

大豆炭疽病菌 *Colletotrichum chlorophyti* 的鉴定

李海云*, 靳 帅, 张学勤, 范光辉, 张建新, 许艳霞

(河北出入境检验检疫局京唐港办事处, 唐山 063611)

摘要 从进口的乌拉圭大豆的残留茎秆上分离到一种新的大豆炭疽病菌, 根据菌落形态、分生孢子形态、ITS 序列及 ACT 序列特征以及对大豆的致病性, 将其鉴定为 *Colletotrichum chlorophyti*, 这是我国口岸首次截获该菌。

关键词 大豆; 炭疽病菌; 分离; 鉴定

中图分类号: S 41 - 30 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.028

Identification of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose

Li Haiyun, Jin Shuai, Zhang Xueqin, Fan Guanghui, Zhang Jianxin, Xu Yanxia

(Jingtang Port Office of Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tangshan 063611, China)

Abstract The pathogenic fungus isolated from soybean imported from Uruguay was identified as *Colletotrichum chlorophyti* based on the morphological characteristics of the colony and conidia of the fungus, rDNA-ITS and partial sequence of the actin gene, and its pathogenicity to soybean. It was the first report that *Colletotrichum chlorophyti* was imported to China.

Key words soybean; *Colletotrichum chlorophyti*; isolation; identification

炭疽菌 *Colletotrichum* Corda 是重要的世界性植物病原真菌。由该属一些种引起的大豆炭疽病在巴西、印度、南美及中国台湾及内地普遍发生, 导致大豆减产 16%~100%^[1-3]。该病从苗期至收获期均可发病, 苗期引起大豆死苗, 成株期可危害茎秆、豆荚, 导致大豆品质变劣, 产量下降。据报道, 能够引起大豆炭疽病的病原菌有平头炭疽菌 *C. truncatum*、毁灭炭疽菌 *C. destructivum*、毛核炭疽菌 *C. coccodes*、胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 及禾谷炭疽菌 *C. graminicola*^[4-6]。美国科学家于 2009 年从阿拉巴马州、伊利诺伊州及密西西比州大豆叶柄中首次分离得到 *C. chlorophyti*, 2012 年报道该菌侵染大豆, 引起大豆炭疽病, 随后 2013 年发现该菌可以侵染大豆种子^[7-8]。但目前国内尚未有该菌分布的报道, 口岸亦没有相关截获报道。

2015 年 9 月, 我们在对进境乌拉圭大豆进行检疫时, 发现类似炭疽病症状的豆秆, 经实验室分离培养、形态和分子特征鉴定及致病性测定, 确认该菌为 *Colletotrichum chlorophyti*, 这是我国首次截获并报道该病菌。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

从乌拉圭进境大豆中, 选取有病斑或表面带小黑点等可疑症状的茎秆及豆荚, 1.25% 次氯酸钠表面消毒 10 min, 无菌水洗 3 次, 置于 PDA 平板上, 25℃、12 h 光暗交替培养, 3 d 后观察豆荚、茎秆周围是否有菌落产生, 并将菌丝移入新的 PDA 培养基上进行纯化培养。

1.2 分离物鉴定

1.2.1 形态鉴定

将病菌分离物置于 PDA 培养基上, 25℃ 培养 3 d 后观察菌落形状及色泽, 取菌丝制片观察和成像。显微镜下观察记录厚垣孢子和分生孢子形态特征。

1.2.2 分子鉴定

将病菌分离物菌丝块移至 PDA 上, 25℃ 培养 7 d 后收集菌丝, 液氮冷冻后研磨。取 0.1 g 菌丝粉用植物基因组提取试剂盒 (Tiagen BioTech) 提取 DNA。用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4

收稿日期: 2016-03-28 修订日期: 2016-05-13

致 谢: 本研究得到上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心易建平研究员的悉心指导与大力帮助, 特此致谢。

* 通信作者 E-mail: yousliyun@163.com

(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ACT512F(5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3')/ACT783R(5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3')^[9] 分别扩增 ITS 和 ACT 基因序列。PCR 反应总体积为 50 μL :25 μL Taq PCR Mastermix(Tiagen BioTech),1 μL 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$),1 μL 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$),2 μL 模板 DNA,加水至 50 μL 。反应循环程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 5 μL 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统分析。PCR 产物送北京金唯智生物科技有限公司测序,所得序列经核实时,去除引物序列在 GenBank 中进行 BLAST 分析。将获得序列与 GenBank 中其他炭疽菌属相关序列,用 MEGA 5.0 程序进行比对,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化发育树,进行 1 000 次重复抽样计算各节点的置信度。

1.3 致病性测定

1.3.1 茎秆伤口接种

取乌拉圭进口转基因大豆种子(GTS40-3-2 品系及 MON87701 $\times$ 89788 品系)种植于营养土中,25 $^{\circ}\text{C}$ 光照条件下培养 4 周备用。在菌龄 1 周的培养皿中加入 5 mL 灭菌水,振荡,获得浓度约为 10^7 cfu/mL 的分生孢子悬浮液。在大豆幼苗下胚轴划一伤口,针刺接

种分生孢子悬浮液,3 次重复,每次至少接种 5 株幼苗,从无菌水作对照接种,接种后置于密封塑料袋中 25 $^{\circ}\text{C}$ 保湿培养 1 d,1~2 周内观察记录发病症状。

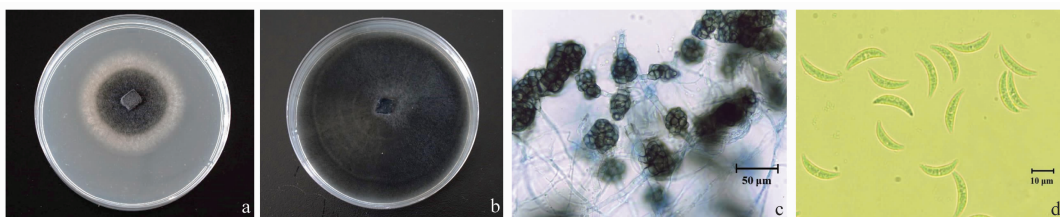
1.3.2 叶片伤口接种

取健康大豆种子‘中黄 13’种植于营养土中,25 $^{\circ}\text{C}$ 光照条件下培养 4 周备用。在菌龄 1 周的培养皿中加入 5 mL 灭菌水,获得浓度约为 10^7 cfu/mL 的分生孢子悬浮液。采用针刺法接种幼叶,重复 3 次,每次至少接种 5 株幼苗,25 $^{\circ}\text{C}$ 保湿培养 1 d,1~2 周内观察记录发病症状,对照用无菌水接种。1~2 周后将接菌的茎秆和叶片经表面消毒后再分离病菌。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态鉴定

在 PDA 培养基上,分离物菌落圆形,气生菌丝毡状或绒状,紧贴培养基生长,菌落边缘整齐,呈灰白色,培养 3 d 后菌丝开始变黑,10 d 后黑色菌落满皿(图 1a~b)。培养 3 d 后开始产生厚垣孢子,厚垣孢子单生或串生于菌丝顶端或中间,黄褐色至黑褐色,多数球形,光滑,大小(平均)7.5 $\mu\text{m} \times 7.5 \mu\text{m}$ 。分生孢子单胞,无色,新月形或镰刀状,一端尖锐,另一端较钝,大小(平均)19 $\mu\text{m} \times 4.8 \mu\text{m}$ (图 1c~d),无附着胞产生。



a: 在 PDA 培养基上培养 3 d 的菌落形态; b: 在 PDA 培养基上培养 10 d 的菌落形态; c: 厚垣孢子; d: 分生孢子
a: Colony morphology on PDA medium (3 d); b: Colony morphology on PDA medium (10 d); c: Chlamydospore; d: Conidia

图 1 *Colletotrichum chlorophyti* 分离物形态特征

Fig. 1 Morphology of *Colletotrichum chlorophyti*

2.2 分子生物学鉴定

2.2.1 ITS 序列分析

利用 rDNA-ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对分离物基因组 DNA 进行 PCR 扩增,通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,PCR 产物送北京金唯智生物科技有限公司测序,获得 538 bp 序列(GenBank 登录号:KU594267)。将序列在 NCBI 网站进行 Blastn 比对分析,发现序列与 *Colletotrichum chlorophyti* (KT207464, KR052084, KC790962, JX126475, KC110786, NR_111460, GU227894

和 GU227895) 的序列相似性为 100%。与 *C. truncatum* (DQ195714 和 DQ195715) 的序列相似性为 100%,与 *C. phaseolorum* (NR_119771 和 GU227896) 的序列相似性为 99.21%,与 *C. metake* (AB738859) 的序列相似性为 99.92%,说明分离物与 *C. chlorophyti* 和 *C. truncatum* 的亲缘关系较近。

2.2.2 ACT 序列分析

为进一步明确分离物的种群分类地位,以 *actin* 为内参基因进行序列分析。采用引物 ACT512F/

ACT783R 对分离物基因组 DNA 进行 PCR 扩增及测序,获得 215 bp 序列(GenBank 登录号:KU985441),并进行 BLAST 分析。结果表明,分离物与 GenBank 中 *C. chlorophyti*(KC110822,JX126476, GU227993 和 GU227992)序列相似性为 99.03%~100%,与 *C.*

phaseolorum(GU227994 和 GU227995)的序列相似性为 88.52%~89.52%,与 *C. truncatum*(GU227960)的序列相似性为 71.90%。采用 MAGA 5.0 软件进行系统发育关系分析,发现分离物与 *C. chlorophyti* 在一个分支,且 Bootstrap 支持率为 100%(图 2)。

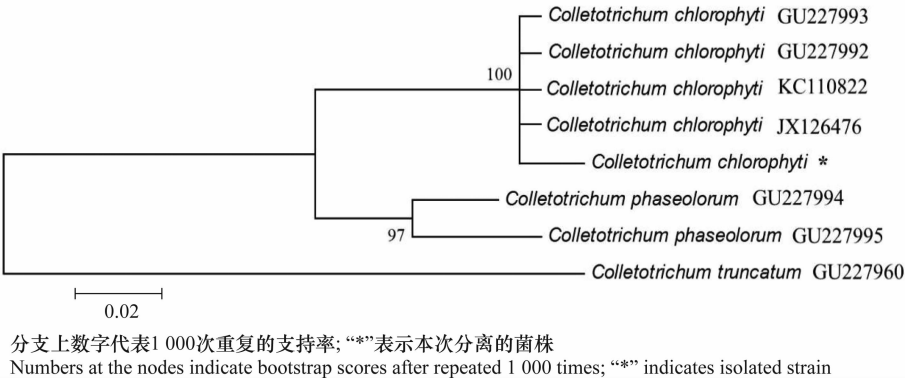


图 2 基于 ACT 序列采用 NJ 法构建的系统发育树

Fig. 2 A phylogenetic tree resulted from analysis of the ACT sequences by using the NJ method

2.3 致病性测定

将分离物接种大豆幼苗均可使植株发病,发病率为 100%。接菌幼苗茎秆 2 周后,接种处产生溃疡斑,对照植株除接种处变褐外,无溃疡斑(图 3a)。针刺接种叶片 5 d 后,在接种处产生明显的坏死斑,

病斑周围深褐色,中央浅褐色,对照叶片仅接种处有伤口,未变色(图 3b)。根据柯赫氏法则,对发病植株和对照株进行病原菌分离,所有发病部位均分离得到与接种菌菌落形态一致的分离物,而对照植株上没分离到接种菌(图 3c)。



a: 茎秆接菌症状, 左: 灭菌水对照, 右: 接种分离物; b: 叶片接菌症状, 左: 灭菌水对照, 右: 接种分离物; c: 从接种植株上再分离的病原菌
a: Symptoms of soybean stems after inoculation; left: Water control; right: Inoculation of isolated strain; b: Symptoms of soybean leaves after inoculation; left: Water control; right: Inoculation of isolated strain; c: Re-separated strain from inoculated soybean

图 3 病原分离物的致病性测定

Fig. 3 Pathogenicity test of pathogenic isolate

通过病原菌的形态学鉴定、致病性测定和分子生物学分析结果,我们将分离物鉴定为 *C. chlorophyti*。

3 讨论

自 2012 年, Yang 等首次报道 *C. chlorophyti* 能够侵染大豆^[7],引起大豆炭疽病以来,我国口岸尚没有该菌的截获报道。本研究对进境大豆茎秆上的病

菌分离物进行鉴定,结果发现该分离物与 *C. chlorophyti* 一致。

传统的炭疽菌属分类主要依靠形态学特征,包括分生孢子和附着胞的大小和形状,刚毛和菌核的有无,菌落颜色,生长速度,培养条件等^[4,10]。然而,在环境影响下,炭疽菌属真菌在形态及表型上存在差异,形态学特征并不能充分区别各菌种。随着分

子生物学的发展,免疫学方法、随机扩增 DNA 多态性(randomly amplified polymorphic DNAs, RAPDs)、rDNA-ITS 技术等已经广泛用于炭疽菌的鉴定。然而,采用真菌公认的 DNA 条形码基因核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)不能充分地区分炭疽菌属内各物种,目前, *actin* (ACT)、 β -tubulin(TUB2)、calmodulin(CAL)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 及 rDNA-ITS(ITS)5 对基因已用于炭疽菌属的种群鉴定^[11]。本研究选取 ITS 和 ACT 两个基因进行分子鉴定,结果显示 ITS 序列不能有效区分 *C. chlorophyti* 和 *C. truncatum*,在 ACT 序列的聚类图中,分离菌与 *C. chlorophyti* 在一个分支上,且自展支持率为 100%。因此,综合形态及分子鉴定结果,可以确定该分离物为 *C. chlorophyti*。

迄今,大豆炭疽病的病原菌报道最多的是 *C. truncatum*,而多个炭疽菌种通常可以侵染同一寄主^[12],因此,每种病菌的致病作用不可忽视。目前,国内外对 *C. chlorophyti* 的研究报道极少,仅有该菌侵染大豆及其 qPCR 分子检测方面的报道。我国是重要的大豆进口国,病害随进口传播与扩散的风险极高,因此,下一步将对大豆炭疽病菌 *C. chlorophyti* 的生物学特性、致病性分化、快速检测及有效防治等进行详细研究,为该菌的检疫及病害防治提供理论指导。

参考文献

- [1] Backman P A, Williams J C, Crawford M A. Yield losses in soybeans from anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* [J]. Plant Disease, 1982, 66: 1032 - 1034.
- [2] Manandhar J B, Hartman G L. Anthracnose [M]// Hartman G L, Sinclair J B, Rupe J C. Compendium of soybean diseases. St. Paul, MN: APS Press, 1999: 13 - 14.
- [3] Wrather J A, Koenning S R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005 [J]. Journal of Nematology, 2006, 38(2): 173 - 180.
- [4] Tiffany L H, Gilman J C. Species of *Colletotrichum* from legumes [J]. Mycologia, 1954, 46(1): 52 - 75.
- [5] Roy K W. Seedling diseases caused in soybean by species of *Colletotrichum* and *Glomerella* [J]. Phytopathology, 1982, 72(8): 1093 - 1096.
- [6] Manandhar J B, Hartman G L, Sinclair B. *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines* [J]. Phytopathology, 1986, 76(3): 282 - 285.
- [7] Yang H C, Haudenschild J S, Hartman G L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose [J]. Plant Disease, 2012, 96(11): 1699.
- [8] Yang H C, Stewart J M, Hartman G L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* infecting soybean seed in Arkansas, United States [J]. Plant Disease, 2013, 97(11): 1510.
- [9] Carbone I, Kohn L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553 - 556.
- [10] Sutton B C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* [M]// Bailey J A, Jeger M J. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. CABI, 1992: 1 - 26.
- [11] Damm U, Liu F, Cannon P F, et al. Unraveling legume anthracnose pathogens [J]. Phytopathology, 2013, 103: 33.
- [12] 陈吴健. 大豆豆荚炭疽病的病原鉴定及其防治[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 132 页)

- [4] LeBoldus J M, Blenis P V, Thomas B R. A method to induce stem cankers by inoculating nonwounded *Populus* clones with *Septoria musiva* spore suspensions [J]. Plant Disease, 2010, 94(10): 1238 - 1242.
- [5] Hu Jia, Pang Zhili, Bi Yang, et al. Genetically diverse long-lived clonal lineages of *Phytophthora capsici* from pepper in Gansu, China [J]. Phytopathology, 2013, 103(9): 920 - 926.
- [6] 王冰, 张路, 李保华, 等. 温度、湿度和光照对苹果炭疽叶枯病菌(*Glomerella cingulata*)产孢的影响[J]. 植物病理学报, 2015, 45(5): 530 - 540.
- [7] 王疏, 白元俊, 周元力, 等. 稻曲病菌的病原学[J]. 植物病理学报, 1998, 28(1): 19 - 24.
- [8] Starkey T E. A simplified medium for growing *Cercospora arachidicola* [J]. Phytopathology, 1980, 70(10): 990 - 991.
- [9] 张树武, 徐秉良, 古丽君, 等. 长枝木霉对禾谷胞囊线虫卵的寄生和毒杀作用及其机制[J]. 植物保护学报, 2013, 40(4): 320 - 326.
- [10] 刘斐, 谭贻, 王忆, 等. 苹果腐烂病菌侵染过程中枝条相关病程物质含量的变化[J]. 中国农学通报, 2015, 31(34): 177 - 186.
- [11] 王茜, 张宝海, 赵亮, 等. 一株芹菜(*Apium graveolens* L.)软腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* 的特征[J]. 植物病理学报, 2015, 45(4): 418 - 424.
- [12] Liberti D, Rollins J A, Harmon P F. Evidence for morphological, vegetative, genetic, and mating-type diversity in *Sclerotinia homoeocarpa* [J]. Phytopathology, 2012, 102(5): 506 - 518.

(责任编辑: 杨明丽)