

综述

十字花科蔬菜种传黑斑病研究进展

肖长坤¹ 李勇² 李健强¹

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100094; 2. 密苏里大学哥伦比亚分校 食品科学系,美国 密苏里州 65211)

摘要 黑斑病是危害十字花科蔬菜生产的世界性真菌病害,20世纪90年代前后在我国北方严重发生,目前在生产中仍有潜在风险。黑斑病病原芸薹链格孢、甘蓝链格孢、萝卜链格孢的鉴定主要借助病菌形态、病原变异、核酸序列、同工酶与酶联免疫分析,其中从核酸水平进行病原鉴定更为快捷;黑斑病菌毒素等次生代谢产物是重要致病因子。分子生物学方法已用于十字花科蔬菜种传黑斑病菌种的检测和鉴定。在该病害的防治方法中,种子处理及施用高效低毒杀菌剂是有效途径。今后应在分子水平上注重对病原种群构成、病害流行及种子健康检测方法的研究,同时加强该病害生物防治的基础和技术性探索。

关键词 十字花科蔬菜;种传黑斑病;芸薹链格孢;甘蓝链格孢;萝卜链格孢

中图分类号 S 435.11

文章编号 1007-4333(2003)05-0061-08

文献标识码 A

Research in seed-borne black spot disease in cruciferous vegetables

Xiao Changkun¹, Li Yong², Li Jianqiang¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Department of Food Science, University of Missouri-Columbia, MO 65211, USA)

Abstract Black leaf spot is a worldwide fungal disease of crucifers important. It caused severe losses in North China during the 1990s and is still a potential threat at present. *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola* and *A. japonica* are pathogens of black leaf spot. The pathogenic fungus can be identified by their morphology, variation, nucleotide acid sequence, isoenzyme, and ELISA. Among these techniques, the nucleotide acid sequence analysis is No. 1 much quick and practical. Toxins produced by the fungus are significant pathogenic factors. Molecular biological methods have been used for detection and identification of the pathogens in seeds. Effective measures for the disease control include seed treatment and fungicides of lower toxicity. It is proposed that future directions of investigating should be the pathogenic constituents, disease epidemic, and methods for seed health testing on the molecular levels, as well as the improvement of bio-control on the basis of fundamental research and technological innovations.

Key words cruciferous vegetables; seed-borne black spot disease; *Alternaria brassicae*; *A. brassicicola*; *A. japonica*

在十字花科蔬菜的诸多病害中,黑斑病(black spot disease)通过种子传带形成异地扩散和蔓延,危害叶片和整株植物,全生育过程发病严重影响产量和品质,成为我国蔬菜生产的主要病害之一。我国是小白菜的初级起源中心,也是大白菜的次级源地,具有悠久的栽培历史。白菜类、甘蓝、青花菜及萝卜等十字花科蔬菜已经成为我国主要的蔬菜,栽种面积不断扩大,甘蓝和青花菜等正逐步成为我国出口蔬菜的主要种类。鉴于十字花科蔬菜的特殊地位,本文针对国内外十字花科蔬菜黑斑病的发生和危害、病原研究,侵染组织化学,种子传带黑斑病菌

的鉴定及检测、综合防治等研究进展进行了简要综述,分析了目前的研究重点及未来的发展前景,期为该病害管理的相关研究工作提供借鉴。

1 黑斑病的发生和危害

十字花科蔬菜黑斑病在许多国家都有发生,尤其在美国、芬兰、加拿大、中国台湾发生较重。20世纪40年代,在中国大陆已分布较普遍,对生产影响不大,但随后该病的发生日益严重。发病植株的叶片、茎、长角果等染病部位呈现褪绿和黑色坏死斑,被侵染的种子皱缩和发芽率降低,产量和品质下降。

收稿日期:2003-04-30

基金项目:国家科技攻关专题资助项目(2002BA516A08-11)

作者简介:肖长坤,硕士研究生;李健强,教授,联系作者,主要从事种子病理学研究,E-mail:lijq@cau.edu.cn.

黑斑病对十字花科蔬菜的危害仅次于软腐病、霜霉病和病毒病3大病害。我国受害较重的地区主要有云南、贵州、河北、武汉、北京、兰州及吉林省的部分县市。1988年大白菜黑斑病曾在我国华北、东北和西北地区突然爆发流行,北京市当年秋白菜损失达20%以上。到1991年仍轻或中等偏轻发生^[1]。此后,白菜黑斑病从关中地区、华北地区向东北地区偏移,吉林省的敦化市和黑龙江省的哈尔滨市均有过较大面积的发生,减产在20%以上。1996年白菜黑斑病再次在北京郊区流行。1999年内蒙古呼伦贝尔市大白菜黑斑病流行,严重地块发病率高达100%,病情指数达61.5,黑斑病不仅影响白菜的产量和品质,还造成贮藏期腐烂,近年来控制十字花科蔬菜黑斑病依然是生产的重要问题。

2 黑斑病病原研究

黑斑病菌为半知菌亚门丝孢纲丝孢目链格孢属真菌。世界上已经报道的链格孢属中近90%以上的种能够兼性寄生于不同种植物,引起多种叶斑病。其中,芸薹链格孢(*Alternaria brassicae*),甘蓝链格孢(*A. brassicicola*)和萝卜链格孢(*A. japonica*)引起十字花科蔬菜黑斑病,通过芸薹属和萝卜属的蔬菜种子及杂草和植株残体等途径传播危害十字花科蔬菜。

2.1 传统的分类和形态鉴定

微生物分类先后经历了以形态学、酯同工酶分析和分子生物学研究为基础进行分类和鉴定的3个不同阶段,属于链格孢属真菌的黑斑病菌的鉴定技术也随之不断发展。

黑斑病菌传统分类的主要依据是分生孢子和喙的形态。李明远对萝卜链格孢形态、培养性状、病原菌侵染和田间症状等进行了观察,并对白菜上的3种链格孢和细交链孢做了对比分析,表明借助多个性状可鉴定萝卜链格孢^[2]。但由于链格孢属内不同种之间培养性状不稳定,且高度相似和重叠,实际操作中用传统的方法很难鉴定到种的水平。李多川等把数值分类的方法应用于链格孢属种级分类,证明数值分类方法能反映链格孢属种内在特征^[3]。张敬泽和张天宇等探索了链格孢属种间显著差异性状对区分种和种内株系的作用,并且分析了这些性状的稳定性,认为链格孢属的分类应选择更多的分类性状,在分类单元的描述方法上应该是差异显著性状的集合体^[4]。

许多链格孢属真菌因为缺乏有性时期,没有可作为分类特征的有性结构形态,很难在性不亲和基础上鉴定到种的水平。传统分类中主要依据分生孢子和分生孢子器的形态与形成过程,很少涉及寄主植物、菌落形态和真菌的遗传背景。虽然十字花科蔬菜上的每一种链格孢真菌都有其不同的孢子形态,但其培养性状不稳定,各性状之间会出现交叉重叠^[5],所以借助形态特征鉴定链格孢属真菌种或种内不同株系时存在诸多困难。因此,了解链格孢属真菌的遗传背景,建立黑斑病菌客观特征如分子标记基础上的进化图谱,从核酸水平上对链格孢属内种进行分类和鉴定是一种新的更为科学的方法^[6]。

2.2 病原变异研究

芸薹链格孢和甘蓝链格孢虽然有相同的寄主范围,但在芥蓝上甘蓝链格孢比芸薹链格孢有更大的变异。借助扫描电镜观察发现,甘蓝链格孢通过形成附着胞直接穿透叶表,而芸薹链格孢则通过气孔侵入叶肉细胞^[7]。在不同基因型的寄主上,芸薹链格孢不同株系表现的毒力不相同,在离体叶段上产生毒素量的多少和毒力呈现一致性;其毒素抑制种子发芽和种苗的生长,毒力强的株系产生的抑制作用也最强,不同基因型的芸薹对毒素的反应在程度上存在差异^[8]。同时,不同株系的毒力强弱与其碳水化合物的含量水平成正相关,中等毒力株系含有相当高水平的脂类、蛋白、DNA和RNA成分^[9]。芸薹链格孢在侵入行为、毒力及与毒力相关的性状指标上存在着生物学和生化特性方面的变异,为病原毒力变异的监测和链格孢菌的鉴定提供了辅助途径,但是否存在可以应用于鉴定的专化性变异尚无文献报道。

2.3 同工酶分析与酶联免疫分析用于分类鉴定

可溶性蛋白凝胶电泳分析自1962年引入脉孢菌的研究以来,真菌菌体(菌丝或孢子)的可溶性蛋白图谱和酯酶、过氧化物酶、过氧化氢酶、乳酸脱氢酶等多种酶系及其同工酶电泳图谱分析作为化学分类的重要手段之一,广泛应用于真菌的分类研究,在病原真菌种级分类上已广泛接受^[10]。

十字花科蔬菜上链格孢属病原菌产生的10种同工酶凝胶电泳可将供试的3个种的链格孢菌分开,并且10种同工酶酶谱均表现出种间差异大于种内差异,种内各菌株间共同条带明显多于差异带,表现出种内的一致性,种内各菌株间酶谱不受寄主、地理环境、分离时间(菌种保藏时间)的影响^[11]。董金

皋等对芸薹链格孢菌种内和链格孢菌种间的酯酶同工酶 IP-PAGE 电泳和薄层扫描结果进行分析,进一步印证了同工酶技术在鉴别十字花科蔬菜黑斑病病原菌种和菌系方面的价值^[12]。同工酶凝胶电泳有助于进行链格孢真菌种级水平的分类鉴定,但种以下分类单位的链格孢真菌的蛋白质图谱能否作为相应等级的分类性状尚有争议。此外,同工酶的表达具有组织特异性和发育阶段性,因此必须严格控制检测条件的一致性,才能保证实验的可重复性。

国外科技人员在利用同工酶技术进行芸薹链格孢多态性分析、种群构成和种的鉴定的同时,尝试利用酶联免疫分析(ELISA)技术进行芸薹链格孢种和株系鉴定以及病害传播的监测。Schmechel 使用芸薹链格孢孢子萌发的幼植体作为抗原制备抗体,用单克隆抗体作为新颖的孢子诱捕器来监测空气中传播的芸薹链格孢孢子,证实并非所有细胞(孢子)产生的单克隆抗体对来自不同地方的芸薹链格孢种和株系都具有专化性,这一研究探索了 ELISA 为基础的免疫监测技术的应用潜能。当用碱性磷酸酯酶为基础的间接 ELISA 评价芸薹链格孢(*A. brassicae*)制备的单克隆抗体效价时,抗原浓度在一定范围下,光密度值和酶联板每孔中的抗原量(孢子)呈现相关性^[13]。在 ELISA 分析中制备到具有专化性的芸薹链格孢单克隆抗体,证实可借助 ELISA 方法进行芸薹链格孢的鉴定,但该技术是否可应用于链格孢属真菌不同种的鉴定及能否应用于种子传带链格孢属真菌的检测,尚未见报道。

2.4 核酸相关研究

近年来核染色体 DNA 序列,尤其是 5.8S rDNA 及其侧翼的内部转录间隔区 ITS1 和 ITS2,18S rDNA 序列已应用于许多植物病原真菌的进化关系研究。通过研究真菌核染色体序列,可以分析不同株系的毒力变异和起源关系,为种的鉴定提供分子方面的证据。

Jasalavich 等对十字花科蔬菜有致病性的链格孢 rDNA 部分序列进行了分析比较,表明芸薹链格孢、甘蓝链格孢和萝卜链格孢等病原菌的 ITS1 和 ITS2 区包含较多变异,ITS1 比 ITS2 有更大的序列变异;ITS1 序列长度变异大于 ITS2 区,每一种的序列长度均不相同;ITS1 区的碱基构成变异比 ITS2 区更大,在种的水平上的变异主要在 ITS1 区,而属的水平上的变异主要在 ITS2 区。提出可以根据 ITS1 区的变异设计种专化性探针和引物实现对植物材料上或纯

培养的链格孢进行种的鉴定^[5]。芸薹链格孢种内变异很小,不同地理起源的芸薹链格孢株系产生非常相似的带型,种内大约具有 75.2%~96.4% 相同带型,而种间相同带型在 13.9%~45.0% 之间。根据种内变异水平及产生的特异性条带进行探针的筛选以及专化性引物的设计,为从核酸水平进行鉴定和直接进行种子带菌检测提供了科学依据^[6]。RAPD (random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 指纹分析可以区分同一地区和不同地区的芸薹链格孢株系的变异^[14]。同样使用 RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性) 分析芸薹链格孢、甘蓝链格孢和萝卜链格孢之间的变异,结果也表现出明显的差异^[15]。

2.5 病原毒素相关研究

十字花科蔬菜黑斑病菌同许多植物病原真菌一样在其致病或人工培养过程中产生能使寄主植物细胞中毒的毒素。樊慕贞等首次研究了白菜黑斑病菌毒素,发现 AB-毒素 (*Alternaria brassicae*) 与 AK-毒素 (*Alternaria kikuchiana*) 有交互保护作用。Buchwaldt 等在芸薹链格孢的培养基中分离出 2 种主要植物毒素, Destruxin B 和 Homodestruxin B 以及少量未见报道的 Destruxin B2, 并且在受该病原菌侵染的油菜叶片组织中第一次检测到这 2 种主要毒素^[16]。随后证实 Destruxin B 是芸薹链格孢产生的主要毒素,为非寄主专化性毒素,具有寄主选择性^[17]。Agarwal 等推断 Destruxin B 是一种 depsipeptide, 在纯化过程中分离到一种对 Destruxin B 具有拮抗活性的物质,认为其是植物生长调节物质^[18]。张金林等研究了 30 种化合物对白菜黑斑病菌钝化作用,结果显示: Na⁺、碱性物质和 KMnO₄ 对病菌毒素具有很强的钝化作用,抑制病菌的孢子萌发但不影响菌丝生长。该结果对白菜黑斑病的防治有借鉴意义^[19]。杀菌剂对白菜黑斑病菌 AB-毒素的钝化作用可能与药剂的 pH 有关,而且对毒素和黑斑病菌的作用效果并不一致,该机制有待进一步研究^[20]。白菜黑斑病菌在光照和振荡培养下菌丝生长速度快,生长量大,但 AB-毒素的产生则需要黑暗和静止条件。研究其营养生长和毒素产生之间关系对毒素的分离纯化和钝化机制研究有参考价值^[21]。Otani 等发现用甘蓝链格孢孢子滤液可诱导芸薹离体叶片产生水浸症状,接着出现褐色坏死斑,而在非寄主上不产生可见的症状;当 *A. alternata* 和该孢子滤液混合接种时,能引起与病原菌侵染一样的症状。并且推断滤液中的

毒素即 AB-毒素可能是一种蛋白^[22]。董金皋等研究芸薹链格孢毒素对白菜细胞膜透性、SOD 和 POD 酶活性的影响,表明白菜叶片用 AB-毒素处理后,细胞膜透性增大,且随处理时间延长和毒素浓度的增加而增大,透性的变化与发病程度呈正相关;芸薹链格孢菌与其毒素分别处理白菜后,SOD 和 POD 酶活性的变化基本趋于一致,证明该毒素表现了与其病原菌一致的致病性^[23]。Mac Kinnon 等从甘蓝链格孢 (*A. brassicicola*) 培养滤液中分离到 6 种新的 fusicocane-like diterpenoids (brassicicene A ~ F),并用光谱确定了 brassicicene A ~ F 的结构,结果与 Otani 等的研究推断并不一致^[24]。马振国等对芸薹链格孢致病毒素分析及致病活性测定,证明 Destruxin B 是芸薹链格孢毒素 AB-毒素的主要成分和致病因子,但并不是惟一因子^[25]。白菜黑斑病菌致病机理及毒素作用需深入研究。

3 黑斑病病原侵染化学

寄主受黑斑病菌侵染后,将发生与植物抗病性有关的诸多生理生化变化。已证明甘蓝链格孢孢子中的脂肪酶在该菌侵染花椰菜过程中非常重要,利于孢子粘附在寄主上并对表皮上具有腊质的叶片进行识别,再借助几种丝氨酸酯酶的作用,使菌丝得以直接穿透寄主表皮^[26]。黑斑病菌侵染油菜后无论抗病还是感病品种苯酚含量均增加,但抗病品种中增加的幅度更大,苯酚的积累和糖类损耗与抗病性有关^[27]。芸薹叶部受链格孢侵染后造成植株中总酚含量减少,但多酚氧化酶活力增高,过氧化物酶活力降低^[28]。Chawla 等认为,过氧化物酶是在植株受黑斑病菌侵染后起抗病作用,而多酚氧化酶是植株体内组成型的并在植株受侵染后大量增加而发挥抗病作用的因子。这 2 种酶主要催化酚类化合物氧化,从而使寄主产生抗性;病菌侵染前后过氧化氢酶活性水平差异不明显,它不与过氧化物酶竞争底物,而有利于过氧化物酶将酚氧化为毒性更强的苯醌,使植物发挥更强的抗病性^[29]。

Doughty 等的研究表明,油菜受芸薹链格孢侵染后 glucosinolates 积累增加,推测其具有限制病菌的扩展和抑制二次侵染的作用^[30]。伴随侵染过程,寄主植物释放 3-丁烯基-4-戊烯基-异硫氰酸盐、二甲基二硫化物、4-氧代异佛尔酮和许多倍半萜烯物质,这是病菌侵染后寄主体内积累的 glucosinolates 进行分解代谢的证据;glucosinolates 的分解与寄主的抗病性

密切相关^[31]。据报道,芸薹链格孢的侵染还可诱导芥菜叶片中细胞壁降解酶活力的变化,当芥菜接种病原菌后,细胞壁降解酶如多聚半乳糖醛酸酶和纤维素酶的活力在抗病品种中下降、在感病品种中增强。

4 种子传带黑斑病菌的检测

4.1 传统检测方法

种子传带黑斑病菌的传统检测方法包括:干检法、水洗法、滤纸法、琼脂平板法、选择性培养基法、生物学法和组织学法等。这些方法具有操作简单、不需特殊设备和应用范围广等优点,在种子健康检测中发挥了重要的作用。但其费时、特异性和灵敏度不高、试验结果易受外界条件的影响等,具有一定局限性。选择性培养基法和其他传统检测方法相比,具有简单、快速、准确和检测灵敏度高的特点,而且具有一定的辅助鉴定作用。吴文希等报道了用于检测种传甘蓝链格孢的一种半选择性和一种选择性培养基,特异性比较强、灵敏度比较高,检测出的种子携带甘蓝链格孢比例与田间发病率呈现良好的正向线性关系^[32],通过观察选择性培养基上菌落颜色和产孢情况,可以快速区分出甘蓝链格孢^[33]。在条件不具备或分子检测方法不适用时,传统的种子健康检测方法仍有效适用,尤其是选择性及半选择性培养基不失为种子健康检测、寄主组织上黑斑病菌的分离及辅助鉴定的一种好方法。

4.2 分子检测方法

随着分子生物学方法的应用和对十字花科蔬菜黑斑病菌的核染色体 DNA 序列的研究,RFLP、PCR 和 RAPD 等技术已开始对十字花科蔬菜种子传带黑斑病菌检测中应用,并逐步实现种子健康检测的规范性、科学性和高通量的统一^[6]。

RAPD 标记对不同的真菌种具有高度特异性,具有分类特异性的扩增 DNA 片段作为杂交探针可以进行油菜种子传带包括芸薹链格孢、甘蓝链格孢、萝卜链格孢等 11 个种的鉴定,从而实现以 RAPD 为基础的种子传带真菌的分子检测^[34]。Sharma 等通过 RAPD 和 RFLP 分析,分别制备出了甘蓝长尾交链孢霉 (*A. brassicae*) 和甘蓝黑斑交链孢霉 (*A. brassicicola*) 种专化性探针,认为把这 2 个探针应用于含有病原菌的组织鉴定及检测具有重要意义^[7]。Vasilescu 等针对十字花科蔬菜种子传带交链孢属真菌 rDNA 和 ITS 区变异情况,分别设计特异性引物,

实现了用 PCR 方法对种子传带甘蓝黑斑交链孢霉 (*A. brassicicola*) 和胡萝卜叶斑交链孢霉 (*A. japonica*) 的快速检测^[35]。

5 黑斑病的防治

虽然抗病品种的选育是治理病害最经济有效的措施,但目前国内外主要利用种子处理、生物防治和植物抗菌活性物质尝试进行十字花科蔬菜黑斑病的综合控制。

5.1 种子处理

在已经报道的防治十字花科蔬菜黑斑病的多项措施中,种子化学处理具有较好的效果。1979年吴文希进行不同药剂及施药方法防治甘蓝链格孢引起的花椰菜黑斑病的效果试验,表明花椰菜种子用二氯甲烷或二氯甲烷与万力 (Benomyl) 的混合液浸种后,明显提高种子的发芽率和出苗率;丙酮及二氯甲烷能完全抑制甘蓝链格孢菌孢子萌发。 $2\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的万力不能完全抑制寄藏于甘蓝叶片上病菌孢子的萌发, $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的克菌丹 (Captan) 能完全抑制该菌萌发与产孢^[36]。吴文希的研究还表明,使用扑海因 (Iprodione) 和苯莱特 (Benomyl) 无论拌种还是浸种,均可有效的抑制白菜种子上携带的甘蓝链格孢对种子和幼苗的危害^[37]。2000年 Shrestha 等报道,使用扑海因、福美双 (Thiram)、代森锰锌 (Mancozeb) 和克菌丹进行种子处理,可以有效的防治芸薹链格孢造成的病害,保苗效果明显,其中以扑海因的防效最好,用原药以 $5\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 进行拌种能有效的减少病害传播;福美双和代森锰锌次之,克菌丹的防效一般^[38]。有报道认为赤霉酸对胡萝卜链格孢有一定的抑制效果。

Maude 等在实验室和玻璃温室的生物引发试验表明,在聚乙二醇 (PEG) 中加入 0.1% 的扑海因和 0.1% 的福美双原药仅部分地降低侵染。如果引发、干燥、用扑海因拌种或形成高分子膜的包衣则能获得完全的防效。添加福美双到引发液中、引发后干燥、再用扑海因拌种,可提高发芽率和产量^[39]。Tylkowska 等对萝卜种子进行渗透引发 (聚乙二醇) 和氢引发,表明 3 个种子批次发芽均提前,发芽一致性提高,但是正常种苗数量减少了,这是由于引发处理后被胡萝卜链格孢等真菌污染的种子数量增加所致;在中高等污染的种子批次中,引发处理会造成更高等度的污染,尤其是 PEG 引发后能使真菌可侵入种子表皮内部^[40]。据报道用 54 温汤浸种处理

20 min 能抑制胡萝卜链格孢病菌且不影响种子发芽率,因此生产中可以考虑用温汤浸种代替杀菌剂处理。

笔者 2001—2002 年期间就大白菜和白菜各 7 个品种进行了福美双 WP 药剂消毒处理效果检测,结果表明,在适合 *Alternaria* spp. 生长的选择性培养基上 (SNA 培养基: $\text{K}_2\text{HPO}_4\ 1.36\ \text{g}$; $\text{Na}_2\text{CO}_3\ 1.06\ \text{g}$; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\ 5.0\ \text{g}$; Dextrose $5.0\ \text{g}$; Asparagine $1.0\ \text{g}$; Agar $20.0\ \text{g}$; 蒸馏 $\text{H}_2\text{O}\ 1\ 000\ \text{mL}$), 14 个供试白菜品种种子寄藏 *Alternaria* spp. 的比率差异较大,其中大白菜类的北京 75 号、津白 45 和白菜类的黑叶四月慢和五月慢青菜的种子健康状况良好,未检测到 *Alternaria* spp., 其他品种种子寄藏 *Alternaria* spp. 的比例为 5.0% ~ 60.0% 和 3.3% ~ 56.7%, 为种子传播白菜黑斑病初侵染来源并危害生产提供了潜在性。福美双对供试白菜种子寄藏 *Alternaria* spp. 消毒处理效果明显,除新 1 号白菜品种外,效果均在 72.4% ~ 100% 之间,为种子处理控制白菜黑斑病提供了可能性。同时表明,福美双拌种处理对提高大多数供试品种种子的发芽率有一定效果^[41]。

5.2 生物防治

利用拮抗菌对十字花科蔬菜黑斑病进行生物防治的研究和报道较多。Sivapalan 在离体条件下测定并证实了从不同花椰菜种子上分离到的拮抗微生物对甘蓝链格孢孢子的萌发具有抑制作用。其中 *Gliocladium roseum*, *Trichoderma harzianum* 对减少甘蓝链格孢对种子和植株叶部的侵染及提高发芽最有效^[42]。Leifert 等从芸薹属作物上分离到拮抗微生物,在叶盘法生物测定中显示, *Pseudomonas fluorescens* 分离物 CL42、66 和 82, *Serratia plymuthica* 分离物 CL43、*S. liquefaciens* 分离物 CL80 能有效的抑制芸薹链格孢生长^[43]。从羽衣甘蓝叶片分离的拮抗微生物中,芽孢杆菌属的 BR-11 和 BS-25 分离物也能有效的抑制甘蓝链格孢的生长及孢子萌发^[44]。据报道 *Streptomyces griseoviridis* 分泌的抗生素物质能控制甘蓝链格孢等多种种传真菌如甘蓝链格孢。在接种芸薹链格孢之前喷洒非致病的 *A. alternata* 孢子悬浮液,也能较好的防治油菜黑斑病。

Leifert 等对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) CL27 菌株进行发酵,用薄层层析分离到一种寡肽,生测结果显示其对甘蓝链格孢具有拮抗活性^[45]。Pichard 等从花椰菜种子上分离到 *B. polymyxa*, 其发酵培养的无菌上清液可以通过产生抗生素起到控制花椰菜

黑斑病的作用,用无菌上清液进行种子处理亦能减少病害的发生^[46]。

5.3 植物抗菌活性物质

Ram 等进行了部分植物提取物杀真菌活性的研究,结果表明 *Ocimum sanctum* 植株叶片提取物在 $10\ 000\ \mu\text{g}\ \text{mL}^{-1}$ 时可以完全抑制芸薹链格孢的孢子萌发,而 *Allium sativum* 和 *A. cepa* 的鳞茎提取物在 $10\ 000\ \mu\text{g}\ \cdot\ \text{mL}^{-1}$ 时对该菌孢子萌发抑制率为 40%^[47]。而蕨类植物 *Adiantum caudatum*、*Diplazium esculentum* 和 *Pteris vittata* 的提取物及 *Alstonia venenata* 的吲哚类生物碱能抑制甘蓝链格孢的生长和孢子萌发^[48]。Tylkowska 等检测了肉桂、大蒜、白屈菜、姜的提取物和杀菌剂抑制黑斑病菌的效果,姜对芸薹链格孢最有效,大蒜对胡萝卜链格孢最有效,但效果均不如杀菌剂^[49]。从 *Jatropha gossypifolia* 植物提取的乳液可以 100% 抑制甘蓝链格孢孢子萌发,稀释 25 倍后其抗菌活性仍维持较高水平^[50]。Pedras 等用芸薹链格孢或其产生的 B 毒素诱导白芥产生了一种植保素 sinalexin,并分离和合成了其主要的抗菌活性成分 4-hydroxy-benzylisothiocyanate^[51]。

Terras 等从芸薹科的 4 个物种分离到 7 种抗真菌蛋白,它们和从萝卜种子上分离到的 2 个抗真菌蛋白几近相同,是分子量为 5 kD 的多肽多聚体,能显著抑制甘蓝链格孢等真菌的生长^[52]。Chung 还发现把萝卜或油菜中的 2S 清蛋白加入大麦或小麦提取的硫堇中,能增加硫堇对甘蓝链格孢的抑制活性。另外 2S 的清蛋白的大小亚基和其他一些因子也可以起到协同增效作用,借助扫描电镜观察钾离子的渗透情况发现,清蛋白和硫堇以增加真菌细胞膜透性这一相同模式起抑制作用^[53]。

6 存在问题和前景展望

6.1 从分子水平加强对健康检测新技术的研究

引起十字花科蔬菜黑斑病的 3 种病原菌有通过种子传带造成异地传播的风险;用化学药剂能有效的进行防治,但杀菌剂过度使用会使病菌产生抗性。目前,国内外对种子传带黑斑病菌的分子检测技术进行了广泛研究,所用方法中 RFLP 和 RAPD 在灵敏度和稳定性方面有很大局限性,PCR 仍是目前最灵敏和快捷的检测方法。当前,比较新的技术如 real-time PCR 和 chip PCR 等已经得到了迅速应用。利用 PCR、Bio-PCR、Real-time PCR、chip PCR 等分子技术研究病菌特有的分子遗传标记,实现黑斑病菌的准

确快速鉴定、种子传带的分子检测、毒力变异和病害流行监测,从病害发生的分子水平寻找病害控制的新途径。

6.2 加强生物防治为主的综合控制技术研究

蔬菜的安全生产已经愈来愈受到关注,深入研究十字花科蔬菜黑斑病菌的致病机制及毒素在致病过程中的作用,对明确病原和寄主互作的分子机制和通过基因工程手段控制该病害具有十分重要意义。

应用生防微生物及其次生代谢物、植物抗菌活性物质、植保素和抗真菌蛋白以及高效、广谱、低毒、低残留化学药剂进行十字花科蔬菜种子处理及黑斑病的综合防治,探讨生防微生物的拮抗机理、无公害生物农药研发和种子药物处理的作用机制是倍受关注和值得深入研究的热点问题。

感谢台湾大学吴文希教授、美国 Campbell 公司研究发展中心 Hasan Bolkan 博士提供文献帮助。

参 考 文 献

- [1] 郑建秋,胡荣娟,王艳梅,等. 秋白菜黑斑病产量损失关键期分析 [J]. 北京农业科学,1994,12(2):39~40
- [2] 李明远. 萝卜链格孢形态学的研究 [J]. 华北农学报,1993,8(3):98~101
- [3] 李多川,张天宇,吴竟爽. 链格孢(丝孢纲)数值分类研究除探 [J]. 真菌学报,1993,12(3):232~239
- [4] 张敬泽,张天宇,王谨. 链格孢属种间培养性状的分类研究 [J]. 浙江农业大学学报,1997,23(5):511~514
- [5] Jasalavich G A, Morales V M, Pelcher L E. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequence from *Alternaria* species pathogenic to cruciferous [J]. Mycology Research,1995,99(5):604~614
- [6] Cook D E L, Forster J W, Jenkins P D, et al. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR [J]. Annals of Applied Biology,1998,132(2):197~209
- [7] Huang J W, Chung W C. Characteristics of cruciferous black spot pathogens, *Alternaria brassicicola* and *A. brassicae* [J]. Plant Pathology Bulletin,1993,2(3):141~148
- [8] Vishwanath, Kolte S J. Biochemical variation among three isolates of *Alternaria brassicae* [J]. Indian Phytopath,1997,50(3):437~438
- [9] Vishwanath, Kolte S J. Variability in *Alternaria brassicae*: response to host genotypes, toxin production and fungicides [J]. Indian Phytopath,1997,50(3):373~381
- [10] 陆家云. 植物病原真菌学 [M]. 北京:中国农业出版社,2000. 393~394

- [11] 陈伟群,张天宇. 十字花科上的链格孢属真菌同工酶凝胶电泳分析 [J]. 真菌学报,1994,13(4):295~302
- [12] 董金皋,樊慕贞,扬英茹,等. 芸薹链格孢菌种内和链格孢菌种间的酯酶同工酶比较 [J]. 植物病理学报,1997,27(2):167~173
- [13] Schmechel D,McCartney H A,Magan N. The production and characterization of monoclonal antibodies against *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc [J]. Food and Agricultural Immunology,1997,9(3):219~232
- [14] Sharma T R,Tewari J P. Detection of genetic variation in *Alternaria brassicae* by RAPD fingerprints [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology,1995,4(2):105~107
- [15] Sharma T R,Tewari J P. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers [J]. Mycological Research,1998,102(7):807~814
- [16] Buchwaldt L, Jensen J S. HPLC purification of destruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and leaves of *Brassica napus* [J]. Phytochemistry,1991,30(7):2311~2316
- [17] Buchwaldt L, Green H. Phytotoxicity of destruxin B and its possible role in the pathogenesis of *Alternaria brassicae* [J]. Plant-Pathology,1992,41(1):55~63
- [18] Agarwal A, Garg G K, Singh U S,. Detection and role of chlorotic toxin and phytohormones in the pathogenesis of *Alternaria* blight in *Brassica napus* [J]. Current Science,1994,66(6):442~443.
- [19] 张金林,董金皋,刘文山,等. 白菜黑斑病菌 (*Alternaria brassicae*) 毒素钝化物的初步研究 [J]. 河北农业大学学报,1995,18(4):16~20
- [20] 张金林,李川,刘文山,等. 3 种杀菌剂对白菜黑斑病菌 AB-毒素的作用初报 [J]. 河北农业大学学报,1995,18(4):130~131
- [21] 阎淑娟,董金皋,樊慕贞. 白菜黑斑病菌营养生长和毒素产生关系的初步研究 [J]. 河北农业大学学报,1998,21(1):23~25
- [22] Otani H, Kohnobe A, Kodama M,. Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,1998,52(5):285~295
- [23] 董金皋,樊慕贞,韩建民,等. 芸薹链格孢毒素对白菜细胞膜透性、SOD 酶和 POD 酶活性的影响 [J]. 植物病理学报,1999,29(2):138~141
- [24] MacKinnon S L, Keifer P, Ayer W A. Components from the phytotoxic extract of *Alternaria brassicicola*, a black spot pathogen of canola [J]. Phytochemistry,1999,51(2):215~221
- [25] 马振国,董金皋,樊慕贞,刘云慧,李正平. 芸薹链格孢毒素分析: 腐败菌素 B 的分离提纯和结构鉴定 [J]. 菌物系统,2000,19(3):360~365
- [26] Berto P, Commenil P, Belingheri L, et al. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves [J]. FEMS Microbiology Letters,1999,180(2):183~189
- [27] Chattopadhyay A K. Relationship of phenols and sugars in *Alternaria* blight resistance of rapeseed mustard [J]. Indian Journal-of-Mycological-Research,1989,27(2):195~199
- [28] Gupta-SK, Gupta PP, Kaushik-CD. Changes in leaf peroxidase, polyphenol oxidase, catalase and total phenols due to *Alternaria* leaf blight in Brassica species [J]. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology,1995,25(3):175~180
- [29] Chawla H KL, Gupta V, Saharan G S. Changes in activities of oxidative enzymes in *Brassica juncea* leaves during interaction with *Alternaria brassicae* [J]. Cruciferae Newsletter,2001,23:55~56
- [30] Doughty K J, Porter A J R, Morton A M, et al. Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. Response to infection by *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc [J]. Annals of Applied Biology,1991,118(2):469~477
- [31] Doughty K J, Blight M M, Bock C H, et al. Release of alkenyl isothiocyanates and other volatiles from *Brassica rapa* seedlings during infection by *Alternaria brassicae* [J]. Phytochemistry,1996,43(2):371~374
- [32] Wu W S, Lu J H. Seed treatment with antagonists and chemicals to control *Alternaria brassicicola* [J]. Seed Sci. & Technol.,1984,12:851~862
- [33] Wu W S, Chen T W. Development of a new semiselective medium for detecting *Alternaria brassicicola* in cruciferous seeds [J]. Seed Sci. & Technol.,1999,27:397~409
- [34] Schleier S, Voigt K, Wostemeyer J. RAPD-based molecular diagnosis of mixed fungal infections on oilseed rape (*Brassica napus*): evidence for genus- and species-specific sequences in the fungal genomes [J]. Journal of Phytopathology,1997,145(2-3):81~87
- [35] Iacomini V B, Blancard D, Guenard M, et al. Development of a PCR-based diagnostic assay for detecting pathogenic *Alternaria* species in cruciferous [J]. seed. Seed Sci. & Technol.,2002,30:87~95
- [36] Wu W S, Wu Ch H, Wu K C. *Alternaria brassicicola*, a destructive pathogen in seed production of cauliflower [J]. Plant Protection Bulltin (Taiwan),1979,21:294~304
- [37] Wu W S, Lu J H. Seed treatment with antagonists and chemicals to control *Alternaria brassicicola* [J]. Seed Sci & Technol,1984,12:851~862
- [38] Shrestha S K, Mathur S B, Munk L. *Alternaria brassicae* in seeds of rapeseed and mustard, its location in seeds, transmission from seeds to seedlings and control [J]. Seed Sci & Technol,2000,28:75~84
- [39] Maude R B, Drew R L K, Gray D, et al. Strategies for control of seed-borne *Alternaria dauci* (leaf blight) of carrots in priming and process engineering systems [J]. Plant Pathology,1992,41(2):204~214
- [40] Tylkowska K, Bulk R W van den. Effects of osmo- and hydropriming on fungal infestation levels and germination of car-

- rot (*Daucus carota* L.) seeds contaminated with *Alternaria* spp [J]. Seed Science and Technology, 2001, 29(2): 365 ~ 375
- [41] 肖长坤, 王红梅, 李健强, 等. 白菜种子贮藏交链孢属真菌检测及药剂消毒处理效果初探 [A]. 中国植物病理学会第七届代表大会暨学术研讨会论文摘要集 [C]. 北京: 中国植物病理学会出版, 2002. 173
- [42] Sivapalan A. Fungi associated with broccoli seed and evaluation of fungal antagonists and fungicides for the control of seed-borne *Alternaria brassicicola* [J]. Seed Science and Technology, 1993, 21(1): 237 ~ 245
- [43] Leifert C, Sigeo D C, Epton H A S, et al. Isolation of bacteria antagonistic to postharvest fungal diseases of cold-stored *Brassica* spp [J]. Phytoparasitica, 1992, 20: Supplement, 143 ~ 148
- [44] Chung W C, Huang J W. Application of microorganisms for biocontrolling black spot of Chinese kale, caused by *Alternaria brassicicola* [J]. Plant Protection Bulletin Taipei, 1994, 36(2): 117 ~ 130
- [45] Leifert C, Li H, Chidburee S, et al. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45 [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78(2): 97 ~ 108
- [46] Pichard B, Thouvenot D. Effect of *Bacillus polymyxa* seed treatments on control of black-rot and damping-off of cauliflower [J]. Seed Science and Technology, 1999, 27(2): 455 ~ 465
- [47] Daya Ram, Ram D. Fungitoxicity of some plants extract against *Alternaria brassicae* [J]. Annals of Agri Bio Research, 1997, 2(1): 25 ~ 26
- [48] Singh U P, Sarma B K, Mishra P K, et al. Antifungal activity of venenatine, an indole alkaloid isolated from *Alstonia venenata* [J]. Folia Microbiologica, 2000, 45(2): 173 ~ 176
- [49] Tylkowska K, Dorna H. Effects of cinnamon, garlic, greater celandine, ginger and chosen fungicides on the growth of pathogenic fungi isolated from onion, cabbage and carrot seeds [J]. Phytopathologia Pblonica, 2001, 21: 25 ~ 34
- [50] Pandey A, Maity B R, Samaddar K R. Antifungal activity of plant latex towards certain fungal organisms [J]. Journal of Mycopathological - Research, 1996, 34(1): 35 ~ 40
- [51] Pedras M S C, Smith K C. Sinalexin, a phytoalexin from white mustard elicited by destruxin B and *Alternaria brassicae* [J]. Phytochemistry, 1997, 46(5): 833 ~ 837
- [52] Terras F R G, Torrekens S, Leuven F van, et al. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from *Brassicaceae* species [J]. FEBS Letters, 1993, 316(3): 233 ~ 240
- [53] Terras F R G, Schoofs H M E, Thevissen K, et al. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors [J]. Plant Physiology, 1993, 103(4): 1311 ~ 1319

科研简讯

甲氨基阿维菌素系列微乳剂的研究与开发通过鉴定

2000年6月20日我校理学院吴学民博士与中种集团农业化学有限公司合作开发的甲氨基阿维菌素系列微乳剂顺利通过教育部组织的专家鉴定。专家一致认为,这一工艺采用先导分散剂加入和表面活性剂泊松点调节等微乳剂加工技术,创新程度高,其产品性能和技术达到国际先进水平。

用于田间害虫喷雾使用的传统的甲氨基阿维菌素制剂以乳油为主,制剂中70%以上是在环境中不易分解的芳烃溶剂,严重污染环境。吴学民博士与中种集团公司合作开发的微乳剂甲氨基阿维菌素,以水取代有机溶剂作为制剂的基剂,可以大大降低这种污染。由于微乳剂具有很好的表面性能和极小的药剂微粒,施药后对靶标的润湿、附着与渗透性能大大提高,特别是对一些有较厚蜡质层的刺吸式口器昆虫和对农作物危害极大的鳞翅目害虫的活性提高20%。

专家认为,以水取代芳烃溶剂是生物农药制剂基剂发展的重要方向。这种水基制剂有益于生态环境,既可提高药效,又可降低制剂对使用者的毒性,并且贮运安全,与传统乳油相比,成本降低10%,具有较高的国内外市场竞争力。

(科技处供稿)