进境澳大利亚大麦夹杂油菜茎基溃疡病菌的检疫鉴定

张慧丽[1,2]， 李雪莲[1,2]， 陈先锋[1,2]， 吕 燕[1]， 段维军[1,2*]

(1. 宁波检验检疫科学技术研究院，宁波 315012；2. 宁波海关，宁波 315012)

摘要 采用常规平板分离法，从进境澳大利亚大麦中夹杂的油菜籽上获得 1 株疑似油菜茎基溃疡病菌的菌株 01829。通过致病性测定、形态学观察、特异性引物扩增、ITS 序列比对分析，对 01829 进行了种类鉴定。结果表明：菌株 01829 在 PDA 培养基上生长较慢，菌落边缘不整齐，产生大量分生孢子器和分生孢子；采用特异性引物对 LMR1-D 和 Lmb 分别进行 PCR 检测，结果均有预期扩增片段产生；基于 ITS 序列构建的系统发育树中，菌株 01829 和 GenBank 中其他油菜茎基溃疡病菌相关序列聚在同一分支；菌株 01829 接种油菜子叶和茎基部，在子叶和茎基部接种部位分别引起叶斑和凹陷溃疡斑。根据上述试验结果，将菌株 01829 鉴定为油菜茎基溃疡病菌，这是我国口岸首次从进境澳大利亚大麦中截获油菜茎基溃疡病菌。

关键词 油菜茎基溃疡病菌； 形态特征； 系统发育分析； 致病性测定； 鉴定

中图分类号： S 41 - 32 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2020106

Quarantine identification of *Leptosphaeria maculans* on *Hordeum vulgare* imported from Australia

ZHANG Huili[1,2]， LI Xuelian[1,2]， CHEN Xianfeng[1,2]， LÜ Yan[1]， DUAN Weijun[1,2*]

(1. *Ningbo Academy of Inspection and Quarantine*, *Ningbo* 315012, *China*;
2. *Ningbo Customs*, *Ningbo* 315012, *China*)

Abstract The fungal strain 01829 was isolated from the oilseed rape mixed in *Hordeum vulgare* imported from Australia by using traditional tissue separation method. Morphological observation, specific PCR detection, ITS sequence analysis and pathogenicity test were carried out to identify the strain 01829. The morphological results showed that the isolate 01829 grew slowly with irregular colony edges on PDA and produced abundant pycnidia and conidia. In specific PCR tests, the primer pairs LMR1-D and Lmb amplified a positive fragment from the DNA of isolate 01829. Its ITS sequence was sequenced. Analysis of the sequence with the related sequences retrieved from GenBank showed that the strain 01829 clustered into *Leptosphaeria maculans* clade. The pathogenicity test showed that the strain 01829 could cause leaf spot of cotyledons and canker lesion of stem. Based on these results, the isolate 01829 was identified as *L. maculans*. To our knowledge, this is the first interception report of *L. maculans* mixed into *H. vulgare* imported from Australia to China.

Key words *Leptosphaeria maculans*; morphological characteristics; phylogenetic analysis; pathogenicity test; identification

油菜茎基溃疡病菌 *Leptosphaeria maculans* 于 2007 年被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》，是一种检疫性真菌。目前，在北美洲的加拿大和墨西哥，南美洲的巴西，大洋洲的澳大利亚，欧洲的英国、法国、德国等国家均有分布，但在中国、日本、韩国和俄罗斯等国家还未见发生危害的报道[1]。导致加拿大、澳大利亚和欧洲地区油菜籽产量和质量损失的主要原因就是油菜茎基溃疡病的发生，一般年份可导致产量损失 10%～20%，严重时产量损失可达 30%～50%，甚至更高[2-4]。油菜茎

收稿日期： 2020 - 03 - 05 **修订日期：** 2020 - 05 - 15
基金项目： 国家重点研发计划(2016YFF0203201)；浙江省公益技术研究项目(LGF20C140001)；海关总署科研项目(2020HK162)；中国检验检疫科学研究院基本科研业务费(2020JK048)
* 通信作者 E-mail：weijunduan@tom.com

基溃疡病菌在全世界导致的油菜每个生长季的损失超过 9 亿美元[5]。目前,我国口岸检疫部门已经从澳大利亚、乌克兰、加拿大等进境的油菜籽,新西兰进口的十字花科蔬菜种子中多次检出该病菌,病菌传入的风险不断加剧[6-10]。中国是油菜的起源地之一,油菜种植在我国已有上千年历史,是我国种植面积最大的油料作物,也是国产植物油第一大油源,第二大饲用蛋白源[11]。Fitt 等用模拟模型预测了我国南方(长江流域)油菜种植区油菜茎基溃疡病传入后 16 年的流行趋势,仅长江流域每年平均损失达 4.93 亿美元,同时还会对我国的十字花科野生植物构成重大威胁[5]。

油菜黑胫病(black leg of oilseed rape)是油菜上最严重的真菌病害之一,引起该病害的病原至少有两种:*L. maculans* 和 *L. biglobosa*。因检疫工作的需要,*L. biglobosa* 在油菜上引起的病害被称为油菜黑胫病(black leg),*L. maculans* 引起病害称为油菜茎基溃疡病(phoma stem canker)[12]。油菜茎基溃疡病病菌危害油菜茎基部,致病力强,危害重,是引起油菜产量损失的主要因素[4-5],迄今该病菌在我国未见分布。油菜黑胫病菌致病性弱,引起茎中上部发病,在我国已有发生报道[13]。这两种病菌都属于真菌界 Fungi、子囊菌门 Ascomycota、格孢腔菌目 Pleosporales、小球腔菌科 Leptosphaeriaceae、小球腔菌属 *Leptosphaeria*。目前,根据 rDNA 基因间隔序列(ITS)、*β-tubulin*(*TUB*)和 *actin*(*ACT*)序列分析[14-16],油菜茎基溃疡病菌种下包括 2 个亚种,分别是:*L. maculans* subsp. *brassicae*(寄主为芸薹属 *Brassica* 栽培植物)和 *L. maculans* subsp. *lepidii*(寄主为独行菜属 *Lepidium* 植物)。油菜黑胫病菌种下包括 6 个亚种,分别是:*L. biglobosa* subsp. *brassicae*、*L. biglobosa* subsp. *thlaspii*、*L. biglobosa* subsp. *erysimii*、*L. biglobosa* subsp. *canadensis*、*L. biglobosa* subsp. *australiensis* 和 *L. biglobosa* subsp. *occiaustralensis*。

油菜茎基溃疡病菌的形态特征受环境、培养基和外部条件影响,变化极大。仅用形态学特征无法鉴定油菜茎基溃疡病菌。由于油菜茎基溃疡病在全球贸易中的重要性,快速、简便地检测油菜茎基溃疡病的发生和发展对控制该病的传播和保证油菜籽的品质至关重要。Mahuku 等[17]根据 ITS 序列设计特异引物 HV17S/HV26C,对安大略湖油菜田块油菜茎基溃疡病菌分布进行了调查[18];Liu 等[19]基于 ITS 序列设计特异性引物,通过产物片段大小来区分 *L. maculans* 和 *L. biglobosa*。周国梁等[6]、易建平等[7]和陈青等[10]采用特异性引物扩增[19]结合 ITS 基因序列分析分别从澳大利亚进口的油菜籽、新西兰的青菜种子中成功检测到油菜茎基溃疡病菌。Fernando 等[20]采用 Liu 等[19]设计的异性引物对加拿大油菜种子和油菜籽黑胫病的感染水平进行了评估。周国梁等[21]根据 ITS 区序列设计了 TaqMan MGB 探针,建立了该病菌的实时荧光 PCR 检测方法。Song 等[22]根据 ITS 序列设计了 2 对引物,建立了油菜茎基溃疡病菌巢式 PCR 检测方法。周圆等[23]根据 ITS 序列差异,建立了油菜茎基溃疡病菌环介导等温扩增—横向流动试纸快速检测方法。上述检测技术均是建立在 ITS 序列分析基础之上,表明 ITS 序列能够有效鉴定划分油菜茎基溃疡病菌。

2019 年 3 月,宁波口岸从一批进境的澳大利亚大麦中发现夹杂有大量油菜籽,挑选形态异常的油菜籽进行分离培养后,获得 1 株疑似油菜茎基溃疡病菌的分离物,对其进行了致病性测定、形态学观察、基因序列比对分析研究,以期在准确鉴定该分离物种类的基础上,对其危害进行评估,为口岸检疫鉴定、后续疫情防控及相关研究工作奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试样品

供试油菜籽为 2019 年 3 月进境澳大利亚大麦中夹杂的油菜籽。致病性测定用的油菜籽为市售油菜种子。

1.2　培养基及主要试剂

马铃薯葡萄糖琼脂培养基,含有氯霉素 100 μg/mL,杭州微生物试剂有限公司,用于病菌分离、纯化和保存。

TANBead Plant DNA Auto Kit,台湾 TANBead 公司;2×*Taq* MasterMix,北京康为世纪生物科技有限公司;100 bp DNA Marker,宝生物工程(大连)有限公司;其他试剂均为分析纯;引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.3　仪器

BX-51 型生物显微镜,日本 Olympus 公司;Axio Imager Z1 型显微镜数码成像系统、Discovery V12

型解剖镜及其成像系统，德国 Zeiss 公司；Friocell 222 型培养箱，德国 MMM 公司；Kingfisher mL 核酸自动化提取仪、Multiskan GO 生物分光光度计，美国 Thermo Scientific 公司；TProfessional Basic 型 PCR 仪，德国 Biometra 公司；PowerPac Basic 型电泳设备和 GelDocEQ 型凝胶成像系统，美国伯乐生命医学产品有限公司。

1.4 病原菌的分离与纯化

从大麦中挑选畸形、变色等外观不正常的油菜籽，采用常规真菌分离方法对油菜籽进行病原菌分离[24]。1%次氯酸钠表面消毒 3 min，无菌水漂洗 3 次，在灭菌滤纸上吸干水分后，置于 PDA 平板培养基上，每皿放 10 粒，25℃黑暗培养，待长出菌落后，挑取边缘菌丝进行纯化，纯化后菌株编号为 01829。

1.5 分离病原菌菌株的致病性测定

选取健康的油菜籽播种于育苗盘中，置于温度 25℃左右、日光条件下育苗间培养。分别在长出 2 片子叶和真叶后采用针刺法[24]进行菌株 01829 的致病性测定。用 70%乙醇擦拭子叶和茎基部进行表面消毒后，用经酒精灯烧过冷却后的 0 号昆虫针点刺子叶和茎基部，取 PDA 培养基上培养 6 d 的菌落，用直径 5 mm 打孔器在菌落边缘打取菌饼，将菌饼有菌丝面放置在刺伤处，上覆蘸有无菌水的灭菌脱脂棉保湿，接种后置于塑料收纳箱内并扣上盖，25℃室温条件下培养。以接种无菌 PDA 为对照，每处理 3 次重复。接种后每天观察并记录发病情况。

1.6 分离病原菌菌株的形态观察

将纯化的菌株 01829 接种于直径 9 cm 的 PDA 平板培养基上，25℃黑暗培养 14 d 后，观察记录其菌落形态特征。将 PDA 平板上的供试菌，在解剖镜下观察分生孢子器，挑取分生孢子器制片后在显微镜下观察分生孢子器和分生孢子的形态特征，并对其大小进行测量。

1.7 分离病原菌菌株的分子生物学研究

1.7.1 基因组 DNA 提取

用灭菌枪头刮取在 PDA 平板培养基上培养 10 d 的 01829 菌丝体，用 TANBead Plant DNA Auto Kit 在 KingFisher mL 核酸自动化提取仪上提取病原菌总 DNA。提取后 DNA 经分光光度计测定浓度后，保存于－20℃冰箱备用。

1.7.2 特异性引物 PCR 检测

参照出入境检验检疫行业标准 SN/T 3685-2013《油菜茎基溃疡病菌检疫鉴定方法》[25]中的 PCR 方法，采用特异性引物 LMR1-D(5′-GCGTAAGAAGCGTGCCTTAGAGTC-3′/5′-TCCTGCTCCTACTCCTTCTCTAGC-3′)[26]和 Lmb(5′-CACCAATTGGATCCCCTA-3′/5′-AGGCGAGTCCCAAGTGGAACA-3′)[27]，对菌株 01829 的总 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测后，用凝胶成像系统观察电泳结果。

1.7.3 序列扩增和测序

采用 ITS 通用引物 ITS1/ITS4 对菌株 01829 总 DNA 进行 PCR 扩增[28]，扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测后，产物送上海华大基因科技有限公司进行双向测序。

1.7.4 序列分析

测得的 ITS 序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对分析，确认序列的可靠性。使用 MEGA 6.0 软件对测得的 ITS 序列与 GenBank 中下载的油菜茎基溃疡病菌及其近似种的 ITS 序列进行比对，以 GenBank 上下载的草茎点霉 *Phoma herbarum* 的相关序列为外群，采用邻接法(neighbor-joining，NJ)构建系统进化发育树，进行 1 000 次重抽样计算系统树中节点的置信度。

2 结果与分析

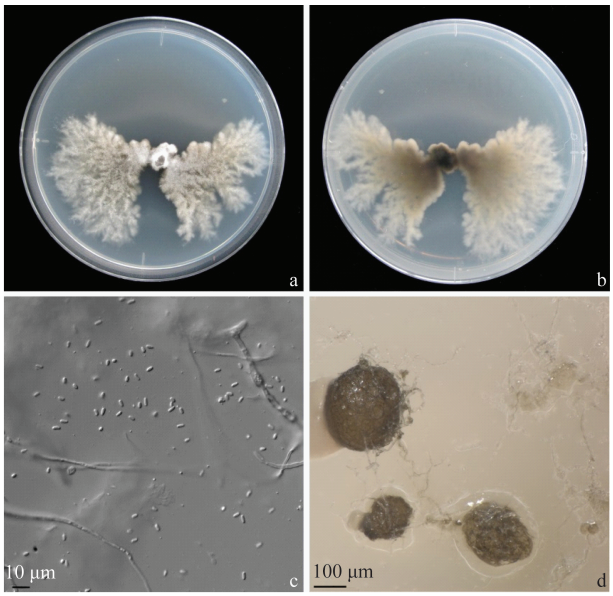
2.1 菌株 01829 的菌落性状和形态特征

菌落生长速度较慢，边缘不整齐，菌丝呈白色放射状，多而致密，分枝较多，有分隔(图 1a～b)。分生孢子器褐色至深褐色，球形至扁球形(图 1d)，散生、埋生或半埋生于菌丝中，直径 133～334 μm，挤压后释放大量分生孢子。分生孢子无色透明，椭圆形或纺锤形，两端各见 1 油球，大小(1.6～6.8)μm×(0.9～2.1)μm(图 1c)。*L. biglobosa* 在 PDA 培养基上产生黄色色素，菌丝白或微黄；而 *L. maculans* 在 PDA 培养基上无色素产生，菌丝白色，分枝较多；结合孢子大小和文献报道[1,6-10,25]，初步判断菌株 01829 疑似 *L. maculans*。

2.2 菌株 01829 致病性测定结果

油菜子叶接种 01829 菌株 2 d 后开始发病，接种点附近出现圆形枯死斑，浅褐色，稍凹陷。对照没有产生上述症状(图 2a)。油菜茎基部接种 01829 菌株 4 d 后在接种点附近出现褐色病斑，病斑不断扩大，在茎基部形成凹陷的溃疡斑(图 2b)。对照没有产生上

述症状(图 2c)。经再次分离培养和 ITS 序列测定,获得了与 01829 形态和 ITS 序列一致的菌株。



a: 01829菌落形态(正面); b: 01829菌落形态(反面); c: 分生孢子; d: 分生孢子器
a: Colony of strain 01829 (front); b: Colony of strain 01829 (reverse); c: Conidia; d: Pycnidia

图 1　菌株 01829 在 PDA 培养基上形态特征

Fig. 1　The morphological characterization of the strain 01829 on PDA medium

a: 01829接种子叶症状; b: 01829接种茎基部症状; c: 对照
a: Symptoms of cotyledon inoculated with 01829; b: Symptoms of stem base inoculated with 01829; c: Control

图 2　菌株 01829 接种油菜子叶和茎基部症状

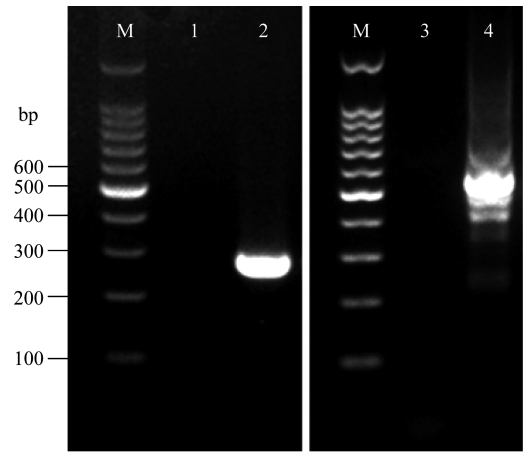
Fig. 2　Symptoms of rape cotyledon and stem base infected by strain 01829

2.3　菌株 01829 的特异性引物 PCR 检测

用油菜茎基溃疡病菌特异性引物对 Lmb 对分离物 01829 的 DNA 进行 PCR 检测,结果扩增得到了约为 270 bp 的预期扩增产物,无非特异性条带(图 3)。特异性引物对 LMR1-D 扩增得到了约为 580 bp 的预期扩增产物,但有明显的非特异性条带,这与王振华等的结果有所不同[8-9]。

2.4　菌株 01829 ITS 序列分析

经引物 ITS1/ITS4 扩增后获得长度为 511 bp 的 ITS 片段,GenBank 序列登录号为 MT138669。在 GenBank 中对该序列进行 BLAST 搜索和比对分析,发现该序列与油菜茎基溃疡病菌(GenBank 登录号:DQ458907)ITS 序列的相似性为 99.61%;与 6 个 *L. maculans* subsp. *brassicae* 的 ITS 序列相似性为 99.14%～99.36%;与 1 个 *L. maculans* subsp. *lepidii* 的 ITS 序列相似性为 94.91%。进一步通过 ITS 系统发育分析发现菌株 01829 的 ITS 序列与 *L. maculans* subsp. *brassicae* 的相关序列聚在同一个分支上(bootstrap 值为 99),而 *L. maculans* subsp. *lepidii* 则位于另一个分支(图 4)。序列分析及系统发育分析表明菌株 01829 为 *L. maculans* subsp. *brassicae*。



M: 100 bp DNA Marker; 1、3:空白对照(水); 2、4: 01829
M: 100 bp DNA Marker; 1,3: ddH_2O; 2,4: 01829

图 3　特异性引物 Lmb(左)和 LMR1-D(右)对菌株 01829 的 PCR 检测结果

Fig. 3　PCR detection of strain 01829 with primers Lmb (left) and LMR1-D (right)

3　讨论

油菜茎基溃疡病菌无性态为 *Phoma lingam*,其典型形态特征为产生近球形分生孢子器和分生孢子。本研究中发现,该病菌只有在早期分离培养时,可以在培养基上产生分生孢子器,后期多次转代后则难以产生。油菜茎基溃疡病菌检测技术有分离培养法和 PCR 方法,PCR 以其快速、准确和灵敏的特点受到广泛应用。Taylor 等[26]根据一段重复序列 LMR1(5 238 bp)设计特异引物 LMR1-D,建立了检测油菜茎基溃疡病菌的 PCR 方法,王振华等[8-9]利用该方法从加拿大进口油菜籽中检测到油菜茎基溃疡病菌,但是在本研究中,特异性引物对 LMR1-D 的扩增产物有明显的非特异性条带,通过调整退火温度也未能消除。本研究采用了口岸日常检测工作中使用的行业标准 SN/T 3685-2013 中提供的 2 对

特异性引物对检测样品进行 PCR 检测。结果表明，引物对 Lmb 扩增特异性优于引物对 LMR1-D，这一结果为口岸检测人员提供了参考。从基于 ITS 序列构建的系统发育树上可以看出，*L. maculans* subsp. *brassicae* 和 *L. maculans* subsp. *lepidii* 各成一个分支，01829 与多个不同地理来源（荷兰、加拿大、英国、美国、澳大利亚）的 *L. maculans* subsp. *brassicae* 位于同一个分支中，且与多个来自澳大利亚的分离物聚在同一个分支，这与 01829 来自澳大利亚是一致的。本研究获得分离物为 *L. maculans* subsp. *brassicae*。除油菜茎基溃疡病菌外，我们也从该批大麦夹杂油菜种子上检出了油菜黑胫病菌 *L. biglobosa*，据文献报道这两种病菌在澳大利亚均有分布[12]。为提高检测工作针对性，实际检测工作中可采用 PCR 方法对油菜籽进行初筛，在此基础上再进行分离培养和鉴定工作。

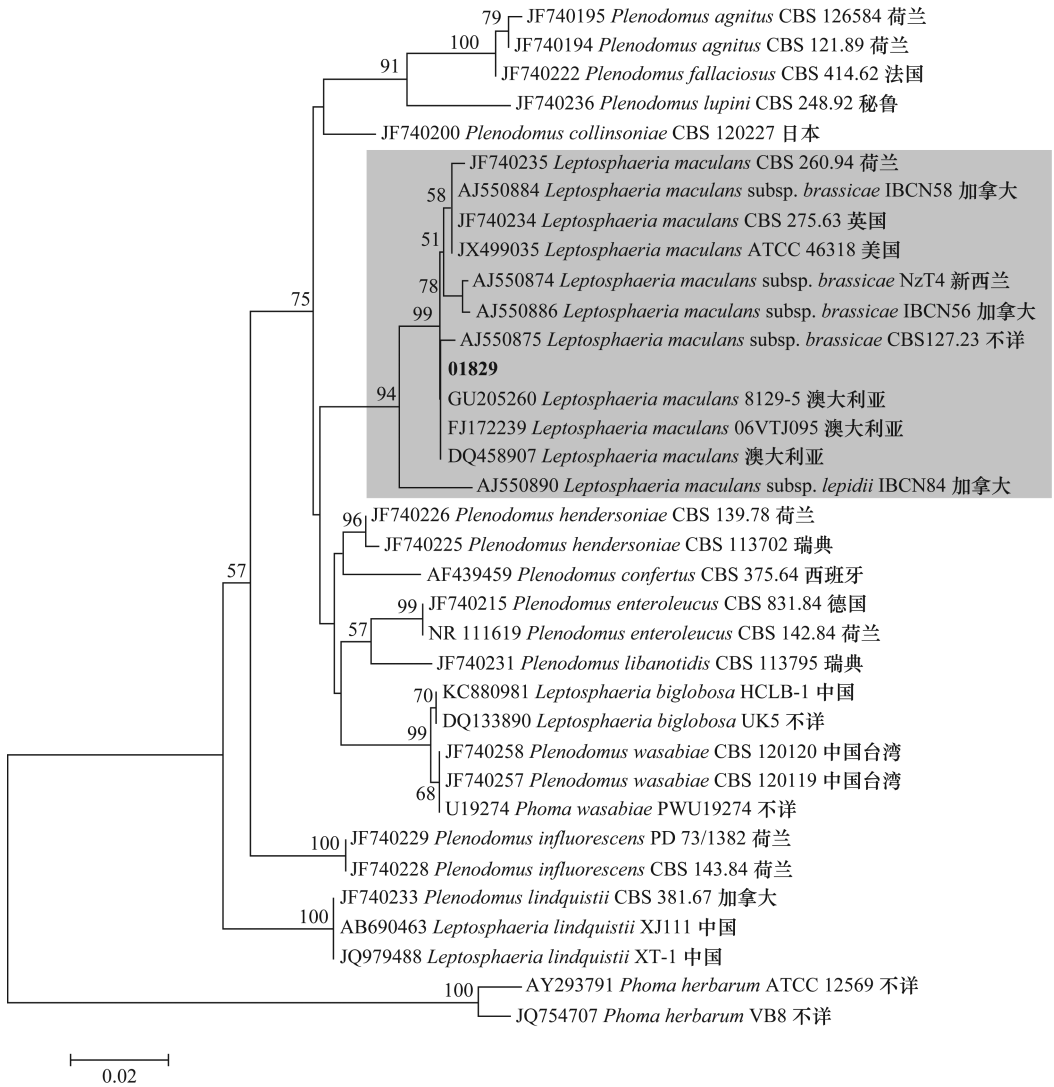


图 4　基于 ITS 序列邻接法构建油菜茎基溃疡病菌 01829 菌株及相关种类的系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree of strain 01829 and other related strains based on ITS sequences by using neighbor-joining method

澳大利亚农业生产是雨养农业，无灌溉设施，作物单产变幅较大，作物轮作模式的研究是澳大利亚农业研究的主要内容[29]。油菜对谷类作物根系病害以及单子叶杂草等有明显的控制效果，是轮作系统中的理想“中断作物”。因此，澳大利亚在同一田块上每 4 年以上种 1 次油菜。轮作顺序依次是：豆科牧草——阔叶作物（油菜）——谷类作物（小麦）——阔叶作物（羽扇豆、豌豆等）——谷类作物（大麦）[30]。正是由于生产上集中连片种植和全程机械化，导致油菜籽可能夹杂在澳大利亚出口的各种轮作作物中。据段维军等[31]统计，自从 2009 年 11 月上海和江苏口岸首次截获该病菌以来，截止

2016 年,全国口岸共截获该病菌 626 次。来源国包括:加拿大、澳大利亚、法国、日本、瑞典、荷兰、美国、乌克兰。货物种类包括:油菜籽、小麦、豌豆、大豆、青菜种子、甘蓝种子等。说明携带这种检疫性病菌的油菜籽通过夹杂在其他作物中进行传播的可能性较高。带菌种子是该病害远距离传播的主要方式,据 Hall 等[32]和汪国平等[33]的研究,种植油菜种子携带油菜茎基溃疡病菌的频率平均为 0.5%～0.6%,尽管在种植当年损失不足 1%～2%,但不断积累的菌源将对油菜生产构成巨大威胁。因此,在日常检疫中对夹杂的油菜籽必须加以重视。

以往口岸检疫研究多针对进口货物本身,对其中夹杂物的研究较少。但是,进境货物夹杂物中携带多种病菌的可能性很大。近年来,口岸部门已多次从进境大宗粮油货物夹杂物中截获多种检疫性真菌,如:自乌克兰玉米夹杂的向日葵种子中截获向日葵茎溃疡病菌 *Diaporthe helianthi*[34];自法国大麦夹杂的向日葵种子中截获大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*[35];自美国大豆夹杂的向日葵种子中截获向日葵茎溃疡病菌[36]和向日葵黑茎病菌 *Plenodomus lindquistii*[37]等。这些截获表明:进境大宗粮油货物夹杂物中携带检疫性真菌可能性较高,口岸检疫部门应予以高度关注,加强防范,以防检疫性病原通过这种方式跨境传播。

参考文献

[1] FITT B D L, BRUN H, BARBETTI M J, et al. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. European Journal of Plant Pathology, 2006, 114(1): 3-15.

[2] WEST J S, KHARBANDA P D, BARBETTI M J, et al. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe [J]. Plant Pathology, 2001, 50(1): 10-27.

[3] HALL R, PETERS R D, ASSABGUI R A. Occurrence and impact of blackleg on oilseed rape in Ontario [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1993, 15(4): 305-313.

[4] ZHOU Yilin, FITT B D L, WELHAM S J, et al. Effects of severity and timing of stem canker (*Leptosphaeria maculans*) symptoms on yield of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK [J]. European Journal of Plant Pathology, 1999, 105(7): 715-728.

[5] FITT B D L, HU B C, LI Z Q, et al. Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits [J]. Plant Pathology, 2008, 57(4): 652-664.

[6] 周国梁, 尚琳琳, 于翠, 等. 进境油菜籽中黑胫病菌和茎基溃疡病菌的检测[J]. 植物保护学报, 2010, 37(4): 289-294.

[7] 易建平, 周国梁, 印丽萍, 等. 进境澳大利亚油菜籽中茎基溃疡病菌的检测[J]. 植物病理学报, 2010,40(6): 70-73.

[8] 王振华,赵晖,宋祺,等. 加拿大进境油菜籽加工过程中油菜茎基溃疡病菌的检测与鉴定[J]. 植物检疫,2010,24(6):25-26.

[9] 王振华, 杨武, 赵晖, 等. 加拿大进境油菜籽茎基溃疡病菌的检测与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(1): 66-69.

[10] 陈青, 黄峰, 廖富荣, 等. 进境青菜种子携带油菜茎基溃疡病菌的检测与鉴定[J]. 植物检疫, 2013, 27(4): 62-64.

[11] 刘成, 冯中朝, 肖唐华, 等. 我国油菜产业发展现状、潜力及对策[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(4): 485-489.

[12] 杨龙, 吴明德, 张静, 等. 油菜黑胫病研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(5): 730-736.

[13] CAI Xiang, HUANG Yongju, JIANG Daohong, et al. Evaluation of oilseed rape seed yield losses caused by *Leptosphaeria biglobosa* in central China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2018, 150(1): 179-190.

[14] MENDES-PEREIRA E, BALESDENT M H, BRUN H, et al. Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans-L. biglobosa* species complex [J]. Mycological Research, 2003, 107(11): 1287-1304.

[15] VOIGT K, COZIJNSEN A J, KROYMANN J, et al. Phylogenetic relationships between members of the crucifer pathogenic *Leptosphaeria maculans* species complex as shown by mating type (MAT1-2), actin, and *beta*-tubulin sequences [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2005, 37(2): 541-557.

[16] VINCENOT L, BALESDENT M H, LI Hua, et al. Occurrence of a new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* in Western Australia [J]. Phytopathology, 2008, 98(3): 321-329.

[17] MAHUKU G S, GOODWIN P H, HALL R. A Competitive polymerase chain reaction to quantify DNA of *Leptosphaeria maculans* during blackleg development in oilseed rape [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995, 8(5): 761-767.

[18] MAHUKU G S, HALL R, GOODWIN P H. Distribution of *Leptosphaeria maculans* in two fields in southern Ontario as determined by the polymerase chain reaction [J]. European Journal of Plant Pathology, 1996, 102(6): 569-576.

[19] LIU Shengyi, LIU Zhuangyi, FITT B D L, et al. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments [J]. Plant Pathology, 2006, 55(3): 401-412.

[20] FERNANDO W, ZHANG Xuehua, CHAMI A. Detection of *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa* causing blackleg disease in canola from Canadian canola seed lots and dockage [J/OL]. Plants, 2016, 5(1): 12. DOI: 10.3390/plants5010012.

[21] 周国梁, 尚琳琳, 林泓, 等. 油菜茎基溃疡病菌的实时荧光 PCR 检测[J]. 植物病理学报, 2011,40(1): 12-19.

[22] SONG Peiling, JEDRYCZKA M, IRZYKOWSKI W, et al. Efficient detection of *Leptosphaeria maculans* from infected seed lots of oilseed rape [J]. Journal of Phytopathology, 2016, 164(11/12): 1097 - 1104.

[23] 周圆，黄海龙，李孝军，等. 油菜茎基溃疡病菌 LAMP-LFD 检测方法的建立[J]. 植物检疫，2016，30(4)：32 - 37.

[24] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京：中国农业出版社，1998.

[25] 国家认证认可监督管理委员会. 油菜茎基溃疡病菌检疫鉴定方法：SN/T 3685 - 2013[S]. 北京：中国标准出版社，2014.

[26] TAYLOR J L. A simple, sensitive, and rapid method for detecting seed contaminated with highly virulent *Leptosphaeria maculans* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(11): 3681 - 3685.

[27] 易建平，尚琳琳，周国梁. 油菜茎基溃疡病菌的 PCR 检测方法及检测用引物：201010142440.2[P]. 2012 - 04 - 18.

[28] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR Protocols: A guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press, 1990: 315 - 3226.

[29] 李厚忠，田新初，贾振业，等. 澳大利亚的油菜[J]. 世界农业，2001，265(5)：31 - 33.

[30] 邱泽森，李旭. 澳大利亚的油菜生产[J]. 作物杂志，2001，17(2)：16 - 19.

[31] 段维军，严进，蔡磊，等. 我国进境植物检疫性菌物截获现状与展望[J]. 菌物学报，2017，36(10)：1311 - 1331.

[32] HALL R, CHIGOGORA J L, PHILLIPS L G. Role of seed-borne inoculum of *Leptosphaeria maculans* in development of blackleg on oilseed rape [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1996, 18(1): 35 - 42.

[33] 汪国平，胡开林，JEDRYCZKA M. 波兰、英国油菜种子样本的健康测试及黑胫病病原菌感染分析[J]. 华南农业大学学报，2003，24(4)：28 - 31.

[34] 段维军，段丽君，陈先锋，等. 进境乌克兰玉米中夹杂向日葵间座壳菌的鉴定[J]. 菌物学报，2016，35(12)：1503 - 1513.

[35] 段维军，段丽君，郭立新，等. 进境法国大麦中夹杂向日葵种子内大丽轮枝菌的种类鉴定[J]. 植物保护学报，2018，45(6)：1429 - 1430.

[36] 李雪莲，段维军. 进境美国大豆夹杂向日葵茎溃疡病菌的检疫鉴定[J]. 中国油料作物学报，2020，42(2)：292 - 297.

[37] 李雪莲，张慧丽，段丽君，等. 进境美国大豆夹杂向日葵黑茎病菌的检疫鉴定[J]. 植物保护学报，2020，47(3)：685 - 686.

（责任编辑：杨明丽）

（上接 51 页）

[12] SPALDING D H. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases [J]. Plant Disease, 1982, 66(1): 1185.

[13] 陈聃，时浩杰，吴慧明，等. 浙江省葡萄炭疽菌对甲基硫菌灵和戊唑醇的抗药性研究[J]. 果树学报，2013，30(4)：665 - 668.

[14] MOREIRA R R, NESI C N, LARISSA M D M L. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control *Glomerella* leaf spot [J]. Biological Control, 2014, 72: 30 - 37.

[15] 张颖，李保华，李桂舫，等. 外源水杨酸诱导苹果对炭疽叶枯病的抗性研究[C]//吴学宏. 植物病理学研究进展—中国植物病理学会第十二届青年学术研讨会论文选编. 北京：中国农业大学出版社，2015.

[16] 朱学明，史祥鹏，雍道敬，等. 内生放线菌 A-1 诱导苹果对炭疽叶枯病的抗性[J]. 植物生理学报，2015，51(6)：949 - 954.

[17] 侯宝宏，徐秉良，郇町，等. 抗苹果树腐烂病解淀粉芽孢杆菌 TS-1203 的抑菌活性物质稳定性及抑菌谱测定[J]. 甘肃农业大学学报，2017，52(1)：80 - 86.

[18] 吴良庆，朱立武，衡伟，等. 砀山梨炭疽病病原鉴定及其抑菌药剂筛选[J]. 中国农业科学，2010，43(18)：3750 - 3758.

[19] 程智慧，张坤，王辉，等. 大蒜鳞茎粗提液对黄瓜霜霉病的防治效果[J]. 北方园艺，2010(11)：175 - 178.

[20] 张纪忠，黄静娟. 微生物分类学[M]. 上海：复旦大学出版社，1990.

[21] 邓建良，刘红彦，刘玉霞，等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报，2010，40(2)：202 - 209.

[22] CHEN Xiaohua, KOUNOUTSI A, SOHLZ R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant grow the promoting bacterium *Bacillus aylolique faciens* FZB 42 [J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(9): 1007 - 1014.

[23] 王英国，王军华，权春善，等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志，2007，27(12)：41 - 45.

[24] 陈成，崔堂兵，于平儒. 一株抗真菌的解淀粉芽孢杆菌的鉴定及其抗菌性研究[J]. 现代食品科技，2011，27(1)：36 - 39.

[25] 陈士云，杨宝玉，高梅影，等. 一株抑制油菜核盘菌菌核形成的解淀粉芽孢杆菌[J]. 应用与环境生物学报，2005，11(3)：373 - 376.

[26] 陈楠楠，秦平伟，尹珺伊，等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌机制研究进展[J]. 中国微生态学杂志，2018，30(12)：1464 - 1469.

[27] 刘超，刘洪伟，汪步青，等. 解淀粉芽孢杆菌 BA-26 抗菌物质分离及对灰葡萄孢抑菌作用研究[J]. 生物技术通报，2019，35(7)：83 - 89.

[28] 李扬，张朝红，于秋香，等. 解淀粉芽孢杆菌 ZJ01 对枣黑斑病菌的抑制作用[J]. 河北农业科学，2018，22(4)：46 - 48.

[29] 纪兆林，凌筝，张清霞，等. 地衣芽孢杆菌对苹果轮纹病菌和炭疽病菌的抑制及其对贮藏期苹果轮纹病的防治作用[J]. 果树学报，2008，25(2)：69 - 74.

（责任编辑：杨明丽）