

李文奇,王 军,范方军,等. 江苏省水稻细菌性基腐病病原分离与抗性资源鉴定[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):139-142.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.048

江苏省水稻细菌性基腐病病原分离与抗性资源鉴定

李文奇,王 军,范方军,朱金燕,王芳权,杨 杰,仲维功

(江苏省农业科学院粮食作物研究所/江苏省优质水稻工程技术研究中心/国家水稻改良中心南京分中心,江苏南京 210014)

摘要:水稻基腐病是由玉米狄克氏细菌(*Dickeya zeae*)侵染引起的毁灭性细菌病害,对水稻产量和品质具有潜在的威胁。分别从江苏省南京市、扬州市采集水稻病根,通过菌落形态特征观察、分子鉴定以及致病性验证等对致病细菌进行分离和鉴定;同时筛选可供利用的太湖流域水稻抗性品种。结果表明:分离到的水稻基腐病致病菌 JS2012 是玉米狄克氏细菌;从 56 份太湖流域水稻资源中共筛选到 26 份抗性资源,结果为进一步研究水稻细菌性基腐病以及培育抗病品种奠定了基础。

关键词:水稻;细菌性基腐病;玉米狄克氏细菌;太湖流域;水稻抗性品种

中图分类号: S432.4+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0139-04

近年来,水稻细菌性基腐病在我国多个省(区、市)均有发生,且有扩散蔓延和逐年加重的趋势,成为水稻高产、稳产的严重障碍,潜在威胁着我国的粮食安全^[1]。培育抗病品种是生产上防治水稻细菌性基腐病最经济有效的途径,因此开展水稻基腐病病原研究以及抗病资源的筛选鉴定是水稻安全生产的迫切需要。

水稻基腐病是由玉米狄克氏菌(*Dickeya zeae*, 别称 *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*)引起的细菌性病害^[1]。水稻基腐病的典型症状是使植株茎基部和根节部变为褐色或深褐色,并伴有恶臭味。水稻基腐病在水稻整个生育期间都可以发病,主要通过水稻根部和茎基部的伤口侵入^[2]。无论是在分蘖期、拔节期还是在抽穗期,一旦发病,植株便呈现失水、变黄和青枯症状,孕穗期形成白穗^[3-5]。从 20 世纪 80 年代初开始,水稻细菌性基腐病在我国的各个省(区、市)蔓延^[2-3],特别是 1988 年在江苏省沿海的如东县大面积发生,有 2.67 万 hm^2 粳稻发病,严重发病的有 1 万 hm^2 左右,由于病株多数形成枯孕穗或枯白穗,造成直接产量损失在 90% 左右^[6];此后很长一段时期内,水稻基腐病在各地未严重发生。近年来,在湖北省宜都市和枝江市^[7-8]、云南省多个地区^[9]、湖南省邵东县等^[10]、福建省云和县^[11]、黑龙江省鸡西市^[12]、海南省^[13]等地相继有水稻细菌性基腐病发生。目前该病在江苏省的危害也有上升的趋势,如 2007 年在江苏省海安县稻田发生严重的水稻细菌性基腐病,平均病田率、枯穗率分别达到 33.66%、0.65%,对水稻产量造成了严重损失^[14]。由于该病症状类似螟虫危害或生理性青枯,易导致该病的诊断失误,从而延误该病的发现时间,不能及时通报,这也是该病目前报道较少的重

要原因之一^[15]。

选育抗病品种是防控水稻基腐病的有效途径。20 世纪 80 年代,南京农业大学利用病原物浸根接种法对 622 份水稻品种资源进行基腐病抗性鉴定,共筛选出高抗的水稻资源 127 份,中抗的水稻资源 210 份,并发现粳稻品种中存在抗性,而粳稻品种多感病^[16-17]。华南农业大学刘琼光等对来自广东省各地培育出的共 42 个新品种和推广的栽培品种进行了抗病性鉴定^[18]。目前,尚不清楚太湖流域水稻品种对基腐病的抗性水平。

本研究针对江苏省近年来发生的水稻基腐病进行病原分离与鉴定,以期明确致病细菌,并进一步挖掘太湖流域抗基腐病水稻品种资源,从而为防治水稻基腐病提供科学依据,并为培育抗病水稻品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于水稻基腐病分离的粳稻品种来自于江苏省南京市和扬州市大田栽培发病的南粳 45,为笔者所在项目组保存;用于抗性资源筛选的试验材料为 56 份太湖流域水稻地方品种,包括 12 份粳稻、44 份粳稻,为笔者所在项目组保存。

1.2 病原菌的分离和鉴定

采用平板划线分离法^[19]进行病原细菌分离。将发病的水稻茎基部和根用清水洗净,再用刀片切成约 5 mm 长的病组织,用 70% 乙醇消毒并用灭菌水冲洗 3 次后,放在灭菌载玻片上的灭菌水中,用灭菌玻璃棒碾碎。静置一段时间后,用灭菌的移植环蘸取组织液在琼脂平板上划线,28 ℃ 培养 4~5 d。挑取单菌落纯化培养 4~5 次,根据柯赫氏法则,从分离纯化的病原菌上挑取单菌落进一步培养,采用针刺法回接水稻根系,待出现基腐病典型症状后保存菌株。

1.3 细菌基因组提取

使用细菌基因组提取试剂盒(OMEGA 公司)进行细菌基因组的提取。

1.4 基腐病菌特异性基因的 PCR 扩增

从 NCBI 数据库中查询已经报道的水稻细菌性基腐病菌

收稿日期:2014-07-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301652);国家科技支撑计划重大项目(编号:2011BAD16B03);江苏省自然科学基金(编号: BK20130723);江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)1003]。
作者简介:李文奇(1983—),男,河南夏邑人,博士,助理研究员,主要从事水稻遗传育种研究。E-mail: 58190059@qq.com。

通信作者:杨 杰,博士,研究员,主要从事水稻遗传育种研究。
E-mail: yangjie168@aliyun.com。

16S rDNA(JQ284040) 序列^[20], 设计引物 16S-up: 5'-GATTGAACGCTGGCGGCAGG-3', 16S-down: 5'-ATTCCGATTAACGCTTGCAC-3', 以分离菌株的基因组为模板扩增 16S rDNA 序列。根据已报道的水稻细菌性基腐病菌 ZJU2012 的 *gyrB*、*recA*、*fljC* 基因分别设计引物 g-up: 5'-CCTCAAGTATCAAGGTATTA-3', g-down: 5'-ATTTCCACGCCGATGTCGTC-3'; r-up: 5'-CGCCAGCAGCCTCTTCATTA-3', r-down: 5'-AGATCCGTATGAAGATTGGT-3'; f-up: 5'-GAACGATACCAACGGCACTC-3', f-down: 5'-CAGCGATTACTGCAGCAGTT-3'^[21]。25 μ L PCR 反应体系为: 0.5 μ L DNA 模板, 各 0.5 μ L 上下游引物, 2.0 μ L dNTP 混合物, 0.125 μ L TaKaRa *Taq*, 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 加 ddH₂O 定容至 25.0 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 40 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 15 $^{\circ}$ C 保存。采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 对扩增片段进行回收后送上海英骏生物技术公司测序。

1.5 抗性资源鉴定

针对本试验保存的太湖流域水稻品种资源进行基腐病抗性鉴定。按照刘琼光等的方法^[18], 将 20 d 秧龄的 56 份水稻亲本材料伤根后, 浸入基腐病菌液(浓度 1×10^8 CFU/mL) 中 3 h, 然后移栽入土中。每个材料 50 株苗, 设 3 个重复, 以液体培养基作为阴性对照。移栽后 7~10 d 开始调查发病情况, 调查的分级标准为: 0 级, 无症状; 1 级, 心叶枯萎 1/3 以下; 2 级, 心叶枯萎 1/3~1/2 (含 1/2、1/3); 3 级, 心叶枯萎 1/2~3/4 (含 1/2); 4 级, 心叶枯萎 3/4 及以上。抗性分级标准为: 高抗, 病情指数 0~5; 中抗, 病情指数 5.1~12.4; 中感, 病情指数 12.5~19.9; 高感, 病情指数 20 及以上^[18]。

2 结果与分析

2.1 病原细菌的分离与形态特征

2012 年 9 月至 10 月期间, 在江苏省南京市、扬州市等地发现多块稻田发生白穗、叶片萎蔫以及干枯的现象(图 1-A、1-B), 且发病植株根系变黑腐烂(图 1-C)并伴随有恶臭味, 为水稻细菌性基腐病的典型致病症状。对收集的 8 份发病植株进行病原分离和培养发现, 在所有的发病植株上均分离到同一菌株, 命名为 JS2012。在牛肉汁蛋白胨培养基上培养 48 h 后, 菌落呈乳白色, 后逐渐变成淡土黄色, 且边缘不整齐。

2.2 病原细菌的分子鉴定

根据已经报道的水稻细菌性基腐病菌的 16S rDNA 序列设计引物, 以分离到的水稻细菌性基腐病菌 JS2012 的基因组为模板, 进行 PCR 扩增目的 16S rDNA 序列, 得到 1 条长度约为 450 bp 的片段(图 2-A)。将 PCR 产物进行回收、克隆并送上海英骏生物技术公司测序, 得到 JS2012 的 16S rDNA 序列。经序列比对和分析, 与已报道的水稻基腐病菌 16S rDNA 的序列一致性为 100%。进一步根据已报道的水稻基腐病菌 ZJU2012 基因组中的 *gyrB*、*recA*、*fljC* 基因序列设计引物, 对 JS2012 菌株基因组中的相关序列进行 PCR 扩增, 结果见图 2-B, 经测序后与已经报道的水稻基腐病菌 ZJU2012 序列进行比对。结果显示, JS2012 的 *gyrB*、*recA*、*fljC* 基因序列与 ZJU2012 的基因序列有 100% 的一致性。

2.3 病原细菌的致病性测定

根据细菌的生长特征和分子鉴定结果, 对初步确认为 *Dickeya zeae* 的菌株 JS2012 进一步应用活体水稻幼苗根部刺伤接种, 按照柯赫氏法则进行回接验证, 测定其致病性。由图 2-C 可以看出, 接种 10 d 后的水稻幼苗出现水稻细菌性基腐病的典型症状, 地上部分叶片(包括心叶)出现萎蔫甚至干枯, 地下部分发病根系变黑腐烂, 并伴有强烈的恶臭味, 以液体培养基为阴性对照的水稻则没有出现基腐病症状。接着对发病水稻根系进行病原分离与分子鉴定, 再次获得了 JS2012 菌株。

2.4 太湖流域水稻品种抗性资源的鉴定

对 56 份太湖流域水稻品种资源进行的基腐病抗性鉴定结果表明, 这些太湖水稻品种中, 有 8 份品种显示高抗基腐病, 分别是飞来凤、帽子头、野凤凰、凤凰稻、爱柴白、千山树、青壳种、早石稻; 有 12 份品种显示中抗基腐病, 分别是铁壳稻、白壳晚稻、小百野稻、白壳石稻、团粒粳、碗儿粳、芦花白、黑壳芦花白、长子芦花白、矮箕壳、小黄早、不留名; 另外还有 36 份感病品种, 包括 19 份中感品种、17 份高感品种(图 3、表 1)。这些结果可以初步说明, 太湖流域水稻品种中存在可供利用的抗性资源, 并且不同粳稻和籼稻品种存在不同的抗性。

3 结论与讨论

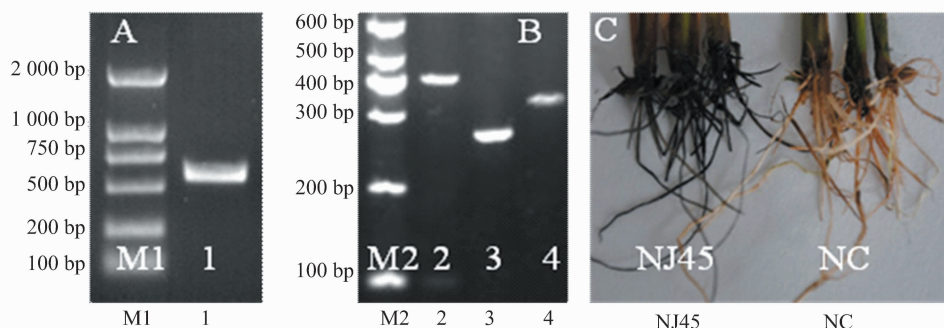
我国对水稻基腐病的研究报道始于 20 世纪 80 年代初, 分别从浙江省水稻、玉米两大作物中分离得到基腐病菌菊欧氏杆菌(*Erwinia chrysanthemi*)^[3,15](现统称为玉米狄克氏细菌 *Dickeya zeae*^[1]); 此后在很长一段时间都没有发现暴发。目前, 在全国 15 个省(区)均发现有水稻基腐病发生, 如江苏省的多个市陆续发现水稻基腐病^[4-14]。水稻基腐病对水稻生产带来的严重影响日趋明显, 作为具有潜在暴发可能的细菌性病害引起了水稻科研工作者高度重视。目前在全国范围内, 针对水稻基腐病菌分离鉴定、生长发育、侵染循环、致病性以及抗性资源筛选开展了一系列研究^[18,22-25], 为预防水稻基腐病的大面积暴发流行提供了科学依据。本试验首次对在江苏省南京市、扬州市分离的水稻细菌性基腐病进行形态特征、致病性和水稻品种抗性等方面的研究。结果表明, 发生在江苏省南京市、扬州市的水稻基腐病是由 *Dickeya zeae* 引起的, 与之前浙江大学报道的基腐病菌菌株 ZJU2012 (2012 年分离于广东省)有较高的一致性, 很有可能是同一种病原菌, 具体还有待于进一步鉴定; 另一方面也说明, 水稻基腐病作为适应性较强的细菌性病害正在全国水稻产区范围内扩散蔓延, 关于其抗性品种资源筛选和抗性机制分析等基础研究工作亟待开展。

培育抗病品种是防治水稻细菌性基腐病的安全有效且对环境友好的重要途径, 而筛选抗性品种资源是培育抗病品种的重要前提。王金生等采用浸根接种法对 622 个水稻品种进行抗病性测定表明, 抗病品种占 54.2%, 感病品种占 45.8%, 且籼稻较粳稻抗病^[17]。刘琼光等对广东省各地培育出的共 42 个新品种和推广的栽培品种进行了抗病性鉴定^[18]。本研究对太湖流域水稻品种进行抗基腐病鉴定, 结果表明, 粳稻和籼稻中都存在抗性资源, 同时也发现, 粳稻品种抗性差异明显, 如小青芒、晚中秋、摧不倒、黄系光、甩杀极、浦东青、润叶



A、B: 水稻叶片和穗的田间发病症状; C: 水稻根和茎的田间发病症状,
R为抗病水稻, S为发病水稻

图1 江苏省水稻细菌性基腐病的田间发病症状



A、B为水稻细菌性基腐病的分子鉴定结果, 其中 M1: DNA marker 2000; M2: DNA marker I; 1: 16S rDNA 序列扩增结果; 2: *gyrB* 序列扩增结果; 3: *recA* 序列扩增结果; 4: *fltC* 序列扩增结果。C为水稻基腐病回接验证结果, 其中 NJ45 为粳稻品种南粳 45, NC 为阴性对照

图2 水稻细菌性基腐病原鉴定



T1~T10为10个不同的太湖流域水稻品种, 分别是铁壳稻、白壳晚稻、黄谷梗稻、小黄稻、小百野稻、桂圆黄、早红莲、晚金粳、太湖粳、帽子头

图3 部分太湖流域水稻品种的抗性表型

表 1 太湖流域水稻品种的抗性鉴定结果

水稻品种	抗性等级
小青芒、晚中秋、黄系光、桂圆黄、早红莲、晚金粳、太湖粳、硬头颈、光头芦花白、矮脚芦花白、一时兴、香梗糯、晚野稻、润叶黄、浦东青、甩杀极、摧不倒	高感
大稻德头、黄谷梗稻、小黄稻、大头鬼、六十日、杜子粳、尖粒子、流离种、陈家种、长稻头、矮大头、矮箕光、长箕光、硬头尖、荒三石、白壳荒三石、金山晚、拖过山、小红枣	中感
铁壳稻、白壳晚稻、小百野稻、白壳石稻、团粒粳、碗儿粳、芦花白、黑壳芦花白、长子芦花白、矮箕壳、小黄早、不留名	中抗
飞来凤、帽子头、野凤凰、凤凰稻、爱柴白、千山树、青壳种、早石稻	高抗

黄、晚野稻、香梗糯等发病率极高,高感基腐病;而帽子头、飞来凤、野凤凰、爱柴白、早石稻、千山树、青壳稻、铁壳稻、白壳晚稻、小百野稻、白壳石稻、团粒粳、碗儿粳、芦花白、黑壳芦花白、长子芦花白、矮箕壳、小黄早、不留名对基腐病表现出不同程度的抗性;此外,粳稻品种也具有同样抗性的分化。这说明不同梗稻品种间以及粳梗稻之间抗病性存在较大差异,但都存在抗性基因资源,因此如何科学合理利用水稻抗基腐病品种是当前生产上面临的问题。

目前,对水稻基腐病的研究还处于起步阶段,尽管取得了一定的研究进展,但是仍有很多工作要做,包括利用抗性水稻资源来解析水稻与基腐病菌互作响应机制和水稻抗病信号调控网络以及基腐病菌的侵染和致病机理等。这些研究可为抗水稻基腐病新品种的培育提供重要的理论依据和基因资源。

参考文献:

[1]刘琼光,张 庆,魏楚丹. 水稻细菌性基腐病研究进展[J]. 中国农业科学,2013,46(14):2923-2931.

[2]洪剑鸣,狄广信,谢良泰,等. 水稻细菌性基腐病原细菌的鉴定[J]. 浙江农业大学学报,1983(4):43-46.

[3]王金生,韦忠民,方中达. 水稻细菌性基腐病的病原菌及其致病性的研究[J]. 植物病理学报,1984,16(3):130-134.

[4]刘琼光,曾宪铭,李伯传. 广东省水稻一种新病害——水稻细菌性基腐病病原初步鉴定[J]. 华南农业大学学报,1997,18(4):131-132.

[5]陈建斌,周惠萍,李作森,等. 云南省水稻细菌性基腐病原的初步鉴定[J]. 云南农业大学学报,2002,17(4):370-371,392.

[6]周 勇,翟友成,曹炳和. 水稻细菌性基腐病在江苏如东县发生严重[J]. 植物保护,1989(6):56.

[7]朱祚亮,曹诗红,徐 蓉,等. 宜都市水稻细菌性基腐病的发生特点与防治技术[J]. 湖北植保,2011(2):46.

[8]项海兰,韩玉江,陈祥敏,等. 枝江市水稻细菌性基腐病初步研究[J]. 湖北植保,2012(1):28-30.

[9]王园媛,刘振华,李晓菲,等. 水稻细菌性基腐病的发生与防治[J]. 云南农业科技,2012(5):54-55.

[10]申亮文,姚雄民,周检军,等. 2011 年邵东县水稻细菌性基腐病的发生特点及原因分析[J]. 湖南农业科学,2012(10):10-11.

[11]蓝林金,郑仕春. 云和县杂交水稻甬优 9 号细菌性基腐病的发

生与防治[J]. 福建农业科技,2011(2):54-55.

[12]张书臣,乔广辉. 鸡西市水稻细菌性基腐病的发生特点与防治技术[J]. 中国农技推广,2009,25(5):43.

[13]林兴祖,冯健敏. 南繁基地水稻细菌性基腐病的发生及防治对策[J]. 农业科技通讯,2007(1):27.

[14]冯成玉,孟爱中,于宝富,等. 水稻细菌性基腐病调查初报[J]. 植物保护,2008,34(1):153-154.

[15]洪剑鸣,谢良泰,狄广信,等. 水稻细菌性基腐病原菌致病变种的研究[J]. 浙江农业大学学报,1986(1):65-69.

[16]王金生,姚 革,方中达. 水稻品种对细菌性基腐病的抗性及其病原菌致病力分化[J]. 中国农业科学,1987,20(3):93-96.

[17]王金生,姚 革,方中达. 水稻品种对细菌性基腐病的抗性及其病原菌致病力分化的研究[J]. 植物保护学报,1989,16(3):181-185.

[18]刘琼光,王振中,周国明,等. 水稻细菌性基腐病品种抗性鉴定[J]. 华南农业大学学报:自然科学版,2003,24(2):89-90.

[19]方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979:179-181.

[20]Pu X M,Zhou J N,Lin B R,et al. First report of bacterial foot rot of rice caused by a *Dickeya zeae* in China[J]. Plant Disease,2012,96(12):1818.

[21]Li B,Shi Y,Ibrahim M,et al. Genome sequence of the rice pathogen *Dickeya zeae* strain ZJU1202[J]. Journal of Bacteriology,2012,194(16):4452-4453.

[22]Hussain M B,Zhang H B,Xu J L,et al. The acyl-homoserine lactone-type quorum-sensing system modulates cell motility and virulence of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*[J]. Journal of Bacteriology,2008,190(3):1045-1053.

[23]Collmer A,Schoedel C,Roeder D L,et al. Molecular cloning in *Escherichia coli* of *Erwinia chrysanthemi* genes encoding multiple forms of pectate lyase[J]. Journal of Bacteriology,1985,161(3):913-920.

[24]Franza T,Mahé B,Expert D. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection[J]. Molecular Microbiology,2005,55(1):261-275.

[25]刘琼光,王振中,陈玉托,等. 水稻细菌性基腐病菌再侵染和潜伏侵染[J]. 植物保护学报,2003,30(3):333-334.