

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (4) :425 - 432; 4 April 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicroen  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140457

## 黑龙江省一株红小豆锈病病原菌鉴定

郑素娇, 柯希望, 殷丽华, 崔冬梅, 张海涛, 台莲梅, 左豫虎\*

黑龙江八一农垦大学, 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319

**摘要:** 【目的】为明确发生在黑龙江省大庆市红小豆田中的锈病病原物的分类地位。【方法】从大庆市采集红小豆锈病标样, 采用单孢子堆分离法获得一株红小豆锈病菌纯培养物 ZXL01。采用观测夏孢子芽孔数目、位置和冬孢子壁厚度等形态学特征结合 ITS 序列分析的方法, 对其进行鉴定。【结果】ZXL01 夏孢子发芽孔多为 2 个, 位于孢子赤道部位较远之处, 冬孢子壁厚度为 2.9  $\mu\text{m}$  - 3.3  $\mu\text{m}$ 。在基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树中, ZXL01 菌株与两株豇豆单胞锈菌 (*Uromyces vignae*) 的参比菌株 (GenBank 登录号: AB115718 和 AB115731) 在自举值 99% 相聚一群。用豇豆单胞锈菌的特异性引物 UV-ITSF/R 进行检测, ZXL01 菌株可扩增出 500 bp 左右的特征片段。【结论】黑龙江省大庆市红小豆锈病病原菌 ZXL01 菌株为豇豆单胞锈菌, ZXL01 菌株的 GenBank 登录号是 KM461700。

**关键词:** 红小豆, 锈病, 病原菌鉴定, 豇豆单胞锈菌

**中图分类号:** S435.21      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 04-0425-08

红小豆锈病在红小豆全生育期均可发生, 主要危害叶片。夏孢子堆多在叶背发生, 散生或聚生, 引起叶片枯死而导致减产。该病发生严重时会造成叶片大量脱落, 植株早衰, 籽粒干瘪, 严重影响红小豆的产量和品质。红小豆锈病在世界范围内广泛分布, 在拉丁美洲、澳大利亚、中国以及美国等多个国家均有过大的流行和危害<sup>[1]</sup>。本研究小组 2012 年对黑龙江省杂豆作物病害的调查表明, 黑龙江省西部地区红小豆锈病发生严重, 多数地块病株率达 100%, 严重地块几近绝收。Lindgren 等<sup>[2]</sup>研究表明, 锈病发病率每上升 1%, 则因锈病导致的产量损失就提高 19 kg/ha。

国外关于红小豆锈病病原菌的分类地位存在分歧。Hiratsuka<sup>[3]</sup> 将红小豆栽培种 [*Vigna angularis*

(Willd.) var. *angularis*]、赤小豆 [*V. umbellate* (Thunb.) Ohwi&Ohashi]、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 上的锈病菌命名为疣顶单胞锈菌 (*Uromyces appendiculatus*)。Hirata<sup>[4]</sup> 则认为, 发生在红小豆栽培种、赤小豆和红小豆野生种 [*V. angularis* var. *nipponensis* (Ohwi.) Ohwi & Ohashi] 上的锈病菌并非疣顶单胞锈菌 (*U. appendiculatus*), 而应该归属于一个新的种, 并将其命名为红小豆单胞锈菌 (*U. azukicola* S. Hirata), 然而这一观点并未被所有学者认可。Hiratsuka<sup>[5]</sup> 和 Arthur<sup>[6]</sup> 认为将疣顶单胞锈菌、红小豆单胞锈菌、豇豆单胞锈菌 (*U. vignae*) 归属于菜豆单胞锈菌 (*U. phaseoli*) 下的变种更为合理, 分别命名为 *U. phaseoli* var. *Phaseoli*、*U. phaseoli* var. *azukicola* Hiratsuka、*U. phaseoli* var. *vignae*。国

**基金项目:** 国家科技支撑计划项目 (2104BAD07B05); 中国博士后科学基金第 56 批面上项目 (2014M561378)

\* 通信作者。Tel/ Fax: +86-459-6819133; E-mail: zuoyhu@163.com

**作者简介:** 郑素娇 (1986 -), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事植物病理学方面的研究。E-mail: sujiao307@126.com

**收稿日期:** 2014-09-25; **修回日期:** 2014-12-08

内关于红小豆锈病病原菌的鉴定未见报道。曹如槐等<sup>[7]</sup>、王晓梅等<sup>[8]</sup>在其研究论文中将红小豆锈病的病原菌叙述为疣顶单胞锈菌,金文林等<sup>[9]</sup>在其研究论文中将红小豆锈病的病原菌叙述为红小豆单胞锈菌,可见国内对红小豆锈病病原菌分类地位的认识也存在分歧。关于红小豆锈病菌是疣顶单胞锈菌还是红小豆单胞锈菌尚没有确切的试验证据。红小豆锈病病原菌的分类地位是当前迫切需要明确的一个重要科学问题。

在进行病原菌分类地位的研究中,除采用形态学和生理特征分析方法之外,分子进化分析已经成为真菌分类的一个重要手段。对于无法从形态学上明确区分的真菌,通常选择包含高度变异区域的核糖体 DNA 转录间隔区(rDNA-ITS)以及线粒体 DNA 为研究对象,同时结合形态学特征对真菌进行区分鉴定<sup>[10]</sup>。Chung 等<sup>[11]</sup>采用 ITS 序列分析结合形态学特征准确的区分了疣顶单胞锈菌和豇豆单胞锈菌,并利用 ITS 序列设计出了疣顶单胞锈菌的高度特异性引物 UA-ITSF/R 和豇豆单胞锈菌的高度特异性引物 UV-ITSF/R<sup>[12]</sup>。为明确黑龙江省红小豆锈病菌的病原菌的分类地位,本研究观察分析了采自黑龙江省大庆市林甸县花园乡的红小豆锈病菌的单孢子纯培养物 ZXL01 的夏孢子芽孔数、芽孔位置以及冬孢子壁厚度等形态学特征,并结合 ITS 序列分析对其进行鉴定,明确了黑龙江省红小豆锈病病原菌的分类地位,为开展该病害的研究奠定基础,研究结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试植株:**供试红小豆(*Vigna angularis*)为感病品种宝清红,由国家杂粮工程技术研究中心种质资源室提供。种植前先在室内进行催芽,待种子发芽后种植于直径为 10 cm 的营养钵内,每盆播种 10 粒,置于 25℃ 的光照玻璃温室内培养至真叶展开度为 60% - 70% 时备用。

**1.1.2 供试菌种:**2012 年 8 月在黑龙江省大庆市林甸县花园乡红小豆锈病发病田块采集带有夏孢子堆的病叶,取病叶上的夏孢子制备浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的夏孢子悬浮液,采用涂抹接种的方法接种于红小豆植株真叶上,接种后于  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  黑暗培养

条件下保湿培养 24 h,然后接种苗置于 25℃、16 h 光照:8 h 黑暗条件下继续培养。参照魏国荣等<sup>[13]</sup>小麦条锈菌纯化的方法,获得红小豆锈病菌的单孢子纯培养物 ZXL01,再将 ZXL01 菌株在感病品种宝清红上扩繁。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**乳酸、苯酚、甘油、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、乙醇、冰乙酸、氯仿、异戊醇、异丙醇、琼脂糖、石英砂、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)均为分析纯;Quick Taq HS Dyemix、溴化乙锭、DL 2000 均为东洋纺生物科技有限公司生产;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为北京索莱宝科技有限公司生产。Bio-Rad PCR 仪,美国伯乐公司;电泳仪和电泳槽,北京六一仪器厂;Bio-Best200E 凝胶成像仪,美国西蒙公司;Olympus BX60 多功能生物显微镜,日本奥林巴斯株式会社;S-4800 型扫描电子显微镜,日本日立公司。

### 1.2 夏孢子和冬孢子的形态观察

将 ZXL01 的夏孢子按照 1.1.2 所述方法进行接种和培养。至叶片显症产孢后,光学显微镜观察参照 Emeran 等<sup>[14]</sup>的方法于 Olympus BX60 多功能生物显微镜上观察。夏孢子和冬孢子自然干燥后喷金 50 s,于日立 S-4800 型扫描电子显微镜上观察。主要观测夏孢子和冬孢子壁的纹饰、夏孢子和冬孢子的大小、夏孢子的芽孔数及芽孔位置以及冬孢子壁的厚度并记录拍照。

### 1.3 红小豆锈病病原菌 DNA 的提取

收集 0.1 g 夏孢子,参照参考文献 [15] 提取菌株 ZXL01 的 DNA, -20℃ 储存备用。

### 1.4 ITS 序列扩增及测序

采用由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成的单胞锈菌属通用引物 ITS5-u (5' -AAGTTTCTGT AGGTG-3') 和 ITS4-u (5' -GGCTTTTCCCTCTTCAT-3')<sup>[16]</sup>,对 ZXL01 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(总体积为 25  $\mu\text{L}$ ): ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu\text{L}$ 、ITS5-u 和 ITS4-u 各 0.5  $\mu\text{L}$ 、DNA 模板(ZXL01 基因组 DNA) 1  $\mu\text{L}$ 、12.5  $\mu\text{L}$  Quick Taq HS Dyemix。PCR 扩增程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物于 4℃ 保存备用。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,对目的条带进行切胶回收,回收产物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序。测序结果在

GenBank 中进行 BLASTn 比较搜索, 确定序列为 ITS 序列后提交 GenBank。

### 1.5 序列分析

将本研究中测定的 ITS 序列与 GenBank 中已报道的 *Uromyces* 不同种的 ITS 序列 (表 1) 进行多序列比对, 多序列比对采用 Cluster X v1.81 使用的默认参数进行<sup>[17]</sup>, 依据多序列比对结果采用 Bioedit v7.0.1 进行校正, 去除两端不确定的序列后<sup>[18]</sup>, 对来自 *Uromyces* 不同种锈菌的 ITS 序列进行分析。以小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis*) 为外群 (outgroup), 采用 Mega v5.2.2 中的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 通过自举 (bootstrap) 对系统树

进行检验, 1000 次重复。

### 1.6 特异 PCR 检测

利用疣顶单胞锈菌特异性引物 UA-ITSF (5'-GGTTTTGCCATTGCACTCAG-3') 和 UA-ITSR (5'-CATTGTTTAGGAGTCCTGAC-3')、豇豆单胞锈菌特异性引物 UV-ITSF (5'-CATCTTTGCCATTGCACTCAG-3') 和 UV-ITSR (5'-AGTTAGTTTAGGAGTTCTAAC-3')<sup>[12]</sup>, 对分离物基因组 DNA 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 观察引物 UV-ITSF/R 能否扩增出 500bp 左右的特异性条带。

表 1. 用于系统进化分析的 *Uromyces* 不同种锈病菌 ITS 序列信息

Table 1. Additional rust taxa selected for ITS analysis

Species	Host	GenBank accession No.
<i>Uromyces pisi</i>	<i>Euphorbia cyparissias</i>	AF180192
<i>U. pisi</i>	<i>E. cyparissias</i>	AF180184
<i>U. scutellatus</i>	<i>E. esula</i>	AF180198
<i>U. scutellatus</i>	<i>E. esula</i>	AF180200
<i>U. pisi-sativi</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	DQ521590
<i>U. pisi-sativi</i>	<i>C. scoparius</i>	DQ521585
<i>U. striatus</i>	<i>Medicago sativa</i>	AF180162
<i>U. striatus</i>	<i>M. sativa</i>	FJ468410
<i>U. appendiculatus</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	DQ411530
<i>U. appendiculatus</i>	<i>P. vulgaris</i>	AB115740
<i>U. viciae-fabae</i>	<i>Vigna faba</i>	FJ468419
<i>U. viciae-fabae</i>	<i>V. faba</i>	FJ468417
<i>U. viciae-fabae</i>	<i>Lathyrus maritimus</i>	AB085195
<i>U. viciae-fabae</i>	<i>L. maritimus</i>	AB085192
<i>U. vignae</i>	<i>V. unguiculata</i> ssp. <i>unguiculata</i>	AB115718
<i>U. vignae</i>	<i>V. unguiculata</i> ssp. <i>unguiculata</i>	AB115731
<i>Puccinia striiformis</i>	<i>Triticum aestivum</i>	JN575605

## 2 结果和分析

### 2.1 夏孢子和冬孢子形态鉴定

接种后 5-6 d 叶片出现明显的花斑症状 (图 1-A), 接种后 8-9 d 即可在叶片表面形成夏孢子堆 (图 1-B), 夏孢子堆浅棕色, 突破表皮后成棕色、粉状, 夏孢子圆形、卵形或椭圆形, 棕色或浅棕色, 表面有细刺, 大小为 (16.0-21.9)  $\mu\text{m}$   $\times$  (18.5-29.6)  $\mu\text{m}$  (图 2-A)。夏孢子具有 2 个芽孔, 芽孔的位置不

一, 多数芽孔位于孢子赤道部位较远之处, 少数位于孢子的赤道 (图 1-D)。接种后 16-17 d 可以产生深棕色的冬孢子堆 (图 1-C), 冬孢子常生于夏孢子堆上或附近 (图 2-C), 冬孢子近圆形至短椭圆形, 深棕色, 表面光滑, 顶端有乳头状突起, 另一端具有无色的柄, 大小为 (16.1-23.0)  $\mu\text{m}$   $\times$  (22.4-37.9)  $\mu\text{m}$  (图 2-B), 冬孢子壁厚度为 2.9  $\mu\text{m}$ -3.3  $\mu\text{m}$  (图 1-E)。夏孢子的芽孔数目及其位置和冬孢子壁的厚度与 Chung 等<sup>[11]</sup>报道的形态学第三类群 (见表 2) 较为相似, 第三类群的锈菌隶属于豇豆单胞锈菌。

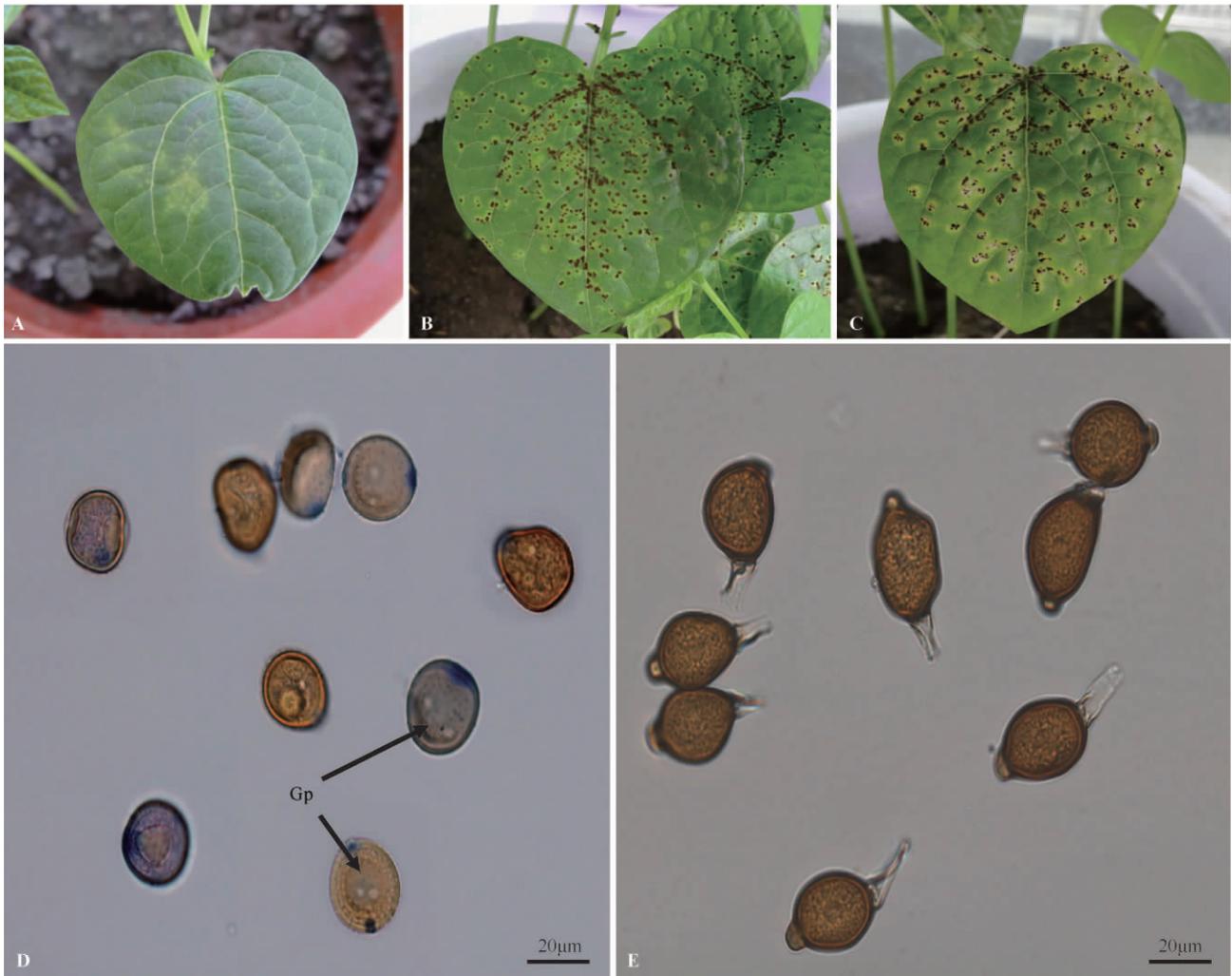


图 1. 接种发病植株的叶片症状和 ZXL01 菌株夏孢子和冬孢子形态的光学显微镜观察

Figure 1. Symptoms of adzuki bean leaves infected by urediospore of ZXL01 and morphological investigation of the urediospore and teliospore of the isolate ZXL01 under optical microscope. A: Lesion; B: Uredium; C: Telium; D: The urediospore of ZXL01, the two germ pores were far from spores' equator area; E: The teliospore of ZXL01.

## 2.2 ITS 序列分析

用通用引物 ITS5 - u 和 ITS4 - u 对 ZXL01 菌株的 rDNA-ITS 序列进行扩增, 获得 629 bp 包含 5.8S rRNA 的 ITS 序列, 序列已提交 GenBank 登录号为 KM461700。对所测菌株 ITS 序列图谱校正, 将所得出的 ITS 区序列与 NCBI 中已有的序列进行比较, 该 ITS 序列与豇豆单胞锈菌相似度为 93%。可初步认定该菌株隶属于豇豆单胞锈菌。

在 GenBank 数据库中选取 17 个 *Uromyces* 属下不同种的 ITS 序列(表 1)。在基于 rDNA-ITS 序列的系统发育树中, ZXL01 与豇豆单胞锈菌的两

个参比菌株(AF115718、AF115731)在自举值 99% 相聚一群(图 3)。采用最大简约法(Maximum parsimony, MP)构建了系统发育树, 其结果与 NJ 法构建的系统发育树结果完全一致。

## 2.3 特异 PCR 检测

利用疣顶单胞锈菌的特异性引物 UA-ITSF/R 和豇豆单胞锈菌的特异性引物 UV-ITSF/R 扩增 ZXL01 基因组的 DNA。通过 1% 的琼脂糖电泳检测, 发现 UA-ITSF/R 没有扩增产物, 而 UV-ITSF/R 扩增出豇豆单胞锈菌特有的 500bp 左右特异性条带(图 4), 与 Chung 等<sup>[12]</sup>报道的结果完全一致。表明 ZXL01 菌株为豇豆单胞锈菌。

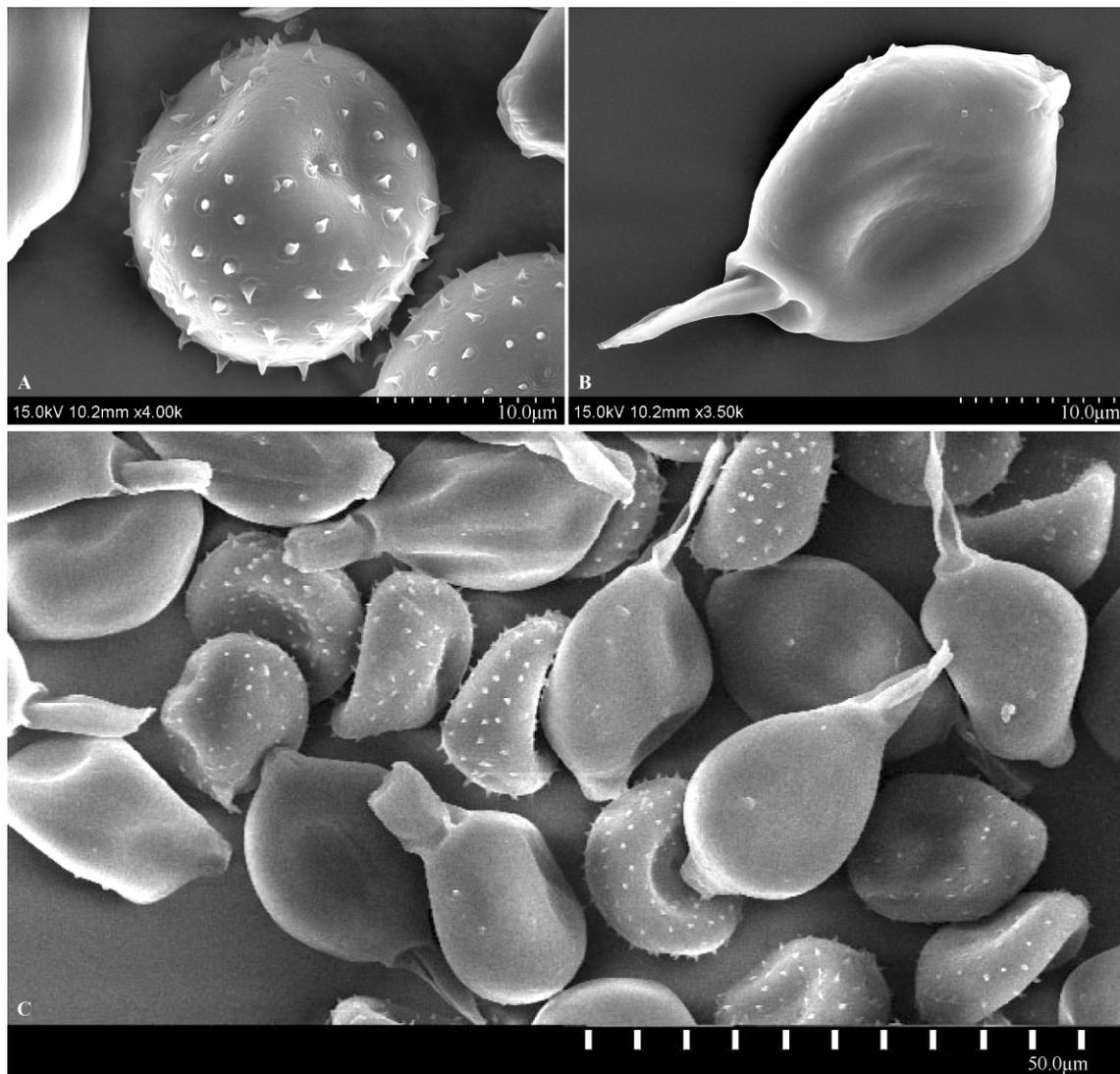


图 2. ZXL01 菌株夏孢子和冬孢子形态的扫描电子显微镜观察

Figure 2. Morphological investigation of the urediospore and teliospore of the isolate ZXL01 on scanning electron microscope. A. Urediospore; B. Teliospore; C. Urediospores and teliospores.

表 2. 基于夏孢子和冬孢子形态特征的锈菌 3 个形态学类群<sup>[11]</sup>

Table 2. Morphological groups based on characteristics of urediospores and teliospores<sup>[11]</sup>

Morphological groups	Urediospores	Teliospores
	No. of germ pores and position	Individual mean of wall thickness
I	2 (rarely 3), equator and far from spores' equator area	1.4 $\mu\text{m}$ - 2.3 $\mu\text{m}$ (rarely more than 2.3 $\mu\text{m}$ )
II	2, equator (rarely far from spores' equator area)	2.4 $\mu\text{m}$ - 3.3 $\mu\text{m}$
III	2 (rarely 3), far from spores' equator area (rarely equator)	2.6 $\mu\text{m}$ - 3.4 $\mu\text{m}$

### 3 结论和讨论

本研究采用形态学结合 ITS 序列分析的方法, 对分离自大庆市林甸县花园乡红小豆锈病的病原菌

菌株 ZXL01 进行了鉴定。形态学和分子鉴定的结果表明, ZXL01 菌株与豇豆单胞锈菌亲缘关系最近, 因此可以确定 ZXL01 分离株为豇豆单胞锈菌 (*Uromyces vignae*)。

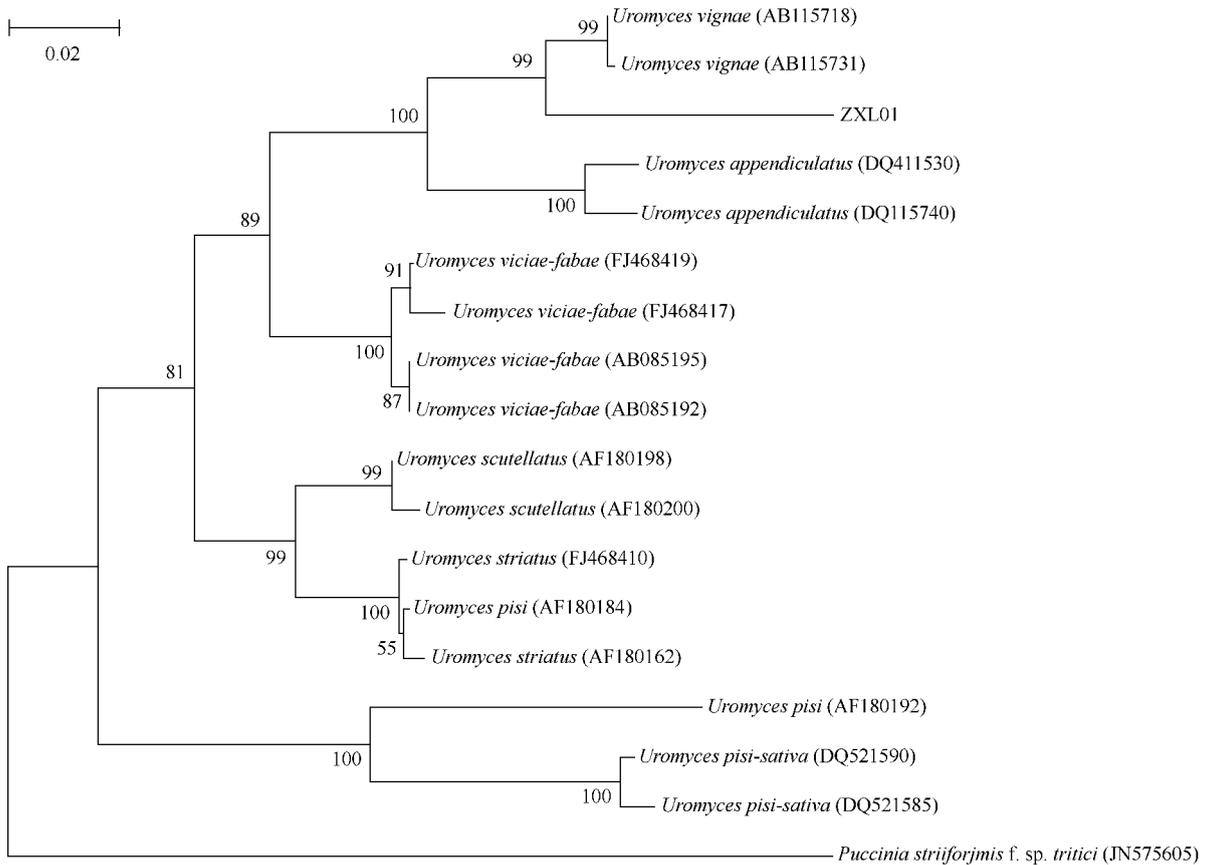


图 3. ZXL01 菌株及相关菌株的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of isolate ZXL01 and their relatives in *Uromyces*. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 2% sequence divergence.

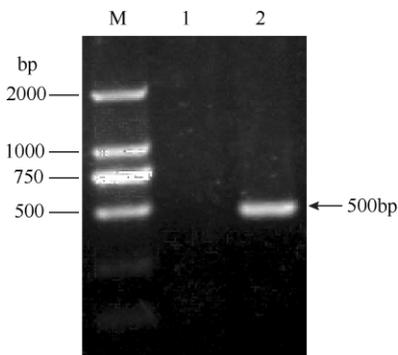


图 4. ITS 特异性引物扩增 ZXL01 基因组 PCR 产物的电泳检测

Figure 4. The polymerase chain reaction (PCR) of species-specific primers UV-TSF/R and UA-TSF/R for identification of ZXL01. M, DL2000 DNA marker; Lane 1, Species-specific primers UA-TSF/R; Lane 2, Species-specific primers UV-TSF/R

通常冬孢子和夏孢子的形态学特征是区分不同锈菌的重要手段<sup>[14]</sup>, 然而, 由于某些种类的 *Uromyces* 在自然条件下很难见到冬孢子, 致使有些

锈菌不能以冬孢子形态为标准进行鉴定<sup>[14,19]</sup>。ZXL01 菌株可在红小豆上产生冬孢子, 因此可以参照冬孢子形态对 ZXL01 菌株进行形态学鉴定。本研究结果发现, ZXL01 菌株的夏孢子具有 2 个芽孔, 多数芽孔位于夏孢子的两极位置, 少数位于夏孢子的赤道位置; 冬孢子壁厚为  $2.9 \mu\text{m} - 3.3 \mu\text{m}$ 。这些特征与 Chung 等<sup>[11]</sup> 报道的形态学第三类群 (隶属于豇豆单胞锈菌) 较为相似, 因此该菌株在形态学上属于豇豆单胞锈菌。

对于形态学上很难区分的真菌种类, 多种核糖体 DNA 区域以及线粒体 DNA 都可以成功应用于真菌种类的鉴别, 因为这些区域的 DNA 特征是具有高度的变异性, 已经有众多团队以该方法对锈菌的系统进化关系进行了研究<sup>[10,20]</sup>。因此为了进一步明确病原菌的分类地位, 除采用形态学和生理特征的鉴别方法外, 分子进化分析是真菌种类鉴定及其亲缘关系研究必须采用的重要手段<sup>[21]</sup>。Chung 等<sup>[11]</sup> 采用形态学结合 LSU rDNA D1/D2 以及 ITS 序列的

方法,对来自 *Phaseolus*、*Vigna*、*Apios* 等寄主的 225 个锈菌进行了鉴定,结果表明基于 LSU rDNA 序列的 D1/D2 区域的分类结果与形态学分类结果相距甚远,而 ITS 序列分析则和形态学特征能够较好的契合,因此将 225 个锈菌依据 ITS 特征及形态学分为 3 个大的类群,其中 ITS 类群 III (形态学类群 III) 隶属于 *U. vignae*, ITS 类群 II (形态学类群 I) 隶属于 *U. appendiculatus* var. *azukicola* 和 *U. appendiculatus* var. *dispersus*, ITS 类群 I (形态学类群 II) 隶属于 *U. appendiculatus*。根据 Chung 等<sup>[11]</sup> 的研究结果,本研究采用形态学结合 ITS 序列的方法分析 ZXL01 菌株的分类地位,该分离株 ITS 序列与 Chung 等<sup>[11]</sup> 报道的 ITS 类群 III 的 2 个分离株 (TSH-R17965, AB115718; HH92019, AB115718) 处于同一分支,自举支持率为 99%。表明 ZXL01 菌株归属于豇豆单胞锈菌。同时,利用 Chung 等<sup>[12]</sup> 设计的 *U. vignae* 特异性引物的扩增结果表明,ZXL01 菌株也属于豇豆单胞锈菌,ZXL01 菌株在 GenBank 上获得的编号是 KM461700。

**致谢:** 本文扫描电子显微镜观察得到哈尔滨师范大学现代实验中心蔡清海教授、张大维教授的指导和帮助,谨此致谢。

## 参考文献

- [1] Stavely JR, Pastor-Corrales MA. Bean Production Problems in the Tropics. 2<sup>nd</sup> eds. Colombia: Central International Agricultural Tropical Press, 1989: 159-194.
- [2] Lindgren DT, Eskridge KM, Steadman JR, Schaaf DM. A model for dry bean yield loss due to rust. *Horttechnology*, 1995, 5(1): 35-37.
- [3] Hiratsuka N. Notes on Japanese species of *Uromyces* (In Japanese). *Japanese Journal of Botany*, 1937, 13: 29-47.
- [4] Hirata S. On the rust fungi of cowpea, kidney bean and small red bean (in Japanese). *Annals Phytopathological Society of Japan*, 1952, 16(1): 13-18.
- [5] Hiratsuka N. Revision of taxonomy of the genus *Uromyces* in the Japanese. *Report of the Tottori Mycological Institute*, 1973, 10: 1-98.
- [6] Arthur JC. Manual of the Rusts in United States and Canada. New York: Hafner Publishing Company, 1934: 296-297.
- [7] Cao R, Wang X, Nan C, Li Y, Wang X. Studies on resistant identification to the rust in adzuki bean germplasm resource. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1991, 21(3): 180. (in Chinese)
- 曹如槐, 王晓玲, 南城虎, 李怡琳, 王晓鸣. 小豆种质资源对锈病的抗性鉴定研究. *植物病理学报*, 1991, 21(3): 180.
- [8] Wang X, Zang D, Cui C, Wang B, Yang X. Spatial distribution pattern of Rust in maize and bean. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2007, 29(5): 488-490. (in Chinese)
- 王晓梅, 臧东初, 崔长军, 王伯全, 杨信东. 玉米锈病和小豆锈病的空间分布型研究. *吉林农业大学学报*, 2007, 29(5): 488-490.
- [9] Jin W, Yu S, Zhang R, Wang J, Zhang Y, Cheng X. Genetic analysis of resistant genes to rust, powdery mildew and brown spot in Adzuki Bean. *Journal of Beijing Agricultural College*, 1996, 11(1): 1-9. (in Chinese)
- 金文林, 喻少帆, 张润清, 王京波, 张永红, 陈学珍. 小豆锈病、白粉病及褐斑病的抗性基因遗传分析. *北京农学院学报*, 1996, 11(1): 1-9.
- [10] Zambino PJ, Szabo LJ. Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. *Mycologia*, 1993, 85(3): 401-414.
- [11] Chung WH, Kakishima M, Tsukiboshi T, Maloto Kakishima. Morphological and phylogenetic analyses of *Uromyces appendiculatus* and *U. vignae* on legumes in Japan. *Mycoscience*, 2004, 45(4): 233-244.
- [12] Chung WH, Chung W, Ting PF, Huang HC, Huang JW. Molecular identification of *Uromyces appendiculatus* and *Uromyces vignae* from Taiwan with PCR-based method. *Plant Pathology Bulletin*, 2008, 17: 297-305.
- [13] Wei G, Wang X. Purification and storage of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2011, 40(2): 90-92. (in Chinese)
- 魏国荣, 王晓杰. 小麦条锈病菌菌种的纯化与保存方法. *河南农业科学*, 2011, 40(2): 90-92.
- [14] Emeran AA, Sellero JC, Niks RE, Rubiales D. Infection structures of host-specialized isolates of *Uromyces viciae-fabae* and of other species of *Uromyces* infecting leguminous crops. *Plant Disease*, 2005, 89(1): 17-22.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. 2<sup>nd</sup> eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1659.
- [16] Pfunder M, Schürch S, Roy BA. Sequence variation and geographic distribution of pseudoflower-forming rust fungi (*Uromyces pisi* s. lat.) on *Euphorbia cyparissias*.

*Mycological Research*, 2001, 105 (1) : 57-66.

- [17] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL \_ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24) : 4876-4882.
- [18] Hall TA. Bio-Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95 / 98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98.
- [19] Emeran AA, Román B, Sillero JC, Satovic Z, Rubiales D. Genetic variation among and within *Uromyces* species infecting legumes. *Journal of Phytopathology*, 2008, 156 (7-8) : 419-424.
- [20] Maier W, Begerow D, Weib M, Obserwinkler F. Phylogeny of the rust fungi: an approach using large subunit ribosomal DNA sequence. *Canadian Journal of Botany*, 2003, 81 (1) : 12-23.
- [21] El-Gazzar A. Systematic implications of susceptibility to *Uromyces* rusts in Leguminosae. In *Advances in legume systematic*. Kew UK: Royal Botanic Gardens, 1981 : 979-994.

## Identification of a fungal isolate causing adzuki bean rust in Heilongjiang

Sujiao Zheng, Xiwang Ke, Lihua Yin, Dongmei Cui, Haitao Zhang, Lianmei Tai, Yuhu Zuo\*

Heilongjiang Bayi Agricultural University, National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, Heilongjiang Province, China

**Abstract:** [Objective] The aim of the study is to identify the pathogen causing adzuki bean (*Phaseolus angularis*) rust in Daqing, Heilongjiang province. [Methods] Adzuki bean rust leaves were collected from Daqing, Heilongjiang province, China. A pure culture of rust isolate ZX101 was obtained by single pustule isolation. Its taxonomic status was determined by observing the number of germ pores of urediniospores, germ pore location and the wall thickness of teliospores, and sequencing ribosomal DNA internal transcribed spacer (rDNA-ITS). [Results] Morphological studies showed that most of the urediospores of ZX101 had two germ pores that were far from spores' equator area. The wall thickness of teliospores ranged from 2.9 to 3.3  $\mu\text{m}$ . The rDNA-ITS sequence of ZX101 was clustered in one clade with 2 reference isolates of *Uromyces vignae* (GenBank accession numbers AB115718 and AB115731) at 99% bootstrap levels in the phylogenetic tree. A 500 bp amplified product was obtained by the specific primers UV-ITSF/R, which was specific for *U. Vignae*. [Conclusion] The morphological features and ITS analysis indicated that the rust fungus ZX101 occurred on leaves of adzuki bean in Daqing was *U. Vignae*, and the accession number of GenBank was KM461700.

**Keywords:** adzuki bean, rust, pathogen identification, *Uromyces vignae*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Key Technology R&D Program (2104BAD07B05) and by the China Postdoctoral Science Foundation on the 56<sup>th</sup> General Program (2014M561378)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-459-6819133; E-mail: zuoyhu@163.com

Received: 25 September 2014 / Revised: 8 December 2014