

李艺阳, 吴冕, 顾和平, 等. 江苏省大豆豆荚真菌病害的病原菌分离与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(10): 1801-1809.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.10.004

## 江苏省大豆豆荚真菌病害的病原菌分离与鉴定

李艺阳<sup>1,2</sup>, 吴冕<sup>2</sup>, 顾和平<sup>2</sup>, 陈新<sup>2</sup>, 崔晓艳<sup>1,2</sup>

(1.南京农业大学植物保护学院, 江苏南京 210095; 2.江苏省农业科学院经济作物研究所/生物育种钟山实验室, 江苏南京 210014)

**摘要:** 真菌引起的大豆豆荚病害直接影响大豆籽粒及鲜食豆荚的产量和品质, 为了解江苏省大豆豆荚病害的主要致病菌, 本研究从南京、淮安、徐州、南通、盐城的大豆种植区内采集了 78 份有明显病斑的豆荚, 通过病原菌组织分离与纯化得到 112 种病原菌。通过对比 *ITS* 与 *TUB2* 序列, 112 种病原菌被分为半知菌亚门的 5 个属: 镰刀菌属 (*Fusarium* spp.)、炭疽菌属 (*Colletotrichum* spp.)、拟茎点霉属 (*Diaporthe* spp.)、黑孢菌属 (*Nigrospora* spp.) 和色二孢属 (*Lasiodiplodia* spp.)。其中镰刀菌属占比最高, 占 65.18%。从每个属中选择 1 个病原菌进行形态学观察以及柯赫氏法则验证, 并结合分子生物学鉴定和系统演化分析。结果证明 5 个分离物分别属于层出镰刀菌 (*F. proliferatum*)、平头炭疽菌 (*C. truncatum*)、大豆拟茎点霉菌 (*D. longicolla*)、球黑孢菌 (*N. sphaerica*) 和假可可毛色二孢菌 (*L. pseudotheobromae*)。本研究明确了为害江苏省大豆豆荚的主要病原菌, 为大豆豆荚真菌病害的有效防控提供理论依据。

**关键词:** 大豆; 真菌病害; 病原菌鉴定

中图分类号: S435.651 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)10-1801-09

## Isolation and identification of the pathogens causing soybean pod fungal diseases in Jiangsu province

LI Yiyang<sup>1,2</sup>, WU Mian<sup>2</sup>, GU Heping<sup>2</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>, CUI Xiaoyan<sup>1,2</sup>

(1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Zhongshan Biological Breeding Laboratory, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Soybean pod diseases caused by fungi directly affect the yield and quality of soybean seeds and fresh pods. In this study, 112 pathogens were isolated and purified from 78 diseased pods collected from soybean growing areas in Nanjing, Huai'an, Xuzhou, Nantong and Yancheng. By comparing *ITS* and *TUB2* sequences, 112 species of pathogens were classified into five genera of Deuteromycotina: *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Diaporthe* spp., *Nigrospora* spp. and *Lasiodiplodia* spp. Among them, *Fusarium* spp. accounted for the highest proportion (65.18%). One pathogen from each genus was selected for morphological observation and Koch's rule validation, and molecular biological identification and phylogenetic analysis were carried out. The results showed that the five isolates belonged to *Fusarium proliferatum*, *Colletotrichum truncatum*, *Diaporthe longicolla*, *Nigrospora sphaerica* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, respectively.

This study identified the main pathogens of soybean pods in Jiangsu province, providing a theoretical basis for effective control of soybean pod fungal diseases.

**Key words:** soybean; fungal diseases; pathogen identification

收稿日期: 2024-02-06

基金项目: 生物育种钟山实验室基金项目 (ZSBBL-KY2023-03); 农业生物育种重大项目 (2023ZD0403402); 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目 [JBGS(2021)057]; 江苏省林业科技创新与推广项目 [LYKJ-盱眙(2023)1号]

作者简介: 李艺阳 (2000-), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要研究方向为植物病理学。(E-mail) 1871561437@qq.com; 吴冕为共同第一作者。

通讯作者: 崔晓艳, (E-mail) cxy@jaas.ac.cn

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是中国重要的经

济作物之一,它是人类植物蛋白的主要来源,也可用于加工优质饲料和农副产品,在日常生产中不可或缺<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着国家持续推进大豆-玉米带状复合种植、粮豆轮作、盐碱地开发利用等产能提升工程,大豆总产量有所提高,初步缓解了大豆产需缺口大、严重依赖进口等问题<sup>[3]</sup>。但随着复种指数的增加,实际生产中大豆病虫害发生频率也在逐年提高,大豆病虫害包括真菌病害、病毒病害、细菌病害、虫害等,种类多,危害大。据报道,全球已知的大豆病虫害有 70 余种,其中在中国发生的大豆病虫害有 40 余种,常见的病害有 10 余种<sup>[4]</sup>。

前人研究发现,真菌侵染会使大豆豆荚发病,引起大豆豆荚干枯、豆荚萎缩及豆荚腐烂,是大豆豆荚上最为常见的病害<sup>[5]</sup>,目前已报道的豆荚真菌病害主要有大豆炭疽病(*Soybean anthracnose*)、大豆紫斑病(*Soybean cercospora spot*)、大豆荚枯病(*Soybean pod blight*)、大豆黑斑病(*Soybean black spot*)等。大豆炭疽病是由炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)真菌引起,炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)真菌包括平头炭疽菌(*C. truncatum*)等 10 余种<sup>[6-7]</sup>;菊池尾孢菌(*Cercosporakikuchii*)是大豆紫斑病的病原菌<sup>[8]</sup>;大豆荚枯病的病原菌主要是镰刀菌属(*Fusarium* spp.)真菌,镰刀菌属(*Fusarium* spp.)真菌包括木贼镰刀菌(*F. equiseti*)等 10 余种<sup>[9]</sup>;链格孢属真菌(*Alternaria* spp.)是大豆黑斑病的病原菌,包括链格孢(*A. alternata*)、芸苔链格孢(*A. brassicae*)、细极链格孢(*A. tenuissima*)<sup>[10]</sup>。豆荚真菌病害的病原菌数量繁多,种类复杂,同一种大豆病害可能是由同一属不同种的病原菌引起的,而不同种病原菌的形态特征、致病性、侵染规律、对杀菌剂的敏感性都不尽相同<sup>[11]</sup>,因此需要对病原菌进行精细鉴定。

由于发现的病原菌种类的增多和属种间的区别较小,利用传统的基于病原菌形态特征的病原菌鉴别技术难以对致病菌进行准确鉴别。随着分子生物学技术的发展,基因测序技术的应用越来越广泛,目前 *ITS*、*HIS3*、*TUB2*、*GAPDH* 和 *CHS-1* 等多基因特征序列分析在物种的属级和种级进化关系分析和鉴定中发挥了重要的作用,也是目前常用的病原菌鉴定方法<sup>[12]</sup>。

本研究采集了江苏南京、淮安、徐州、南通、盐城 5 个地区大豆种植区内的病荚,拟通过组织分离与纯化,结合形态学观察与分子生物学鉴定,明确江苏省引起

大豆豆荚发病的主要病原菌,为今后江苏地区大豆豆荚真菌病害的防控及抗病品种的选育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病样的采集

本研究于 2023 年大豆生长季(始粒期-满粒期)在江苏南京、淮安、徐州、南通、盐城 5 个地区的大豆种植区内采集具有明显病斑的豆荚样品,标记后于 -20 °C 冰箱保存。

### 1.2 病原菌的分离纯化与保存

将采集到的豆荚用清水冲洗,在病健交界处取数块 2 mm×2 mm 的植物组织,置于 75% 酒精中浸泡 30 s,随后在 NaClO 溶液(有效氯浓度为 2%)中浸泡 2 min,用去离子水冲洗 3 遍。将处理后的植物组织放入 PDA 培养基(含 50 μg/mL 的利福平和氨苄青霉素)中密封,25 °C 暗培养 48 h。

取 3~5 块 PDA 培养基上菌落边缘的菌丝块(2 mm×2 mm),放入 15 mL 无菌水中用匀浆机打碎,吸取 60 μL 液体均匀涂布在浓度为 3% 的 WA 培养基(含 50 μg/mL 的利福平和氨苄青霉素)上,25 °C 暗培养 24~48 h。挑取单根菌丝转移至 PDA 培养基上继续培养 7 d。挑取菌落边缘菌丝于 PDB 培养基中,120 r/min 振荡培养 5 d 后吸取培养液置于冻存管中,于 -80 °C 冰箱中长期保存。

### 1.3 病原菌的分子生物学鉴定

以核糖体内转录间隔区基因(*ITS*)序列和  $\beta$ -微管蛋白 2 基因(*TUB2*)序列为模版,设计引物 ITS-ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)/ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG);*TUB2*-T1 (AACATGCGTGAGATTGTAAGT)/Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC),PCR 扩增病原菌 DNA。扩增产物由擎科生物工程(南京)股份有限公司进行测序。将测序结果在 NCBI(美国国家生物技术信息中心)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 BLAST 比对,确定病原菌的种属。同时下载与病原菌 *ITS* 序列和 *TUB2* 序列相似性高的序列,利用 MEGA-X 软件中的最大似然法(ML)构建病原菌和相似菌种的系统发育树,分析病原菌与相似菌种的亲缘关系。

### 1.4 病原菌的形态学观察

首先肉眼观察 25 °C 暗培养的纯化分离物的菌落颜色、菌丝形态,吸取无菌水轻轻冲洗菌落,将孢子冲出后,用荧光显微镜观察孢子形态及大小。若

病原菌的孢子无法被冲洗出,取菌丝块置于 PDB 培养基中,25 ℃ 条件下 120 r/min 振动培养 5 d 至产孢后再用显微镜观察。

### 1.5 柯赫氏法则验证

参考大豆黄化苗接种大豆炭疽病病原菌的方法<sup>[13]</sup>,在装有湿润蛭石的花盆中均匀播种大豆,用黑色塑料袋覆盖花盆,暗培养4~5 d,将5 cm 黄化苗拔出,冲洗干净后备用。用直径为0.5 cm 的打孔器在 PDA 平板培养基的菌落边缘打孔,取菌丝块,并将长有菌丝的一面贴在在大豆黄化苗下胚轴部位,用湿润的吸水纸将接种部位包裹起来,并在外面包裹1层无菌锡纸,放于25 ℃ 光照培养箱中培养5 d,12 h 光照与12 h 黑暗交替,记录发病情况。切取黄化苗发病组织置于 PDA 培养基(含有50 μg/mL 利福平和50 μg/mL 氨苄青霉素)中培养,观察形成的菌落形态,并提取 DNA 进行分子生物学鉴定,完成

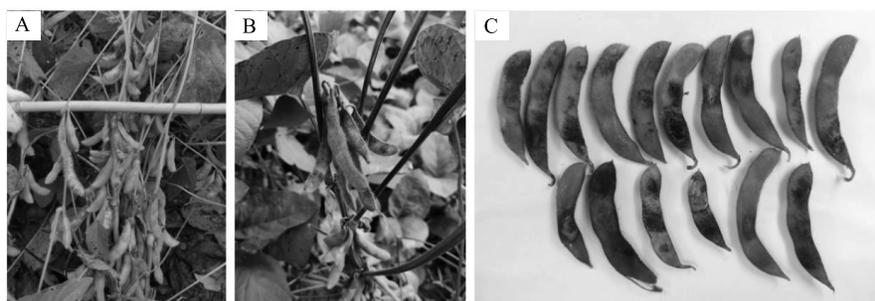
柯赫氏法则验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 感病豆荚的采集

在江苏省南京、徐州、淮安、南通、盐城5个城市的大豆种植区内采集78份大豆病荚。其中,在南京市共采集到29份大豆病荚(六合区16份、浦口区8份、玄武区5份);在徐州市铜山区共采集到15份大豆病荚;在淮安市共采集到15份大豆病荚(淮阴区3份、洪泽区12份);在南通市如东县共采集到9份大豆病荚;在盐城市共采集到10份大豆病荚(滨海县6份、盐都区4份)。

采集的感病豆荚表面均有圆形或不规则黑色斑块,有的病斑有晕圈,随着病原菌侵染程度的加深,病斑面积也逐渐扩大,直至侵染整个豆荚,使豆荚干枯、籽粒干瘪,严重时大豆颗粒无收(图1)。



A, B: 大豆荚期田间状况; C: 采集的豆荚发病症状。

图1 大豆豆荚病害症状

Fig.1 Symptoms of soybean pod diseases

### 2.2 病原菌的初步鉴定

对病原菌进行分离和纯化,在78份大豆病荚中共分离出112种病原菌,利用NCBI数据库比对112种病原菌的ITS和TUB2序列,将这112种病原菌分为5个属,分别是镰刀菌属(*Fusarium* spp.) (73种)、炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.) (15种)、拟茎点霉属(*Diaporthe* spp.) (10种)、黑孢菌属(*Nigrospora* spp.) (9种)和色二孢属(*Lasiodiplodia* spp.) (5种),均属于半知菌亚门真菌。其中镰刀菌属真菌占比最大,为65.18%;其次是炭疽菌属真菌,占13.39%,拟茎点霉属、黑孢菌属和色二孢属真菌占比均低于10.00%(图2A)。在南京、徐州、淮安、南通、盐城5个城市的大豆病荚中均分离到镰刀菌属真菌,说明该菌属分布广泛。炭

疽菌属真菌和拟茎点霉属真菌在南京、淮安、徐州、盐城的大豆病荚中被分离到,黑孢菌属真菌在南京、淮安、南通、盐城的大豆病荚中被分离到。色二孢属真菌的检出率较低,仅在南通地区的大豆病荚中被分离到(图2B)。

### 2.3 病原菌的系统发育分析

从每个菌属中选择3种病原菌进行系统发育分析,编号如表1所示。选择稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae* PO-FA28)作为外类群构建系统发育树,结果显示,系统发育树共被分为5个支系,分别对应镰刀菌属(*Fusarium* spp.)、黑孢菌属(*Nigrospora* spp.)、炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)、色二孢属(*Lasiodiplodia* spp.)和拟茎点霉属(*Diaporthe* spp.) 5个菌属,均有较高的支持率(99.0%~100.0%)(图3)。

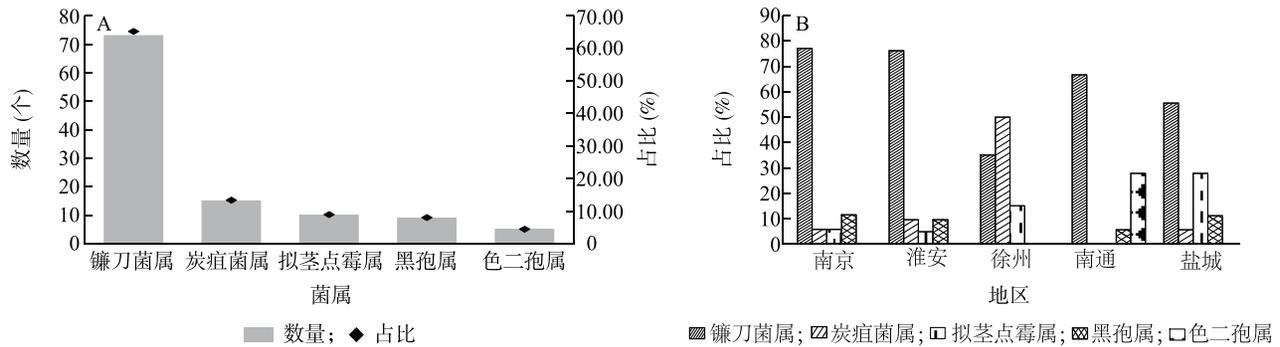


图2 病原菌的菌属(A)和来源(B)的占比

Fig.2 Proportion of pathogens from different genera (A) and different sources (B)

表1 病原菌编号

Table 1 Numbers of pathogens

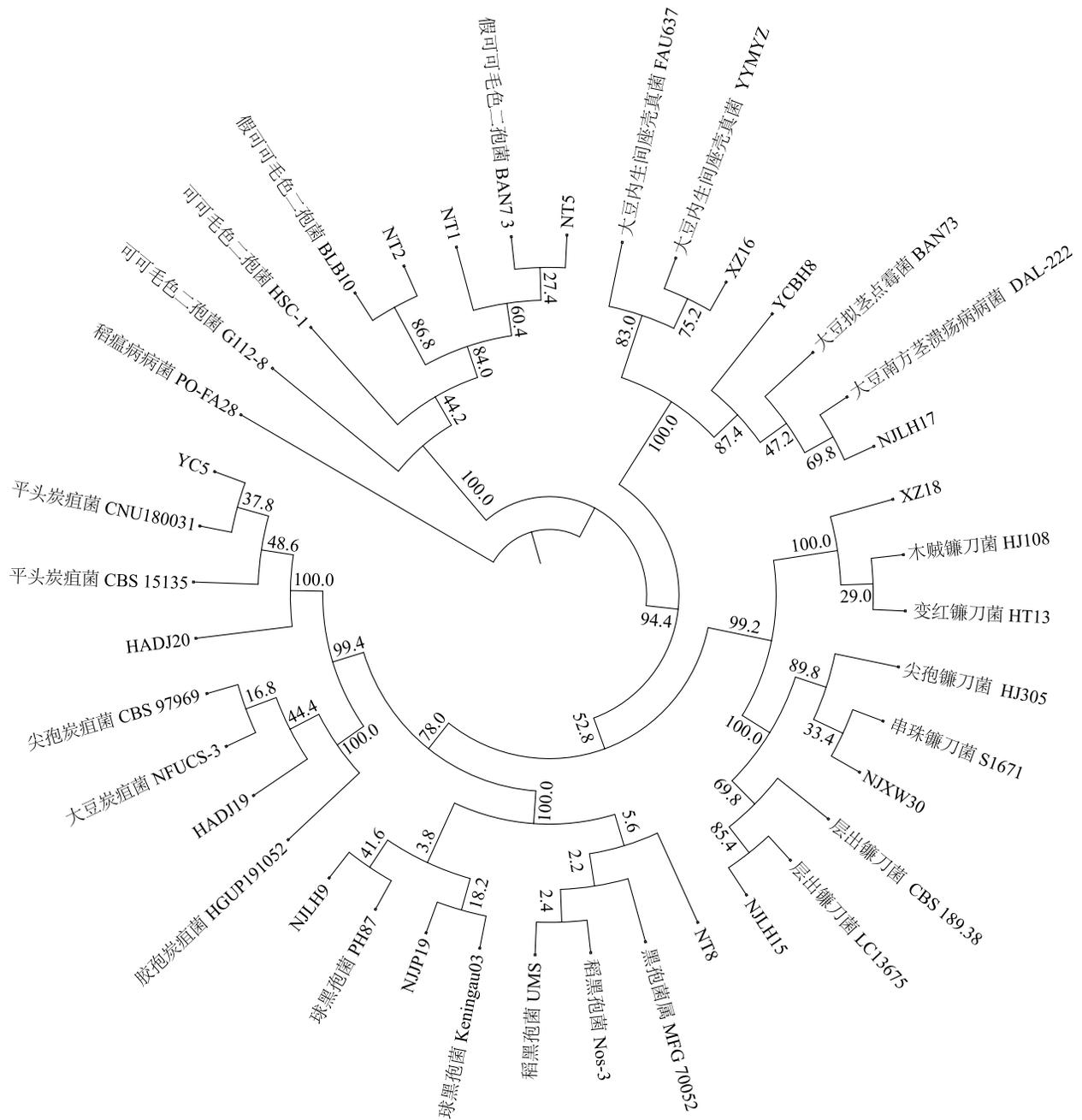
编号	属名	采集地
XZ18	镰刀菌属	徐州
XZ16	拟茎点霉属	徐州
NJXW30	镰刀菌属	南京
NJLH9	黑孢菌属	南京
NJLH15	镰刀菌属	南京
NJLH17	拟茎点霉属	南京
NJJP19	黑孢菌属	南京
HADJ19	炭疽菌属	淮安
HADJ20	炭疽菌属	淮安
YC5	炭疽菌属	盐城
YCBH8	拟茎点霉属	盐城
NT1	色二孢属	南通
NT2	色二孢属	南通
NT5	色二孢属	南通
NT8	黑孢菌属	南通

NJLH15、NJXW30、XZ18 属于镰刀菌属, NJLH15 与层出镰刀菌 (*F. proliferatum*) 聚在一起, 支持率为 85.4%; NJXW30 与串珠镰刀菌 (*F. verticillioides*) 聚在一起, 支持率为 33.4%; XZ18 单独为一支, 其临近分支是木贼镰刀菌 (*F. equiseti*) 和变红镰刀菌 (*F. incarnatum*), 支持率为 100.0%。NJJP19、NJLH9、NT8 属于黑孢菌属, NJJP19、NJLH9 均与球黑孢菌 (*N. sphaerica*) 聚在一起, 支持率分别为 18.2%、41.6%; NT8 为单独一支, 其临近分支是黑孢菌 (*Nigrospora* sp.) 和稻黑孢菌 (*N. oryzae*), 但支持率较低, 为 5.6%。HADJ20、

HADJ19、YC5 属于炭疽菌属, YC5 以 37.8% 的支持率与平头炭疽菌 (*C. truncatum*) 聚在一起, HADJ20、HADJ19 均单独为一支, HADJ20 的邻近分支是平头炭疽菌 (*C. truncatum*), 支持率为 100.0%, HADJ19 以 44.4% 的支持率与临近分支大豆炭疽菌 (*C. sojiae*) 和尖孢炭疽菌 (*C. acutatum*) 聚在一起。NT1、NT2、NT5 属于色二孢属, NT2 和 NT5 均与假可可毛色二孢菌 (*L. pseudotheobromae*) 聚在一起, 支持率分别为 86.8% 和 27.4%; NT1 单独为一支, 临近分支为假可可毛色二孢菌 (*L. pseudotheobromae*), 支持率为 60.4%。YCBH8、XZ16、NJLH17 属于拟茎点霉属, XZ16、NJLH17 分别与大豆内生间座壳真菌和 大豆南方茎溃疡病菌 (*D. phaseolorum*) 聚在一起, 支持率分别为 75.2%、69.8%, YCBH8 单独为一支, 其邻近分支是大豆拟茎点霉菌 (*D. longicolla*), 支持率为 87.4% (图 3)。

#### 2.4 病原菌的形态学特征

从每个菌属中选择 1 种病原菌进行形态学观察, 选取的病原菌分别为 NJLH15、HADJ20、YCBH8、NJJP19、NT1。NJLH15 的菌落中心为橘红色, 向外渐变为白色, 形状呈较为规则的圆形, 气生菌丝茂密, 呈绒毛状 (图 4A、图 4B); NJLH15 的小型分生孢子呈椭圆形, 无色, 大小为  $(5\sim 15)\mu\text{m}\times(2\sim 3)\mu\text{m}$ ; 大型分生孢子呈镰刀形, 略微弯曲, 具有 1~5 个隔膜, 基部有足胞, 无色, 大小为  $(15\sim 45)\mu\text{m}\times(2\sim 5)\mu\text{m}$  (图 4C); NJLH15 厚垣孢子呈球形或近球形, 大小为  $(8\sim 10)\mu\text{m}\times(5\sim 10)\mu\text{m}$  (图 4D)。NJLH15 与层出镰刀菌 (*F. proliferatum*) 在系统发育树上聚在一起, 支持率为 85.4%, 同时, NJLH15 的形态特征与 *F. proliferatum* 非常相似<sup>[14]</sup>, 因此将 NJLH15 鉴定为 *F. proliferatum* 成员。



数字表示支持率(%)。

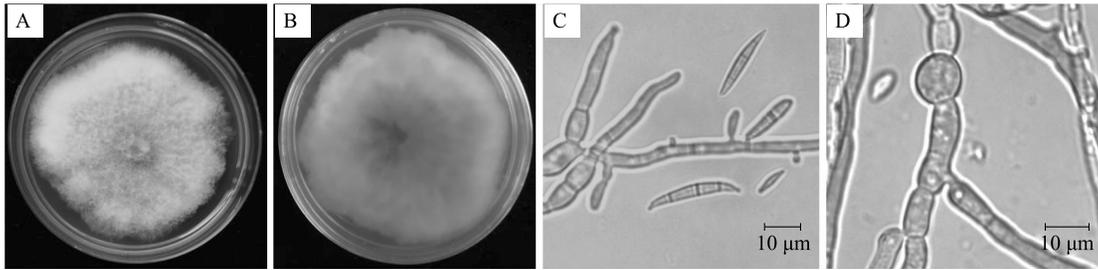
图3 病原菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of pathogens

HADJ20 的菌落生长初期为纯白色,后逐步变为深灰,菌落外观呈圆形或近圆形,菌丝紧密(图 5A、图 5B);分生孢子盘黑色,生有深棕色、具分隔的刚毛(图 5C);分生孢子为单孢子,呈镰刀状,无隔膜,无色,大小为 (15~38) μm × (2~5) μm (图 5D)。HADJ20 虽然在系统发育树上为一个单独的

分支,但其邻近分支是平头炭疽菌(*C. truncatum*),支持率为 100%,且 HADJ20 的形态特征与 *C. truncatum*<sup>[15]</sup> 非常相似,因此将 HADJ20 鉴定为 *C. truncatum* 成员。

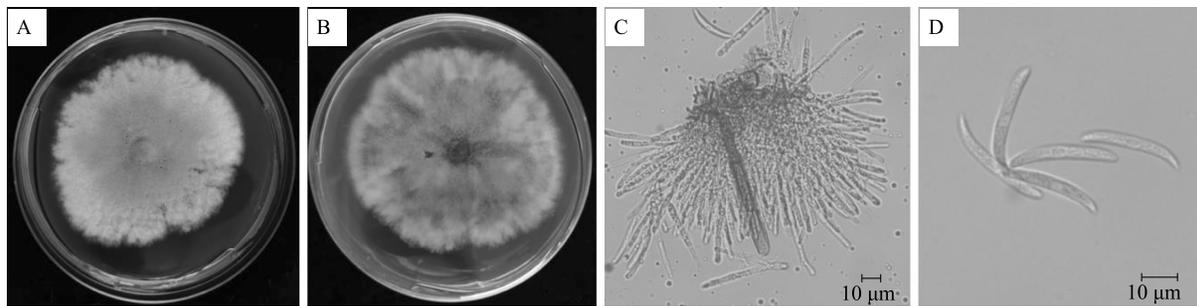
YCBH8 的菌落生长初期为白色,后逐渐变为淡黄色,培养基背面可见黑色子座,形状呈圆形或近圆



A: 培养皿正面菌落形态; B: 培养皿反面菌落形态; C: 分生孢子及产孢细胞; D: 厚垣孢子。

图4 病原菌 NJLH15 培养性状及形态学特征

Fig.4 Culture characters and morphological characteristics of pathogen NJLH15



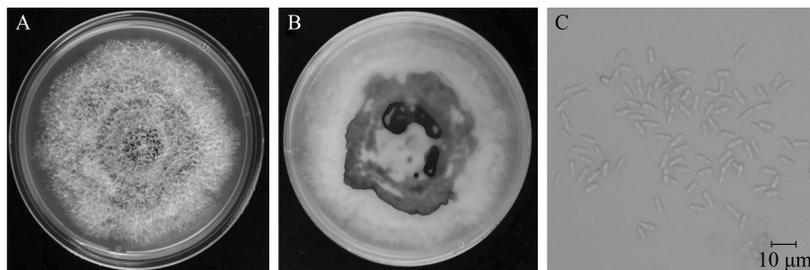
A: 培养皿正面菌落形态; B: 培养皿反面菌落形态; C: 分生孢子盘和刚毛; D: 分生孢子。

图5 病原菌 HADJ20 培养性状及形态学特征

Fig.5 Culture characters and morphological characteristics of pathogen HADJ20

形(图 6A、图 6B)。α 型分生孢子呈长椭圆形, 单孢, 无色, 含有 2 个油滴, 大小为 (5~12) μm×(2~4) μm(图 6C), 未观察到 β 型分生孢子。YCBH8 虽然在系统发育树上为一个单独为分支, 但其邻近

分支是大豆拟茎点霉菌 (*D. longicolla*), 支持率为 87.4%, 且 YCBH8 的形态特征与 *D. longicolla*<sup>[16]</sup> 大体相似, 因此将 YCBH8 鉴定为 *D. longicolla* 成员。



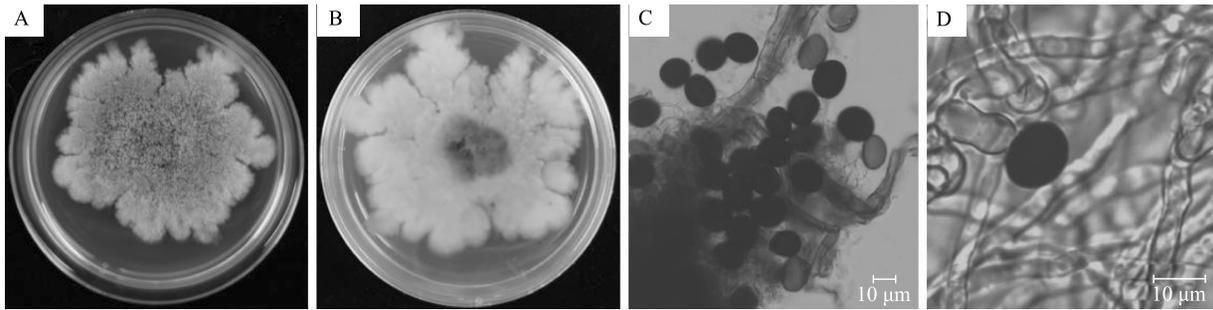
A: 培养皿正面菌落形态; B: 培养皿反面菌落形态; C: 分生孢子。

图6 病原菌 YCBH8 培养性状及形态学特征

Fig.6 Culture characters and morphological characteristics of pathogen YCBH8

NJJP19 的菌落生长初期为白色, 后逐渐变为灰色, 菌落形状不规则, 边缘呈波浪形, 随着分生孢子的产生, 菌落逐渐变为褐色或黑色(图 7A、图 7B)。分生孢子为单孢孢子, 亮黑色, 呈椭圆形或球形, 分生孢子单个顶生,

大小为 (10~18) μm×(8~12) μm(图 7C、图 7D)。NJJP19 与球黑孢菌 (*N. sphaerica*) 聚在一起, 支持率较低, 仅为 18.2%, 但 NJJP19 的形态特征与 *N. sphaerica*<sup>[17]</sup> 非常相似, 因此将 NJJP19 鉴定为 *N. sphaerica* 成员。



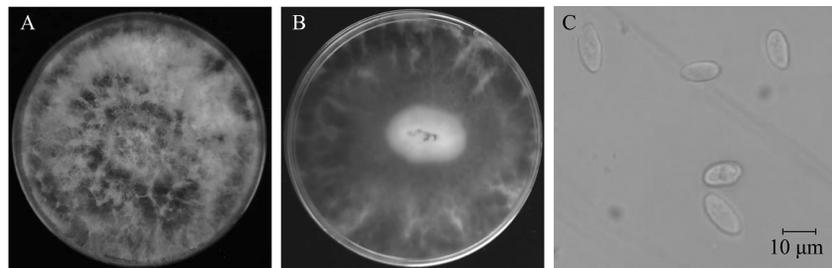
A: 培养皿正面菌落形态; B: 培养皿反面菌落形态; C: 产孢细胞; D: 分生孢子。

图7 病原菌 NJJP19 培养性状及形态学特征

Fig.7 Culture characters and morphological characteristics of pathogen NJJP19

NT1 的菌落生长初期为白色,后逐渐变为褐色,菌落边缘规整,气生菌丝茂密,菌丝白色或灰色(图 8A、图 8B)。分生孢子为单孢孢子,无色透明,近似卵形,大小为(12~23)  $\mu\text{m}$ ×(8~10)  $\mu\text{m}$ (图 8C),未见成熟分生

孢子。NT-1 为单独的一个分支,其邻近分支是假可可毛色二孢菌(*L. pseudotheobromae*),支持率为 60.4%,且 NT1 的形态特征与 *L. pseudotheobromae*<sup>[18]</sup> 相似,因此将 NT1 鉴定为 *L. pseudotheobromae* 成员。



A: 培养皿正面菌落形态; B: 培养皿反面菌落形态; C: 分生孢子。

图8 病原菌 NT1 培养性状及形态学特征

Fig.8 Culture characters and morphological characteristics of pathogen NT1

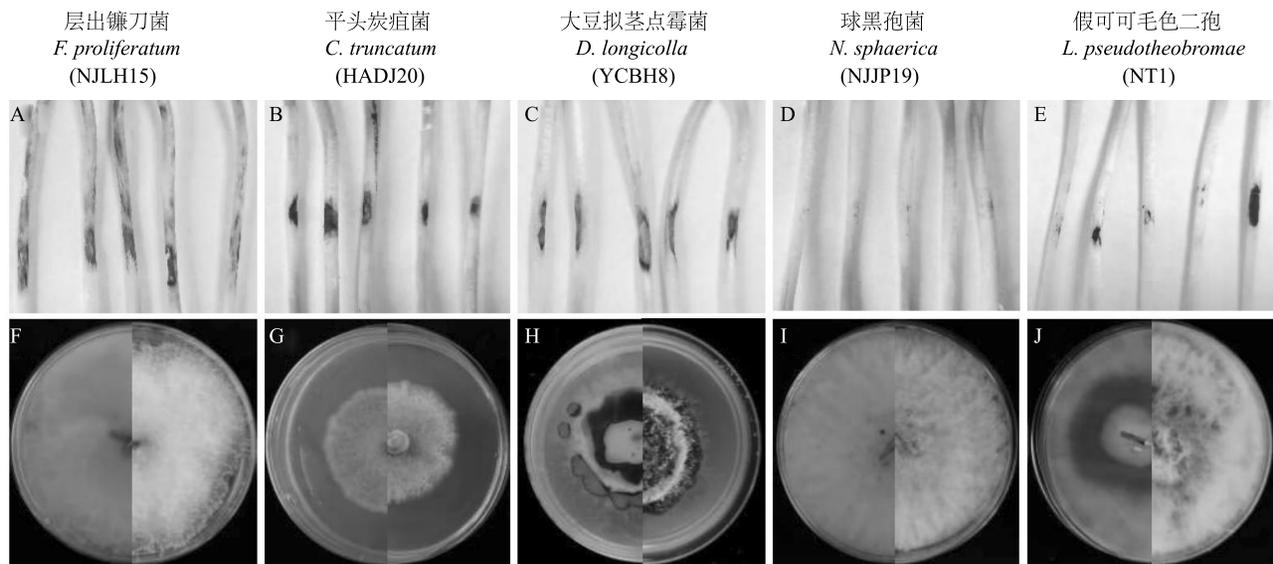
## 2.5 柯赫氏法则验证

以大豆黄化苗下胚轴为试验材料,接种 *F. proliferatum*、*C. truncatum*、*D. longicolla*、*L. pseudotheobromae*、*N. sphaerica* 5 种病原菌的菌丝,明确这 5 种病原菌的致病性。接种结果表明,5 种病原菌均能导致大豆发病,但致病能力有所不同。根据病斑大小可以看出,接种 *F. proliferatum*、*C. truncatum*、*D. longicolla* 的黄化苗下胚轴发病严重,接种 *L. pseudotheobromae*、*N. sphaerica* 的黄化苗下胚轴症状非常轻(图 9A~图 9E)。分离发病部位的病原菌,再次进行形态学观察和分子生物学鉴定,结果显示,分离得到的病原菌均与先前接种的病原菌相同(图 9F~图 9J),符合柯赫氏法则。

## 3 讨论

本研究从江苏省内 5 个大豆种植区采集发病大

豆豆荚,分离出 112 种病原菌,经鉴定发现,112 种病原菌属于半知菌亚门的 5 个属。其中镰刀菌属病原菌占比最大,为 65.18%,并且在江苏省的每个大豆种植区菌都分离到镰刀菌属病原菌。可知镰刀菌属病原菌是为害江苏省大豆豆荚的主要病原菌。前人研究发现,镰刀菌能够侵染各个生长阶段的大豆,造成幼苗枯萎、荚果和种子腐烂以及根腐病<sup>[19-21]</sup>,所以不仅要注意防控大豆根部或茎基部的镰刀菌,同时也要重视防控大豆鼓粒期或鲜荚采收期豆荚上的镰刀菌。炭疽菌属真菌和拟茎点霉属真菌均是大豆生产中常见的病原菌,在江苏省分布较为广泛。炭疽菌主要侵染大豆豆荚,大豆发病症状为,豆荚表面形成不规则的黑褐色斑点。炭疽菌严重影响鲜食豆荚的品质和产量<sup>[22]</sup>。拟茎点霉菌是大豆种腐病和茎枯病的主要致病菌<sup>[23-24]</sup>,目前国内还没有关于大豆豆荚中分离到拟茎点霉菌的报道,国外也鲜有



A~E:接种 5 种病原真菌 5 d 后大豆黄化苗下胚轴的发病情况;F~J:从 A~E 发病部位分离得到的病原菌在 PDA 上的形态特征。

图 9 柯赫氏法则验证

Fig.9 Verification results based on Koch's postulates

相关报道。目前关于黑孢菌属真菌和色二孢属真菌在大豆上被分离到的报道极少,本研究中,黑孢菌属真菌在江苏省大豆种植区分布较为广泛,在 4 个种植区均分离到该病原菌。黑孢菌属真菌是内生真菌,其代谢产物能显著抑制多种作物的真菌病害,主要存在于无症状宿主体内,可作为生防菌<sup>[25]</sup>,对于本研究分离到的黑孢菌属真菌是否也能抑制其他真菌还有待进一步探究。色二孢属真菌的占比最少,仅占 4.46%,只在 1 个采集地被分离到。色二孢属真菌是变色菌,对它的研究主要集中在木材染色等方面<sup>[26]</sup>,在大豆上鲜少被报道。由此可见,各采集地区分离到的病原菌不尽相同,可能是因为不同的生态环境或地理环境影响病原菌群体结构和组成。

国外的诸多研究结果表明,多种病原菌能造成大豆豆荚病害。早在 23 年前,美国研究者 Roy 等<sup>[27]</sup>对感染北美大豆豆荚的真菌进行了综述:在北美地区的大豆感病豆荚中分离到 88 种病原菌,分属于 65 个属。中国鲜有对大豆豆荚真菌病害的病原菌进行系统调查的研究,本研究发现,除 *L. pseudotheobromae* 外,其他本研究分离到的病原菌均在此综述中出现,*L. pseudotheobromae* 首次在大豆豆荚上被分离到,这丰富和完善了引起大豆豆荚病害的病原菌菌库。

病害的分类是进行病害精准防控的基础,病害

的防控要考虑到植物保护的综合性、整体性、预防性和前瞻性。大豆的病害防治也应如此,病原菌鉴定只是基础工作,下一步应该培育抗病品种、合理轮作、协调田间水系、建立合适的群体结构,努力协调好营养生长和生殖生长的矛盾,将物理防控、化学防控、生物防控有机结合,才能对大豆病害取得较为理想的防治效果。

#### 参考文献:

- [1] 滕卫丽,郭志文,郑立娜,等. 不同发育时期大豆豆荚性状 QTL 动态分析[J]. 东北农业学报,2020,51(10):1-9.
- [2] YAN L, NICOLLE H, LI S X, et al. Identification of QTL with large effect on seed weight in a selective population of soybean with genome-wide association and fixation index analyses[J]. BMC Genomics,2017,18(1):529-539.
- [3] 郝月振. 周口市玉米大豆带状复合种植技术推广研究[D]. 郑州:河南农业大学,2023.
- [4] 陈夕军,陈莹,石童,等. 大豆常见病害症状、病原种类及其生理分化[J]. 大豆科技,2023(2):27-37.
- [5] 冯贺涛. 大豆豆荚主要病害防治对策[J]. 农民致富之友,2019(5):70.
- [6] CHEN L S, CHU C, LIU C D, et al. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan [J]. Journal of Phytopathology,2006,15(11):654-662.
- [7] YANG H, HAUDENSHIELD J, HARTMAN G. Multiplex real-time PCR detection and differentiation of *Colletotrichum* species in-

- fecting soybean[J]. *Plant Disease*, 2015, 99(11):1559-1568.
- [8] 董志敏,厉志,刘佳,等.大豆抗灰斑病研究进展[J].作物杂志,2017(3):1-5.
- [9] SUN Q, ZHANG S L, XIE Y J, et al. Identification of new *Fusarium sulawense* strains causing soybean pod blight in China and their control using carbendazim, dipicolinic acid and kojic acid[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(17):1-17.
- [10] 王佳,任俊达,李玮瑜,等.大豆黑斑病病原菌鉴定[J].北京农学院学报,2021,36(1):88-92.
- [11] 满益龙,谭新球,司乃国,等.不同辣椒炭疽病菌对唑菌酯的敏感性差异[J].植物保护,2016,42(5):171-176.
- [12] TAYLOR J W, JACOBSON D J, KROKEN S, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 31(1):21-32.
- [13] 李艺阳,吴冕,王幸,等.大豆炭疽病病原菌鉴定及大豆种质资源抗病性评价[J/OL].植物病理学报,2024:1-14[2024-01-18].<https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001636>.
- [14] 祁鹤兴,李红芳,邹海涛,等.青贮玉米来源镰刀菌的分离鉴定及其致病性分析[J/OL].分子植物育种,2024:1-18[2024-01-18].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231016.1120.012.html>.
- [15] 石姐姐,阮宏椿,揭宇琳,等.福建省大豆炭疽病病原菌的分离与鉴定[J].植物保护学报,2022,49(2):539-546.
- [16] 耿肖兵,王春玲,黄铭慧,等.引起大豆苗期根腐病的大豆拟茎点种腐病菌鉴定[J].植物保护,2015,41(5):127-129,144.
- [17] 魏敏,孙晓东,庞强强,等.薄荷叶斑病病原菌鉴定及室内防治药剂筛选[J].中药材,2023,46(4):811-816.
- [18] 贺春萍,胡月,吴贺,等.粗叶榕茎枯病病原菌的分离与鉴定[J/OL].植物病理学报,1-6[2024-01-18].<https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000892>.
- [19] HUI Y, NELSON B. Effects of soil type, temperature and moisture on development of *Fusarium* root rot of soybean by *Fusarium solani* (FSSC 11) and *Fusarium tricinctum*[J]. *Plant Disease*, 2022, 106(11):3773-3783.
- [20] NAEEM M, LI H J, YAN L, et al. Characterization and pathogenicity of *Fusarium* species associated with soybean pods in maize/soybean strip intercropping[J]. *Pathogens*, 2019, 8(4):245-262.
- [21] ZHAO L, WEI X, ZHENG T, et al. Evaluation of pathogenic *Fusarium* spp. associated with soybean seed (*Glycine max*) in Hubei province, China[J]. *Plant Disease*, 2022, 106(12):3178-3186.
- [22] BOUFLEUR T, CIAMPI-GUILLARDI M, TIKAMI Í, et al. Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: current status and future prospects[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(4):393-409.
- [23] 耿肖兵,王春玲,黄铭慧,等.引起大豆苗期根腐病的大豆拟茎点种腐病菌鉴定[J].植物保护,2015,41(5):127-129.
- [24] 赵晓林,李凯楠,郑素娇,等.一种大豆对拟茎点茎枯病抗性鉴定技术体系的构建[J].植物病理学报,2022,52(6):959-966.
- [25] 申屠旭萍,俞晓平,夏湛恩,等.一株银杏内生真菌代谢产物抗菌活性初步研究[J].植物保护,2006,32(3):55-57.
- [26] 郑雅娴,吕文华.黄藤材主要变色菌的分离和鉴定[J].西北林学院学报,2015,30(5):219-223.
- [27] ROY K W, BAIRD R E, YABNEY T S. A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and a key for identification of selected fungi[J]. *Mycopathologia*, 2001, 150(1):15-27.

(责任编辑:成纾寒)