

· 中药农业 ·

甘草种子携带真菌检测与致病性分析[△]徐秀兰¹, 尚兴朴^{2a}, 马丽娟³, 芦钰⁴, 王玉玺⁴, 邱艳红¹, 张海军¹, 吴萍^{1*}

1. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097;

2. 中国中药有限公司, 北京 100195;

3. 河北科技师范学院 农学与生物科技系, 河北 秦皇岛 066004;

4. 中国农业大学 植物保护学院, 北京 100093

[摘要] 目的: 明确甘草种子携带真菌及其致病性, 对产自不同地区的4个批次甘草种子进行种子外部、内部携带真菌的检测与致病性分析。方法: 通过将不同形态的真菌进行分离纯化、显微形态学观察、以及16S内转录间隔区(ITS)序列比对等方法确定分离真菌的种属, 并将分离菌株回接到甘草幼苗确定其是否为致病菌。结果: 甘草种子外部携带的真菌主要为青霉属 *Penicillium* spp.、曲霉属 *Aspergillus* spp.、链格孢属 *Alternaria* spp.、芽枝状枝孢霉 *Cladosporium cladosporioides*、毛霉属 *Mucor* spp.、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 等; 内部携带的真菌主要为青霉属 *Penicillium* spp.、曲霉属 *Aspergillus* spp.、链格孢属 *Alternaria* spp. 和尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*。不同批次甘草种子外部携带的真菌具有显著性差异, 同时甘草种子外部带菌量和内部带菌率存在正相关关系, 可以通过甘草种子外部带菌量推测甘草种子内部带菌率。通过致病性测试确定具有致病性的真菌有立枯丝核菌 *R. solani*、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*。结论: 结果可为甘草种子药剂处理预防种传病害提供参考。

[关键词] 甘草; 种子; 真菌; 检测; 立枯丝核菌; 尖孢镰刀菌

[中图分类号] S567 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)12-2043-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190825002

Detection and Pathogenicity Test of Seed-borne Fungi of *Glycyrrhiza uralensis* SeedXU Xiu-lan¹, SHANG Xing-pu^{2a}, MA Li-juan³, LU Yu⁴, WANG Yu-xi⁴, QIU Yan-hong¹,
ZHANG Hai-jun¹, WU Ping^{1*}

1. Beijing Vegetable Research Center of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China;

2. China National Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Beijing 100195, China;

3. Department of Agriculture and Biotechnology, Hebei Normal University of Science and Technology,
Qinhuangdao 066004, China;

4. School of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100093, China

[Abstract] **Objective:** In this experiment, both internal and external seed-borne fungi from four batches of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) seeds were isolated by culturing on potato dextrose agar medium. **Methods:** Identification of the isolated fungi was conducted by morphology observation, and 16S ITS PCR sequence amplification. Licorice seedlings were inoculated with the fungal isolates for pathogenicity test following Koch's postulates. **Results:** The results showed that the external seed-borne fungi were mainly *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporioides cladosporioides*, *Mucor* spp., *Rhizoctonia solani*. The fungi seed carried internally included *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. and *Fusarium oxysporum*. There were significant differences in the fungal amount and species between different batches of licorice seeds. There was a positive correlation between the fungal amount on the external seed and the seed internal infection rate, which indicated that the seed internal infection rate could be predicted by the external fungal amount on seed.

[△] [基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1701400); 北京市农林科学院公益检测专项(yzx002); 国家中药材产业技术体系遗传改良研究室建设项目(CARS-21)

* [通信作者] 吴萍, 副研究员, 研究方向: 种子处理技术; Tel: (010)51503077, E-mail: wuping@nrcv.org

^a 并列第一作者

Pathogenicity test confirmed two pathogenic fungal isolates, *R. solani* and *F. oxysporum*. **Conclusion:** This study provides basic data for developing treatment for licorice seed to prevent seed-borne diseases.

[**Keywords**] *Glycyrrhiza uralensis* Fisch; seed; fungus; detection; *Rhizoctonia solani*; *Fusarium oxysporum*

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 以根和根茎入药, 具有补脾益气、祛痰止咳、缓急止痛等功效, 能调和百草, 素有“十方九草”之美誉, 是我国市场需求旺盛的中药^[1]。野生甘草多生长于三北地区^[2], 是构成我国北方荒漠植被的重要植物, 具备生态和经济的价值, 对环境资源保护起着不可替代的作用^[3]。甘草不仅广泛应用于中医临床, 其制品甘草浸膏、甘草酸粉盐等在食品、保健品、化妆品、烟草、轻工等许多行业也备受青睐, 国际市场需求量日益增长。2016年, 我国甘草及制品的进口量为2.8万t, 进口额达37 000万美元^[4]。

甘草病害的发生及危害一直都是影响甘草产量及其品质最主要的限制因素。据报道, 目前我国甘草主要病害包括锈病、根腐病、褐斑病、白粉病、猝倒病和立枯病等真菌性病害^[5]。种子药剂处理是提高播种品质和防治种传病害最简单、经济有效的方法^[6]。本研究旨在对甘草种子进行内外部携带真菌检测, 并对种传真菌的致病性进行测试, 为甘草种子药剂处理预防种传病害提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(批号: DL114-01, 博迈德生物有限公司); 乳酸葡萄糖培养基(aPDA, 批号: BCBN5254V, Fluka 公司); 乳酸(批号: 20180312, 福晨化学试剂有限公司); 98% 硫酸溶液(批号: 20160318, 光复科技发展有限公司)。

Centrifuge 5424 R 型高速离心机、Centrifuge 5810 R 型高速离心机、MLX-204 型瞬时离心机(Eppendorf 中国有限公司); XT5408-GC380TL2 型光照培养箱(杭州雪中炭恒温技术有限公司); T110 型 PCR 仪(Bio-Rad 公司); LDZF-50KB 型灭菌锅(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); ShockMixer-1 型脉冲震荡样品前处理器(广东环凯微生物科技有限公司)。

4 个批次来自不同产区的甘草种子样品, 未经任何加工处理于常温下在编织袋中保存。样品为中国中药有限公司提供, 由中国中药有限公司王继永研究员

鉴定为 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的种子。4 个批次的种子均收获于 2018 年。批次 A 产自新疆维吾尔自治区焉耆县; 批次 B 产自新疆维吾尔自治区阿勒泰地区; 批次 C 产自内蒙古自治区赤峰市; 批次 D 产自甘肃省会宁县。种子样品抽取参考 *International Rules for Seed Testing* 第 2 章扦样, 在随机选取的不同种子袋中抽取等量初次样品, 混合后为送检样品^[7]。

1.2 方 法

1.2.1 种子外部带菌检测 随机选取 4 个批次甘草种子各 10 g(1000 粒)分别放入均质袋内, 加入无菌水 20 mL 拍打 60 s, 吸取全部悬浮液, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min(离心半径为 16 cm), 除去上清液, 加入 1 mL 无菌水均匀悬浮沉淀, 取适量悬浮液进行梯度稀释, 分别稀释 1 × 10⁻¹、1 × 10⁻²、1 × 10⁻³、1 × 10⁻⁴, 每个稀释梯度菌悬液吸取 100 μL 均匀涂布到 aPDA 培养基上, 每个浓度重复 3 次, 置于 28 °C 恒温箱中培养 2~3 d, 观察记录平板上的菌落总数, 根据稀释倍数和检测种子数计算种子外部携带的孢子负荷量和检出真菌的分离比例。每个供试种子批次重复 4 次。

孢子负荷量 = 3 皿菌落总数 / 0.3 mL × 稀释倍数 / 1000 (1)

分离比例 = (某类真菌菌落个数 / 菌落总数) × 100% (2)

1.2.2 种子内部带菌检测 4 个批次甘草种子样品随机选取 100 粒种子作为 1 个重复, 用 75% 乙醇浸泡 30 s, 1% 次氯酸钠溶液浸泡 3 min, 然后用无菌水冲洗 3 次, 晾干, 将种子均匀摆放在 aPDA 平板上, 每个平板上摆放 20 粒, 共 5 皿, 置于 28 °C 恒温培养 2~3 d, 观察并记录平板上的菌落总数并拍照, 每个供试品种批次设置 4 个重复。

随机选取 4 个批次甘草各 100 粒, 用 98% 硫酸浸泡 50 min, 然后用无菌水冲洗 3 次, 晾干。将种子均匀摆放在 aPDA 平板上, 每个平板上摆 20 粒, 共 5 皿, 置于 28 °C 恒温培养 2~3 d, 观察并记录平板上的菌落总数并拍照, 每个供试品种样品重复 4 次。根据公式(3)~(4)计算种子带菌率和分离频率。

种子带菌率 = (带菌种子数/检测种子总数) × 100% (3)

分离频率 = (带某类菌种子数/带菌种子数) × 100% (4)

1.2.3 真菌形态学鉴定 将分离到的不同种类的真菌转移到 aPDA 培养基上进行纯化, 然后通过显微镜观察菌丝和孢子的形态, 结合真菌培养性状和形态学特征, 参考相关工具书和文献鉴定到属^[8-10]。

1.2.4 真菌分子鉴定 收集在 aPDA 培养基培养 4 d 的真菌菌丝至 1.5 mL 离心管中, 分别编号, 放入液氮中充分冷却后取出研磨充分。采用核酸快速提取试剂盒, 按照操作使用说明提取 DNA, 提取的 DNA 质量浓度稀释到 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 保存在 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

以上述提取总 DNA 为模板, 用真菌通用引物内转录间隔区 (ITS)1/ITS4 进行 PCR 扩增^[11]。扩增体系为 $2 \times \text{mix } 2 \mu\text{L}$, ITS1 $2 \mu\text{L}$, ITS4 $2 \mu\text{L}$, $\text{ddH}_2\text{O } 19 \mu\text{L}$, 检测样品 $2 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 终止温度在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。反应结束后取 $5 \mu\text{L}$ 产物进行琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物测序, 通过 BLAST 序列比对, 鉴定到属、种。

1.2.5 甘草种子芽率与幼苗发病率测定 将甘草种子浸泡于 98% 硫酸 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 50 min, 至种皮表面破损出现均匀小点, 在超净工作台上用无菌水洗净晾

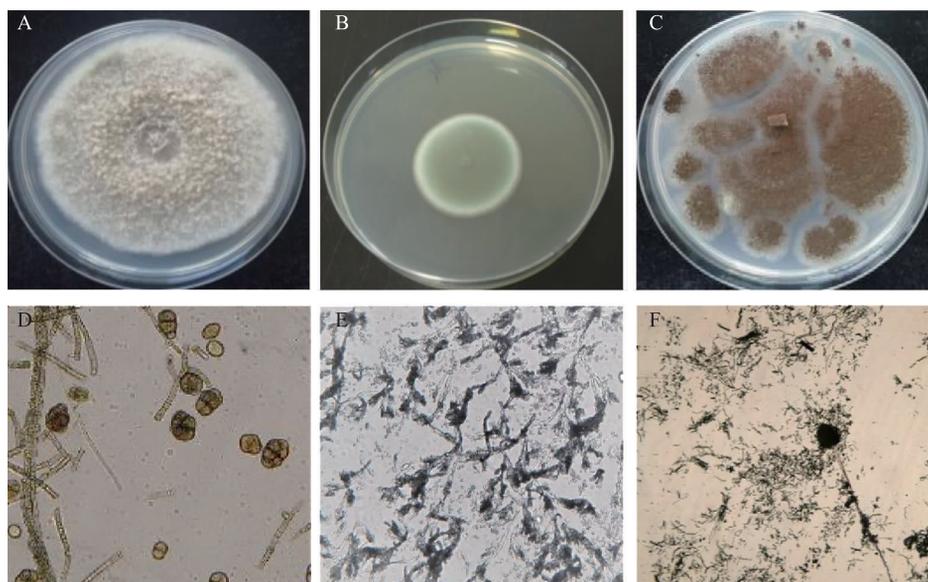
干, 取 100 粒播种于灭菌的基质中, 设置 4 次重复, 于 7、14 d 记录种子发芽率, 同时观察并记录幼苗发病情况。

1.2.6 真菌致病性测定 将甘草幼苗每盆移植 2 株, 放入光照 ($20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 16 h 光照, 8 h 黑暗) 培养箱培养, 在幼苗生长 12 d 时进行实验。将纯化的 6 个真菌菌株 (曲霉、链格孢、毛霉、尖孢镰刀菌、芽枝状枝孢霉、立枯丝核菌) 在 aPDA 培养基上 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 4~5 d, 形成一定大小的菌落。用灭菌的打孔器在菌落靠近边缘处打取菌饼 ($\Phi = 6 \text{ mm}$), 将菌饼贴附于甘草幼苗茎基部, 每个菌株处理 3 株幼苗作为重复。对照组采用无菌的 aPDA 琼脂块 ($\Phi = 6 \text{ mm}$) 贴附于甘草幼苗茎基部。接种完毕后将甘草幼苗放在光照培养箱中 ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 16 h/8 h、光照/黑暗) 继续培养, 观察其发病情况。将上述处理后甘草幼苗的发病部位用 75% 酒精消毒, 切取片段放入 aPDA 平板中培养, 分离纯化后按照 1.2.3、1.2.4 项下进行形态学、分子学鉴定。

2 结果与分析

2.1 种传真菌鉴定

2.1.1 种传真菌形态学鉴定结果 如图 1 所示, 根据真菌的形态和在显微镜下菌丝与孢子的形态初步确定分离得到部分菌株为链格孢属 *Alternaria* spp.、青霉属 *Penicillium* spp. 和曲霉属 *Aspergillus* spp. 真菌。



注: A. 链格孢属 *Alternaria* sp. 菌落形态; B. 青霉属 *Penicillium* sp. 菌落形态; C. 曲霉属 *Aspergillus* sp. 菌落形态; D. 链格孢属 *Alternaria* sp. 在显微镜下 (10×20 倍) 分生孢子与菌丝形态; E. 青霉属 *Penicillium* sp. 在显微镜下 (10×10 倍) 分生孢子与菌丝形态; F. 曲霉属 *Aspergillus* sp. 在显微镜下 (10×10 倍) 分生孢子与孢子梗形态。

图 1 分离真菌菌落形态及显微形态

2.1.2 种传真菌分子鉴定结果 未能通过形态鉴定的菌株通过 ITS 测序在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 比对序列鉴定菌株有曲霉 *Aspergillus* sp.、互隔交链孢霉 *Alternaria alternata*、毛霉 *Mucor* sp.、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、芽枝状枝孢霉 *Cladosporioides*；种子内部携带尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 及互隔交链孢霉 *Alternaria alternata* (见表1)。

表1 分离菌株 ITS 序列比对结果

菌株编号	序列长度/bp	比对结果	学名
G1W	607	曲霉属	<i>Aspergillus</i> sp.
G-2W	564	互隔交链孢霉	<i>Alternaria alternata</i>
G-4W	571	毛霉属	<i>Mucor</i> sp.
G-6W	715	立枯丝核菌	<i>Rhizoctonia solani</i>
G-10W	542	芽枝状枝孢霉	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
G-6N	560	尖孢镰刀菌	<i>Fusarium oxysporum</i>
G3N	572	互隔交链孢霉	<i>Alternaria alternata</i>

2.2 甘草种子外部携带真菌种类

甘草种子外部带菌检测结果如表2所示,不同批次的甘草种子外部带菌量差异较大,在所检测的4批次中,批次A的外部带菌量最高,每粒种子的平均孢子负荷量为7.1个,且与其他批次差异显著。甘草种子外部主要携带的真菌有青霉属 *Penicillium* spp.、曲霉属 *Aspergillus* spp.、链格孢属 *Alternaria* spp.、芽枝状枝孢霉 *Cladosporium cladosporioides*、毛

霉属 *Mucor* spp.、立枯丝核菌 *R. solani* 等。其中,致病菌有立枯丝核菌 *R. solani* 和曲霉 *Aspergillus*。

2.3 甘草种子内部携带真菌种类

甘草种子内部携带真菌检测结果如表3所示,不同批次的甘草种子内部带菌率差异有统计学意义。批次A的内部带菌率最高,为25%,与批次B和C差异有统计学意义,与批次D差异无统计学意义,甘草种子内部携带的真菌主要有青霉属 *Penicillium* spp.、曲霉属 *Aspergillus* spp.、链格孢属 *Alternaria* spp. 和尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*。4个批次甘草种子均携带链格孢属 *Alternaria* spp., 批次A和C带有青霉属 *Penicillium* spp., 批次D有曲霉属 *Aspergillus* spp.。在批次A中还发现了尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*, 其中致病菌有尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 和曲霉 *Aspergillus*。

2.4 甘草种子外部带菌量与内部带菌率的相关性分析

甘草种子外部带菌量与内部带菌率相关性分析结果如图2所示,甘草种子外部带菌量与内部带菌率呈正相关关系,甘草种子外部带菌量越高,种子内部带菌率就越高;种子外部带菌量每升高1个/粒,种子内部带菌率就增加2.965%。此外,3个批次的种子外部、内部均分离得到链格孢属,分析发现种子外部链格孢属量和内部链格孢属带菌率具有类似相关性(见图3),表明可通过种子外部带菌量可以推测种子内部带菌率情况。

表2 甘草种子外部带菌检测结果

批次	每粒孢子负荷量/个	分离比例/%					立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>
		青霉属 <i>Penicillium</i>	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	链格孢属 <i>Alternaria</i>	毛霉属 <i>Mucor</i>	芽枝状枝孢霉 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	
A	7.1 a	—	98.0	—	—	—	2
B	1.6 d	25.0	—	25.0	—	50.0	—
C	2.4 c	49.5	32.1	9.2	9.2	—	—
D	4.0 b	—	11.0	83.0	3.0	—	3

注:表中同列数值带有不同字母表示 $P < 0.05$; —表示未分离到该类真菌;下同。

表3 甘草种子内部带菌检测结果

批次	带菌率/%	分离频率			
		青霉属 <i>Penicillium</i>	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	链格孢属 <i>Alternaria</i>	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>
A	25 a	16.7	—	50	33.3
B	10 b	—	—	100	—
C	10 b	50.0	—	50	—
D	20 a	—	50	50	—

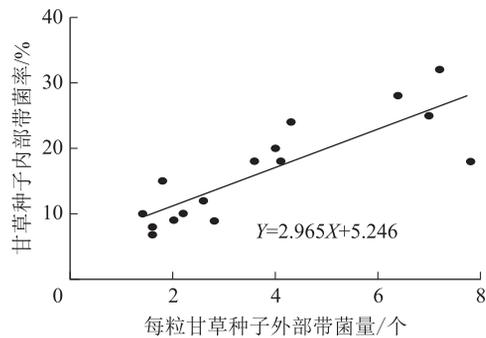


图2 甘草种子外部带菌量与内部带菌率的相关性

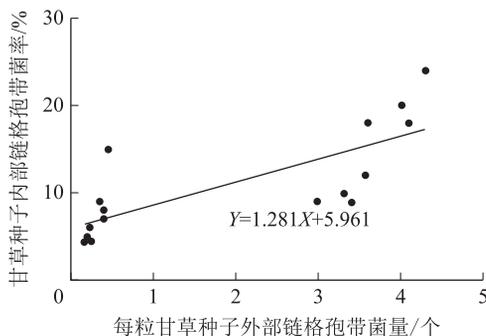


图3 甘草种子外部与内部携带链格孢量的相关性

2.5 未处理和98%硫酸处理过的甘草种子发芽率比较结果

未处理和用98%硫酸处理过的甘草种子发芽率(见图4)。用98%硫酸处理过的比未处理的甘草种子发芽率高,说明98%硫酸可以帮助打破甘草的种皮机械障碍促进种子发芽。用98%硫酸处理的甘草种子批次A、B、C、D的发芽率分别为100%、88%、74%、54%;不做处理的甘草种子批次A、B、C、D的发芽率分别为46%、10%、12%、12%。经差异性分析得出4个批次的甘草种子经98%硫酸处理后的发芽率均显著高于未处理种子。

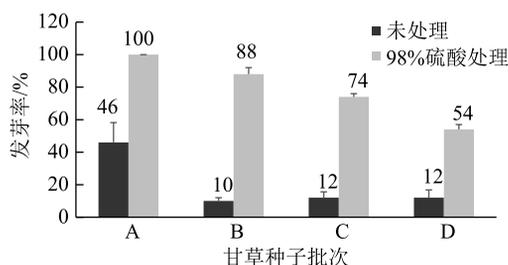


图4 未处理和98%硫酸处理过的甘草种子发芽率(n=400)

2.6 98%硫酸处理对甘草种子幼苗发病率的影响

未处理和用98%硫酸处理过的甘草种子幼苗发

病率不同(见图5),未处理的甘草种子幼苗发病率较高,其幼苗发病率分别为61%、11%、33%、40%;用98%硫酸处理大大降低了甘草种子幼苗的发病率,可以杀死其表面的部分真菌,其幼苗发病率分别是4%、0%、2.7%、7.1%。

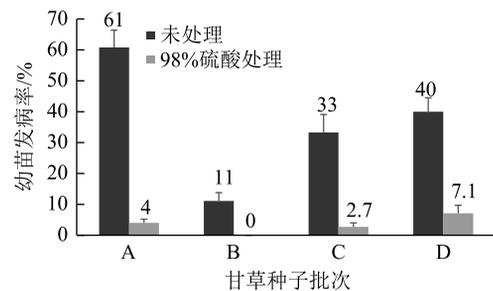


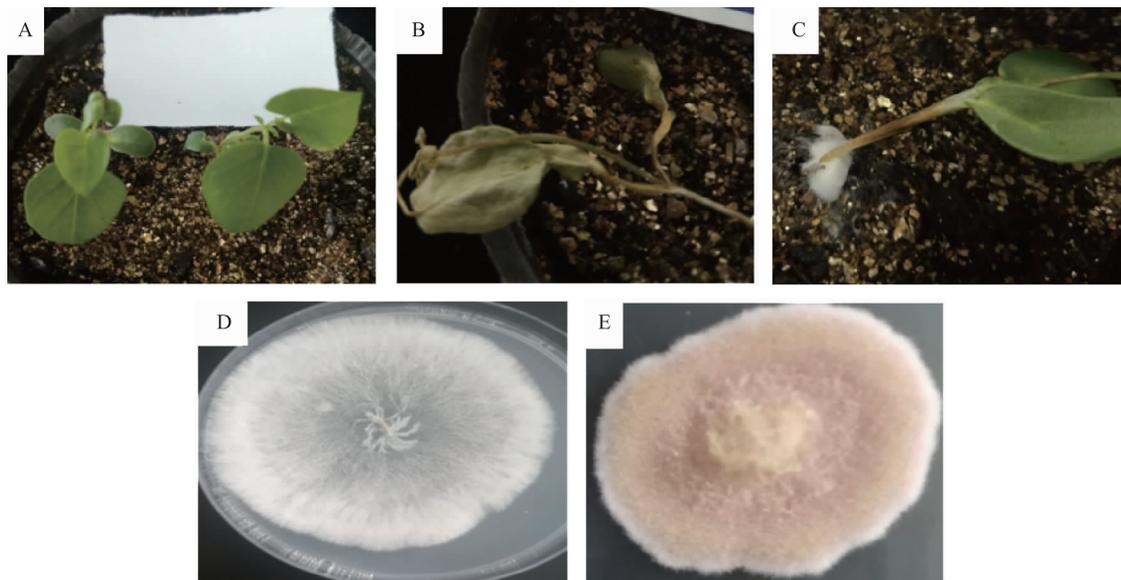
图5 未处理和98%硫酸处理过的甘草幼苗发病率(n=400)

2.7 真菌致病性检测

将纯化的真菌菌株(曲霉、链格孢、毛霉、尖孢镰刀菌、芽枝状枝孢霉、立枯丝核菌)回接到健壮甘草幼苗茎基部上,9d后发现回接尖孢镰刀菌、立枯丝核菌的甘草幼苗发生枯萎症状(见图6),将发病幼苗病变部位用75%乙醇消毒后放在aPDA平板上,2d后发现接种立枯丝核菌、尖孢镰刀菌的培养基上的菌落形态与所接种真菌的菌落形态一致。通过16S ITS序列比对,确认分离菌株为接种菌株。通过接种试验确认了种传尖孢镰刀菌、立枯丝核菌可引起甘草幼苗病害。

3 结论与讨论

本研究对4个不同批次的甘草种子进行内外部携带真菌检测。结果表明,不同批次的种子带菌量与真菌种类均有差异。虽然4个批次甘草种子经过了相同的加工与存储过程,但是由于产自不同地区,种子的带菌情况受到发育过程不同环境影响而不同。据相关报道,甘草种子携带的真菌主要有曲霉菌、青霉菌、根霉菌和链格孢菌^[11]。本研究发现甘草种子携带的真菌还包括芽枝状枝孢霉、毛霉属、立枯丝核菌和尖孢镰刀菌。甘草种子携带的真菌中链格孢菌所占的比例最高,同时进行了真菌致病性测定,经过接种幼苗后再分离发病植物组织,得到尖孢镰刀菌、立枯丝核菌为致病菌。为进一步确认甘草种子可携带的致病真菌,下一步研究可开展相同产区不同种子批次,不同年份收获种子批次带菌检测分析。



注: A. 无菌 aPDA 接种的对照植株; B. 立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 接种植株; C. 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 接种植株; D. 立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 菌落形态; E. 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 菌落形态。

图6 甘草种子真菌致病性结果

一般情况下,种子内部带菌检测采用次氯酸钠消毒,而后将种子摆放在培养基上培养^[12]。本研究由于使用次氯酸钠消毒后种子培养时有大量细菌生长,干扰检测,因此采用了98%硫酸处理后的种子进行内部带菌检测,消除了细菌的干扰,其携带的真菌并没有被完全消灭,说明98%硫酸未能将甘草种子内部携带的真菌完全清除,在适宜的条件下也可用于种子外部消毒。

测定98%硫酸处理和未处理甘草种子的幼苗发芽率与发病率时发现,98%硫酸处理过的甘草幼苗发芽率显著升高且发病率显著降低,说明98%硫酸处理可以促进种子萌发并杀死甘草种子表面携带的部分真菌,降低甘草幼苗发病率。尤其是批次A的甘草种子用98%硫酸处理后发芽率达到100%,98%硫酸处理可使甘草种子种皮破损利于发芽^[13],发病率也显著降低,可以作为推荐甘草种子处理方式。

此外,本研究发现,甘草种子外部带菌量和内部带菌率存在正相关关系,可以通过甘草种子外部带菌量推测甘草种子内部带菌率。研究结果可以为甘草种子药剂处理预防种传病害提供基础数据。

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,2015,86.

- [2] 黄文静,高静,王楠,等. 甘草种子萌发特性的研究[J]. 种子,2018,37(8):12-15.
- [3] 尚兴朴,邓庭伟,曾燕,等. 两种甘草种子伪品的鉴别[J]. 中国现代中药,2019,21(2):204-207.
- [4] 王诺,臧春鑫,杨光. 中国生物遗传资源进出境调查报告(2018)[M]. 北京:经济科学出版社,2019:144-146.
- [5] 贺达汉. 宁夏中药材病虫害防治中的问题及对策[J]. 宁夏农林科技,2002,43(6):32-34.
- [6] 尼尔高. 种子病理学[M]. 狄原渤,译. 北京:农业出版社,1984.
- [7] International Seed Testing Association. *International Rules for Seed Testing* [M]. Zurich: International Seed Testing Association,2020.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979.
- [9] 周与良,邢来君. 真菌学[M]. 北京:高等教育出版社,1990.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [11] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[J]. PCR Protocols,1994(38):315-322.
- [12] 淡红梅,李静,李先恩,等. 甘草种子带菌检测和药剂消毒处理效果研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(7):542-546.
- [13] 安钰,李明,李生兵,等. 不同处理对甘草种子发芽率和出苗率的影响[J]. 中国现代中药,2017,19(9):1287-1290.

(收稿日期:2020-08-25 编辑:戴玮)