

大豆细菌性病害病原菌分离鉴定与致病性评价

张 慧¹, 于仁敬¹, 邹佳男¹, 辛大伟¹, 胡振帮¹, 张 勇³, 刘春燕², 陈庆山¹

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090; 3. 黑龙江省农业科学院 克山分院, 黑龙江 克山 161606)

摘 要:对在黑龙江哈尔滨同家岗农场采集的绥农 14 大豆细菌性斑点病叶片进行病原菌分离, 将分离得到的大豆细菌性斑点病病原菌进行抗生素耐性鉴定、分子鉴定并对大豆品种回接试验, 分离得到 1 个细菌菌株。经过革兰氏染色、病原菌回接试验、16S rDNA 分子鉴定方法确定分离的菌株为丁香假单胞杆菌属, 命名为 *Psgneau 2*。分离的菌株对终浓度为 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氨苄青霉素和羧苄青霉素都具有耐性, 对壮观青霉素、利福平、卡那霉素、庆大霉素、四环素和氯霉素不具有抗性。采用高压喷雾和菌落滴度的方法将分离的 *Psgneau 2* 菌株接种 10 个大豆品种, 进行致病性鉴定, 结果表明绥农 14 极易感病, 合丰 35 抗病性高于其它品种。

关键词:大豆; 细菌性病原菌; 分离; 鉴定; 致病性
中图分类号:S565. 103 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 01. 0112

Isolation, Identification and Pathogenicity Evaluation of Soybean Bacterial Disease Pathogens

ZHANG Hui¹, YU Ren-jing¹, ZOU Jia-nan¹, XIN Da-wei¹, HU Zhen-bang¹, ZHANG Yong³, LIU Chun-yan², CHEN Qing-shan¹

(1. College of Agricultural Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China ; 2. Land Reclamation Research and Breeding Center of Heilongjiang, Harbin 150090, China; 3. Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan 161606, China)

Abstract: In order to research soybean bacterial disease in Heilongjiang province, one bacterial pathogen was isolated from Suinong 14 diseased leaves which were collected from Harbin Yanjiagang farm. The pathogen has been carried out antibiotic resistance identification, molecular identification, re-inoculated identification and pathogenicity identification. By Gram staining, pathogen-back test, 16S rDNA molecular identification, the pathogen was *Pseudomonas syringae* and named *Psgneau 2*. The pathogen exhibited resistance against two antibiotics, ampicillin and carbenicillin, as three concentration 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, but susceptible to spectinomycin, rifampicin, kanamycin, gentamicin, tetracycline and chloramphenicol. Ten soybean varieties were inoculated with *Psgneau 2*, of which Suinong 14 was more susceptible than others and Hefeng 35 was the most resistant to *Psgneau 2*.

Keywords: Soybean; Bacterial pathogen; Isolation; Identification; Pathogenicity

大豆细菌性病害是大豆的一种常见病害, 主要分为 3 种: 大豆细菌性斑点, 病原菌为丁香假单胞菌大豆致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*, 简称 *Psg*)^[1-3]; 大豆细菌斑疹病, 病原菌为油菜黄单胞菌大豆致病变种 [*Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (Nakano) Dye]^[4]; 大豆细菌性野火病, 病原菌为丁香假单胞菌烟草致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*)^[5-6]。最为普遍的大豆细菌性病害是前两者。在美国由于细菌性病害造成的大豆减产可以达到 4% ~ 40%^[7-10]。近年来, 大豆细菌性斑点病在我国大豆主产区均有不同程度的发生和流行,

在田间调查中发现大豆品种对细菌性斑点病的抗病性有差异, 即使同一品种在不同地区抗病性也不同, 对大豆的产量和质量也有不同程度影响。在感病品种上轻者可减产 5% ~ 10%, 重者则可达到 30% ~ 40%, 病株大豆籽粒变色, 降低其商品价值^[11], 直接影响到大豆的出口和农民的收益。在我国主要分布于东北、黄淮流域各大豆主产区, 北方种植大豆的区域病害重于南方^[4]。

目前科研人员采用筛选抗病品种等方法, 通过不断连续回交, 对主栽感病大豆品种进行改造。在国外, 高抗的大豆种质有 PI. 68708, Flbmbeau,

收稿日期: 2015-04-14
基金项目: 国家自然科学基金 (31471516, 31271747); 黑龙江省高校长江后备支持计划 (2014CJHB004)。
第一作者简介: 张慧 (1989-), 女, 硕士, 主要从事大豆抗病机制研究。E-mail: dnnxzhanghui@163. com。
通讯作者: 陈庆山 (1973-), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆生物技术研究。E-mail: qshchen@126. com;
刘春燕 (1981-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事大豆抗病机制研究。E-mail: cyliu@126. com。

Norchief, Pl. 189968, Avery^[12-14]。耐病品种有 Williams79。在国内,孙永吉、张佳环、张淑珍等也通过大田生产试验和室内人工接种鉴定出一些抗性品种^[11,15-16]。

本研究对黑龙江省闫家岗农场采集的病叶进行了病原菌的分离、抗生素抗性鉴定、分子鉴定及致病性鉴定,并利用合适的抗感鉴定方法,鉴定大豆品种抗性,旨在研究大豆细菌性病害的致病机理,以及相关细菌性斑点病致病菌信息,筛选抗病材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 绥农 14、绥农 8 号、合丰 25、黑农 37、合丰 35、东农 42、绥农 10 号、东引小粒豆、东农 50 和科丰 1 号,以上材料来自东北农业大学农学院。

1.1.2 菌株材料 本试验分离菌株 *Psgneau 2*, 实验室保存对照菌株 *Psg race 4*。

1.2 方法

1.2.1 病叶的采集 2013 年 7~8 月,从黑龙江省北大荒集团闫家岗农场进行大豆细菌病病害调查,采用五点取样法,每点调查 50 株(5 行×10 株),采集发病明显的大豆品种绥农 14 叶片样本。将采集的叶片置于冰盒中,回到实验室后将样品保存于 4℃ 冰箱,并且尽快进行病菌的分离。

1.2.2 病原菌菌株的分离与革兰氏染色 病原菌的分离采用“平板划线分离法”,对菌株在无菌条件下分离,使用灭菌的剪刀剪下样本的病斑(约 5 mm×5 mm),使用 0.1% 升汞对叶片的表面灭菌 2 min,用 75% 酒精对其灭菌 30 s,最后用无菌水对处理的叶片冲洗 3 次,将病叶组织置于灭过菌的离心管中,加入少量无菌水,用灭菌的钻头尽量磨碎叶片,用接种环蘸取少许菌液,在 King's medium B 培养基平板上划线接种,无菌培养 1~2 d 后,再次挑取平板上的单菌落,继续将单菌落纯化,直至菌落形态单一,将该菌株命名为 *Psgneau 2*。

按照“科赫氏法则”要求安排试验。将分离得到的有代表性的菌株 *Psgneau 2* 使用 King's medium B 液体培养基培养,配置接种用菌液。在三出复叶时期,再次接种到绥农 14 叶片上,接种后保湿 24 h,在 25℃ 条件下培育,待接种植株发病后,进行病原菌再分离,并与接种菌相比较。对分离的菌株参照方仲达的治病研究方法进行革兰氏染色鉴定。

1.2.3 分离菌株的分子鉴定 在 28℃, 180 r·min⁻¹, 培养菌液 24 h, 取 1~4 mL, OD₆₀₀ = 0.8 左右的菌液。按 Bacteria Genomic DNA Extraction 提取试剂盒提取基因组 DNA。16S rDNA 序列克隆,在 50 μL 的 PCR 反应体系中加入如下成分:模板 DNA 50~100 ng, 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 4 μL, 引物 F (10 μmol·L⁻¹) 1 μL, 引物 R (10 μmol·L⁻¹) 1 μL, TaKaRa Ex Taq (5 U·μL⁻¹) 0.5 μL, 16S-free H₂O 补至 50 μL。PCR 反应条件(30 个循环), 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 72℃ 终延伸 10 min。阴性对照为 16S-free H₂O。引物序列如下: 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492R: TACGGC-TACCTTGTTACGACTT。

基因纯化后,与 pEASY 克隆载体连接,使用 M13F 和 T7 测序引物进行测序,比对。将所测序列在 GenBank 核酸序列数据库, EZTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 中的 16S rDNA 序列数据,进行同源性分析。使用 Mega 5.05 软件, Clustal W 进行序列比对、分析。

1.2.4 分离菌株对抗生素抗性鉴定 配制含有 25, 50 和 100 μg·mL⁻¹ 抗生素[氨苄青霉素(Amp), 羧苄青霉素(Cb), 壮观青霉素(Spe), 利福平(Rif), 卡那霉素(Kan), 庆大霉素(Gent), 四环素(Tet), 氯霉素(Cm)]的 King's medium B 固体培养基。悬浮病原菌液至 OD₆₀₀ 为 1.0 左右(1 OD 约为 5×10⁸ CFU·mL⁻¹), 稀释 1 000 倍至浓度约为 10⁵ CFU·mL⁻¹, 涂布于相应抗性的培养基上, 3 次重复。

1.2.5 分离菌株致病性评价 将 *Psgneau 2* 在 KB 培养基上 28℃ 培养过夜。3 000 r·min, 室温离心 10 min, 去上清, 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 重悬菌体, 并检测 OD₆₀₀ 吸光值, 计算细菌浓度。将菌液稀释至 1×10⁵ CFU·mL⁻¹, 加入 Silwet L-77 至终浓度为 0.05%, 混匀, 准备高压喷射侵染。取长势相近的对生真叶, 利用电动高压喷枪, 从叶片的背面, 避开主叶脉, 将菌液喷射入叶片中, 以看到接种处叶片区域湿润为标准, 呈水渍状。避免过度接种, 损伤叶片。

本试验采用“叶碟取样法”, 接种后每个试验样品在 0 d 用打孔器取等量 3 片叶碟, 在 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 中充分研磨, 稀释 10 倍。接菌 4 d 后用打孔器取等量 3 片叶碟, 在 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 中充分研磨, 稀释 1 000 倍, 涂布于 50 μg·L⁻¹ 羧苄青霉素 KB 固体培养基上, 培养 2 d 后, 统计平板上的菌落

数量,计算每平方厘米叶片中菌落数量的常用对数值,比较细菌的生长情况,进行4次生物学重复。以感病品种绥农14为对照,参照张佳环等^[11]大豆品种对大豆细菌性斑点病的抗性鉴定,鉴定绥农8号为细菌性斑点病的抗病品种,评价 *Psgneau* 2 对合丰25、黑农37、合丰35、东农42、绥农10号、东引小粒豆、东农50、科丰1号共8个大豆品种的致病性。

1.3 数据分析

统计计算平板上0和4 d的菌落数量,利用公式 $\lg(\text{菌落数} \times \text{稀释倍数} / 0.6)$ 。计算4次生物学重复的平均值,标准差。利用 Excel 2007 软件进行数据处理和数据分析。

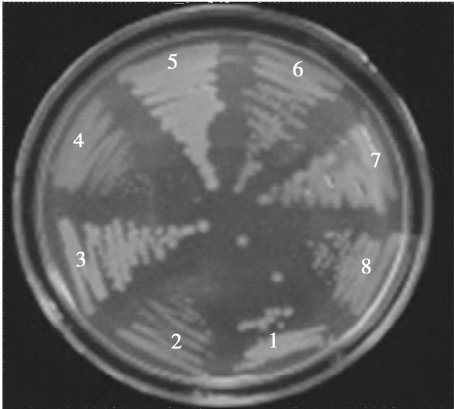
2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与分离菌株的鉴定

2.1.1 病原菌的分离与革兰氏染色 图1为分离的 *Psgneau* 2 经过无菌培养1~2 d后,培养基上菌株菌落呈中型,乳白至淡黄色,圆形,菌落表面光滑,边缘圆滑。

图2为分离的菌株回接健康的绥农14叶片,

4 d后绥农14叶片背面出现水渍状病斑,接种7 d后,叶片表现枯死的圆斑,周围有明显的褪绿扩展区,发病严重的部位,叶片组织干枯死亡,可以初步确定分离的菌株对大豆有致病性。重分离菌株经过革兰氏染色反应试验呈阴性,菌体为短杆状,鞭毛1~4根,极生,无芽孢,在 King's medium B 培养基上呈现荧光。革兰氏染色呈阴性(图3)。



2 号为分离的 *Psgneau* 2 菌株。
No. 2 was *Psgneau* 2.

图1 分离的 *Psgneau* 2 菌株

Fig. 1 Separated pathogen *Psgneau* 2 strains



A



B

A:接菌4 d后绥农14叶片; B:接菌7 d后绥农14叶片。
A: Inoculated infected Suinong14 leaves after 4 days; B: Inoculated infected Suinong 14 leaves after 7 days.

图2 回接 *Psgneau* 2 绥农14 的发病叶片
Fig. 2 Suinong14 leaf infected by *Psgneau* 2

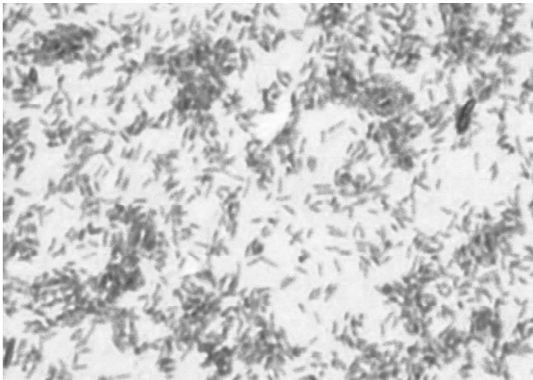
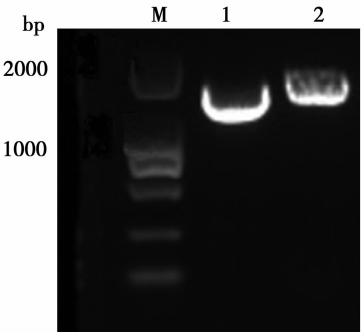


图3 *Psgneau* 2 的革兰氏染色
Fig. 3 Gram stain of *Psgneau* 2

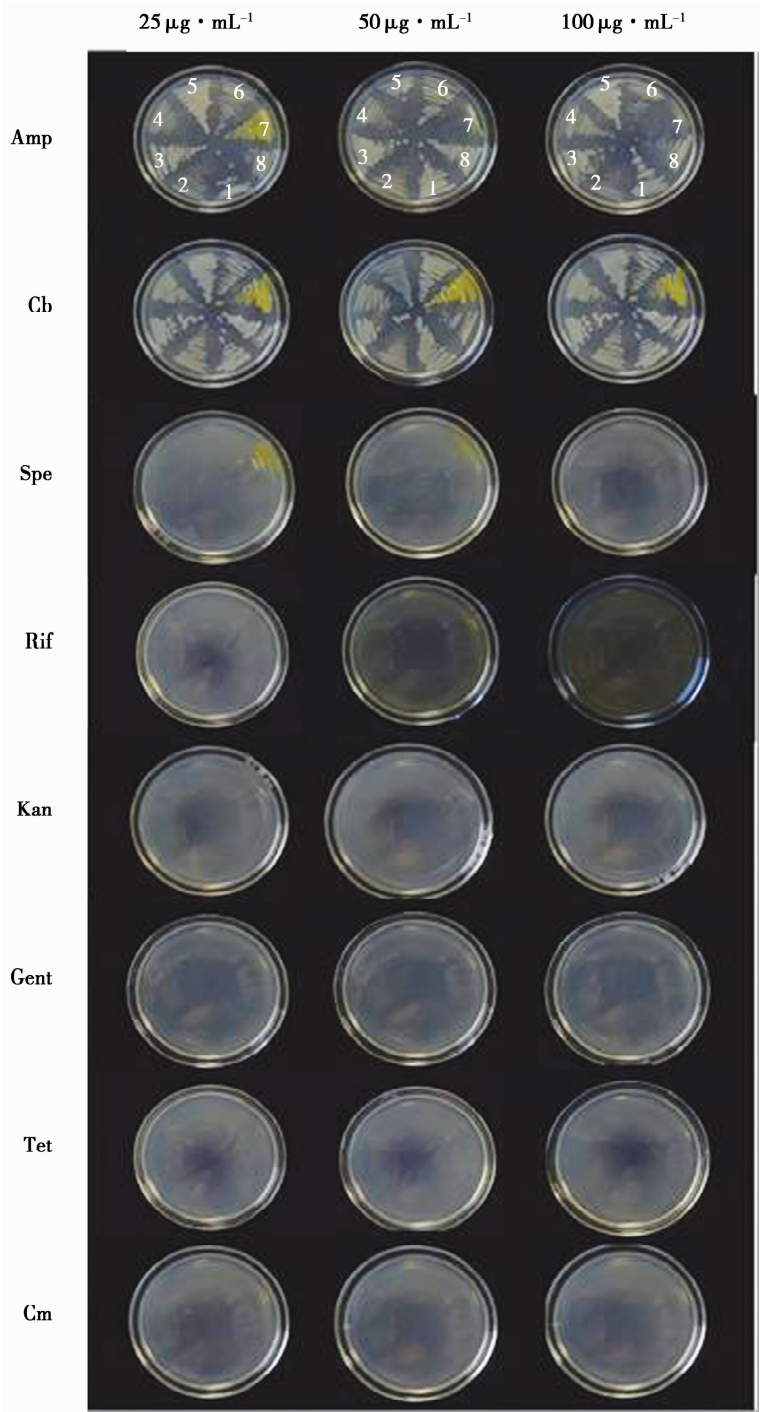


M: Marker ;1: *Psg* race 4; 2: *Psgneau* 2.
图4 16S rDNA 检测结果

Fig. 4 Amplification results of bacterial 16S rDNA

2. 1. 2 分离菌株的分子鉴定 测序序列在 EZTax-on-e 比对,分离菌种 *Psgneau 2* 与菌株 *Pseudomonas ficuserectae* JCM 2400 (*T*) 同源性最高 (登记号: AB021378), 相似度达到 99. 86% , 为薄壁菌门假单胞菌属。与对照菌株同属于丁香假单胞菌属(图 4)。

2. 1. 3 抗生素耐性鉴定 由图 5 可知,分离的 *Psgneau 2* 菌种对终浓度为 25, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氨苄青霉素和羧苄青霉素都具有耐性。因此,在随后的试验中,确定将 KB 固体培养基配置为终浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 培养菌液,抑制培养过程中杂菌的生长,并保证菌液活性良好。3 次重复试验,菌株抗性一致。



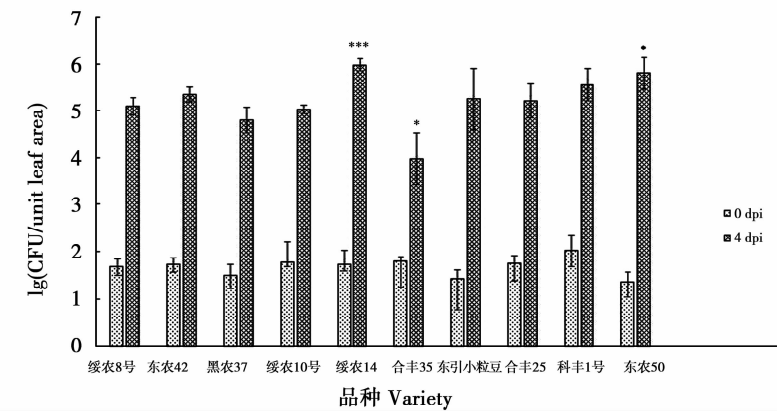
2 号为分离的 *Psgneau 2* 菌株。
No. 2 was *Psgneau 2*.

图 5 分离菌种对抗生素的耐性
Fig. 5 Antibiotic resistance of bacteria

2.2 *Psgneau* 2 菌株对不同大豆品种致病性评价

使用分离的 *Psgneau* 2 号菌种,将病原菌浓度稀释至 1×10^5 CFU·mL⁻¹,高压喷射分别接种于绥农 8 号、东农 42、黑农 37、绥农 10 号、绥农 14、合丰 35、东引小粒豆、合丰 25、科丰 1 号、东农 50 植株的第一片三出复叶。大豆品种绥农 8 号是细菌性斑点病的抗病品种,绥农 14 为感病品种,作为区分抗病品种和感病品种的对照品种。在接菌次数和接菌强度,菌液用量上保证基本一致。在 0 dpi 取样时,

每个品种的初始菌量没有显著性差异。如图 6 所示,在接种后 4 d(4 dpi),绥农 14 初步表现出发病症状,与对照绥农 8 号相比,绥农 14 在 0.001 水平上表现为感病,东农 50 在 0.05 水平上感病,合丰 35 在 0.05 水平上表现抗病,其它品种与绥农 8 号相比,没有显著性差异。这表明,一种大豆细菌性斑点病的菌种,对不同的 大豆品种致病性存在差异。在致病程度上,*Psgneau* 2 对绥农 14 和东农 50 具有致病性,而合丰 35 具有显著的抗病性。



*:0.05 水平显著;***:0.001 水平显著;dpi:接菌后的天数。
*:Significant at 0.05 level;***:Significant at 0.001 level;dpi:Day post-inoculation.

图 6 *Psgneau* 2 菌种接种 0 和 4 d 不同大豆品种致病情况
Fig. 6 Pathogenicity of the *Psgneau* 2 strain inoculates on different soybean varieties after 0 and 4 days

3 结论与讨论

本研究是在黑龙江省北大荒集团闫家岗农场采集大豆细菌性斑点病病叶并分离得到细菌病原菌,经过病原菌回接试验,该菌使得绥农 14 再次感病。同时革兰氏染色试验确定该菌种为革兰氏阴性接菌,16S rDNA 分子鉴定确定该菌为丁香假单胞菌属,最终确定该病菌为大豆细菌性病害致病菌。并将此菌保存,接种了绥农 8 号、东农 42、黑农 37、绥农 10 号、绥农 14、合丰 35、东引小粒豆、合丰 25、科丰 1 号、东农 50 共 10 个大豆品种,获得易感品种绥农 14 以及抗病品种合丰 35。

常用的细菌接种鉴定方法是针刺法和喷雾法。简单的喷雾法有时不利于接种,而针刺法可以给大豆叶片造成伤口,有利于病原菌对大豆的侵染,但难以控制侵染的初始菌量,抗感反应也是通过是否产生病斑进行鉴定,往往这种判定方法不能通过对病菌的繁殖进行计算,来准确判定品种的抗病和感病性。本研究接种方法采用高压喷雾法,使用高压泵连接喷雾枪,可以确保接种成功。接菌时,喷雾枪离叶片保持一定距离,喷出的水雾对叶片产生了“水渍”效果,保持叶片的完整无损。在接菌后,首

先定量 0 d 接菌的菌量,保证每个叶片初始接菌量保持一致。在 4 d 左右取样,稀释到合适的浓度。病原菌在抗病品种产生的菌落数量少,而感病品种,病原菌在接种叶片上会在 4 d 左右大量繁殖,培养基上病斑数较多。这样使得在室内条件下,定量鉴定多个品种,在人为可控条件下,可以进行一次性的大量试验,而且试验重复性好,操作简单。避免了田间鉴定结果受环境影响较大的因素。室内鉴定可以人为控制环境温度和适度的条件,容易控制接菌的浓度和接菌量,数量少,容易调查。可见接菌后取叶碟涂布于平板上计算菌落滴度的方法来反应品种的抗病和感病性更为合理可靠。

参考文献

[1] 丁俊杰. 大豆细菌斑点病抗性鉴定的研究概况[J]. 黑龙江农业科学,2013 (1):132-134. (Ding J J. The research status of the resistance identification to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences,2013 (1):132-134.)
[2] Chiku K,Tsunemi K,Yamamoto M,et al. Defects in D-rhamnosyl residue biosynthetic genes affect lipopolysaccharide structure, motilityand cell-surface hydrophobicity in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* Race 4[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2013,77(3):505-510. (下转第 123 页)

Zhang M C. Genetic basic of landrace soybean in Hebei [J]. Journal of Plant Genetic Resources,2009,10(4):560-565.)

[17] 李林海,邱丽娟,常汝镇,等. 中国黄淮和南方夏大豆(*Glycine max* L.)SSR 标记的遗传多样性及分化研究[J]. 作物学报 2005,31(6):777-783. (Li L H, Qiu L J, Chang R C, et al. Defereniaion and geneic diveriy of SSR molecular marker for Huanghuai and Southernsummer sowing soybean in China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2005,31(6):777-783.)

[18] 许占有,邱丽娟,常汝镇,等. 利用 SSR 标记鉴定大豆种质资源[J]. 中国农业科学,1999,32(增刊):40-48. (Xu Z Y, Qiu L J, Chang R Z, et al. Using SSR markers evaluate soybean germplasm[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1999,32(S):40-48.)

[19] 林凡云,邱丽娟,常汝镇,等. 山西省大豆地方品种与选育品种农艺性状及 SSR 标记遗传多样性比较分析[J]. 中国油料作物学报,2003,25(3):24-29. (Lin F Y, Qiu L J, Chang R Z, et al. Comparative analysis of agronomic traits of landraces and cultivars and SSR markers genetic diversity of soybean in Shanxi province[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003,25(3):24-29.)

[20] 李文滨,韩英鹏. 大豆分子标记及辅助选择育种技术的发展[J]. 大豆科学,2009,28(15):917-925. (Li W B, Han Y P. Development of soybean molecular markers and molecular marker asistant breeding [J]. Soybean Science, 2009,28(15):917-925.)

[21] 李文福,朱晓双,王晓锋,等. 大豆种质对 SMV 成株和种粒斑驳抗性的 SSR 标记辅助鉴定[J]. 植物遗传学资源报,2010,11(2):239-243 (Li W F, Zhu X S, Wang X F, et al. Identification of the SMV adult-plant and seed coat mottling resistance in soybean germplasms using SSR markers [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2010,11(2):239-243.)

[22] 智海剑,盖钧镒,何小红. 大豆对 SMV 数量(程度)抗性的综合分级方法研究[J]. 大豆科学,2005,24(2):5-11. (Zhi H J, Gai J Y, He X H. The comprehensive classification research method of soybean to SMV number(degree) of resistance [J]. Soybean Science, 2005,24(2):5-11.)

[23] 赵银月,保丽萍,耿智德,等. 云南省大豆地方种质资源遗传多样性的初步分析[J]. 西南农业学报,2006,19(4):591-593. (Zhao Y Y, Bao L P, Geng Z D, et al. Preliminary analysis of genetic diversity of local soybean germplasm in Yunnan [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2006,19(4):591-593.)

[24] 邹清梅. 我省山区玉米地方品种的类型、特点及其在育种上的利用[J]. 湖北农业科学,1998(3):35-36. (Zou Q M. Types, characteristics of mountain province local varieties of maize and its utilization inbreeding [J]. Hubei Agricultural Sciences, 1998(3):35-36.)

[25] 智海剑,盖钧镒. 大豆花叶病毒及抗性遗传的研究进展[J]. 大豆科学,2006,25(2):174-180. (Zhi H J, Gai J Y. Advances in the studies on soybean mosaic virus [J]. Soybean Science, 2006,25(2):174-180.)

(上接第 116 页)

[3] McCann H C, Rikkerink E H A, Bertels F, et al. Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease [J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(7):e1003503.

[4] 王芳. 大豆细菌性病害的识别与综合防治[J]. 大豆通报, 2007(5):9. (Wang F. The identification and integrated prevention of bacterial diseases in soybean [J]. Soybean Bulletin, 2007(5):9.)

[5] Lee S, Yang D S, Uppalapati S R, et al. Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in *Nicotiana benthamiana* [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1):65.

[6] Gupta K J, Brotman Y, Segu S, et al. The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(2):553-568.

[7] Wrather J A, Koenning S R. Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007 [J]. Plant Health Progress, 2009. doi:10.1094/PHP-2009-0401-01-RS.

[8] Park E W. Effects of bacterial blight on soybean yield [J]. Plant Disease, 1986, 70.

[9] Cross J E, Kennedy B W, Lambert J W, et al. Pathogenic races of the bacterial blight pathogen of soybeans, *Pseudomonas glycinea* [J]. Plant Disease Reporter, 1966, 50(8):557-560.

[10] Prom L K, Venette J R. Races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* on commercial soybean in eastern North Dakota [J]. Plant Disease, 1997, 81(5):541-544.

[11] 张佳环,高洁,许庆国,等. 大豆品种对大豆细菌性斑点病的抗性鉴定[J]. 大豆科学,2000,19(2):180-183. (Zhang J H, Gao J, Xu Q G, et al. Identification of the resistance of soybean varieties to bacterial blight disease of soybean [J]. Soybean Science, 2000,19(2):180-183.)

[12] Mukherjee D, Lambert J W, Cooper R L, et al. Inheritance of resistance to bacterial blight (*Pseudomonas glycinea* Coerper) in soybeans (*Glycine max* L.) [J]. Crop Science, 1966, 6(4):324-326.

[13] Wrather J A, Kendig S R, Anand S C, et al. Effects of tillage, cultivar, and planting date on percentage of soybean leaves with symptoms of sudden death syndrome [J]. Plant Disease, 1995, 79(6):560-562.

[14] Staskawicz B, Dahlbeck D, Keen N, et al. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* [J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12):5789-5794.

[15] 张淑珍,徐鹏飞,吴俊江,等. 黑龙江省大豆品种对细菌性斑点病的田间抗病性调查及室内接种鉴定分析[J]. 东北农业大学学报,2006,37(5):588-591. (Zhang S Z, Xu P F, Wu J J, et al. Study on the identification of the resistance of soybean varieties (lines) to *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* in field and inoculation indoors [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2006,37(5):588-591.)

[16] 孙永吉,刘宗麟,刘玉芝,等. 大豆品种资源抗细菌斑点病鉴定与评价[J]. 大豆科学,1989,8(2):185-189. (Sun Y J, Liu Z L, Liu Y Z, et al. Evaluation and identification of soybean cultivars and lines for resistance to bacterial blight [J]. Soybean Science, 1989,8(2):185-189.)