesis related gene expression among different chemotypes of *Fusarium graminearum* in spring wheat. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1229
- Carter JP, Rezanoor HN, Holden D, Desjardins AE, Plattner RD, Nicholson P. 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108(6): 573–583
- Desjardins AE, Manandhar HK, Plattner RD, Manandhar GG, Poling SM, Maragos CM. 2000. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3): 1020–1025
- Dong F, Qiu J, Xu J, Yu M, Wang S, Sun Y. 2016. Effect of environmental factors on *Fusarium* population and associated trichothecenes in wheat grain grown in Jiangsu Province, China. *International Journal of Food Microbiology*, 230: 58–63
- Dong F, Xing YJ, Lee YW, Mokoena MP, Olaniran AO, Xu JH, Shi JR. 2020a. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and toxigenic *Fusarium* species in freshly harvested rice in Jiangsu, China. *World Mycotoxin*, 13(2): 201–211
- Dong F, Zhang X, Xu JH, Shi JR, Lee YW, Chen XY, Li YP, Mokoena MP, Olaniran AO. 2020b. Analysis of *Fusarium graminearum* species complex from freshly harvested rice in Jiangsu Province (China). *Plant Disease*, 104(8): 2138–2143
- Gomes LB, Ward TJ, Badiale-Furlong EM, Del Ponte EM. 2015. Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. *Plant Pathology*, 64(4): 980–987
- Goswami RS, Kistler HC. 2005. Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology*, 95(12): 1397–1404
- Jia HY, Zhou JY, Xue SL, Li GQ, Yan HS, Ran CF, Zhang YD, Shi JX, Jia L, Wang X, et al. 2018. A journey to understand wheat *Fusarium* head blight resistance in the Chinese wheat landrace Wangshuibai. *The Crop Journal*, 6(1): 48–59
- Kim Y, Kang IJ, Shin DB, Roh JH, Heu S, Shim HK. 2018. Timing of *Fusarium* head blight infection in rice by heading stage. *Mycobiology* 46: 283–286
- Lee J, Chang IY, Kim H, Yun SH, Leslie JF, Lee YW. 2009. Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10): 3289–3295
- Liu YY, Sun HY, Li W, Xia YL, Deng YY, Zhang AX, Chen HG. 2017. Fitness of three chemotypes of *Fusarium graminearum* species complex in major winter wheat-producing areas of China. *PLoS ONE*, 12(3): e0174040
- Ma YT, Liu TG, Wen CY, Liu B, Gao L, Chen WQ. 2019. Determination and contamination of *Fusarium* mycotoxins in different wheat planting regions of China. *Journal of Plant Protection*, 46(2): 266–273 (in Chinese) [马玉彤, 刘太国, 文才艺, 刘博, 高利, 陈万权. 2019. 我国不同麦区小麦镰刀菌毒素检测及毒素污染分析. 植物保护学报, 46(2): 266–273]
- Miller JD, Greenhalgh R, Wang YZ, Lu M. 1991. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia*, 83(2): 121–130
- Nakajima T, Yoshida M, Tomimura K. 2008. Effect of lodging on the

- level of mycotoxins in wheat, barley, and rice infected with the *Fusarium graminearum* species complex. *Journal of General Plant Pathology*, 74(4): 289–295
- Nicolli CP, Machado FJ, Spolti P, del Ponte EM. 2018. Fitness traits of deoxynivalenol and nivalenol-producing *Fusarium graminearum* species complex strains from wheat. *Plant Disease*, 102(7): 1341–1347
- O' Donnell K, Ward TJ, Abera D, Kistler HC, Aoki T, Orwig N, Kimura M, Bjørnstad S, Klemsdal SS. 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology*, 45(11): 1514–1522
- Qiu JB, Shi JR. 2014. Genetic relationships, carbendazim sensitivity and mycotoxin production of the *Fusarium graminearum* populations from maize, wheat and rice in eastern China. *Toxins*, 6(8): 2291–2309
- Qiu JB, Xu JH, Shi JR. 2019. *Fusarium* toxins in Chinese wheat since the 1980s. *Toxins*, 11(5): e248
- Shi JR, Qiu JB, Dong F, Xu JH, Ji F, Liu X, Yu MZ. 2016. Risks of *Fusarium* toxins of wheat in China. *Journal of Triticeae Crops*, 36(2): 129–135 (in Chinese) [史建荣, 仇剑波, 董飞, 徐剑宏, 祭芳, 刘馨, 俞明正. 2016. 小麦镰刀菌毒素及其发生风险研究进展. *麦类作物学报*, 36(2): 129–135]
- Spolti P, Barros NC, Gomes LB, dos Santos J, del Ponte EM. 2012. Phenotypic and pathogenic traits of two species of the *Fusarium graminearum* complex possessing either 15-ADON or NIV genotype. *European Journal of Plant Pathology*, 133(3): 621–629
- Sun XD, Su P, Shan H. 2017. Mycotoxin contamination of rice in China. *Journal of Food Science*, 82(3): 573–584
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729
- Wang JH, Zhang JB, Chen FF, Li HP, Ndoye M, Liao YC. 2012. A multiplex PCR assay for genetic chemotyping of toxigenic *Fusarium graminearum* and wheat grains for 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol and nivalenol mycotoxin. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10(2): 505–511
- Wang XL, Cui YF, Fan FY, Song YL, Ren JP, Meng QL, Xu WJ, Jiang LH. 2010. Phylogenetic, carbendazim sensitivity and mycotoxin genotype analyses of *Fusarium graminearum* complex species isolated from wheat *Fusarium* head blight in China. *Journal of Phytopathology*, 158(7/8): 576–578
- Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E, O' Donnell K. 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14): 9278–9283
- Yang M, Zhang H, Kong X, van der Lee T, Waalwijk C, van Diepeningen A, Xu J, Xu J, Chen W, Feng J. 2018. Host and cropping system shape the *Fusarium* population: 3ADON-producers are ubiquitous in wheat whereas NIV-producers are more prevalent in rice. *Toxins*, 10(3): e115
- Yli-Mattila T, Gagkaeva T, Ward TJ, Aoki T, Kistler HC, O' Donnell K. 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, 101(6): 841–852
- Zhang H, van der Lee T, Waalwijk C, Chen WQ, Xu J, Xu JS, Zhang Y, Feng J. 2012. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PLoS ONE*, 7(2): e31722
- Zhang JB, Li HP, Dang FJ, Qu B, Xu YB, Zhao CS, Liao YC. 2007. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycological Research*, 111(8): 967–975
- Zhang Z, Zhang H, Lee T, Chen WQ, Arens P, Xu J, Xu JS, Yang LJ, Yu DZ, Waalwijk C, et al. 2010. Geographic substructure of *Fusarium asiaticum* isolates collected from barley in China. *European Journal of Plant Pathology*, 127(2): 239–248

(责任编辑:李美娟)