

• XXXX •

淫羊藿叶枯病病原菌鉴定、生物学特性及防治杀菌剂筛选

袁慈¹, 蒋佳敏¹, 祁俊生^{1,2}, 肖微恩¹, 易子媛¹, 应天豪¹, 刘铭^{1,2}, 尹福强^{1,2*}

(1. 重庆三峡科技大学生物与食品工程学院, 重庆 404020;

2. 三峡库区道地药材绿色种植与深加工重庆市工程实验室, 重庆 404020)

[摘要] 目的:明确引起重庆市万州区淫羊藿叶枯病的病原菌种类、生物学特性及其有效防治杀菌剂,为生产提供理论依据。方法:利用组织分离法分离病原菌,基于柯赫氏法则进行致病性测定,结合形态学和多基因联合系统发育分析鉴定病原菌,菌丝生长速率法测定生物学特性和杀菌剂筛选。结果:病原菌菌落圆形,菌丝中央稀疏灰褐色,边缘浓密白色;进化树与 *Diaporthe hongkongensis* 聚为一支,支持率 100%,结合形态学特征,确定引起重庆市万州区淫羊藿叶枯病的病原菌为 *D. hongkongensis*;在培养基为玉米粉琼脂培养基(CMA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和燕麦琼脂培养基(OA),温度 28 °C,光暗交替和全黑暗,pH 6.0,碳源为可溶性淀粉,氮源为胰蛋白胨时菌丝生长最快;6种化学杀菌剂中,45%咪鲜胺 ME 抑菌效果最好,半数效应浓度(EC₅₀)为 0.040 mg·L⁻¹,5种生物杀菌剂中,0.3%四霉素 AS 抑菌效果最好,EC₅₀为 0.819 mg·L⁻¹。结论:该研究报告由 *D. hongkongensis* 引起的淫羊藿叶枯病,化学杀菌剂 45%咪鲜胺、生物杀菌剂 0.3%四霉素对 *D. hongkongensis* 具有较强抑制作用。

[关键词] 淫羊藿; 间座壳属; 叶枯病; 生物学特性; 杀菌剂筛选

[中图分类号] S43;R284;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260513

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Identification, Biological Characterization, and Fungicide Screening for Pathogen Causing Leaf Blight in *Epimedium*

YUAN Ci¹, JIANG Jiamin¹, QI Junsheng^{1,2}, XIAO Zhi'en¹, YI Ziyuan¹, YING Tianhao¹, LIU Ming^{1,2},
YIN Fuqiang^{1,2*}

(1. College of Biology and Food Engineering, Chongqing Sanxia University of Science and Technology, Chongqing 404020, China; 2. Green Cultivation and Deep Processing of Genuine Medicinal Materials in Three Gorges Reservoir Area, Chongqing Engineering Laboratory, Chongqing 404020, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the pathogen species responsible of *Epimedium* leaf blight in Wanzhou, Chongqing, investigate its biological characteristics, and screen effective fungicides, thereby providing a theoretical basis for disease control in production. **Methods:** The pathogen was isolated through the tissue isolation method. Pathogenicity was verified according to Koch's postulates. The pathogen was identified based on morphological observation and multi-gene phylogenetic analysis. The biological characterization of the pathogen and fungicide screening were conducted based on the mycelial growth rate method. **Results:** The pathogen formed circular colonies, with sparse gray-brown mycelia in the center and dense white mycelia at the edge. Multi-gene phylogenetic analysis showed that the pathogen clustered in the same clade as *Diaporthe hongkongensis*, with a support rate of 100%. This result, combined with morphological characteristics, identified the pathogen causing the leaf blight of *Epimedium* in Wanzhou District of Chongqing as *D. hongkongensis*. The mycelia grew the fastest in the corn meal agar, potato dextrose agar, and oatmeal agar with soluble starch as the carbon source and peptone as the nitrogen source at 28 °C, light-dark alternation and total darkness, and pH 6.0. Among the six chemical fungicides, prochloraz 45% ME had the best inhibitory effect,

[收稿日期] 2026-01-22

[基金项目] 重庆市技术创新与应用发展专项(CSTB2025TIAD-qykjggX0450)

[第一作者] 袁慈, 硕士, 从事道地药材栽培与病虫害防治, E-mail: 1628660576@qq.com

[通信作者] * 尹福强, 博士, 教授, 从事道地药材栽培与病虫害防治, E-mail: 20200002@sanxiau.edu.cn

with an median effective concentration (EC_{50}) of $0.040 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Among the five biological fungicides, tetramycin 0.3% AS had the best inhibitory effect, with an EC_{50} of $0.819 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** This study is the first to report that *D. hongkongensis* causes the leaf blight of *Epimedium*. Chemical fungicides such as 45% prochloraz and biological fungicides such as 0.3% tetramycin have strong inhibitory effects on *D. hongkongensis*.

[Keywords] *Epimedium*; *Diaporthe*; leaf blight; biological characteristics; fungicide screening

淫羊藿 (*Epimedium sagittatum*) 为小檗科淫羊藿属多年生草本植物, 又名仙灵脾、三枝九叶草, 为我国传统中药材, 以干燥叶入药, 性辛、甘、温, 收载于2020年版《中华人民共和国药典》^[1]。淫羊藿富含淫羊藿苷、淫羊藿次苷、朝藿定 A~C 等多种黄酮类化合物及多糖、多酚、生物碱等成分, 具有补肾壮阳的作用, 也可以用于治疗类风湿关节炎、骨质疏松^[1-5]等疾病。近年来, 淫羊藿市场需求逐年增长, 人工种植面积显著扩大, 病害发生日益普遍, 成为影响药材产量与品质的关键因素。

目前, 已报道的淫羊藿病害有叶枯病^[6]、叶腐病^[7]、根茎腐病^[8]和炭疽病^[9-10]等。其中, 叶枯病是叶部病害中的一类重要病害, 病原菌种类繁多, 炭疽属 (*Colletotrichum* spp.)^[11-12]、间座壳属 (*Diaporthe* spp.)^[13]、链格孢属 (*Alternaria* spp.)^[14-15]、*Nothophoma* 属^[16]和瑟氏腔菌属 (*Sydowia*)^[17]均可侵染植物叶片导致叶枯病。

淫羊藿叶枯病初期叶片出现带褐棕色边缘的白色斑块, 后期蔓延至整个叶片导致枯萎, 病原菌鉴定为 *Alternaria alternata*^[6]。2023年, 在重庆市万州区淫羊藿种植基地发现一种叶枯病, 严重田块发病率40%~50%、病情指数可达47, 导致淫羊藿品质下降、产量降低。该病初期出现褪绿深褐色不规则病斑, 病斑中间呈灰白色, 后期灰白色扩增边缘有黄色晕圈, 至整张叶片呈灰白色枯萎状, 最终叶片脱落, 症状与文献报道发现的叶枯病不同, 不能确定致病病原菌种类。本研究采集具有典型叶枯病症状的淫羊藿叶片分离鉴定病原菌, 并对病原菌进行生物学特性测定和有效杀菌剂筛选, 以期鉴定出引起重庆万州淫羊藿叶枯病病原菌种类, 筛选出抑菌效果良好的化学杀菌剂和生物杀菌剂, 相关研究结果将进一步丰富淫羊藿叶枯病的研究, 并为淫羊藿叶枯病的科学防控提供参考。

1 材料

1.1 供试材料 2023年, 在重庆市万州区淫羊藿种植基地 ($30^{\circ}40.2'N$; $108^{\circ}40.8'E$) 采集具有叶枯病典型症状的叶片样品, 拍照记录采样信息, 装入无菌保鲜袋用于病原菌分离。采集淫羊藿健康植株于重庆三峡科技大学植物保护实验室移栽管理, 供致

病性测定使用。

1.2 供试培养基 根据《植病研究方法》^[18]和《植物病理学实验技术》^[19]制备培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、马铃薯蔗糖琼脂培养基 (PSA)、查氏培养基 (CDA)、胡萝卜培养基 (CA)、玉米粉琼脂培养基 (CMA)、燕麦琼脂培养基 (OA)、水琼脂培养基 (WA)、绿豆粉琼脂培养基 (BA)。

1.3 供试仪器及试剂 SW-CJ-1FD 型超净工作台 (上海跃进医疗器械有限公司); S9 Series 型显微镜 (德国徕卡公司); BXM-30R 型高压蒸汽灭菌锅 (上海东亚压力容器制造有限公司); HPX-80 型生化培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司); MA-96 型聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (苏州雅睿生物技术有限公司); TG16-WS 型湘立高速离心机 (湖南湘立科学仪器有限公司); DYY-7C 型电泳仪 (北京六一生物技术有限公司); 2015F382-32 型微量电子天平 [上海越平科学仪器 (苏州) 制造有限公司]; HSY-26 型电热恒温水浴锅 (上海跃进医疗器械有限公司); BC-210KGM 型医用冷藏箱 (合肥美的电冰箱有限公司)。硫酸链霉素 (合肥中龙神力动物药业有限公司, 批号 20250103); DNA 提取试剂盒、PCR Master Mix (2 \times)、ddH₂O [天根生化科技 (北京) 有限公司, 批号分别为 DP305、K1071、R0581]; 无水葡萄糖、琼脂粉 (上海伊卡生物技术有限公司, 批号分别为 G0212、EQ1001); 乙醇、三氯甲烷、次氯酸钠等均为国产分析纯; 6种化学杀菌剂和5种生物杀菌剂见表1、表2。

2 方法

2.1 病害调查 2023年利用5点取样法在万州淫羊藿种植基地对淫羊藿叶枯病发病率及病情指数进行调查。叶部病级分级标准: 0级, 无病斑; 1级, 病斑面积占整个叶片面积的0~10%; 2级, 病斑面积占整个叶片面积的11%~25%; 3级, 病斑面积占整个叶片面积的26%~50%; 4级, 病斑面积占整个叶片面积的50%以上。

2.2 病原菌鉴定

2.2.1 病原菌的分离纯化 通过组织分离法^[18]分离致病菌。选取淫羊藿叶片病健交界处组织, 用无菌手术刀裁取 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 的组织块, 在75%乙

表1 化学杀菌剂及相关浓度梯度

Table 1 Chemical fungicides and relevant concentrations

化学杀菌剂	剂型	生产厂家	批号	有效质量浓度梯度/mg·L ⁻¹
咪鲜胺	45%ME	深圳诺普信农化股份有限公司	20231211ME01X.R	0.225、0.113、0.056、0.029、0.014
啶酰·咯菌腈	30%SC	深圳诺普信农化股份有限公司	20240111SC01X.R	0.600、0.300、0.150、0.075、0.038
咯菌腈	20%SC	郑州领先化工有限公司	20230806	0.200、0.100、0.025、0.013、0.003
戊唑·多菌灵	30%WP	深圳诺普信农化股份有限公司	20240114WP01X.B	2.000、1.000、0.250、0.128、0.064
苯醚·甲环唑	10%WG	深圳诺普信农化股份有限公司	20231127WG01X.R	10.000、5.000、1.250、0.320、0.160
克菌·戊唑醇	400 g/LSC	安道麦马克西姆有限公司	P1018292N1	40.000、20.000、10.040、5.000、1.280

注:ME为微乳剂,SC为悬浮剂,WP为可湿性粉剂,WG为水分散粒剂

表2 生物杀菌剂及相关浓度梯度

Table 2 Biological fungicides and relevant concentrations

生物杀菌剂	剂型	生产厂家	批号	有效质量浓度梯度/mg·L ⁻¹
四霉素	0.3%AS	辽宁微科生物工程有限公司	20240516	1.500、0.750、0.384、0.192、0.096
蛇床子素	1%EW	内蒙古清源保生物科技有限公司	20240410	2.000、1.000、0.500、0.256、0.128
中生菌素	3%WP	深圳诺普作物科学股份有限公司	20231101WP01X.B	90.000、45.000、22.500、5.760、2.880
申嗪霉素	1%SC	湖北天泽农生物工程有限公司	20240902	80.000、40.000、20.000、10.000、5.100
多抗霉素	10%WP	日本科研制药株式会社	202402151830	100.000、50.000、25.200、12.800、6.400

注:AS为水剂,EW为水乳剂,WP为可湿性粉剂,SC为悬浮剂

醇中消毒30 s,5%次氯酸钠处理3 min,分别用无菌水漂洗3次后置于无菌干燥的滤纸上,将干燥好的组织块转接至含50 mg·L⁻¹链霉素的PDA培养基表面,25℃黑暗条件下恒温培养2~3 d。

2.2.2 致病性测定 采用针刺法对淫羊藿植株离体叶片进行致病性试验。取健康完整的淫羊藿叶片,75%乙醇表面消毒后用无菌水冲洗。用灭菌接种针在叶片主脉进行穿刺处理,随后将5 mm菌块接种于创伤处,接种等体积无菌PDA培养基为对照,每个处理3次重复。

接种后的植株叶片放入培养箱中控温控湿培养(25℃,相对湿度80%),定时记录并观察病害发生情况。当接种后的叶片再次出现相同病症时,同2.2.1项方法再次分离病原菌。若分离获得的病原菌与接种菌株一致,则可判定接种菌株为淫羊藿叶枯病的致病菌。

2.2.3 形态学鉴定 将病原菌菌株接种于PDA培养基上,25℃恒温培养60 d,观察记录菌落形态特征并进行拍摄。使用光学显微镜(Olymeus, BX51)观察菌丝、孢子及孢子梗的形态,并测量孢子尺寸($n=50$),参考《真菌鉴定手册》^[20]与《中国真菌志》^[21],确定病原菌的种类。

2.2.4 分子生物学鉴定 使用DNA提取试剂盒提取菌丝体中的DNA。分别用引物内转录间隔区

(ITS) 1/ITS4、*TEF1-728F/TEF1-986R*、*Bt2a/Bt2b*、*CAL-228F/CAL-2Rd*对菌株中的核糖体转录间隔区序列(rDNA-ITS)、翻译延伸因子(*tef1- α*)、 β -微管蛋白(*β -tubulin*)和钙调蛋白(Calmodulin)基因进行扩增。PCR扩增所用引物序列见表3^[22-25]。PCR扩增体系总体积为20 μ L,其中2 \times Taq Master Mix 10 μ L、DNA模板2 μ L、上下游引物各0.3 μ L和ddH₂O 7.4 μ L。PCR反应程序见表4。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果进行BLAST同源性比对分析,下载同源性较高序列和标准菌株序列,在MEGA11.0中排列剪切整齐用PhyloSuite软件按ITS-*TEF1-TUB-CAL*顺序串联,MEGA11.0软件最大似然法(maximum likelihood method)构建系统发育树,重复值设置1 000次,建树所用序列登录号见增强出版附加材料。

2.3 病原菌生物学特性 用5 mm无菌打孔器从培养4 d的病原菌菌落边缘获取菌饼,将菌饼分别接种于不同培养基,不同温度、不同光照、不同pH、不同碳源和不同氮源的平板中,在上述条件下培养5 d,采用十字交叉法测定菌落直径。所有处理设3次重复,处理条件见表5。实验数据利用SPSS 26.0进行统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义,用Origin 2022作图。

表3 PCR扩增所用引物及引物序列

Table 3 Primers for molecular identification

目的基因	长度/bp	引物名称	序列(5'-3')	碱基数/个
ITS	558	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20
TEF1	345	728F	CATCCAGAAGTTCGAGAAGG	20
		986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	20
TUB	484	Bt2a	GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC	24
		Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	24
CAL	717	228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	22
		2Rd	TGRTCNGCCTCDCGGATCATCTC	23

表4 基因PCR扩增反应程序

Table 4 Parameter for genes PCR reaction procedure

基因	预变性温度/时间	变性、退火、延伸温度/时间	终延伸温度和时间
ITS	94 °C, 5 min	94 °C变性 45 s, 55 °C退火 45 s, 72 °C延伸 1 min, 35 循环	72 °C, 10 min
TEF1	94 °C, 5 min	94 °C变性 46 s, 55 °C退火 46 s, 72 °C延伸 1 min, 38 循环	72 °C, 10 min
TUB	94 °C, 3 min	94 °C变性 31 s, 55 °C退火 30 s, 72 °C延伸 1 min, 35 循环	72 °C, 10 min
CAL	94 °C, 5 min	94 °C变性 46 s, 55 °C退火 46 s, 72 °C延伸 1 min, 35 循环	72 °C, 10 min

表5 生物学特性的处理条件

Table 5 Treatment conditions for biological characteristics

因素	处理条件
培养基	供试培养基 PDA、PSA、CDA、CMA、BA、CA、OA 和 WA
温度/°C	5、10、15、20、25、28、30、35 °C
光照	24 h 全光照、24 h 全黑暗、光暗交替(12 h 光照 12 h 黑暗)
pH	5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0
碳源	CDA 培养基为基础培养基。等量的葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉替换蔗糖,制成不同碳源的培养基,不加蔗糖的 Czapek 培养基为对照
氮源	CDA 培养基为基础培养基。以等量的牛肉浸膏、胰蛋白胨、甘氨酸、氯化铵、尿素(Urea)替换硝酸钾,制成不同氮源的培养基,不加硝酸钾的 Czapek 培养基为对照

2.4 室内杀菌剂筛选 采用菌丝生长速率法,评估6种化学杀菌剂和5种生物杀菌剂对病原菌的抑菌活性。将各化学杀菌剂和生物杀菌剂按预设浓度梯度用无菌水依次配制母液并稀释,每个浓度设3次重复。在菌落边缘处选取直径为5 mm的菌饼,将菌丝面朝下置于含杀菌剂的PDA平板中心,以未添加药剂的PDA培养基作为对照。25 °C恒温培养5 d。采用十字交叉法测定菌落直径,计算各杀菌剂浓度对菌丝生长的抑制率。

在Excel 2010软件中将药剂浓度对数设为横坐标,抑菌率几率值设为纵坐标,得到各杀菌剂的毒力回归方程和相关系数(r)。使用SPSS 26.0软件用有效浓度和抑制率计算半数效应浓度(EC_{50})。

3 结果与分析

3.1 淫羊藿叶枯病田间调查 在重庆万州,淫羊藿叶枯病多始发于春季,夏季6—8月为病害高发期,严重田块发病率40%~50%、病情指数可达47。淫羊藿叶枯病主要出现在叶缘和叶尖,发病初期,叶片出现褪绿深褐色不规则病斑,病斑中间呈灰白色;发病后期,随着侵染加重,灰白色区域向外扩增,部分病变边缘有黄色晕圈,整张叶片呈灰白色枯萎状,并最终导致叶片脱落。见增强出版附加材料。

3.2 淫羊藿叶枯病病原菌鉴定

3.2.1 病原菌分离与致病性测定 从典型发病叶片中分离出80个菌株,共3种菌落形态,分离率分别为55%、20%和25%。将纯化后的3种菌株接种

于健康的淫羊藿叶片上,培养7 d后,接种分离率为55%菌株的叶片出现棕褐色病斑,病斑中间出现枯萎状灰白色区域,与田间自然感染症状相符,而对照组未出现病变。对接种患病叶片进行二次分离鉴定,与原接种菌株一致,表明接种菌株为淫羊藿叶枯病的致病菌。见增强出版附加材料。

3.2.2 形态学鉴定 菌落圆形,中央菌丝稀疏呈灰褐色,边缘菌丝浓密呈白色,25 °C培养5 d后菌落直径可达8.0 cm。菌落背面与正面形态基本一致。60 d后有深褐色或黑色子实体出现在培养基表面或半浸没,球形至近球形,孤立或聚集,并产有乳白色至黄色的分生孢子角。挑取子实体压碎制作显微镜玻片,可见子实体内生的分生孢子梗。有两种形态不同的分生孢子,分别为 β 型分生孢子和 α 型分生孢子。 β 型分生孢子透明、丝状、直或略弯,(长 \times 宽)(14.849~26.594) $\mu\text{m} \times$ (4.13~1.29) μm ,平均值为(19.091 \pm 2.314) $\mu\text{m} \times$ (2.156 \pm 0.712) μm , $n=50$; α 型分生孢子单细胞、透明、梭形、两端锐尖,(4.695~9.302) $\mu\text{m} \times$ (4.079~1.442) μm ,平均值为(7.037 \pm 1.059) $\mu\text{m} \times$ (2.404 \pm 0.61) μm , $n=50$ 。见增强出版附加材料。

3.2.3 分子生物学鉴定 对典型菌株YYH10和YYH15提取DNA后进行PCR扩增测序,测序结果在NCBI中对比下载相同源性高的序列和部分模式菌株序列,进行分子系统发育分析,使用最大似然法结合ITS-TEF1-TUB-CAL多位点基因串联建立系统发育树,YYH10和YYH15与*Diaporthe hongkongensis*(CBS115448,HT-1)聚为一支,支持率为100%。结合形态学鉴定,确定导致万州区淫羊藿叶枯病的致病病原菌为*D. hongkongensis*。见增强出版附加材料。

3.3 淫羊藿叶枯病病原菌生物学特性

3.3.1 培养基对菌丝生长的影响 在玉米粉琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基和燕麦琼脂培养基上*D. hongkongensis*菌丝生长快,菌落直径分别为71.83、70.33、68.17 mm,三者差异无统计学意义,但显著高于其他培养基。菌落在WA培养基上几乎不生长。表明*D. hongkongensis*菌丝生长最适培养基为CMA、PDA和OA培养基。见增强出版附加材料。

3.3.2 温度对菌丝生长的影响 温度对*D. hongkongensis*菌丝生长影响显著,在温度为5 °C时菌丝不生长,10~15 °C时生长缓慢,28 °C时菌丝生长最快,菌落直径76.55 mm,温度在28~35 °C时,

菌落直径逐渐变小。表明*D. hongkongensis*菌丝生长最适温度为28 °C。见增强出版附加材料。

3.3.3 光周期对菌丝生长的影响 在光暗交替和全黑暗条件下*D. hongkongensis*菌丝生长较快,菌落直径分别为74.13 mm和73.17 mm,生长速率差异不显著,全光照条件下的菌落直径为66.33 mm,与光暗交替和全黑暗条件差异显著($P<0.05$)。表明*D. hongkongensis*菌丝生长最适光照环境为光暗交替和全黑暗。见增强出版附加材料。

3.3.4 pH对菌丝生长的影响 *D. hongkongensis*在pH为5.0~12.0均能生长,其中pH为6.0时菌丝生长最快,菌落直径为48.00 mm,显著高于其他pH条件下的菌落直径;pH为5.0条件下菌丝生长最慢,菌落直径为21.40 mm。表明*D. hongkongensis*菌丝生长的最适pH为6.0。见增强出版附加材料。

3.3.5 碳源对菌丝生长的影响 *D. hongkongensis*在碳源为可溶性淀粉培养基上长势最快,显著高于其他碳源,菌落直径为45.83 mm,其次为麦芽糖、葡萄糖、乳糖、果糖和甘露醇,在无碳源条件下,菌丝不生长。表明*D. hongkongensis*菌丝生长最适碳源为可溶性淀粉。见增强出版附加材料。

3.3.6 氮源对菌丝生长的影响 *D. hongkongensis*在氮源为胰蛋白胨培养基上菌丝生长最快,菌落直径为53.02 mm;其次为牛肉浸膏、甘氨酸、氯化铵;当氮源为尿素时生长最慢,菌落直径仅为15.37 mm,与其他氮源差异显著;在无氮源的Czapek培养基上,菌丝不生长。表明*D. hongkongensis*菌丝生长最适氮源为胰蛋白胨。见增强出版附加材料。

3.4 室内杀菌剂筛选

3.4.1 化学杀菌剂筛选 化学杀菌剂中,EC₅₀值由大到小依次为400 g \cdot L⁻¹克菌·戊唑醇SC>10%苯醚·甲环唑WG>30%戊唑·多菌灵WP>20%咯菌腈SC>30%啶酰·咯菌腈SC>45%咪鲜胺ME。其中45%咪鲜胺ME杀菌效果最强,EC₅₀为0.040 mg \cdot L⁻¹。表明*D. hongkongensis*对化学杀菌剂45%咪鲜胺ME敏感度最高。见增强出版附加材料。

3.4.2 生物杀菌剂筛选 生物杀菌剂中,EC₅₀值由大到小依次为10%多抗霉素WP>1%申嗪霉素SC>3%中生菌素WP>1%蛇床子素EW>0.3%四霉素AS。其中0.3%四霉素AS杀菌效果最强,EC₅₀为0.819 mg \cdot L⁻¹。表明*D. hongkongensis*对生物杀菌剂0.3%四霉素AS敏感度最高。见增强出版附加材料。

4 讨论

本研究通过分离鉴定,确定引起重庆万州区淫羊藿叶枯病的致病病原菌为 *Diaporthe hongkongensis*,这是 *D. hongkongensis* 引起淫羊藿叶枯病的首次报道。

D. hongkongensis 为子囊菌门(Ascomycota)类壳菌纲(Sordariomycetes)间座壳目(Diaportheales)间座壳科(Diapoithaceae)间座壳属(*Diaporthe*)真菌^[26], GOMES等^[27]最初在香港杜鹃果实上采集并分离鉴定,可引起枝枯病^[28], 胴枯病^[29], 叶枯病^[30]、果腐病^[31-32]和茎灰枯病^[33]等病害。

关于 *D. hongkongensis* 生物学特性研究少有报道,本研究结果表明 *D. hongkongensis* 的最适培养基为玉米粉琼脂培养基(CMA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和燕麦琼脂培养基(OA),温度 28 °C, 光暗交替和全黑暗, pH 为 6.0, 碳源为可溶性淀粉, 氮源为胰蛋白胨时菌丝生长最快。CHEN等^[28]研究发现樱桃树干病原菌 *D. hongkongensis* 的最佳生长温度为 30 °C, 但淫羊藿叶枯病病原菌 *D. hongkongensis* 在 28 °C 菌丝生长最快,这可能与寄主本身及寄主所在环境有关。本研究结果中,菌丝生长速度在 5~35 °C 呈现出先增加再下降的趋势,在 28 °C 时达到峰值。淫羊藿通常在高山林下种植,这一生长温度响应特征与田间观察到的病害发生规律高度吻合,即病害多发于春季,随着气温升高逐渐加重,并在夏季 6—8 月达到高发期。

化学杀菌剂作用范围广、经济效益高,当病害发生严重时,是最有效的方法。在本研究中,化学杀菌剂结果表明, *D. hongkongensis* 对 45% 咪鲜胺 ME 敏感度最高 ($EC_{50} < 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。咪鲜胺 (prochloraz) 被首次报道,由 Boots 公司开发(现为 BayerCorpScience)^[34],属于甾醇生物合成抑制剂(SBIs),其通过抑制病原菌内麦角甾醇的合成过程中 C-14 脱甲基反应,破坏细胞膜结构的完整性,抑制病原菌的侵染和繁殖^[35]。咪鲜胺在我国生产中有长久的使用历史,具有广阔的应用前景,多用于防治小麦赤霉病和茎基腐病^[36]。生产上可选用咪鲜胺 ME 以有效防治由 *D. hongkongensis* 引起的淫羊藿叶枯病。

与化学杀菌剂相比,生物杀菌剂具备环保优势,能够促进作物健康生长,其低毒性和无残留特性,使其在药用植物病害防控领域备受青睐^[37-38]。根据本研究生物杀菌剂筛选结果, *D. hongkongensis* 对 0.3% 四霉素 AS 敏感度最高 ($EC_{50} < 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 抑

制作用最强。四霉素又称梧宁霉素,主要通过破坏细胞壁和细胞膜来抑制病原菌生长,同时诱导并激活植物的防御酶系统增强其抗病性^[39],是一种广谱且高效低毒的农用抗生素类杀菌剂,能作为射干眼斑病^[40]、草莓茎基腐病^[41]和马缨杜鹃炭疽病^[42]的防治药剂。因此,在生产过程中可选择使用四霉素 AS 防治由 *D. hongkongensis* 引起的淫羊藿叶枯病。

本研究中,化学杀菌剂复配药剂 30% 啶酰·咯菌腈 SC、20% 咯菌腈 SC 和 30% 戊唑·多菌灵 WP 及生物杀菌剂 1% 蛇床子素 EW 同样对 *D. hongkongensis* 表现出较强的抑制作用 ($EC_{50} < 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),在生产中可以考虑交叉使用,以减轻抗药性。

本研究通过室内毒力测定筛选出对 *D. hongkongensis* 抑制效果较强的化学杀菌剂咪鲜胺 ME 和生物杀菌剂四霉素 AS,由于仅对杀菌剂进行室内筛选,无法验证其在复杂田间环境下的实际防效、持效期及对淫羊藿的安全性,只能作为杀菌剂的初步筛选结果,田间实际防治效果仍需进一步深入研究。

研究分离鉴定了导致重庆万州淫羊藿叶枯病的病原菌,明确病原菌菌丝生长条件,室内筛选到对 *D. hongkongensis* 抑制效果好的化学杀菌剂和生物杀菌剂,可为淫羊藿叶枯病识别和防控提供理论依据与技术参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China: Volume 1 [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [2] CHEN X L, LI S X, GE T, et al. *Epimedium linn*: A comprehensive review of phytochemistry, pharmacology, clinical applications and quality control[J]. Chem Biodivers, 2024, 21(8): e202400846.
- [3] LI N, XIE L J, YANG N, et al. Rapid classification and identification of chemical constituents in *Epimedium koreanum* Nakai by UPLC-Q-TOF-MS combined with data post-processing techniques [J]. Phytochem Anal, 2021, 32(4): 575-591.
- [4] 李远栋,王世坤,杨东元,等. 淫羊藿苷防治膝骨性关节炎作用机制的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(8): 2652-2658.
LI Y D, WANG S K, YANG D Y, et al. Research progress on mechanism of icariin in prevention and treatment of knee osteoarthritis [J]. Chin Herb Med, 2023, 54(8): 2652-

- 2658.
- [5] 乔韬,许栋,陈映冰,等. 基于文献计量的淫羊藿苷研究热点和未来趋势分析[J]. 中草药,2021,52(23):7293-7301.
QIAO T, XU D, CHEN Y B, et al. Analysis on research hotspots and future trends of icariin based on bibliometrics[J]. Chin Herb Med,2021,52(23):7293-7301.
- [6] HOU W C , CHU L X, DAN Z W , et al. First report of *Alternaria alternata* causing leaf blight on *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim. in China[J]. Plant Dis, 2024,108(5):1394.
- [7] ZHOU S, GAO Y, AN J, et al. *Rhizopus oryzae* causes the leaf rot disease of *Epimedium sagittatum* in Guizhou, China [J]. Plant Dis, 2024,108(4):1105.
- [8] CHU L, LI D, HOU W, et al. First report of *Fusarium falciforme* causing root and rhizome rot of *Epimedium sagittatum* in China[J]. Plant Dis, 2024,108(5):1400.
- [9] LIN R, LI X Y, WU S, et al. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* on *Epimedium sagittatum* in China[J]. Plant Dis, 2025,109(1):235.
- [10] HOU W C, CHU L X, YANG L L, et al. First report of *Colletotrichum fruticicola* causing anthracnose on *Epimedium sagittatum* in China[J]. Plant Dis, 2025,108(3):813.
- [11] 刘安泰,张朝敏,李紫腾,等. 有机硅助剂在苹果炭疽叶枯病化学防控中的减药增效作用评价[J]. 植物保护, 2022, 48(1):284-290.
LIU A T, ZHANG C M, LI Z T, et al. Evaluation of increasing control effect and reducing fungicide effect of organosilicon adjuvant on chemical control of *Glomerella* apple leaf spot [J]. Plant Prot, 2022, 48(1):284-290.
- [12] 王薇,符丹丹,张荣,等. 苹果炭疽叶枯病病原学研究[J]. 菌物学报, 2015, 34(1):13-25.
WANG W, FU D D, ZHANG R, et al. Etiology of apple leaf spot caused by *Colletotrichum* spp [J]. Mycosystema, 2015, 34(1):13-25.
- [13] 王洁,董晓旭,陈金霄,等. 柿叶枯病病原菌鉴定、生物学特性及杀菌剂毒力测定[J]. 园艺学报, 2025, 52(3):737-48.
WANG J, DONG X X, CHEN J X, et al. Identification and biological characteristics of the pathogen causing persimmon leaf blight and toxicity test of different fungicides [J]. Acta Horti Sin, 2025, 52(3):737-748.
- [14] 卢文洁,罗志明,李春花,等. 云南省荞麦叶枯病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2019, 46(5):1065-1072.
LU W J, LUO Z M, LI C H, et al. Identification and biological characteristics of the pathogen causing leaf blight of *Fagopyrum esculentum* in Yunnan province [J]. J Plant Protec, 2019, 46(5):1065-1072.
- [15] 祁鹤兴,芦光新,李宗仁,等. 青海省青贮玉米链格孢叶枯病病原菌鉴定及其致病力分析[J]. 草业学报, 2021, 30(6):94-105.
QI H X, LU G X, LI Z R, et al. Identification and pathogenicity of *Alternaria* leaf blight strains in silage maize in Qinghai province [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(6):94-105.
- [16] 王欣悦,王浙吉,张东为,等. 云杉叶枯病病原鉴定、生物学特性及药剂筛选[J]. 植物病理学报, 2025, 55(6):1288-1298.
WANG X Y, WANG Z J, ZHANG D W, et al. Identification and biological characterization of the pathogen causing spruce leaf blight and screening of effective fungicides against the disease [J]. Acta Phytopathol Sin, 2025, 55(6):1288-1298.
- [17] 吴盈盈,田呈明,彭骋,等. 樟子松新型叶枯病的病原菌鉴定及防治药剂筛选[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2025, 49(4):170-178.
WU Y Y, TIAN C M, PENG C, et al. Identification and screening of fungicides of pathogen causing a new leaf blight disease in *Pinus sylvestris* var. *mongholica* [J]. J Nanjing For Univ Nat Sci Ed, 2025, 49(4):170-178.
- [18] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 1998.
FANG Z D. Research Methods in Plant Pathology [M]. The third edition. Beijing: China Agriculture Press, 1998.
- [19] 孙广宇,宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2002.
SUN G Y, ZONG Z F. Experimental techniques in plant pathology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002.
- [20] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979.
WEI J C. Fungal identification manual [M]. Shanghai: Shanghai science and technology publishing house, 1979.
- [21] 中国科学院《中国孢子植物》编辑委员会. 中国真菌志[M]. 北京:科学出版社, 1987.
Consilio Florarum Cryptogamarum Sinicarum Academiae Sinicae Edita. Flora of Fungi in China [M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [22] WHITE T, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. PCR protocols: A guide to methods and applications, 1990, 18(1):315-322.
- [23] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. Mycologia, 1999, 91(3):553-556.
- [24] GLASS N L, DONALDSON G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(4):1323-1330.
- [25] QUAEDVLIIEG W, KEMA G H J, GROENEWALD J Z, et al. *Zymoseptoria* gen. nov.: A new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts [J]. Persoonia, 2011, 26(1):57-69.
- [26] 王舒敏,孙进华,弓德强,等. 间座壳属产植物激素、有机酸和脂肪酸分析研究[J]. 热带作物学报, 2024, 45(11):2438-2447.
WANG S M, SUN J H, GONG D Q, et al. Production of

- phytohormones, organic acids and fatty acids by *Diaporthe* fungi[J]. Chin J Trop Crops, 2024, 45(11): 2438-2447.
- [27] GOMES R R, GLIENKE C, VIDEIRA S I R, et al. *Diaporthe*: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi [J]. Persoonia, 2013, 31(1): 41.
- [28] CHEN P Z, PRANAMI D A, JI S X, et al. Molecular identification and pathogenicity of *Diaporthe eres* and *D. hongkongensis* (Diaporthales, Ascomycota) associated with cherry trunk diseases in China [J]. Microorganisms 2023, 11(10): 2400.
- [29] GUO Y S, CROUS P W, BAI Q, et al. High diversity of *Diaporthe* species associated with pear shoot canker in China [J]. Persoonia, 2020, 45(1): 132-162.
- [30] LI B, WANG J, JIANG M G, et al. First report of *Diaporthe hongkongensis* causing leaf blight on macadamia in China [J]. Plant Dis, 2024, 108(10): 3179.
- [31] ZHANG Z, ZHANG Z B, HUANG Y T, et al. First report of *diaporthe hongkongensis* causing fruit rot on peach (*Prunus persica*) in China [J]. Plant Dis, 2021, 105(7): 2017.
- [32] 聂华丽, 吉宁, 王瑞, 等. 采前喷施水杨酸与硝普钠对玛瑙红樱桃致病菌的抑制效果及不同抑菌剂的毒力分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1617-1631.
- NIE H L, JI N, WANG R, et al. Inhibitory effects of salicylic acid and sodium nitroprusside sprayed before harvest on pathogenic fungi of 'Manahong' cherry and toxicity of different fungicides [J]. Microbiol China, 2025, 52(4): 1617-1631.
- [33] HUDA S A R, KEE Y J, WONG K L, et al. *Diaporthe* species causing stem gray blight of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia [J]. Sci Rep, 2021, 11(1), 3907.
- [34] 王徽. 咪鲜胺合成方法评述 [J]. 农药, 2019, 58(12): 934-936.
- WANG Z. A review of synthetic methods of prochloraz [J]. Agrochemicals, 2019, 58(12): 934-936.
- [35] 徐铮, 曹永兵, 姜远英. 麦角甾醇生物合成途径中的抗真菌药作用靶酶 [J]. 国外医药抗生素分册, 2021, 22(5), 193-197.
- XU Z, CAO Y B, JIANG Y Y. Target enzymes of antifungal drugs in the ergosterol biosynthesis pathway [J]. World Notes Antibi, 2021, 22(5), 193-197.
- [36] 崔永源, 高续恒, 钱乐, 等. 咪鲜胺及其复配剂对河南省禾谷镰孢的抑菌活性及对小麦赤霉病的室内防效 [J]. 植物保护, 2025, 51(1), 262-270.
- CUI Y Y, GAO X H, QIAN L, et al. Inhibitory activity of prochloraz and its mixtures against *Fusarium graminearum* in Henan province and indoor control efficacy on wheat blast disease [J]. Plant Prot, 2025, 51(1), 262-270.
- [37] GEOFFREY J, NICOLA I, KENT S, et al. Protecting maize from rootworm damage with the combined application of arbuscular mycorrhizal fungi, *Pseudomonas* bacteria and entomopathogenic nematodes [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1-12.
- [38] LIANG L Q, FU Y J, DENG S S, et al. Genomic, antimicrobial, and aphicidal traits of *Bacillus velezensis* ATR2, and its biocontrol potential against ginger rhizome rot disease caused by *Bacillus pumilus* [J]. Microorganisms, 2021, 10(1): 63.
- [39] 田秀, 周连柱, 黄晓庆, 等. 我国葡萄灰霉病菌对四霉素和啞酰菌胺的敏感性测定 [J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(4): 868-873.
- TIAN X, ZHOU L Z, HUANG X Q, et al. Sensitivity of *Botrytis cinerea* to tetramycin and boscalid in China [J]. Chin J Biol Control, 2022, 38(4): 868-873.
- [40] 汤子萱, 徐琴, 刘铭, 等. 射干眼斑病原菌鉴定及室内药剂筛选 [J]. 植物保护, 2025, 51(3): 218-225, 240.
- TANG Z X, XU Q, LIU M, et al. Identification of the pathogen and indoor fungicide screening for *Belamcanda chinensis* eyespot [J]. Plant Prot, 2025, 51(3): 218-225, 240.
- [41] 叶梓, 谢雨璐, 张国芳, 等. 草莓茎基腐病原菌鉴定、致病力分析及防治药剂筛选 [J]. 核农学报, 2024, 38(5), 822-832.
- YE Z, XIE Y L, ZHANG G F, et al. Identification, pathogenicity analysis, and effective bactericides screening of the pathogen responsible for strawberry stem rot [J]. J Nucl Agric Sci, 2024, 38(5), 822-832.
- [42] 胡珊, 莫维弟, 周志成, 等. 马缨杜鹃炭疽病原菌生物学特性及防治药剂筛选 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(4): 570-576.
- HU S, MO W D, ZHOU Z C, et al. Biological characteristics of pathogenic anthracnose *Colletotrichum fiorinae* on *Rhododendron delavayi* and screening of fungicides [J]. J South China Agric Univ, 2023, 44(4): 570-576.

[责任编辑 顾雪竹]