

木论保护区野生兜兰致病菌的分离鉴定及抑菌试验

王海庆, 陆小芳, 韦莉红, 邓慧莲, 罗美东, 覃勇荣*

河池学院化学与生物工程学院, 广西 河池

收稿日期: 2022年4月22日; 录用日期: 2022年5月23日; 发布日期: 2022年5月31日

摘要

为了解桂西北岩溶地区野生兜兰致病菌的危害, 以便为珍稀野生植物的生物学保育提供科学依据, 对广西木论国家级自然保护区野生兜兰进行了实地调查, 以具有典型白色病斑的硬叶兜兰叶片为实验材料, 经过致病菌分离纯化、致病性测定、形态学鉴定及DNA测序, 最终确认硬叶兜兰的病原菌为灰黄青霉 (*Penicillium griseofulvum*)。为了筛选能够有效抑制该病原菌的天然植物材料, 选用生姜、大蒜、洋葱三种天然植物的提取液进行了抑菌试验。结果表明, 三种植物材料均对硬叶兜兰病原菌灰黄青霉具有抑制作用, 其中大蒜提取液的抑菌作用最强, 抑制率高达96%, 说明大蒜具有防控硬叶兜兰病害的应用潜力。以天然植物提取液作为抑菌剂用于珍稀野生植物的生物学保育, 可以节能减排, 降低成本, 保护环境。

关键词

木论自然保护区, 野生兜兰, 病原菌, 分离鉴定, 天然植物抑菌剂, 抑菌试验

Isolation, Identification and Bacteriostatic Test of Pathogenic Bacteria of Wild *Paphiopedilum* in Mulun Nature Reserve of Guangxi

Haiqing Wang, Xiaofang Lu, Lihong Wei, Huilian Deng, Meidong Luo, Yongrong Qin*

School of Chemistry and Biological Engineering, Hechi University, Hechi Guangxi

Received: Apr. 22nd, 2022; accepted: May 23rd, 2022; published: May 31st, 2022

*通讯作者。

文章引用: 王海庆, 陆小芳, 韦莉红, 邓慧莲, 罗美东, 覃勇荣. 木论保护区野生兜兰致病菌的分离鉴定及抑菌试验[J]. 植物学研究, 2022, 11(3): 399-408. DOI: 10.12677/br.2022.113047

Abstract

In order to understand the hazard of pathogenic bacteria in the karst area of northwest Guangxi, and to provide scientific basis for biological conservation of rare wild plants, field investigation was carried out on the wild *Paphiopedilum* in the Mudun National Nature Reserve of Guangxi. The leaves of *P. micranthum* with typical white lesions were used as experimental materials. After isolation and purification of pathogenic bacteria, pathogenicity determination, morphological identification and DNA sequencing, the pathogen of *P. micranthum* was finally confirmed to be *Penicillium griseofulvum* strain. In order to screen the natural plant materials that can effectively inhibit the pathogenic bacteria, the antibacterial test was carried out with the extracts of three natural plants, ginger, garlic and onion. The results showed that the three plant materials all had inhibitory effects on the pathogenic bacteria *Penicillium griseofulvum*, a pathogen of *P. micranthum*. Among them, the antibacterial effect of garlic extract was the strongest, and the inhibition rate was as high as 96%, indicating that garlic has the application potential of preventing and controlling the disease of *P. micranthum*. Using natural plant extracts as bacteriostatic agents for the biological conservation of rare wild plants can save energy, reduce costs, and protect the environment.

Keywords

Mulun Nature Reserve, Wild *Paphiopedilum*, Pathogenic Bacteria, Isolation and Identification, Natural Plant Antibacterial Agent, Bacteriostatic Test

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

兰科植物具有独特的观赏价值和重要的药用价值[1], 兜兰属是兰科植物中最受人喜爱的花卉之一[2]。我国兜兰物种资源丰富, 但由于过度采集、生境破坏及走私出境等原因, 导致野生兜兰数量急剧减少, 分布区不断萎缩, 许多种类已到了灭绝的边缘, 因此, 其保护问题亟需引起有关部门的高度重视。广西木论国家级自然保护区地处桂西北, 总面积 10829.7 hm², 分布有硬叶兜兰等 5 种野生兜兰[3]。为了深入了解桂西北岩溶地区野生兜兰的生存状况, 笔者多次到木论保护区野生兜兰的主要分布点进行调查, 发现约有 1/3 的硬叶兜兰野生居群受到病原菌的感染, 部分植株受害严重, 并陆续出现死亡症状。目前, 关于野生兜兰的研究, 主要侧重于物种分布、引种栽培及生理生态等方面, 关于野生兜兰致病菌防治的研究, 鲜有文献报道。相关研究结果表明, 黄连、生姜、大蒜、洋葱、桂皮等植物提取液具有一定的抑菌作用[4] [5] [6]。虽然天然植物的抑菌作用已有一些文献报道, 但人工栽培兜兰病虫害的防治, 多使用百菌清、多菌灵、炭疽灵等化学农药进行[7]。基于环保的考虑, 高残留剧毒化学农药的过量使用, 引起了人们越来越多的担忧, 因此, 开发高效、低毒、低残留的天然植物源农药(生物农药)逐渐成为人们关注的热点。本研究在对木论保护区野生兜兰致病菌分离纯化的基础上, 分别选用生姜、大蒜、洋葱的提取液作为抑菌剂, 通过抑菌试验和比较分析, 说明不同植物提取物对木论保护区野生兜兰致病菌的抑菌效果, 以期对野生兜兰致病菌的有效防治和生物学保育提供理论支持。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

具有典型白色病斑的硬叶兜兰野生居群样本, 2020年12月采于广西木论国家级自然保护区, 生姜、大蒜、洋葱三种实验材料, 购自当地农贸市场, 所购买的植物材料均无发芽和虫变现象。

2.2. 试验方法

2.2.1. 致病菌的分离及纯化

分离硬叶兜兰叶片白色病斑的培养基为马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。采用研磨涂布法[8][9]和组织分离法[10][11][12]进行致病菌分离。研磨法用75%酒精消毒病叶, 在病健交界处切取5 mm左右方块, 在500 μ L 无菌水中研磨, 将研磨液制成 10^{-3} ~ 10^{-5} 浓度的病菌稀释液在平板上涂布。组织分离法选取带有典型白色病斑的硬叶兜兰叶片, 洗净后剪取病健交界3 mm \times 3 mm大小的组织块, 依次在75%酒精中消毒10 s, 无菌水中连续漂洗3次, 用无菌滤纸吸干植物组织块上的水后, 放置于PDA平板上。28 $^{\circ}$ C培养3 d后, 挑取优势菌落的菌丝到新的PDA平板上进行纯化培养, 28 $^{\circ}$ C培养4 d后转移到PDA斜面上, 于4 $^{\circ}$ C环境下保存。为了保证实验结果的准确性, 应进行多次分离培养, 以每次培养均为优势菌的菌种作为致病性测定的实验材料。

2.2.2. 致病性测定

根据柯赫氏法则, 以分离患病兜兰叶片获得的优势菌种为材料, 分三组试验对健康硬叶兜兰叶片进行致病性测定[13][14][15][16][17]。菌丝悬液的制备: 将分离得到的菌种接种到液体培养基中, 培养3 d制成液体菌悬液。接种方法: 硬叶兜兰叶片接种前先用清水将叶片表面清洗干净, 再用75%的酒精擦拭待接种的叶片, 之后, 用无菌水清洗晾干。第一组试验将硬叶兜兰叶片刺伤后接种病原菌的孢子进行致病性测定; 第二组试验利用液体培养法培养病原菌得到其菌丝, 使用灭菌针吸取菌悬液注射在被刺伤的健康硬叶兜兰叶片上进行致病性测定; 第三组试验将无菌水喷洒在被刺伤的健康硬叶兜兰叶片上作为对照组。将接种后的三组硬叶兜兰植株置于自然条件下种植, 定时用无菌水喷洒兜兰叶片进行保湿, 并观察发病情况。

2.2.3. 病原菌的形态鉴定

对通过致病性测定的病原菌进行形态学观察。将分离纯化后保存的菌种接种至新的PDA培养基中进行培养, 每隔2 d对病原菌菌落进行观察及记录。显微镜观察材料的制作方法: 制作大小为10 mm \times 10 mm, 厚度为1 mm的PDA培养基, 将培养基放到已灭菌的载玻片上, 用接种环接种少量经过纯化的病原菌孢子, 盖上盖玻片, 于25 $^{\circ}$ C的培养箱中培养。每隔1 d就使用光学显微镜观察病原菌及其分生孢子的形状、菌丝的分隔情况和颜色等特征并记录下来, 根据菌丝和孢子形态初步鉴定病原菌[18][19][20][21]。

2.2.4. 病原菌的分子鉴定

采用上海生工真菌基因组快速提取试剂盒, 根据其提取步骤提取病原菌的DNA。采用真菌ITS的通用引物ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增[22][23][24]。PCR扩增体系(25 μ L)为: 2 \times TaqPCR Master Mix 12.5 μ L、引物ITS-1 1 μ L、引物ITS-4 1 μ L、模板DNA 1 μ L、dd H₂O 9.5 μ L。PCR条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 进行25次循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸7 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后, 使用凝胶成像系统检测扩增结果, 选取条带清晰的样品按要求寄送到生工生物工程股份(上海)有限公司进行测序。将得到的测序结果与NCBI数据库进行BLAST比对, 比对结果利用MAGE7.0软件进行系统进化树的构建。

2.2.5. 天然抑菌植物的筛选及抑菌率的测定

将生姜、大蒜、洋葱各 200 g 切成小块, 分别放入榨汁机中将其汁液榨出, 使用纱布过滤, 弃掉滤渣, 收集滤液(100%)并用无菌水稀释成浓度分别为 20%、40%、60%、80%的稀释液, 放置 4℃ 冰箱备用。

在超净工作台上, 分别将不同浓度的生姜、大蒜、洋葱三种植物材料稀释液各 5 mL 与 15 mL 的 50℃ PDA 培养基混合均匀, 以 5 mL 无菌水与培养基混合作为对照。待培养基凝固后, 使用 6 mm 的打孔器打取经过活化培养的硬叶兜兰致病菌菌饼, 将菌饼接入到具有抑菌活性的培养基中央, 每个培养基中接入 1 个菌饼, 不同提取液种类及浓度各处理 3 个重复。将经过处理的培养基置于 26℃ 恒温培养箱中培养 6 d。采用十字交叉法测量第 4 d、第 5 d、第 6 d 的菌落直径, 与对照菌落作比较, 计算抑菌率。通过比较三种不同浓度的天然植物提取液的抑菌效果, 筛选出能高效抑制病原菌的植物材料及最适浓度。

$$\text{菌丝生长抑制率(\%)} = [(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / (\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径})] \times 100\%$$

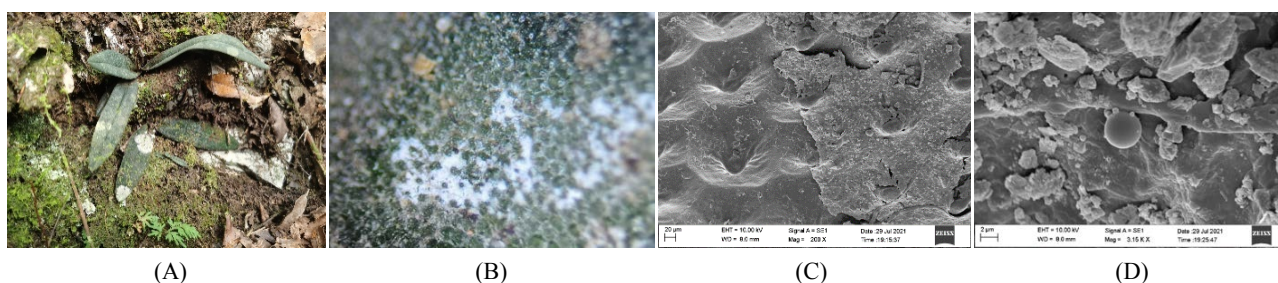
2.2.6. 数据处理

实验数据的处理用 Excel 2016 和 SPSS 20.0 进行, 用最小显著差数法(LSD 法)对相关实验数据的差异进行多重比较, 图形的绘制用 Origin 18.0 进行。

3. 结果与分析

3.1. 患病野生兜兰的发病情况及症状特点

致病菌主要是危害硬叶兜兰叶片表面, 不仅影响兜兰植株的观赏价值, 严重时会造成整张叶片枯萎。在进行野外调研时发现, 患病硬叶兜兰叶片多靠近地面或与地面土壤接触, 侵染周期较长, 病斑蔓延速度慢, 慢慢扩大成不规则病斑, 叶片的患病与健康部位分界限明显。利用体视显微镜对硬叶兜兰叶片上的致病菌进行观察, 结果发现, 该致病菌似白色粉末状附着于兜兰叶片表面。使用扫描电镜观察时发现, 在叶片病健交界处(硬叶兜兰叶片患病处与健康处的界限)可看到叶片上不长病斑的地方比较光滑, 表皮细胞呈多边形, 表面具乳突[25] [26]。长白色病斑的地方比较粗糙, 表面乳突不明显, 覆盖了一层不明物质。将硬叶兜兰叶片白色病斑处放大 500 倍时, 可发现菌丝的存在; 放大 3150 倍时, 可发现菌丝旁边出现孢子。(图 1)



注: A 为自然患病硬叶兜兰照片; B 为硬叶兜兰叶片白色病斑的体视显微镜照片(3X); C 为硬叶兜兰叶片病健交界处的扫描电镜照片(200X); D 为致病菌菌丝和孢子形态的扫描电镜照片(3150X)。

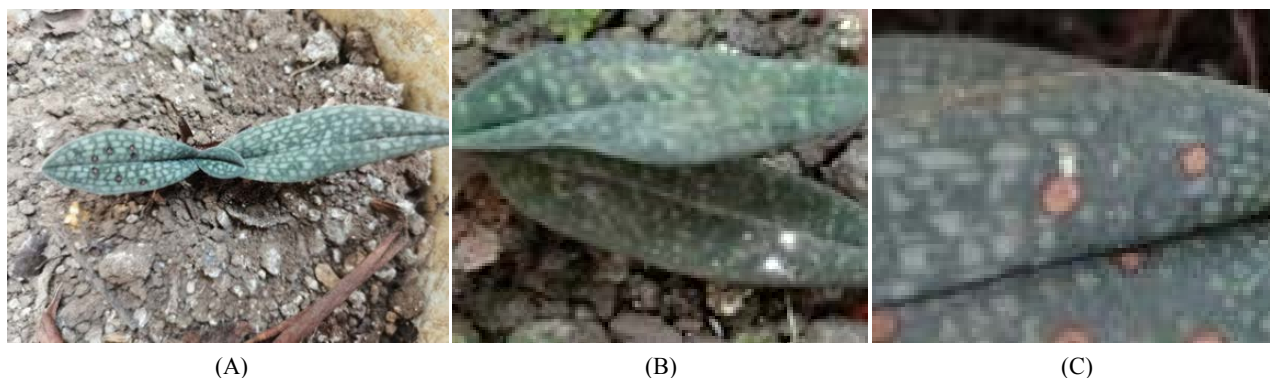
Figure 1. Symptoms and characteristics of naturally diseased wild *P. sclerophylla* leaves

图 1. 自然患病野生硬叶兜兰叶片症状特点

3.2. 病原菌的致病性测定结果

通过活体接种的方法进行分离菌株的致病性测定, 结果发现对照组无发病现象产生, 第一组试验和第二组试验接种后全部发病, 发病症状明显且引起的病害症状与自然患病的硬叶兜兰表现一致。第一组

试验接种两个月后, 在刺伤处出现白色病斑; 第二组试验接种两周后, 刺伤处出现白色病斑。将经过致病性测定而产生的白色病斑重新进行分离、镜检, 结果发现其与初期分离到的菌株形态特征相同。根据柯赫氏法则, 证明本试验的接种菌即为硬叶兜兰白色病斑的病原菌。(图 2)



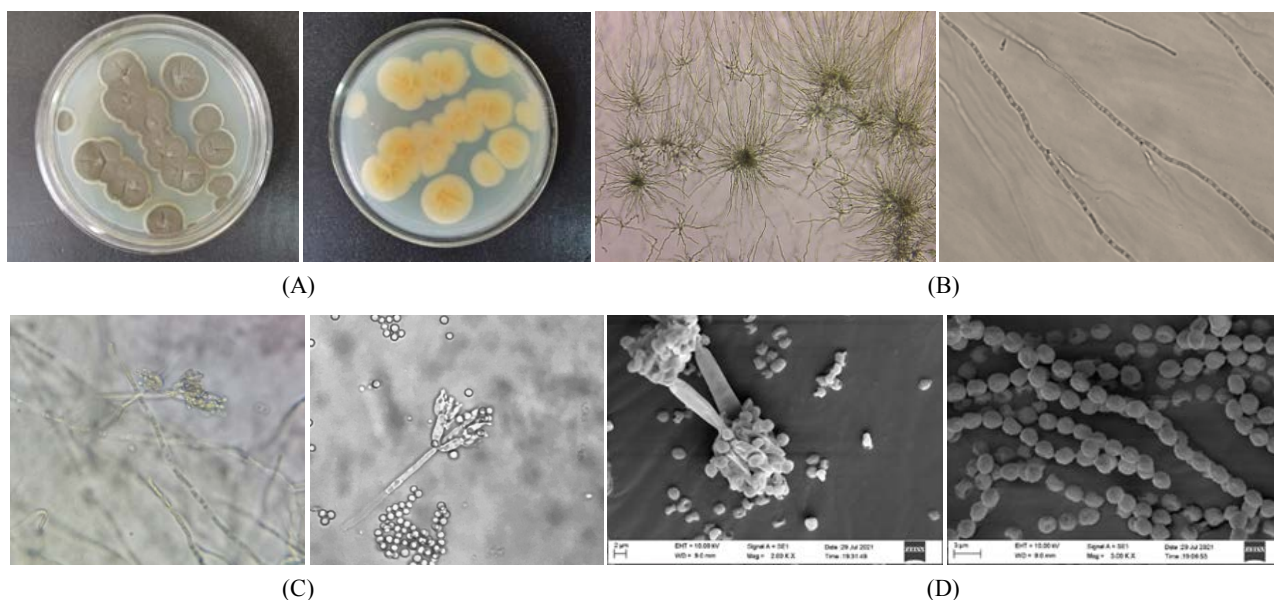
注: A 为无菌水刺伤(对照组); B 为菌丝刺伤接种; C 为孢子刺伤接种。

Figure 2. Pathogenicity determination results of pathogenic bacteria

图 2. 病原菌的致病性测定结果

3.3. 病原菌的形态学鉴定

菌落形态特征: 将病原菌培养 2 d 后, PDA 培养基表面即可见白色菌落长出; 培养 3 d 后, 白色菌落变成边缘呈白色、中间为蓝绿色的菌落; 接种 5 d 后, 菌落直径可达 1~1.5 cm, 呈圆形, 中心有脐状突起, 质地呈绒状, 带轻微絮状, 在边缘面上的颗粒状物通常更为突出; 接种 7 d 后, 菌落色素加深呈灰绿色, 菌落反面呈乳黄色, 质地平滑, 表面可见放射状皱褶。



注: A 为病原菌菌落的表面特征及背面特征(培养 7 d); B 为显微镜下病原菌的菌丝形态特征; C 为显微镜下病原菌的分生孢子梗特征; D 为扫描电镜下的病原菌分生孢子形态。

Figure 3. Morphological observation of pathogenic bacteria

图 3. 致病菌的形态观察

显微形态观察：在显微镜下对病原菌进行形态观察，发现病原菌的菌丝相互缠绕且有横隔；分生孢子梗长，帚状枝复杂，难以辨别出副枝和类副枝；分生孢子链较长，可弯曲；扫描电镜观察发现，病原菌产生的分生孢子近圆形，数量极多，易散落，孢壁粗糙，可见凹陷。(图 3)

3.4. 病原菌的分子生物学鉴定

将测序结果在 NCBI 中与已知序列进行 BLAST 比对后，发现硬叶兜兰叶片白色病斑的致病菌与灰黄青霉 *Penicillium griseofulvum* strain 46/193/195wat (KF811439.1) 的相似性达到 99.10%，下载相似性高的序列以及常见模式菌的序列后，通过 Mega7.0 软件以邻接法(NJ)构建系统进化树。综合分子比对结果和形态特征鉴定，最终将致病菌鉴定为灰黄青霉。其具体分类地位如下：隶属于子囊菌门(*Ascomycota*)，散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)，散囊菌目(*Eurotiales*)，丝裂孢科(*Trichocomaceae*)，青霉菌属(*Penicillium*)，灰黄青霉菌(*Penicillium griseofulvum* strain)。(图 4)

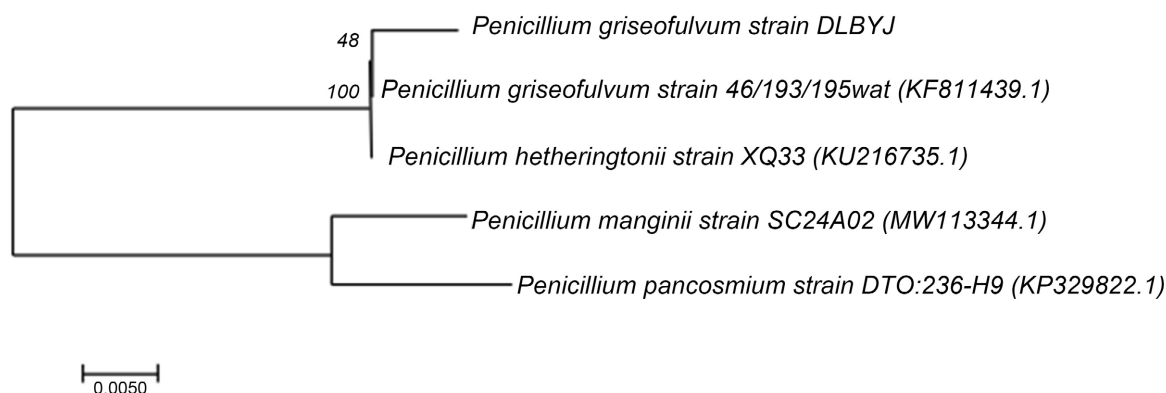


Figure 4. ITS phylogenetic tree constructed based on the neighbor-joining method

图 4. 基于邻接法构建的 ITS 系统发育树

3.5. 不同浓度植物提取液对硬叶兜兰叶片致病菌的抑菌效果

Table 1. Comparison of the antibacterial effects of different concentrations of plant extracts on pathogenic bacteria of *P. micranthum* leaves

表 1. 不同浓度植物提取液对硬叶兜兰叶片病原菌的抑菌效果比较

抑菌物质	培养时间 (d)	浓度(%)										CK
		20		40		60		80		100		
		菌落直径 (cm)	抑菌效果 (%)	菌落直径 (cm)	抑菌效果 (%)	菌落直径 (cm)	抑菌效果 (%)	菌落直径 (cm)	抑菌效果 (%)	菌落直径 (cm)	抑菌效果 (%)	菌落直径 (cm)
生姜	4	1.13 ± 0.03b	37.25 ± 3.40a	1.12 ± 0.13b	39.05 ± 2.21a	1.40 ± 0.05a	5.88 ± 5.88c	1.38 ± 0.02a	8.82 ± 2.94c	1.25 ± 0.27ab	23.62 ± 5.71b	1.45 ± 0.10a
	5	1.18 ± 0.03c	50.56 ± 2.45b	1.17 ± 0.13c	58.36 ± 3.20a	1.53 ± 0.03b	21.61 ± 2.12d	1.52 ± 0.08b	21.98 ± 6.50d	1.30 ± 0.30bc	40.56 ± 1.74c	1.77 ± 0.03a
	6	1.23 ± 0.06d	41.55 ± 2.01b	1.18 ± 0.10d	57.32 ± 2.79a	1.73 ± 0.13ab	6.36 ± 2.25d	1.53 ± 0.06bc	22.22 ± 4.81c	1.32 ± 0.29cd	40.23 ± 2.56b	1.80 ± 0.05a
	4	1.10 ± 0.00b	41.58 ± 4.11c	0.83 ± 0.08c	72.55 ± 2.07b	0.65 ± 0.00d	94.28 ± 2.82a	0.63 ± 0.06d	96.09 ± 3.38a	0.65 ± 0.05d	94.12 ± 5.88a	1.45 ± 0.10a

Continued

大蒜	5	1.32 ± 0.03b	39.01 ± 2.46e	1.02 ± 0.10c	64.54 ± 8.86d	0.88 ± 0.03d	76.60 ± 2.13c	0.77 ± 0.03e	85.81 ± 2.45b	0.67 ± 0.03f	94.32 ± 2.45a	1.77 ± 0.03a
	6	1.52 ± 0.03b	23.61 ± 2.41e	1.18 ± 0.16c	51.39 ± 5.43d	1.05 ± 0.05cd	62.50 ± 4.17c	0.92 ± 0.08de	73.61 ± 6.36b	0.77 ± 0.08e	86.11 ± 6.36a	1.80 ± 0.05a
洋葱	4	1.58 ± 0.02a	14.71 ± 2.95c	1.50 ± 0.00ab	-5.88 ± 0.00b	1.48 ± 0.13ab	-4.05 ± 4.77b	1.42 ± 0.10b	4.55 ± 6.57a	1.40 ± 0.09b	6.72 ± 0.52a	1.45 ± 0.10ab
	5	1.78 ± 0.03a	-0.71 ± 2.46b	1.85 ± 0.09a	-6.23 ± 4.02c	1.78 ± 0.28a	-0.82 ± 1.91b	1.68 ± 0.03a	8.51 ± 2.13a	1.62 ± 0.15a	13.62 ± 3.06a	1.77 ± 0.03a
洋葱	6	1.87 ± 0.03ab	-5.56 ± 2.40b	1.95 ± 0.15a	12.52 ± 3.06c	1.88 ± 0.25ab	-6.57 ± 0.84b	1.73 ± 0.03b	6.25 ± 2.08a	1.70 ± 0.00b	8.26 ± 2.28a	1.80 ± 0.05ab

注：实验数据为3次重复的平均值，结果用“平均值±标准误”表示。相关检测指标同一行数据后的不同英文小写字母表示差异显著， $P < 0.05$ 。

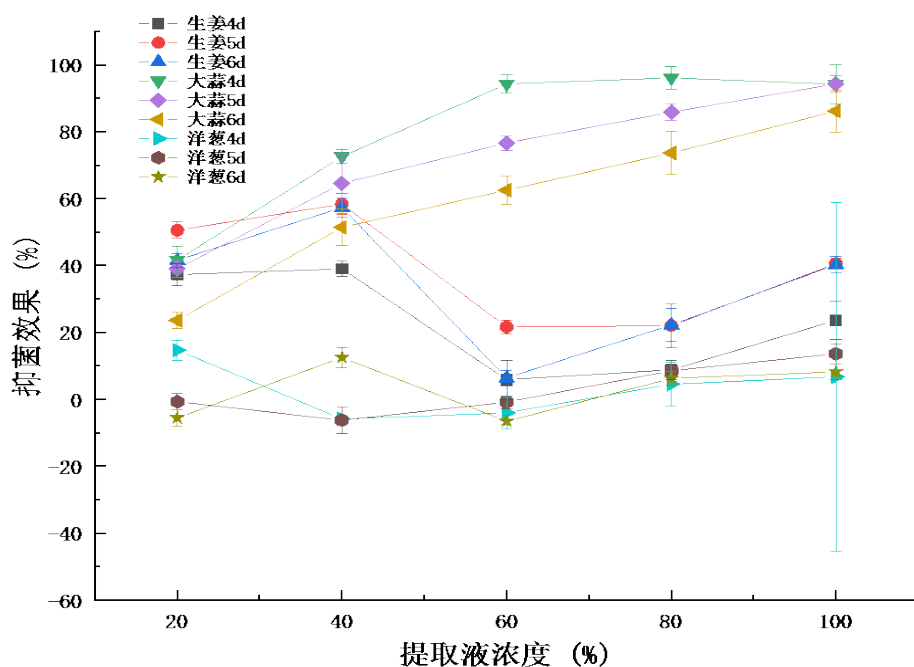


Figure 5. Comparison of inhibitory effects of different plant extracts on pathogenic bacteria of *P. micranthum*

图 5. 不同植物提取液对硬叶兜兰病原菌的抑制效果比较

明确病原菌的分类学地位是病害防控的基础，通过了解病原菌生物学特性，可为病害的防治提供依据。实验结果表明，生姜、大蒜及洋葱对硬叶兜兰致病菌均有一定的抑制效果，但不同植物提取液的抑菌效果有较大差异，其抑制作用强弱排序为：大蒜 > 生姜 > 洋葱。随着生姜提取液浓度的增加，其菌丝抑制率逐渐增加，当提取液的浓度为 40% 时，其对硬叶兜兰病原菌的抑制率最高；但随着生姜提取液浓度的继续增加，其抑菌作用却出现下降的趋势。大蒜提取液对硬叶兜兰病原菌有较强的抑制作用，浓度越高，抑菌效果越明显，其抑菌率最高达到 96%，说明大蒜提取液对硬叶兜兰病原菌有较好的抑制作用。洋葱提取液的抑菌作用不明显，虽然随着提取液浓度的增加，其抑菌效果有一定程度的增加，但其最好的抑菌效果仅为 13%；当提取液浓度低于 80% 时，其完全失去了抑菌作用。具体情况见表 1 和图 5。

4. 讨论

在进行硬叶兜兰致病菌的分离培养时,发现患病硬叶兜兰根际土壤中也有与灰黄青霉菌落形态一致的菌株。在野外调查时发现,患病兜兰叶片多靠近地面或与地面土壤相接触。青霉属真菌常生长在腐烂的水果、肉类和各种潮湿的有机物上,根据青霉属的生活习性,可以推测硬叶兜兰叶片病害的传播途径可能有空气传播和土壤传播两种,但是,以哪一种方式传播为主,有待进一步验证。

对患病硬叶兜兰叶片的病原菌分离培养后,最终鉴定出引起硬叶兜兰叶片产生白色病斑的致病菌为灰黄青霉。灰黄青霉是一种青霉属的真菌,常用于生产抗生素和生物制剂。据查阅相关文献资料,仅找到两例灰黄青霉感染动物的病例[27][28],以及1例灰黄青霉致人类感染的报道[29]。据报道,灰黄青霉的某些菌株可以产生赭曲霉毒素 A(OTA),该毒素具有多种毒性,严重危害人类和动植物健康[30]。因为灰黄青霉感染硬叶兜兰叶片的机理尚不明了,所以,不清楚其能否引起其他兰科植物致病。而与灰黄青霉同属的橘青霉(*Penicillium citrinum*)是一种植物致病菌,理论上两者可能具有相似的生物学特性,所以,灰黄青霉感染也可能使其他植物致病。

据报道,灰黄青霉可以产生灰黄霉素等次生代谢物质,灰黄霉素是一种低毒的抗生素,对部分致病菌的生长繁殖具有一定的抑制作用,因此可作为生防菌或生物农药使用[31]-[37]。另有文献报道,灰黄青霉与绿色木霉协同作用,可以作为生物染料对竹材进行染色[38]。白树猛等人发现,灰黄青霉对土壤和水体中的重金属污染比较敏感,因此可作为环境污染的指示生物[39][40]。邢翠平等研究发现,从灰黄青霉的代谢产物中,可分离出人体抗食物过敏的活性成分,因此具有很强的开发利用价值[41]。

抑菌试验的结果表明,生姜、大蒜和洋葱均对硬叶兜兰病原菌灰黄青霉有一定的抑制作用,其中大蒜提取液的抑菌效果最好。虽然生姜和蒜具有防治硬叶兜兰灰黄青霉病害的潜力,但其实际应用效果还需进一步验证。大蒜是一种价廉易得的植物资源,对多种病菌均有较强的抑制作用,因此,其抑菌潜力可以进一步挖掘,若能以此取代化学杀菌剂用于珍稀野生植物的生物学保育,则可以降低成本,保护生态环境。

5. 结论

根据以上实验结果及分析讨论,可以初步得到以下结论:木论自然保护区硬叶兜兰野生居群叶片的致病菌为灰黄青霉,其传播途径可能有空气传播和土壤传播两种;在生姜、大蒜和洋葱三种天然植物材料中,大蒜提取物对硬叶兜兰叶片的致病菌灰黄青霉的抑菌效果最好(抑菌率达到96%),生姜的抑菌效果次之,洋葱的抑菌效果最差。因此,天然植物(大蒜)抑菌剂值得进一步研究和开发利用。

基金项目

广西高校重点实验室(桂教科研 2010[6]号),桂西北地方资源保护与利用工程中心(桂教科研[2012]9号),广西高校大学生创新创业计划训练课题(202110605013),河池学院高层次人才科研启动费项目(XJ2018GKQ016)。

参考文献

- [1] 钟佳丽. 兰科植物研究进展[J]. 广东蚕业, 2020, 54(10): 29-30.
- [2] 龙波, 龙春林. 兜兰属植物及其研究现状[J]. 自然杂志, 2006, 28(6): 341-344.
- [3] 谭卫宁. 广西木论国家级自然保护区兜兰属(兰科)植物资源现状与保护对策[J]. 广西林业科学, 2009, 38(3): 187-189+196.
- [4] 任玉锋, 刘雅琴, 董博博, 等. 生姜汁、大蒜汁对灵武长枣采后病原真菌抑菌效果的研究[J]. 北方园艺, 2010(7): 145-147.

- [5] 张志敏, 侯发民, 张绍阳, 等. 大蒜素对刺梨白粉病的抑菌作用及防治效果[J]. 北方园艺, 2020(19): 46-51.
- [6] 唐俊妮, 王琼, 韦吉敏, 等. 洋葱汁对五种常见食源性病原细菌抑菌效果研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2015, 41(3): 277-284+260.
- [7] 李春华, 李天纯, 李柯澄. 兜兰盆花生产病虫害防治[J]. 中国花卉园艺, 2014(16): 38-39.
- [8] 寸东义, 赵文军, 杜宇, 等. 进境兰花褐斑病菌的分离及 PCR 鉴定[J]. 植物检疫, 2007, 21(4): 210-212.
- [9] 张则君, 张晓宇, 刘宏, 等. 植物内生细菌分离鉴定方法概述[J]. 农业技术与装备, 2012(22): 75-77.
- [10] 王晓国, 卢家仕, 周主贵, 等. 带叶兜兰菌根真菌分离和初步鉴定[J]. 西南农业学报, 2016, 29(2): 316-320.
- [11] 王春明, 元维伟, 张小杰, 等. 二月兰叶斑病病原甘蓝链格孢的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 草业学报, 2020, 29(5): 88-97.
- [12] 钟文文, 葛朝晖, 许俊杰. 剑兰叶斑病病原菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 131-138.
- [13] 陈耀丽, 俞龙春, 钱悦, 等. 大尖囊蝴蝶兰内生真菌和细菌的分离与鉴定[J]. 热带生物学报, 2019, 10(4): 372-379.
- [14] 张志光, 张天晓, 陈个贤, 等. 菟兰立枯病原菌及抗菌防治的研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1994, 17(1): 70-74.
- [15] 何海永, 赵玳琳, 谭清群, 等. 非洲菊根腐病原菌的分离鉴定及致病性[J]. 北方园艺, 2021(14): 87-93.
- [16] 钱双宏, 沈林波, 熊国如, 等. 甘蔗褐条病原菌分离鉴定及其室内毒力的测定[J]. 热带作物学报, 2015, 36(2): 353-357.
- [17] 石金巧, 张荣全, 龙友华, 等. 一种猕猴桃叶斑病原菌鉴定及生物学特性[J]. 北方园艺, 2021(12): 44-49.
- [18] 谢昌平, 洪玉凤. 鹤望兰叶斑病菌的鉴定及生物学特性[J]. 热带作物学报, 2005, 26(3): 91-95.
- [19] 覃茜, 陆祖正, 丁丽琼, 等. 广西兰花镰刀菌叶斑病原菌鉴定及生物学特性[J]. 北方园艺, 2019(18): 40-46.
- [20] 冉双飞. 西南地区主要兰科植物病原真菌鉴定及系统学研究[D]: [硕士学位论文]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [21] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 科学技术出版社, 1979: 479-482.
- [22] 吴剑丙, 朱江敏, 白坚, 等. 野生兰科植物菌根内生真菌分离及鉴定[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2011, 10(3): 228-232.
- [23] 徐波, 曾宋君, 宋凤鸣, 等. 兜兰茎腐病原菌鉴定和生物学特性及室内药剂筛选研究[J]. 广东农业科学, 2014, 41(14): 70-75.
- [24] 崔学强, 李秀玲, 范继征, 等. 兜兰萎蔫病原菌的分离与鉴定[J]. 西南农业学报, 2020, 33(12): 2846-2851.
- [25] 孙安慈. 兰属、兜兰属、石斛属植物叶片的扫描电镜观察[J]. 武汉植物学研究, 1995, 13(4): 289-294.
- [26] 查应琴, 关萍, 陈业, 等. 中国兜兰属 23 种植物叶表皮微形态特征初步研究[J]. 植物科学学报, 2019, 37(6): 709-718.
- [27] Oros, J., Ramirez, A., Poveda, J.B., et al. (1996) Systemic Mycosis Caused by *Penicillium griseofulvum* in a *Seychelles giant tortoise* (*Megalochelys gigantea*). *Veterinary Record*, **139**, 295-296. <https://doi.org/10.1136/vr.139.12.295>
- [28] Aho, R., Westerling, B., Ajello, L., et al. (1990) Avian Penicilliosis Caused by *Penicillium griseofulvum* in a Captive Toucanet. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **28**, 349-354. <https://doi.org/10.1080/02681219080000451>
- [29] 张静, 黄怀球, 袁立燕, 等. 一株致面部感染的灰黄青霉的形态学观察[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2012, 19(3): 128-131.
- [30] 彭娅萍. 葡萄中赭曲霉毒素 A 产生菌的筛选及其产毒机制研究[D]: [硕士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [31] 陈杰, 马永清, 郭振国, 薛泉宏. 灰黄青霉对瓜列当的防效及对番茄根区土壤微生物的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019, 27(5): 766-773.
- [32] 孙跃跃, 马军妮, 李玉龙, 等. 功能性育苗基质中生防菌及腐植酸钾对甜瓜穴盘苗的促生作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(9): 174-180.
- [33] 李玉龙. 生防菌对两种作物病害的防治作用及机理[D]: [博士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [34] 龙熙翠, 钟介石, 吴怡, 等. 滇重楼内生真菌的分离及其抑菌活性[J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38(8): 16-19.
- [35] 申光辉, 薛泉宏, 张晶, 等. 草莓根腐病拮抗真菌筛选鉴定及其防病促生作用[J]. 中国农业科学, 2012, 45(22): 4612-4626.
- [36] 朱育菁, 于晓杰, 潘志针, 等. 灰黄霉素的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2010, 49(3): 435-439.

- [37] 邵旗. 烟曲霉与灰黄青霉化学成分及抗微生物活性[D]: [硕士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [38] 王皓炜. 灰黄青霉/绿色木霉协同染色毛竹材的研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 北京林业大学, 2021.
- [39] 白树猛. 半知菌优势种与海洋环境污染之间的关系和检测[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 青岛科技大学, 2009.
- [40] 白树猛, 田黎, 史振平, 等. 近岸污染指示半知菌灰黄青霉(*Penicillium griseofulvum*)的分子检测[J]. 微生物学报, 2010, 50(1): 76-80.
- [41] 邢翠平. 深海来源构巢曲霉和灰黄青霉的抗过敏活性成分研究[D]: [硕士学位论文]. 厦门: 自然资源部第三海洋研究所, 2019.