

浙江省大豆红冠腐病的病原菌鉴定

盖云鹏, 黄子凌, 陈好好, 周乔俐, 马海杰, 李红叶

(浙江大学 农业与生物技术学院 生物技术研究所, 浙江 杭州 310058)

摘 要:大豆红冠腐病 (red crown rot of soybean, RCR) 是世界范围内的重要的大豆病害之一, 病害症状为罹病植株茎基部变红, 表面聚集了大量橙红色球状子囊壳。对采自浙江省桐庐县的疑似大豆红冠腐病的病原进行分离和培养, 从分离获得的菌株中选择 1 个代表菌株 ZJHZ01 进行后续试验和分析, 为浙江省大豆产区的红冠腐病的防控提供依据。致病性测定结果表明: 菌株 ZJHZ01 接种大豆茎基部可引起发病, 回接症状与田间自然发病症状较为相似。病原菌落初为白色, 后变为鹅黄色, 菌落中可产生大量红褐色微菌核和厚垣孢子, 在 PDA、V8 和康乃馨叶片培养基中极易产生子囊孢子, 与已报道的大豆红冠腐病菌的菌落形态特征相似, 初步认为 ZJHZ01 为冬青丽赤壳 (*Calonectria ilicicola*)。进一步在分子生物学水平上, 对其 *TUB*、*HIS* 和 *EF-1 α* 序列进行 PCR 扩增和测序, 对比 GenBank 中已经录入的丽赤壳属相应序列。基于以上 3 种基因联合序列, 通过采用邻接法构建了的系统发育树。结果表明: 菌株 ZJHZ01 与 GenBank 中 *C. ilicicola* 菌株 GDBL01 存在着极高的同源性, 序列相似度达到了 99% 以上。通过对浙江省桐庐地区大豆产区的大豆病株的病原菌进行致病性、形态学和分子生物学分析, 明确了浙江省桐庐大豆产区的红冠腐病是由 *C. ilicicola* 侵染所致, 这是该病害在浙江省的首次报道。

关键词:大豆; 红冠腐病; 冬青丽赤壳; 病原鉴定

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 06. 0986

Identification of Red Crown Rot of Soybean Caused by *Calonectria ilicicola* in Zhejiang Province, China

GAI Yun-peng, HUANG Zi-lin, CHEN Hao-hao, ZHOU Qiao-li, MA Hai-jie, LI Hong-ye
(Institute of Biotechnology, College of Agriculture of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Red crown rot (RCR) is one of worldwide fungal diseases in soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. It causes yield loss and seed quality deficiency seriously. The objective of this study is to identify the pathogen causing stem rot on soybean in Zhejiang province, and to provide an IPM strategy for disease control. Typical symptoms of the disease were red discoloration at the base of the soil line with numerous reddish perithecia on the lesion surface. Diseased samples were collected from Tonglu County, Zhejiang province and ascospore suspensions were placed on potato dextrose agar (PDA) plate. One representative isolate ZJHZ01 was chosen for morphological and molecular study. Pathogenicity was verified by conidial suspension inoculation on the basal stems of soybean cultivars. The colonial morphology was basically white, and the colonies tend to change into brown. Numerous yellowish-brown microsclerotia and chlamydospores were consistently formed on colonies. Orange-to-reddish perithecia had formed in old cultures of PDA, V8 and carnation leaf agar. Based on the morphology and pathogenicity analysis, the strain ZJHZ01 was primarily identified as *Calonectria ilicicola* Boedijn & Reitsma. In addition, the molecular identification of representative strain ZJHZ01 was conducted, and the *TUB*, *HIS* and *EF-1 α* gene were amplified and sequenced and compared with sequences deposited in GenBank. The NJ phylogenetic trees were constructed by comparison with strain ZJHZ01 and reference strains. Comparing with other known *Calonectria* sp. in GenBank, the three genes of ZJHZ01 shared high sequences homology with GDBL01 at a level of 99% similarity. Identification of the pathogen was based on morphology of colony and conidial, pathogenicity and phylogenetic analysis. This is the first report of red crown rot of soybean caused by *C. ilicicola* in Zhejiang Province, China.

Keywords: Soybean; Red crown rot; *Calonectria ilicicola*; Pathogen identification

收稿日期:2016-05-24
基金项目:浙江大学大学生科研训练计划(2015032199)。
第一作者简介:盖云鹏(1986-),男,博士,主要从事植物病原真菌学与生物信息学研究。E-mail:gaiy@zju.edu.cn。
通讯作者:李红叶(1963-),女,博士,教授,主要从事植物病原真菌学与分子植物病理学研究工作。E-mail:hyli@zju.edu.cn。

大豆[*Glycine max* (L.) Merr]是我国重要的粮食和经济作物,富含蛋白质、脂肪、碳水化合物和各种维生素,在人们生活中占有重要地位。大豆也是浙江省的重要经济作物,每年面积约为 13 万 hm²,具有明显的区域性特色,主要以种植鲜食大豆、菜用大豆为主^[1]。随着栽培面积的不断扩大,大豆病害日益突出,严重影响和制约大豆产业的发展^[2]。浙江省大豆常见病害主要有霜霉病[*Peronospora manshurica* (Naum.) Syd.]、炭疽病(*Glomerella glycines* Lehman & Wolf)、灰斑病[*Cercosporidium sojinum* (Hara) X. J. Liu & Y. L. Guo]、褐斑病(*Mycosphaerella sojae* Hori)、黑斑病(*Alternaria atrans* Gibson)、紫斑病[*Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoy.) Gardner]、枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. *tracheiphilum* Snyder & Hansen)、锈病(*Phakopsora pachyrhizi* Sydow.)、细菌性斑点病(*Pseudomonas glycinea* Coerper)和多种病毒病等,这些病害发生普遍,分布广泛,严重影响了大豆产量和品质^[3]。

最近,在浙江省杭州市桐庐县大豆产区发现一种为害大豆根茎部的病害,典型症状表现为叶片发黄,脉间组织逐渐变褐,最后全株落叶枯死。发病植株离地面 3~8 cm 的茎基部变红,表面伴有大量橙红色球状子实体聚集,疑似是大豆红冠腐病(red crown rot of soybean)^[4],目前该病害在浙江省尚未报道。大豆红冠腐病是大豆上一种重要病害,因其为害根茎部,轻则引起产量下降,品质变劣,重则引起整株死亡^[5]。本文对浙江省桐庐地区的大豆新病害进行了病样采集、病原分离培养、形态学鉴定、致病性测定和分子生物学鉴定,旨在为浙江省大豆红冠腐病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离和培养

2015 年 9 月,从浙江省桐庐县江南镇的 2 个发病大豆田块随机采集病株若干,在实验室用常规方法镜检病原。用灭菌的接种针从病株茎基部挑取橙红色子囊壳,将子囊壳放入无菌水中,用移液器枪头反复吸打多次,然后将子囊壳放置在铺有灭菌滤纸的灭菌培养皿上,自然晾干。用灭菌接种针挑取该子囊壳再次放入新的灭菌水中,反复吸打,再次放置在新的灭菌滤纸上,如此重复冲洗 3 次。将子囊壳放置在 2 mL 灭菌离心管中,用镊子压碎子囊

壳,加入 1 mL 无菌水,制成子囊孢子悬浮液母液。从母液中取 100 μL 加入至 1 mL 无菌水中,制成孢子悬浮液的二级母液。从二级母液中取 100 μL 加入至 1 mL 无菌水中,制成孢子悬浮液的三级母液。分别从孢子悬浮液各级母液中取 200 μL,均匀涂布至添加 50 μg·mL⁻¹ 硫酸链霉素的 PDA 培养基上,自然晾干。在 25℃ 恒温培养箱培养 3 d 后,从培养基上挑取单菌落,转移至新的 PDA 平皿,获得的单孢菌株保存于 PDA 试管斜面,置 4℃ 冰箱中储存备用。

1.2 致病性测定

纯化后的菌株在 V8 培养基上 25℃ 培养 14 d,用无菌水洗下分生孢子,配制成浓度为 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 的分生孢子悬浮液。用无菌注射器无伤接种至播种 30 d 的健康大豆植株(大豆品种为中黄 37)茎基部,接种菌量为 5 mL·株⁻¹,共接种 30 株大豆。以注射清水作为对照。接种后植株置于温室中,昼夜温度 16~28℃,湿度 65%~85%。每天观察和记录接种大豆植株的发病情况。调查结束后,从病株上再分离病原菌。

1.3 病原菌形态学鉴定

将供试菌株接种到 PDA 平板、V8 培养基^[6]、康乃馨叶片培养基(carnation leaf agar, CLA)^[7]上,25℃ 培养箱培养 7~28 d 后,观察菌落形态特征,在光学显微镜下观察病原菌子囊壳、子囊孢子、分生孢子形态,并测量其大小,拍照记录。

1.4 病原菌的分子鉴定

1.4.1 基因组 DNA 提取 将病原菌接种到 PDB 液体培养基中,在 28℃,180 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 3~4 d,过滤收集菌丝体,风干后,采用 CTAB 方法^[8]提取 DNA。

1.4.2 PCR 扩增和测序 利用引物 T1/Bt2b 扩增 β-tubulin 基因(*TUB*),引物序列为 T1:5'-AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3'; Bt2b:5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3'。利用 CylHIS3F/CylHIS3R 扩增组蛋白 *Histone* 基因(*HIS*),引物序列为 CylHIS3F:5'-AGG TCC ACT GGT GGC AAG-3'; CylHIS3R:5'-AGC TGG ATG TCC TTG GAC TG-3'。利用 EF1-728F/CylIEF-R2 扩增延伸因子基因(*EF-1α*),引物序列为 EF1-728F:5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3'; CylIEF-R2:5'-CAT GTT CTT GAT GAA (A/G)TC ACG-3'^[9]。PCR 体系为 25 μL,其

中,10 × buffer (Mg²⁺ plus) 3 μL, dNTP Mixture 2 μL, EX Taq polymerase 0.3 μL, 10 μmol·L⁻¹ primers 各 1 μL, DNA 模版 10 ng, 灭菌 ddH₂O 补足 25 μL。β-tubulin 基因的扩增条件为 96℃ 预变性 2 min, 96℃ 15 s, 55℃ 30 s, 75℃ 35 s, 共 35 个循环, 最后 75℃ 延伸 2 min。HIS 基因和 EF-1α 的扩增条件为 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至杭州擎科梓熙生物技术有限公司测序。

1.4.3 序列比对及系统发育树构建 将测序结果在 GenBank 数据库中进行同源性序列分析, 从基因数据库中下载相似度高的相应基因序列, 进行同源性分析。采用 MEGA 4.0^[10] 中的邻接法 (neighbor-joining analysis, NJ) 对不同菌株的 TUB、HIS 和 EF-1α 联合序列进行系统发育树分析, 利用自展法

(bootstrap) 检验各分支的支持率 (bootstrap proportions, BP), 1 000 次重复。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离和致病性测定

从发病植物组织中共分离得到 3 个菌株, 因培养性状和形态上均一致, 选择菌株 ZJHZ01 为代表菌株进行形态学特征和致病性测定。将菌株 ZJHZ01 接种至大豆植株的茎基部约 30 d 后, 植株开始出现叶黄萎焉症状 (图 1a), 茎基部表皮层裂开, 呈鲜红色腐烂 (图 1b)。该试验重复一次, 发病率均为 100%。对照大豆植株未见发病。接种发病症状与田间病株症状相一致。从接种植株茎基部的发病部位分离到与接种菌株菌落生长性状和孢子形态相同的病原菌, 符合柯赫氏法则。



a: 接种大豆植株的叶片发黄;b: 接种大豆植株的茎基部出现红褐色病斑。
a: The leaves turned yellow after inoculation of strains ZJHZ01;b: Reddish brown lesions girdled the basal stems.

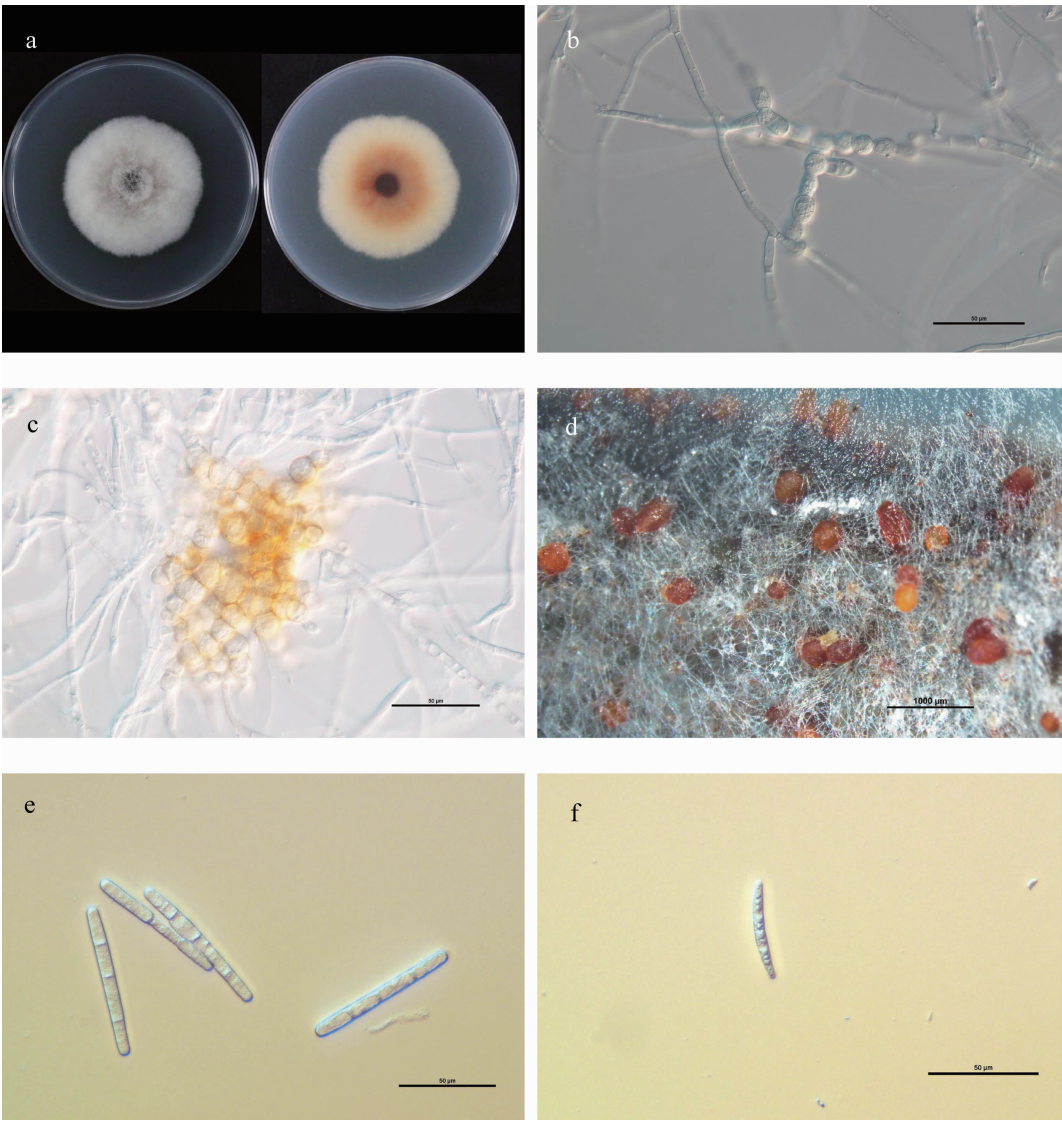
图 1 分离菌株 ZJHZ01 在大豆茎基部的回接症状

Fig. 1 Symptom of inoculated stems with *C. ilicicola* strain ZJHZ01

2.2 病菌培养特征和形态

菌株 ZJHZ01 在 PDA 初生菌丝为白色, 逐渐变成鹅黄色, 菌落性状规则, 质地致密, 7 d 后产生微菌核, 并有深褐色可溶性色素形成, 渗入培养基 (图 2a)。病原可产生菌厚垣孢子, 成串, 深褐色, 近圆形 (图 2b)。菌丝还可聚集形成初浅红褐色微菌核 (图 2c)。该真菌为同宗配合, PDA 培养基上培养 30 d 后即可形成少量子囊壳。在 V8 培养基上菌丝为灰白色, 菌落形状规则, 但质地稀疏, 不产生色素, 21 d 后形成大量红橙色子囊壳。在 CLA 培养基上培养 28 d 后即形成大量的子囊壳 (图 2d)。病菌分生孢梗呈扫帚状, 二叉或三叉分支, 分生孢子梗

顶端的产孢细胞瓶状, 分生孢子梗末端长有圆球状泡囊, 分生孢子圆柱形, 刚直, 无色, 1 ~ 3 个, 多为 3 个分隔, 40.7 ~ 68.0 × 5.8 ~ 8.5 μm (图 2e)。子囊壳橙红色, 椭球形, 表面粗糙, 220 ~ 450 × 120 ~ 300 μm。轻压后可见大量子囊从孔口喷出, 子囊棍棒状, 具长柄, 内含 8 个子囊孢子。子囊孢子梭形, 纺锤形, 稍弯曲, 两端钝圆, 1 ~ 3 个隔膜, 32.2 ~ 54.0 × 4.1 ~ 7.2 μm (图 2f)。根据菌株的形态特征, 参照文献对 *C. ilicicola* 的特征描述, 初步确定菌株 ZJHZ01 为冬青丽赤壳 (*Calonectria ilicicola* Boedijn & Reitsma)^[11]。



a: 分离菌株 ZJHZ01 在 PDA 上的培养性状(左边, 正面; 右边, 背面); b: 厚垣孢子; c: 微菌核; d: 子囊壳; e: 分生孢子; f: 子囊孢子。

a: Colony on PDA of *C. ilicicola* strain ZJHZ01 (left surface side, right reverse side); b: Chlamydospore; c: Microsclerotia; d: Perithecia on the Carnation leaf agar; e: Conidia; f: Ascospores.

图 2 大豆红冠腐病分离菌株的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of *C. ilicicola* strain ZJHZ01

2.3 分子鉴定

对供试菌株 ZJHZ01, 分别扩增 *TUB*、*HIS* 和 *EF-1α* 共 3 个基因位点的相应序列。将扩增产物进行回收、纯化和测序, 分别获得 600, 451 和 499 bp 的核苷酸片段。通过 BLAST 序列一致性比对检索, 结果表明分离菌株 ZJHZ01 与冬青丽赤壳 (*C. ilicicola*) 菌株 GDBL01 (*TUB*: GU073284; *HIS*: JQ973140; *EF-1α*: JQ973174) 各序列相似度达 99% 以上。向 GenBank 提交 *TUB*、*HIS* 和 *EF-1α*, 得到序列登录号分别为 KT943520、KT943521 和 KT943522。根据上

述病原菌的形态特征、致病性测定以及分子鉴定结果, 将浙江省发生的大豆红冠腐病菌鉴定为冬青丽赤壳 (*C. ilicicola*)。

进一步利用 MEGA 4.0 软件采用 NJ 法建立系统发育树, 结果表明菌株 ZJHZ01 与来自不同地理位置或不同寄主来源的 *C. ilicicola* 菌株都聚在同一个大的分支上, 其中, ZJHZ01 与广东省惠州市博罗县的大豆红冠腐病 *C. ilicicola* 菌株 C-GDBL01 同源性最高(图 3)。

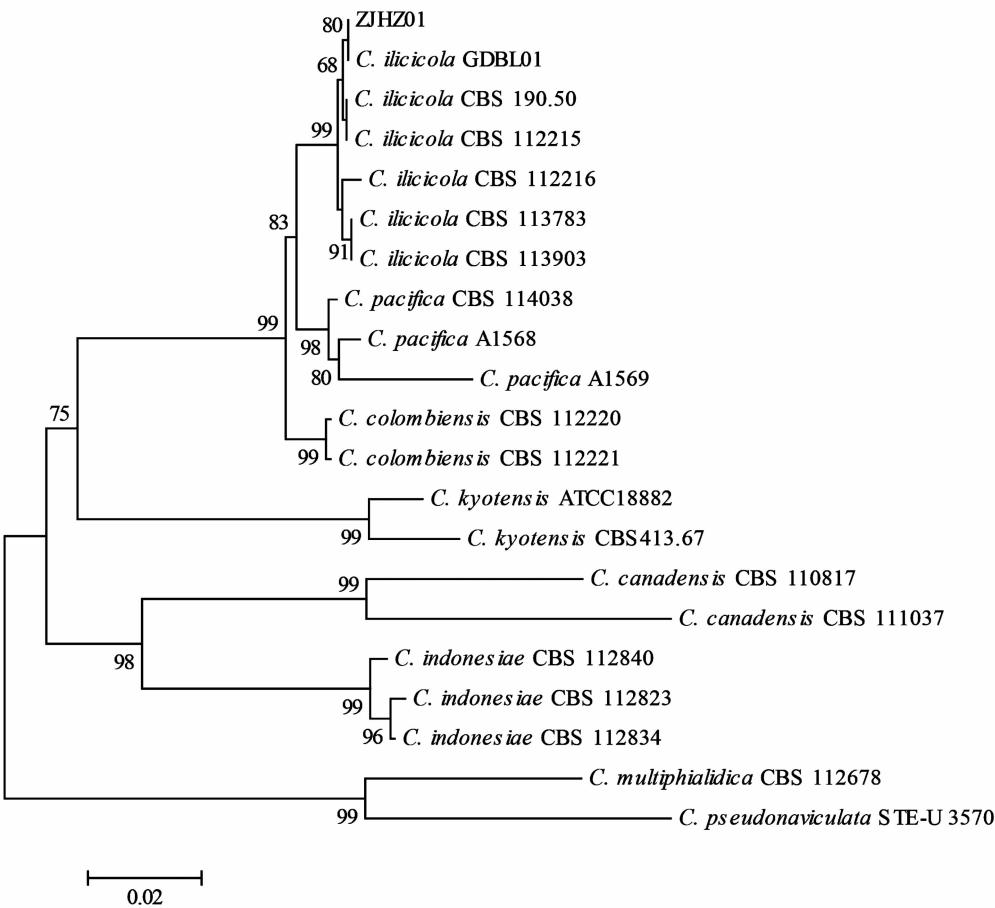


图3 大豆红冠腐病菌株 ZJHZ01 与丽赤壳属相关种的系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree illustrating relationships of *C. ilicicola* strain ZJHZ01 and *Calonectria* sp.

3 结论与讨论

大豆红冠腐病在世界重要大豆产区,包括日本、韩国和美国均有报道。*C. ilicicola* 也可侵染花生 (*Arachis hypogaea* L.), 引起花生黑腐病 (Cylindrocladium black rot of peanut, CBR) [12]。在 2007 年,我国将花生黑腐病菌列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中。在该检疫名录中使用了冬青丽赤壳的无性阶段的拉丁名 (*Cylindrocladium parasiticum*) [13], 但根据最新的《国际藻类、真菌及植物命名法则》和阿姆斯特丹宣言的最新真菌分类命名法则 [14], *C. ilicicola* 无性阶段的拉丁名已不再使用。尽管 *C. ilicicola* 引起花生黑腐病是检疫性病害, 但该病原菌引起大豆红冠腐病是否也属于检疫性病害, 尚待商榷。

在田间诊断和鉴定时, 大豆新赤壳菌茎腐病 (*Neocosmospora* stem rot of soybean) 与大豆红冠腐病较难区分。大豆新赤壳菌茎腐病的病原是侵脉新

赤壳 (*Neocosmospora vasinfecta* E. F. Smith), 其典型症状是罹病大豆叶片黄化和早衰, 茎基部和主根可见红色子囊壳 [15]。两种病原菌的主要区别在于: *N. vasinfecta* 子囊孢子为椭圆形, *C. ilicicola* 子囊孢子为纺锤形 [16]。

本研究通过病原菌形态学和分子生物学特征, 以及致病性测定, 首次证明大豆红冠腐病在浙江省的发生和危害。除浙江省之外, 大豆红冠腐病在中国云南省 [17] 和广东省 [18] 也有报道。从结果可知, 病菌在田间和培养条件下不仅均可产生大量的分生孢子和子囊孢子, 还可形成厚垣孢子和微菌核, 是典型的土传和种传病害。田块一旦发过病就可残留抗逆性能强的病菌子囊壳、微菌核和厚垣孢子, 给连作带来困难 [19]。为预防红冠腐病, 繁殖大豆种子应该选择无病区或无病的田块, 播种前应对种子进行消毒处理。此外, 对有发病的田块, 注意进行水旱轮种, 或与其它非豆科作物轮作 [20]。

参考文献

[1] 朱丹华. 2010 年浙江省大豆生产调研报告[J]. 大豆科技, 2010(6):25-26. (Zhu D H. Research report on soybean production in Zhejiang province in 2010[J]. Soybean Science and Technology,2010(6):25-26.)

[2] 刘欣,姚晗珺,章强华,等. 浙江省出口菜用大豆使用农药现状及风险分析[J]. 大豆科学, 2011, 30(2):298-302 (Liu, X, Yao H J, Zhang Q H, et al. Status of pesticide and risk analysis of exporting vegetable soybeans in Zhejiang province[J]. Soybean Science,2011,30(2):298-302.)

[3] 葛起新,戎文治. 浙江植物病虫害病害篇[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991. (Ge Q X, Rong W Z. Diseases of plant diseases and insect pests in Zhejiang[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991)

[4] 盖云鹏,潘汝谦,关铭芳,等. 一种值得关注的大豆病害—大豆红冠腐病[J]. 植物保护, 2014, (4):118-121. (Gai Y P, Pan R Q, Guan M F, et al. A notable soybean disease of red crown rot of soybean[J]. Plant Protection, 2014(4):118-121.)

[5] Kuruppu P U, Schneider R W, Russin J S. Effects of soil temperature on microsclerotia of *Calonectria ilicicola* and soybean root colonization by this fungus[J]. Plant Disease, 2004, 88 (6): 620-624.

[6] 潘汝谦,关铭芳,徐大高,等. 花生黑腐病菌的生物学特性[J]. 华中农业大学学报, 2012, 30 (6):701-706. (Pan R Q, Guan M F, Xu D G, et al. Biological characteristics of *Cylindrocladium parasiticum*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 30 (6): 701-706.)

[7] Fisher N L, Burgess L W, Toussoun T A, et al. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species[J]. Phytopathology, 1982, 8(2):1041 - 1049.

[8] 刘少华,陆金萍,朱瑞良,等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法[J]. 植物病理学报, 2005, 35(4):362-365. (Liu S H, Lu J P, Zhu R L, et al. A rapid and simple extraction method for plant pathogenic fungi[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(4):362-365.)

[9] Crous P W, Groenewald J Z, Risède J M, et al. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: Species with sphaeropedunculate vesicles[J]. Studies in Mycology, 2004, 18:415-430.

[10] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596-1599.

[11] Crous P W, Wingfield M J, Alfenas A C. *Cylindrocladium parasiticum*, sp. nov. a new name for *C. crotalariae*[J]. Mycological Research, 1993, 97 (7):889-896.

[12] Pan R Q, Guan M F, Xu D G, et al. *Cylindrocladium* black rot caused by *Cylindrocladium parasiticum*, newly reported on peanut in China[J]. Plant Pathology, 2009, 58(6):1176-1176.

[13] 盖云鹏,潘汝谦,徐大高,等. 进境检疫性有害生物—寄生帚梗柱孢霉[J]. 植物检疫, 2014, 28 (4):76-81. (Gai Y P, Pan R Q, Xu D G, et al. Quarantine plant pathogen-*Cylindrocladium parasiticum*[J]. Plant Quarantine,2014, 28 (4):76-81.)

[14] Hawksworth D L, Crous P W, Redhead S A, et al. The amsterdam declaration on fungal nomenclature[J]. Mycotaxon, 2011, 116(1):105-112.

[15] Greer A M, Spurlock T N, Coker C M. First report of *Neocosmospora* stem rot of soybean caused by *Neocosmospora vasinfecta* in Arkansas[J]. Plant Disease, 2015, 99 (4):554-554.

[16] Sun S L, Kim M Y, Van K, et al. First report of *Neocosmospora vasinfecta* var. *vasinfecta* causing soybean stem rot in South Korea [J]. Plant Disease, 2014, 98 (12):1744-1744.

[17] Ma Z H, Zhang Z D, Wang Y X, et al. *Cylindrocladium crotalariae*, causing red crown rot of soybean in China[J]. Plant Pathology, 2004, 53(4):537-537.

[18] Guan M F, Pan R Q , Gao X G, et al. First report of red crown rot caused by *Cylindrocladium parasiticum* on soybean in Guangdong, southern China [J]. Plant Disease, 2010, 94 (4): 485-485.

[19] Kuruppu P, Schneider R, Russin J. Factors affecting soybean root colonization by *Calonectria ilicicola* and development of red crown rot following delayed planting[J]. Plant disease, 2004, 88 (6): 613-619.

[20] Sidebottom J R, Beute M K. Inducing soil suppression to *Cylindrocladium* black rot of peanut through crop rotations with soybean [J]. Plant Disease, 1989, 73 (8): 679-685.