

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.06.005

黄雪铭, 刘泽, 胡贺晓, 等. 光叶菝葜叶斑病原鉴定与植物源杀菌剂毒力测定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(6): 56-67.

光叶菝葜叶斑病原鉴定与 植物源杀菌剂毒力测定

黄雪铭¹, 刘泽¹, 胡贺晓¹, 高乞¹, 韦荣昌², 周浩¹

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, 广西南宁 530007;

2. 广西农业科学院, 广西南宁 530007

摘要: 为明确广西光叶菝葜上新发现叶斑病的病原菌种类并筛选有效植物源杀菌剂, 采用组织分离法获得病原菌, 并通过活体叶片接种试验验证其致病性。结合柯赫氏法则、形态学特征及多基因系统发育分析(基于 ITS、SSU、LSU、TEF、GAPDH、RPB2 基因片段)进行综合鉴定。同时, 利用菌丝生长速率法测定了 6 种植物源杀菌剂(和厚朴酚、柠檬醛、香茅醛、香叶醇、麝香草酚和左旋香芹酮)对代表菌株 TFL18.1 的抑制效果, 该菌株分离自广西钦州光叶菝葜病叶。结果表明: 光叶菝葜叶斑病的病原菌为链格孢(*Alternaria alternata*); 室内毒力测定显示, 和厚朴酚的抑菌活性最强($EC_{50} = 45.56$ mg/L), 麝香草酚次之($EC_{50} = 63.69$ mg/L), 柠檬醛的毒力最弱($EC_{50} = 2084.00$ mg/L)。

关键词: 光叶菝葜; 叶斑病; 链格孢; 病原鉴定; 植物源杀菌剂

中图分类号: S435.672

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2026)06-0056-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification of the Pathogen Causing *Smilax glabra* Leaf Spot and Toxicity Evaluation of Botanical Fungicides

HUANG Xueming¹, LIU Ze¹, HU Hexiao¹,
GAO Qi¹, WEI Rongchang², ZHOU Hao¹

1. School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi Minzu University/Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modification, Nanning Guangxi 530007, China;

2. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning Guangxi 530007, China

Abstract: To identify the pathogen responsible for a newly discovered leaf spot disease on *Smilax glabra* in Guangxi, China and screen for effective botanical fungicides, this study obtained the pathogen via tissue isolation, verified its pathogenicity through in vivo inoculation tests. Comprehensive identification was

收稿日期: 2025-12-04

基金项目: 广西自然科学基金面上项目(2025GXNSFAA069875)。

作者简介: 黄雪铭, 硕士研究生, 主要从事植物-病原微生物分子互作研究。

通信作者: 周浩, 博士, 教授。

performed integrating Koch's postulates, morphological characteristics, and multigene phylogenetic analysis based on gene fragments of *ITS*, *SSU*, *LSU*, *TEF*, *GAPDH*, and *RPB2*. Meanwhile, the inhibitory effects of six botanical fungicides (honokiol, citral, citronellal, geraniol, thymol, and L-carvone) against the representative strain TFL18.1, which was isolated from diseased leaves of *S. glabra* in Qinzhou, Guangxi, were determined using the mycelial growth rate method. Results showed that the pathogen causing leaf spot disease on *S. glabra* was *Alternaria alternata*; in vitro toxicity tests revealed that honokiol exhibited the strongest antifungal activity ($EC_{50} = 45.56$ mg/L), followed by thymol ($EC_{50} = 63.69$ mg/L), while citral showed the weakest activity ($EC_{50} = 2\ 084.00$ mg/L).

Key words: *Smilax glabra* Roxb.; leaf spot; *Alternaria alternata*; pathogen identification; phyto-fungicide

光叶菝葜(*Smilax glabra* Roxb.)为菝葜科(Smilacaceae)菝葜属(*Smilax*)多年生藤本植物,其干燥根茎入药称“土茯苓”,在中医药中应用广泛。据报道该植物在全球分布于 17 个国家,在我国主要集中于南方省份,如广东、广西、湖南、湖北、四川及浙江等地^[1],除药用外,也常用于食品和茶饮的生产^[2]。光叶菝葜喜温暖湿润和荫蔽环境,多生长于海拔 2 000 m 以下的山坡或林下。在民族地区,光叶菝葜长期作为民间药物使用,常用于妇科炎症、风湿痹痛及梅毒等疾病的防治,深得民众信赖^[3]。现代药理研究显示,光叶菝葜富含黄酮类、酚酸类和皂苷类等多种生物活性成分^[2]。研究还发现,其中茎、叶的黄酮含量显著高于根茎,叶中黄酮含量可达根茎的 12 倍^[4],表明其地上部分同样具备良好的药用与开发价值。

在广西,光叶菝葜作为一种重要药用资源,于南宁、钦州等地广泛种植。然而,在种植过程中常受多种病害威胁,主要包括炭疽病、叶斑病和锈病等^[5-7],严重影响药材的产量与质量,并对当地药用植物产业的可持续发展构成威胁。南宁某光叶菝葜种植基地发生的一种叶部病害,典型症状表现为叶片出现棕色圆形或不规则病斑,严重时引发叶组织坏死与早期落叶,对药材生产构成直接威胁。为此,本研究综合采用组织分离、形态学鉴定及基于多基因(*ITS*、*SSU*、*LSU*、*TEF*、*GAPDH* 和 *RPB2*)的系统发育分析等方法,以明确其病原菌的分类地位。在此基础上,进一步开展了植物源杀菌剂的室内筛选,以期筛选出高效、低毒的绿色防控药剂。研究成果可为光叶菝葜叶斑病的准确诊断与绿色防控提供科学依据,对保障药材安全生产具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试培养基及试剂

主要培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)由马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 20 g 和蒸馏水 1 000 mL 配制而成;燕麦琼脂培养基(OA)由燕麦片 30 g、琼脂粉 20 g 和蒸馏水 1 000 mL 配制;麦芽浸膏琼脂培养基(MEA)由麦芽浸膏 30 g、琼脂粉 20 g 和蒸馏水 1 000 mL 配制;查氏琼脂培养基(CZA)由 KNO_3 1 g、 $MgSO_4$ 0.25 g、KCl 0.5 g、葡萄糖 0.2 g、蔗糖 0.2 g、琼脂粉 15 g 和蒸馏水 1 000 mL 配制。

主要试剂包括 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、异戊醇、75%乙醇、三氯甲烷、液氮等。PCR 及电泳相关试剂包括普通 DNA Taq 聚合酶、10×EasyTaq Buffer、DNA Marker、GelRed、6×Loading Buffer、dNTP、TBE、琼脂糖、EDTA 等。

1.2 病样采集

2022 年 5 月在广西钦州光叶菝葜种植区发现一种叶斑病后,选取具有典型症状的罹病植株,同时移栽健康植株作为对照,共同置于广西民族大学试验大棚(温度 25~32 °C,相对湿度 75%~90%,自然光照)进行培养。在统一管理及定期浇水的条件下,持续观察并记录植株的发病进程。从中采集典型叶斑病样本,用于后续病原菌的分离与鉴定。

1.3 病原菌分离、纯化及保存

病原菌的分离参照常规组织分离法^[8]进行。选取光叶菝葜发病植株叶片,清洗晾干后,切取病健交界处 5 mm×5 mm 组织块作为分离材料。在超净工作台中,依次采用 75%乙醇处理 30 s、1%次氯酸钠溶液

表面消毒 3 min, 随后用无菌水漂洗 3 次以去除残留消毒剂。将表面消毒后的组织块接种至含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 PDA 平板, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下倒置培养。待菌丝萌发后, 挑取菌落边缘新鲜菌丝转接至新的 PDA 平板进行继代培养。进一步采用单孢分离法纯化菌株: 用无菌水洗脱培养 7 d 的菌落孢子, 制备孢子悬液, 经血球计数板调整浓度至 1 个孢子/ μL , 取 2 μL 进行平板划线, 在显微镜下定位单个萌发孢子并挑取至新 PDA 平板, 获得纯培养物, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下采用 PDA 斜面保存备用。

1.4 致病性试验

将分离纯化的菌株接种于含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 PDA 平板, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~5 d 备用。选取健康光叶菝葜植株, 用 75% 乙醇擦拭消毒叶片, 无菌水冲洗 3 次后用于致病性测定。采用刺伤接种法: 用 5 mm 打孔器制取菌丝块, 在叶片上以无菌针刺伤后覆盖菌块, 以空白 PDA 培养基块作为对照。接种后用保鲜袋包裹保湿, 定期观察并记录发病情况。发病后重新分离病原菌并按柯赫氏法则验证。

1.5 形态学观察

将供试菌株分别接种于 PDA、OA、MEA 平板中央, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养。培养过程中测量菌落直径, 待菌落长满培养基时, 记录菌落颜色、质地及培养基背面色泽变化, 并拍照保存。无菌条件下, 用接种针挑取少量菌丝于载玻片中央, 加 1 滴无菌蒸馏水制成临时装片, 在光学显微镜下观察分生孢子形态、大小及产孢细胞等特征, 对典型结构显微拍照, 并用 ImageJ 1.53 软件测量其尺寸。参照 Woudenberg 等^[9]的方法进行形态学初步鉴定。

1.6 分子生物学鉴定

将纯培养菌株接种于 PDA 培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 7 d, 用无菌牙签刮取新鲜菌丝, 用 CTAB 法^[10]提取基因组 DNA。以该 DNA 为模板, 采用表 1 所列引物对 *ITS*、*SSU*、*LSU*、*RPB2*、*TEF* 和 *GAPDH* 片段进行 PCR 扩增(所有引物均由武汉奥科鼎盛生物科技有限公司合成)。PCR 体系(25 μL): DNA 模板 1 μL (约 50 ng)、10 \times EasyTaq Buffer 2.5 μL 、dNTP 混合液(各 2.5 mM)0.5 μL 、上游及下游引物(10 μM)各 0.5 μL 、EasyTaq DNA 聚合酶(5 U/ μL)0.1 μL , 无菌去离子水补至 25 μL 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 35 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s); 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送公司双向测序。使用 Vector NTI 软件对测序峰图进行校对与拼接。将所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性比对, 并将最终确认的序列提交至 GenBank 获取登录号(表 2)。

表 1 光叶菝葜病原真菌 PCR 扩增所用引物

基因	引物	引物序列	参考文献
<i>ITS</i>	ITS-1	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	[11]
	ITS-4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	[11]
<i>SSU</i>	NS1	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	[11]
	NS4	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG	[11]
<i>LSU</i>	LROR	GTA CCC GCT GAA CTT AAG C	[12]
	LR5	TCC TGA GGG AAA CTT CG	[13]
<i>TEF</i>	EF-983F	GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT	[14]
	EF1-2128R	AT GAC ACC RAC RGC RAC RGT YTG	[14]
<i>GAPDH</i>	GPD-1	CAACGGCTTCGGTTCGCATTG	[15]
	GPD-2	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	[15]
<i>RPB2</i>	RPB2-5F	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	[16]
	fRPB2-7cR	CCC ATW GCY TGC TTM CCC AT	[16]

参照 Woudenberg 等^[9]的方法,从 NCBI 下载 47 株近缘菌株及外类群 *Cicatricea salina* CBS 302.84 的 *ITS*、*SSU*、*LSU*、*RPB2*、*TEF* 和 *GAPDH* 序列。使用 PhyloSuite v1.2.2 软件^[17]进行如下处理:首先将各基因位点的序列分别采用 MAFFT 模块进行比对,然后通过 Gblocks 模块去除模糊比对区域(保留保守位点),最后使用 concatenated sequence 模块将不同基因的比对序列拼接成超级矩阵。利用 Partition-Finder 模块筛选最优的分区方案和核苷酸替代模型。基于处理后的序列数据集,采用 IQ-TREE 软件构建最大似然(Maximum Likelihood, ML)系统发育树,自举检验(Bootstrap)重复次数为 20 000 次。同时,使用 MrBayes 模块进行贝叶斯推断(Bayesian Inference, BI),运行 4 条马尔可夫链,每 1 000 代采样一次,直至分裂频率标准差低于 0.01。最终,使用 FigTree 软件对系统发育树进行可视化与注释。

表 2 用于系统发育分析的链格孢属菌株及下载的基因序列

菌株名称	菌株编号	<i>ITS</i>	<i>LSU</i>	<i>SSU</i>	<i>TEF</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RPB2</i>
<i>A. alstroemeriae</i>	CBS 118808	KP124296	KP124447	KP124917	KP125071	KP124153	KP124764
<i>A. alstroemeriae</i>	CBS 118809	KP124297	KP124448	KP124918	KP125072	KP124154	KP124765
<i>A. alternantherae</i>	CBS 124392	KC584179	KC584251	KC584506	KC584633	KC584096	KC584374
<i>A. alternata</i>	CBS 103.33	KP124302	KP124453	KP124923	KP125077	KP124159	KP124770
<i>A. alternata</i>	CBS 195.86	KP124317	KP124469	KP124939	KP125093	KP124173	KP124785
<i>A. alternata</i>	CBS 918.96	AF347032	KC584311	KC584567	KC584693	AY278809	KC584435
<i>A. alternata</i>	CBS 102595	FJ266476	KC584284	KC584540	KC584666	AY562411	KC584408
<i>A. alternata</i>	CBS 102602	KP124332	KP124484	KP124954	KP125108	KP124187	KP124800
<i>A. alternata</i>	CBS 102604	KP124334	KP124486	KP124956	KP125110	AY562410	KP124802
<i>A. arborescens</i>	CBS 101.13	KP124392	KP124546	KP125016	KP125170	KP124244	KP124862
<i>A. arborescens</i>	CBS 102605	AF347033	KC584253	KC584509	KC584636	AY278810	KC584377
<i>A. arborescens</i>	CBS 119544	KP124408	KP124561	KP125031	KP125186	JQ646321	KP124878
<i>A. arborescens</i>	CBS 119545	KP124409	KP124562	KP125032	KP125187	KP124260	KP124879
<i>A. betae-kenyensis</i>	CBS 118810	KP124419	KP124572	KP125042	KP125197	KP124270	KP124888
<i>A. burnsii</i>	CBS 118816	KP124423	KP124576	KP125046	KP125201	KP124273	KP124892
<i>A. burnsii</i>	CBS 118817	KP124424	KP124577	KP125047	KP125202	KP124274	KP124893
<i>A. eichhorniae</i>	CBS 489.92	KC146356	KP124579	KP125049	KP125204	KP124276	KP124895
<i>A. gaisen</i>	CBS 632.93	KC584197	KC584275	KC584531	KC584658	KC584116	KC584399
<i>A. gaisen</i>	CBS 118488	KP124427	KP124581	KP125051	KP125206	KP124278	KP124897
<i>A. gossypina</i>	CBS 102597	KP124432	KP124586	KP125056	KP125211	KP124281	KP124902
<i>A. gossypina</i>	CBS 102601	KP124433	KP124587	KP125057	KP125212	KP124282	KP124903
<i>A. iridialustralis</i>	CBS 118404	KP124434	KP124588	KP125058	KP125213	KP124283	KP124904
<i>A. iridialustralis</i>	CBS 118486	KP124435	KP124589	KP125059	KP125214	KP124284	KP124905
<i>A. jacinthicola</i>	CBS 878.95	KP124437	KP124591	KP125061	KP125216	KP124286	KP124907
<i>A. jacinthicola</i>	CBS 133751	KP124438	KP124592	KP125062	KP125217	KP124287	KP124908
<i>A. jacinthicola</i>	CPC 25267	KP124439	KP124593	KP125063	KP125218	KP124288	KP124909
<i>A. longipes</i>	CBS 113.35	KP124440	KP124594	KP125064	KP125219	KP124289	KP124910
<i>A. longipes</i>	CBS 540.94	AY278835	KC584285	KC584541	KC584667	AY278811	KC584409
<i>A. tomato</i>	CBS 103.30	KP124445	KP124599	KP125069	KP125224	KP124294	KP124915

续表 2

菌株名称	菌株编号	ITS	LSU	SSU	TEF	GAPDH	RPB2
<i>A. tomato</i>	CBS 114.35	KP124446	KP124600	KP125070	KP125225	KP124295	KP124916
<i>A. brassicae</i>	CBS 116528	KC584185	KC584258	KC584514	KC584641	KC584102	KC584382
<i>A. dauci</i>	CBS 117097	KC584192	KC584268	KC584524	KC584651	KC584111	KC584392
<i>A. juxtiseptata</i>	CBS 119673	KC584202	KC584282	KC584538	KC584664	KC584122	KC584406
<i>A. nobilis</i>	CBS 116490	KC584208	KC584291	KC584547	KC584673	KC584127	KC584415
<i>A. petroselinii</i>	CBS 112.41	KC584211	KC584295	KC584551	KC584677	KC584130	KC584419
<i>A. porri</i>	CBS 116698	DQ32370	KC584297	KC584553	KC584679	KC584132	KC584421
<i>A. pseudorostrata</i>	CBS 119411	JN383483	KC584298	KC584554	KC584680	KC562406	KC584422
<i>A. radicina</i>	CBS 245.67	KC584213	KC584299	KC584555	KC584681	KC584133	KC584423
<i>A. simsimi</i>	CBS 115265	JF780937	KC584304	KC584560	KC584686	KC584137	KC584428
<i>A. smyrnii</i>	CBS 109380	AF229456	KC584305	KC584561	KC584687	KC584138	KC584429
<i>A. aspera</i>	CBS 115269	KC584242	KC584349	KC584607	KC584734	KC584166	KC584474
<i>A. concatenata</i>	CBS 120006	KC584246	KC584355	KC584613	KC584740	AY76295	KC584480
<i>A. chartarum</i>	CBS 200.67	AF229488	KC584356	KC584614	KC584741	KC584172	KC584481
<i>A. helianthiinficiens</i>	CBS 117370	KC584200	KC584278	KC584534	KC584661	KC584119	KC584402
<i>A. nepalensis</i>	CBS 118700	KC584207	KC584290	KC584546	KC584672	KC584126	KC584414
<i>A. solidaccana</i>	CBS 118698	KC584219	KC584308	KC584564	KC584690	KC584141	KC584432
<i>A. conoidea</i>	CBS 132.89	AF348226	KC584327	KC584585	KC584711	FJ348227	KC584452

注: 菌株名称中 *A.* 为 *Alternaria*; ITS 为内转录间隔区; LSU 为核糖体大亚基; SSU 为核糖体小亚基; TEF 为翻译延伸因子; GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶; RPB2 为 RNA 聚合酶 II 第二大亚基。

1.7 不同杀菌剂的室内毒力测定

选用和厚朴酚(麦克林, 纯度 $\geq 98\%$, 货号 M813634)、柠檬醛(麦克林, 纯度 97% , 货号 C804526)、香茅醛(麦克林, 纯度 96% , 货号 C805140)、香叶醇(麦克林, 纯度 98% , 货号 G810439)、麝香草酚(麦克林, 纯度 98% , 货号 T818893)和左旋香芹酮(麦克林, 纯度 99% , 货号 L805683)6种植物源杀菌剂进行室内毒力测定。根据各化合物的溶解特性, 先配制成 $50\sim 100\text{ mg/mL}$ 母液, 再用无菌 PDA 培养基逐级稀释至预试确定的浓度梯度, 并添加终浓度 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 氯霉素以抑制细菌污染。将药液与预冷至约 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 的 PDA 充分混匀后倒板, 凝固制成含药平板。确定杀菌剂浓度^[18]及前期预试验, 设置 5 个浓度梯度。用 5 mm 无菌打孔器切取菌落边缘菌丝块, 菌丝面朝下接种于含药平板中央, 每浓度 3 次重复, 以无药 PDA 为空白对照。接种皿用封口膜密封, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 倒置培养 5 d 后, 采用十字交叉法测量各处理的菌落直径, 并按以下公式计算菌丝生长抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}) / (\text{对照组菌落直径} - 0.5\text{ cm}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: 0.5 cm 为接种菌丝块的直径。

1.8 统计分析

试验数据整理后, 计算平均值与标准差。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较组间差异, 若存在显著性($p < 0.05$), 则进一步使用 Tukey 法进行多重比较。采用非线性回归模型进行毒力回归分析, 计算各药剂的半数有效浓度(EC_{50})、 95% 置信区间(95% CI)、斜率及决定系数(R^2)。试验结果均以平均值 \pm 标准差表示, 并采用柱状图与折线图进行可视化。

2 结果与分析

2.1 病害症状

2022 年 5 月,在广西南宁光叶菝葜种植基地发现叶斑病为害。病害初期表现为直径 1~2 mm 的深褐色圆形小斑,边缘清晰;随着病情发展,病斑数量增多并逐渐扩展为 3~5 mm 的圆形或近圆形斑块,颜色由浅棕色转为深棕色(图 1)。在高湿(相对湿度>90%)环境下,多个病斑相互融合,造成叶片大面积枯死,可见深棕色轮纹,严重时叶片出现萎蔫或脱落现象。

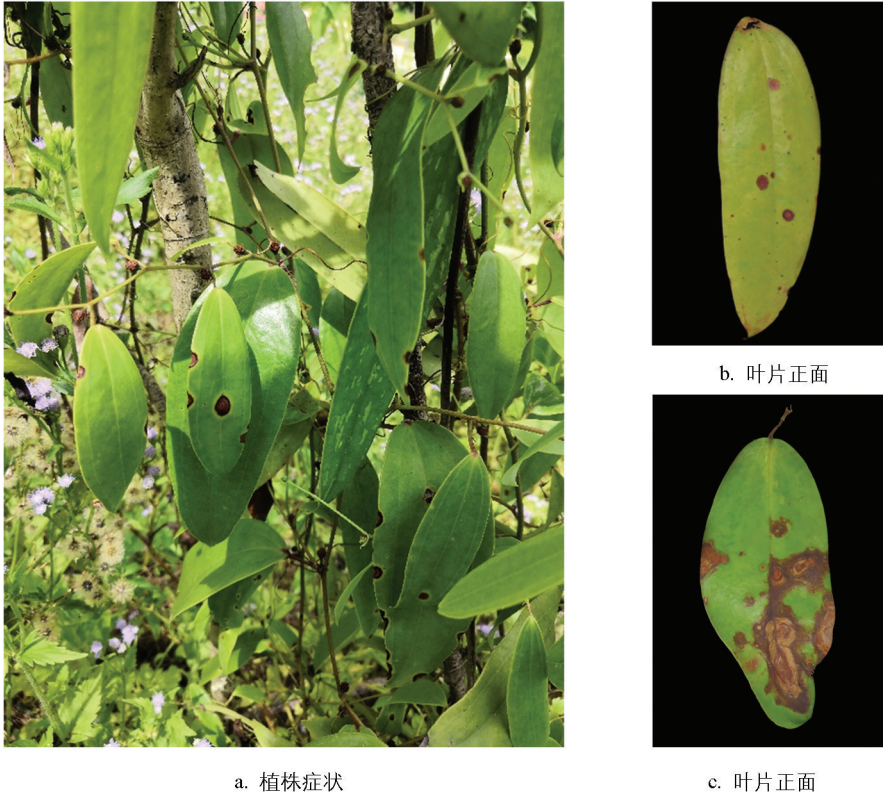


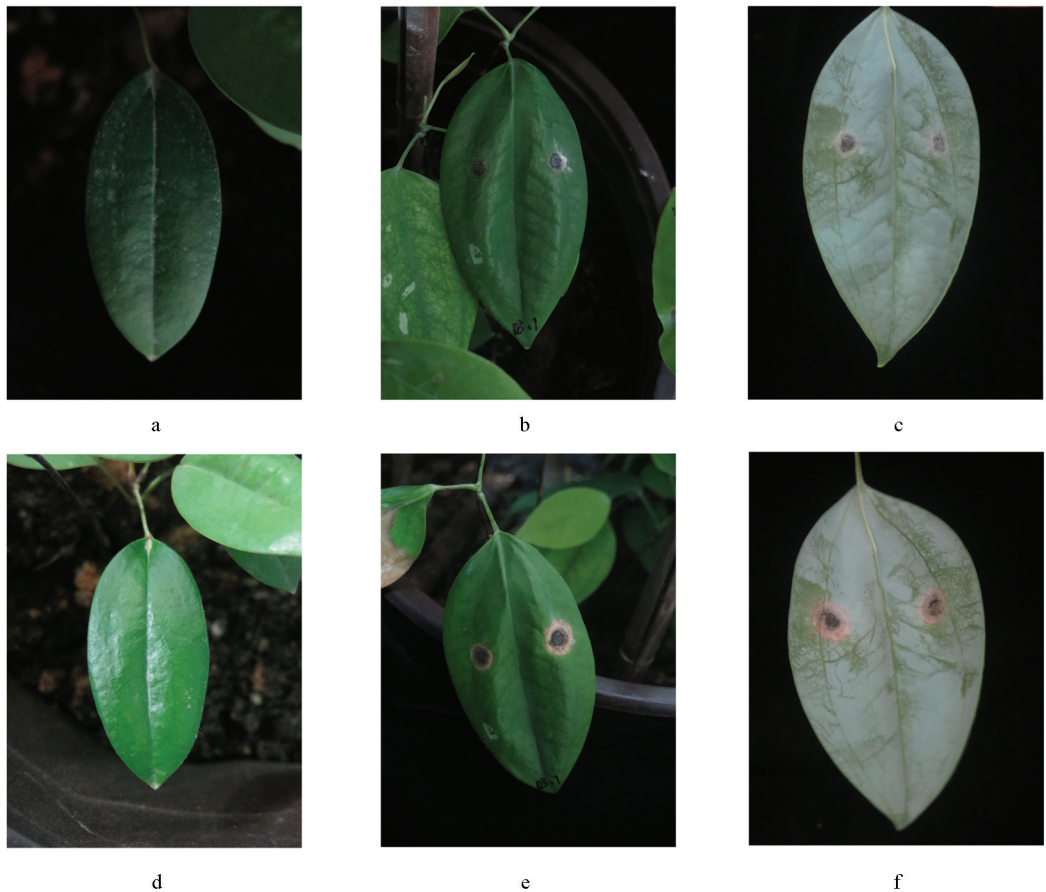
图 1 光叶菝葜田间自然病斑

2.2 病原分离与致病性测定

通过组织分离法共获得 9 株真菌分离物,其菌落形态特征基本一致。经叶片接种测定,所有菌株均能在光叶菝葜上引起叶斑症状。选取代表性菌株 TFL18.1 进行单孢纯化后用于后续致病性研究。采用菌丝块接种法进行回接试验,将直径 5 mm 的菌丝块贴接于经表面刺伤的健株叶片上。接种第 3 d,叶片开始出现规则的圆形浅色褪绿病斑(图 2b、2c);至第 6 d,病斑持续扩展,形成棕黄色坏死斑,表面产生灰白色霉状物(图 2e、2f),其症状特征与田间观察结果类似。空白对照叶片在整个试验期间无病斑(图 2a)。从发病组织重新分离获得的菌株,其形态特征与原始菌株 TFL18.1 一致,符合柯赫氏法则的验证要求,据此确认菌株 TFL18.1 为光叶菝葜叶斑病的致病菌。

2.3 病原菌形态学鉴定

将菌株 TFL18.1 分别接种于 PDA、OA 和 MEA 培养基,于 28 °C 黑暗条件下培养 6 d 后,观察其菌落及显微形态特征。在 PDA 培养基上,菌落扩展迅速,直径达 9 cm,覆盖整个培养皿;气生菌丝呈白色且生长丰密,菌落正面无明显色素产生(图 3a),背面中心为黑色,边缘呈浅棕色(图 3d)。在 OA 培养基上,菌落呈规则圆形;气生菌丝茂密、白色,中心区域呈灰黑色(图 3b);背面中心为深灰色,向外渐变为淡灰褐色,边缘为白色(图 3e)。在 MEA 培养基上,菌落为圆形,气生菌丝致密、呈绒毛状,白色(图 3c);背面中



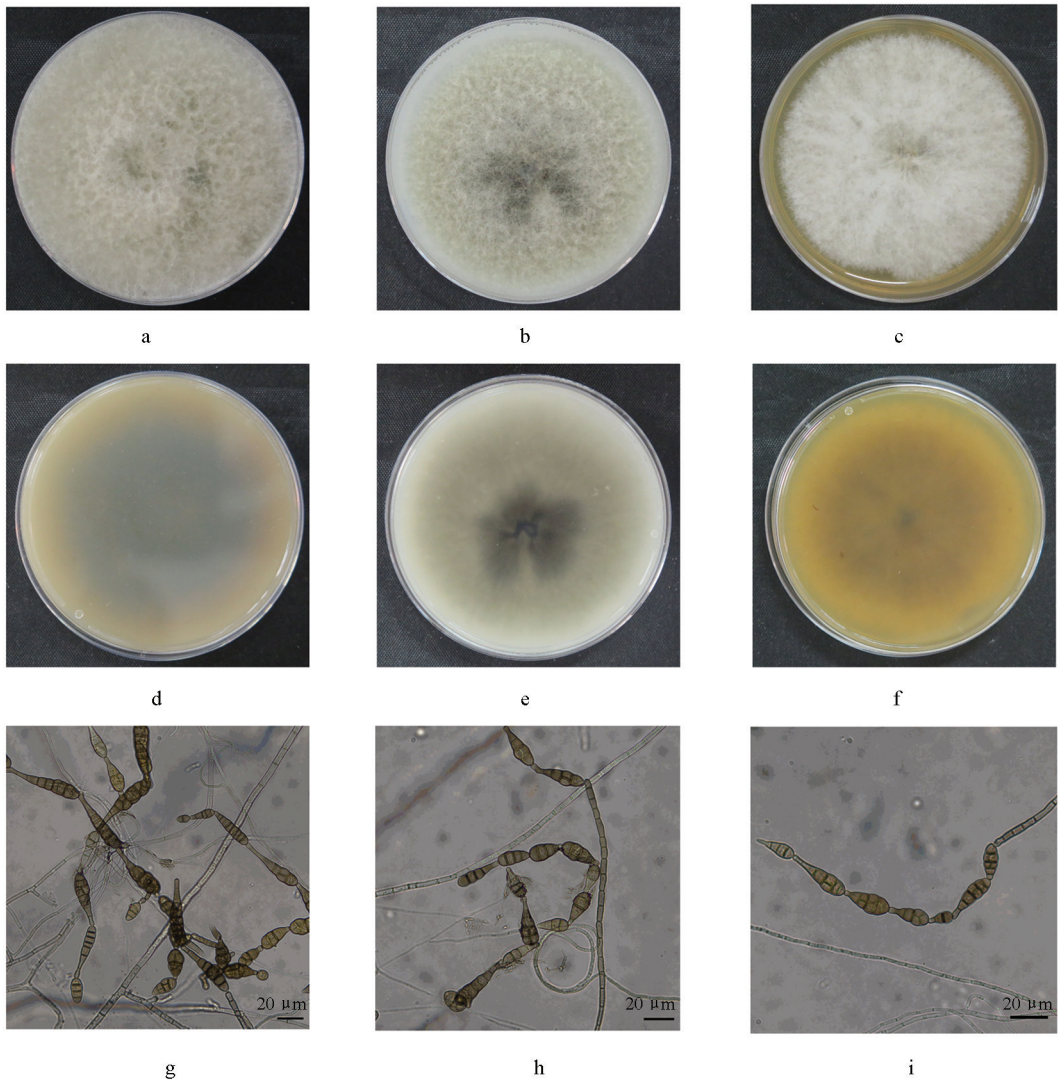
a: 空白对照组(3 d); b、c: 菌株 TFL18.1 接种后叶片正反面的病害症状(3 d); d: 空白对照(6 d); e、f: 菌株 TFL18.1 接种后叶片正反面的病害症状(6 d)。

图 2 菌株 TFL18.1 致病性接种症状

心为土黄色, 向边缘逐渐过渡为浅黄色(图 3f)。显微结构观察表明, 分生孢子梗单生或簇生, 直立或微弯曲, 分枝较少; 分生孢子呈棕色至褐色, 形态多样, 包括棒状、梨形或椭圆锥形, 具横隔膜与纵隔膜, 隔膜处略缢缩, 孢子大小为 $(19\sim 34)\mu\text{m} \times (3.5\sim 12.5)\mu\text{m}$ (图 3g、3h、3i)。综合上述菌落形态与孢子显微特征, 菌株 TFL18.1 符合链格孢属(*Alternaria*)^[9]的典型特征, 初步鉴定为一种链格孢菌(*Alternaria* sp.)。

2.4 分子生物学鉴定

为准确鉴定菌株 TFL18.1 的分类地位, 本研究选用引物对 ITS-1/ITS-4、NS1/NS4、LROR/LR5、EF-983F/EF1-2128R、GPD-1/GPD-2 及 RPB2-5F/fRPB2-7cR, 以其基因组 DNA 为模板, 分别扩增 *ITS*、*SSU*、*LSU*、*TEF*、*GAPDH* 和 *RPB2* 基因片段, 各 PCR 产物经纯化后送至测序公司进行双向测序, 经拼接和校对后的长度分别为: 579、1 056、959、242、626 和 750 bp, 提交至 NCBI GenBank 分别获得登录号 *ITS* (PP292012)、*SSU* (PP292027)、*LSU* (PP292026)、*TEF* (PP318628)、*GAPDH* (PP318627)、*RPB2* (PP318626)。BLASTn 单基因比对分析显示, 6 个片段与 *Alternaria alternata* CBS 195.86 的相似度分别为 100% (*ITS*, 515/515 bp)、99% (*SSU*, 1 020/1 021 bp)、99% (*LSU*, 849/850 bp)、100% (*TEF*, 240/240 bp)、99% (*GAPDH*, 572/579 bp) 和 99% (*RPB2*, 732/736 bp)。进一步将上述 6 个基因序列进行串联, 分别采用最大似然法 (ML) 和贝叶斯推断法 (BI) 构建系统发育树(图 4)。结果显示, 菌株 TFL18.1 与 *A. alternata* 典型菌株聚于同一分支, 且该分支获得较高的统计支持 (ML Bootstrap 值 = 99%, BI 后验概率 = 1.00)。综合形态学特征与多基因系统发育分析结果, 确定引起光叶菝葜叶斑病的病原菌为 *A. alternata*。



a~c: 菌株 TFL18.1 在 PDA、OA 和 MEA 培养基上的菌落形态(正面); d~f: 菌株 TFL18.1 在 PDA、OA 和 MEA 培养基上的菌落形态(反面); g~i: 分生孢子及分生孢子梗。

图 3 链格孢菌菌株 TFL18.1 的菌落及分生孢子形态特征

2.5 不同植物源药剂的室内毒力测定

采用菌丝生长速率法测定 6 种植物源药剂对病原菌 TFL18.1 的抑制效果。结果表明,各药剂对菌丝生长的抑制效果存在显著差异,且抑制率均随浓度升高而增加(图 5)。在供试药剂中,和厚朴酚表现出最强的抑制活性,在 50 mg/L 浓度下抑制率达 62.23%,130 mg/L 时增至 82.52%。麝香草酚的抑菌效果次之,60 mg/L 浓度时抑制率为 47.96%。香叶醇在较高浓度下也显示出良好效果,900 mg/L 时抑制率为 73.17%。相比之下,柠檬醛与左旋香芹酮的抑菌能力较弱,在最高测试浓度(分别为 600 mg/L 和 500 mg/L)下,抑制率仅为 46.33%和 38.21%;香茅醛的效果最差,900 mg/L 时抑制率仅 37.40%。

毒力回归分析显示,6 种药剂的毒力回归方程拟合良好($R^2=0.8787\sim 0.9455$)。和厚朴酚的毒力最强, EC_{50} 值为 45.56 mg/L;麝香草酚次之, EC_{50} 值为 63.69 mg/L。香茅醛毒力中等, EC_{50} 值为 462.82 mg/L。香叶醇、左旋香芹酮和柠檬醛的毒力相对较弱, EC_{50} 值分别为 687.30、994.72 和 2 084.00 mg/L。各药剂毒力从大到小依次为:和厚朴酚、麝香草酚、香茅醛、香叶醇、左旋香芹酮、柠檬醛(表 3)。综上,和厚朴酚和麝香草酚对光叶菝葜叶斑病原菌表现出显著的抑制效果,具备作为该病害潜在绿色防控药剂的开发价值。

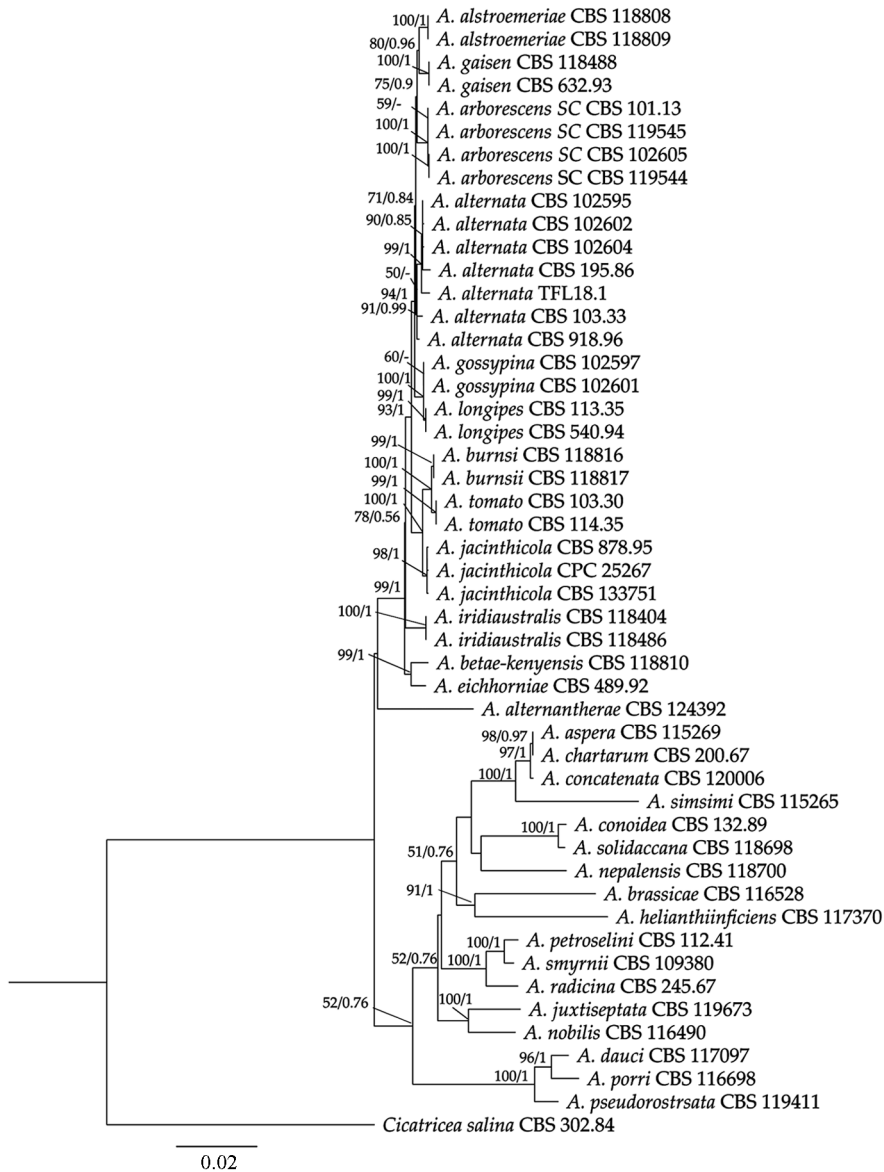


图 4 基于 ITS、SSU、LSU、TEF、GAPDH 和 RPB2 拼接序列的菌株 TFL18.1 系统发育树

表 3 6 种杀菌剂对菌株 TFL18.1 的毒力回归方程和 EC_{50} 值

杀菌剂	毒力回归方程	R^2	$EC_{50} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	95% 置信区间
柠檬醛	$y = 0.7127x + 2.7170$	0.9330	2084.00	1650.30~2890.50
香茅醛	$y = 0.8364x + 2.1500$	0.8787	2555.24	1980.50~3420.10
香叶醇	$y = 1.6490x + 0.6339$	0.8870	687.30	612.45~775.80
和厚朴酚	$y = 2.7120x + 0.5546$	0.9097	45.56	38.12~53.45
麝香草酚	$y = 2.4960x + 0.5263$	0.9455	63.69	57.20~71.18
左旋香芹酮	$y = 0.6974x + 2.5570$	0.8898	994.72	820.15~1250.60

注: x 代表药剂浓度的对数值; y 代表抑制率的几率值; R^2 代表决定系数; EC_{50} 代表抑制菌丝生长 50% 的有效浓度。

3 讨论与结论

3.1 讨论

链格孢属 (*Alternaria*) 隶属于真菌界子囊菌门 (Ascomycota)、座囊菌纲 (Dothideomycetes)、格孢腔菌

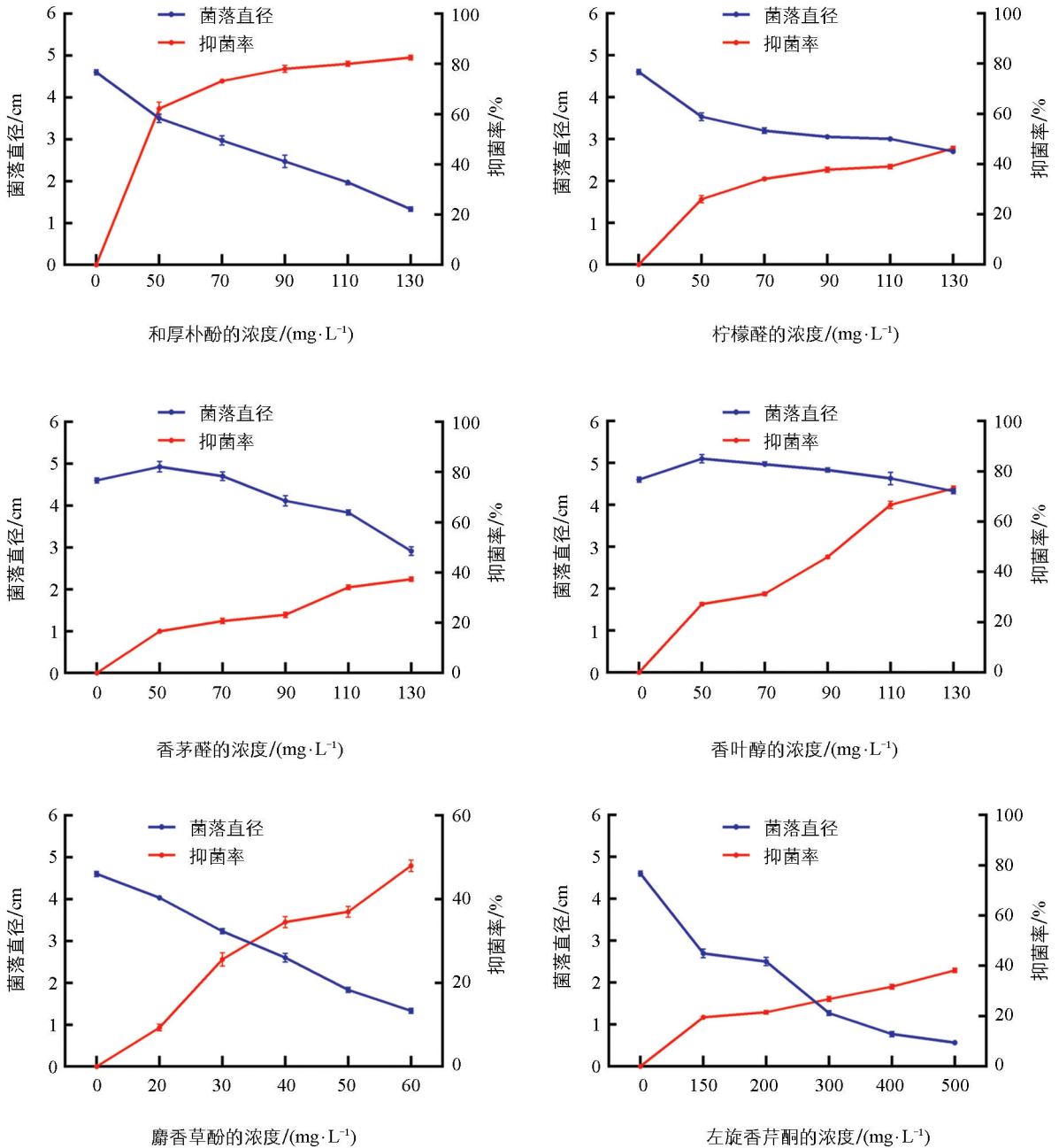


图 5 6 种植物源杀菌剂对菌株 TFL18.1 的抑制效果

目(Pleosporales)、格孢腔菌科(Pleosporaceae)^[19], 广泛分布于全球多种生态环境中, 包括寄生、腐生和内生类群, 可侵染多种作物及药用植物, 导致叶斑、果腐和茎腐等病害, 造成严重经济损失^[20-21]。Woudenberg 等^[9]依据多基因系统发育关系将该属划分为 28 个组, 其中 *A. alternata* 作为模式种被归入 Alternaria 组, 该组目前包含 11 个种和 1 个复合种^[22]。本研究通过致病性验证、形态特征及多基因(*ITS*、*SSU*、*LSU*、*TEF*、*GAPDH*、*RPB2*)联合系统发育分析, 明确了 *A. alternata* 为光叶菝葜(*Smilax glabra*)叶斑病的病原菌, 扩展了该病原的寄主范围, 为病害诊断与防控提供了依据。然而, 本研究样本仅来源于广西南宁和钦州的种植基地, 其结果可能难以代表该病害在不同生态区的流行规律和病原遗传多样性。今后需开展更大范围的病原收集(如覆盖华南地区主要种植区)与群体遗传结构分析, 并结合基因组数据深入解析其致病机制。关于 *A. alternata* 的致病机制, 现有研究表明其能产生多种寄主选择性毒素(Host-Specific toxins, HSTs), 如 ACT-毒素、AF-毒素等, 这些毒素可导致植物细胞质膜透性改变、电解质渗漏, 最终引起细胞坏死^[20]。本研究中观察到的叶片坏死症状可能与该菌产生相关毒素有关, 后续需进一步从代谢产物

层面解析其侵染机理。

植物病原真菌是为害植物的重要病原,超过70%的植物病害由真菌引起,对作物产量和品质构成严重威胁。虽然化学农药是目前最有效的防治手段,但长期大量使用已带来环境安全、人畜健康等诸多问题^[23]。相较于针对链格孢属病害的高效化学杀菌剂(如咯菌腈、啞菌环胺、咪鲜胺等,其 EC_{50} 值通常 $<1\text{ mg/L}$)^[24-26],本研究筛选出的和厚朴酚与麝香草酚的 EC_{50} 值(分别为 45.56 mg/L 和 63.69 mg/L)相对较高。然而,鉴于链格孢菌已对多种化学药剂(如啞酰菌胺、甲氧基丙烯酸酯类)产生严重的抗药性^[24-25],且植物源杀菌剂具有易降解、环境残留低及作用机制多样等优势,它们在病害综合治理及抗药性管理中仍具有重要的开发潜力。近年来,植物源活性成分因其广谱抗菌活性、环境友好性和较低毒性^[27],在植物病害绿色防控领域备受关注,已成为新农药研发的重要方向^[28]。诸如黄酮类、萜类和酚类等植物次生代谢产物,在微生物防控中通常具备多靶点作用机制,不易诱导抗药性^[25]。和厚朴酚与麝香草酚均为酚类或酚类衍生物,其抑菌机制可能涉及破坏病原菌细胞膜的完整性,导致细胞内含物外泄,或干扰线粒体呼吸链,抑制能量代谢^[29]。研究表明,石芥苳和红梗楠的丙酮提取物对茄链格孢菌(*Alternaria solani*)、茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)、香蕉炭疽刺盘孢菌(*Colletotrichum musae*)和水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)4种植物病原真菌均有抑制作用;其中,石芥苳提取物的抑菌率为 $70.2\%\sim 100\%$,红梗楠提取物的抑菌率为 $50.6\%\sim 92.8\%$ ^[26]。另有研究采用菌落生长速率法测定7种植物化学物质对果生刺盘孢(*Colletotrichum fructicola*)的抑制效果,发现和厚朴酚、厚朴酚、麝香草酚和香芹酚均表现出良好的抗真菌活性,其中和厚朴酚与厚朴酚在田间对果生刺盘孢引起的炭疽病也表现出良好的防治效果^[27]。本研究中,和厚朴酚与麝香草酚在室内条件下对光叶菝葜叶斑病原菌*A. alternata*表现出显著的抑制效果。然而,本研究目前仅局限于室内毒力筛选,尚未开展田间应用效果验证。后续需通过田间小区试验及大田示范,进一步评估该类药剂的实际防效与环境相容性;并应深入解析其抑菌作用机理,为药用植物病害的绿色可持续治理提供更为充分的科学依据。

3.2 结论

本研究首次证实引起光叶菝葜(*Smilax glabra*)叶斑病的病原菌为链格孢(*Alternaria alternata*),同时筛选出两种对致病菌株 TFL18.1 具有显著抑菌作用的高效植物源杀菌剂:和厚朴酚和麝香草酚。本研究结果不仅明确了病原菌分类地位,也为该病害的绿色防控提供了新选择,对促进光叶菝葜产业的健康可持续发展具有重要指导意义。

参考文献:

- [1] 王江威,苏晓琳,郑秀茜,等. 中药菝葜的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 化学工程师, 2020, 34(2): 50-53.
- [2] WU H, WANG Y, ZHANG B, et al. *Smilax glabra* Roxb; A Review of Its Traditional Usages, Phytochemical Constituents, Pharmacological Properties, and Clinical Applications [J]. Drug Design, Development and Therapy, 2022, 16: 3621-3643.
- [3] 叶晓燕,王钰莹,张雪玲,等. 菝葜的活性成分与药理作用的研究进展 [J]. 药学前沿, 2024, 28(9): 124-132.
- [4] 李玉琪,袁婷婷,茅凤燕,等. 光叶菝葜茎叶中黄酮类成分含量测定 [J]. 解放军药学报, 2017, 33(1): 50-52.
- [5] TAN H M, HU H X, LIU Z, et al. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum brasiliense* on *Smilax glabra* in China [J]. Plant Disease, 2025, 109(11): 2440.
- [6] LIU Z, WANG H Y, LIN S Y, et al. First Report of *Colletotrichum fructicola* Causing Leaf Spot on *Smilax glabra* in China [J]. Plant Disease, 2024, 108(4): 1112.
- [7] 吴春银,张晓琪,林颖,等. 光叶菝葜锈病的首次报道 [J]. 热带农业科学, 2020, 40(4): 37-40.
- [8] WANG L, WANG N, YU J L, et al. Identification of Pathogens Causing Alfalfa Fusarium Root Rot in Inner Mongolia, China [J]. Agronomy, 2023, 13(2): 456.
- [9] WOUDEBERG J H C, GROENEWALD J Z, BINDER M, et al. *Alternaria* Redefined [J]. Studies in Mycology, 2013, 75: 171-212.
- [10] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA [J]. Nucleic Acids

Research, 1980, 8(19): 4321-4325.

- [11] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics [M] //PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [12] REHNER S A, SAMUELS G J. Taxonomy and Phylogeny of *Gliocladium analysed* from Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences [J]. Mycological Research, 1994, 98(6): 625-634.
- [13] VILGALYS R, HESTER M. Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* Species [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(8): 4238-4246.
- [14] CARBONE I, ANDERSON J B, KOHN L M. Patterns of Descent in Clonal Lineages and Their Multilocus Fingerprints Are Resolved with Combined Gene Genealogies [J]. Evolution, 1999, 53(1): 11-21.
- [15] BERBEE M L, PIRSEYEDI M, HUBBARD S. *Cochliobolus* Phylogenetics and the Origin of Known, Highly Virulent Pathogens, Inferred from ITS and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Sequences [J]. Mycologia, 1999, 91(6): 964-977.
- [16] O'DONNELL K, KISTLER H C, CIGELNIK E, et al. Multiple Evolutionary Origins of the Fungus Causing Panama Disease of Banana; Concordant Evidence from Nuclear and Mitochondrial Gene Genealogies [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(5): 2044-2049.
- [17] ZHANG D, GAO F L, JAKOVLIC 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.
- [18] WANG H Y, WEI R C, WEI Y J, et al. Identification, Characterization, and Sensitivity to Phytochemicals of a Novel *Curvularia* Species Associated with Leaf Spot Disease on *Curcuma kwangsiensis* [J]. Scientific Reports, 2024, 14: 26487.
- [19] ROSSMAN A Y, CROUS P W, HYDE K D, et al. Recommended Names for Pleomorphic Genera in *Dothideomycetes* [J]. IMA Fungus, 2015, 6(2): 507-523.
- [20] TSUGE T, HARIMOTO Y, AKIMITSU K, et al. Host-Selective Toxins Produced by the Plant Pathogenic Fungus *Alternaria alternata* [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(1): 44-66.
- [21] 冯中红, 孙广宇. 链格孢属及相关属分类研究新进展 [J]. 菌物研究, 2020, 18(4): 294-303.
- [22] WOUDEBERG J H C, SEIDL M F, GROENEWALD J Z, et al. *Alternaria* Section *Alternaria*: Species, Formae Speciales or Pathotypes? [J]. Studies in Mycology, 2015, 82: 1-21.
- [23] 赵永田, 王兴娥, 郑冰玲, 等. 植物源抑真菌剂的筛选研究现状与展望 [J]. 生物灾害科学, 2022, 45(4): 400-404.
- [24] WANG F, SAITO S, MICHAILIDES T J, et al. Fungicide Resistance in *Alternaria alternata* from Blueberry in California and Its Impact on Control of *Alternaria* Rot [J]. Plant Disease, 2022, 106(5): 1446-1453.
- [25] WANG F, SAITO S, XIAO C L. Fungicide Resistance of *Alternaria alternata* and *A. arborescens* Isolates from Mandarin Fruit and Its Influence on Control of Postharvest *Alternaria* Rot [J]. Plant Disease, 2023, 107(5): 1538-1543.
- [26] SHEN G J, TENG H L, SUN J Z, et al. Baseline Sensitivity and Toxicity Mechanisms of Prochloraz to *Alternaria alternata* Strains Associated with Maize Leaf Blight in Heilongjiang Province in China [J]. Plant Disease, 2024, 108(11): 3336-3344.
- [27] PAVELA R, BENELLI G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints [J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(12): 1000-1007.
- [28] ISMAN M B, GRIENEISEN M L. Botanical Insecticide Research: Many Publications, Limited Useful Data [J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(3): 140-145.
- [29] ZHAO W, HU A L, REN M J, et al. First Report on *Colletotrichum fructicola* Causing Anthracnose in Chinese Sorghum and Its Management Using Phytochemicals [J]. Journal of Fungi, 2023, 9(2): 279.