

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.05.011

张克瑶, 王飞, 屈钰攀, 等. 桑枝枯菌核病病原菌的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(5): 120-129.

桑枝枯菌核病病原菌的分离鉴定及生物学特性研究

张克瑶^{1,2}, 王飞^{1,2}, 屈钰攀^{1,2}, 刘晓姣^{1,2},
覃继财³, 欧婷^{1,2}, 陈艳玲^{1,2}, 谢洁^{1,2}

1. 西南大学 蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715; 2. 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 重庆 400715;
3. 广西河池宜州区龙头乡农业技术推广站, 广西 河池 546317

摘要: 桑枝枯菌核病是危害桑树叶片和枝条的严重真菌病害, 其病原菌亦可导致桑椹染病, 分离获得病原菌, 并研究其生物学特性将有助于精准防控该类病害. 利用平板分离法对染病桑枝进行桑枝枯菌核病病原菌的分离纯化, 并通过回接实验对其致病性进行检测; 利用形态学观察和分子生物学手段对菌株进行鉴定; 通过检测菌株生长情况, 明确其生物学特性及其侵染叶片时的特征. 研究表明, 分离获得的菌株 GXS1 接种桑叶 36 h 后, 桑叶出现明显病斑; 该菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上菌落呈白色, 培养后期能产黑色菌核, 基于 18S rDNA 和 ITS rDNA 序列的系统发育分析, 菌株 GXS1 与核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)亲缘关系最近; 该菌最适生长温度为 20 °C, 最适 pH 值为 5.0, 最佳碳源为葡萄糖、蔗糖或果糖, 最佳氮源为硝酸钠, 最适培养基为 PDA; 该菌接种桑叶 12 h 后开始形成侵染垫, 接种 24 h 后侵染垫数量明显增多.

关键词: 桑枝枯菌核病; 核盘菌; 桑树; 生物学特性; 侵染过程

中图分类号: S435

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2024)05-0120-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation and Identification of a Mulberry Branch-Blight Sclerotiniosis Pathogen and Its Characterization

ZHANG Keyao^{1,2}, WANG Fei^{1,2}, QU Yupan^{1,2}, LIU Xiaojiao^{1,2},
QIN Jicai³, OU Ting^{1,2}, CHEN Yanling^{1,2}, XIE Jie^{1,2}

收稿日期: 2023-09-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32371713); 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2022NSCQ-MSX0536); 中央高校基本科研业务费项目(SWU-KQ22082).

作者简介: 张克瑶, 硕士研究生, 主要从事植物病原真菌致病机理研究.

通信作者: 谢洁, 博士, 教授.

1. College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. State Key Laboratory of Resource Insects, Chongqing 400715, China;
3. Guangxi Hechi Yizhou District Longtou Township Agricultural Technology Extension Station, Hechi Guangxi 546317, China

Abstract: Mulberry branch-blight sclerotiniosis is a fungal disease that seriously harms the leaves, branches and fruits of mulberry trees. Isolating the pathogenic microorganism and studying its biological characteristics will greatly help the accurate prevention and control of such diseases. In this study, the pathogenic microorganisms of mulberry branch-blight sclerotiniosis were isolated and purified by plate separation method, and the pathogenicity was detected by back infection experiment. Strain identification was carried out based on morphological observation and molecular characteristics. The biological characteristics of the strain and the infected leaves were clarified by detecting the growth of the strains. The results showed that obvious disease spots on mulberry leaves were detected after 36-hour inoculation of the isolated strain GXS1. This strain has white colonies on potato glucose medium (PDA) and can produce black sclerotia in the later stage of culture. Based on 18S rDNA and ITS rDNA sequences, the phylogenetic analysis showed that this strain had the closest relationship with *Sclerotinia sclerotiorum*. The optimal growth temperature of *S. sclerotiorum* GXS1 is 20 °C, the optimal pH is 5.0, the best carbon source is glucose, sucrose or fructose, the best nitrogen source is sodium nitrate, and the most suitable medium is PDA. Infection cushion of *S. sclerotiorum* GXS1 was formed after 12-hour inoculation in mulberry leaves, and the number of infected cushions increased significantly after 24 hours inoculation. In summary, this study reported a pathogenic fungus, *S. sclerotiorum* GXS1, which can cause mulberry branch-blight sclerotiniosis. Its biological characteristics and infection characteristics were preliminarily clarified. The study could provide an important theoretical basis for the pathogenic biology study of mulberry branch-blight sclerotiniosis.

Key words: mulberry branch-blight sclerotiniosis; *Sclerotinia sclerotiorum*; mulberry; biological characteristics; infection process

蚕桑业在中国古代丝绸之路中发挥了关键作用,也是“一带一路”建设的重要组成部分。桑树(*Morus* L.)不仅是家蚕的独特食物来源^[1],亦是抗干旱、盐碱及水涝的生态修复植物^[2],其所含活性物质还是抗炎、降脂、降血糖类药物的主要成分^[3-4]。然而,桑树常受到桑青枯病、白粉病、桑枝枯菌核病等植物病害的威胁^[5-6]。其中,桑枝枯菌核病主要危害春季新萌发的桑叶及枝梢,造成桑芽、新梢基部形成褐色病斑,上部芽叶迅速失水导致桑枝折断,对桑叶产量影响巨大^[7]。桑枝枯菌核病最早发现于我国广东^[8],之后在全国各地陆续出现,江苏省唯宁县1999年开始出现病情,至2002年桑园大面积发病,发病率高达80%~100%,桑叶因此减产50%^[9]。2011年该病在广西宜州市广泛流行,发病面积占全市桑树种植面积的28%左右,导致桑叶减产60%~90%^[10]。此外,蓝月丘^[11]发现该病还会危害桑椹,造成桑椹膨大变白,内部产生大量黑色粉状物。因此,研究桑枝枯菌核病对于提升桑叶和桑椹的产量和质量具有重要意义。

明确导致病害发生的病原微生物是桑枝枯菌核病防控的第一步。目前针对桑枝枯菌核病病原菌尚无系统性的鉴定报道,仅有研究指出其病原菌来自核盘菌属(*Sclerotinia* sp.)^[10],但该属的真菌包括核盘菌(*S. sclerotiorum*)^[12]、三叶草核盘菌(*S. trifoliorum*)^[13]、小核盘菌(*S. minor*)^[14]以及雪腐核盘菌(*S. nivalis*)^[15]等。核盘菌属多数为植物病原真菌,不同种类之间差异较大^[16]。因此,进一步明确桑枝枯菌核病病原菌的种类尤为必要。此外,了解病原菌的生物学特性有助于明确病害的发病条件及规律,从而能在培育桑树时创造不利于病原菌生存的环境条件,进而降低病害发生率。目前,关于桑枝枯菌核病病原菌生物学特性的研究较少^[17],且病原菌种间存在丰富的遗传多样性,不同来源的分离株之间的生物

学特性和致病力也存在差异^[18-19].

本研究从桑树发病组织内分离纯化获得病原菌,并验证其致病能力;通过形态学观察以及分子生物学手段明确其分类地位;最后对病原菌生长最适温度、pH 值、碳氮源和培养基等基本生物学特性及其侵染过程进行研究,以期更全面地了解该菌发病条件,为桑枝枯菌核病的防治奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、燕麦培养基(OA)、麦芽浸粉培养基(MEA)、水培养基(WA)、察氏培养基(CZA)、察氏酵母培养基(CYA)、桑汁培养基(SA)、基础培养基(MM)^[20].

1.1.2 发病桑树样品

发病桑树样品采集自广西河池市宜州区龙头乡龙田村池沟屯村头(24°26'N—108°8'E).

1.2 方法

1.2.1 菌株分离纯化

取发病桑树枝条用无菌水冲洗表面杂质,用滤纸吸干水分. 75%乙醇消毒 5 min 后,无菌水冲洗 2~3 次,吸干水分,切取患病组织置于 PDA 培养基,22 ℃培养,逐日观察,待组织长出菌丝后,通过菌丝尖端纯化法进行纯化培养^[21],重复操作 3 次,最后将纯化获得的菌株进行斜面培养,置于 4 ℃保存.

1.2.2 菌株致病性检测

选取大小相似的桑叶,用 75%乙醇消毒后,无菌水冲洗 2~3 次,晾干备用. 用 6 mm 打孔器获取菌饼,对叶片进行刺伤处理,将菌丝面朝下接种于桑叶上. 培养温度 22 ℃,湿度大于 90%,光照与黑暗交替 12 h,培养 36 h. 以无菌 PDA 培养基为对照,待叶片发病后,对病原菌进行重分离,重分离方法参照 1.2.1. 致病性检测后,确定对编号为 GXS1 的病原菌开展后续研究.

1.2.3 菌株形态特征观察

将接种至 PDA 培养基的病原菌于 22 ℃黑暗条件下分别培养 2 d 和 10 d 后,观察菌落形态并记录. 利用光学显微镜观察菌株的显微形态,记录其颜色、大小及形状.

1.2.4 菌株分子生物学鉴定

刮取新鲜菌丝,加入装有 20 μL DNA 快速提取液 PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent(Applied Biosystems, USA) 的 1.5 mL 离心管中,涡旋 30 s,100 ℃加热 10~15 min,12 000 r/min 离心 3 min,吸取上清即得真菌总 DNA. 以菌株 GXS1 基因组 DNA 为模板,以引物 18S-F(5'-CCAGTAGT-CATATGCTTGTCT-3')和 18S-R(5'-ACCTTGTTACGACTTTTACTTCC-3')扩增 18S rDNA 序列;以引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增 ITS rDNA 部分基因序列. PCR 反应体系为:模板 DNA 1.0 μL;上下游引物各 1.0 μL;Taq 酶(南京诺唯赞生物科技有限公司)12.5 μL;ddH₂O 9.5 μL. PCR 扩增程序为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 15 s,55 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 15 s,进行 30 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min. PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序.

将所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,在 Genbank 数据库中下载同源序列,利用 MUSCLE 进行多序列比对,设置模型为 p-distance,bootstrap 设置为 1 000,其余参数默认,采用邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统发育进化树.

1.2.5 *S. sclerotiorum* GXS1 的生物学特性检测

1.2.5.1 温度对菌丝生长的影响

取直径为 6 mm 的 *S. sclerotiorum* GXS1 菌饼接种至 PDA 培养基,置于温度分别为 5 ℃,10 ℃,15 ℃,20 ℃,25 ℃,30 ℃,35 ℃,40 ℃的培养箱,黑暗条件下培养 2 d. 每个处理设置 3 个重复,用十字

交叉法记录菌落直径.

1.2.5.2 pH 值对菌丝生长的影响

以 PDA 培养基为初始培养基,利用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节其 pH 值分别至 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. 取直径为 6 mm 的菌饼接种至不同 pH 值的培养基中,于 22 ℃ 黑暗条件下培养 2 d. 每个处理设置 3 个重复,用十字交叉法记录菌落直径.

1.2.5.3 碳源对菌丝生长的影响

分别以 2%(m/v)葡萄糖、山梨醇、麦芽糖、蔗糖、淀粉、乳糖和果糖为碳源,加入基础培养基中,接种新鲜的菌饼,置于 22 ℃ 黑暗培养 2 d. 每个处理设置 3 个重复,用十字交叉法记录菌落直径.

1.2.5.4 氮源对菌丝生长的影响

分别以 0.2%(m/v)硝酸钠、硝酸钾、甘氨酸、硫酸铵、尿素、酵母浸粉和蛋白胨为氮源,加入基础培养基中,接种新鲜的菌饼,置于 22 ℃ 黑暗培养 2 d. 每个处理设置 3 个重复,用十字交叉法记录菌落直径.

1.2.5.5 培养基对菌丝生长的影响

将直径为 6 mm 的菌饼分别接种至马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、水培养基(WA)、察氏培养基(CZA)、察氏酵母培养基(CYA)、燕麦培养基(OA)、麦芽浸粉培养基(MEA)、桑汁培养基(SA),于 22 ℃ 黑暗培养 2 d. 每个处理设置 3 个重复,用十字交叉法记录菌落直径.

1.2.6 *S. sclerotiorum* GXS1 对桑叶侵染过程的观察

将 *S. sclerotiorum* GXS1 接种到 100 mL 马铃薯葡萄糖培养基(PDB)中,温度 22 ℃, 150 r/min 旋转摇床培养 5 d,收集菌丝. 用组织研磨仪将菌丝磨碎,用无菌水调 OD₆₀₀ 至 2.0,制得菌丝悬浮液. 取桑叶,用 75%酒精消毒 5 min,然后用无菌水清洗 2~3 次,将上述菌丝悬浮液均匀喷洒到叶片上,保湿培养. 以喷洒无菌水的叶片作为对照,分别在 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 取样,加入适量 FAA 固定液固定 24~48 h,之后用无菌水冲洗,将叶片剪成小叶段,在叶片各处均匀取样 10 个,加入 2.5 g/mL 水合氯醛透明 24~48 h,棉蓝染色 3 min 后,无菌水洗去染液,进行镜检观察.

1.2.7 数据统计

所有数据采用 Excel 2016 进行统计处理,用 SPSS Statistics 21.0 进行单因素方差 Tukey 分析,利用 GraphPad Prism 8.0.2 作图.

2 结果与分析

2.1 桑枝枯菌核病病原菌的分离及形态特征

从发病桑树的枝叶分离病原菌(图 1a),共获得 6 株潜在病原菌(结果未显示),经 ITS 初步鉴定,核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 为优势种类. 将其中一株潜在病原菌菌株 GXS1 接种于 PDA 培养基,对其进行进一步观察,发现培养 2 d 后,菌丝铺满直径为 9 cm 的平板,生长初期气生菌丝较稀疏(图 1b); 10 d 后菌丝变得浓厚,培养基边缘出现菌丝纠结,形成菌丝团,菌丝团逐渐变大,颜色加深,表面出现小水珠,最后形成黑色、表面光滑、大小不一的菌核(图 1c). 将菌株 GXS1 回接桑叶 36 h 后,桑叶出现明显病症,其病斑呈褐色腐烂状,而对照组叶片状况良好(图 1d). 取发病部位重分离病原菌,均能得到菌丝呈白色且能产生黑色菌核的分离菌株(图 1e),与桑枝枯菌核病菌 GXS1 菌落形态一致,而对照组未得到类似菌株. 这说明桑枝枯菌核病病原菌 GXS1 具有导致桑树发病的能力. 利用显微镜进一步观察菌株 GXS1,发现菌丝无色透明,有隔,未观察到分生孢子(图 1f).

2.2 桑枝枯菌核病原菌的分子生物学鉴定

以 GXS1 菌株的基因组 DNA 为模板,扩增获得菌株的 18S rDNA 及 ITS rDNA 保守基因序列,片段长度分别为 1 692 bp 和 511 bp,将序列提交至 Genbank 获得登录号 OR186274 和 OR186271. 基于 18S rDNA 序列的 BLAST 比对结果显示,该菌与 *S. sclerotiorum* 相似度为 100%,系统发育分析结果表明,菌株 GXS1 的 18S 序列与多株 *S. sclerotiorum* 聚为同一最小分枝(图 2a). 基于 ITS rDNA 序列的 BLAST 比对结果显示,该菌与 *S. sclerotiorum* 相似度为 100%,系统发育分析结果显示,菌株 GXS1 与多株 *S. sclerotiorum* 聚为同一最小分枝,二者亲缘关系最近(图 2b). 因此,综合菌株的形态学和分子生物学特征,将

GXS1 菌株鉴定为核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*), 命名为 *S. sclerotiorum* GXS1.

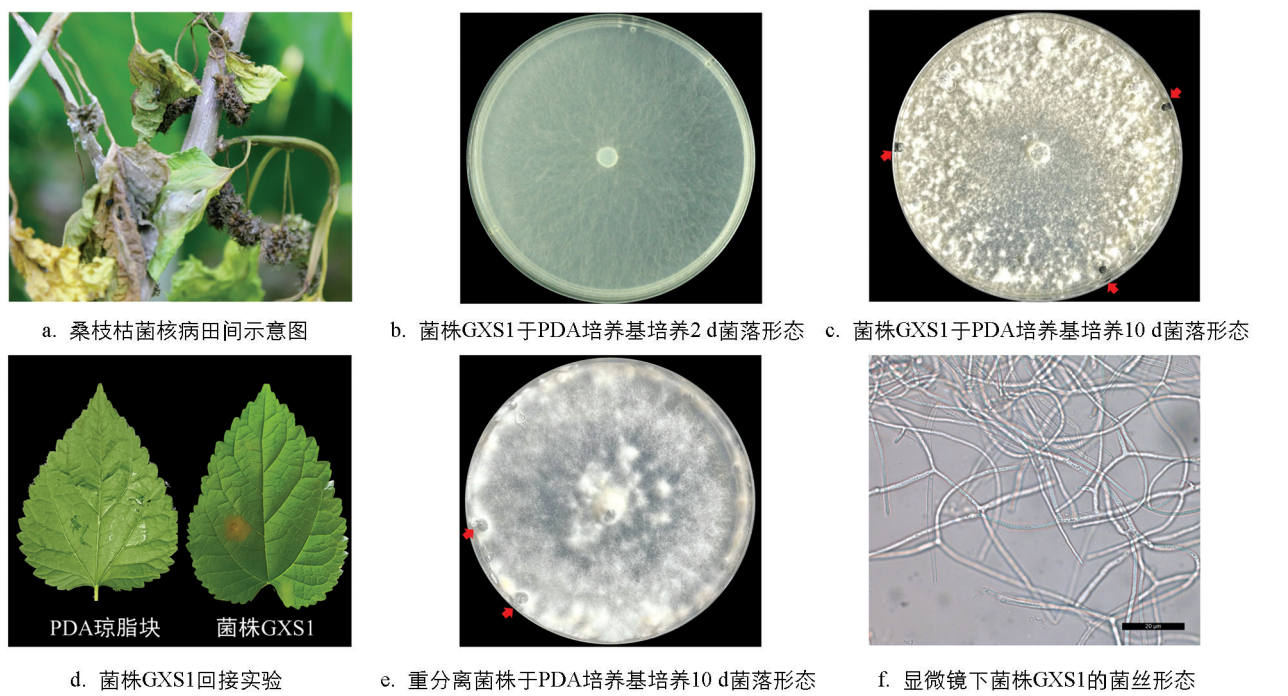


图 1 桑枝枯菌核病病原菌的分离及形态学特征

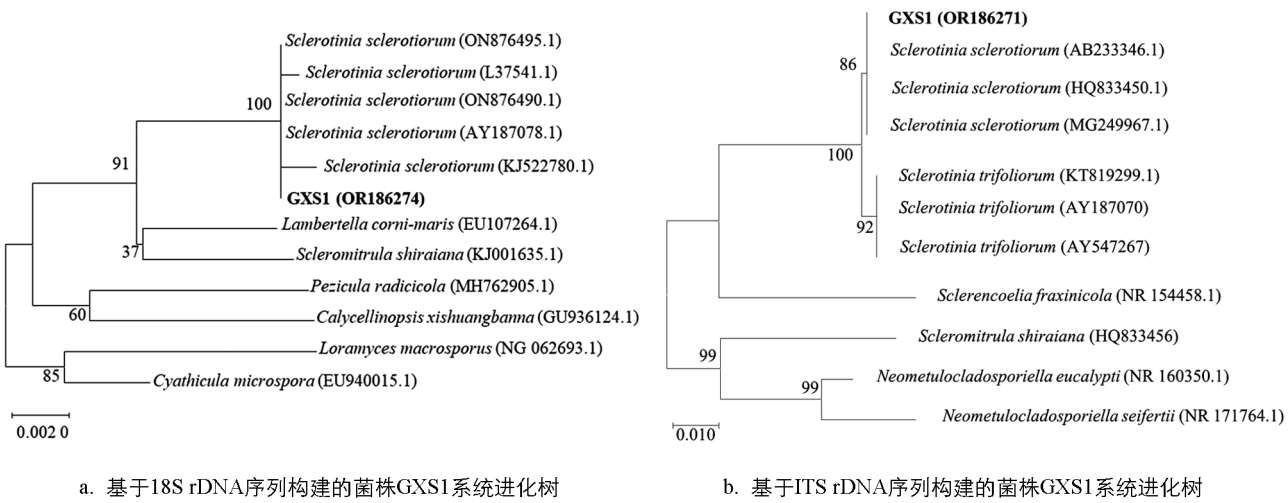


图 2 GXS1 菌株基于保守基因序列的系统发育树

2.3 温度和 pH 值对 *S. sclerotiorum* GXS1 生长的影响

将 *S. sclerotiorum* GXS1 接种于 PDA 培养基, 在不同温度条件下进行培养, 结果发现 *S. sclerotiorum* GXS1 在 5~30 ℃ 时均能生长, 但菌落生长情况差异较大(图 3a 和图 3b). 该菌在 5 ℃ 低温下能够缓慢生长, 随着温度的升高, 菌丝生长速度逐渐加快, 20 ℃ 时菌株生长速度最快, 平均菌落直径可达 59.3 mm. 当温度到达 25 ℃ 时, 菌丝生长开始受到抑制, 菌落直径减少至 55.3 mm, 而高于或等于 35 ℃ 时, *S. sclerotiorum* GXS1 则完全停止生长. 因此, *S. sclerotiorum* GXS1 最适生长温度为 20 ℃, 温度过高或过低均会抑制其生长.

在不同 pH 值条件下进行培养发现, *S. sclerotiorum* GXS1 在 pH 值为 4~11 时均可生长, 但菌落在不同 pH 值条件下生长速度存在差异(图 3c 和图 3d). 当 pH 值为 5 时, 菌株生长速度最快, 菌落直径可达 78.0 mm. 当 pH 值为 4 时, 其生长开始受到抑制, 菌丝变得致密, 菌落直径为 65.3 mm, 此外, 随着 pH 值的升高, 菌丝生长速度逐渐变慢. 因此, *S. sclerotiorum* GXS1 最适 pH 值为 5, 表明中性偏酸的条件更

适合该菌生长, 但过酸或者过碱条件下都不利于其生长.

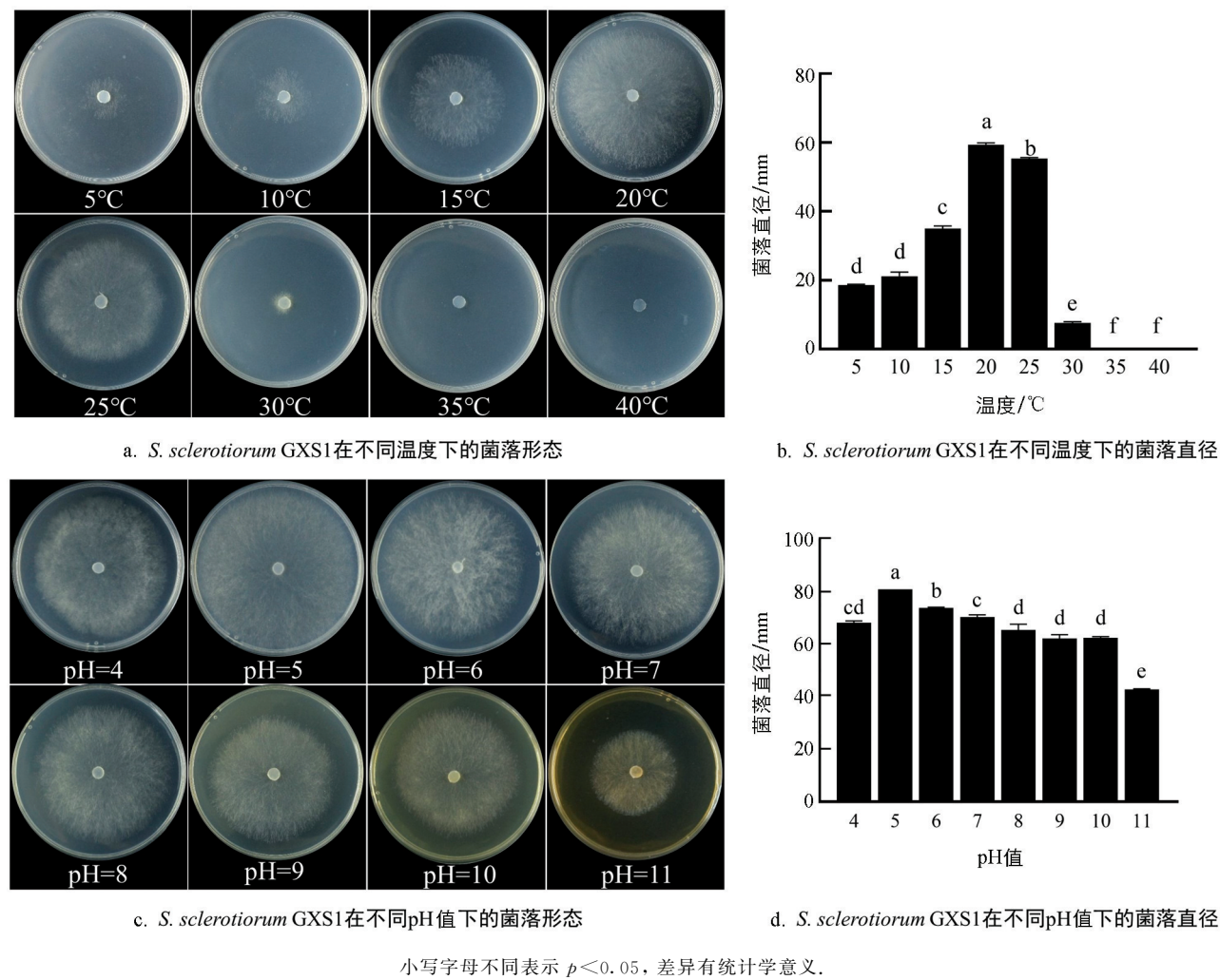


图 3 温度和 pH 值对 *S. sclerotiorum* GXS1 菌丝生长的影响 (2 d)

2.4 碳氮源对 *S. sclerotiorum* GXS1 生长的影响

探究菌株碳氮源的利用情况发现, *S. sclerotiorum* GXS1 在供试的 7 种碳源培养基上均能生长(图 4a 和图 4b). 当以蔗糖、葡萄糖和果糖作为碳源时, 菌株生长速度均较快, 培养 2 d 后菌落直径分别为 53.3 mm, 53.3 mm 和 51.2 mm, 三者之间无显著差异, 其次为以乳糖和山梨醇为碳源时, 平均菌落直径为 44.5 mm 和 41.3 mm, 而以淀粉和麦芽糖为碳源时, 菌落直径与无碳对照组无明显差异($p > 0.05$). 因此, *S. sclerotiorum* GXS1 菌株对葡萄糖、蔗糖和果糖的利用效果最好, 但不能够利用淀粉和麦芽糖作为碳源.

在供试的 7 种氮源培养基中, 除以尿素作为氮源的培养基外, *S. sclerotiorum* GXS1 在其他氮源培养基上均能生长(图 4c 和图 4d). 在以硝酸钠为氮源的培养基中菌丝生长速度最快, 平均菌落直径为 63.8 mm; 其次为以蛋白胨、酵母浸粉和硝酸钾为氮源的培养基, 平均直径为 54.3 mm, 53.8 mm 和 53.8 mm; 以硝酸钾为氮源时菌丝较稀薄, 而以蛋白胨或酵母浸粉为氮源时菌丝更致密. 然而, *S. sclerotiorum* GXS1 以甘氨酸为唯一氮源时, 平均菌落直径下降为 37.3 mm, 菌落直径小于对照组直径 43.5 mm, 表明甘氨酸会抑制菌落生长. 因此, *S. sclerotiorum* GXS1 菌株对硝酸钠的利用效果最好, 且其生长会受到甘氨酸和尿素的抑制.

2.5 培养基对 *S. sclerotiorum* GXS1 生长的影响

探究不同培养基对菌株生长情况的影响发现, *S. sclerotiorum* GXS1 在供试的 7 种培养基上生长时,

菌落边缘规则, 生长速度存在明显差异(图 5a 和图 5b). *S. sclerotiorum* GXSl 在 PDA 培养基上生长速度最快, 且菌丝致密, 2 d 后菌落长满整个平板, 平均菌落直径为 78.0 mm; 其次为 CYA 培养基, 培养 2 d 后, 菌丝浓厚、气生菌丝发达, 菌落直径为 71.7 mm; 而其在 CZA, SA, OA, MEA 和 WA 培养基上生长较慢. 因此, *S. sclerotiorum* GXSl 的最适培养基为 PDA.

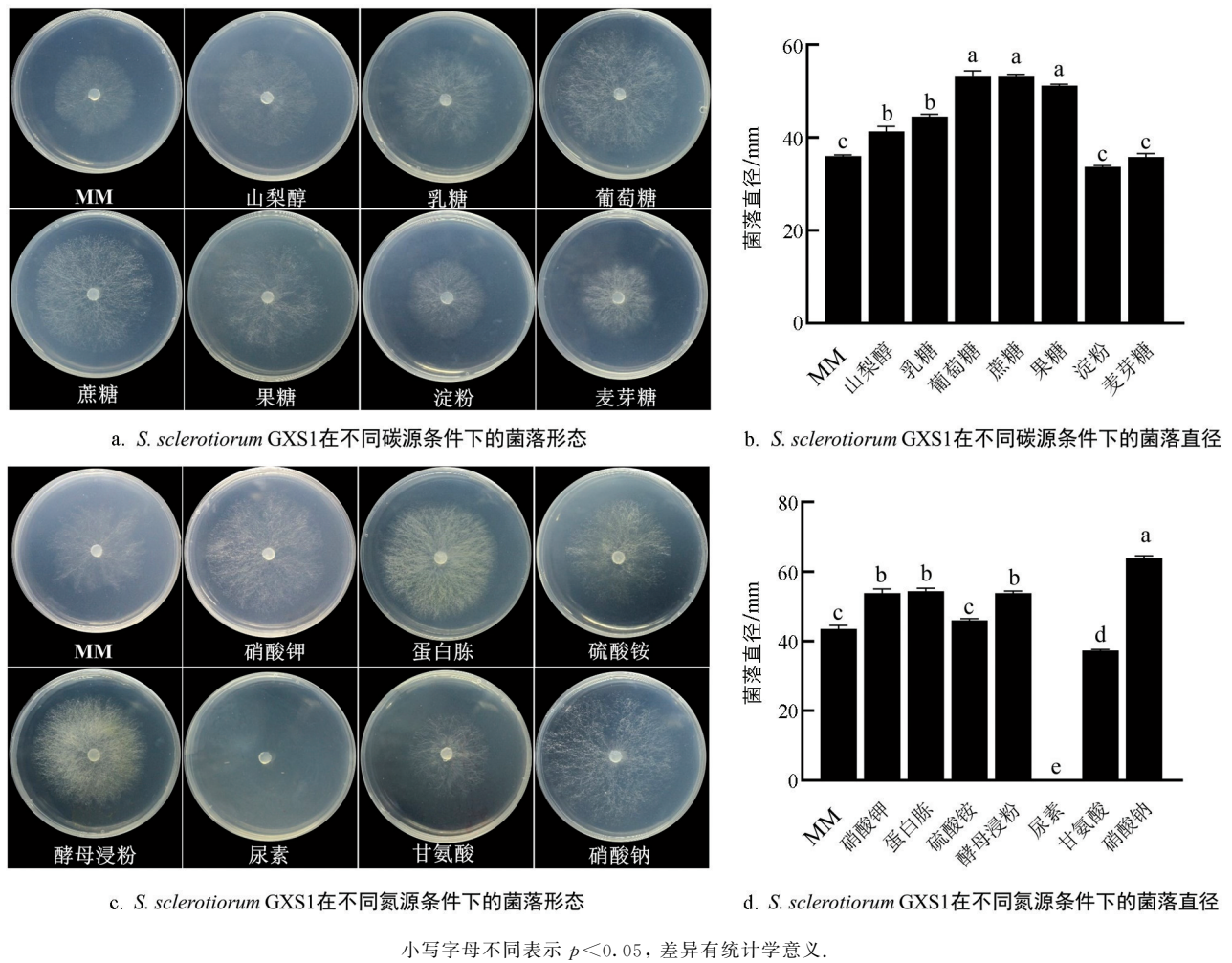


图 4 碳氮源对 *S. sclerotiorum* GXSl 菌丝生长的影响 (2 d)

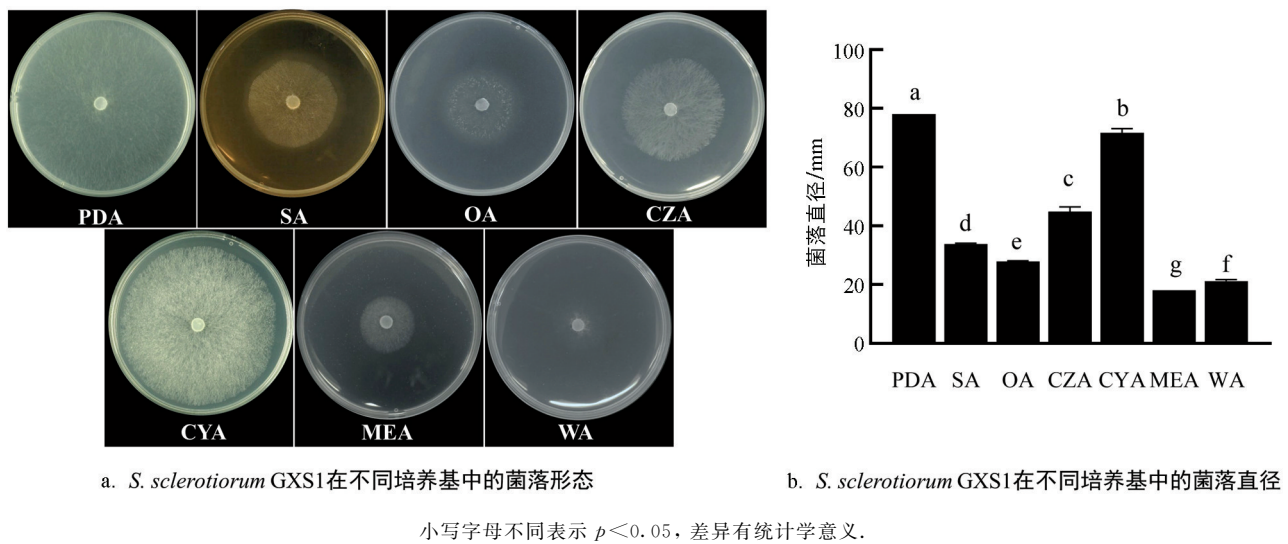


图 5 培养基对 *S. sclerotiorum* GXSl 菌丝生长的影响 (2 d)

2.6 S. sclerotiorum GXS1 对桑叶的侵染过程

采用 *S. sclerotiorum* GXS1 菌丝悬浮液接种离体桑叶, 分别在不同时间取样, 观察菌株侵染桑叶的过程. 结果发现: 在桑叶表面接种 6 h 后, *S. sclerotiorum* GXS1 以菌丝的形态附着在叶片表面(图 6a); 接种 12 h 后, *S. sclerotiorum* GXS1 的菌丝开始扭曲分叉, 形成侵染垫结构(图 6b); 接种 24 h 后(图 6c), *S. sclerotiorum* GXS1 在叶表形成密集的网状结构, 可见多个清晰的球状侵染垫结构; 接种 48 h 后, 侵染垫延伸出菌丝, 菌丝向周围细胞蔓延、扩散(图 6d).

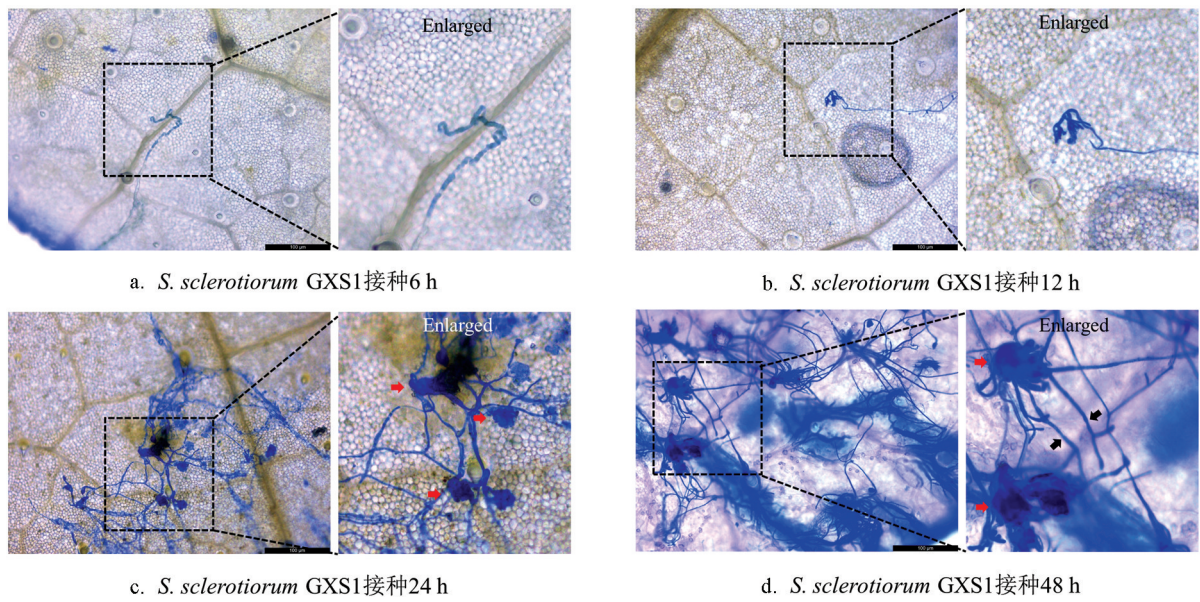


图 6 *S. sclerotiorum* GXS1 对桑叶侵染过程的观察

3 讨论

明确植物病害的病原菌种类是制定综合防治方法的前提, 近年来陆续有核盘菌从不同菌核病寄主中被分离鉴定出来, 如花生^[22]、马铃薯^[23]、花菜^[24]、茄子^[25]等. 核盘菌是一种全球分布的植物病原真菌^[12], 可危害 600 多种植物, 常侵染植物的叶、茎以及果实等组织, 进而造成严重的经济损失^[26]. 本研究对引起桑枝枯菌核病的病原菌进行了系统性鉴定, 并通过回接桑叶验证其致病性, 确认导致桑枝枯菌核病的病原菌为核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*.

环境条件是病害流行的重要因素, 植物的种植环境会影响病原菌生长, 从而间接影响病害发生^[27-28], 如 pH 值、温度、水分和养分等环境因素. 因此, 阐明病原菌的生物学特性对确定合适的管理策略具有重要意义. 有研究表明, 大部分核盘菌的最适生长温度为 20~25 ℃^[29-30], 说明较低的温度更适合核盘菌的生长. 本研究表明, *S. sclerotiorum* GXS1 在 5~30 ℃ 均能生长, 最适生长温度为 20 ℃, 在 30 ℃ 到 40 ℃ 之间受到明显抑制, 这与 Prova 等^[31]的研究结果一致. 研究还发现 *S. sclerotiorum* GXS1 在 5 ℃ 的低温下也能生长, 这与春季土壤温度较低时病情蔓延情况相符. 环境的 pH 值对核盘菌的发育和毒力至关重要^[32]. 本研究发现 *S. sclerotiorum* GXS1 在 pH 值为 4~11 时均能生长, 说明该菌株对环境 pH 值的适应能力较强, 但其更适宜在酸性条件下生长, 在 pH 值为 5 时菌丝生长速度最快, 这与不同地区、不同寄主中分离出的核盘菌一致^[33-34]. 除了温度和 pH 值等环境因素的影响, 碳氮源及培养基的种类也对病原菌的生长有影响. 碳氮化合物是病原真菌在宿主体内存活所必需的, 它们能为真菌合成细胞组分提供所需的碳氮源^[35]. 王丹等^[36]发现人参核盘菌最适碳源为蔗糖或葡萄糖, 最适氮源为蛋白胨、牛肉膏或酵母浸粉, 最适培养基为 SDA; 周洁等^[29]发现明日叶核盘菌的最适碳源是果糖、葡萄糖以及蔗糖, 最适氮源是酵母提取物; 杨顺超等^[33]发现菊花核盘菌对果糖和蛋白胨的利用率最高, 最适培养基为酵母浸出粉胨葡萄糖培养基 (YEPD). 本研究中, *S. sclerotiorum* GXS1 可以利用多种碳氮化合物, 以葡萄糖、蔗糖或果糖为碳源, 硝酸钠为氮源时对菌株生长最有利, 最适培养基为 PDA, 葡萄糖和蔗糖这类简单的碳水化合物可以被核盘菌

利用并转化为草酸盐,这有利于核盘菌的生长,且能增强其致病能力^[35]。本研究表明该菌能够同化利用不同的碳氮源,从而促进病原菌在宿主中的生长,但尿素对菌株有明显抑制作用,表明其具有防控该病害的潜力,但具体作用机制仍需进一步探究。

植物病原真菌在入侵植物时,常常会形成特殊的侵染结构^[37-38],这些结构在病原菌穿透植物表皮时发挥着重要作用,具体过程与寄主和菌株有关^[39-40]。核盘菌能够利用植物表面营养帮助自身发育,形成侵染垫,从而破坏植物表面角质层,侵染垫进一步分化出菌丝入侵到植物内部,抑制植物防御杀死细胞^[26]。孙明明等^[41]发现大豆核盘菌在侵染大豆叶片和茎秆的过程中,菌丝形成分枝,最终在尖端形成椭圆形的“侵染胞”结构,菌丝通过气孔或直接入侵植物组织。本研究在 *S. sclerotiorum* GXS1 侵染桑树叶片的过程中发现,接种 6 h 后,叶面观察到菌丝,未出现结构改变;接种 12 h 后,菌丝开始扭曲膨胀,出现分叉,这与 Liang 等^[26]的报道一致;接种 24 h 后,可以观察到密集的菌丝网,菌丝尖端膨大形成多个球状的侵染垫;接种 48 h 后,侵染垫分化出入侵菌丝,不断分支延伸,向周围细胞扩散。本研究探究了 *S. sclerotiorum* GXS1 入侵桑树叶片的动态过程,发现该菌能够通过形成特殊的侵染结构入侵桑树叶片,帮助自身侵染植物细胞,这为进一步探究病原菌的侵染过程和致病机制奠定了基础。

4 结论

本研究通过分离纯化获得一株桑枝枯菌核病原菌 GXS1,根据菌株形态特征、ITS 和 18S 保守序列分析,将该菌株鉴定为 *Sclerotinia sclerotiorum*,回接实验证实 *S. sclerotiorum* GXS1 能够导致桑叶发病。*S. sclerotiorum* GXS1 的生物学特性研究结果表明,其生长最适温度为 20 ℃,最适 pH 值为 5,最适碳源为葡萄糖、蔗糖或果糖,最适氮源为硝酸钠,最适培养基为 PDA。桑叶侵染过程显示,*S. sclerotiorum* GXS1 接种桑叶后会形成侵染垫结构,再分支产生菌丝入侵桑叶。

参考文献:

- [1] XU W F, WANG F, WANG R L, et al. Seasonal Characterization of the Endophytic Fungal Microbiome of Mulberry (*Morus* spp.) Cultivars Resistant and Susceptible to Sclerotiniosis [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(10): 2052.
- [2] OU T, ZHANG M, HUANG Y Z, et al. Role of Rhizospheric *Bacillus megaterium* HGS7 in Maintaining Mulberry Growth under Extremely Abiotic Stress in Hydro-Fluctuation Belt of Three Gorges Reservoir [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 880125.
- [3] LIM S H, CHOI C I. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as a Promising Nutraceutical Resource [J]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 437.
- [4] JIANG Y, NIE W J. Chemical Properties in Fruits of Mulberry Species from the Xinjiang Province of China [J]. *Food Chemistry*, 2015, 174: 460-466.
- [5] 徐伟芳,王爱印,舒平,等. 几种常见桑树病害的识别与防治 [J]. *蚕学通讯*, 2015, 35(2): 22-30, 35.
- [6] 宾荣佩,陈小青,潘启寿,等. 广西桑树主要病虫害的发生与综合防治措施 [J]. *广西蚕业*, 2014, 51(4): 23-31.
- [7] 朱方容,韦秉兴,陈小青,等. 广西桑树菌核病与防治技术研究 [J]. *广西蚕业*, 2023, 60(1): 1-9.
- [8] 陈俊英. 桑枝枯菌核病的发生与防治 [J]. *广东蚕丝通讯*, 1986, 20(1): 41.
- [9] 仝德侠,王敦崇,岳俊富,等. 桑枝枯菌核病发病情况调查及防治对策 [J]. *江苏蚕业*, 2004, 26(1): 25-26.
- [10] 谢锦灵. 宜州市桑枝枯菌核病发生流行规律及综合防治措施 [J]. *广西植保*, 2016, 29(1): 18-20.
- [11] 蓝月丘. 桑园暴发枝枯菌核病的原因及防治对策 [J]. *广西农学报*, 2013, 28(4): 37-38.
- [12] HOSSAIN M M, SULTANA F, LI W Q, et al. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the Pathogenomic Features of a Global Pathogen [J]. *Cells*, 2023, 12(7): 1063.
- [13] FREY L A, VLEUGELS T, RUTTINK T, et al. Phenotypic Variation and Quantitative Trait Loci for Resistance to Southern Anthracnose and Clover Rot in Red Clover [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135(12): 4337-4349.
- [14] MIHAJLOVIC M, HRUSTIC J, GRAHOVAC M, et al. First Report of *Sclerotinia minor* on Lettuce in Serbia [J]. *Plant Disease*, 2022, 106(10): 2754.
- [15] 王聪浩. 西洋参菌核病病原学及综合防治技术研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2021.
- [16] BATURO-CIESNIEWSKA A, GROVES C L, ALBRECHT K A, et al. Molecular Identification of *Sclerotinia trifolio-*

- rum* and *Sclerotinia sclerotiorum* Isolates from the United States and Poland [J]. *Plant Disease*, 2017, 101(1): 192-199.
- [17] 浦冠勤,毛建萍. 桑枝枯菌核病病原菌的生物学特性研究 [J]. *蚕业科学*, 2002, 28(2): 87-90.
- [18] CHAUDHARY S, LAL M, SAGAR S, et al. Genetic Diversity Studies Based on Morpho-Pathological and Molecular Variability of the *Sclerotinia sclerotiorum* Population Infecting Potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(12): 177.
- [19] 李国庆. 作物菌核病病原——核盘菌的多样性研究 [J]. *植物病理学报*, 1997, 27(2): 188-189.
- [20] 涂亚婷. 桑断枝烂叶病菌(*Boeremia exigua* GXH1)生物学特性及致病机理探究 [D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- [21] 李维峰,何鹏搏,陈红梅,等. 中国滇南地区莲雾炭疽病病原菌的形态学和分子生物学鉴定 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2023, 45(5): 83-91.
- [22] FASKE T R, DRENNAN G, HURD K. First Report of Sclerotinia Blight Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on Peanut in Arkansas [J]. *Plant Health Progress*, 2017, 18(1): 7-8.
- [23] WOODHALL J W, BROWN L, HARRINGTON M, et al. *Sclerotinia sclerotiorum* Causes Decay and Forms Sclerotia in Potato Tubers in Idaho [J]. *Plant Health Progress*, 2020, 21(4): 335-337.
- [24] 彭能胜,邓思怡,常威,等. 花菜病害病原菌分离纯化及鉴定 [J]. *湖北植保*, 2022(6): 30-32.
- [25] 李韦柳,吴永官,甘桂云,等. 茄子菌核病病原菌鉴定及抗性种质资源筛选 [J]. *中国蔬菜*, 2021(6): 85-91.
- [26] LIANG X F, ROLLINS J A. Mechanisms of Broad Host Range Necrotrophic Pathogenesis in *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Phytopathology*, 2018, 108(10): 1128-1140.
- [27] SAIJO Y, LOO E P I. Plant Immunity in Signal Integration between Biotic and Abiotic Stress Responses [J]. *The New Phytologist*, 2020, 225(1): 87-104.
- [28] 杨秀梅,王丽花,张艺萍,等. 蓝莓叶斑病病原菌鉴定及其生物学特性 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2022, 44(10): 48-55.
- [29] 周洁,文生巧,齐传东,等. 明日叶茎基腐病病原菌鉴定及生物学特性研究 [J]. *中国瓜菜*, 2023, 36(5): 44-50.
- [30] 蒋晶晶,杜蕙,陈爱昌,等. 甘肃省党参菌核病病原菌鉴定及其生物学特性研究 [J]. *草业学报*, 2022, 31(12): 181-190.
- [31] PROVA A, AKANDA A M, ISLAM S, et al. Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum*, an Emerging Fungal Pathogen Causing Blight in Hyacinth Bean (*Lablab purpureus*) [J]. *The Plant Pathology Journal*, 2018, 34(5): 367-380.
- [32] XU L S, LI G Q, JIANG D H, et al. *Sclerotinia sclerotiorum*: An Evaluation of Virulence Theories [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2018, 56: 311-338.
- [33] 杨顺超,刘晔,蒋甲福,等. 菊花菌核病病原菌鉴定、抗性筛选与防治 [J]. *核农学报*, 2022, 36(1): 24-33.
- [34] 顾玉阳,王黎娜,袁娟,等. 扁豆菌核病病原菌鉴定及其生物学特性 [J]. *中国蔬菜*, 2020(10): 68-76.
- [35] ISLAM M R, AKANDA A M, HOSSAIN M M, et al. First Characterization of a Newly Emerging Phytopathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* Causing White Mold in Pea [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(10): 923-939.
- [36] 王丹,傅俊范,尹海波,等. 人参核盘菌菌核分泌液致病性及生物学特性研究 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2020, 51(4): 439-445.
- [37] ROCHA R O, ELOWSKY C, PHAM N T T, et al. Spermine-Mediated Tight Sealing of the *Magnaporthe oryzae* Appressorial Pore-Rice Leaf Surface Interface [J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5: 1472-1480.
- [38] RYDER L S, DAGDAS Y F, KERSHAW M J, et al. A Sensor Kinase Controls Turgor-Driven Plant Infection by the Rice Blast Fungus [J]. *Nature*, 2019, 574: 423-427.
- [39] 杨庆丽,张毅,祁天涛,等. 大麦叶斑病菌侵染过程及几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶活性变化的研究 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2023, 58(1): 122-129.
- [40] ULOTH M B, CLODE P L, YOU M P, et al. Attack Modes and Defence Reactions in Pathosystems Involving *Sclerotinia sclerotiorum*, *Brassica carinata*, *B. juncea* and *B. napus* [J]. *Annals of Botany*, 2016, 117(1): 79-95.
- [41] 孙明明,吕世翔,李智媛,等. 大豆菌核病菌丝侵染茎叶过程扫描电镜观察研究 [J]. *大豆科学*, 2020, 39(1): 123-129.