



北京地区大豆叶斑病病原菌高粱附球菌的鉴定

崔宇星¹, 白莹雪², 王秋实², 尚巧霞², 任俊达², 李玮瑜¹

(1. 北京农学院 植物科学技术学院/农业应用新技术北京市重点实验室/植物生产国家级实验教学示范中心, 北京 102206; 2. 北京农学院 生物与资源环境学院/农业农村部华北都市农业重点实验室, 北京 102206)

摘要:北京地区大豆叶斑病发生严重, 发病范围较广, 对大豆生产造成严重影响。为分析北京地区大豆叶斑病病害发生原因, 进而为病害高效防控提供理论依据, 本研究分析其田间病害症状, 收集发病植株, 采用组织分离法对大豆病叶进行分离培养, 并采用琼脂平板表面单孢分离法对分离到的病原菌进行纯化。参照科赫法则进行致病性检测, 通过形态学和分子生物学鉴定确定该病原菌的种类。结果表明: 病原菌菌落初期为白色或灰白色, 后期整个菌落呈现红褐色, 菌落中心出现橘红色、粉红色或白色的凸起, 边缘为灰白色, 呈现不规则状。分生孢子为球形、近球形或卵圆形, 中间有隔, 多为串生, 大小约为 $20\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ 。结合分子生物学鉴定结果, 该病原菌确定为高粱附球菌。本研究初次在大豆中分离得到高粱附球菌, 并且经过回接验证发现该病原菌致病性极强。

关键词:大豆; 叶斑病; 分子生物学; 高粱附球菌; 科赫法则

Identification of Soybean Leaf Spot Pathogen *Epicoccum sorghinum* in Beijing

CUI Yu-xing¹, BAI Ying-xue², WANG Qiu-shi², SHANG Qiao-xia², REN Jun-da², LI Wei-yu¹

(1. College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture/Beijing Key Laboratory of New Agricultural Application Technology/National Experimental Teaching Demonstration Center of Plant Production, Beijing 102206, China; 2. Beijing University of Agriculture, College of Bioscience and Resources Environment, The Key Laboratory for Northern Urban Agriculture of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 102206, China)

Abstract: Soybean leaf spot disease occurs with a wide range in Beijing, having a serious impact on soybean production. In order to analyze the causes of soybean leaf spot disease in Beijing, thus providing a theoretical basis for the efficient prevention and control of the disease, in this study, we analyzed the symptoms of the disease in the field, collected the diseased plants and isolated the pathogenic bacteria by tissue separation method, and purified the pathogenic bacteria by single spore separation method on the surface of the agar plate. Then we test the pathogenicity according to Koch postulates and determined the type of pathogenic bacteria by morphology and molecular biology. The results showed, at first the pathogenic bacterial colonies were white or gray-white at the initial stage, and all the pathogenic bacterial colonies were reddish-brown at the later stage. The center of the colonies was orange-red, pink, or white with bulges, and the edges were gray-white in an irregular shape. The conidia was spherical, nearly spherical or oval, with a septum in the middle, mostly in clusters, about $20\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$. Combined with molecular biology result, the pathogen was identified as *Epicoccum sorghinum*. The *E. sorghinum* was isolated from soybean for the first time, and it was found that the pathogen was highly pathogenic after re-inoculation.

Keywords: soybean; leaf spot disease; molecular biology; *Epicoccum sorghinum*; Koch's postulates

大豆是各国重要的粮油作物、蛋白饲料作物, 在满足粮食、油料、饲料蛋白添加等方面发挥重要作用。大豆作为大宗产品在我国农业、畜牧养殖等方面有着重要地位, 然而各种病原菌的侵染易导致大豆产量、品质等下降。大豆是我国重要的经济作物、粮食作物, 也是我国唯一进口量大于生产量的大宗产品, 大豆产业对我国国际贸易有重要作用。而大豆在整个生长周期中均易受到病菌的侵染, 导致大豆的产量、品质、种子活力等严重下降, 其中叶斑病和根腐病是大豆的主要病害, 并对大豆生产造成严重影响。

根腐病会导致大豆植株根系腐烂, 使得植株因营养供给不足而发育不良, 甚至死亡。而大规模的叶斑病会严重制约大豆光合作用的进行, 进而影响大豆籽粒中有机物质的积累, 使得大豆质量、品质、种子活力等受到影响。大豆叶斑病包括灰斑、黑斑、红叶斑、褐斑等, 病害前期因病原菌侵染而导致叶片失绿并形成斑点, 后期病斑逐步连结。研究表明, 不同大豆叶斑病病原菌存在较大差异。大豆灰斑病的病原菌多为尾孢属真菌, 如半知菌亚门的大豆尾孢菌^[1-2]; 大豆黑斑病的病原菌为链格孢属真菌, 如细极链格孢^[3-4]; 大豆红叶斑是由棘壳孢属真

收稿日期: 2021-10-27

基金项目: 北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目(2021YJS046); 北京市科学技术协会 2020-2022 年度青年人才托举工程项目。

第一作者: 崔宇星(1998—), 男, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究。E-mail: 13465464749@163.com。

通讯作者: 任俊达(1989—), 男, 博士, 讲师, 主要从事植物病理学研究。E-mail: renjd@bua.edu.cn;

李玮瑜(1983—), 女, 博士, 副教授, 主要从事大豆基因组学研究。E-mail: li-wei-yu@126.com。

菌^[5]或茎点霉^[6]侵染导致的;大豆褐斑病是由半知菌亚门的大豆壳针孢菌^[7]侵染导致的。因此,叶斑病病原菌多为半知菌亚门的真菌,至今尚未有从大豆病叶上分离得到高粱附球菌的相关报道。

叶斑病的发生严重制约了大豆光合作用的进行,进而影响大豆籽粒中有机物质的积累,使得大豆质量、品质、种子活力等大幅度下降。2021 年 7—9 月,北京地区叶斑病发生严重,发病植株叶片产生黄褐色病斑,发病严重处叶斑连接成片,内为深褐色,外围为黄色,叶脉失绿泛黄,后期脱落,发病范围较广,对大豆生产造成严重影响。本研究分离该地区治病菌株并进行致病性检测,通过形态学和分子生物学鉴定方法确定该病原菌的种类,以期为该病害的有效防控、抗病种质的筛选等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆病样 2021 年 7—9 月于北京市大豆种植区采集病株,拍照并记录发病症状与发病率,取样后置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

回接试验供试大豆品种为中黄 13。

1.1.2 主要仪器与试剂 高压灭菌锅、超净工作台、光学显微镜(Zeiss imager A1)、剪刀、酒精灯、镊子、无菌滤纸等。

蒸馏水、无菌水、75% 乙醇、次氯酸钠溶液、琼脂粉、马铃薯、葡萄糖、植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京博迈德基因技术有限公司)、2 × *Taq* PCR Mix(北京爱博森生物科技有限公司)等。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯去皮切块,称取 200 g 于 1 L 蒸馏水中煮至软化,过滤掉马铃薯块之后加入 15 g 琼脂粉、20 g 葡萄糖,混匀并加热融化,分装至三角瓶后置于灭菌锅中 121 ℃ 灭菌 2 h。

1.2 方法

1.2.1 病症调查 观察并记录大豆发病症状,主要包含病斑颜色、大小、特征,发病主要部位,及发病率等,同时对症状显著的叶片进行拍照。

1.2.2 病原菌的分离纯化与形态学鉴定 采用组织分离法对大豆病叶进行分离,即剪取大豆叶片病健交界处约 5 mm × 5 mm 叶组织,经 75% 乙醇处理 30 s 后,次氯酸钠处理 3 min,再用无菌水冲洗 3 次,放置于无菌滤纸上吸干表面水分。然后将叶组织

放入装有 PDA 的培养皿中,封口后于 28 ℃ 恒温培养箱倒置培养^[8-9]。待菌落长出后,采用琼胶平板表面单孢分离法,对分离得到的病原菌进行纯化^[8]。菌落长满菌板后进行形态特征观察,并根据菌落、分生孢子形态鉴定病原菌。

1.2.3 致病性检测 依据科赫法则^[8],对分离得到的菌物进行致病性测定。选取大小、健康状况类似的中黄 13 大豆叶片,用 75% 乙醇消毒后,从纯化菌物的菌落边缘取直径为 5 mm 的菌饼,进行有伤、无伤接种,对照叶片覆盖大小相同的 PDA 培养基,2 d 后取走菌饼。28 ℃ 恒温培养箱中培养,每天观察叶片的发病状况,并拍照记录,发病后再次取发病部位进行分离培养,并鉴定是否为同一种病原菌^[9]。

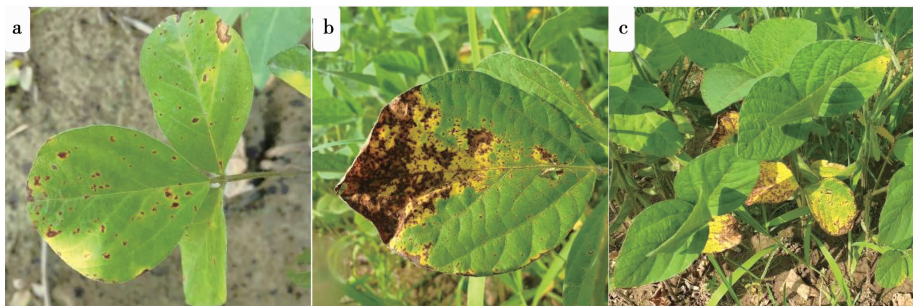
1.2.4 病原菌分子生物学鉴定 利用试剂盒提取分离纯化获得的病原菌纯培养菌丝的 DNA,合成 ITS 基因通用引物 ITS1/ITS4^[10],以纯培养菌丝 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应条件为:95 ℃ 预变性 4 min;95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min^[11-13]。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,并进行测序。引物合成和测序由北京博迈德基因技术有限公司完成。将测序结果于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库进行 blast 分析。

使用 MEGAX (<https://www.megasoftware.net/>) 的邻接法,与其他附球菌属序列比对并构建系统发育树,确定该病原菌的分类地位;与其他寄主上鉴定得到的高粱附球菌进行亲缘关系分析。

2 结果与分析

2.1 田间病害症状描述

叶片发病始于大豆植株形态学下端,逐渐向上延伸扩展。叶片发病初期,叶片上有黄褐色、边缘为黄色的病斑,呈现点状或线状,病菌沿叶脉、导管运输,叶脉开始失绿发黄(图 1a)。发病严重部位,病斑愈合成大斑块,叶斑为深褐色,边缘为黄色,潮湿部位易形成穿孔,叶脉变为黄色并逐渐变为褐色,严重发病部位明显失水蜷缩之后叶片脱落(图 1b)。该病病健交界明显,肉眼可辨,发病严重的叶片多为形态学下端老叶(图 1c)。发病大豆植株大多较健康植株矮小。



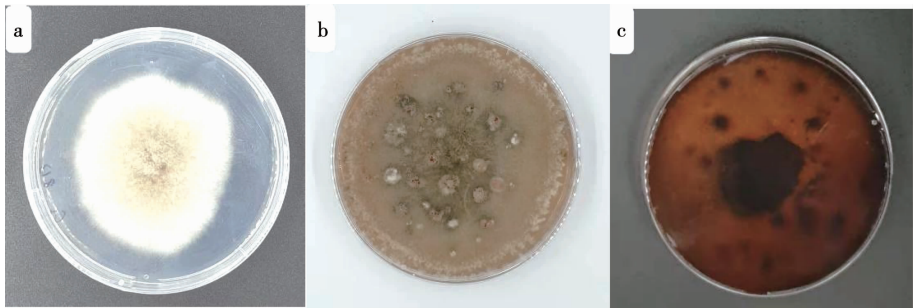
注:a. 发病初期; b. 发病后期; c. 发病部位。
Note: a. Early stage of the disease; b. Late stage of the disease; c. Location of the disease.

图1 田间病害发生症状
Fig. 1 The symptoms of disease in the field

2.2 病原菌分离纯化与形态学鉴定

将采集到的症状类似的病叶在 PDA 培养基上 28 ℃ 恒温培养, 菌落生长速度极快, 3 d 可长满菌盘。菌落初期为白色或灰白色(图 2a); 中期菌落中

心出现橘红色、粉红色或白色凸起, 边缘为灰白色, 呈现不规则状(图 2b); 后期整个菌落呈现红褐色(图 2c)。



注:a. 初期; b. 中期; c. 后期。
Note: a. Early stage; b. Middle stage; c. Late stage.

图2 病原菌在 PDA 培养基上的菌落形态
Fig. 2 The colony form of the isolated pathogen on PDA medium

生长后期挑取适量菌丝于光学显微镜下观察, 分生孢子为球形、近球形或卵圆形, 中间有隔, 多为串生, 大小约为 20 μm × 5 μm(图 3)。孢子形状和菌落形态与朱香等^[14]描述的高粱附球菌形态特征基本吻合, 因此初步鉴定该病原菌为高粱附球菌。

2.3 病原菌致病性检测

自然条件下, 由该病原菌引起的大豆叶斑病发病于大豆形态学下端, 病原菌沿叶脉生长, 产生的病斑多为黄褐色、不规则状, 发病后期叶片蜷曲并脱落。据统计, 该菌侵染能力较强, 田间病株率达到 42%。

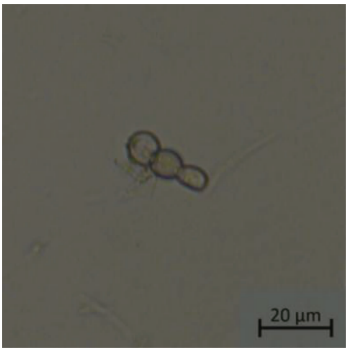
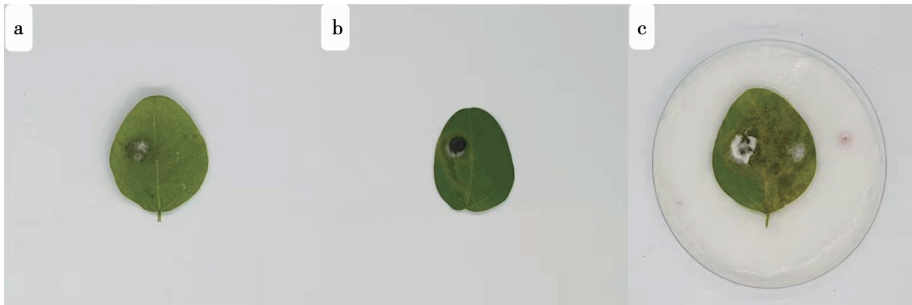


图3 病原菌分生孢子
Fig. 3 The conidia of the isolated pathogen

室内进行致病性检测,将分离纯化后得到的病原菌分别刺伤接种和无伤接种于离体的大豆叶片上,24 h 后大豆叶片开始呈现水浸状,48 h 后叶脉及菌饼周围失绿泛黄,72 h 后病原菌大量繁殖,白色菌落覆盖达 1/5 ~ 1/3 叶片,菌落周围产生大量黄褐色斑点,边缘为黄色,严重部位连结成片,叶脉呈

现黄色,部分叶片形成穿孔,与自然发病状况相同(图 4),符合科赫法则^[8],证明该菌为大豆叶斑病的致病菌。同时据统计,本次有伤和无伤病原回接,发病叶片均达到 100%,表明该菌对大豆叶片的致病力极强。



注:a. 接种 1 d; b. 接种 2 d; c. 接种 3 d。
Note: a. One day after inoculation; b. Two days after inoculation; c. Three days after inoculation.

图 4 大豆离体叶片接种病原菌后症状

Fig. 4 The symptoms of soybean leaves inoculated by isolated pathogen

2.4 病原菌分子生物学鉴定与分析

序列比对结果显示,分离得到的病原菌(MT 125854. 1)与高粱附球菌(MW 081248. 1)基因序列

一致性为 99. 38%。该病原菌与其他附球菌属菌种的系统发育树(图 5)及其形态学鉴定结果证明,该病原菌为高粱附球菌。

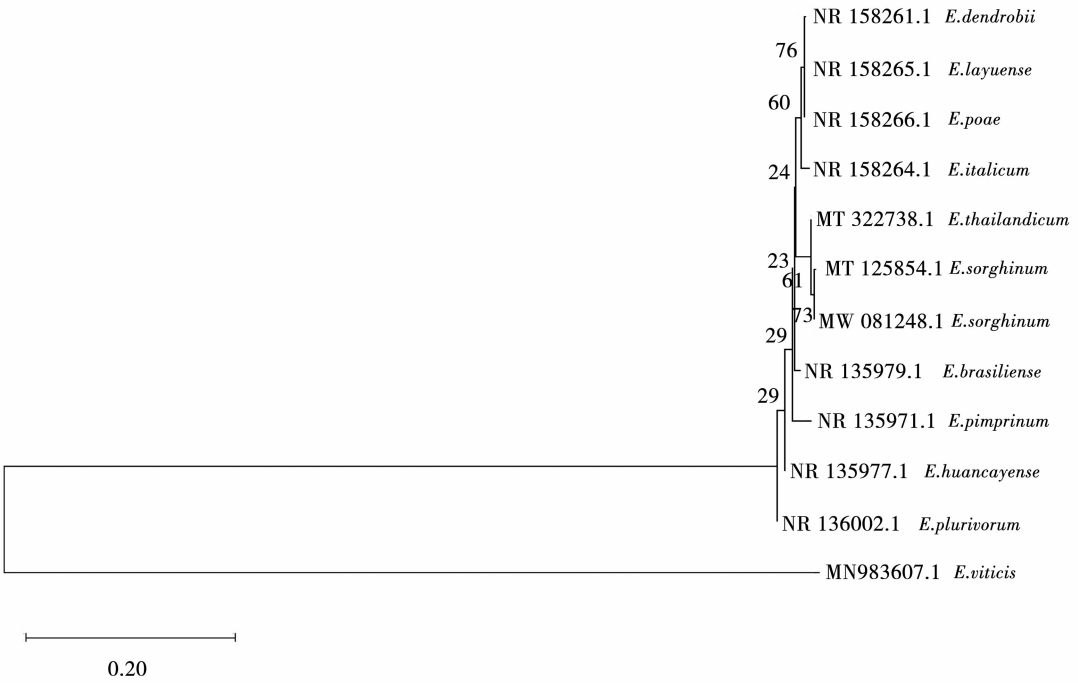


图 5 基于 ITS 序列构建的病原菌和其他植物叶斑病病原菌系统发育树

Fig. 5 The phylogenetic tree of isolated pathogen and leaf spot pathogens of other plants based on ITS sequences

与其他寄主上鉴定得到的高粱附球菌的亲缘关系分析表明,大豆上分离得到的高粱附球菌与玉

米、高粱上的亲缘关系较为接近,与重楼、薰衣草、水稻、香樟和苍术上的亲缘关系较远(图 6)。

参考文献

[1] 孙长征. 大豆灰斑病发生规律及防控技术研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2010. (SUN C Z. Study on occurrence regularity and control technology of soybean gray spot disease[D]. Harbin: Heilongjiang University, 2010.)

[2] 韩新华, 许艳丽, 李春杰, 等. 大豆灰斑病的发生与综合防治[J]. 大豆科技, 2007(3): 14-16. (HAN X H, XU Y L, LI C J, et al. Occurrence and management of frog-eye leaf spot in soybean[J]. Soybean Science & Technology, 2007(3): 14-16.)

[3] 许伟民, 谢昀烨, 王春伟, 等. 北五味子黑斑病的药剂防治[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(5): 520-529. (XU W M, XIE Y Y, WANG C W, et al. Chemical control alternaria leaf spot of schisandra caused by *Alternaria tenuissima*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2013, 35(5): 520-529.)

[4] 吉丽, 田磊, 卢宝慧, 等. 大豆灰霉病和黑斑病拮抗菌株的筛选和鉴定[J]. 土壤与作物, 2020, 9(1): 31-39. (JI L, TIAN L, LU B H, et al. Screening and identification of antagonistic strains of soybean *Botrytis cinerea* and *Alternaria tenuissima*[J]. Soils and Crops, 2020, 9(1): 31-39.)

[5] HARTMAN G L, 王探应, 陈雯. 大豆红叶斑病[J]. 植物检疫, 1989(1): 65-68. (HARTMAN G L, WANG T Y, CHEN W. Red leaf blotch of soybean[J]. Plant Quarantine, 1989(1): 65-68.)

[6] 常雪艳, 严进. 大豆红叶斑病[J]. 植物检疫, 2009, 23(1): 4. (CHANG X Y, YAN J. Red leaf blotch of soybean[J]. Plant Quarantine, 2009, 23(1): 4.)

[7] 靳学慧, 吴兴泉, 马汇泉, 等. 大豆壳针孢菌生物学特性的研究[J]. 植物保护学报, 1996(3): 285-286. (JIN X H, WU X Q, MA H Q, et al. Studies on the biological characteristics of *Septoria glycines hemmi* [J]. Journal of Plant Protection, 1996(3): 285-286.)

[8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. (FANG Z D. Research methods of plant diseases[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998.)

[9] 李华义, 何运转, 张艳杰, 等. 掌叶半夏疫病原菌的分离与鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(4): 68-72. (LI H Y, HE Y Z, ZHANG Y J, et al. Isolation and identification of blight disease on *Pinellia pedatisecta* [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2016, 39(4): 68-72.)

[10] 丛丽丽, 康俊梅, 张铁军, 等. 苜蓿镰刀菌根腐病原菌的分离鉴定与致病性分析[J]. 草地学报, 2017, 25(4): 857-865. (CONG L L, KANG J M, ZHANG T J, et al. Identification and pathogenicity test of pathogenic *Fusarium* of alfalfa root rot[J]. Acta Agrestia Sinica, 2017, 25(4): 857-865.)

[11] ANALIA E P, MARÍA V M. First report of *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema Dorenbosch & van Kest on wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) in Argentina[J]. Mycopathologia, 2005, 159(1): 75-78.

[12] PAŽOUTOVÁ S. Genetic variation of *Phoma sorghina* isolates from Southern Africa and Texas[J]. Folia Microbiologica, 2009, 54(3): 217-229.

[13] OLIVEIRA R C, DAVENPORT K W, HOVDE B, et al. Draft genome sequence of sorghum grain mold fungus *Epicoccum sorghinum*, a producer of tenuazonic acid [J]. Genome Announcements, 2017, 5(4): e01495-16.

[14] 朱香. *Epicoccum sorghinum* 的分离及多基因转玉米株系的抗性鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018. (ZHU X. Isolation of *Epicoccum sorghinum* and resistance identification of multi-transgenes maize lines [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.)

[15] 张国辉, 李向阳, 顾焕先, 等. 黔东南州红心猕猴桃叶尖干枯病原鉴定[J]. 中国农学通报, 2021, 37(3): 145-149. (ZHANG G H, LI X Y, GU H X, et al. Identification of pathogens of dry blight disease in leaf tip of red-fleshed kiwi fruit in Qiandongnan prefecture [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(3): 145-149.)

[16] ROHÁIK T, HUDEC K. Fungal infection of malt barley kernels in Slovak Republic [J]. Plant Protection Science, 2007, 43(3): 86-93.

[17] LIU L M, ZHAO Y, ZHANG Y L, et al. First report of leaf spot disease on rice caused by *Epicoccum sorghinum* in China [J]. Plant Disease, 2020, 104(10): 2735.

[18] DU Y X, XU Y, JIANG J Y, et al. First report of *Epicoccum sorghinum* causing leaf spot on atractylodes lancea in Hubei Province, China [J]. Plant Disease, 2020, 104(11): 3082.

[19] 黄鉉琳, 尹桥秀, 江仕龙, 等. 茶叶斑病病原菌高粱附球菌的鉴定及生物学特性[J]. 热带作物学报, 2021, 42(11): 3269-3277. (HUANG H L, YIN Q X, JIANG S L, et al. Identification and biological characteristics of *Epicoccum sorghinum*, pathogen of Tea Leaf Spot [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(11): 3269-3277.)

[20] 曾慧兰, 卢其能, 曾鹏远, 等. 百合叶尖干枯病原菌的鉴定, 生物学特性及其对杀菌剂的敏感性研究[J]. 园艺学报, 2018, 45(12): 2407-2416. (ZENG H L, LU Q N, ZENG P Y, et al. Identification, biological characteristics and sensitivity of the causal pathogen inducing leaf dieback on lily [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(12): 2407-2416.)

[21] FU R T, CHEN C, WANG J, et al. First report of *Epicoccum sorghinum* causing leaf spot on *Paris polyphylla* in China [J]. Plant Disease, 2019, 103(6): 1426.

[22] CHEN X L, WANG Y H, LUO T. First report of leaf spot caused by *Phoma sorghina* on *Oxalis debilis* in China [J]. Plant Disease, 2017, 101(6): 1047.

[23] YU L, SHE X M, LAN G B, et al. First report of leaf spot caused by *Epicoccum sorghinum* on Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis*) in China [J]. Plant Disease, 2019, 103(11): 2966.

[24] 彭成彬, 王泽榕, 阮俊峰, 等. 柳叶蜡梅真菌病害分离鉴定及生物学特性[J]. 福建农业学报, 2021, 36(4): 457-463. (PENG C B, WANG Z R, RUAN J F, et al. Identification and biology of leaf spot pathogen on *Chimonanthus salicifolius* [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2021, 36(4): 457-463.)

[25] SAXENA S C. Identification of resistance sources to banded leaf and sheath blight (*Rhizoctonia solani* f. sp. *sasakii*) in maize [J]. Indian Phytopathology, 2013, 60(2): 162-166.