

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.06.007

白及炭疽病病原菌的鉴定及其 室内防治药剂筛选

侯秀明¹, 王晗怡¹, 陈婷婷¹, 高萌¹,
高乞¹, 廖宏泽¹, 周浩^{1,2}

1. 广西民族大学 海洋与生物技术学院/广西多糖材料与改性重点实验室, 南宁 530006;
2. 广西民族大学 海洋生物资源保护与利用重点实验室, 南宁 530006

摘要: 在广西桂林市白及种植基地调查发现了一种炭疽病, 造成白及产量下降。为明确白及炭疽病病原菌并寻找适合的杀菌剂, 采用组织分离法和单孢纯化法从染病叶片中分离病原真菌, 柯赫氏法则验证病原后, 运用形态学和分子生物学方法鉴定病原, 同时利用菌丝生长速率测定法分析了 8 种杀菌剂对病原菌的抑制效果。结果表明, 结合菌落、显微形态特征以及多基因序列联合分析(ITS, ACT, CHS-1, HIS3, GAPDH, TUB2), 鉴定病原菌为 *Colletotrichum orchidophilum*, 回接健康白及叶片后能引起明显病斑, 病菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上的生长速度为 0.43 cm/d, 不同浓度杀菌剂对典型菌株 BJ103.2 菌丝生长的抑制作用不同, 其中肟菌戊唑醇的抑制作用最强, 半数有效浓度(EC_{50})为 7.92 $\mu\text{g/mL}$ 。研究结果为炭疽病的诊断与防治策略提供了科学的依据。

关键词: 白及; 炭疽病; 多基因序列联合分析; 药剂筛选

中图分类号: S435.672

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)06-0066-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification the Pathogen of Anthracnose on *Bletilla striata* in Guangxi Province and Fungicide Screening in Laboratory

HOU Xiuming¹, WANG Hanyi¹, CHEN Tingting¹,
GAO Meng¹, GAO Qi¹, LIAO Hongze¹, ZHOU Hao^{1,2}

1. School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi Minzu University / Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modifications, Nanning 530006, China;
2. Key Laboratory of Protection and Utilization of Marine Resources, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China

Abstract: Anthracnose on *Bletilla striata* was observed in a plantation in Guiling, Guangxi, which caused

收稿日期: 2022-06-13

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(32060599)。

作者简介: 侯秀明, 硕士研究生, 主要从事植物与病原微生物分子互作研究。

通信作者: 周浩, 副研究员。

great loss of *Bletilla striata* production. To determine the causal agent and choose efficient fungicide, the pathogenic fungi were isolated from the infected leaves by tissue isolation and single spore purification. Koch's rule was used for the pathogenicity test. The strains were further identified by morphological characteristics and molecular biological methods. The indoor toxicity of eight fungicides to this pathogen was determined by means of mycelium growth rate method. The strains were identified as *Colletotrichum orchidophilum* based on colony, micromorphological characteristics and multi-gene phylogenetic analysis (ITS, ACT, CHS-1, HIS3, GAPDH, TUB2). The average growth rate of the pathogen on PDA was 0.43 cm/d. Different concentrations of fungicides had different inhibitory effects on the mycelial growth of typical strain BJ103.2, among which trifloxystrobin tebuconazole had the strongest inhibitory effect with EC_{50} of 7.92 $\mu\text{g/mL}$. The results provided a theoretical basis for the prevention and control of anthracnose on *Bletilla striata*.

Key words: *Bletilla striata*; anthracnose; multi-gene phylogenetic analysis; fungicide screening

白及[*Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f.], 又名白给、地螺丝, 是兰科白及属多年生草本植物, 也是我国传统的药用植物。白及具有收敛止血、消肿生肌和美容的功效, 首次记载于汉代的《神农本草经》, 已被《中国药典》收录^[1]。白及提取液可用于血管栓塞剂、代血浆等医用材料, 白及多糖胶可作为食品保鲜剂^[2]。白及因药用功能的挖掘而不断扩大其应用范围 and 市场需求, 其价格也从 10 元/kg 增至 800~1 000 元/kg^[3]。近年来, 随着白及组培技术的建立和成熟^[4], 人工种植业开始兴起, 多集中在我国西南、华中以及长江流域等地区, 然而伴随的白及病害也逐渐增加, 严重时造成白及大幅度减产, 影响了白及产业的发展。

目前对白及的研究多集中于药用价值及种植方面, 对白及病害的研究较少。已报道的真菌病害有: *Fusarium oxysporum* 可引起白及根腐病^[5], *F. fujikuroi* 可引起白及黑斑病^[6], *Epicoccum sorghinum* 可引起白及叶斑病^[7]。炭疽病是由刺盘孢属(*Colletotrichum* spp.) 真菌引起的植物病害的总称, 危害植物叶片、茎和果实。本研究在对广西桂林市白及种植基地病害调查中发现叶片上有疑似炭疽病, 且病害严重。通过采集白及发病叶片组织, 利用组织分离法与单孢纯化法分离病原, 结合显微形态与多基因系统发育分析鉴定该病害病原, 明确桂林市白及种植基地炭疽病病原菌的分类地位, 并通过室内毒力测定进一步筛选出防治白及炭疽病的有效杀菌剂, 以期对白及炭疽病病原真菌的科学诊断与病害防治提供理论基础。

1 材料

1.1 供试植物材料

供试病害植株与健康植株均从广西桂林市白及种植基地采集。炭疽病病症植株放入无菌袋中保存并编号, 带入实验室分离。采集健康白及块茎放入温室培养。

1.2 供试材料及培养基

材料有 Taq DNA 聚合酶, 10× EasyTaq Buffer, dNTP, 氯仿, 异丙醇, 1% CTAB。供试杀菌剂共 8 种, 分别为多菌灵(Carbendazim, 50%可湿性粉剂, 四川国光农化股份有限公司); 代森锰锌(Mancozeb, 70%可湿性粉剂, 四川国光农化股份有限公司); 代森锌(Zineb, 70%可湿性粉剂, 四川国光农化股份有限公司); 苯菌灵(Benomyl, 10%可湿性粉剂, 蓝丰生物化工有限公司); 丙森锌(Propineb, 70%可湿性粉剂, 德国拜耳作物科学公司); 苯醚甲环唑(Difenoconazole, 10%水分散粒剂, 瑞德丰生物科技); 肟菌戊唑醇(Nativo, 75%水分散粒剂, 德国拜耳作物科学公司); 敌磺钠(Fenaminsulf, 70%可湿性粉剂, 山东天威农药有限公司)。

所用培养基共 3 种,分别为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 L;燕麦培养基(OA):燕麦片 30 g,琼脂 20 g,水 1 L;麦芽汁培养基(MEA):麦芽浸提物 34 g,琼脂 20 g,水 1 L.

1.3 主要设备仪器

莱卡生物显微镜(DM2000 LED),德国徕卡;超净工作台(S. SW-CJ-2F 型),恒宇公司;电热恒温培养箱(HPS-250 型),哈尔滨市东明医疗仪器厂;台式微量离心机(D3024 型),大龙兴创实验仪器(北京)股份有限公司;全自动立式高压灭菌器(GI54DP 型),厦门致微仪器有限公司;PCR 仪(PDC0200 型),BOD-RAD;电泳仪(JY600PJ 型),北京君意东方电泳设备有限公司;相机(2013DJ6792 型),佳能有限公司.

2 方法

2.1 田间病害观察与样品采集

2019 年 5 月至 7 月,在广西桂林市白及种植基地发现疑似炭疽病病症的白及叶片,拍照记录田间发病样苗病灶,采集发病样苗带回实验室.

2.2 病原菌的分离、纯化及保存

对患病叶片观察、拍照并标号,采取组织分离法^[8]分离病原菌.将叶片洗净后取多个病健交界处叶块(5 mm×5 mm),表面消毒晾干后置于 PDA 平板上,于 25 ℃恒温培养箱中黑暗培养.待组织长出菌落后,在新鲜的 PDA 平板上收集分生孢子,制备悬浮液(10⁶ 个/mL),利用平板稀释划线法纯化病原菌^[9],纯培养物用 PDA 斜面保存于 4 ℃冰箱中.

2.3 致病性测定

将纯培养物接种到含氯霉素(25 μg/mL)的 PDA 上,25 ℃黑暗培养 5 d,用打孔器获取直径 5 mm 菌饼待用,将健康白及叶片消毒,用牙签在叶片上间隔 5 cm 制造伤口,在伤口处接种菌饼,刺伤的白及叶片作为空白对照,定期观察叶片发病情况并记录,重复 3 次.

2.4 形态学观察

将纯化物接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、燕麦培养基(OA)、麦芽汁培养基(MEA),7 d 后拍照记录菌落形态.接种菌饼(直径为 5 mm)于 PDA 平板中央,间隔 24 h 测量菌落半径,培养 5 d,采用十字交叉法测量菌株生长速度($\bar{v}$):

$$\bar{v} = \bar{r} / d$$

式中, $\bar{r}$ 为菌落半径实际平均值, d 为培养天数.制备分生孢子悬浮液,滴在载玻片上观察分生孢子并拍照,孢子悬浮液保湿培养 12 h,40 倍镜下观察到分生孢子附着孢,利用 ImageJ 软件^[10]测量 50 个分生孢子及附着孢大小.

2.5 分子生物学鉴定

接种培养物于 PDA 中,待菌丝长满后,使用 CTAB 法^[11]提取 DNA.用引物(表 1)分别扩增 ITS,ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH, HIS3,引物均由武汉奥科鼎盛生物科技有限公司合成.扩增体系(25 μL):无菌去离子水 20.9 μL,10×EasyTaq Buffer 2.5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,EasyTaq 0.1 μL,DNA 模板 1 μL.扩增程序:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 45 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,循环 35 次,72 ℃延伸 10 min,4 ℃保温.扩增完成后,1%琼脂糖凝胶电泳检测,将符合预期大小的 PCR 产物送武汉奥科鼎盛生物科技有限公司测序,使用 Vector NTI 软件^[12]对测序结果进行检查校准,将序列上传 NCBI 数据库获得序列登录号.依据 Damm 等^[13]以及 Marin-Felix 等^[14]的报告获得参考序列登录号(表 2),利用 TBtools^[15]下载参考序列,通过 PhyloSuite1.22 软件^[16]进行序列比对和拼接,并采用 ML(最大似然法)构建系统发育树,设置自检值为 20 000,选择 *C. pseudoactatum* 作为外类群.

表 1 白及病原真菌 PCR 扩增所用引物

DNA 序列	引物	引物序列(5'-3')	参考文献
ITS	ITS-1	CTTGTCATTTAGAGGAAGTAA	[17]
	ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	[18]
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	[19]
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	[19]
TUB2	TUB-2T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	[20]
	TUB-2Bt-2b	ACCTCAGTGTAGTGACCTTGGC	[20]
CHS-1	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	[21]
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	[21]
GAPDH	Gpd1	ATTGGCCGCATCGTCTTCCGCAA	[22]
	Gpd2	CCCACTCGTTGTTCGTACCA	[22]
HIS3	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	[23]
	CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGA CTG	[23]

表 2 本研究中系统发育分析所用炭疽病属菌株相关信息和 GeneBank 登录号

种名	菌株号	GeneBank 登录号					
		ITS	GAPDH	CHS-1	HIS3	ACT	TUB2
<i>C. pyricola</i>	CBS 128531	JQ948445	JQ948776	JQ949106	JQ949436	JQ949766	JQ950096
<i>C. acerbum</i>	CBS 128530	JQ948459	JQ948790	JQ949120	JQ949450	JQ949780	JQ950110
<i>C. johnstonii</i>	CBS 128532	JQ948444	JQ948775	JQ949105	JQ949435	JQ949765	JQ950095
<i>C. simmondsii</i>	CBS 122122	JQ948276	JQ948606	JQ948937	JQ949267	JQ949597	JQ949927
<i>C. pseudoacutatum</i>	CBS 436. 77	JQ948480	JQ948811	JQ949141	JQ949471	JQ949801	JQ950131
<i>C. paranaense</i>	CBS 134729	KC204992	KC205026	KC205043	KC205004	KC205077	KC205060
<i>C. rhombiforme</i>	CBS 129953	JQ948457	JQ948788	JQ949118	JQ949448	JQ949778	JQ950108
<i>C. cuscutae</i>	IMI 304802	JQ948195	JQ948525	JQ948856	JQ949186	JQ949516	JQ949846
<i>C. godetiae</i>	CBS 133. 44	JQ948402	JQ948733	JQ949063	JQ949393	JQ949723	JQ950053
<i>C. abscissum</i>	COAD 1877	KP843126	KP843129	KP843132	KP843138	KP843141	KP843135
<i>C. johnstonii</i>	IMI 357027	JQ948443	JQ948774	JQ949104	JQ949434	JQ949764	JQ950094
<i>C. godetiae</i>	IMI 381927	JQ948438	JQ948769	JQ949099	JQ949429	JQ949759	JQ950089
	CBS 129816	JQ948440	JQ948771	JQ949101	JQ949431	JQ949761	JQ950091
<i>C. paxtonii</i>	IMI 165753	JQ948285	JQ948615	JQ948946	JQ949276	JQ949606	JQ949936
<i>C. sloanei</i>	IMI 364297	JQ948287	JQ948617	JQ948948	JQ949278	JQ949608	JQ949938
<i>C. acutatum</i>	CBS 112996	JQ005776	JQ948677	JQ005797	JQ005818	JQ005839	JQ005860
	CBS 144. 29	JQ948401	JQ948732	JQ949062	JQ949392	JQ949722	JQ950052
<i>C. indonesiense</i>	CBS 127551	JQ948288	JQ948618	JQ948949	JQ949279	JQ949609	JQ949939
<i>C. lacticiphilum</i>	CBS 112989	JQ948289	JQ948619	JQ948950	JQ949280	JQ949610	JQ949940
	CBS 129827	JQ948290	JQ948620	JQ948951	JQ949281	JQ949611	JQ949941
<i>C. australe</i>	CBS 116478	JQ948455	JQ948786	JQ949116	JQ949446	JQ949776	JQ950106
<i>C. salicis</i>	CBS 607. 94	JQ948460	—	—	JQ949451	JQ949781	JQ950111
<i>C. orchidophilum</i>	CBS 631. 80	JQ948152	JQ948482	JQ948813	JQ949143	JQ949473	JQ949803
	CBS 119291	JQ948154	JQ948484	JQ948815	JQ949145	JQ949475	JQ949805
	IMI 309357	JQ948153	JQ948483	JQ948814	JQ949144	JQ949474	JQ949804
	BJ103. 2	MZ268251	MZ889101	MZ267729	MZ267730	MZ267728	MZ267731

2.6 不同杀菌剂对病原室内毒力测定

采用菌丝生长速率法测定杀菌剂对白及炭疽病菌的室内毒力,供试杀菌剂浓度依次设置为 0.01,0.1,1,6.25,10,12.5,25,50,100 $\mu\text{g/mL}$ ^[24],以无菌水作为空白对照,每处理重复 2 次,96 h 后采用十字交叉法测得不同处理的菌落直径,通过 Excel 2010 计算不同浓度杀菌剂对病原菌生长的抑制率.选取浓度为 0.01,0.1,1,10,100 $\mu\text{g/mL}$ 处理组展示药剂抑制效果.

$$I = [(d_c - d_t) / d_c] \times 100$$

式中, I 为抑制率(%), d_c 为空白对照菌落纯生长量, d_t 为实验组菌落纯生长量,菌落纯生长量通过实验组菌落平均直径减去接种菌饼直径测得.

采用 GraphPad Prism 8.0 以杀菌剂浓度为横坐标,抑制率为纵坐标制作杀菌剂抑制作用曲线图,并计算半数有效浓度(EC_{50}),判断不同杀菌剂的药效.

3 结果与分析

3.1 白及炭疽病田间症状

病害初期表现为叶片上出现深褐色的不规则状斑点,单个叶片出现多个病斑,病健交界处明显,后期病斑扩大,融合形成不规则的深褐色大病斑,继而整个叶片枯萎(图 1).该病害为白及种植基地多发病害,造成白及叶片脱落,植株死亡.

3.2 病原菌致病性测定

接种分离病原菌典型菌株 BJ103.2,叶片 3 d 后出现黄褐色病斑,6 d 后病斑扩大为椭圆形,接种部位有菌丝出现,9 d 后,病斑蔓延到整个叶片,叶片枯萎;对照组(CK)不发病(图 2),该症状与田间症状相似.再次从该发病叶片病健交界处分离病原菌,与所接种病原菌一致.依据柯赫氏法则,分离菌株 BJ103.2 为白及炭疽病的致病菌.



图 1 白及炭疽病发病症状

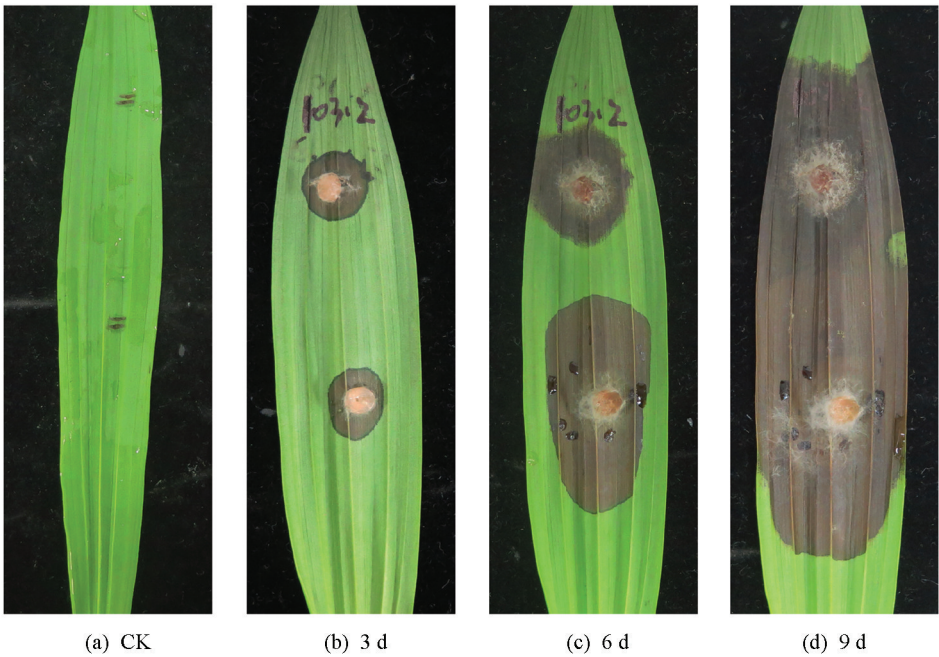


图 2 菌株接种叶片发病症状

3.3 病原菌形态学特征

在 PDA 平板上, 恒温培养箱内 25 ℃ 黑暗培养病原菌, 2 d 后菌丝直径为 1.2 cm, 7 d 后长成完整的圆形菌落, 平均生长速度为 0.43 cm/d. 表面为淡绿色毯状的气生菌丝, 整体凸起. 菌落背面中心为墨绿色, 外圈为绿色. 接种于 MEA 平板, 培养条件一致, 菌落呈圆形, 表面扁平, 毯状菌丝, 菌落背面中心为黄褐色, 外圈为淡黄色. 接种于 OA 平板, 培养条件一致, 菌落呈圆形, 表面扁平, 束状菌丝, 菌落背面中心为灰褐色, 外圈为白色(图 3a-3c). 显微镜下, 无分生孢子堆和刚毛, 分生孢子簇生于孢子梗, 分生孢子呈棒状形, 两端微钝或一端稍尖, 单胞, 接近无色, 大小为 $(8.6\sim19.4)\mu\text{m}\times(1.6\sim4.2)\mu\text{m}$ (图 3d). 孢子梗无色, 有隔; 分生孢子萌发可以从一端或两端同时长出牙管, 并在一端形成分生孢子附着孢, 呈椭圆形或灯泡形, 边缘平滑, 浅灰色, 大小为 $(3.4\sim9.5)\mu\text{m}\times(2.9\sim6.6)\mu\text{m}$ (图 3e). 依据 Damm 等^[13]形态学特征的报告, 初步判断该病原菌为炭疽病属真菌.

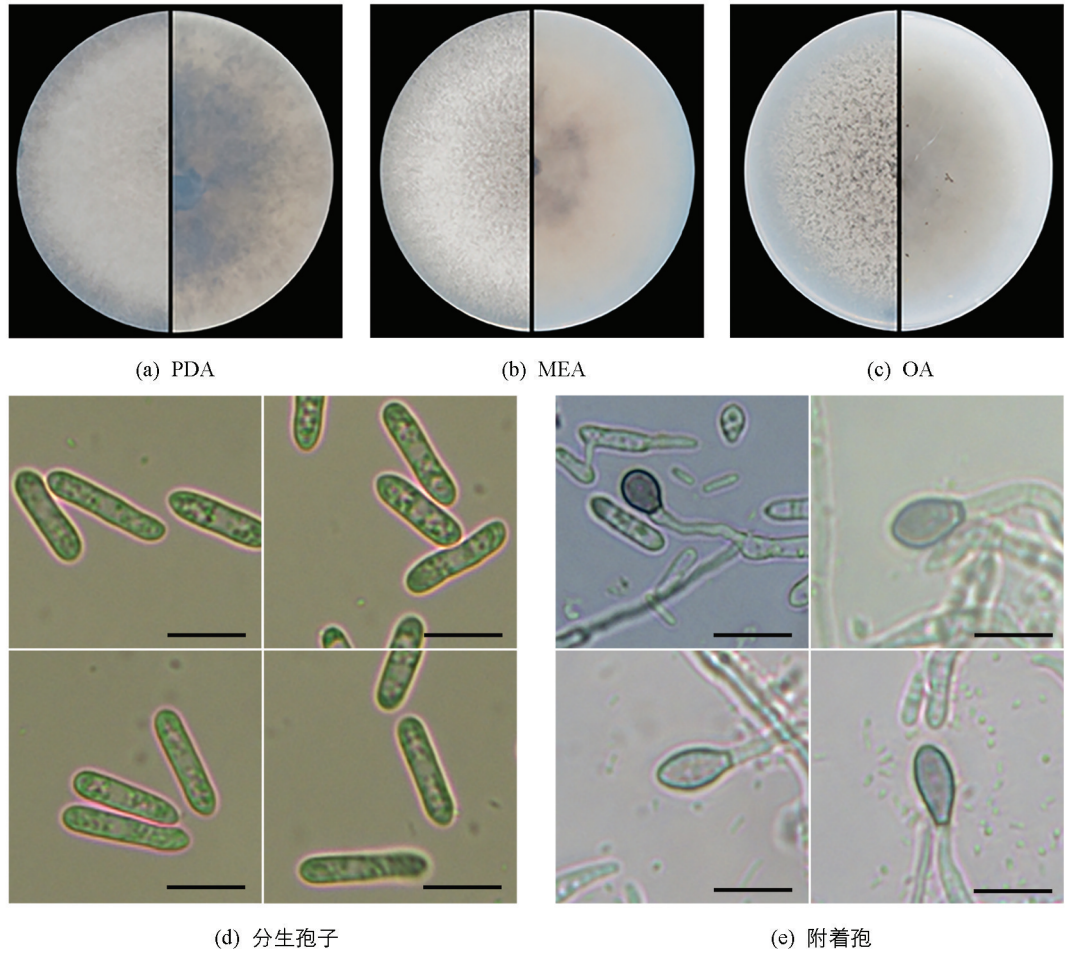


图 3 BJ103.2 形态学特征

3.4 系统发育学分析

以代表菌株 BJ103.2 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 测序后将序列上传 NCBI 数据库, 获得序列登录号, ITS(MZ268251), *GAPDH*(MZ889101), *CHS-1*(MZ267729), *HIS3*(MZ267730), *ACT*(MZ267728)以及 *TUB2*(MZ267731). ITS, *ACT*, *CHS-1*, *HIS3*, *GAPDH*, *TUB2* 序列 BLAST 结果显示, 菌株 BJ103.2 与 CBS 631.80 相应序列一致度高于 97%. 以 ITS 进行比对, BJ103.2 与 *C. orchidophilum*(登录号: JQ948152)序列一致度为 99.26%(533/537, 存在 2 个 Gap); 以 *ACT* 进行比对, 与 *C. orchidophilum*(登录号: JQ949473)序列一致度为 98.78%(243/246, 无 Gap); 以 *CHS-1* 进行比对, 与 *C. orchidophilum*(登录号: JQ948813)序列一致度为 98.23%(277/282, 无 Gap); 以 *HIS3* 进行比对, 与 *C. orchidophilum*(登录号: JQ949143)序列一致度为 97.64%(373/382, 无 Gap); 以 *GAPDH* 进行比对, 与 *C. orchidophilum*(登录号: JQ948482)序列一致度为 97.06%(198/204, 存在 2 个 Gap); 以 *TUB2* 进行比对, 与 *C.orchidophilum*(登录号: JQ949803)序列一致度为 99.18%(486/490, 存在 1 个 Gap). 构

建系统发育树, 结果显示, BJ103.2 与炭疽病属 *C. orchidophilum* 聚为同一支, 其自举值大于 90(图 4). 结合形态特征, 鉴定该病原菌为 *C. orchidophilum*.

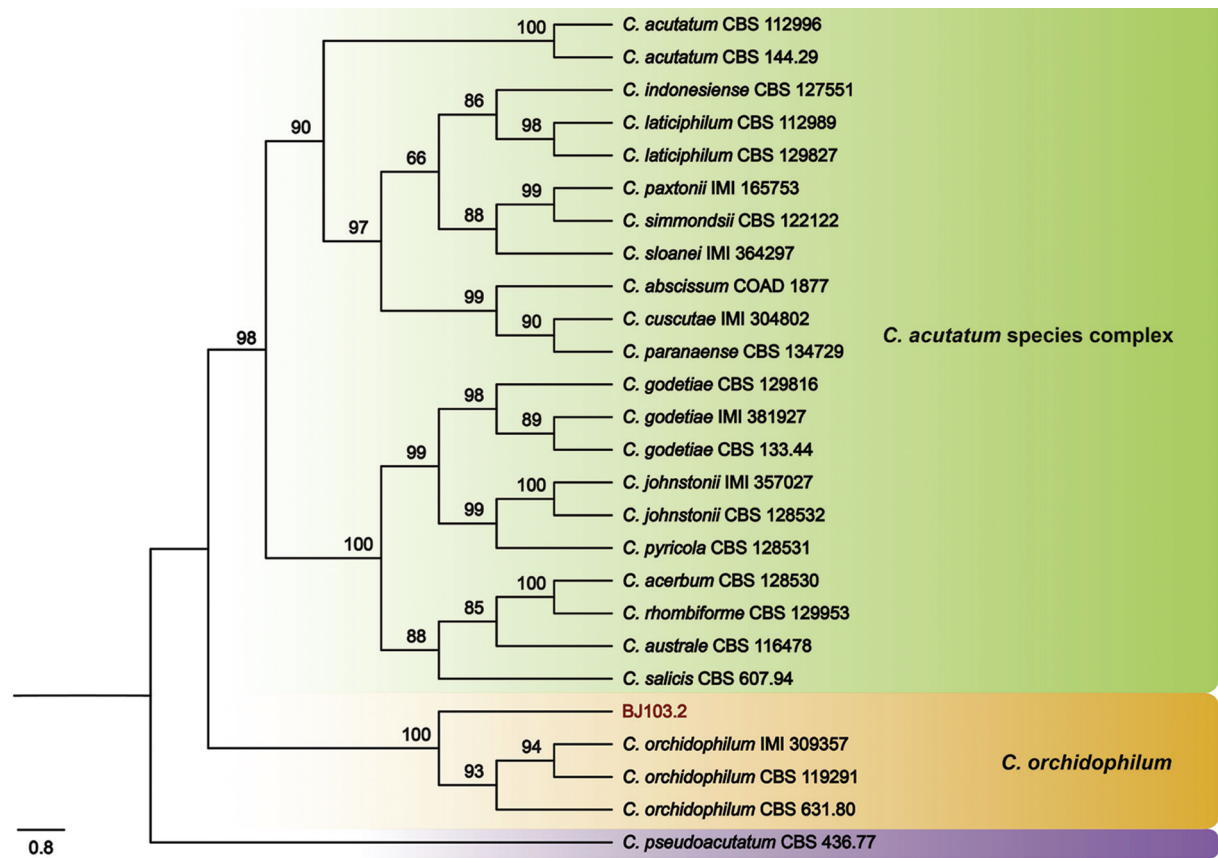


图 4 菌株 BJ103.2 及其相似菌株的系统进化树

3.5 不同杀菌剂对病原室内毒力测定

不同杀菌剂对白及炭疽病室内毒力测定结果见图 5 和图 6.

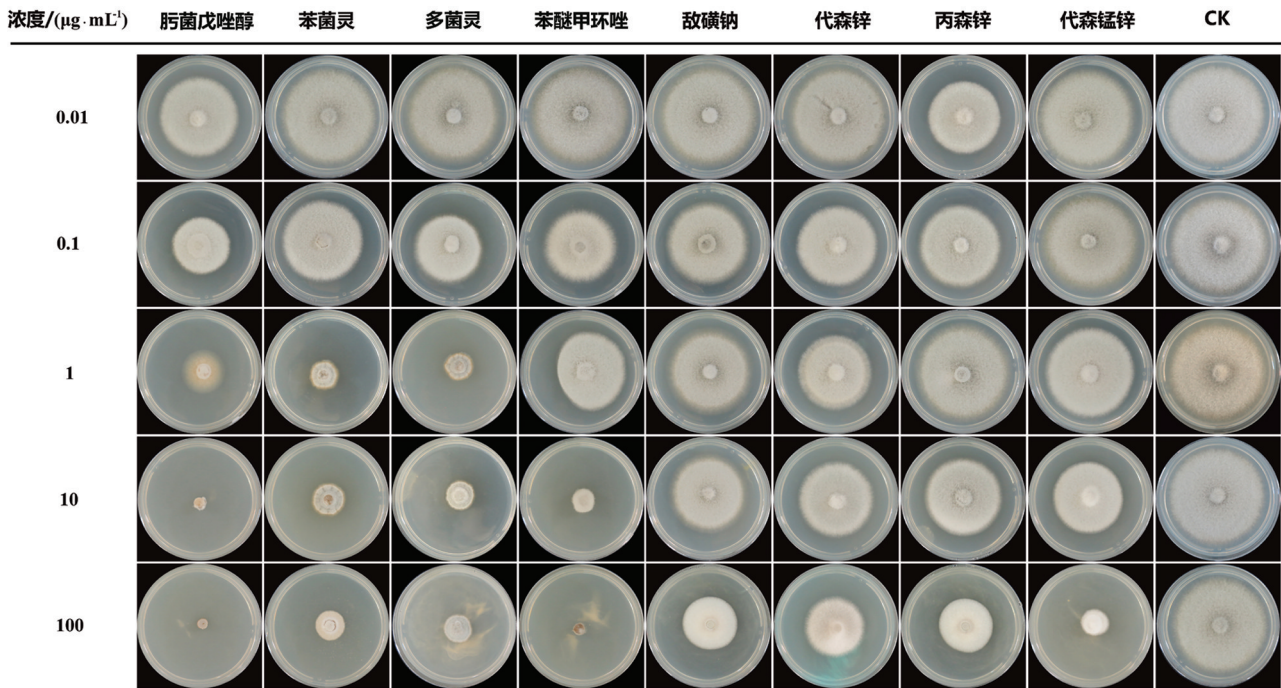
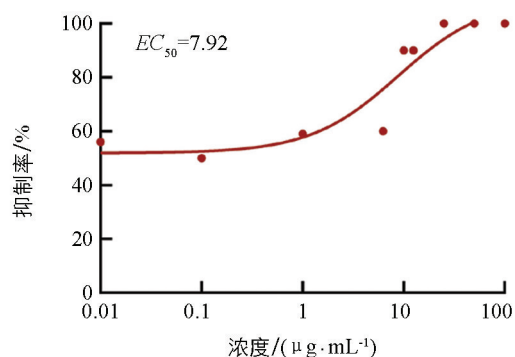
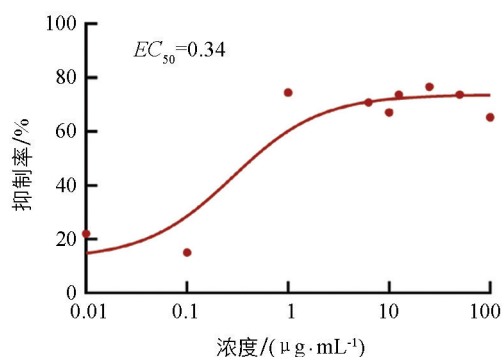


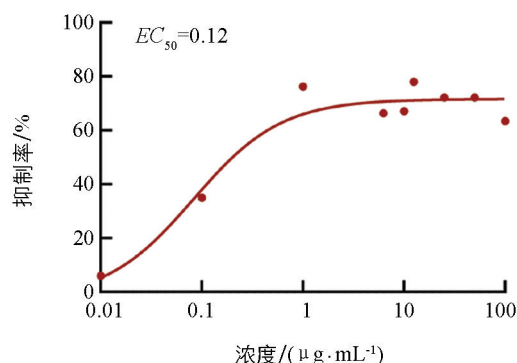
图 5 不同杀菌剂对白及炭疽病病原菌 BJ103.2 的抑制效果



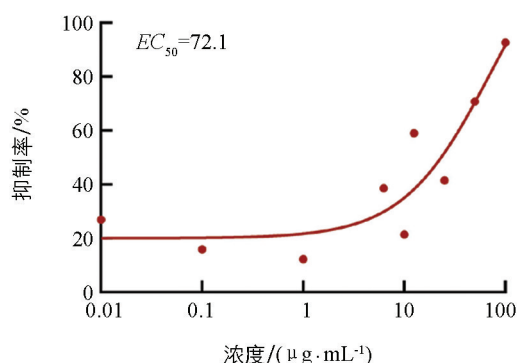
(a) 肟菌戊唑醇



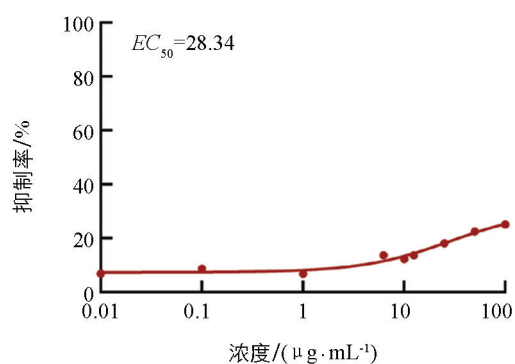
(b) 苯菌灵



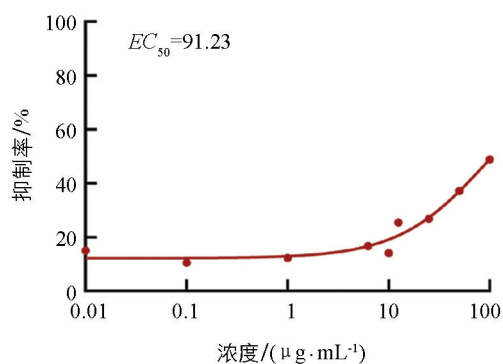
(c) 多菌灵



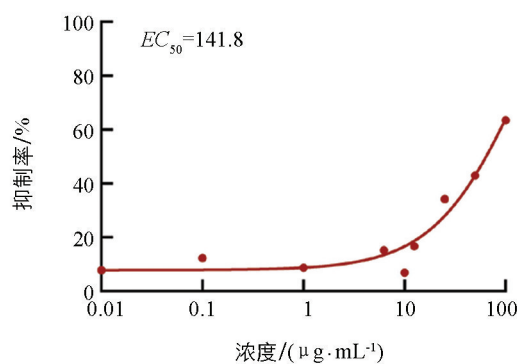
(d) 苯醚甲环唑



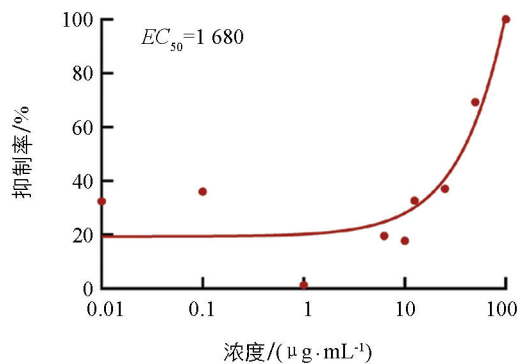
(e) 敌磺钠



(f) 代森锌



(g) 丙森锌



(h) 代森锰锌

图 6 不同杀菌剂对白及炭疽病的抑制效果曲线图

结果表明, 8 种药剂对病原菌生长均有抑制作用, 但不同杀菌剂对病原菌生长的抑制作用不同. 肟菌戊唑醇、多菌灵、苯菌灵、代森锰锌、苯醚甲环唑的抑制作用明显, 在浓度分别为 8.5, 5.8, 32.8,

48.8, 55.2 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率大于 60%, 但多菌灵并不能完全抑制病原菌的生长. 此外, 在浓度分别为 71.7 $\mu\text{g/mL}$ 和 98.2 $\mu\text{g/mL}$ 时, 脲菌戊唑醇与代森锰锌抑制率达到 100%, 但白及炭疽病对脲菌戊唑醇比较敏感, 其 EC_{50} 为 7.92 $\mu\text{g/mL}$, 代森锰锌 EC_{50} 为 1 680 $\mu\text{g/mL}$, 表明病原菌对其不敏感. 敌磺钠与代森锰锌抑制效果较差, 在炭疽病防治中不具有指导意义. 综上所述, 脲菌戊唑醇可作为防治白及炭疽病的有效杀菌剂.

4 讨论

炭疽病菌的寄主广泛, 传播途径多, 其孢子在土壤中越冬, 通过雨水或人工浇水在农田中广泛传播, 也可通过病虫与栽培人员进行传播. 其侵染能力强, 危害程度大, 对我国农业发展有严重的影响, 如 *C. fioriniae* 能导致四川肉桂炭疽病^[25], *C. fruticola* 能引起樱桃炭疽病^[26], *C. acutatum* 能引起西班牙扁桃炭疽病^[27]. *C. orchidophilum* 主要在兰科植物上引起炭疽病, 1902 年正式命名, 2011 年在我国南方的多种兰科植物上发现该种病原菌^[28]. 本研究通过致病实验, 结合形态学和分子生物学证据, 明确该种白及炭疽病病原菌为 *C. orchidophilum*, 在广西省内首次报道. 该病原在自然状态下致病力极强, 有待于进一步开展致病机理和科学防控研究.

在本研究中, 通过生长抑制实验, 发现脲菌戊唑醇能有效抑制 *C. orchidophilum* 在 PDA 上的生长. 脲菌戊唑醇水分散粒剂是脲菌酯和戊唑醇混合而成的杀菌剂, 其中脲菌酯是一种呼吸抑制剂, 通过抑制呼吸作用达到抑菌效果, 而戊唑醇可抑制病原真菌体内甾醇脱甲基化, 阻碍菌丝生长. 脲菌戊唑醇对水稻稻曲病、香蕉黑星病、黄瓜白粉病、炭疽病、白菜炭疽病和番茄早疫病有良好的防治效果^[29]. 研究表明, 在 PDA 上, 8 种不同杀菌剂对典型菌株 BJ103.2 菌丝生长的抑制作用不同, 其中脲菌戊唑醇对 *C. orchidophilum* 的抑制作用最强, EC_{50} 为 7.92 $\mu\text{g/mL}$, 暗示在种植基地喷洒脲菌戊唑醇防治该种白及炭疽病可取得较好的效果. 本研究中的药敏实验是在室内进行的, 由于田间环境与实验室环境存在一定差异, 所以在实际应用之前, 有必要开展后续田间药效实验.

参考文献:

- [1] 刘珈羽, 冯靖雯, 方皓, 等. 白及粉末入药历史沿革概述 [J]. 中成药, 2018, 40(1): 176-180.
- [2] 钱丽华, 尹舒雅, 陆娜, 等. 白芨资源综合利用现状及展望 [J]. 江苏农业科学, 2021, 49(19): 64-71.
- [3] 黄婷. 沼肥在白芨育苗及种植中的应用研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2019.
- [4] 刘春雷, 刘燕琴, 陈艾萌, 等. 珍稀药材白及“两段式”组培快繁技术研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(1): 30-36.
- [5] 赵彩呈, 洪英娣, 刘丽, 等. 丽江滇重楼和白芨根腐病病原菌鉴定 [J]. 贵州农业科学, 2019, 47(5): 28-30, 35.
- [6] CHEN J, ZHONG J, ZHANG C J, et al. First Report of *Fusarium fujikuroi* Causing Black Rot of *Bletilla striata* (Baiji) in China [J]. Plant Disease, 2019, 103(2): 377.
- [7] DU Y X, XU Y, JIANG J Y, et al. First Report of *Epicoccumsorghinum* Causing Leaf Spot on *Atractylodes lancea* in Hubei Province, China [J]. Plant Disease, 2020, 104(11): 3082.
- [8] WANG L. Architectural Typology [M]. Third Edition. Beijing: China Architecture and Building Press, 2019.
- [9] 张昊, 张争, 许景升, 等. 一种简单快速的赤霉病菌单孢分离方法——平板稀释画线分离法 [J]. 植物保护, 2008, 34(6): 134-136.
- [10] SCHINDELIN J, RUEDEN C T, HINER M C, et al. The Image Jecosystem: an Open Platform for Biomedical Image Analysis [J]. Molecular Reproduction and Development, 2015, 82(7-8): 518-529.
- [11] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [12] LUG Q, MORIYAMA E N. Vector NTI, a Balanced All-in-one Sequence Analysis Suite [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(4): 378-388.

[13] DAMM U, CANNON P F, WOUDENBERG J C, et al. The Colletotrichumboninense Species Complex [J]. Studiesin Mycology, 2012, 73(1): 1-36.

[14] MARIN-FELIX J, GROENEWALD L, CAI Q. Genera of PhytopathogenicFungi: GOPHY 1 [J]. Studies in Mycology, 2017, 86: 99-216.

[15] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Bio- logical Data [J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.

[16] ZHANG D, GAO F L, JAKOVLIĆ I, et al. PhyloSuite: an Integrated and Scalable Desktop Platform for Streamlined Molecular Sequence Data Management and Evolutionary Phylogenetics Studies [J]. Molecular Ecology Resources, 2020, 20(1): 348-355.

[17] GARDES M, BRUNS T D. ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes - Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts [J]. MolecularEcology, 1993, 2(2): 113-118.

[18] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylo- genetics [M] //PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.

[19] CARBONE I, KOHN L M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes [J]. My- cologia, 1999, 91(3): 553-556.

[20] GLASS N L, DONALDSON G C. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes [J]. AppliedandEnvironmental Microbiology, 1995, 61(4): 1323-1330.

[21] MYLLYS L, STENROOS S. A New Genes for Phylogenetic Studies of Lichenized Fungi: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Beta-Tubulin Genes [J]. The Lichenologist, 2002, 34(3): 237-246.

[22] CROUS P W, GAMS W, STALPERS J A, et al. MycoBank: an Online Initiative to Launch Mycology into the 21st Century [J]. Studies in Mycology, 2004, 50(1): 19-22.

[23] MORIWAKI J, TSUKIBOSHI T. Colletotrichum Echinochloae, a New Species on Japanese Barnyard Millet (Echinoch- loautilis) [J]. Mycoscience, 2009, 50(4): 273-280.

[24] 单体江, 宋慧云, 段志豪, 等. 短萼仪花炭疽病病原鉴定及其药剂筛选 [J]. 中国植保导刊, 2019, 39(2): 5-11.

[25] YU LL, ZHOU L, LIU W, et al. First Report of Fusariumfujikuroi Causing Black Rot of Macleayacordata in China [J]. Plant Disease, 2019, 103(9): 2476.

[26] ZHAOYANG T, LOU J, HE L, et al. First Report of Colletotrichumfructicola Causing Anthracnose on Cherry(Prunu- savium) in China [J]. Plant Disease, 2021, 106(1): 317.

[27] LÓPEZ-MORAL A, RAYA-ORTEGA M C, AGUSTÍ-BRISACH C, et al. Morphological, Pathogenic, and Molecular Characterization of *Colletotrichum acutatum* Isolates Causing Almond Anthracnose in Spain [J]. Plant Disease, 2017, 101(12): 2034-2045.

[28] YANG Y L, CAI L, YU Z N, et al. Colletotrichum Species on Orchidaceaein Southwest China [J]. Cryptogamie, My- cologie, 2011, 32(3): 229-253.

[29] 宋晓兵, 彭埃天, 凌金锋, 等. 75% 肟菌酯·戊唑醇水分散粒剂防治香蕉黑星病的应用效果 [J]. 植物保护, 2012, 38(6): 178-180, 185.

责任编辑 周仁惠