

韩 凤, 黄 靖, 章文伟, 等. 多花黄精白绢病病原菌鉴定及室内药剂筛选[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12): 2244-2253.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.007

多花黄精白绢病病原菌鉴定及室内药剂筛选

韩 凤¹, 黄 靖², 章文伟¹, 林茂祥¹, 肖 忠¹, 宋旭红²

(1. 重庆市药物种植研究所/重庆市道地药材规范化生产工程技术研究中心, 重庆 408435; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要: 为明确多花黄精白绢病病原菌的种类及生物学特性, 筛选适宜的杀菌剂, 本研究从重庆市南川区采集多花黄精白绢病病株, 采用菌核分离法, 分离纯化得到多花黄精白绢病病原菌菌株 BJB, 依据柯赫氏法则验证其致病性, 通过形态学及分子生物学鉴定病原菌种类, 通过生物学试验明确病原菌的适宜生长条件, 并通过室内药效试验筛选适宜杀菌剂。结果表明, 本研究分离纯化得到的白绢病病原菌菌株 BJB 为罗耳阿太菌(*Athelia rolfsii*)。多花黄精白绢病病原菌的适宜生长条件为马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA), 温度 25 ℃, pH 值 4, 碳源蔗糖, 氮源硝酸钠, 暗培养。多花黄精白绢病病原菌菌丝和菌核的致死温度分别为 45 ℃ 和 55 ℃。杀菌剂戊唑醇对多花黄精白绢病病原菌的抑制效果最好, 半抑制浓度(EC_{50}) 为 0.420 $\mu\text{g/mL}$; 咯菌腈、萎锈灵和啮菌酯的抑制效果其次, EC_{50} 分别为 1.750 $\mu\text{g/mL}$ 、1.991 $\mu\text{g/mL}$ 和 2.940 $\mu\text{g/mL}$ 。本研究结果为多花黄精白绢病病害的诊断与防治提供依据。

关键词: 多花黄精; 白绢病; 病原菌; 罗耳阿太菌

中图分类号: S435.672 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)12-2244-10

Pathogen identification and indoor fungicide screening of southern blight of *Polygonatum cyrtonema*

HAN Feng¹, HUANG Jing², ZHANG Wenwei¹, LIN Maoxiang¹, XIAO Zhong¹, SONG Xuhong²

(1. Chongqing Institute of Medical Plant Cultivation/Chongqing Engineering Research Center for Standardized Production of Genuine Medicinal Materials, Chongqing 408435, China; 2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

Abstract: In order to clarify the species and biological characteristics of the pathogen of southern blight of *Polygonatum cyrtonema* and screen suitable fungicides, the diseased plants of *Polygonatum cyrtonema* were collected from Nanchuan District of Chongqing City, and the pathogen strain BJB of *Polygonatum cyrtonema* was isolated and purified by sclerotia separation method. The pathogenicity was verified according to Koch's rule. The species of pathogenic bacteria were identified by morphology and molecular biology. The suitable growth conditions of pathogenic bacteria were determined by biological test, and the suitable fungicides were screened by indoor efficacy test. The results showed that the strain BJB isolated and purified in this study was *Athelia rolfsii*. The suitable growth conditions of the pathogen were as follows: potato sucrose agar (PSA) medium, temperature 25 ℃, pH 4, sucrose as carbon source, sodium nitrate as nitrogen source, and dark

culture. The lethal temperature of mycelium and sclerotium of the pathogen was 45 ℃ and 55 ℃, respectively. The fungicide tebuconazole showed the best inhibitory effect against the pathogen, and the median effective concentration (EC_{50}) was 0.420 $\mu\text{g/mL}$. The EC_{50} values for fludioxonil, triadimefon and azoxystrobin were 1.750 $\mu\text{g/mL}$, 1.991 $\mu\text{g/mL}$ and 2.940 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results of this study provide a basis for the diagnosis and preven-

收稿日期: 2024-03-16

基金项目: 重庆市基本科研业务专项(2023JK70-2512); 重庆市技术创新与应用发展专项重点项目(CSTB2024TIAD-KPX0049); 重庆市科卫联合中医药科研项目(2019zy023281); 重庆市卫生健康委员会中医药科技项目(zy201702147)

作者简介: 韩 凤(1980-), 女, 重庆人, 本科, 正高级农艺师, 主要从事药用植物栽培研究。(E-mail) hanfengasdf@126.com

通讯作者: 宋旭红, (E-mail) songxuhong@cqacmm.com

tion of southern blight disease of *Polygonatum cyrtonema*.

Key words: *Polygonatum cyrtonema*; southern blight; pathogen; *Athelia rolfsii*

多花黄精 (*Polygonatum cyrtonema* Hua) 又名老虎姜、山姜、仙人余粮, 是一种多年生草本植物。多花黄精根茎富含糖类、酚类、黄酮类、皂苷类和氨基酸等活性成分及矿质元素, 是正品中药材黄精的来源之一^[1-2], 具有抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤、消炎、抗衰老、降血糖和调节免疫等药理作用^[3-4]。多花黄精生产中常见的病害主要有根腐病^[5-6]、炭疽病^[7]、茎腐病^[8]、叶枯病^[9]和白绢病^[10]等。受栽培制度及气候变化的影响, 重庆地区的多花黄精生产中白绢病的危害呈多发、加重趋势, 严重影响当地多花黄精药材的品质和产量。多花黄精白绢病是一种传染性极强的真菌性病害。田间调查发现, 重庆地区一般地块发病率为 5%~12%, 而地势低洼、排水不良的酸性地块发病率可高达 30% 以上。每年 5-7 月为重庆地区多花黄精白绢病的高发期。

引起植物白绢病的病原菌主要是小菌核属 (*Sclerotium*) 病原菌, 包括有性型罗耳阿太菌 (*Athelia rolfsii*) 和无性型齐整小核菌 (*Sclerotium rolfsii* Sacc.)^[11-17]。鉴于多花黄精白绢病病原菌的鉴定分类和高效防治杀菌剂筛选缺乏研究的现状, 本研究通过采集具有典型白绢病症状的多花黄精植株, 进行病原菌分离及其致病性检测, 结合病原菌形态特征和内转录间隔区 (ITS) 碱基序列以及 *SSU*、*LSU* 基因碱基序列分析, 鉴定多花黄精白绢病病原菌种类, 并通过不同培养基、pH、碳源、氮源、光照、温度对病原菌生长的影响试验, 明确多花黄精白绢病病原菌的生物学特性, 并测定不同杀菌剂对该病原菌的抑制效果, 以期多花黄精白绢病的诊断和科学防治

提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 培养基及其配制 马铃薯蔗糖琼脂培养基 (PSA) 由蔗糖 20 g、马铃薯 200 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL 配制得到; 燕麦琼脂培养基 (OA) 由燕麦 60 g、琼脂 18 g、水 1 000 mL 配制得到; 水琼脂培养基 (WA) 由琼脂 20 g、水 1 000 mL 配制得到; 沙氏琼脂培养基 (SDA) 由蛋白胨 10 g、葡萄糖 40 g、琼脂 15 g、水 1 000 mL 配制得到; 玉米琼脂培养基 (CMA) 由玉米粉 30 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL 配制得到; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 由葡萄糖 20 g、马铃薯 200 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL 配制得到; 察氏琼脂培养基 (Czapek) 由硝酸钠 3.00 g、磷酸氢二钾 1.00 g、硫酸镁 0.50 g、氯化钾 0.50 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30.00 g、琼脂 15.00 g、水 1 000 mL 配制得到。

1.1.2 不同浓度药剂的制备 供试药剂包括 98% 萎锈灵 (湖北津乐达化工有限公司产品)、96% 嘧菌酯 (湖北康宝泰精细化工有限公司产品)、98% 咯菌腈 (瑞士先正达作物保护有限公司产品)、97% 戊唑醇 (郑州凯瑞农化产品有限公司产品)、96% 异菌脲 (江苏辉丰农化股份有限公司产品) 和 98% 啶酰菌胺 (德国巴斯夫欧洲公司产品) 6 种。萎锈灵原药用甲醇溶解, 其余 5 种原药均用丙酮溶解, 配置成质量浓度为 1 000 mg/L 的母液, 于 4 ℃ 保存备用。为测定 6 种药剂室内毒力, 对 6 种原药进行稀释, 稀释后各药剂的质量浓度见表 1。

表 1 防效试验杀菌剂浓度
Table 1 Concentrations of fungicides used in efficacy tests

药剂	质量浓度 (μg/mL)
萎锈灵	18.000 00、9.000 00、4.500 00、2.250 00、1.125 00、0.562 50、0.281 25
嘧菌酯	1 000.000 00、125.000 00、15.625 00、1.953 00、0.244 00、0.030 50、0.003 80
咯菌腈	46.700 00、23.350 00、11.675 00、5.837 00、2.918 00、1.459 00、0.729 00
戊唑醇	1 000.000 00、125.000 00、15.625 00、1.953 00、0.244 00、0.030 50、0.004 00
异菌脲	180.000 00、120.000 00、80.000 00、53.300 00、35.600 00、23.600 00、15.800 00
啶酰菌胺	1 000.000 00、500.000 00、250.000 00、125.000 00、62.500 00、31.250 00、15.625 00

1.2 方法

1.2.1 病株样品采集与病原菌分离 2020 年 6 月于重庆市南川区三泉镇 (29° 08′ 23. 36″ N, 107° 13′ 6.55″ E) 采集患有白绢病的多花黄精植株, 参照王雅等^[18]方法进行病原菌分离。用无菌水冲洗病株根茎 4~5 次, 吸干表面水分, 将洗净的病株根茎切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 放入带有无菌滤纸的培养皿中, 加入适量无菌水保湿, 室温培养产生菌核。收集菌核并用 75% 乙醇消毒 20~30 s, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 2~4 min, 最后用无菌水冲洗 5 次。将冲洗后的菌核放在无菌纸上吸干表面水分, 接入盛有 PDA 培养基的培养皿中央, 在 25℃ 条件下暗培养, 待菌核萌发产生菌丝后, 挑取边缘菌丝, 再接种到 PDA 培养基上进行纯化培养, 得到纯化病原菌株。

1.2.2 病原菌致病性测定 选取 3 年生、长势一致的健康多花黄精种苗, 参考刘雨等^[19]方法, 在植株叶片、茎秆、根茎上无伤接种直径为 0.5 cm 菌饼, 以浸有无菌水的棉球保湿, 置于 BSG-400 型光照培养箱 (上海博迅医疗生物仪器有限公司产品) 中, 培养条件设置为光照时间 16 h/d、光照度 1 500 lx、温度 25℃、相对湿度 75%。以接种空白 PDA 培养基作为对照, 每处理分别接种 5 株。依据柯赫氏法则, 待植株发病后, 采集病健交界处组织进行再次分离、纯化, 通过形态鉴定和显微镜观察分离菌株与接种菌株的菌落形态、菌核大小等特征是否一致来确定致病菌。

1.2.3 病原菌形态学鉴定 将上述病原菌接种到 PDA 培养基上, 25℃ 暗培养 3 d, 采用十字交叉法测量菌落直径, 观察菌落形态和菌核形成及其颜色变化, 统计菌核数量, 并在 Olympus CX41 显微镜 (日本奥林巴斯株式会社产品) 下观察菌丝形态并进行初步分类。

1.2.4 病原菌分子生物学鉴定 病原菌在 PDA 培养基中培养 3 d 后, 使用 D3690 真菌基因组提取试剂盒 (广州市百菱生物科技有限公司产品) 提取病原菌 DNA。选取 ITS 引物 ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3′)/ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)^[20]、SSU 引物 NS1 (5′-CACCTGGTTGTACCTGCCAG-3′)/NS6 (5′-AGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3′)^[21]、LUS 引物 LROR (5′-GTACCCGCTGAACCTTAAGC-3′)/LR5 (5′-ATCCT-

GAGGGAAACTTC-3′)^[22] 对病原菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系 20.0 μL; DNA 模板 1.0 μL, 2×Hieff robust PCR master mix [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司产品] 10.0 μL, 上下游引物各 0.5 μL, ddH₂O 8.0 μL。扩增程序: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ (ITS 引物)/50℃ (SSU 引物)/50℃ (LSU 引物) 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。引物合成及测序均由重庆擎科生物公司完成。将测序结果上传 NCBI (美国国家生物信息中心), 获得序列号, 并在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 BLAST 比对; 下载近源种的 ITS 碱基序列、SSU、LUS 基因碱基序列, 使用 MEGA 7.0 软件进行同源性比对, 以 *Diaporthe amygdale* (NCBI 登录号分别为 KC343019、MN273786、MH875666) 为外源, 设置自展值 (Bootstrap) 为 1 000, 采用邻接法 (Neighbour-joining, NJ) 构建系统发育树, 确定多花黄精白绢病菌株的分类地位。

1.2.5 病原菌生物学特性测定

1.2.5.1 培养基类型对病原菌生长的影响 用无菌打孔器取 5 mm 的菌饼, 分别接种于 PSA、OA、WA、SDA、CMA、PDA 和 Czapek 培养基 (培养皿直径 9 cm) 中, 25℃ 培养 3 d, 用十字交叉法测量菌落直径。每处理 5 次重复。

1.2.5.2 培养基 pH 值对病原菌生长的影响 以 PDA 为基础培养基, 用 1 mol/L NaOH 和 HCl 溶液调节培养基 pH, 得到 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10 的 PDA 培养基。同样用无菌打孔器取 5 mm 的菌饼, 分别接种于 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10 的 PDA 培养基中, 25℃ 培养 3 d, 用十字交叉法测量菌落直径。每处理 5 次重复。

1.2.5.3 培养基碳源与氮源类型对病原菌生长的影响 以 Czapek 培养基为基础培养基, 用等量甘露醇、葡萄糖、麦芽糖、可溶性淀粉、果糖、乳糖替代培养基中的蔗糖作为碳源, 得到不同碳源的 Czapek 培养基; 用等量乙酸铵、甘氨酸、氯化铵、尿素、硫酸铵、硝酸钾替代培养基中的硝酸钠作为氮源, 得到不同氮源的 Czapek 培养基。然后, 用无菌打孔器取 5 mm 的菌饼, 分别接种于不同碳源的 Czapek 培养基和不同氮源的 Czapek 培养基, 25℃ 培养 3 d, 用十字交叉法测量菌落直径。每处理 5 次重复。

1.2.5.4 温度对病原菌生长的影响 用无菌打孔器

取 5 mm 的菌饼,接种于 PDA 培养基中,分别以 5 ℃、10 ℃、15 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃ 和 35 ℃ 条件下培养 3 d 后,用十字交叉法测量菌落直径。每处理 5 次重复。

1.2.5.5 光周期对病原菌生长的影响 用无菌打孔器取 5 mm 的菌饼,接种于 PDA 培养基中,分别以 0 h/d(全暗)、12 h/d(半明半暗)和 24 h/d(全明)3 种光周期 25 ℃ 恒温培养 3 d,用十字交叉法测量菌落直径。每处理 5 次重复。

1.2.5.6 病原菌致死温度测定 采用试管水浴法测定菌丝和菌核的致死温度。试管中放入 10 个直径 0.5 cm 菌饼,分别置于 41 ℃、42 ℃、43 ℃、44 ℃、45 ℃、46 ℃、47 ℃、48 ℃、49 ℃ 和 50 ℃ 的恒温水浴锅中预热 1 min 后开始计时,10 min 后取出立即冷却降温,然后取出菌饼表面消毒后置于 PDA 培养基中 25 ℃ 培养 5 d,观察菌丝是否生长。同样,试管中放入大小一致的 10 个菌核,分别置于 45 ℃、47 ℃、49 ℃、51 ℃、53 ℃、55 ℃、57 ℃、59 ℃ 的恒温水浴锅中预热 1 min 后开始计时,10 min 后取出立即冷却降温,然后取出菌核,表面消毒后置于 PDA 培养基中 25 ℃ 培养 5 d,观察菌核是否生长,进而确定菌丝和菌核的致死温度。

1.2.6 室内药剂毒力测定 无菌条件下,取 1 mL 不同质量浓度不同类型杀菌剂药液(表 1)分别加入 14 mL PDA 培养基,混匀后置于直径 9 cm 的无菌培

养皿中。然后在不同质量浓度药剂的 PDA 培养基中接入直径 0.5 cm 的菌饼,以不加药剂的 PDA 培养基作对照,25 ℃ 暗培养 3 d 后测量各处理的菌落直径。每处理 3 次重复。抑制率按下式计算:

抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100%。

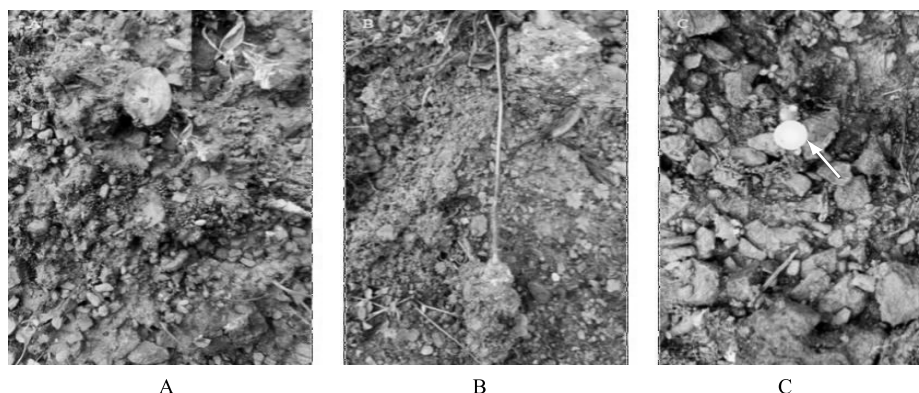
1.3 数据分析

利用 Excel 2016 软件进行数据统计以及图、表绘制,利用 SPSS 20.0 软件进行处理间差异显著性分析及毒力回归方程的拟合和半抑制浓度 (EC_{50}) 的计算。

2 结果与分析

2.1 多花黄精白绢病症状

生产中多花黄精实生苗与根茎繁殖的植株可感染白绢病,主要危害根茎和茎基部。高温高湿条件下,实生苗感染病害后,叶片由绿色转变为褐色,叶片表面呈现云纹状斑点,逐渐扩展到整个叶片,可见褐色的菌核。土壤表面常长出一层白色绢丝状菌丝体,常形成许多大小不一褐色或棕褐色的菌核或子实体(图 1)。根茎繁殖植株感病后,根茎呈黄褐色斑点,地上叶片开始黄化,随着病情发展,叶片病斑不断变大,后期呈黄褐色、不规则的病斑,稍凹陷,叶片从下往上逐渐变黄,茎秆枯萎,菌丝不断往下侵染根部,最后整个根茎腐烂,全株死亡。



A:感染白绢病的 1 年生种子苗;B:感染白绢病的 3 年生种子苗;C:子实体。

图 1 多花黄精白绢病田间症状

Fig.1 Field symptoms of *Polygonatum cyrtonema* with southern blight

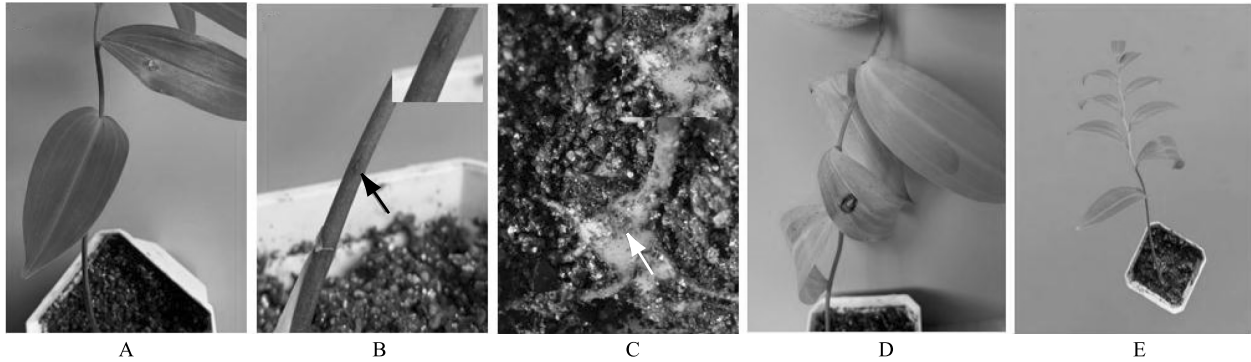
2.2 病原菌致病性

将纯化好的菌株 BJB 回接接种到健康的多花黄精植株叶片、茎秆和根茎上,在 25 ℃ 下保湿培养。接种后 3 d 出现病状,叶片接种部位出现水渍状斑,

组织表面可见紧贴的白色菌丝;接种后 5 d 叶片穿孔(图 2A);接种后 7 d 茎秆被侵染部位变为褐色(图 2B),中间灰色,凹陷;接种后 8 d,根基部呈水渍状腐烂,褐色(图 2C),有恶臭味,且很容易将植株从

花盆中拔起,最后整个植株枯死(图 2D)。症状与田间自然病株症状相同,而对照植株无明显病症(图 2E)。接种后 15 d 采集病健交接组织和对照进行再次分离、纯化病原菌,将分离菌株在 25 ℃ 培养

3 d 观测菌落形态特征,其与接种菌株一致,培养 10 d 菌核形态与接种菌株的也一致,对照处理未获得菌株。因此,确定菌株 BJB 为多花黄精白绢病的致病菌。



A: 叶片接种后 5 d 的植株; B: 茎秆接种后 7 d 的植株; C: 接种后 8 d 的根茎; D: 叶片接种后 26 d 的植株; E: 健康植株。

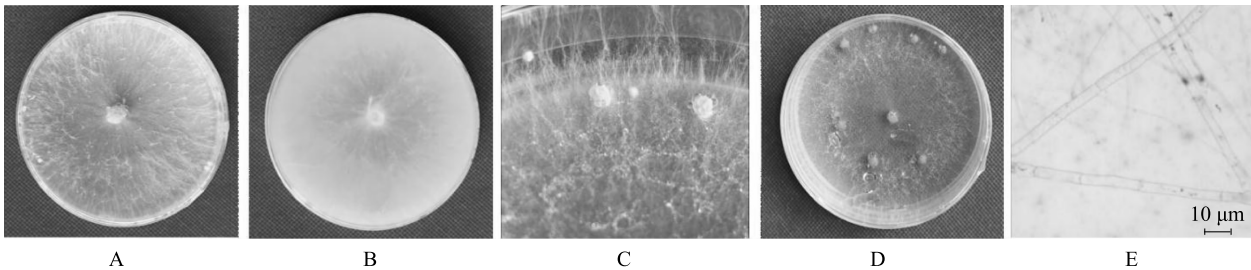
图 2 分离获得的菌株 BJB 对多花黄精的致病性检测及叶片、茎秆和根茎感病症状

Fig.2 Pathogenicity test of isolated strain BJB on *Polygonatum cyrtoneura* and symptoms of leaves, shoots and rhizomes

2.3 病原菌鉴定

2.3.1 形态学鉴定 菌株 BJB 在 25 ℃ 培养 1 d, 菌落开始萌发, 培养 5 d, 长满整个培养基, 菌落呈圆形(图 3A), 背面白色(图 3B), 菌丝呈疏松的白色羽毛状, 从中间向四周辐射状生长(图 3A), 培养 7 d

形成近球形或椭圆形的白色菌核(图 3C), 成熟后菌核呈褐色或棕褐色(图 3D), 表面具有光泽。每皿培养基可产生大小不一的菌核 8~23 个, 菌核直径 0.4~2.2 mm。显微镜下菌丝有横隔膜(图 3E), 直径 5.4~7.2 μm, 未见分生孢子。



A: 培养 5 d 的菌落正面; B: 培养 5 d 菌落背面; C: 培养 7 d 的初期菌核; D: 培养 12 d 的后期菌核; E: 菌丝。

图 3 菌株 BJB 的菌落、菌丝和菌核形态特征

Fig.3 Morphological characteristics of colony, mycelium and sclerotium of strain BJB

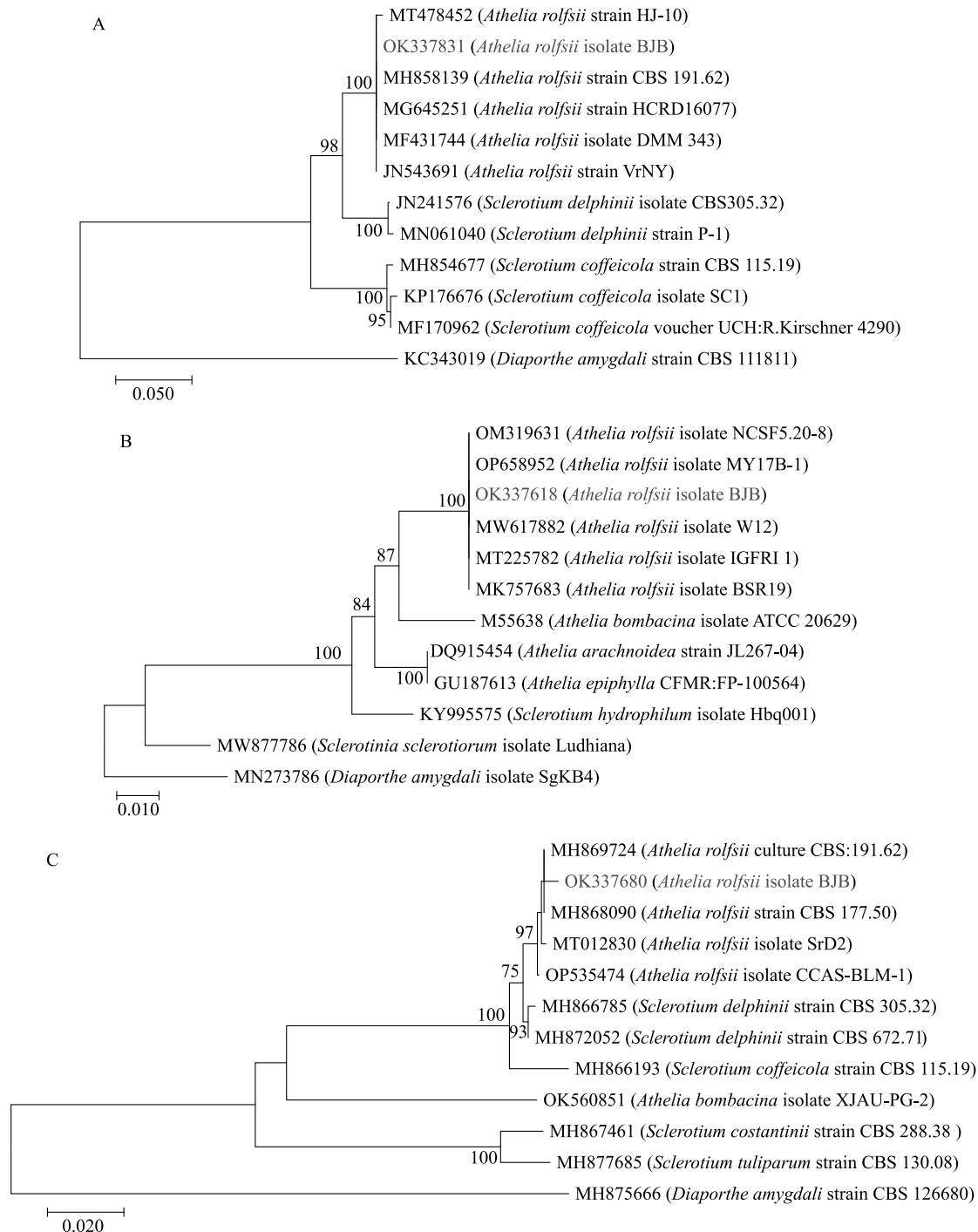
2.3.2 分子生物学鉴定 以菌株 BJB 基因组 DNA 为模板, 采用 ITS 引物以及 SSU、LSU 引物对菌株进行扩增, 扩增产物测序后得到的序列上传至 NCBI (美国国家生物信息中心), GenBank 登录号依次为 OK337831、OK337681 和 OK337680。菌株 BJB 与 *Athelia rolfsii* 菌株的同源性较高, 菌株 BJB 的 ITS 引物以及 SSU、LSU 引物的扩增序列与 *Athelia rolfsii* 菌株的 ITS 引物以及 SSU 和 LSU 引物的扩增序列(登录号分别为: MH858139、MW617882 和 MH869724)的相似度分别为 100.00% (558/558)、

100.00% (1 312/1 312) 和 99.77% (875/877)。菌株 BJB 与几个 *Athelia rolfsii* 菌株聚于同一分支(图 4), 因此, 综合形态学特征和分子生物学分析结果, 本研究认为多花黄精白绢病致病菌 BJB 为罗耳阿太菌(*Athelia rolfsii*)。

2.4 病原菌生物学特性

2.4.1 培养基对病原菌生长的影响 不同培养基中病原菌生长速度存在显著差异(图 5A)。PSA 培养基中病原菌生长最快, 培养 3 d 菌落直径可达 72.33 mm, 显著高于其他培养基; 其次为 PDA 培养

基,菌落直径为 68.3 mm;再次是 SDA 培养基和 OA 培养基,两者间差异不显著。WA 和 Czapek 培养基中,病原菌生长较缓慢,培养 3 d 菌落直径仅为 39.33 mm 和 33.5 mm,显著低于其他培养基。



A: 基于 ITS 碱基序列构建的系统发育树; B: 基于 SSU 基因碱基序列构建的系统发育树; C: 基于 LSU 基因碱基序列构建的系统发育树。

图 4 基于 ITS 碱基序列以及 SSU、LSU 基因碱基序列分别构建的系统发育树

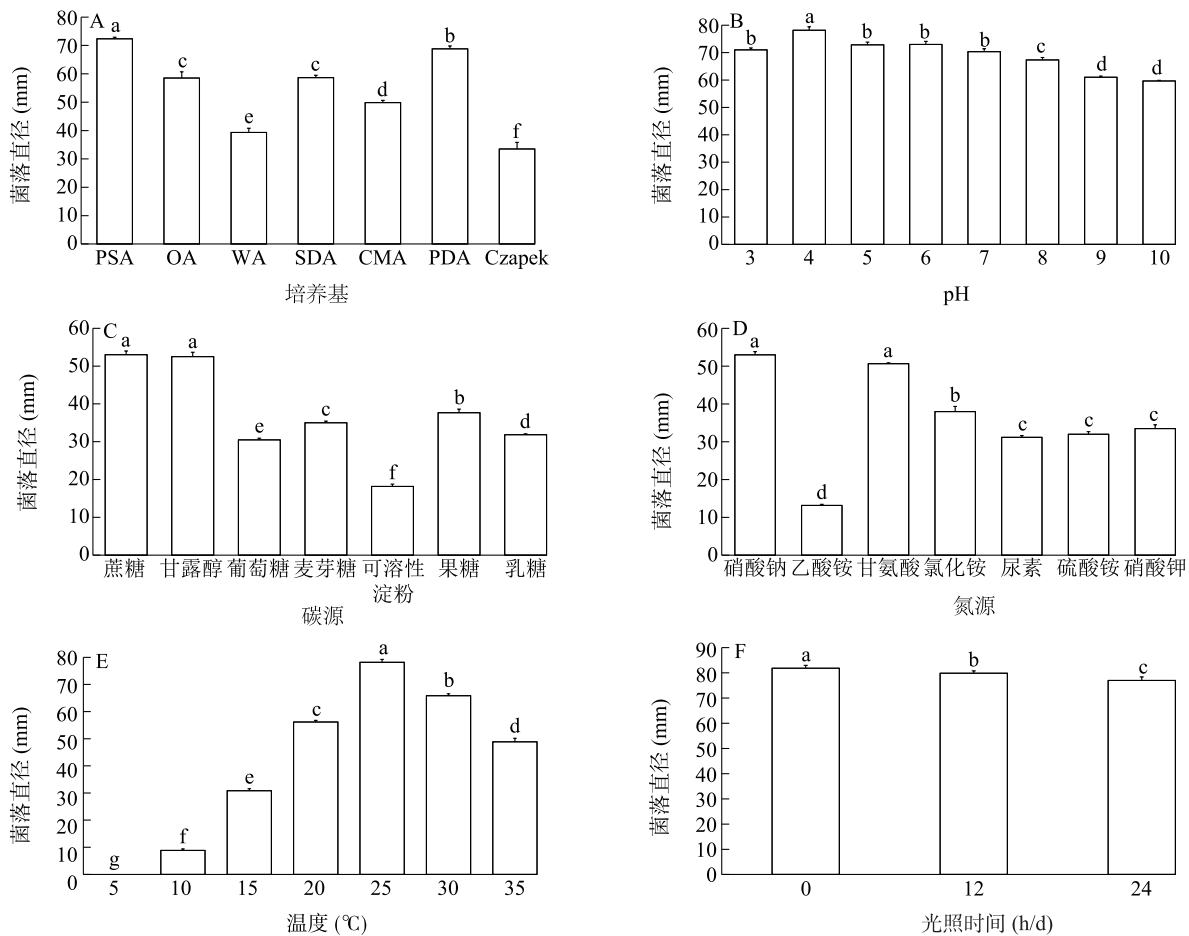
Fig.4 Phylogenetic trees constructed based on ITS base sequences, SSU gene sequences, and LSU gene sequences, respectively

2.4.2 pH 值对病原菌生长的影响 培养基 pH 值 3~10 时,病原菌培养 3 d 菌落直径均大于接种时的菌斑直径 5 mm,说明培养基 pH 值 3~10 范围内,病原菌均能生长(图 5B)。培养基 pH 值为 4 时,病原

菌培养 3 d 菌落直径达到 78.17 mm, 显著大于其他处理。pH 为 6、5、3 和 7 处理的菌落直径次之, 分别为 73.00 mm、72.88 mm、71 mm、70.30 mm, 且这 4 种处理间的差异不显著。培养基 pH 值为 9 和 10 时, 菌落直径分别为 61.00 mm、59.67 mm, 显著低于其他处理。上述结果说明, 偏酸性环境有利于病原菌的生长, 碱性环境下, 病原菌的生长会受到抑制。

2.4.3 碳、氮源对病原菌生长的影响 供试的 7 种碳源培养基上, 病原菌 25 ℃ 培养 3 d 菌落直径的变化如图 5C 所示。从图中可以看出, 不同碳源培养基中, 病原菌均能生长。其中, 以蔗糖或甘露醇为碳源时, 病原菌培养 3 d 菌落直径较大, 分别达 53.00 mm 和 52.50 mm, 显著高于其他碳源。其次为果糖、麦芽糖、

乳糖、葡萄糖等碳源处理, 而以可溶性淀粉为碳源的处理菌落直径最小, 仅为 18.17 mm。不同氮源培养基中, 病原菌 25 ℃ 培养 3 d 菌落直径的变化如图 5D 所示。从图中可以看出, 供试的 7 种氮源培养基中, 病原菌均能生长。其中, 以硝酸钠或甘氨酸为氮源时, 病原菌培养 3 d 菌落直径较大, 分别为 53.00 mm 和 50.67 mm, 显著高于其他氮源; 其次为氯化铵、硝酸钾、硫酸铵和尿素等氮源处理, 菌落直径分别为 38.00 mm、33.50 mm、32.00 mm、31.17 mm; 以乙酸铵为氮源的培养基中, 病原菌菌落直径最小, 仅为 13.17 mm。上述结果说明不同的碳源和氮源培养基对病原菌菌丝的生长速度有较大的影响, 适宜的碳源为蔗糖或甘露醇, 氮源为硝酸钠或甘氨酸, 而可溶性淀粉和乙酸铵分别为促生效果较差的碳源和氮源。



PSA: 马铃薯蔗糖琼脂培养基; OA: 燕麦琼脂培养基; WA: 水琼脂培养基; SDA: 沙氏琼脂培养基; CMA: 玉米琼脂培养基; PDA: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基; Czapek: 察氏琼脂培养基。柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 不同培养条件下的菌落直径

Fig.5 Colony diameters of strain BJB under different culture conditions

2.4.4 温度对病原菌生长的影响 10~35 ℃ 环境温

度条件下, 病原菌的菌落直径均高于接种时的直径,

且随着培养温度的增加,培养 3 d 的菌落直径呈先增加后减少的趋势。其中,25 ℃ 温度处理的病原菌培养 3 d 菌落直径可达 78.17 mm,增加最为显著;其次为 30 ℃ 温度处理和 20 ℃ 温度处理,菌落直径分别为 65.83 mm 和 56.17 mm;10 ℃ 温度处理下,菌落直径为 8.80 mm,5 ℃ 温度处理下,菌丝不生长。上述结果说明,25 ℃ 为病原菌的适宜生长温度,过高多低的温度均不利于病原菌的生长(图 5E)。

2.4.5 光周期对病原菌生长的影响 不同光周期下 25 ℃ 恒温培养 3 d,病原菌菌落直径的差异显著。全暗条件下菌落直径可达 81.83 mm,显著高于半明半暗(12 h/d)处理的 79.83 mm 和全光照(24 h/d)处理的 77.00 mm,且半明半暗处理的菌落直径与全光照处理亦存在显著差异(图 5F)。上述结果说明全暗的环境有利于病原菌菌丝的生长。

2.4.6 致死温度 多花黄精白绢病病原菌经 10 min 41~44 ℃ 恒温水浴处理后,菌丝在 PDA 培养基中均能继续生长,但经 10 min 45~50 ℃ 处理的菌丝不再生长,由此确定菌丝的致死温度是 45 ℃。菌核经 10 min 45 ℃ 水浴处理后,菌核在 PDA 培养基中能正常萌发,萌发率为 87%,随处理温度升高,萌发率逐渐下降,51 ℃ 处理后萌发率降到 26%,53 ℃ 处理后萌发率仅为 2.3%,55 ℃ 和 57 ℃ 水浴处理后未见菌核萌发,表明菌核的致死温度为 55 ℃。

2.5 室内药剂毒力测定

6 种杀菌剂对多花黄精白绢病病原菌的抑制效果如表 2 所示。从表中可以看出,6 种杀菌剂对多花黄精白绢病病原菌均有一定的抑制作用。其中,戊唑醇对病原菌抑制作用最强, EC_{50} 为 0.420 $\mu\text{g/mL}$;其次为咯菌腈, EC_{50} 为 1.750 $\mu\text{g/mL}$;再次是萎锈灵和啉菌酯, EC_{50} 分别为 1.991 $\mu\text{g/mL}$ 和 2.940 $\mu\text{g/mL}$;抑制作用最差的是啶酰菌胺, EC_{50} 为 126.317 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 杀菌剂对 *Athelia rolfsii* 的抑菌活性

Table 2 Antibacterial activities of fungicides against *Athelia rolfsii*

药剂	毒力回归方程	相关系数	EC_{50} ($\mu\text{g/L}$)
萎锈灵	$Y = 11.222\ 3 + 2.303\ 7x$	0.990\ 2	1.991
啉菌酯	$Y = 6.480\ 9 + 0.584\ 9x$	0.998\ 5	2.940
咯菌腈	$Y = 14.183\ 3 + 3.347\ 5x$	0.926\ 7	1.750
戊唑醇	$Y = 6.976\ 0 + 0.585\ 1x$	0.992\ 3	0.420
异菌脲	$Y = 8.780\ 1 + 3.316\ 1x$	0.985\ 2	73.733
啶酰菌胺	$Y = 4.816\ 0 + 1.813\ 6x$	0.994\ 1	126.317

3 讨论与结论

白绢病病原菌能侵害白术^[11]、温郁金^[12]、黄连^[13]、玄参^[14]和铁皮石斛^[15]等 500 多种植物^[23-26]。在中国多花黄精种植区,白绢病时常发生,该病可引起植株根腐、茎腐等症状,严重影响植株生长,导致产量减少。作者在重庆南川多花黄精种植区多年调查发现,白绢病病害有逐年加重的趋势。2011 年,鲍康阜^[10]报道了白绢病在安徽黄精种植基地的发生事件,但并未对引起黄精白绢病的病原菌种类进行鉴定。本研究在多花黄精白绢病病株调查的基础上,对白绢病病原菌进行分离,并结合形态学特征和 ITS 碱基序列以及 SSU、LUS 基因碱基序列构建的系统发育进化树进行鉴定,明确引起多花黄精白绢病的病原菌菌株 BJB 为罗耳阿太菌(*A. rolfsii*)。

多花黄精白绢病为土传病害,病原菌以菌丝体和菌核在土壤、种茎、病残体、杂草中越冬。当次年温湿度条件适宜时,菌核以及菌核萌发产生的菌丝可通过直接接触或伤口入侵的方式侵染寄主。白绢病病原菌菌核在土壤中可存活 5~6 年。本研究结果表明,多花黄精白绢病病原菌最适宜生长培养基为 PSA,与王静等^[16]报道烟草白绢病病原菌的适宜培养基一致;该病原菌在 pH 3~10 条件下均可生长,对酸碱度适应性较强,且当 pH 为 4 时,菌丝生长最快,表明多花黄精白绢病病原菌 *A. rolfsii* 喜好酸性土壤环境,这与加拿大一枝黄花白绢病病原菌(最适 pH 5)^[17]和椒草白绢病病原菌(最适 pH 6)^[27]的适宜生长 pH 有一定的差异,这可能是病原菌为适应不同寄主环境而自我调节的结果。因此,生产中可通过施用生石灰和碱性肥料等措施调节土壤的酸碱度,进而实现对多花黄精白绢病的防治。多花黄精白绢病病原菌可利用多种碳源,最适合的碳源为蔗糖,这与唐伟等^[17]和王炳文等^[27]的研究结果一致;多花黄精白绢病病原菌对可溶性淀粉利用相对较差,可能是可溶性淀粉为大分子化合物不能被病原菌直接吸收。多花黄精白绢病病原菌生长最适合的氮源为硝酸钠,这草莓白绢病病原菌^[28]一致。本研究中多花黄精白绢病病原菌菌丝和菌核的致死温度分别为 45 ℃ 和 55 ℃,表明多花黄精白绢病菌核比菌丝具有更强抗逆性,其原因可能与菌核具有坚硬的致密组织相关。黑暗条件有利于多花黄

精白绢病病原菌菌丝的生长,这与王炳文等^[27]的研究结果一致,多花黄精白绢病病原菌在10~35℃的环境中均能正常生长,最适生长温度为25℃,这与魔芋白绢病病原菌的生长温度和最适生长温度基本一致^[29]。重庆市南川区位于亚热带季风气候区,5~7月处于梅雨季节,平均气温21~32℃,平均相对湿度76%左右,这为该地区多花黄精白绢病发生与流行提供了适宜的气候条件。同时,每年5月份重庆南川区的多花黄精处于生长旺季,植株间通风差,田间土壤湿度大,这也促进了多花黄精白绢病的发生和流行。因此,及时除草、合理密植、雨前减少灌溉,及时处理病株及周围土壤,是重庆市南川区控制白绢病发生与流行的有效手段。本研究中初步探讨了培养基类型、pH、碳氮源、温度以及光周期对 *A. rolfsii* 菌丝生长的影响,但病原菌侵染机制等方面的工作尚有待进一步研究。

目前,生产中常用化学药剂进行作物白绢病的防治^[30],但由于不同地区、不同中药材品种的白绢病病原菌对药剂的敏感性存在差异^[20-21,23,31-33],因此,筛选合适的药剂对中药材白绢病的防治有重要意义。目前,中国登记的白绢病防治药剂(<http://www.chinapesticide.org.cn/>)主要有:戊唑醇等^[34]麦角甾醇抑制剂类,萎锈灵、氟酰胺和啉酰菌胺等^[35-36]琥珀酸脱氢酶抑制剂类,嘧菌酯^[37]等甲氧基丙烯酸酯类,咯菌腈等^[34,38]吡咯类,异菌脲等^[39]二甲酰亚胺类。此外,井冈霉素单剂或者与化学药剂复配剂也可以用来防治花生等作物的白绢病^[39]。本研究选用的6种不同类型的药剂对多花黄精白绢病病原菌的抑制效果从高到低依次为戊唑醇、咯菌腈、萎锈灵、嘧菌酯、异菌脲和啉酰菌胺。其中,戊唑醇、咯菌腈、萎锈灵和嘧菌酯的抑制作用较强,异菌脲和啉酰菌胺的抑制作用较弱。戊唑醇具有很强的内吸传导性,杀菌谱广、持效期长,低毒且对环境污染小,在花生白绢病的防治中亦有较好的效果^[40]。萎锈灵和啉酰菌胺同属琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂,但两者对多花黄精白绢病病原菌的 EC_{50} 分别为1.991 μg/mL和126.317 μg/mL,差异较大,可能是由2种药剂的分子结构差异导致的。在进一步的研究中,可利用防治效果较好的戊唑醇、咯菌腈、萎锈灵和嘧菌酯等药剂开展活体植株试验和田间试验,以明确适用于生产的多花黄精白绢病防治药剂和方法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 刘京晶,斯金平. 黄精本草考证与启迪[J]. 中国中药杂志,2018,43(3):631-633.
- [3] 陈辉,冯珊珊,孙彦君,等. 3种药用黄精的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2015,46(15):2329-2338.
- [4] 苏文田,刘跃钧,蒋燕锋,等. 黄精产业发展现状与可持续发展的建议[J]. 中国中药杂志,2018,43(13):2831-2835.
- [5] 韩凤,李巧玲,韩如刚,等. 渝产多花黄精根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 分子植物育种,2020,18(11):3693-3698.
- [6] 梁忠厚,李静纳. 湖南多花黄精根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 南方农业学报,2021,52(7):1923-1930.
- [7] 南红亮. 林下黄精高产栽培及病虫害防治技术探讨[J]. 种子科技,2022,40(3):94-96.
- [8] 周先治,苏海兰,陈阳. 多花黄精主要病害发生规律调查[J]. 福建农业科技,2017(10):25-27.
- [9] 迟惠荣. 多花黄精叶枯病病原菌鉴定及贝莱斯芽胞杆菌防病促生效果研究[D]. 杭州:浙江大学,2019.
- [10] 鲍康阜. 黄精白绢病的发生与综合防治[J]. 现代农业科技,2011,22(16):114,117.
- [11] 茹水江,王汉荣,王连平,等. 白术白绢病生物学特性及其防治药剂筛选[J]. 浙江农业学报,2007,19(6):439-443.
- [12] 马瑞,徐刚,郑樊,等. 温郁金白绢病菌的生物学特性及药剂毒力测定[J]. 热带作物学报,2018,39(7):1410-1415.
- [13] 马琳. 黄连白绢病菌 *Sclerotium rolfsii* 生物学特性及综合防治的研究[D]. 成都:四川农业大学,2010.
- [14] 陈婧,桑维钧. 道真玄参白绢病病原鉴定及杀菌剂毒力测定[J]. 湖北农业科学,2015,54(20):5020-5024.
- [15] 李海明,林江波,王伟英,等. 铁皮石斛白绢病菌的分离鉴定与抑菌药剂筛选[J]. 福建农业学报,2015,30(9):901-904.
- [16] 王静,赵杰,钱玉梅,等. 山东烟草白绢病病原鉴定及室内防治药剂筛选[J]. 中国烟草科学,2013,34(4):55-59.
- [17] 唐伟,朱云枝,强胜. 加拿大一枝黄花白绢病菌株 SC64 (*Sclerotium rolfsii*) 的生物学特性研究[J]. 南京农业大学学报,2011,34(2):67-72.
- [18] 王雅,黄思良,何朋朋,等. 芝麻白绢病病原菌的分离鉴定及其生物学特性[J]. 中国油料作物学报,2013,35(1):84-91.
- [19] 刘雨,杨雅雯,苗玉焕,等. 大别山区3种鸢尾科药材白绢病病原鉴定及其生物学特性[J]. 中国中药杂志,2021,46(2):290-297.
- [20] 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. New York, USA: Academic Press,1990:315-322.
- [21] LI J X, CHEN Q H, WANG M H, et al. First report of southern blight on *Cynanchum stauntonii* caused by *Athelia rolfsii* in China [J]. Plant Disease,2020,104(6):1857.
- [22] STIELOW J B, LEVESQUE C A, SEIFERT K A, et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes[J]. Persoonia,

- 2015,35(1):242-263.
- [23] FARR D F, BILLS G F, CHAMURIS G P, et al. Fungi on plants and plant products in the United States [M]. St. Paul, Minnesota, USA:APS Press, 1989:942.
- [24] KWON J H, SHEN S S, PARK C S. Stem rot of strawberry caused by *Sclerotium rolfsii* in Korea [J]. Plant Pathology Journal, 2004, 20(2):103-105.
- [25] ODVODY G N, MADDEN D B. Leaf sheath blights of Sorghum bicolor caused by *Sclerotium rolfsii* and *Gloeocercospora sorghi* in South Texas [J]. Phytopathology, 1984, 74(3):264-268.
- [26] PUNJA Z K. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii* [J]. Annual Review of Phytopathology, 1985, 23(1):97-127.
- [27] 王炳文, 刘海涛, 冯淑杰, 等. 椒草白绢病菌生物学特性及其防治药剂的初步研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(11):5028-5030.
- [28] 李 阳, 金 薇, 黄俊斌. 草莓白绢病的病原鉴定及生物学特性[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(3):250-253.
- [29] 李利军, 卢美欢, 马英辉, 等. 魔芋白绢病病原菌生物学特性及中药提取物药物筛选[J]. 西北农业学报, 2018, 27(10):1518-1525.
- [30] 金 苹, 高晓余. 白绢病的研究[J]. 农业灾害研究, 2011, 1(1):14-22.
- [31] 鲁 鹏, 肖仲久, 李小霞, 等. 白术白绢病菌的生物学特性及杀菌剂对其室内毒力测定[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(8):90-93.
- [32] 游景茂, 王 磊, 唐 其, 等. 博落回白绢病的病原鉴定及防治[J]. 中国现代中药, 2017, 19(10):1429-1433.
- [33] 袁文佳, 李金鑫, 陈 红, 等. 紫菀白绢病病原菌的鉴定、生物学特性及防治药剂筛选[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6):2915-2924.
- [34] 李建涛, 范怀峰, 王建美, 等. 四种杀菌剂对花生白绢病的毒力及田间控制作用[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(6):686-691.
- [35] 李 敏, 李 爽, 张忠信, 等. 河南省花生白绢病菌群体多样性及对萎锈灵敏感性研究[J]. 河南农业科学, 2021, 50(5):64-73.
- [36] 仇是胜, 柏亚罗. 琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂的研发进展(II)[J]. 现代农药, 2015, 14(1):1-7.
- [37] 梁 君, 张科立, 张珂莹, 等. 铁皮石斛白绢病防治药剂筛选试验[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(6):839-842.
- [38] 王洪苏, 凡续晨, 魏家欣, 等. 乌头白绢病防治药剂的筛选[J]. 中药材, 2023, 46(3):576-580.
- [39] 陈正州. 异菌脲和噻呋酰胺对花生白绢病的田间防效[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(22):130-131, 137.
- [40] 李亮亮, 杨文玲, 杜志敏, 等. 汝南县花生白绢病菌的鉴定、生物学特性及室内抗病药筛选[J]. 河南科学, 2021, 39(4):551-558.

(责任编辑:石春林)