



# 大豆拟茎点种腐病菌 *Phomopsis longicolla* 荧光素酶标记菌株的制备及应用

张 晨, 陈 汉, 王志昂, 董莎萌, 王源超, 叶文武

(南京农业大学 植物保护学院/农业农村部大豆病虫害防控重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘 要:**大豆拟茎点种腐病菌 (*Phomopsis/Diaporthe longicolla*) 可侵染大豆引起种腐病和茎枯病等多种病害。本研究根据该病菌基因组的密码子偏好性, 优化了外源的荧光素酶基因序列, 通过酵母同源重组构建了荧光素酶表达载体, 利用 PEG 介导的原生质体转化法获得了稳定表达荧光素酶的大豆拟茎点种腐病菌菌株 PIYC2-1-Luc。结果显示: 荧光素酶基因的引入不影响大豆拟茎点种腐病菌的生长速率和致病力。以 PIYC2-1-Luc 菌株进行示踪可直观发现: 健康大豆中分离的 3 株内生镰孢菌能够显著抑制 PIYC2-1-Luc 生长, 具有生防潜力; 含苯醚甲环唑、精甲霜灵·咯菌腈和咯菌腈·噻霉酮的种衣剂均可抑制 PIYC2-1-Luc 向大豆种子扩展, 表明这些药剂或其成分可用于病害防控; PIYC2-1-Luc 对大豆品种 Williams 的致病力强于齐黄 34, 表明齐黄 34 更加抗病。该荧光素酶标记方法具有较好的有效性和稳定性, 该研究为进一步开展大豆拟茎点种腐病菌的致病机理及病害防控技术研究提供了一种可视化、高效的菌株材料。

**关键词:**大豆拟茎点种腐病菌; *Phomopsis longicolla*; 荧光素酶; 密码子偏好性; 病原菌示踪

## Generation and Preliminary Application of A Luciferase-labeled Strain for Soybean *Phomopsis* Seed Decay Pathogen *Phomopsis longicolla*

ZHANG Chen, CHEN Han, WANG Zhi-ang, DONG Suo-meng, WANG Yuan-chao, YE Wen-wu

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Disease and Pest Control of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** *Phomopsis longicolla* (syn. *Diaporthe longicolla*) causes a variety of soybean diseases, including seed decay and pod and stem blight. We optimized the sequence of an exogenous luciferase gene according to the codon preference of *P. longicolla* genome, constructed the expression vector using yeast-homologous recombination technology, and finally obtained the luciferase-labeled *P. longicolla* strain PIYC2-1-Luc by PEG-mediated protoplast transformation system. The introduction of luciferase gene did not affect the growth and virulence of *P. longicolla*. By tracing PIYC2-1-Luc, we obviously found that: the growth rate of PIYC2-1-Luc could be inhibited by three endophytic *Fusarium* strains isolated from healthy soybean, revealing them as candidates of biocontrol strain; the growth of PIYC2-1-Luc toward soybean seeds treated with three seed coating products (difenoconazole, mefenoxam + fludioxonil, and fludioxonil + benziothiazolinone) was inhibited, revealing these fungicide products or effective ingredients are useful of disease control; and the disease level of PIYC2-1-Luc against the soybean cultivar Williams was stronger than that against Qihuang 34, revealing that Qihuang 34 is more resistant to disease. These results indicate that the labeling method is effective and stable, and this study provides a visual and highly effective strain material for further research on the pathogenic mechanism and disease control technology of *P. longicolla*.

**Keywords:** soybean *Phomopsis* seed decay pathogen; *Phomopsis longicolla*; luciferase; codon preference; pathogen tracking

大豆拟茎点种腐病菌 *Phomopsis longicolla* (或 *Diaporthe longicolla*) 可与同属的病原真菌复合侵染大豆, 引起种腐病 (*Phomopsis* seed decay) 和茎枯病 (*Phomopsis* stem blight) 等一系列病害<sup>[1-3]</sup>, 曾在美国、阿根廷等大豆主产国造成严重的经济损失<sup>[4]</sup>。中国于 2009 年首次报道大豆拟茎点茎枯病 (2006 年发现于黑龙江)<sup>[5]</sup>, 随后在广东、江西、湖北等地相继发现该病<sup>[6-10]</sup>。近年来, 在黄淮海地区的大豆生产中也陆续发现拟茎点种腐病菌引起的大豆茎枯病, 并有蔓延加重的趋势; 据统计, 发病田块一般造成大豆减产 10% ~ 30%, 严重时病株比例超过

90%, 甚至导致绝收<sup>[11]</sup>。由于对该病原菌流行规律与成灾机理的研究比较滞后, 限制了病害防控技术的发展。

为防控大豆拟茎点种腐病, 美国大豆基金会 (United Soybean Board, USB) 于 2009 年资助开展为期 3 年的抗病资源筛选工作, 2011 年的统计结果表明, 26 个大豆品系对该病害具有一定抗性, 但可能由于病原-寄主互作的特异性分化, 这些品系的抗感性在不同地区存在差异<sup>[4]</sup>。在中国, 赵晓林等<sup>[11]</sup>于 2021 年报道了一种大豆对拟茎点种腐 (茎枯) 病的抗性鉴定技术体系, 从黄淮海等地收集的 62 个大豆

收稿日期: 2022-10-27

基金项目: 国家自然科学基金 (32172374); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-004)。

第一作者: 张晨 (1998—), 女, 博士研究生, 主要从事大豆真菌病害研究。E-mail: 2020202023@stu.njau.edu.cn。

通讯作者: 叶文武 (1984—), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆卵菌与真菌病害研究。E-mail: yeww@njau.edu.cn。

品种中发现了 13 个抗病品种,初步证明中国大豆种质中存在对该病的抗性资源。此外,科学用药也是防控该病的关键措施,在病害发生时甚至是唯一有效的措施。除了化学农药,大量的生物源天然有机物及自然环境中微生物被开发利用,成为绿色防控的重要措施<sup>[12-13]</sup>。然而,目前中国尚未有登记的针对大豆拟茎点种腐(茎枯)病的化学和生物农药。

荧光素酶(Luciferase, Luc)被广泛应用于各种真菌、细菌及病毒等病原微生物的标记,其生物发光原理是酶和底物的氧化反应,不需要外界的激发光,不存在光漂白、自发荧光等干扰实验结果观察的因素,在应用中具有信噪比高的特点。同时,由于仅在活细胞内发生,其发光强度与表达荧光素酶的细胞数量成正比,因此可用于定量分析<sup>[14-15]</sup>。操作简便、结果直观和对机体损伤小等特点也使其被应用于肿瘤生长检测和转移示踪、基因表达及蛋白质丰度的可视化监测等多个领域<sup>[16-17]</sup>。该技术也被应用于病原微生物在寄主体内定殖等过程的可视化<sup>[18]</sup>。

为更好地开展大豆拟茎点种腐病菌致病机理及病害防控技术的研究,本研究通过外源基因密码子优化和遗传转化技术,构建一种稳定表达荧光素酶的大豆拟茎点种腐病菌菌株,并应用其进行生防菌株拮抗效果、种衣剂拌种防效和大豆品种抗病性等测试结果的可视化观察,评估该荧光素酶标记方法的有效性和稳定性,以及该荧光素酶标记菌株的应用潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆拟茎点种腐病菌野生型菌株 YC2-1;大豆品种 Williams、齐黄 34 和苏豆 13;酵母菌株 XK125 和载体 pYF11 均由本实验室保存。3 株供试内生镰孢菌 Fus1、Fus2 和 Fus3 均分离自健康大豆。大肠杆菌 JM109 感受态细胞购自广州康体生物科技有

限公司。限制性内切酶 *Xho* I 购自北京宝日医生物技术有限公司。荧光素 Luciferin 购自上海西格玛奥德里奇贸易有限公司。卡那霉素、氨苄青霉素和利福平购自北京索莱宝科技有限公司。荧光素酶基因 *PiLuc* 及引物的合成均由上海生工生物工程股份有限公司完成。3% 苯醚甲环唑悬浮种衣剂和 6.25% 精甲霜灵·咯菌腈悬浮种衣剂为南京高正农用化工有限公司提供,4% 咯菌腈·噻霉酮悬浮种衣剂为陕西西大华特科技实业有限公司提供。

### 1.2 试验设计

为避免外源基因不能表达或表达效率低,首先根据大豆拟茎点种腐病菌基因组的密码子偏好性对荧光素酶基因序列进行优化。随后将优化后的荧光素酶基因构建在表达载体上,利用遗传转化方法将其转入大豆拟茎点种腐病菌。当被喷施荧光素(Luciferin)后,菌体上的荧光素酶可以催化荧光素氧化进而发出生物荧光,这些荧光可被荧光测定仪快速、灵敏地检测并成像。将获得的荧光素酶标记菌株应用于生防菌株拮抗效果、种衣剂拌种防效和大豆品种抗病性的测定,探究该荧光素酶标记方法的有效性与稳定性。

### 1.3 方法

1.3.1 荧光素酶表达载体 pYF11-PiLuc 的构建  
根据已测序的 YC2-1 基因组数据(<https://ngdc.cnbc.ac.cn/gwh>;登录号:GWHASJP000000000),利用 Python 软件统计全基因组密码子分布频率,分析其密码子偏好性,获取密码子优化表,设计出有利于在大豆拟茎点种腐病菌中表达的荧光素酶基因 *PiLuc*。以合成的 *PiLuc* 为模板,利用引物 PiLuc-F 和 PiLuc-R(表 1)进行 PCR 扩增。利用酵母同源重组技术将 PCR 扩增产物与限制性内切酶 *Xho* I 酶切后的 pYF11 载体进行连接,筛选阳性菌株后提取质粒 pYF11-PiLuc。将 pYF11-PiLuc 质粒转化至大肠杆菌 JM109 菌株的感受态细胞,提取阳性克隆的 pYF11-PiLuc 质粒并测序。

表 1 荧光素酶基因的 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification of luciferase gene

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	长度 Length/nt
PiLuc-F	TTTCGTAGGAACCCAATCTTCAAAATGGAGGACGCCAAGAACAT	44
PiLuc-R	CACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACTCACTTGTCTCGTCGTCGCTCTT	57

1.3.2 大豆拟茎点种腐病菌荧光素酶标记菌株的制备  
利用 PEG 介导的原生质体转化法<sup>[19]</sup>将 pYF11-PiLuc 转入大豆拟茎点种腐病菌菌株 YC2-1。对转化平板喷施终浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Luciferin,使用 Tanon 5200 Multi 及 Tanon 生物图像拍摄软件

(发光成像程序)进行筛选,曝光时间为 10 s;拍摄结果使用 TanonImage 软件进行颜色均一化。挑选具有明显荧光的转化子,转接到含卡那霉素(终浓度 50 ng·μL<sup>-1</sup>)、氨苄青霉素(终浓度 50 ng·μL<sup>-1</sup>)和利福平(终浓度 50 ng·μL<sup>-1</sup>)的 CM 平板上,25 ℃

黑暗培养。将荧光较强的转化子在不含抗生素的CM平板上继代培养4代,以获得荧光保持良好的转化子。

将野生型菌株和筛选的转化子分别接种于CM平板,25℃黑暗培养3d。用直径5mm的无菌打孔器在菌落边缘打取菌饼,转接于新的CM平板中央,25℃黑暗培养,记录菌落生长情况。选取菌落形态和生长速率与野生型相似的转化子用于致病力测定。

将野生型菌株和筛选的转化子分别接种于CM平板上,25℃黑暗培养3d。切取2mm×2mm幼嫩菌丝块,置于100mL CM液体培养基中,150~180r·min<sup>-1</sup>,28℃培养30h。遮光种植大豆Williams,置于25℃温室培养4d,选取大小一致的黄化苗,将菌丝球接种于黄化苗下胚轴处,25℃黑暗条件下保湿培养3d后测量病斑长度。

1.3.3 生防菌株拮抗效果测定 切取相同大小的候选生防菌和PIYC2-1-Luc菌株的菌丝块,分别接种于CM平板两侧,以CM培养基琼脂块为对照,25℃黑暗培养5d。对平板喷施终浓度1mmol·L<sup>-1</sup>的Luciferin,使用Tanon 5200 Multi及Tanon生物图像拍摄软件拍照并进行颜色均一化,曝光时间为2s。

1.3.4 种衣剂拌种防效测定 分别用3种不同种衣剂(根据说明书用量)对大豆品种苏豆13进行拌种,将不同处理的种子分别放置在CM平板边缘,以未经拌种的种子作为对照。将PIYC2-1-Luc菌丝块放置在CM平板中央,25℃黑暗培养3d。对样品喷施终浓度1mmol·L<sup>-1</sup>的Luciferin,使用Tanon 5200 Multi及Tanon生物图像拍摄软件拍照并进行

颜色均一化,曝光时间为2s。

1.3.5 大豆品种抗病性测定 将不同大豆品种于25℃黑暗条件下种植4d并获得黄化苗。从菌株PIYC2-1-Luc菌落边缘切取2mm×2mm菌丝块,置于CM液体培养基中,28℃、150~180r·min<sup>-1</sup>培养30h。将菌丝球分别接种于大豆黄化苗下胚轴处,25℃黑暗条件下保湿培养3d。对样品喷施终浓度1mmol·L<sup>-1</sup>的Luciferin,使用Tanon 5200 Multi及Tanon生物图像拍摄软件拍照并进行颜色均一化,曝光时间为2s。

1.4 数据分析

使用Python统计大豆拟茎点种腐病菌YC2-1菌株全基因组密码子的使用频率。使用BioEdit v7.0.9.0比对序列及分析测序结果。使用Excel 2021统计菌落直径和病斑长度等数据。使用Graphpad prism 6和Adobe Photoshop 2022制作图表。

2 结果与分析

2.1 菌株PIYC2-1-Luc稳定表达荧光素酶基因

大豆拟茎点种腐病菌的密码子偏好性如表2所示,设计并合成易在该菌中表达的荧光素酶基因*PiLuc*,其长度为1677bp(图1)。

将重组质粒转入野生型菌株YC2-1后,对平板喷施Luciferin后可见多个转化子成功表达*PiLuc*基因(图2A),共挑取27个候选转化子。将候选转化子在不含抗生素的CM平板上继代培养4代后,5个候选菌株可稳定表达*PiLuc*基因。经生长速率和致病力测定,发现菌株Luc-8和Luc-12与野生型菌株无显著差异(图2B)。选取Luc-12(命名为PIYC2-1-Luc)用于后续研究。

表2 大豆拟茎点种腐病菌YC2-1菌株全基因组密码子分析

Table 2 Analysis of codon in the whole genome of *P. longicolla* strain YC2-1

氨基酸	密码子	数量	占比	频率	氨基酸	密码子	数量	占比	频率
Amino acid	Codon	Number	Fraction/%	Frequency/%	Amino acid	Codon	Number	Fraction/%	Frequency/%
Ala	GCC	288632	38.1	34.8	Leu	TTG	98724	13.6	11.9
Ala	GCT	155098	20.5	18.7	Leu	TTA	23067	3.2	2.8
Ala	GCG	165417	21.8	19.9	Leu	CTT	107357	14.8	12.9
Ala	GCA	149112	19.7	18.0	Lys	AAA	87340	23.9	10.5
Arg	AGA	58762	11.5	7.1	Lys	AAG	278185	76.1	33.5
Arg	CGC	132994	26.1	16.0	Met	ATG	177661	100.0	21.4
Arg	CGA	68156	13.4	8.2	Phe	TTT	88330	28.9	10.6
Arg	CGG	91293	17.9	11.0	Phe	TTC	217606	71.1	26.2
Arg	CGT	59502	11.7	7.2	Pro	CCT	112554	21.8	13.6
Arg	AGG	99397	19.5	12.0	Pro	CCG	128519	24.9	15.5
Asn	AAC	202577	69.2	24.4	Pro	CCC	153131	29.7	18.5
Asn	AAT	90209	30.8	10.9	Pro	CCA	122071	23.6	14.7
Asp	GAT	167766	34.8	20.2	Ser	TCA	89388	13.4	10.8
Asp	GAC	314475	65.2	37.9	Ser	TCT	94743	14.2	11.4



表 2 ( 续 )

氨基酸	密码子	数量	占比	频率	氨基酸	密码子	数量	占比	频率
Amino acid	Codon	Number	Fraction/%	Frequency/%	Amino acid	Codon	Number	Fraction/%	Frequency/%
Cys	TGC	72345	67.3	8.7	Ser	TCG	125234	18.7	15.1
Cys	TGT	35209	32.7	4.2	Ser	AGT	59333	8.9	7.2
Gln	CAA	106422	32.1	12.8	Ser	TCC	139707	20.9	16.8
Gln	CAG	225478	67.9	27.2	Ser	AGC	160181	24.0	19.3
Glu	GAG	345114	71.0	41.6	Thr	ACA	106389	21.6	12.8
Glu	GAA	141110	29.0	17.0	Thr	ACC	175334	35.7	21.1
Gly	GGG	112024	18.4	13.5	Thr	ACT	85440	17.4	10.3
Gly	GGT	117354	19.2	14.1	Thr	ACG	124290	25.3	15.0
Gly	GGC	272794	44.7	32.9	Trp	TGG	131498	100.0	15.8
Gly	GGA	107708	17.7	13.0	Tyr	TAT	68844	31.0	8.3
His	CAC	130549	65.2	15.7	Tyr	TAC	152967	69.0	18.4
His	CAT	69530	34.8	8.4	Val	GTT	93293	18.0	11.2
Ile	ATT	93780	24.8	11.3	Val	GTG	150631	29.1	18.2
Ile	ATC	228312	60.4	27.5	Val	GTC	228392	44.1	27.5
Ile	ATA	56038	14.8	6.8	Val	GTA	45132	8.7	5.4
Leu	CTA	52099	7.2	6.3	Ter	TAG	5311	31.8	0.6
Leu	CTC	216892	29.8	26.1	Ter	TAA	3967	23.7	0.5
Leu	CTG	228721	31.5	27.6	Ter	TGA	7432	44.5	0.9

注:占比-该密码子在编码同一氨基酸的所有密码子出现次数中所占的比例;频率-该密码子在所有基因每千个密码子中出现的频率。  
Note;Fraction-Proportion of the codon in occurrences number of all codons which encode the same amino acid; Frequency-Frequency of the codon in every 1 000 codons of all genes.

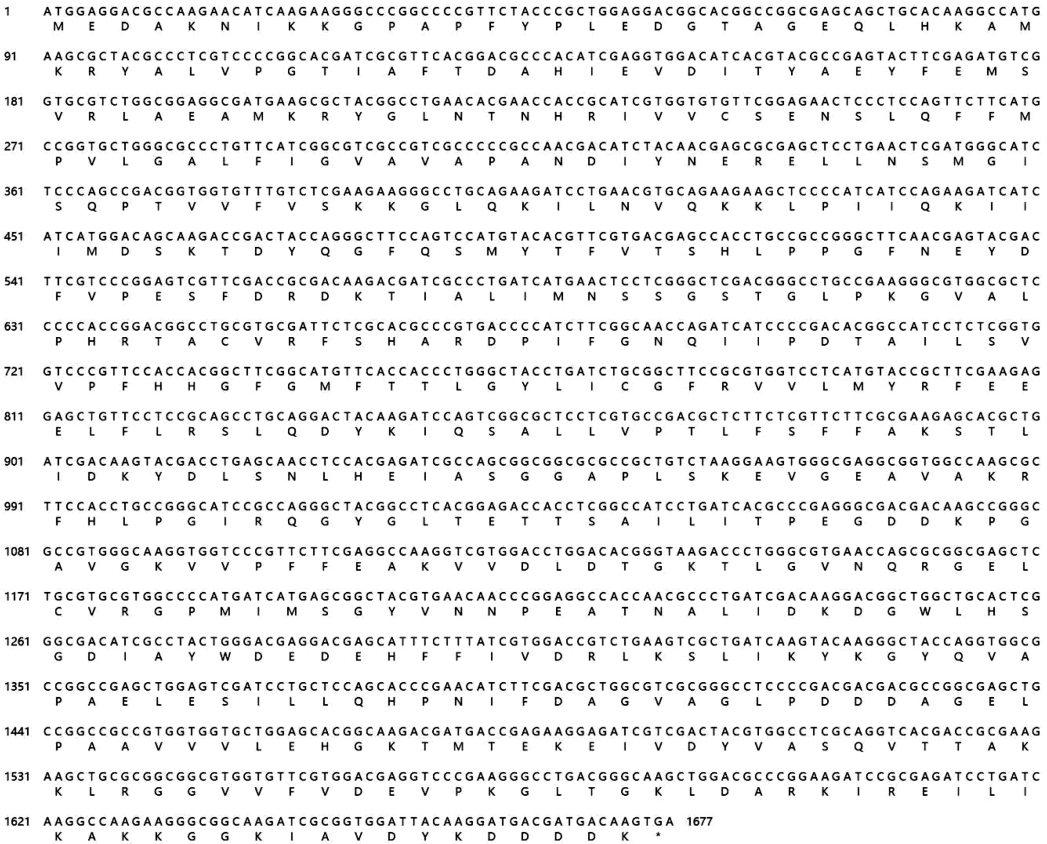
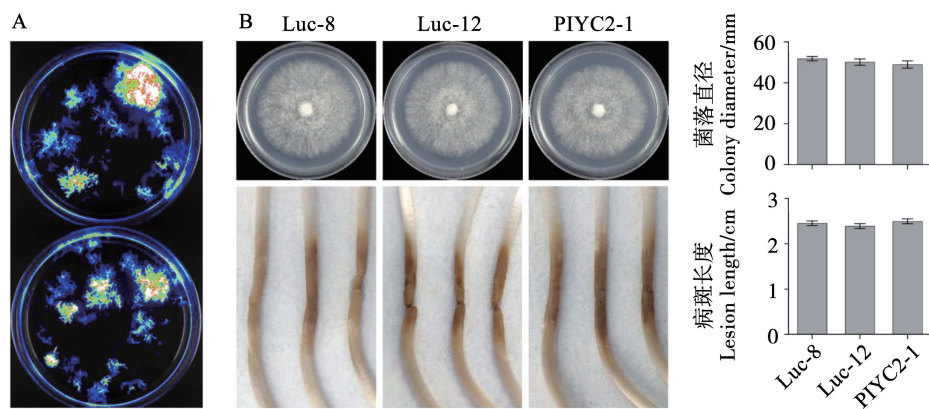


图 1 人工合成的荧光素酶基因 *PILuc* 的完整序列

Fig. 1 Complete sequence of the synthetided luciferase gene *PILuc*





注:A. 表达 *PILuc* 基因的转化菌株的筛选;B. 菌株的生长速率与致病力测定。

Note:A. Screening of transformants expressing the *PILuc* gene; B. Measurement of growth rate and pathogenicity of the indicated strains.

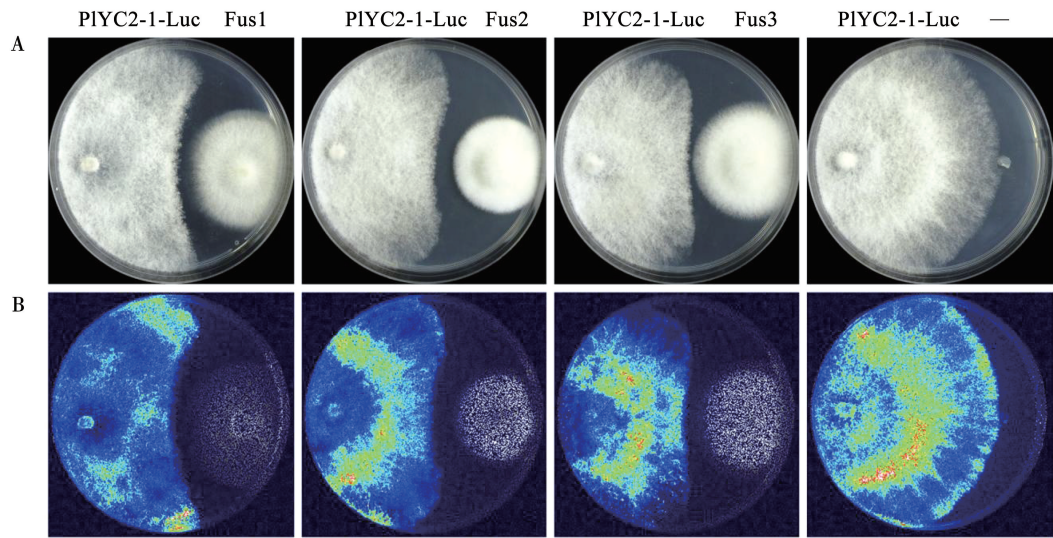
图2 荧光素酶标记菌株的筛选及生长速率与致病力测定

Fig.2 Screening of luciferase-labeled strains and analysis of their growth rate and pathogenicity

2.2 PIYC2-1-Luc 菌株应用于生防菌株拮抗效果测定

向各处理组的 CM 平板上喷施 Luciferin, 对照组 PIYC2-1-Luc 菌落形态正常, 而 3 株供试镰孢菌 (Fus1、Fus2 和 Fus3) 显著抑制菌株 PIYC2-1-Luc 生

长, 且喷施 Luciferin 后菌落边界清晰, 易于形态变化的判断(图 3)。结果表明, 3 株供试镰孢菌具有防治大豆拟茎点种腐病菌引起的病害的潜力, 该荧光素酶标记的菌株 PIYC2-1-Luc 具有应用于大规模筛选生防菌株的潜力。



注:A. 直接在白光下观察;B. 喷施 Luciferin 后成像观察。

Note:A. Observation directly under white light; B. Imaging observation after spraying Luciferin.

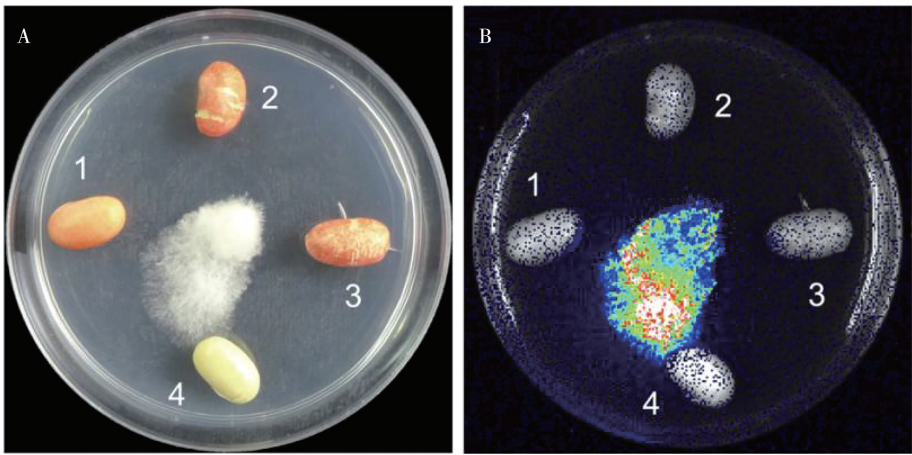
图3 荧光素酶标记菌株 PIYC2-1-Luc 用于生防菌株拮抗效果测定

Fig.3 Application of the luciferase-labeled strain PIYC2-1-Luc for measuring the antagonistic effect of biocontrol microbes

2.3 PIYC2-1-Luc 菌株应用于种衣剂拌种防效测定

将大豆种子分别用 3 种种衣剂拌种处理, 观察其对大豆拟茎点种腐病菌的抑制情况, 发现 PIYC2-1-Luc 菌落可正常扩展至对照组大豆, 而向 3 个处

理组的扩展均受到明显抑制, 且喷施 Luciferin 后菌落边界清晰, 易于形态变化的判断(图 4)。结果表明, 这 3 种种衣剂或其有效成分(部分)可用于防治大豆拟茎点种腐病菌引起的病害, 菌株 PIYC2-1-Luc 具有应用于大规模测定药剂防效或筛选新药剂的潜力。



注:A. 直接在白光下观察;B. 喷施 Luciferin 后成像观察;1. 苯醚甲环唑;2. 精甲霜灵·咯菌;3. 咯菌腈·噻霉酮;4. 未处理。

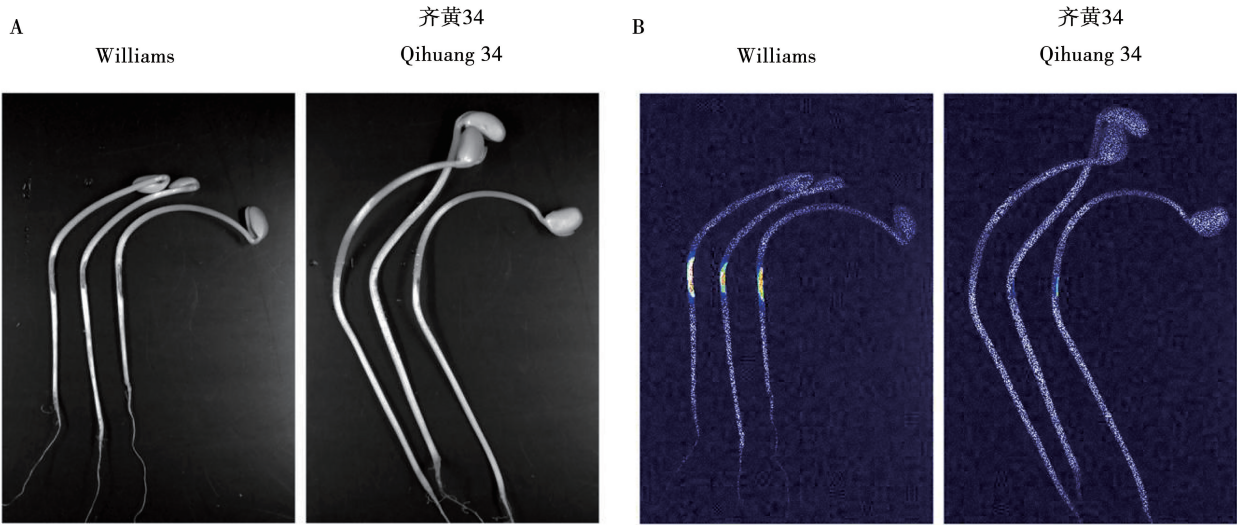
Note:A. Observation directly under white light; B. Imaging observation after spraying Luciferin;  
1. Difenconazole; 2. Mefenoxam + fludioxonil; 3. Fludioxonil + benzothiazolinone; 4. No treatment.

图 4 荧光素酶标记菌株 PIYC2-1-Luc 应用于种衣剂拌种防效测定  
g. 4 Application of the luciferase-labeled strain PIYC2-1-Luc for measuring the effect of fungicide seed coating treatment

2.4 PIYC2-1-Luc 菌株应用于大豆品种抗病性测定

将菌株 PIYC2-1-Luc 接种于不同大豆品种黄化苗下胚轴,3 d 后喷施 Luciferin 并观察病斑扩展情况,发现接种 PIYC2-1-Luc 的大豆均可见病斑,且病斑界限明显,易于判断。两个大豆品种的病斑面积

具有显著差异,大豆品种 Williams 接种处荧光面积明显大于齐黄 34(图 5)。结果表明,齐黄 34 对大豆拟茎点种腐病菌 *P. longicolla* 具有较强抗性,荧光素酶标记的菌株 PIYC2-1-Luc 有助于品种抗病性测定,并具有大规模筛选大豆抗拟茎点种腐病资源的应用潜力。



注:A. 直接在白光下观察;B. 喷施 Luciferin 后成像观察。  
Note:A. Observation directly under white light; B. Imaging observation after spraying Luciferin.

图 5 荧光素酶标记菌株 PIYC2-1-Luc 应用于大豆品种抗病性测定  
Fig. 5 Application of the luciferase-labeled strain PIYC2-1-Luc for measuring disease resistance of soybean varieties



3 讨论

荧光素酶示踪与荧光蛋白示踪两种方法被广泛应用于微生物示踪<sup>[20-21]</sup>。相比于需要激发光激发的荧光蛋白示踪方法,荧光素酶示踪方法在应用时只需喷施特定的底物,且可用于完整个体的研究而非单个细胞,更适用于病原微生物的整体表型观测。由于同义密码子在翻译过程中使用的频率不一致,即具有“密码子偏好性”,其直接影响蛋白质的表达,所以密码子优化是实现异源基因高效表达的关键<sup>[22]</sup>。本研究利用生物信息学方法分析了大豆拟茎点种腐病菌的密码子偏好性,进而优化荧光素酶基因,并将其转入大豆拟茎点种腐病菌中,以实现荧光素酶基因在该菌中的高效表达。此外,外源基因在菌株基因组上的随机整合可能影响菌株自身基因的表达。为获得基本生物学特性未受影响的荧光素酶标记菌株,本研究进行多次继代筛选,得到5株稳定表达荧光素酶的候选菌株,测定其在培养基上的生长速率和对寄主植物大豆的致病力,最终获得高效并稳定表达荧光素酶基因且生长速率和致病力与野生型一致的菌株 PIYC2-1-Luc。

目前,大豆拟茎点种腐病菌引起的拟茎点种腐病已成为黄淮海大豆生产中的三大主要病害之一<sup>[23]</sup>,加快挖掘病害防控资源、发展病害防控技术尤为迫切。生物防治具有环境友好、对人畜安全和病原不易产生抗药性等特点,是植物病害绿色防控的一大助力<sup>[24-26]</sup>。随着生物信息学的快速发展,对有益微生物的研究逐渐从二元互作模式拓展至整个植物微生物组,生物防治的研究更加深入<sup>[12, 27]</sup>。种衣剂拌种是有效预防种传病害的关键措施,但目前利用杀菌剂防治大豆拟茎点种腐病的研究相对滞后,且由于耕作制度和气候条件的差异,部分杀菌剂,如吡唑醚菌酯,其防效具有显著差异<sup>[28-29]</sup>。种植抗病品种是最绿色和根本有效的防控措施,而收集抗病资源是培育抗病品种的第一步,目前已从62个大豆主栽品种中筛选出13个抗病品种<sup>[11]</sup>,仍需扩大筛选规模,准确掌握我国大豆资源的抗性情况。本研究探讨荧光素酶标记菌株 PIYC2-1-Luc 的应用效果,结果表明,3株内生镰孢菌和3种种衣剂具有防治大豆拟茎点种腐病的潜力,大豆品种齐黄34对该病害具有一定抗性,该荧光素酶标记菌株可

用于测定生防菌株拮抗效果、种衣剂拌种防效和大豆品种抗病性。在喷施荧光素后,菌株 PIYC2-1-Luc 菌落边缘相比未标记菌株更加清晰,易于判别。评价品种抗性时,病斑界限和病斑大小易于观察和比较,具有灵敏和快捷特点。因此,该菌株可应用于大规模筛选病害防控资源。

4 结论

将根据密码子偏好性进行优化的荧光素酶基因转入大豆拟茎点种腐病菌,经过多次继代和筛选获得高效且稳定表达荧光素酶的候选菌株。菌株 PIYC2-1-Luc 与野生型的生长速率和致病力无显著差异。应用该菌株进行生防菌株拮抗效果、种衣剂拌种防效和大豆品种抗病性测定表明,该荧光素酶标记方法具有较好的有效性和稳定性,所获菌株具有大规模筛选病害防控资源的潜力。

参考文献

[1] ZHAO X L, LI K N, ZHENG S J, et al. *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of soybean stem blight in China [J]. *Plant Disease*, 2022, 6(11): 2892-2903.

[2] MENGISTU A, CASTLEBURY L A, SMITH J R, et al. Isolates of *Diaporthe-Phomopsis* from weeds and their effect on soybean [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2007, 29(3): 283-289.

[3] XUE A G, MORRISON M J, COBER E, et al. Frequency of isolation of species of *Diaporthe* and *Phomopsis* from soybean plants in Ontario and benefits of seed treatments [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2007, 29(4): 354-364.

[4] LI S X. *Phomopsis* seed decay of soybean [M]//SUDARIC A. *Soybean-Molecular aspects of breeding*. IntechOpen, 2011: 277-292.

[5] CUI Y L, DUAN C X, WANG X M, et al. First report of *Phomopsis longicolla* causing soybean stem blight in China [J]. *Plant Pathology*, 2009, 58(4): 799.

[6] SHAN Z, LI S, LIU Y, et al. First report of *Phomopsis* seed decay of soybean caused by *Phomopsis longicolla* in South China [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(11): 1693.

[7] CHEN X, PAN R, XU D, et al. First report of soybean stem blight caused by *Phomopsis longicolla* in Guangdong province, southern China [J]. *Plant Disease*, 2013, 97(6): 844.

[8] XUE C S, LU Y Y, XIAO S Q, et al. First report of *Phomopsis longicolla* causing leaf spot on soybean in China [J]. *Plant Disease*, 2015, 99(2): 290.

[9] LIU H, PANG L, LU X, et al. First report of *Phomopsis*



longicolla associated with postharvest fruit rot of kiwifruit in China [J]. Plant Disease, 2020, 104(2): 579-580.

[10] HU J, ZHOU Q, SHI C, et al. First report of *Phomopsis longicolla* causing stem canker of eggplant in Fujian province, China [J]. Plant Disease, 2021, 105(10): 965.

[11] 赵晓林, 李凯楠, 郑素娇, 等. 一种大豆对拟茎点茎枯病抗性鉴定技术体系的构建[J]. 植物病理学报, 2022, 52(6): 959-966. (ZHAO X L, LI K N, ZHENG S J, et al. Establishment of a technical system for the identification of soybean resistance to *Phomopsis* stem blight [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2022, 52(6): 959-966. )

[12] XU S, LIU Y X, CERNAVA T, et al. Fusarium fruiting body microbiome member *Pantoea agglomerans* inhibits fungal pathogenesis by targeting lipid rafts [J]. Nature Microbiology, 2022, 7(6): 831-843.

[13] ZHANG X F, LI Q Y, WANG M, et al. 2E, 4E-decadienoic acid, a novel anti-oomycete agent from coculture of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* [J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e0154222.

[14] 夏敏杰, 缪建成, 胡晶莹, 等. 稳定表达荧光素酶的人乳腺癌 MCF-7 细胞的构建[J]. 毒理学杂志, 2022, 36(2): 142-146. (XIA M J, MIAO J C, HU J Y, et al. Establishment of the human breast cancer MCF-7 cells line stably expressing luciferase [J]. Journal of Toxicology, 2022, 36(2): 142-146. )

[15] 林御星. 萤火虫生物发光探针在疾病标记物检测以及相关疾病模型中的应用[D]. 山东: 山东大学, 2019. (LIN Y X. Bioluminescent probes based on firefly luciferase for detection of disease biomarkers and its applications in related animal models [D]. Shandong: Shandong University, 2019. )

[16] KOCHER B, PIWNICA-WORMS D. Illuminating cancer systems with genetically engineered mouse models and coupled luciferase reporters *in vivo* [J]. Cancer Discovery, 2013, 3(6): 616-629.

[17] AZAD T, TASHAKOR A, HOSSEINKHANI S. Split-luciferase complementary assay: Applications, recent developments, and future perspectives [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(23): 5541-5560.

[18] JACOBSEN I D, LUTTICH A, KURZAI O, et al. *In vivo* imaging of disseminated murine *Candida albicans* infection reveals unexpected host sites of fungal persistence during antifungal therapy [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(10): 2785-2796.

[19] ZHANG C, ZHANG H, ZHENG X, et al. Functional characterization of two cell wall integrity pathway components of the MAPK cascade in *Phomopsis longicolla* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2023, 36(1): 47-58.

[20] SYED AB RAHMAN S F, SINGH E, PIETERSE C M J, et al. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens [J]. Plant Science, 2018, 267: 102-111.

[21] TSIEN R Y. The green fluorescent protein [J]. Annual Review of Biochemistry, 1998, 67: 509-544.

[22] PLOTKIN J B, KUDLA G. Synonymous but not the same: The causes and consequences of codon bias [J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12(1): 32-42.

[23] 叶文武, 刘万才, 王源超. 中国大豆病虫害发生现状及全程绿色防控技术研究进展[J/OL]. 植物保护学报, 2023, 50(2): 265-273. (YE W W, LIU W C, WANG Y C. Occurrence status and whole-process green control technologies for soybean diseases and pests in China [J]. Journal of Plant Protection, 2023, 50(2): 265-273.

[24] MOLINA-SANTIAGO C, PEARSON J R, NAVARRO Y, et al. The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1919.

[25] ZHANG F, GE H, ZHANG F, et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloee against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 100: 64-74.

[26] HU J, ZHENG M, DANG S, et al. Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* LYZ69 against anthracnose of alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Phytopathology, 2021, 111(8): 1338-1348.

[27] SHALEV O, KARASOV T L, LUNDBERG D S, et al. Commensal *Pseudomonas* strains facilitate protective response against pathogens in the host plant [J]. Nature Ecology & Evolution, 2022, 6(4): 383-396.

[28] BATZER J C, MUELLER D S. Soybean fungal endophytes *Alternaria* and *Diaporthe* spp. are differentially impacted by fungicide application [J]. Plant Disease, 2020, 104(1): 52-59.

[29] MENGISTU A, KELLY H M, ARELLI P R, et al. Effects of tillage, cultivar and fungicide on *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kukuchii* in soybean [J]. Crop Protection, 2015, 72: 175-181.

[30] DE LAMO F J, TAKKEN F L W. Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 37.