



罗加凤

天津海关动植物与食品检测中心研究员，从事进出境植物病害检疫工作 37 年。从进出境植物及其产品中截获检疫性及危险性有害生物 80 余种。主持或参加 30 多项国家级和省部级科研项目，获得国家和省部级奖励 12 项，发表真菌新种 2 种，发表学术论文 80 余篇，出版著作 1 部，获得发明专利 7 项，制定国家标准和行业标准 20 余项。

进境美国大豆中值得关注的真菌 *Diaporthe novem*

张莹¹，胡佳续¹，滕少娜²，廖芳¹，罗加凤^{1*}

1 天津海关动植物与食品检测中心，天津 300461

2 重庆海关技术中心，重庆 400020

摘要:采用常规平板分离法，从一批进境的美国大豆样品中获得 1 株可疑的间座壳属菌株 MDD57。经形态学观察发现，该菌株在 PDA 培养基上产生分生孢子器，且同时产生大量 α 型和 β 型分生孢子，未见有性阶段。经 ITS 和 *tefla* 基因扩增、核酸序列比对分析，发现该菌株同 GenBank 中 2 株 *Diaporthe novem* 菌株的基因序列同源性达 100%，且聚类于同一发育分支。经柯赫氏法则验证，该菌株可侵染大豆茎部和叶片，引起典型的间座壳属病害症状。根据以上结果，确定进境美国大豆中携带有 *D. novem*，这是天津口岸首次从美国大豆中截获该危险性病菌。该病菌同大豆北方茎溃疡病菌、大豆南方茎溃疡病菌、大豆拟茎点种腐病菌同为近似种，引起大豆茎秆溃疡及种子腐烂，危害严重。

关键词: *Diaporthe novem*; 形态特征; 序列分析; 致病性

[引用本文] 张莹，胡佳续，滕少娜，廖芳，罗加凤，2022. 进境美国大豆中值得关注的真菌 *Diaporthe novem*. 菌物学报，41(3): 412-419

Zhang Y, Hu JX, Teng SN, Liao F, Luo JF, 2022. A noteworthy fungus *Diaporthe novem* on soybean imported from America. Mycosystema, 41(3): 412-419

基金项目：海关总署科研项目(2020HK171)

Supported by the Scientific Research Project of General Administration of Customs (2020HK171).

*Corresponding author. E-mail: ljf1965@126.com

ORCID: ZHANG Ying (0000-0001-9482-8586)

Received: 2021-06-03, accepted: 2021-10-18

A noteworthy fungus *Diaporthe novem* on soybean imported from America

ZHANG Ying¹, HU Jiaxu¹, TENG Shaona², LIAO Fang¹, LUO Jiafeng^{1*}

¹ Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center of Tianjin Customs, Tianjin 300461, China

² Technology Center of Chongqing Customs, Chongqing 400020, China

Abstract: A fungal strain MDD57 was isolated from soybean seeds imported from America by conventional isolation and culture method. Morphological observation showed that the strain produced pycnidia and a lot of α -conidia and β -conidia on PDA medium, but there was no teleomorph stage. ITS and *tefla* gene amplification and DNA sequence alignment indicated that the sequences of the strain were the most similar to the two sequences of *Diaporthe novem* deposited in GenBank with 100% identity, and the strain was clustered with the strain of *D. novem*. Koch's rule verification proved that the strain infected soybean stems and leaves, forming typical *Diaporthe* symptoms. The isolate was identified as *D. novem*. This is the first interception report of *D. novem* from American soybean at Tianjin port. The pathogen is similar to *D. caulivora*, *D. aspalathi* and *D. longicolla*, causing stem canker and seed rot of soybean and bring about serious damage.

Keywords: *Diaporthe novem*; morphological characteristics; sequence analysis; pathogenicity

Diaporthe novem 属于囊菌门 Ascomycota, 粪壳菌纲 Sordariomycetes, 间座壳目 Diaporthales, 间座壳科 Diaporthaceae, 间座壳属 *Diaporthe*, 其无性阶段为 *Phomopsis* sp.9 (van Rensburg *et al.* 2006)。它与严重危害大豆的大豆北方茎溃疡病菌 *D. caulivora*、大豆南方茎溃疡病菌 *D. aspalathi* 和大豆拟茎点种腐病菌 *D. longicolla* 互为近似种, 其中大豆北方茎溃疡病菌和大豆南方茎溃疡病菌被列入我国进境植物检疫性有害生物名录。

D. novem 最早由 Santos *et al.* (2011) 正式命名, 现有资料显示该病菌在智利(Díaz *et al.* 2014)、克罗地亚(Santos *et al.* 2011)、意大利(Rekab *et al.* 2004; Dissanayake *et al.* 2017; Guarnaccia & Crous 2017)、葡萄牙(Santos *et al.* 2010)、南非(van Niekerk *et al.* 2005; van Rensburg *et al.* 2006)和澳大利亚(Thompson *et al.* 2018)等国家有分布。危害大豆(Santos *et al.* 2011; Petrović *et al.* 2018)、向日葵(Rekab *et al.* 2004; Thompson

et al. 2018)、猕猴桃(Díaz *et al.* 2014; Díaz *et al.* 2017)、葡萄(van Niekerk *et al.* 2005)、金橘和青柠(Guarnaccia & Crous 2017)等重要经济作物, 引起种子和果实腐烂, 造成严重经济损失。该菌也在绣球花(Santos *et al.* 2010)、南非红茶(van Rensburg *et al.* 2006)、茜草科拉拉藤属(Dissanayake *et al.* 2017)上有分离报道, 我国尚未见报道。

2019 年 8 月, 天津海关动植物与食品检测中心植物检疫实验室从进境美国大豆中分离培养获得了 1 株疑似间座壳属菌株 MDD57, 对其开展了形态研究, 并进行了测序和致病性测定, 确定该病菌为 *D. novem*, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品为 2019 年 8 月到岸的美国进境大豆种子。致病性测定所用植株为栽培 3 周的健康黄大豆幼苗。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离培养

挑取皱缩、带有病斑的病豆，用 1%次氯酸钠表面消毒 5 min，灭菌水冲洗 3 次，置 25 °C 下保湿培养 24 h，-20 °C 冰冻 24 h，置 PDA 培养基上，22 °C 12 h 黑暗/光照交替培养。5 d 后观察培养结果，对可疑菌落用 PDA 纯化。对纯化菌落镜检，记录菌落特征，测定分生孢子形态及大小。

1.2.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

经纯化的可疑菌落，培养 7 d 左右，取适量菌丝块，液氮充分研磨后，用植物基因提取试剂盒(德国 Qiagen 公司 Dneasy plant mini kit)提取 DNA。PCR 反应采用真菌通用引物 ITS4 和 ITS5 进行 ITS 片段扩增(White *et al.* 1990)，采用引物 EF1-728F 和 EF1-986R 进行 *tef1α* 片段扩增(Carbone & Kohn 1999)，2 对引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。具体引物序列及反应条件见表 1。PCR 反应体系总体积 25 μL，包含：EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (2× Premix) 12.5 μL；ddH₂O 9.0 μL；引物各 1.0 μL；DNA 模板 1.5 μL (30 ng/μL)。PCR 相关试剂由 TaKaRa 公司生产。扩增产物经 2.0%琼脂糖凝胶在 1×TAE 缓冲液中电泳，确认扩增成功后，产物送生工生物工程(上海)股份有限公司北京测序部测序。

1.2.3 序列比对和系统发育分析

利用 DNAMAN 8.0 分析软件对测得的序列进行装配；序列同源性比较分析采用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tools)工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)；序列多重比对采用

Clustalw 程序(Thompson *et al.* 1994)，如果序列长度不同，则只保留共有区段；使用 MEGA 5.0 程序(Tamura *et al.* 2011)进行比对，以 *Diaporthe corylina* CBS121124 为外群，采用邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建系统进化发育树(Saitou & Nei 1987)，进行 1 000 次重抽样计算系统树中节点的置信度。

1.2.4 致病性测定

将分离纯化后的病原菌转至 PDA 培养基，于 22 °C 12 h 黑暗/光照交替培养 10 d。挑取菌落中适量的分生孢子液，用无菌水制成分生孢子悬浮液，孢子适宜浓度约为 1×10⁷ 个/mL。

选用栽培 3 周的健康黄大豆幼苗，用 70%酒精对幼苗叶片及茎基部进行擦拭消毒。叶片采用针刺法接种分生孢子悬浮液，茎基部采用创伤法接种菌丝。用湿润的灭菌脱脂棉覆盖伤口，保湿 1 d，置于 20–22 °C 下生长观察。同时设置无菌水空白对照。出现症状后，对发病叶片及茎基部的病健交界组织进行病原菌再分离。

2 结果与分析

2.1 病菌的培养性状和形态学特征

菌株 MDD57 在 PDA 培养基上，菌落培养初期白色，菌丝絮状、致密，边缘不整齐。菌落生长迅速，培养 1 周左右即可长满培养皿，此时菌落中间呈浅棕色或橄榄色，随着培养时间的增加，颜色逐渐加深并扩散至菌落部分区域，呈深橄榄色或灰黑色(图 1A)。培养 2 周左右，菌落表

表 1 引物序列及反应条件

Table 1 Primer sequences and PCR conditions

序号 No.	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequences (5'→3')	反应条件 PCR conditions
1	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	94 °C 3 min; (94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s) 35 cycles; 72 °C 5 min
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
2	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	94 °C 5 min; (94 °C 45 s, 52 °C 30 s, 72 °C 90 s) 40 cycles; 72 °C 6 min
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC	

面可见零星分生孢子器，随着分生孢子器的成熟，有时可见乳白色分生孢子液溢出(图 1B)。分生孢子单胞、无色、透明。 α 型孢子纺锤形，两端稍钝，无隔膜，通常含 2 个油球，大小为 6.0–10.0 $\times$ 2.0–3.0 μm ，平均 7.0 $\times$ 2.3 μm 。 β 型孢子为长针状，一端常钩状弯曲，大小为 25.0–36.0 $\times$ 1.2–2.0 μm ，平均 29.6 $\times$ 1.4 μm (图 1C)。

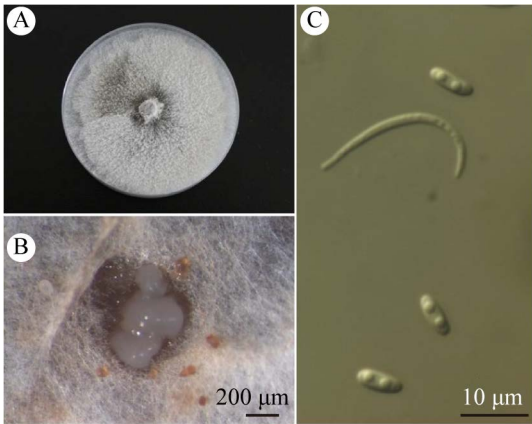


图 1 MDD57 在 PDA 上的菌落及其形态特征
A: PDA 培养 7 d 后的菌落; B: 分生孢子液; C: α 型分生孢子和 β 型分生孢子

Fig. 1 Colony and morphological characteristics of strain MDD57 on PDA. A: Colony on PDA (7 d); B: Conidial drop; C: α -conidia and β -conidia.

2.2 ITS 和 *tefla* 序列比对结果

将 MDD57 的 ITS 基因序列与 NCBI 网站 GenBank 中相关序列进行 BLAST 比对。结果显示，其与 *D. novem* (登录号: MH299960)和 *D. helianthi* (登录号: AJ312366)的相似度均为 99%，通过 ITS 基因能确定 MDD57 为 *Diaporthe/Phomopsis* 属真菌。

菌株 MDD57 的 *tefla* 基因序列 BLAST 结果显示，其与 *D. novem* (登录号: MH025961、MH025962)相似度均为 100%。

2.3 系统发育分析

基于 *tefla* 基因序列构建的系统发育分析结果见图 2，所列几个种均可形成独立分支，MDD57 与 *D. novem* 聚为一支。

2.4 致病性测定结果

MDD57 接种大豆 5 d 左右开始发病。叶片接种部位出现浅褐色病斑，造成叶片皱缩、病斑周围变黄；大豆幼苗茎基部接种部位变黑，出现长条状、棕褐色病斑(图 3)。接种 15 d 后，整株枯萎，全部幼苗死亡。根据柯赫氏法则，从茎基部发病部位再次分离病菌，获得与 MDD57 形态和 *tefla* 基因序列一致的菌株。

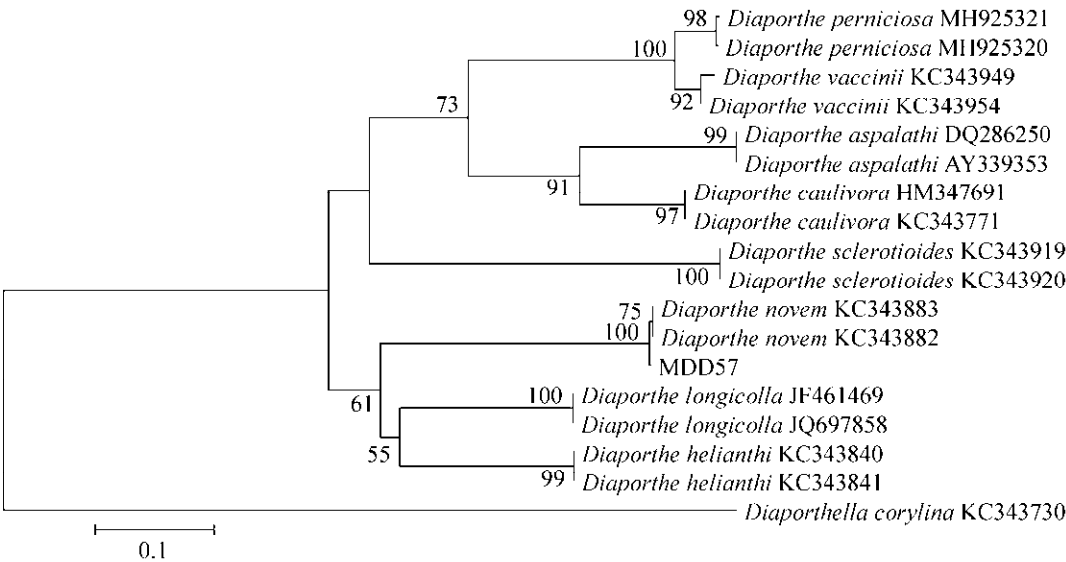


图 2 基于间座壳属真菌 MDD57 及相关种类的 *tefla* 序列采用邻接法构建的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree generated from *tefla* sequences of *Diaporthe novem* strain MDD57 and related species based on neighbor-joining method (NJ).

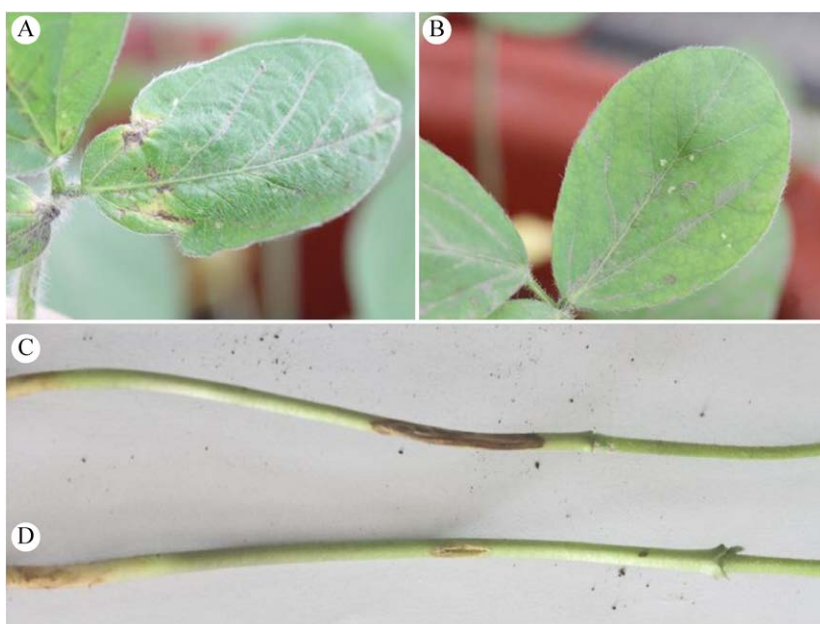


图3 菌株 MDD57 接种大豆幼苗 7 d 后的症状 A, B: 接种叶片皱缩病斑及对照; C, D: 接种茎基部棕褐色长条形病斑及对照

Fig. 3 Artificial inoculation symptoms caused by *Diaporthe novem* strain MDD57 on soybean seedling in 7 days after inoculation. A, B: Crinkle spot of inoculated leaves and uninfected leaves of experimental control; C, D: Brown streak of inoculated stem-base and the uninfected control.

3 结论与讨论

通过对美国大豆种子中可疑菌株进行分离纯化、形态学观察、分子检测及致病性测定,最终确定该菌株为 *Diaporthe novem*。间座壳属真菌以植物病原菌和内生菌的形式存在于健康的叶片、茎、种子和根中,或以腐生菌的形式存在于各种寄主的腐烂组织中(Murali *et al.* 2006; Garcia-Reyne *et al.* 2011; Udayanga *et al.* 2011)。由于分布广泛、寄主多样、病原菌危害严重,该属中的一些种类是重要的检疫性有害生物。在《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中有 5 种检疫性真菌病害与该属相关,分别是大豆北方茎溃疡病菌 *D. caulivora*、大豆南方茎溃疡病菌 *D. aspalathi*、向日葵茎溃疡病菌 *D. helianthi*、苹果果腐病菌 *D. perniciosus* 和蓝莓果腐病菌 *D. vaccinii*。因此,对间座壳属不同种类真菌进行准确地检疫鉴定非常重要。

间座壳属引起大豆种子腐烂、茎枯病和茎溃疡,导致大豆产量和质量显著下降,造成严重经济损失(Backman *et al.* 1985; Fernández *et al.* 1999)。*D. novem* 与其近似种大豆北方茎溃疡病菌 *D. caulivora*、大豆南方茎溃疡病菌 *D. aspalathi* 和大豆拟茎点种腐病菌 *D. longicolla* 的形态特征较为相似,目前,针对几种大豆上的间座壳属真菌近似种,形态上主要是依据菌落和分生孢子形态来区分(表 2)。

间座壳属真菌形态特征有限,所以利用形态特征和培养性状难以对该属进行准确鉴定(段维军等 2016)。本研究将来自美国的大豆样品中分离得到的间座壳属菌株 MDD57 确定为 *D. novem*,分子上主要依据 *tefla* 基因序列分析。在试验中,ITS 基因并没有将 *D. novem* 与其近似种准确区分开来。对于待测菌株,我们可以先考虑用 ITS 基因确定到属,再寻找合适基因进一步鉴定到种。

表 2 已发表的大豆上 4 种间座壳属近似种的形态比较

Table 2 Morphological comparison of four similar species of *Diaporthe* on soybean

阶段	<i>Diaporthe novem</i> ^{a,b} (syn. <i>D. pseudolongicolla</i>)	<i>Diaporthe longicolla</i> ^{b,c,d}	<i>Diaporthe caulivora</i> ^{c,d} (syn. <i>D. phaseolorum</i> var. <i>caulivora</i>)	<i>Diaporthe aspalathit</i> ^{c,d} (syn. <i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>)
现用名	<i>Diaporthe novem</i>	<i>Phomopsis longicolla</i>	<i>Phomopsis phaseoli</i>	<i>Phomopsis phaseoli</i>
Current name				
菌落形态 (PDA)	白色致密的气生菌丝	白色，呈密集的丛卷毛状，有时部分区域显黄绿色	丛毛状的白色菌落，后期变为黄色至紫色	白色，丛生长毛，老熟后变成深褐色
Cultural	Fresh mycelia white, compact, aerial	White, compact aerial mycelium with typical yellowish-green ring around the centre of colony	White colonies tufted and turn yellow to tan in later stage	White, tufted long hair, dark brown after maturity
characteristics on PDA				
无性型形态	α 型分生孢子单胞，卵圆形或椭圆形，两端稍钝，透明，通常含 2 个油球，大小为 6.0–10.0×1.9–3.1 μm ； β 型分生孢子透明，单胞，丝状，一端弯曲，大小为 19.5–37.7×0.9–2.0 μm	α 型分生孢子透明，单胞，梭形，含 2 个油球，大小 4.9–9.0×1.4–3.5 μm ； β 型分生孢子极少见	很少见	很少见
Anamorph characteristics	Alpha conidia unicellular, oval or ellipsoidal, with obtuse ends, hyaline, 2-guttules, 6.0–10.0×1.9–3.1 μm ; beta conidia hyaline, unicellular, filiform, curved at one end, 19.5–37.7×0.9–2.0 μm	Alpha conidia hyaline, unicellular, ellipsoidal, 2-guttules, 4.9–9.0×1.4–3.5 μm ; beta conidia rarely seen	Rarely seen in culture	Rarely seen in culture
生殖方式	异宗配合	无性生殖	同宗配合	同宗配合
Sexuality	Heterothallic	Asexual	Homothallic	Homothallic
有性型形态	子囊 38.5–43.0×6.5–10.5 μm ，棍棒状，顶端可见折光环；子囊孢子 8.6–13.1×2.1–3.6 μm ，透明，光滑，圆柱形，中间有隔膜，有时分隔处有缢缩，常含 4 个油球，有时无油球	未发现	子囊 29.8–40.0×4.0–7.0 μm ，长棍棒状，顶部有清晰的折光环；子囊孢子 8.0–12.0×2.4–4.0 μm ，透明，纺锤形，双胞，常含油球	子囊 34.8–41.1×4.8–8.7 μm ，长棍棒状，顶部有清晰的折光环；子囊孢子 7.4–13.2×2.3–4.2 μm ，无色，纺锤形，双胞，含 4 个油球
Teleomorph characteristics	Asci 38.5–43.0×6.5–10.5 μm , clavate, with visible refractive apical ring; ascospores 8.6–13.1×2.1–3.6 μm , hyaline, smooth, cylindrical, medianly septate, sometimes constricted at the septum, normally 4-guttules, sometimes eguttulate	Not found	Asci 29.8–40.0×4.0–7.0 μm , clavate, with conspicuous refractive apical ring; ascospores 8.0–12.0×2.4–4.0 μm , hyaline, fusoid, two-celled, normally guttules	Asci 34.8–41.1×4.8–8.7 μm , clavate, with conspicuous refractive apical ring; ascospores 7.4–13.2×2.3–4.2 μm , colourless, fusoid, two-celled, 4-guttules

Note: ^a Santos *et al.* 2011; ^b Petrović *et al.* 2018; ^c Yan *et al.* 2017; ^d Chen *et al.* 2007.

关于 *D. novem* 的命名, van Rensburg *et al.* (2006) 从顶梢枯死的南非红茶树中分离到 1 株 *Phomopsis*, 由于当时没有观察到它的生殖方式, 无法将其命名, 延续 van Niekerk *et al.* (2005) 的编号系统, 将其标记为 *Phomopsis* sp.9。Novem 是拉丁文数字 9, Santos *et al.* (2011) 从克罗地亚大豆中分离到该病菌, 并提出了 *Diaporthe novem* J.M. Santos, Vrandečić & A.J.L. Phillips 的正式命名。Petrović *et al.* (2018) 从塞尔维亚大豆种子中检出该病菌, 由于形态特征与危害症状与 *D. longicolla* 相近, 将该病害称为 *D. pseudolongicolla*, 并作为一种塞尔维亚大豆上的新发病害报道。

大豆作为重要的粮油兼用作物、饲料原料, 在国内有着巨大的需求, 是我国最重要的进口农产品之一, 2019 年我国大豆进口总量达到 8 851 万 t (胡佳续等 2021)。我国口岸多次检出 *D. novem*, 由于该病菌不在检疫性名录内, 其危害往往容易被忽视。该病菌引起大豆茎秆溃疡和种子腐烂 (Petrović *et al.* 2018), 导致大豆产量和品质下降。由受害种子生产的豆油及大豆榨油后所得饲料、肥料及豆饼等其他产品质量低下, 不适合作为饲料使用。此外, 该病菌寄主广泛, 一旦随进境大豆传入我国, 将会对我国大豆及其他农作物生产、农业生态造成难以估量的损失。因此, 口岸在对进境大豆检疫鉴定时, 有必要加强对该菌的关注。

致谢: 感谢沈阳农业大学植物保护学院周如军教授在拉丁名方面的指导。

[REFERENCES]

- Backman PA, Weaver DB, Morgan-Jones G, 1985. Soybean stem canker: an emerging disease problem. *Plant Disease*, 69: 641-647
- Carbone I, Kohn LM, 1999. A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556
- Chen XJ, Li YF, Zong K, Yao J, Duan WJ, Sun JJ, Zheng HS, 2017. SN/T 4865-2017 Detection and identification of *Phomopsis longicolla* Hobbs. Standards Press of China, Beijing. 1-9 (in Chinese)
- Díaz GA, Latorre BA, Jara S, Ferrada E, Naranjo P, Rodríguez J, Zoffoli JP, 2014. First report of *Diaporthe novem* causing postharvest rot of kiwifruit during controlled atmosphere storage in Chile. *Plant Disease*, 98(9): 1274
- Díaz GA, Latorre BA, Lolas M, Ferrada E, Naranjo P, Zoffoli JP, 2017. Identification and characterization of *Diaporthe ambigua*, *D. australafricana*, *D. novem*, and *D. rudis* causing a postharvest fruit rot in kiwifruit. *Plant Disease*, 101(8): 1402-1410
- Dissanayake AJ, Camporesi E, Hyde KD, Zhang W, Yan JY, Li XH, 2017. Molecular phylogenetic analysis reveals seven new *Diaporthe* species from Italy. *Mycosphere*, 8(5): 853-877
- Duan WJ, Duan LJ, Chen XF, Cai L, 2016. Identification of the quarantine fungus *Diaporthe helianthi* from the corn seeds imported from Ukraine. *Mycosystema*, 35(12): 1503-1513 (in Chinese)
- Fernández FA, Phillips DV, Russin JS, Rupe JC, 1999. Stem canker. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC (eds.) *Compendium of soybean diseases*. 4th ed. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, Minnesota, USA. 33-35
- García-Reyne A, López-Medrano F, Morales JM, Esteban CG, Martín I, Eraña I, Meije Y, Lalueza A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez-Tudela JL, Aguado JM, 2011. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transplant Infectious Disease*, 13: 204-207
- Guarnaccia V, Crous PW, 2017. Emerging citrus diseases in Europe caused by species of *Diaporthe*. *IMA Fungus*, 8: 317-334
- Hu JX, Zhang Y, Wang ZM, Liu Y, Jiang Y, 2021. Preliminary study on fungal diversity in US soybean based on high throughput sequencing and culture methodology. *Plant Quarantine*, 35(1): 31-38 (in Chinese)
- Murali TS, Suryanarayanan TS, Geeta R, 2006. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(7): 673-680
- Petrović K, Riccioni L, Djordjevic V, Tubic SB, Miladinovic J, Ceran M, Rajkovic D, 2018. *Diaporthe pseudolongicolla*: The new pathogen on soybean seed in Serbia. *Ratarstvo i Povrtarstvo*, 55(2): 103-109
- Rekab D, Del Sorbo G, Reggio C, Zoina A, Forrao G, 2004. Polymorphisms in nuclear rDNA and mtDNA reveal the polyphyletic nature of isolates of *Phomopsis* pathogenic to sunflower and a tight monophyletic clade of defined

- geographic origin. *Mycology Research*, 108(4): 393-402
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425
- Santos JM, Correia VG, Phillips AJL, 2010. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction *in vitro* and biological species definition. *Fungal Biology*, 114(2-3): 255-270
- Santos JM, Vrandečić K, Čosić J, Duvnjak T, Phillips AJL, 2011. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia*, 27: 9-19
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739
- Thompson J, Higgins D, Gibson T, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-4680
- Thompson SM, Tan YP, Neate SM, Grams RM, Shivas RG, Lindbeck K, Aitken EAB, 2018. *Diaporthe novem* isolated from sunflower (*Helianthus annuus*) and other crop and weed hosts in Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 152(3): 823-831
- Udayanga D, Liu XZ, McKenzie EHC, Chuksatirote E, Bahkali AHA, Hyde KD, 2011. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*, 50: 189-225
- van Niekerk JM, Groenewald JZ, Farr DF, Fourie PH, Halleen F, Crous PW, 2005. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 34: 27-39
- van Rensburg JCJ, Lamprecht SC, Groenewald JZ, Castebury LA, Crous PW, 2006. Characterization of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. *Studies in Mycology*, 55: 65-74
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 38: 315-322
- Yan J, Wu PS, Gu JF, 2007. SN/T 1899-2007 Identification of *Diaporthe phaseolorum* (Cooke et Ell.) Sacc. var. *caulivora* Athow et Caldwell and *Diaporthe phaseolorum* (Cooke et Ell.) Sacc. var. *meridionalis* F.A. Fernandez. Standards Press of China, Beijing. 1-5 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 陈雪娇, 李云飞, 宗凯, 姚剑, 段维军, 孙娟娟, 郑海松, 2017. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 4865-2017 大豆拟茎点种腐病菌检疫鉴定方法. 北京: 中国标准出版社. 1-9
- 段维军, 段丽君, 陈先锋, 蔡磊, 2016. 进境乌克兰玉米中夹杂向日葵间座壳菌的鉴定. *菌物学报*, 35(12): 1503-1513
- 胡佳续, 张莹, 王仲敏, 刘勇, 姜一, 2021. 基于高通量测序及分离培养初步研究美国大豆中真菌多样性. *植物检疫*, 35(1): 31-38
- 严进, 吴品珊, 顾建锋, 2007. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1899-2007 大豆茎溃疡病菌检疫鉴定方法. 北京: 中国标准出版社. 1-5