



张欢,曹尚,范新宇,等.一株引起高粱根腐病的病原菌鉴定[J].黑龙江农业科学,2025(4):14-17.

# 一株引起高粱根腐病的病原菌鉴定

张欢,曹尚,范新宇,张美琦,陈雪梅,战鑫,郭永霞

(黑龙江八一农垦大学农学院/国家杂粮工程技术研究中心,黑龙江大庆163319)

**摘要:**为明确一株分离得到的高粱根腐病的病原菌种类,采用蘸根接种法进行柯赫氏法则验证,并基于 ITS 和  $\beta$ -tubulin 基因序列分析,同时结合形态学对该菌进行鉴定。结果表明,菌株 ZY5 菌落正面绒状,规则圆形,黄褐色;菌落背面深黄褐色至黑色;厚垣孢子单生或串生,8~17  $\mu\text{m} \times 10 \sim 12 \mu\text{m}$ ;分生孢子长卵圆形,无隔膜,大小 2.0~3.0  $\mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ 。基于  $\beta$ -tubulin 基因序列构建的系统发育树,与高粱附球菌(*Epicoccum sorghinum*)聚为一支,支持率为 98%。根据形态特征与构建的系统发育树的结果,将菌株 ZY5 鉴定为高粱附球菌。高粱附球菌可以引起高粱根腐病为国内外首次报道。

**关键词:**高粱;根腐病;高粱附球菌;病原鉴定

高粱(*Sorghum bicolor* L. Moench, 1794)原产非洲,具抗旱、耐涝、耐盐碱、耐贫瘠的特性,可用作粮食、饲料、燃料等,其广泛分布在六大洲的热带、亚热带和温带气候地区,每年产量 5 000 多万  $\text{t}^{[1-3]}$ 。黑龙江省是我国高粱主产区,其中 80%集中在松嫩平原中南部地区的安达、大庆、肇源等地<sup>[4-6]</sup>。随着种植面积的增大,病害严重限制了高粱的生产,由于真菌、细菌、病毒、线虫和寄生植物的影响,高粱每年的作物损失达 30%<sup>[7-8]</sup>。根腐病作为苗期病害,其危害程度尤为明显,国内外学者研究表明,高粱根腐病通常是由土壤真菌 *Fusarium* spp.<sup>[9-11]</sup>、*Pythium* spp.<sup>[12]</sup>、*Penicillium* spp.<sup>[13]</sup>、*Bipolaris sorokiniana*、*Alternaria alternata*、*Macrophomina phaseolina*、*Rhizoctonia sorghi* 和 *Phoma sorghina*<sup>[14-16]</sup>等复合侵染导致。前期在对高粱病害进行调查期间,发现根腐病发生普遍,且发病率高,影响高粱幼苗的生长发育,并从高粱田间采集根腐病样本分离真菌,根据菌落颜色、病菌形态初步确定有镰孢菌、青霉菌、链格孢菌、丝核菌和一株文献未报道的菌,本研究针对这一株菌进行了系统研究,以期更好地了解引起高粱根腐病的病原种类,为病害的防治奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试高粱品种:龙杂 10 号,由黑龙江省农业科学院作物育种研究所提供。

供试培养基:PDA 培养基。

供试菌株:2019 年从黑龙江省肇源科技园区

采集高粱根腐病样本,分离、纯化获得菌株,编号 ZY5,保存在黑龙江八一农垦大学植物病理实验室。

### 1.2 方法

1.2.1 柯赫氏法则验证 参照《植病病理学实验技术》<sup>[17]</sup>中有关方法对从高粱根腐病样本中分离纯化的菌株 ZY5 进行致病性测定。选用蘸根接种法,发病后对发病组织再分离,与初分离菌株对比,确定致病菌。

高粱种子消毒:挑选大小均匀饱满的成熟高粱种子,清水冲洗 3 遍后,先后用 70%乙醇消毒 3 min,漂白水(漂白粉 1 g:蒸馏水 14 mL)消毒 20 min,再用无菌水洗 3 遍。

滤纸保湿法催芽获取无菌苗:取一张无菌的滤纸铺入灭菌后的培养皿内,每皿加 5 mL 无菌水,再取经过消毒的种子,均匀地摆放到铺有滤纸的培养皿中,每皿摆放 20 粒,然后放入 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中 24 h,第二天挑选无菌的高粱苗放入新的培养皿内保湿培养,48 h 后接种分离菌。

蘸根接种法接种:将培养好的幼苗放在待测菌株 ZY5 的孢子悬浮液中浸根处理 1 h,对照放在无菌水中浸根处理 1 h。将处理好的幼苗放入带有 3 层滤纸的培养皿中,每皿加入 3 mL 无菌水,放入 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养,3 d 后观察发病情况并拍照。

接种物再分离:从接种发病的植株上再进行病菌分离和纯化,将培养物与接种的菌株进行对比,观察性状是否相同。

收稿日期:2024-11-27

基金项目:黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201910223055)。

第一作者:张欢(1998—),男,博士研究生,从事植物保护研究。E-mail: 18228901907@163.com。

通信作者:郭永霞(1970—),女,博士,教授,从事农药学研究。E-mail: gyxia@163.com。

1.2.2 病原菌的形态学鉴定 在 PDA 培养基 25 ℃全黑暗恒温培养 7 d,观察菌株 ZY5 的微观形态特征。结合相关文献<sup>[18-19]</sup>将该分离致病菌株用显微镜观察,根据形态特征初步鉴定。

1.2.3 病原菌分子生物学鉴定 采用 CTAB 法提取 DNA,生物工程(上海)股份有限公司合成的引物 ITS1 和 ITS4(靶标 ITS 区域)以及 Bt2a 和 Bt2b(靶标 *βtubulin* 基因),对致病菌株 DNA 进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA。扩增体系(50 μL):*Taq* PCR Master Mix 25 μL,上下游引物各 2 μL,模板 DNA 2 μL,dd H<sub>2</sub>O 19 μL;反应条件:95 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 45 s,56 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 45 s,35 个循环;最后 72 ℃

延伸 10 min。扩增后将合格产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对,用软件 MEGA 7 进行多序列比对并构建系统发育树<sup>[20]</sup>。

2 结果与分析

2.1 致病性测定

菌株 ZY5 回接致病性验证,结果表明,对照未接菌的幼苗基本未发病(图 1a),幼苗蘸根接种后,幼根均变褐,发病较重(图 1b),症状表现与田间症状一致(图 1c)。对接种发病的幼根经再分离,获得的菌落与初分离得到的菌相同,确定菌株 ZY5 为高粱根腐病的致病菌。



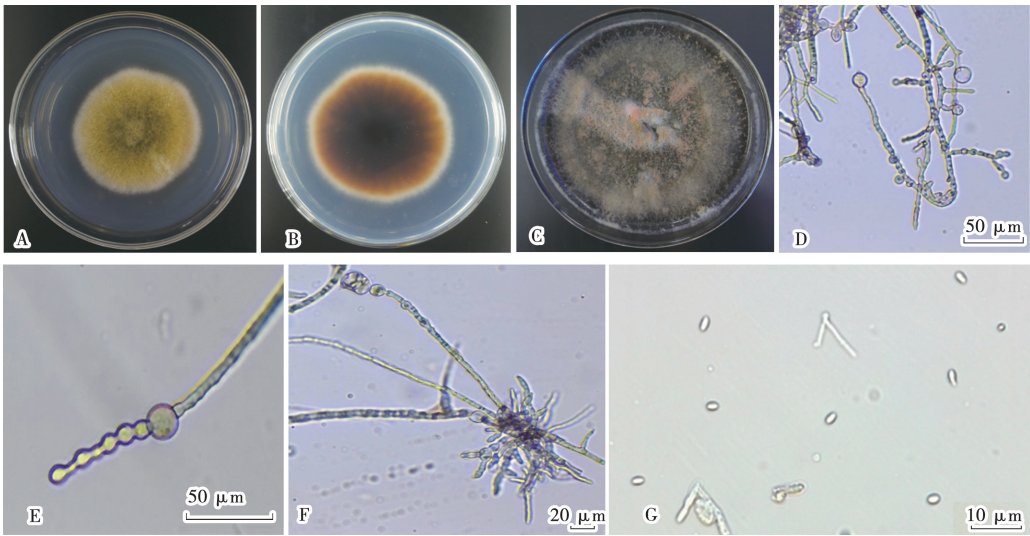
a. 对照; b. 接菌发病症状; c. 田间发病症状。

图 1 高粱根腐病病状

2.2 病原菌的形态学特征

ZY5 在 PDA 培养基上 25 ℃培养 7 d,菌落直径 63~65 mm;菌丝灰白色;菌落正面绒状,规则圆形,边缘黄褐色,中间灰褐色(图 2A),背面深黄褐色至黑色(图 2B)。再放置室内,室温自然光照培养 10 d,菌落背面逐渐变为深红色,菌落中心

出现不规则锈红色分生孢子团(图 2C)。挑取病菌显微镜观察,病菌可产生厚垣孢子,单生或串生(图 2D~E),大小 8~17 μm×10~12 μm;分生孢子梗具分枝(图 2F);分生孢子长卵圆形(图 2G),无隔膜,大小 2.0~3.0 μm×1.0~1.5 μm,初步鉴定为附球菌。



A. 菌落正面; B. 菌落背面; C. 菌落中心形成锈红色分生孢子团; D、E 厚壁孢子; F. 产孢结构; G. 分生孢子。

图 2 病原菌 ZY5 PDA 培养的形态特征

2.3 病原菌的分子生物学鉴定

利用 ITS 基因和  $\beta$ -tubulin 基因对菌株 ZY5 的 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经电泳验证后送至生工公司测序,PCR 产物的有效长度分别为 500 bp 和 750 bp。

将 ITS 基因和  $\beta$ -tubulin 基因序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对,下载序列相似性为 99% 及以上,依据最大似然法 (ML) 构建系统发育树进行系统进化分析,通过自举 (bootstrap) 对系统树

进行检验,1 000 次重复。该菌株 ITS 基因序列 (OK584736) 与 *Epicoccum sorghinum* (MN341233)、*Epicoccum laticollum* (MH824373)、*Epicoccum thailandicum* (MN010545) 聚为一支,不能具体确定到种。而其  $\beta$ -tubulin 序列与高粱附球菌 (*Epicoccum sorghinum*, MN218192) 聚为一支,自展支持率为 98% (图 3)。将菌株 ZY5 鉴定为高粱附球菌。

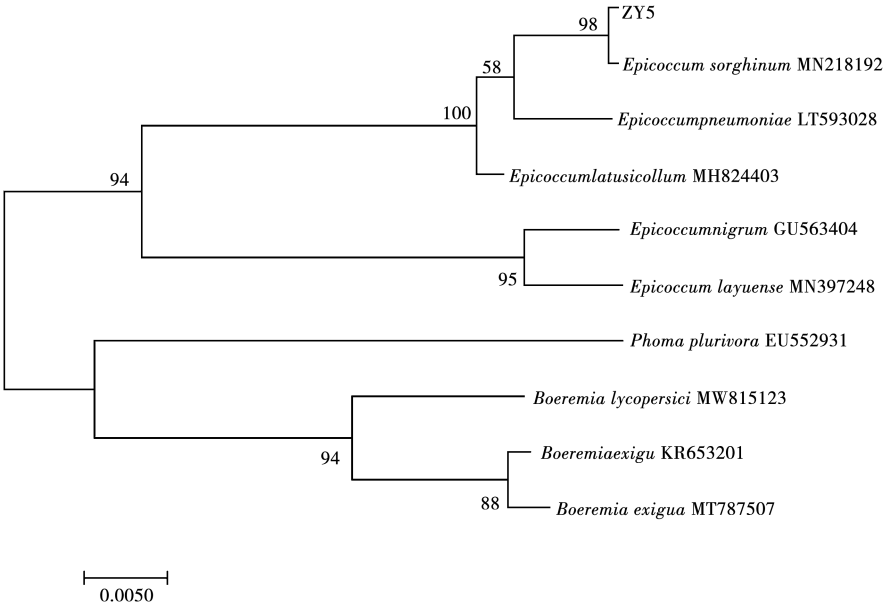


图 3 基于  $\beta$ -tubulin 序列构建的 ZY5 菌株的系统发育树

3 讨论

已有研究表明引起高粱根腐病的病原菌有 *Fusarium* spp.<sup>[9-11]</sup>、*Pythium* spp.<sup>[12]</sup>、*Penicillium* spp.<sup>[13]</sup>、*Bipolaris sorokiniana*、*Alternaria alternata*、*Macrophomina phaseolina*、*Rhizoctonia sorghi* 和 *Phoma sorghina*<sup>[14-16]</sup> 等,高粱根腐病通常由多种土壤真菌复合侵染导致。本研究结合形态和分子生物学鉴定出一株新的高粱根腐病致病菌高粱附球菌 (*Epicoccum sorghinum*)。国内相关报道表明,高粱附球菌可侵染为害葫芦科,禾本科水稻、玉米、慈竹、狗尾巴草,百合科黄花菜、吊兰,豆科大豆、豇豆,马齿苋科马齿苋和苋科等植物,并引起植株叶部、茎部、根部的病害<sup>[21]</sup>。

随着分子技术的发展,病原菌的鉴定不再仅仅是对其形态进行观察<sup>[22]</sup>,本研究提取了病原菌 ZY5 的 ITS 基因序列,并进行 BLAST 比对,该菌株与 *Epicoccum sorghinum*、*Epicoccum latusi-*

*collum* 和 *Epicoccum thailandicum* 的同源性均为 100%,不能鉴定到种。虽然大部分的致病菌可通过 ITS 序列鉴定<sup>[23-24]</sup>,但仍有部分种无法通过此方法鉴定<sup>[25]</sup>。相对 ITS 来说  $\beta$ -tubulin 基因内含子区域高度可变,进化速率更快<sup>[26]</sup>,因此本研究又采用  $\beta$ -tubulin 基因进行系统发育分析,结果显示,病原菌与高粱附球菌 (*Epicoccum sorghinum*) 聚为一支,自展支持率为 98%,能明显与其他种区分开来。可见,结合多基因序列分析是鉴定高粱附球菌较为理想的分子生物学手段。

4 结论

通过蘸根法确定 ZY5 为高粱根腐病的致病菌。ZY5 经 PDA 培养观察形态特征,并基于 ITS 基因序列和  $\beta$ -tubulin 基因序列构建系统发育树,将 ZY5 鉴定为高粱附球菌 (*Epicoccum sorghinum*)。研究结果可为了解引起高粱根腐病的病原种类及病害的防治奠定基础。



参考文献:

[1] VENKATESWARAN K, ELANGO VAN M, SIVARAJ N. Origin, domestication and diffusion of *Sorghum bicolor* [M]//Breeding Sorghum for Diverse End Uses. Amsterdam: Elsevier, 2019: 15-31.

[2] 焦少杰,王黎明,姜艳喜,等. 黑龙江省高粱产业技术需求[J]. 黑龙江农业科学,2009(6):38-39,43.

[3] 焦少杰. 黑龙江省西部高粱生产发展对策研究[D]. 北京: 中国农业科学院,2013.

[4] 卢庆善,邹剑秋,朱凯,等. 试论我国高粱产业发展:一论全国高粱生产优势区[J]. 杂粮作物,2009,29(2):78-80.

[5] 闫锋,董扬,李清泉,等. 黑龙江省高粱生产现状与对策[J]. 农业科技通讯,2021(11):11-12.

[6] 沈海军. 黑龙江省高粱生产概况[J]. 黑龙江农业科学,2011(12):152-154.

[7] LITTLE C R, PERUMAL R. The biology and control of sorghum diseases [M]//Sorghum. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 2019: 297-346.

[8] ROOYEN D V. The resistance of grain sorghum to the root rot pathogen complex[D]. Bloemfontein: University of the Free State Bloemfontein, 2012.

[9] DITSHIPI P M. Etiology of *Fusarium* crown and root rot of grain sorghum in South Africa[D]. University of the Free State, 2007.

[10] GUNASINGHE N, VAGHEFI N, SHIVAS R G, et al. Diversity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from cultivated *Sorghum* stems and roots in eastern Australia[J]. Plant Pathology, 2024, 73(9): 2563.

[11] YAN J C, QI N W, XU J, et al. Metabolomic analyses reveal that IAA from *Serratia marcescens* Lkbn100 promotes plant defense during infection of *Fusarium graminearum* in *Sorghum*[J]. Plants, 2024, 13(16): 2184.

[12] PRATT R G. Pathogenicity of three species of *Pythium* to seedlings and mature plants of grain *Sorghum* [J]. Phytopathology, 1980, 70(8): 766.

[13] 徐秀德,刘志恒. 高粱病虫害原色图鉴[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社,2013.

[14] BALAH A M, EASSA S M H, EL-HADIDY A E, et al. Bioefficacy of some Rhizobacterial isolates against *Sorghum* root Rot pathogen *Bipolaris sorokiniana* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(5): 398-405.

[15] BATHOOVA M, ŠVUBOVÁ R, BOKOR B, et al. Silicon triggers *Sorghum* root enzyme activities and inhibits the root cell colonization by *Alternaria alternata* [J]. Planta, 2021, 253(2): 29.

[16] THOMAS M D. Sorghum diseases in western Africa [M]. Sorghum and Millets Diseases, a Second World Review. ICRISAT, Patancheru, Andhra Pradesh, India, 1992: 25-29.

[17] 孙广宇,宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社,2002.

[18] 黄玟琳,尹桥秀,江仕龙,等. 茶叶斑病病原菌高粱附球菌(*Epicoccum sorghinum*)的鉴定及生物学特性[J]. 热带作物学报,2021,42(11):3269-3277.

[19] 张国辉,李向阳,顾焕先,等. 黔东南州红心猕猴桃叶尖干枯病病原鉴定[J]. 中国农学通报,2021,37(3):145-149.

[20] 彭成彬,柯栋贤,陈美霞,等. 茶树镰刀菌的分离鉴定和遗传多样性研究[J]. 中国茶叶,2018,40(8):24-29.

[21] 李润根,徐丹,李子奇. 百合病原菌高粱附球菌寄生范围的初步研究[J]. 昆明学院学报,2020,42(6):64-67.

[22] 申永铭,李海源,陈爱昌,等. 甘肃省西地区甘蓝枯萎病病原菌的分离与鉴定[J]. 植物保护,2017,43(4):180-184.

[23] 柳凤,欧雄常,詹儒林,等. 火龙果赤斑病病原菌的分离与鉴定[J]. 中国植保导刊,2018,38(8):19-22,42.

[24] 孙华,张海剑,郭宁,等. 黄淮海夏玉米主产区穗腐病病原菌的分离鉴定[J]. 植物保护学报,2017,44(5):796-802.

[25] VISAGIE C M, HOUBRAKEN J, FRISVAD J C, et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* [J]. Studies in Mycology, 2014, 78: 343-371.

[26] EZEONUEGBU B A, ABDULLAHI M D, WHONG C M Z, et al. Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 2094.

# Identification of a Pathogen Causing Root Rot Disease in Sorghum

**ZHANG Huan, CAO Shang, FAN Xinyu, ZHANG Meiqi, CHEN Xuemei, ZHAN Xin, GUO Yongxia**  
(College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University / National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China)

**Abstract:** In order to identify the pathogen species of a separated sorghum root rot, the dipping root inoculation method was used to verify Koch's postulates, and the fungus was identified based on the analysis of *ITS* and *β-tubulin* gene sequences, combined with morphological characteristics. The results indicated that the colony of strain ZY5 was velvety on the front, regular and circular, with a yellow brown color. The reverse side of the colony was dark yellow brown to black. Chlamydospores were either solitary or in chains, and sized 8—17 μm×10—12 μm. Conidia were oval-shaped, aseptate, and sized 2.0—3.0 μm×1.0—1.5 μm. The phylogenetic tree constructed based on *β-tubulin* sequences grouped ZY5 closely with *Epicoccum sorghinum*, with a support rate of 98%. Based on morphological characteristics and the constructed phylogenetic tree, strain ZY5 was identified as *Epicoccum sorghinum*. This is the first report domestically and internationally of *Epicoccum sorghinum* causing sorghum root rot.

**Keywords:** sorghum; root rot disease; *Epicoccum sorghinum*; pathogen identification