江西农业大学学报　2024,46(4)　　http://xuebao.jxau.edu.cn
Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis　　https://doi.org/10.3724/aauj.2024081

刘彤珂,赖家豪,熊桂红,等.桑椹菌核病菌的分离鉴定及室内药剂筛选[J].江西农业大学学报,2024,46(4):914-923.
LIU T K,LAI J H,XIONG G H,et al.Isolation and identification of mulberry fruit sclerotiniosis pathogen and laboratory screening of biological fungicides[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2024,46(4):914-923.

桑椹菌核病菌的分离鉴定及室内药剂筛选

刘彤珂,赖家豪,熊桂红,游　婧,蒋军喜,刘　冰*

(江西农业大学 农学院,江西 南昌 330045)

摘要:【目的】桑椹菌核病是桑果上的一种毁灭性病害,对果桑产业的健康发展和产量稳定构成了严重的威胁。分离鉴定引起江西省乐安县桑椹菌核病的病原菌并筛选抑制其菌丝生长的生物农药,为后续研究该病绿色防控技术提供理论依据。【方法】利用组织分离法和柯赫氏法则对江西省乐安县的发病桑椹进行病原分离和致病性测定;采用形态学和分子生物学手段对分离到的病原菌进行鉴定并优化其培养条件;采用含药平板法测定7种生物农药对病原菌的抑制效果。【结果】从发生桑椹菌核病的种植地采集的菌核分离出的8株真菌在PDA培养基上培养特征一致,以菌株JH21为代表对其ITS和RPB2序列扩增测序,经过同源比对确定JH21为核地杖菌(*Scleromitrula shiraiana*)。该菌的菌丝在pH为6的绿豆葡萄糖琼脂培养基(MBDA)上12 h/12 h光暗交替、20~25 ℃培养时生长较好。室内药剂筛选结果表明,0.3%四霉素水剂和0.3%丁子香酚可溶液剂对核地杖菌有较好抑制作用,其EC_{50}分别为0.078 μg/mL、0.667 μg/mL。【结论】研究确定了在江西省乐安县种植园中的桑椹主要受到由核地仗菌侵染引起的缩小性菌核病的威胁。四霉素和丁子香酚作为生物农药具有绿色、安全的特点,在防治桑椹菌核病方面具有应用潜力。

关键词:桑椹菌核病;病原鉴定;核地杖菌;培养条件;生物农药
中图分类号:S888.71+9　　**文献标志码**:A　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID)**:
文章编号:1000-2286(2024)04-0914-10

Isolation and identification of mulberry fruit sclerotiniosis pathogen and laboratory screening of biological fungicides

LIU Tongke, LAI Jiahao, XIONG Guihong, YOU Jing, JIANG Junxi, LIU Bing*

(College of Agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: [**Objective**] Mulberry fruit sclerotiniosis is a destructive disease on mulberry fruits, which poses a serious threat to the healthy development of the fruit and mulberry industry and yield stability. In order to provide the theoretical basis for the green prevention and control technology of mulberry fruit sclerotiniosis, the pathogens causing mulberry fruit sclerotiniosis in Le'an County, Jiangxi Province, were isolated and identified and the biopesticides with the ability of inhibiting the growth of the pathogens mycelium were screened. [**Method**] Tissue isolation method and Koch's rule were used to isolate and determine the

收稿日期:2023-12-04　　**修回日期**:2024-05-13
基金项目:国家自然科学基金项目(31460139)和江西省蚕桑产业技术体系(JXARS-23)
Project supported by National Natural Science Foundation of China(31460139) and Jiangxi Sericultural Industry Technology System(JXARS-23)
作者简介:刘彤珂,硕士生,orcid.org/0009-0001-9041-5247,liutongke585@163.com;*通信作者:刘冰,副教授,博士,主要从事植物病理学研究,orcid.org/0000-0002-0620-1642,lbzjm0418@126.com。
©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND协议

pathogenicity of diseased mulberry in Le'an County, Jiangxi Province. Morphological and molecular biology methods were used to identify the isolated pathogens and optimize their cultivation conditions. The inhibitory effect of 7 biopesticides on the pathogen was measured using the drug containing plate method. [**Result**] Eight strains of fungi were isolated from the sclerotia collected from the planting site where mulberry fruit sclerotiniosis occurred, and cultured on PDA medium with consistent characteristics. The ITS and RPB2 sequences of representative strain JH21 were amplified and sequenced, and the strain JH21 was identified as Scleromitrula shiraiana by homology comparison. The mycelium of S. shiraiana grew better when it was incubated on mung bean dextrose agar medium (MBDA) at pH of 6 for 12 h with alternating light and dark and temperature conditions of 20-25 ℃. The laboratory screening of fungicides results showed that 0.3% Tetramycin aqueous solution and 0.3% Eugenol soluble solution had good inhibitory effects on the growth of S. shiraiana with EC50 of 0.078 μg/mL and 0.667 μg/mL respectively. [**Conclusion**] In this study, it was determined that mulberry plantations in Le'an County of Jiangxi Province were mainly threatened by reduced sorosis scleroteniosis caused by S. shiraiana. As biopesticides, Tetramycin and Eugenol are eco-friendly and safe, and they have potential applications in the prevention and control of mulberry fruit sclerotiniosis.

Keywords: mulberry fruit sclerotiniosis; pathogen identification; *Scleromitrula shiraiana*; cultivation conditions; biopesticides

【研究意义】桑树(*Morus alba* L.)是桑科(Moraceae)桑属(*Morus*)的一种落叶乔木或灌木状植物。桑椹是桑树成熟果实,是一种富含多种营养物质、具有较高经济与药用价值的浆果,受到消费者的普遍欢迎和喜爱[1-3]。果桑的种植面积也在近几年不断扩大,目前在陕西、江苏、浙江、广东、广西、江西,以及四川和重庆等地均有一定面积的分布[4]。然而,在果桑生产中,菌核病的发生日趋严重,且病势猛烈连年暴发,遍及了我国诸多省(市、自治区)的果桑种植区,成为该产业发展的制约因素之一[5-6]。桑椹菌核病又称白果病,发病果实呈白色或灰白色,该病分为肥大性菌核病、缩小性菌核病和小粒性菌核病3种类型,现公认对应的常见病原分别为桑实杯盘菌(*Ciboria shiraiana*)、核地杖菌(*Scleromitrula shiraiana*)和肉阜状杯盘菌(*Ciboria carunculoides*)[7-9]。在南方地区,春季气候变化幅度大,气温逐渐升高,阴雨天气多且湿度大,为桑椹菌核病的暴发提供了有利的环境条件,该病为害尤其严重。目前控制桑椹菌核病的常用手段是喷施化学药剂如甲基硫菌灵、多菌灵和菌核净等,而生物农药的应用几乎没有,相关研究也非常少见。因此,分离鉴定桑椹菌核病病原并探究其培养条件,以及筛选低毒高效的生物农药对于桑椹菌核病的绿色防治具有重要意义。【前人研究进展】近年来,关于桑椹菌核病的发生和防治受到学者的广泛关注,对桑椹菌核病的防治方法研究有明显进展。盛桂林等[10]通过植物安全性试验和农药残留试验确认啶酰菌胺可作为防治桑椹菌核病的优选药剂。郑章云等[11]开展田间防治试验,发现2×10^8 CFU/g泰诺木霉菌WP对桑椹菌核病的防效与在生产中应用的化学药剂腐霉利防效相当。陈佳婧等[12]发现采用木霉菌和甲基硫菌灵交替防治桑椹菌核病较单独使用木霉菌的防效明显提高。朱志贤等[13]报道在果桑花穗形成期开始可交替使用咪鲜胺锰盐和唑醚·氟酰胺,该方法能安全有效控制病害并满足食品安全需求。

【本研究切入点】2021—2023年,课题组在江西省乐安县调查发现桑椹缩小性菌核病在当地多个果桑种植基地发生,对桑椹产量与品质造成严重影响,而且在田间化学农药甲基硫菌灵和多菌灵的频繁施用已使桑椹菌核病菌对其产生明显的抗性。【拟解决的关键问题】研究从形态学和分子生物学对江西省乐安县发生的桑椹菌核病病原菌进行鉴定,探究病原菌的培养条件并在室内筛选生物农药,为有效、绿色防控桑椹菌核病提供理论基础与参考依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试病样

2021—2023年,于江西省乐安县牛田镇流坑村和招携镇杭村的果桑种植基地采集发生桑椹菌核病

的病果以及土壤表面的菌核和萌发的子囊盘，-20 ℃保存备用。

1.1.2 培养基

配制马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）、绿豆葡萄糖琼脂培养基（MBDA）、桑叶葡萄糖琼脂培养基（MLBA）、燕麦琼脂培养基（OA）、查氏培养基（Czapek）、胡萝卜葡萄糖琼脂培养基（CDA）和马铃薯葡萄糖培养基（PDB）[14-15]。

1.1.3 试剂与药剂

真菌基因组DNA提取试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）、6%春雷霉素水剂（山西运城绿康实业有限公司）、0.3%四霉素水剂（辽宁微科生物工程有限公司）、10%多抗霉素可湿性粉剂（日本科研制药株式会社）、5%大蒜素微乳剂（成都新朝阳作物科学股份有限公司）、0.3%丁子香酚可溶液剂（山东亿嘉农化有限公司）、1.5%苦参·蛇床素水剂（山西德威本草生物科技有限公司）、5%香芹酚可溶液剂（山西德威本草生物科技有限公司）等。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离纯化

在无菌条件下，采集到的土壤表面菌核用体积分数75%乙醇溶液表面消毒1 min，无菌水荡洗4次，在灭菌滤纸上沥干后，用无菌刀片切开，将白色部分接种在PDA平板上，于25 ℃恒温培养。待菌核组织长出菌丝后，挑取菌丝顶端纯化[16]。

1.2.2 病原菌形态观察

对采集的病果症状和子囊盘进行形态观察，并且用细针刮开子囊盘上端肉质部分，制作临时玻片并于光学显微镜下观察子囊及子囊孢子，对分离纯化后的菌落挑取表面乳白色脓液制作临时玻片，观察其分生孢子。随机选取至少30个子囊、子囊孢子与分生孢子进行测量并记录其大小。

1.2.3 病原菌致病性测定

依照柯赫氏法则验证致病性。于3月上旬桑花未开时，取5 mm直径病原菌菌饼接种到桑花上，用湿润脱脂棉包裹，再用保鲜膜包裹，最后套袋。3 d后取下脱脂棉与保鲜膜，继续套袋7 d。待观察到发病后，取病果使用1.2.1方法分离病原菌，并观察是否与第一次分离出的病原形态一致。对照接种琼脂饼。

1.2.4 病原菌分子生物学鉴定

病原菌基因组DNA提取：病菌菌饼转入PDB培养基中，在28 ℃、150 r/min条件下摇培7 d，过滤收集菌丝；或直接刮取固体培养基上的病菌菌丝，将其在液氮中研磨成粉末状，用真菌基因组DNA提取试剂盒提取病菌基因组DNA。

以提取的病原菌基因组DNA为模板，利用引物ITS1/ITS4（ITS1：5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′/ITS4：5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′）[17]和引物RPB2-5F/RPB2-7CR（RPB2-5F：5′-GATGATAGAGATCATTTCGG-3′/RPB2-7CR：5′-CCCATAGCTTGTTTACCCAT-3′）[18]扩增ITS和RPB2序列。均使用20 μL PCR扩增反应体系：DNA模板1.0 μL，引物各0.8 μL，2×*Taq* MasterMix 10 μL，ddH_2O 7.4 μL。反应程序：95 ℃预变性3 min；95 ℃变性15 s，55 ℃退火15 s，72 ℃延伸30 s，35个循环；72 ℃延伸5 min。

PCR扩增产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测后送北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。所获序列提交至GenBank，并在NCBI数据库中对其进行BLAST比对，进一步利用MEGA 7.0软件进行序列分析，使用最大似然法（maximum likelihood）构建系统发育树，根据病原菌的序列在系统发育树中的分布进行同源性鉴定[19]。

1.2.5 病原菌培养条件探究

将病菌分别接种在PDA、MBDA、MLBA、OA、Czapek和CDA培养基上，在第10、20、30、40天分别用十字交叉法测量菌落直径，40 d拍照记录菌落形态。根据此结果以MBDA为基础培养基进行病原菌其他培养条件试验。用直径为8 mm的打孔器在菌落边缘打取菌饼并接种在平板上进行相应条件的培养。每个处理重复3次。在菌落生长的第7、14、21天用十字交叉法测量菌落直径，并记录菌落形态。培养条件的设置如下：

（1）碳源：分别将蔗糖、乳糖、可溶性淀粉、D-甘露糖醇添加至培养基中，以基础培养基为对照。

（2）氮源：在基础培养基中分别添加蛋白胨、胰蛋白胨、氯化铵、酵母膏、硝酸钾5种氮源，以基础培养基为对照。

(3)温度:分别在10,15,20,25,30 ℃温度下培养病原菌。

(4)pH:用1 mol/L HCl和1 mol/L NaOH调节培养基pH分别至5、6、7、8、9后培养病原菌。

(5)光暗条件:分别在24 h光照、12 h光照与12 h黑暗交替、24 h黑暗3种光照条件培养病原菌。

1.2.6　抑制病原菌生长药剂室内筛选

采用含药平板法测定药剂对菌丝生长的抑制作用。配制不同浓度含药平板,并将直径为8 mm菌饼接种到上面,以不含药平板为对照。每个处理重复3次,25 ℃恒温培养7 d后,用十字交叉法测量菌落直径,计算抑制率。取各处理药剂有效成分浓度的对数值为自变量x,对应处理的抑制率为因变量y,运用SPSS 26.0软件处理及分析数据。

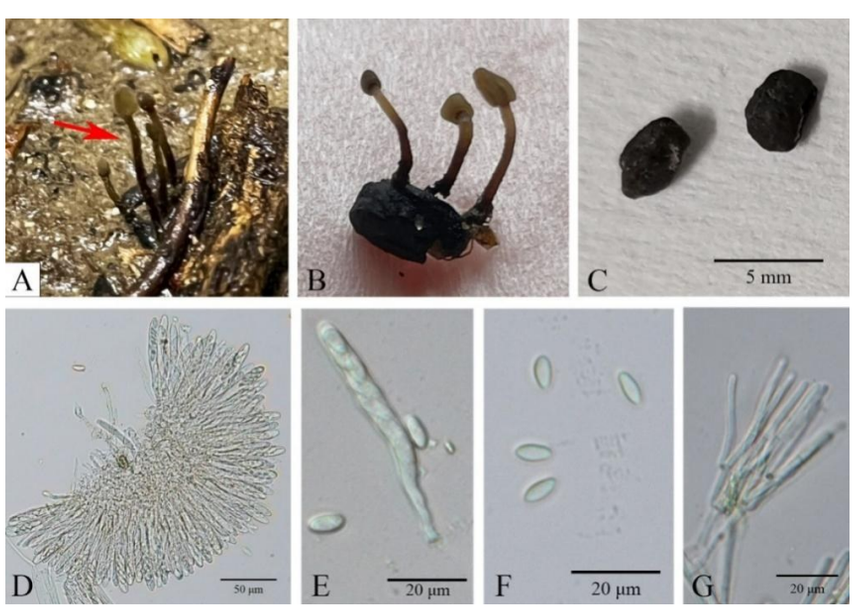
抑制率=[(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/(对照组菌落直径-菌饼直径)]×100%

2　结果与分析

2.1　病原菌分离纯化与形态观察

田间采集的菌核呈黑色,椭圆形或不规则形,萌发产生单个或数个子实体。子实体柄部细长,呈深褐色,头部钟状或纺锤状,呈褐色或深褐色,表面有2~6道纵脊。子囊之间具有侧丝,子囊伞状着生于子实体头部,呈棍棒状或圆筒状,大小为(4.47~9.74) μm×(47.45~103.17) μm,内含8个子囊孢子。子囊孢子单胞、无色,呈椭圆形或纺锤形,大小为(2.76~4.30) μm×(5.52~8.91) μm(图1)。

试验共分离菌核57个,纯化后得到桑椹菌核病病原菌8株(分别命名为JH21、JH27、JH31、BZ-1、BZ-2、BZ-3、BZ-4、BZ-6)。这8株真菌在PDA培养基上培养特征一致,普遍生长缓慢,菌落致密,边缘不规则形,呈墨绿色至黄褐色。培养30 d后,菌落上产生乳白色脓液,为病菌分生孢子团。镜检发现分生孢子单胞、无色,呈圆形或椭圆形,大小为(1.78~3.00) μm×(2.98~4.60) μm(图2)。选取菌株JH21进行后续试验。



A、B:菌核萌发产生子实体;C:菌核;D、E:子囊;F:子囊孢子;G:侧丝。

A、B:Sclerotia germination produces fruiting bodies;C:Sclerotia;D、E:Ascomyces;F:Ascospores;G:Lateral hyphae.

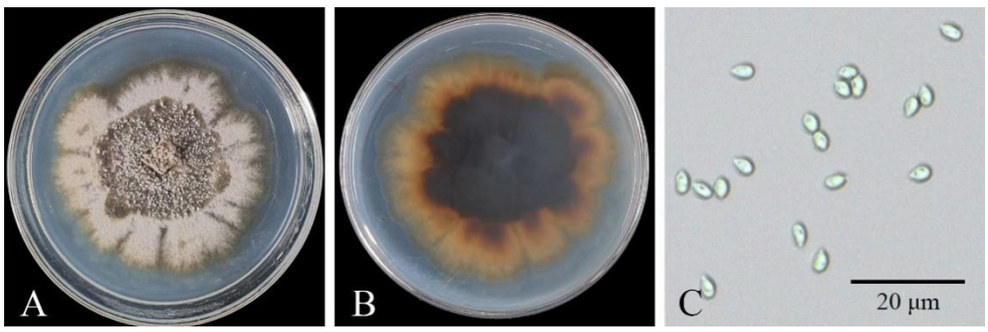
图1　桑椹缩小性菌核病病原菌核及子实体

Fig.1　Pathogenic sclerotium and fruiting bodies of reduced sorosis scleroteniosis

2.2　病害症状及病原菌致病性

田间观察发现,乐安果桑园发生的桑椹菌核病的病椹整体较健康成熟桑椹小,呈灰白色或黄白色,病小果表面有黄褐色细斑,内部有黑色且坚硬的菌核(图3A、图3B)。

致病性测定结果表明,对照果实未发病菌株JH21接种12 d后果实开始发病且发病率100%。发病桑椹小核果缩小,呈灰白色或黄色,表面有褐色细斑(图3C)。取发病桑椹再进行组织分离,获得与初次分离同样的真菌纯培养。可见,菌株JH21可以导致桑椹发生缩小性菌核病。

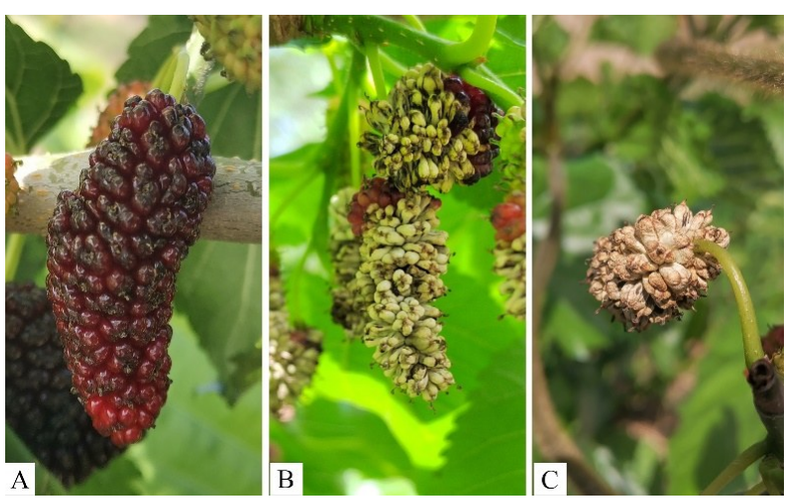


A:菌落正面;B:菌落反面;C:分生孢子。

A:The front side of the colony;B:The back side of the colony;C:Conidia.

图2 桑椹缩小性菌核病病原在PDA培养基上的菌落形态及分生孢子

Fig.2 Colony morphology and conidia of reduced sorosis sclerotiniosis on PDA medium



A:健康成熟桑椹;B:自然发病桑椹;C:接种发病桑椹。

A:Healthy and mature mulberry;B:Diseased mulberry caused by naturally infecting of pathogen;

C:Diseased mulberry caused by artificially inoculating the pathogen.

图3 桑椹菌核病发病症状

Fig.3 Symptoms of mulberry fruit sclerotiniosis

2.3 病原菌分子生物学鉴定

以菌株JH21的基因组DNA为模板,对其ITS和RPB2序列进行扩增并测序。获得的序列使用BLAST在NCBI数据库进行同源性比对,结果显示菌株JH21的ITS序列与核地杖菌*S.shiraiana* GDSNKY-BG01(GenBank登录号:MK386751)的相似性为99.26%,RPB2序列与核地杖菌*S. shiraiana* Cq3-2(GenBank登录号:MW013891)的相似性为99.56%。从基于ITS序列的系统发育树可以看出,菌株JH21与核地杖菌*S. shiraiana* SXSG-5、*S. shiraiana* Cbch3-1在同一分支(图4);从基于RPB2序列的系统发育树可以看出,菌株JH21与核地杖菌*S. shiraiana* Zhf2、*S. shiraiana* Cq3-2汇于同一分支(图5)。由此推断菌株JH21与核地杖菌序列同源。结合病原菌的菌落形态以及致病性测定结果,确定分离得到的病原菌为桑椹缩小性菌核病病原菌核地杖菌(*S. shiraiana*)。

2.4 病原菌培养条件探究

2.4.1 培养基对核地杖菌生长的影响

核地杖菌在6种培养基上菌丝均致密,但不同培养基上菌落大小不同,其中在MBDA上菌落最大。核地杖菌在MBDA上生长最快,培养10 d菌落平均直径可达54.13 mm。4次测量中,在MBDA上的菌落直径显著大于其他培养基($P<0.05$)(图6A)。总之,在这6种培养基中,MBDA为核地杖菌生长最适培养基,并且由此选择MBDA作为后续试验基础培养基。

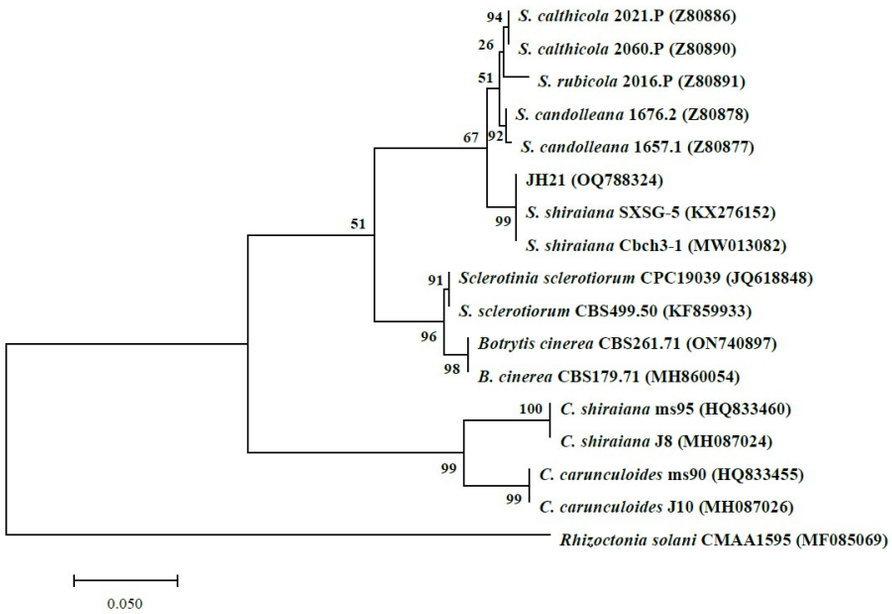


图4　基于ITS序列的系统发育进化树

Fig.4　Phylogenetic evolution tree based on ITS sequences

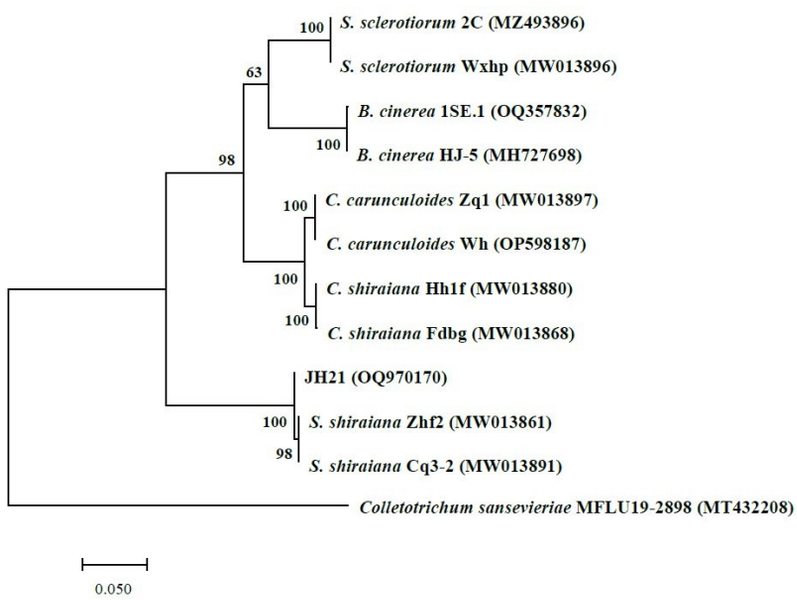


图5　基于RPB2序列的系统发育进化树

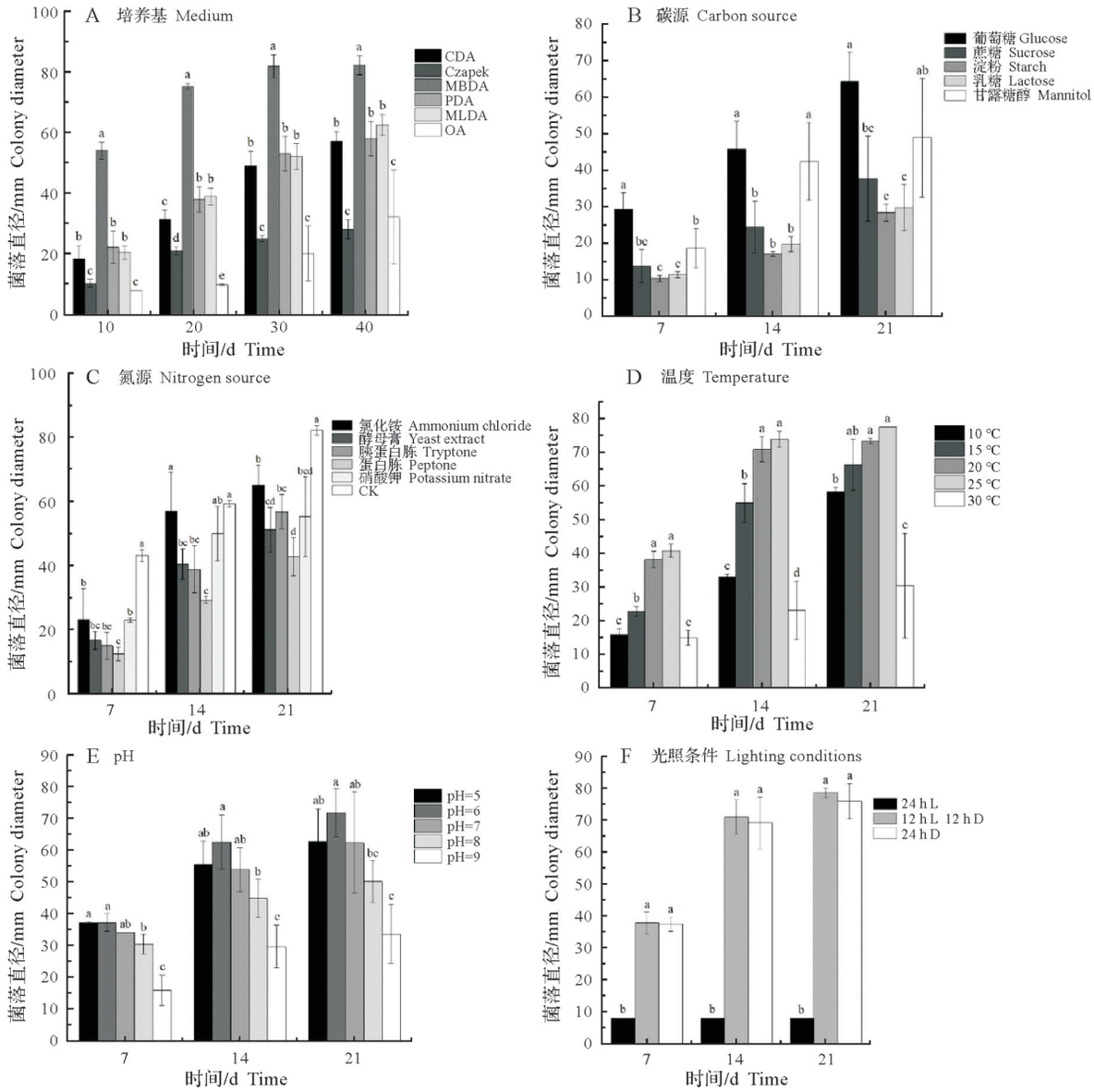
Fig.5　Phylogenetic evolution tree based on RPB2 sequence

2.4.2　碳源对核地杖菌生长的影响

菌落形态上葡萄糖、蔗糖和D-甘露糖醇培养基上菌落较致密。培养7 d葡萄糖培养基与D-甘露糖醇培养基菌落直径差异显著(P<0.05),培养14 d和21 d均无显著差异(P>0.05),但培养21 d葡萄糖培养基上菌落平均直径为64.33 mm,大于其他培养基上的菌落平均直径(图6B)。所以,总的来看核地杖菌菌丝对葡萄糖的利用最好。

2.4.3　氮源对核地杖菌的影响

菌落形态上CK、酵母膏、胰蛋白胨和蛋白胨培养基上菌落致密。6种供试培养基中,培养7 d和21 d不添加额外氮源的CK培养基菌落直径显著大于其他培养基菌落直径(P<0.05),培养7 d菌落平均直径达43.17 mm(图6C)。结合菌落形态和菌落直径的结果,可以看出核地杖菌对酵母膏、胰蛋白胨和氯化铵的利用较好,但是在不需要添加额外氮源的MBDA培养基上生长得更好。



图柱上不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

Different lowercase letters on the bar represented significant difference(P<0.05).

图6 不同培养条件对核地杖菌菌丝生长的影响

Fig.6 Effects of different cultural conditions on the mycelial growth of *Scleromitrula shiraiana*

2.4.4 温度对核地杖菌生长的影响

核地杖菌在15~25 ℃条件下生长快,25 ℃条件下菌丝生长速度最快,培养14 d菌落平均直径为73.83 mm。培养7 d和14 d,20 ℃与25 ℃条件下菌落平均直径显著大于其他温度条件(P<0.05)(图6D)。综上,核地杖菌菌丝生长的最适温度范围为20~25 ℃。

2.4.5 pH对核地杖菌生长的影响

核地杖菌在pH为5~9范围内均能生长。pH为5~7时,核地杖菌菌落直径显著大于其他pH(P<0.05),其中pH为6时核地杖菌培养21 d菌落平均直径可达71.67 mm(图6E)。因此,核地杖菌在中性或弱酸性条件下生长较好,最适生长pH为6。

2.4.6 光照条件对核地杖菌生长的影响

由图6可知,24 h光照条件下核地杖菌不能生长,在其他给予黑暗条件下核地杖菌能够正常生长且菌落形态和大小相似,12 h黑暗与12 h光照交替条件和24 h黑暗条件下培养14 d菌落平均直径为71.00 mm、69.17 mm(图6F),说明24 h光照会抑制核地杖菌的菌丝生长,12 h光暗交替的条件适宜菌丝生长。

2.5　抑制病原菌生长药剂室内筛选

由表 1 可知,7 种药剂的抑菌效果由好到差依次为四霉素、丁子香酚、多抗霉素、大蒜素、苦参·蛇床素、香芹酚和春雷霉素,即 0.3% 四霉素水剂对核地杖菌的抑制效果最好,0.3% 丁子香酚可溶液剂抑菌效果仅次于四霉素,6% 春雷霉素水剂对核地杖菌的抑制效果最差。所以 0.3% 四霉素水剂和 0.3% 丁子香酚可溶液剂对核地杖菌有较好抑制作用,具有防治桑椹菌核病的潜力。

表 1　7 种杀菌剂对核地杖菌的室内抑制作用

Tab.1　Laboratory inhibiting effects of 7 fungicides on *Sclerotimitrula shiraiana*

供试药剂 Fungicide	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC_{50}/(μg·mL^{-1})
6% 春雷霉素 AS 6% Chunleimycin AS	y=−1.93+1.6x	0.944	16.116
0.3% 四霉素 AS 0.3% Tetramycin AS	y=2.8+2.53x	0.980	0.078
10% 多抗霉素 WP 10% Polymyxin WP	y=−1.05+1.33x	0.984	6.085
5% 大蒜素 ME 5% Allicin ME	y=−1.63+1.79x	0.973	7.984
0.3% 丁子香酚 SLX 0.3% Eugenol SLX	y=0.32+1.84x	0.998	0.667
1.5% 苦参·蛇床素 AS 1.5% Matrine·Osthole AS	y=−2.17+2.39x	0.992	8.070
5% 香芹酚 SLX 5% Carvacrol SLX	y=−2.46+2.1x	0.954	14.662

3　讨论与结论

桑椹菌核病是影响果桑产业发展的重要问题之一,该病有来势迅猛、发病快、难防治的特点,往往对桑椹造成毁灭性地危害。桑椹菌核病的病原菌种类复杂,除现公认的 3 种外,还有报道指出核盘菌(*S. sclerotiorum*)和桑茎点霉(*Phoma moricola*)能引起桑椹菌核病,其发病症状与桑椹肥大性菌核病相似[20-21]。因此,了解当地引起桑椹菌核病的病原对该病的防治具有重要作用。本研究从江西省乐安县多个发生菌核病的果桑种植基地采集菌核并分离获得病原菌,经形态观察与 ITS、RPB2 序列分析,鉴定其为引起桑椹缩小性菌核病的核地杖菌(*S. shiraiana*),这与田间观察到的病害症状相符。Hong 等[22]报道病原菌子实体头部为褐色,卵球形或纺锤形,表面有多个纵脊,柄部褐色且细长,在 PDA 上的菌落表面为橄榄灰色,背面为深橄榄棕色。Lü 等[23]报道培养约 20~25 d 的核地杖菌菌落中央有乳白色脓液,脓液内含许多小孢子。这些报道中对核地杖菌的描述与本研究观察到的子实体和分离到的病原菌菌落形态一致。苏正川[15]研究发现核地杖菌在绿豆培养基和桑叶培养基上生长速度快,而本研究中分离到的核地杖菌在绿豆培养基上比桑叶培养基上生长得更好。由于引起桑椹菌核病的其他 2 种病原菌在人工培养基上极难生长,本研究也尝试其他方法分离病原菌,但未分离出肉阜状杯盘菌和桑实杯盘菌。因此还需要观察江西省乐安县等地的种植园发病桑椹的症状和表层土壤的子实体,以及进一步从分子生物学角度进行鉴定桑椹菌核病病原菌。

本研究对核地杖菌的培养条件探究发现,该菌菌丝生长的最适温度在 20~25 ℃,最适生长 pH 为 6,24 h 全光照会抑制病原菌的生长。桑椹生长期较短,成熟期比较集中。根据乐安县田间调查,3—4 月份是果桑的花期,此时多为阴雨天,平均温度为 10~22 ℃。尹爱群等[24]对桑椹鲜品直接提取后测定 pH 值在 5.5~6.1。可见,田间适宜的温度、湿度和 pH 为病原菌侵染桑花,以及菌丝生长提供了有利的环境条件。同时,营养元素是病原菌生长繁殖不可缺少的条件,其中碳是生物细胞结构成分的主要元素,氮是蛋白质的基本成分,也是核酸和酶类的重要物质元素[25-26]。本研究的结果表明核地杖菌对葡萄糖的利用最

好，而MBDA培养基能给该菌提供良好的氮源。

目前，果桑生产中使用化学农药是最常用也是防治效果最好的方法。据报道，农化学药25%凯润与10%世高对桑椹菌核病有良好的防治效果[27]。相较于化学农药来说，生物农药的防治效果探究较少，且普遍不如化学农药。有报道木霉菌发酵液对桑椹菌核病的防治表现比较理想，表明木霉菌具有在生产中应用的潜力[28]。同时，天然化合物对植物病害的应用也得到众多研究者的关注，如使用香芹酚防治十字花科蔬菜根肿病[29]。因此，为避免化学农药的滥用和病原菌出现抗药性等不利因素，有必要研究其他农药尤其是生物农药对桑椹菌核病的抑制作用。本研究选取7种生物农药进行抑制病原菌生长药剂室内筛选，发现0.3%四霉素水剂和0.3%丁子香酚可溶液剂对核地杖菌有较好地抑制作用，具有防治桑椹菌核病的潜力，可在田间做进一步试验，筛选出适合防治桑椹菌核病低毒、低残留、高效的农药。

参考文献 References：

[1] MAQSOOD M，ANAM SAEED R，SAHAR A，et al.Mulberry plant as a source of functional food with therapeutic and nutritional applications：a review[J].Journal of food biochemistry，2022，46(11)：e14263.

[2] PALACHAI N，WATTANATHORN J，MUCHIMAPURA S，et al.Phytosome loading the combined extract of mulberry fruit and ginger protects against cerebral ischemia in metabolic syndrome rats[J].Oxidative medicine and cellular longevity，2020，2020：5305437.

[3] TAM D N H，NAM N H，ELHADY M T，et al.Effects of mulberry on the central nervous system：a literature review[J].Current neuropharmacology，2021，19(2)：193-219.

[4] 孙娇娇，陈澄，华克达.基于文献计量学的桑椹研究现状分析[J].林业科技情报，2022，54(3)：66-69.
SUN J J，CHEN C，HUA K D.Analysis of mulberry research status based on bibliometrics[J].Forestry science and technology information，2022，54(3)：66-69.

[5] 包立军，苏超，张敏娟，等.桑椹菌核病病原研究进展[J].蚕业科学，2019，45(3)：441-446.
BAO L J，SU C，ZHANG M J，et al.Research progress on pathogens of mulberry sclerotiniose[J].Science of sericulture，2019，45(3)：441-446.

[6] 吕志远，田立超，何宁佳.桑椹菌核病研究进展[J].植物病理学报，2023，53(1)：1-12.
LYU Z Y，TIAN L C，HE N J.Research progress of mulberry sclerotial disease[J].Acta phytopathologica Sinica，2023，53(1)：1-12.

[7] KOHN L M，NAGASAWA E.The genus *Scleromitrula*(Sclerotiniaceae)，Episclerotium gen.nov.(Leotiaceae)and allied stipitate-capitate species with reduced ectal excipula[J].Transactions of the mycological society of Japan，1984，25：127-148.

[8] WHETZEL H H，WOLF F A.The cup fungus，*Ciboria Carunculoides*，pathogenic on mulberry fruits[J].Mycologia，1945，37(4)：476-491.

[9] GRAY E，GRAY R E.Observations on popcorn disease of mulberry in south central Kentucky[J].Castanea，1987，52(1)：47-51.

[10] 盛桂林，张怡，沈旦军，等.桑葚菌核病防控关键技术和残留安全性试验[J].农药，2022，61(3)：219-224.
SHENG G L，ZHANG Y，SHEN D J，et al.Key techniques for the control of mulberry fruit sclerotiniosis and residual safety of boscalid on mulberry[J].Agrochemicals，2022，61(3)：219-224.

[11] 郑章云，杨义，张明海，等.不同生物制剂对桑葚菌核病防治试验[J].云南农业大学学报(自然科学)，2018，33(2)：376-379.
ZHENG Z Y，YANG Y，ZHANG M H，et al.The control test of different biological agents against mulberry fruit sclerotiniosis[J].Journal of Yunnan agricultural university(natural science)，2018，33(2)：376-379.

[12] 陈佳婧，张明海，陈泉，等.木霉菌与化学药剂交替使用对桑椹菌核病的防治效果试验[J].蚕学通讯，2022，42(1)：12-17.
CHEN J J，ZHANG M H，CHEN Q，et al.Experiment on improving the control effect of Trichoderma on mulberry sclerotinia[J].Newsletter of sericultural science，2022，42(1)：12-17.

[13] 朱志贤，董朝霞，莫荣利，等.桑椹肥大型菌核病化学防治技术研究[J].果树学报，2022，39(7)：1262-1270.
ZHU Z X，DONG Z X，MO R L，et al.Study on the control of mulberry hypertrophic sorosis sclerotiniosis disease[J].Journal of fruit science，2022，39(7)：1262-1270.

[14] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998:122-125.
FANG Z D.Research methods for plant diseases[M].Beijing:China Agriculture Press,1998:122-125.
[15] 苏正川.桑葚缩小型菌核病病原学及其分子检测体系[D].重庆:西南大学,2015.
SU Z C.Etiology of mulberry shrunken popcorn disease and development of a molecular detection system for the pathogen [D].Chongqing:Southwest University,2015.
[16] 王爱印.桑椹菌核病病原菌的分离、鉴定及其拮抗性桑树内生菌的研究[D].重庆:西南大学,2016.
WANG A Y.Isolation and identification of pathogens of mulberry fruit sclerote disease and research on their antagonastic endophyte[D].Chongqing:Southwest University,2016.
[17] 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.
[18] MATHENY P B.Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences(*Inocybe*; Agaricales)[J].Molecular phylogenetics and evolution,2005,35(1):1-20.
[19] KUMAR S,STECHER G,TAMURA K.MEGA7:molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J].Molecular biology and evolution,2016,33(7):1870-1874.
[20] LYU R,ZHAO A,LI J,et al.Biological study of hypertrophy sorosis sclerotenioisis and its molecular characterization based on LSU rRNA[J].African journal of microbiology research,2013,7(26):3405-3411.
[21] 贺磊,胡军华,徐立,等.一株桑椹致病菌的鉴定及其生物学特性研究[J].西南农业学报,2010,23(3):760-763.
HE L,HU J H,XU L,et al.Identification and biological characteristics of pathogen of mulberry disease[J].Southwest China journal of agricultural sciences,2010,23(3):760-763.
[22] HONG S K,KIM W G,SUNG G B,et al.Identification and distribution of two fungal species causing sclerotial disease on mulberry fruits in Korea[J].Mycobiology,2007,35(2):87-90.
[23] LYU Z,KANG X,XIANG Z,et al.Laccase gene *Sh-lac* is involved in the growth and melanin biosynthesis of *Scleromitrula shiraiana*[J].Phytopathology,2017,107(3):353-361.
[24] 尹爱群,王磊,张艳华.不同干燥方法对桑椹中含糖量及pH值的影响[J].中国药师,2005,8(6):519-520.
YIN A Q,WANG L,ZHANG Y H.Effects of different drying methods on the sugar content and pH of mulberry[J].China pharmacist,2005,8(6):519-520.
[25] ROSA R M,MACHADO M,VAZ M G M V,et al.Urea as a source of nitrogen and carbon leads to increased photosynthesis rates in *Chlamydomonas reinhardtii* under mixotrophy[J].Journal of biotechnology,2023,367(2023):20-30.
[26] 马国良,马辉,马学斌,等.不同碳氮源对青海春油菜菌核病菌菌丝生长及菌核形成的影响[J].安徽农业科学,2012,40(25):12501-12503.
MA G L,MA H,MA X B,et al.Effects of different carbon and nitrogen sources on mycelial growth and sclerotinia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* on Qinghai spring rape[J].Journal of Anhui agricultural sciences,2012,40(25):12501-12503.
[27] 龙镜池.桑椹菌核病防治药物筛选试验[J].广东蚕业,2014,48(3):32-34.
LONG J C.Screening test of fungicides for the prevention and control of mulberry sclerotinia disease[J].Guangdong sericulture,2014,48(3):32-34.
[28] 杨明方,盛晟,吴福安.几种不同药剂对桑椹菌核病防治效果之初探[J].中国蚕业,2021,42(1):13-16.
YANG M F,SHENG S,WU F A.Preliminary study on the control effect of several different chemicals on mulberry fruit sclerotiniosis[J].China sericulture,2021,42(1):13-16.
[29] 詹俊杰,周星海,张晋豪,等.香芹酚/β-环糊精包合物制备及熏蒸防治白菜根肿病的研究[J].江西农业大学学报,2023,45(3):663-672.
ZHAN J J,ZHOU X H,ZHANG J H,et al.Study on preparation of carvacrol/β-cyclodextrin inclusion complex and fumigation to control cabbage clubroot[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2023,45(3):663-672.