

烟草赤星病生物防治进展

许连生 (安徽省烟草公司宿州市分公司, 安徽宿州 234000)

摘要 从植物诱导抗病性、微生物拮抗作用、转基因植物3个方面展开,对近年来烟草赤星病生物防治的研究进展进行了论述。

关键词 烟草; 赤星病; 生物防治

中图分类号 S572 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)06-02327-02

烟草赤星病(*Alternaria alternata*)是烟草上的一个重要真菌性病害,主要发生在烟叶成熟期^[1-2]。赤星病于1892年首先在美国发现,多次给世界烟叶生产带来较大的经济损失^[3-5]。在我国,1916年首次在北京发现,1964年在山东烟区大流行,造成很大的经济损失^[6-8]。此后,赤星病在全国各烟区发生频繁。

多年来,对烟草赤星病的防治,主要采用抗病育种、化学防治、生物防治、农业防治的方法^[9]。至今还没有得到令人满意的抗烟草赤星病的品种^[10]。化学防治尽管效果明显,但会产生农药残留,严重影响烟叶品质,且对环境造成污染^[11-12]。农业措施能够起到辅助防治的效果,但起不到根本性作用。生物防治由于其所有的独特的优越性,成为最具发展前景的领域,也是国内外科研工作者研究的热点。近年来,科学工作者对烟草赤星病的生物防治研究取得了许多研究成果,笔者对此进行了综述。

1 拮抗菌的筛选

拮抗作用是利用某些有益微生物(细菌、真菌、放线菌等)或其产生的抗菌物质来抑制病菌的生长,从而达到控制病害的目的^[13]。近年来,对于赤星病菌拮抗菌的研究已经取得了一些成果。

1.1 细菌 易龙等^[14]从健康烟草的叶、茎中分离到302株非病原内生细菌,通过平板对峙培养,筛选出对烟草赤星病菌[*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl]有不同致病力的4个代表菌株均有拮抗作用的11个菌株。室内测定其对赤星病菌抑菌带的宽度达5.5~13.2 mm;拮抗、防病试验测定,来自叶片内的内生菌株Itb162对赤星病菌有较强和稳定的拮抗作用,对赤星病有52.0%的防病效果。无菌滤液试验表明,拮抗内生细菌Itb162无菌滤液在一定浓度范围内均能有效地抑制菌丝生长,减少孢子萌发,且浓度越高,抑制能力越强。在2007年,易龙等^[15]又从烟草叶片上分离得到细菌Ata28,经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),通过平板对峙培养,测定其对不同致病力的烟草赤星病菌均有拮抗作用,抑菌带宽度达8.4 mm;在温室中进一步进行盆栽控病试验,防治效果为75.2%。试验表明,拮抗菌Ata28的无菌滤液在一定浓度范围内均能有效地抑制赤星病菌菌丝生长(图1)。

方敦煌等^[16]从健康烟草根分离到669株根际芽孢杆菌,通过平板对峙培养、代谢产物活性检测,筛选到9株抑制烟草赤星病菌活性较强的菌株,其菌体及粗代谢产物产生的抑

菌圈直径均>10 mm(图2);离体防效和田间小区防治试验表明,菌株B6、B75的含菌发酵液和粗代谢产物的离体防效分别为75.6%、76.9%和62.5%、64.7%,小区防效分别为70.3%、75.8%和60.3%、64.4%。粗代谢产物的抑菌作用试验发现,菌株B75的粗代谢产物在一定浓度范围内能抑制赤星病菌孢子萌发、菌丝生长与产孢。

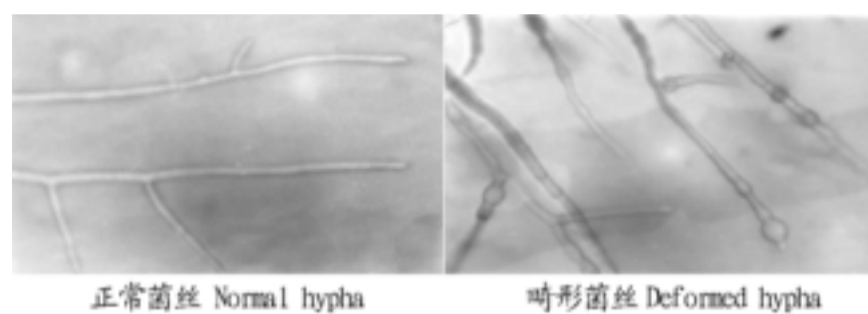


图1 光学显微镜下受Ata28抑制的烟草赤星病菌丝形态^[14]

Fig.1 Morphology of Mycelium of *A. alternata* Inhibited by Ata 28 under the Microscope

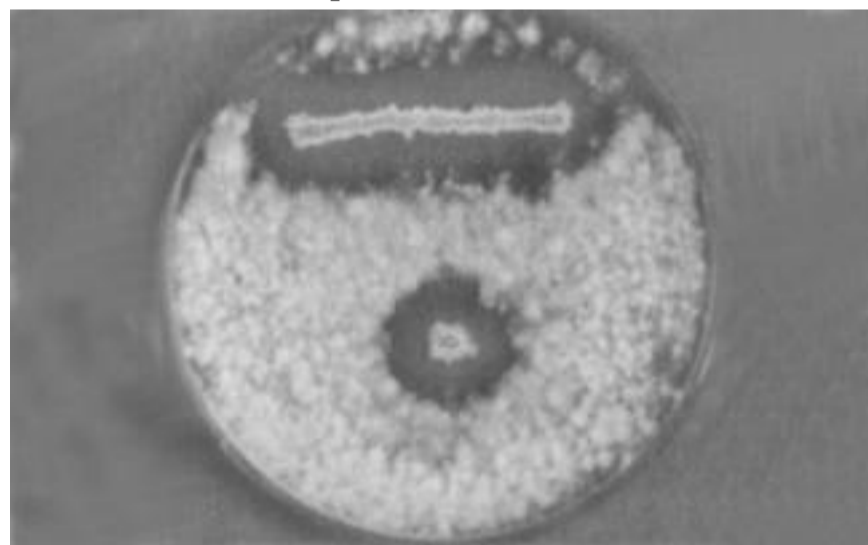


图2 防治烟草赤星病拮抗根际芽孢杆菌的筛选^[16]

Fig.2 Inhibition of anti-bacteria B75 against the pathogen of tobacco brown spot

方敦煌等^[17]对B75菌株进行了进一步研究,在以NB培养液进行试验时发现,B75在对数生长的中期开始产生抗菌物质,在生长的衰退期前存在一个产生抗菌物质的高峰期;在25~50、pH值4.0~8.5均可产生抗菌物质,其中30和pH值6.0的培养条件最适。不同的装液量试验结果表明,三角瓶装液量为100 ml/500 ml时,是B75菌株菌体生长及产生抗菌物质的最适宜量。不同的碳、氮源试验结果表明,甘露醇、酵母膏最有利于B75菌株菌体生长,且产生的抗菌物质抑菌活性较强。推测抗菌物质为蛋白质或多肽。

罗坤等^[18]利用稀释分离方法,从湖南、云南烟区烟株下部叶片分离得到烟草叶面细菌676株,通过对峙培养试验和孢子萌发试验,结果16株菌株对烟草赤星病菌有较强的拮抗作用;室内盆栽生防测定试验表明,16株菌株不同程度地减轻了烟草赤星病的发生,其中5株防治效果较好,分别达

77.4%、77.4%、92.5%、92.5%和90.3%。

王智文等^[19]通过单次单因子试验和正交试验,对多粘类芽孢杆菌 Cp-S316 菌株抗真菌活性物质的发酵培养基进行了优化,获得适合菌株生长和抗真菌活性物质产生的最佳培养基配方为:马铃薯100.0 g、乳糖400.0 g、蛋白胨15.0 g、硝酸钠0.5 g、硫酸镁2.0 g、水1 L。经摇瓶发酵试验,发酵液效价比基础培养基配方提高了325.2%。Cp-S316 菌株产生的抗真菌活性物质粗提物对烟草赤星病菌菌丝有强烈的抑制作用,显微镜观察发现,活性物质能引起菌丝原生质凝集。

1.2 真菌 方敦煌等^[20]研究显示,木霉对烟草赤星病的防治效果随着木霉孢子对烟草赤星病孢子的配比浓度增加而增加,当木霉孢子与烟草赤星病菌孢子的浓度配比达10:1时,防效最大,达90%以上,再增大浓度配比,防效不再增加,保持稳定。

纪丽莲^[21]从黄海岸芦竹(*Arundo donax*)中分离得到一株木霉属的内生真菌 F0238,在皿内及盆栽苗上对该菌防治烟草赤星病进行了试验研究。对峙培养结果表明,F0238对烟草赤星病菌有较强的营养竞争作用;盆栽试验表明,F0238在孢子浓度 10^{10} 个/ml时对烟草赤星病的预防能力达90%以上,孢子浓度 $10^8 \sim 10^9$ 个/ml时对烟草赤星病的治疗效果达50%以上,表明该菌具有潜在的防治烟草赤星病的能力。

1.3 放线菌 何莲等^[22]从烟草、辣椒和番茄地里取样,通过分离、纯化获得12个放线菌,编号为SZF1~SZF12,其中SZF2和SZF7对赤星病菌的抑制作用最好,在PDA平板上做对峙试验,其抑菌带宽分别达11.8和11.3 mm。培养8 d的SZF2和SZF7的发酵液对赤星病的防效达73.5%和32.4%,具有很好的应用前景。

1.4 病毒型生物制剂和抗菌酶类 白建保等^[23]研究了肽霉素(一种病毒型生物制剂)对烟草赤星病菌的抑制作用,结果表明,在PDA培养基上共同培养时,抑菌圈直径为47.1 mm;肽霉素作用方式是抑制孢子萌发,使病菌菌丝生长受到限制,原生质聚集,后菌丝畸形,出现大量原生质外渗;该药液作用位点在菌体的细胞膜上,菌体失去侵染力。

陶刚等^[24]以指形管培养法分别测定几丁质酶粗酶液和纯化的几丁质酶混合液(2种几丁质酶)对烟草赤星病菌孢子萌发的抑制作用,结果表明,较高浓度(25.2 U/ml)几丁质酶粗酶液在48 h内强烈抑制孢子萌发和芽管伸长,或致芽管畸形和细胞壁破裂;几丁质酶混合液对赤星病菌的孢子萌发也表现出明显的抑制作用,但在相同或相近酶活性条件下,纯化的几丁质酶混合液(9.4 U/ml)和粗酶液(12.6 U/ml)对赤星病菌孢子萌发的抑制率(处理24 h时)分别为46.0%和84.3%,前者明显低于后者。采用孢子液悬滴法接种烟苗(K326)叶片测定木霉几丁质酶对赤星病菌致病性的影响,结果表明,几丁质酶粗酶液浓度越高,对孢子萌发抑制时间越长,抑制率越高;其浓度为4.9、9.8、19.5 U/ml的抑制率在7 d时分别为36.8%、56.2%和57.6%。

2 诱导抗病性

植物的诱导抗性又称系统性获得抗性(SAR),是当植物受到弱毒株病原物侵染或某些生化制剂诱导处理后产生的一种主动防卫反应,可以对随后病原物的侵染产生抗性^[25]。

寻找能够诱导植物产生抗病性的病菌激发子是当今植物病理学科中十分活跃和重要的工作。刘爱新等^[26]用TBA16制备激发子(Hictor,也称抗病诱导剂)诱导处理烟草后,烟草体内的几丁质酶(Ch)和-1,3-葡聚糖(Gu)的活性增强,对赤星病菌有明显的抑菌作用。

梁元存等^[27]用TBA16制备激发子诱导烟草,幼苗经激发子处理后,苯丙氨酸裂解酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性有所增加,病程相关蛋白(PR)也有量的积累。梁元存等^[28]还用抗病诱导剂SRS-2(主要成分是病菌弱毒株TBA16的孢子壁组分)进行大田应用,结果表明,诱导剂SRS-2能够较好地控制烟草赤星病,防效最高达85.0%,平均为62.7%。

商明清等^[29]以烤烟品种NC89在16~25℃、自然光周期的温室内培育,9~10叶期供试验用;烟草赤星病菌强毒株TBA28用于挑战接种;赤星病菌弱毒株TBA16用于制备糖蛋白激发子,随着诱导时间增加,防效增加,诱导后10 d,防效可达53.5%。

3 转基因

随着生物技术实验手段的不断提高,通过转基因技术获得稳定遗传的抗病植株已成为可能^[30]。

吴中心^[31]以烟草赤星病的抗性材料净叶黄DNA为供体,感病材料NC89为受体,通过涂抹柱头法和注射子房法,通过外源DNA的导入处理,获得了抗赤星病性状可稳定遗传的株系。刘国胜^[32]利用从病原细菌 *Pseudomonas syringae* Pv.tonato 中获得的无毒基因 avr D 片段与病原菌诱导型的特异启动子 P_{CHS} 和 PAL 构建成表达盒,通过土壤农杆菌分别转化烟草品种 K326 和 Bottom Special。经烟草赤星病菌孢子定量接种转基因植株及其离体叶片,筛选到一批高抗植株。方玉达等^[33]通过根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导,将水稻几丁质酶基因导入烟草栽培品种中,并得到转基因植株。导入的3个基因即 npt_{II}、bar 和几丁质酶基因,在子一代以近3:1的比例分离。表达水稻几丁质酶的子一代转基因烟草表现出对烟草赤星病病原真菌(*A. alternata*)的抗性。Kai等^[34]研究显示,将 GbERF2 基因转入烟草,使其在烟草中过量表达,可以提高对烟草赤星病的抗性。GbERF2 基因是从被 *Verticillium dahliae* 侵染的海滩棉花中克隆得到的一种能够结合 GCC 盒的 ERF 类转录因子。

4 展望

关于烟草赤星病拮抗菌研究方面,芽孢杆菌、木霉和放线菌前景比较好,可以进行深入研究,找出起重要作用的抗菌物质,并对其作用机理进行探析;对于诱导抗病性方面,寻找新型高效的激发子是一条行之有效的途径,并可以对其作用机理进行深入研究,找到提高植物抗病性的分子靶标,为有效控制烟草赤星病打下坚实的基础;对于转基因方面,现在还不准许释放,相信不久的将来转基因烟草会投放生产,需提前做好研究储备。

参考文献

- [1] 方宇澄.中国烟草病虫害彩色图谱[M].合肥:安徽科学技术出版社,1992:10.
- [2] SHEWHED, L UCAS GB. Compendium of tobacco disease[M]. [s.l.]: American Phytopathological Society (APS), 1990:10-12.

种方法下的氟含量分别为:14.40 和 15.32 ng/kg, 13.28 和 14.31 ng/kg, 11.90 和 13.38 ng/kg。

2.4 方法的精确性和准确性 由表1可知, 加标回收率在 97%~103%, 因此可认为, 此方法测定样品中的氟准确性可靠。相对标准偏差为 4.19%, 认为此方法达到质控要求。

表1 回收率实验结果

Table 1 The result of recovery test

| 样品 Samples | 样品氟含 量 μg Fluorine content in samples | 加入 10 μg 标 样后测定值 μg Determination value after 10 μg standard added | 回收率 % Recovery rate |
|---------------|--|--|------------------------------|
| 1 | 14.4 | 24.1 | 97 |
| 2 | 15.9 | 25.7 | 98 |
| 3 | 14.6 | 24.9 | 103 |
| 4 | 15.0 | 25.2 | 102 |
| 5 | 15.9 | 25.6 | 97 |
| 6 | 14.4 | 24.5 | 101 |
| 7 | 15.2 | 25.1 | 99 |
| 8 | 14.4 | 24.6 | 102 |
| 9 | 15.5 | 25.5 | 100 |
| 10 | 14.4 | 24.5 | 101 |
| 11 | 15.9 | 25.7 | 98 |
| 12 | 15.4 | 25.6 | 102 |
| 平均值 Mean | 15.1 | | |
| 标准偏差 SD | 0.632 | | |
| 相对标准偏差 %RSD | 4.19 | | |

(上接第2328页)

- [3] 刘学敏, 常稳, 李大壮. 烟草赤星病研究现状及存在问题[J]. 东北农业大学学报, 2000, 31(1): 80-85.
- [4] STAVELY J R, MAIN C E. Influence of temperature and other factors on initiation of tobacco brown spot[J]. *Phytopathology*, 1970, 60: 1591-1596.
- [5] LUCAS G B. Disease of tobacco[M]. 3rd. [s.l.]: Ed Biol Consulting Associates, 1975: 267-296.
- [6] 陈瑞泰. 中国烟草栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [7] 宋利明. 我国赤星病发生流行规律调查研究[J]. 烟草科技, 1994(3): 40-42.
- [8] 谈文. 烟草赤星病的发生规律及综合治理[J]. 烟草科技, 1993(2): 45-48.
- [9] 谭仲夏, 杨龙祥. 烟草赤星病的生物防治研究现状及展望[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(3): 34-38.
- [10] 朱贤朝, 王彦亭, 王智发. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 64-75.
- [11] FRAVEL D R, SPURR H W. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controlled environment[J]. *Phytopathology*, 1977, 67(7): 930-932.
- [12] 杨献营. 非病原细菌对烟草赤星病菌的生物抑制作用研究[J]. 中国烟草科学, 2000(3): 47-48.
- [13] 卢海涛. 浅谈植物病害的生物防治[J]. 生物学通报, 1991(5): 8-9.
- [14] 易龙, 肖崇刚, 马冠华, 等. 防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 19-22.
- [15] 易龙, 马冠华, 杨水英, 等. 拮抗菌 At28 对烟草赤星病菌的抑制及种类鉴定[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(3): 100-103.
- [16] 方敦煌, 吴祖建, 邓云龙, 等. 防治烟草赤星病拮抗根际芽孢杆菌的筛选[J]. 植物病理学报, 2006, 36(6): 555-561.
- [17] 方敦煌, 吴祖建, 邓云龙, 等. 烟草赤星病拮抗菌株 B75 产生抗菌物质的条件[J]. 中国生物防治, 2006, 22(3): 244-247.
- [18] 罗坤, 罗宽, 朱小湘, 等. 烟叶面细菌分离筛选及其对烟草赤星病的拮抗作用[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 32(3): 245-247.

3 结论

研究表明, 可利用植物中氟含量监测氟污染, 植物监测具有样点布设不受任何条件限制, 取样容易, 方便快捷, 样品不易丢失, 可长期监测等优点。可利用绿化树种对于大气中氟污染进行综合治理。树种不同对污染物的吸收具有明显差异。该实验中三种植物的生长环境相同, 而对氟的吸收作用不同。富集能力: 榆树 > 松树 > 柳树。在城市生态环境和绿化建设中, 可结合城区大气污染物排放情况, 选用对污染物吸收净化能力强的树种, 对环境的污染治理起到重要作用。

参考文献

- [1] 贾陈忠, 秦巧燕, 侯延军, 等. 荆州大气氟污染与植物叶片含氟量监测分析[J]. 环境工程, 2004(3): 51-54.
- [2] 薛皎亮, 刘红霞, 谢映平. 城市空气中铅在国槐树体内的积累[J]. 中国环境科学, 2000, 20(6): 536-539.
- [3] 林志红, 卢云鹤, 陈军, 等. 深圳南山区大气二氧化硫和氟化物污染的植物学评价[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2002, 26(2): 147-150.
- [4] 陈渊, 谢祖芳, 罗志辉, 等. 玉林市植物叶片中氟含量的初步调查[J]. 玉林师范学院学报, 2005, 5(26): 78-82.
- [5] 赵明茜, 弓尘杰, 张桂莲, 等. 绿色植物在城市环境污染及其治理中的作用[J]. 河南农业大学学报, 2001, 35(3): 26-28.
- [6] 鲁敏, 程正渭, 李英杰. 绿化树种对大气氯、氟污染物的吸滞能力[J]. 山东工程学院学报, 2005, 20(3): 39-41.
- [7] 鲁敏, 李英杰, 鲁金鹏. 绿化树种对大气污染物吸收净化能力的研究[J]. 城市环境与城市生态, 2002(2): 7-9.
- [19] 王智文, 刘训理, 何亮, 等. Cp-S316 菌株发酵培养基的优化及其对烟草赤星病菌的抑制作用[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2): 723-728.
- [20] 方敦煌, 白江兰, 邓星燕, 等. 木霉与烟草赤星病菌对寄生效果的影响[J]. 西南农业大学学报, 2005, 27(1): 33-35.
- [21] 纪丽莲. 芦竹内生真菌 F0238 对烟草赤星病的防治作用[J]. 江苏农业科学, 2005(2): 54-56.
- [22] 何莲, 彭曙光, 杨小年, 等. 烟草赤星病菌拮抗放线菌的筛选及其对病原菌的抑制作用[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 162-163.
- [23] 白建保, 宋影, 赵秀香. 肽霉素对烟草赤星病菌的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(10): 2993-2995.
- [24] 陶刚, 刘杏忠, 王革, 等. 木霉几丁质酶对烟草赤星病菌的作用[J]. 中国生物防治, 2004, 20(4): 252-255.
- [25] 杨献营. 烟草病害防治的新途径——诱导抗病性的研究进展[J]. 中国烟草, 1998(3): 29-31.
- [26] 刘爱新, 董汉松, 梁元存, 等. 烟草几丁酶-1.3-葡聚糖酶的抑菌作用[J]. 微生物学通报, 1999, 26(1): 15-17.
- [27] 梁元存, 商明清, 刘爱新, 等. 病菌激发子诱导烟草抗赤星病的研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2000, 31(1): 8-10.
- [28] 梁元存, 刘爱新, 董汉松, 等. 烟草抗赤星诱导剂 SRS-2 的田间应用[J]. 植物保护学报, 1998, 25(3): 235-239.
- [29] 商明清, 梁元存, 刘爱新, 等. 烟草赤星病菌蛋白激发子诱导烟草抗病防卫反应[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(1): 20-23.
- [30] 易龙, 肖崇刚. 烟草赤星病防治研究进展[J]. 植物保护, 2003, 29(5): 12-14.
- [31] 吴中心. 外源 DNA 导入转移烟草抗赤星病性状的研究[J]. 河南农业大学学报, 1995, 29(1): 71-75.
- [32] 刘国胜, 刘玉乐, 李胜国, 等. 病原细菌无毒基因 avrD 介导的抗赤星病转基因烟草[J]. 植物病理学报, 1996(2): 165-170.
- [33] 方玉达, 刘大钧. 转水稻几丁质酶基因烟草植株及其对烟草赤星病 (*Aternia alternata*) 的抗性[J]. 南京农业大学学报, 2000(1): 5-9.
- [34] KAI JING ZUO, JIE QIN, JING YA, et al. Over-expression of CbERF2, transcription factor in tobacco enhances brown spots disease resistance by activating expression of downstream genes[J]. *Gene*, 2007, 391: 80-90.