

李青, 宋春茶, 罗建梅, 等. 桑葚果腐病病原菌的分离鉴定及抑菌植物提取物筛选 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (11): 1289–1297.

LI Q, SONG C C, LUO J M, et al. Identification and Natural Antibacterial Agent of Mulberry Rot Pathogen [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (11): 1289–1297.

桑葚果腐病病原菌的分离鉴定及抑菌植物提取物筛选

李 青^{1,2}, 宋春茶^{1,2}, 罗建梅^{1,2}, 杨态娇^{1,2}, 聂闪闪^{1,2}, 张东华^{1,2},
刘 丽^{1,2}, 胡世俊^{2,3*}, 闫晓慧^{1,2*}

(1. 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224; 2. 西南林业大学林学院, 云南 昆明 650224;
3. 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘 要: 【目的】分离鉴定桑葚果实腐烂的病原菌并筛选对其具有抑菌活性的植物提取物, 为桑葚果腐病的绿色防控提供依据。【方法】采用组织分离法分离病原菌并通过真菌形态学及分子生物学对病原菌进行鉴定; 采用菌丝生长速率法测定 54 种植物提取物对桑葚果实腐烂病原菌的抑菌活性, 筛选活性较好的提取物, 通过浓度梯度进行毒力测定, 最后通过显微观察活性较好的提取物 (EC_{50}) 对菌丝形态的影响。【结果】经形态及分子生物学鉴定该致病菌为易脆毛霉 (*Mucor fragilis*); 当提取物质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 青蒿和天蓝鼠尾草乙醇提取物对该菌株有较好的抑菌效果, 抑菌率分别为 77.72% 和 49.06%, 经毒力测定其抑菌有效中浓度 (EC_{50}) 分别为 0.063、0.107 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 通过显微镜观察发现, 青蒿乙醇提取物可导致病菌菌丝畸变, 天蓝鼠尾草对病原菌菌丝形态无明显影响。【结论】本研究发现青蒿和天蓝鼠尾草对桑葚果腐病菌易脆毛霉有较好的抑菌活性, 青蒿提取物的抑菌活性尤为显著, EC_{50} 仅为 $0.063\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 具有进一步开发的价值。

关键词: 桑葚果腐病; 植物提取物; 抑菌活性; 毒力

中图分类号: S436.6

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 11-1289-09

Identification and Natural Antibacterial Agent of Mulberry Rot Pathogen

LI Qing^{1,2}, SONG Chuncha^{1,2}, LUO Jianmei^{1,2}, YANG Taijiao^{1,2}, NIE Shanshan^{1,2},
ZHANG Donghua^{1,2}, LIU Li^{1,2}, HU Shijun^{2,3*}, YAN Xiaohui^{1,2*}

[1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650224, China; 2. College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China; 3. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China (State Forestry Administration), Kunming, Yunnan 650224, China]

Abstract: 【Objective】Pathogen of the fruit rot on mulberries was isolated and identified, and effective antibacterial plant extracts for the disease prevention and control selected. 【Method】Tissue separation method was applied to isolate potential pathogens from the infected mulberries. The morphology and molecular biology of the isolates were examined for pathogen identification. Antibacterial activity of 54 plant ethanol extracts was tested to compare the inhibition on the growth of the isolate mycelia. Virulence of the most potent extracts at gradient concentrations was determined along with microscopic observations. 【Result】Growth of the identified pathogen, *Mucor fragilis* was significantly inhibited at a rate of 77.72% by the extract of *Artemisia caruifolia* on a dosage of $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ rendering an EC_{50} at $0.063\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and also at a rate of 49.06% by *Salvia uliginosa* with an EC_{50} at $0.107\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. In addition to a higher inhibition rate, the *A. caruifolia* extract induced significant mycelial distortions on the pathogens as shown under the microscope. 【Conclusion】Significant antifungal activities against the mulberry rot-causing *M. fragilis* were found of the ethanol extracts of *A. caruifolia* and *S. uliginosa*. With a toxicity of EC_{50} at $0.063\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and significant deformation on the mycelia of the pathogen, *A. caruifolia* was considered the choice candidate as a biocontrol agent against the disease.

Key words: Mulberry rot disease; plant extracts; antibacterial activity; toxicity

收稿日期: 2024-04-09 修回日期: 2024-08-30

作者简介: 李青 (2000—), 女, 硕士研究生, 主要从事有害生物综合防控研究, E-mail: Lq15912856989@163.com

* 通信作者: 闫晓慧 (1980—) 女, 博士, 教授, 主要从事植物源农药研究, E-mail: luckyxh@163.com; 胡世俊 (1977—), 男, 博士, 副教授, 主要从事入侵植物研究, E-mail: shijunhu@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (32160378); 云南省高层次人才项目 (YN-WR-QNBJ-2018-300); 西南林业大学博士科研启动经费项目 (111711、111712)

0 引言

【研究意义】桑葚 (*Fructus Mori*) 是桑科 (Moraceae) 桑属 (*Morus*) 植物成熟果穗的统称, 别名为桑乌、桑果、桑枣^[1], 桑葚富含维生素、氨基酸、花青素、多糖和蛋白质等, 具有很高的营养价值和保健作用^[2-4]。我国桑树病害 200 余种, 其中真菌病害占 80% 左右^[5], 严重影响了桑果的产量和品质, 给相关产业造成巨大的经济损失。桑葚果实腐生性病害是在采后是造成桑葚减产的主要因素, 探寻无毒和环境友好抑菌手段可降低果桑产业发展过程中因桑葚果实腐烂造成的危害。【前人研究进展】桑葚果实腐烂致病菌有毛霉属 (*Mucor* spp.)、匍枝根霉属 (*Rhizopus stolonifer* spp.)、葡萄孢属 (*Botrytis* spp.) 和层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*)^[6-8]。目前已发现约有 1 400 种植物具有杀菌活性; 具有抑菌、杀菌活性的植物主要为菊科、豆科、伞形科、姜科、松科、樟科、禾本科、百合科、桃金娘科、唇形科等植物^[9-12]。据报道, 麻黄乙醇提取物、八角茴香和厚朴乙醇提取物对桑葚菌核病具有较好的抑菌活性^[13-14]; 王彩霞等^[15]对 87 种药用植物进行抑菌筛选, 发现厚朴和麻叶蟛蜞菊提取物对葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 有较好的抑菌活性, 厚朴、乌药和麦冬提取物对禾谷镰孢 (*Fusarium graminearum*) 有较好的抑菌活性; 苟亚峰等^[16]对 23 种植物进行抑菌筛选, 发现圆滑番荔枝提取物对胡椒瘟病菌 (*Phytophthora capsici*) 有较好的抑菌活性。【本研究切入点】关于桑葚果腐病病原菌及防治该病害的相关研究报道较少。【拟解决关键问题】通过组织分离法从桑葚果腐病病果上分离纯化得到病原菌, 结合形态学及分子生物学技术鉴定该病原菌。通过菌丝生长速率法测定 54 种植物提取物对该病原菌的抑制作用, 旨在为桑葚采后病害的绿色防控提供依据, 为开发新型植物源杀菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料

供试植物分属于 22 科, 共 54 种, 分别采自辽宁、广西、云南等地, 由西南林业大学林学院胡世俊副教授鉴定, 详见表 1。

1.1.2 供试药剂

60% 唑醚·代森联水分散粒剂购自巴斯夫 (中国) 有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 植物提取物的制备

采用乙醇回流法^[17-18]提取植物样品。植物材料风干粉碎后称取粗粉 200 g, 用 95% 乙醇加热回流提取 1 h, 重复 3 次并合并提取液, 通过旋转蒸发仪浓缩回收溶剂, 得到乙醇提取物, 置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

表 1 供试植物名录
Table 1 List of tested plants

序号 Number	植物名称 Plants	科 Family	提取部位 Plant parts	采集地点 Location
1	牛尾蒿 <i>Artemisia dubia</i>	菊科 Asteraceae	全草	云南昆明
2	千里光 <i>Senecio scandens</i>	菊科 Asteraceae	全草	云南昆明
3	鱼眼草 <i>Dichrocephala integrifolia</i>	菊科 Asteraceae	全草	云南昆明
4	黑蒿 <i>A. palustris</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	辽宁朝阳
5	茵陈蒿 <i>A. capillaris</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	辽宁朝阳
6	小花鬼针草 <i>Bidens parviflora</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	辽宁朝阳
7	全叶马兰 <i>Aster pekinensis</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	辽宁朝阳
8	革命菜 <i>Crassocephalum crepidioides</i>	菊科 Asteraceae	全草	广西宾阳
9	藿香蓟 <i>Ageratum conyzoides</i>	菊科 Asteraceae	全草	广西宾阳
10	银胶菊 <i>Parthenium hysterophorus</i>	菊科 Asteraceae	全草	广西宾阳
11	香丝草 <i>Erigeron bonariensis</i>	菊科 Asteraceae	全草	广西宾阳
12	金腰箭 <i>Synedrella nodiflora</i>	菊科 Asteraceae	全草	广西宾阳
13	翼齿六棱菊 <i>Laggera pterodonta</i>	菊科 Asteraceae	全草	云南昆明
14	野蒿蒿 <i>Crassocephalum crepidioides</i>	菊科 Asteraceae	全草	云南昆明
15	微甘菊 <i>Mikania micrantha</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南德宏
16	青蒿 <i>A. caruifolia</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	辽宁朝阳
17	天名精 <i>Carpesium abrotanoides</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南昆明
18	紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南昆明
19	香青 <i>Anaphalis sinica</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南昆明
20	土木香 <i>Inula helenium</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南昆明
21	小鱼眼草 <i>Dichrocephala benthamii</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南昆明
22	假臭草 <i>Praxelis clematidea</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南昆明
23	火绒草 <i>Leontopodium leontopodioides</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	辽宁朝阳
24	尼泊尔香青 <i>Anaphalis nepalensis</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南昆明

续上表

序号 Number	植物名称 Plants	科 Family	提取部位 Plant parts	采集地点 Location
25	钻叶紫菀 <i>Symphyotrichum subulatum</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南昆明
26	芳香堆心菊 <i>Helenium aromaticum</i>	菊科 Asteraceae	地上部分	云南昆明
27	水棘针 <i>Amethystea caerulea</i>	唇形科 Lamiaceae	全草	辽宁朝阳
28	益母草 <i>Leonurus japonicus</i>	唇形科 Lamiaceae	全草	云南昆明
29	墨西哥鼠尾草 <i>Salvia leucantha</i>	唇形科 Lamiaceae	地上部分	云南昆明
30	香茶菜 <i>Isodon amethystoides</i>	唇形科 Lamiaceae	地上部分	云南昆明
31	天蓝鼠尾草 <i>Salvia uliginosa</i>	唇形科 Lamiaceae	地上部分	云南昆明
32	山薄荷 <i>Dracocephalum moldavica</i>	唇形科 Lamiaceae	全草	辽宁朝阳
33	马鞭草 <i>Verbena officinalis</i>	马鞭草科 Verbenaceae	全草	云南昆明
34	牛筋果 <i>Harrisonia perforata</i>	芸香科 Rutaceae	地上部分	云南昆明
35	臭椿 <i>Ailanthus altissima</i>	苦木科 Simaroubaceae	枝叶	辽宁朝阳
36	拔毒散 <i>Sida szechuensis</i>	锦葵科 Malvaceae	地上部分	云南昆明
37	土牛膝 <i>Achyranthes aspera</i>	苋科 Amaranthaceae	全草	云南昆明
38	土荆芥 <i>Dysphania ambrosioides</i>	苋科 Amaranthaceae	全草	云南昆明
39	粉花月见草 <i>Oenothera rosea</i>	柳叶菜科 Onagraceae	地上部分	云南昆明
40	黄花酢浆草 <i>Oxalis pes-caprae</i>	酢浆草科 Oxalidaceae	全草	云南昆明
41	荨麻 <i>Urtica fissa</i>	荨麻科 Urtiaceae	全草	云南昆明
42	女娄 <i>Clematis apiifolia</i>	毛茛科 Ranunculaceae	地上部分	云南昆明
43	老鹳草 <i>Geranium wilfordii</i>	牻牛儿苗科 Geraniaceae	全草	云南昆明
44	络石 <i>Trachelospermum jasminoides</i>	夹竹桃科 Apocynaceae	枝、叶	云南昆明
45	线萼山梗菜 <i>Lobelia melliana</i>	桔梗科 Campanulaceae	地上部分	云南昆明
46	黄精 <i>Polygonatum sibiricum</i>	天门冬科 Asparagaceae	地上部分	辽宁朝阳
47	曼陀罗 <i>Datura stramonium</i>	茄科 Solanaceae	枝、叶	云南昆明
48	忍冬 <i>Lonicera japonica</i>	忍冬科 Caprifoliaceae	地上部分	云南昆明
49	马桑 <i>Coriaria nepalensis</i>	马桑科 Coriariaceae	枝、叶	云南昆明
50	毛蕊花 <i>Verbascum thapsus</i>	玄参科 Scrophulariaceae	地上部分	云南昆明
51	紫红獐芽菜 <i>Swertia punicea</i>	龙胆科 Gentianaceae	全草	云南昆明
52	罗汉松 <i>Podocarpus macrophyllus</i>	罗汉松科 Podocarpaceae	枝、叶	云南昆明
53	假酸浆 <i>Nicandra physalodes</i>	茄科 Solanaceae	地上部分	云南昆明
54	角蒿 <i>Incarvillea sinensis</i>	紫葳科 Bignoniaceae	地上部分	辽宁朝阳

1.2.2 病原菌的分离纯化

采用组织分离法^[19]对病原菌进行分离。将发病的桑葚果实用无菌水冲洗干净，75%乙醇消毒 5 s，取出后用无菌水清洗并吸干水分，无菌条件下切取约 5 mm×5 mm 的病组织块，置于 PDA 培养基中，在 28 ℃ 电热恒温培养箱中培养 3 d，待病组织块长出菌丝后，挑取菌落边缘菌丝进行纯化，直到平板上长出单一菌落。

1.2.3 病原菌的形态学观察

用无菌打孔器在已分离纯化得到的菌株边缘打取 6 mm 的菌饼，置于新的 PDA 培养基上，28 ℃ 恒温培养箱中暗培养，观察并记录菌株的培养性状，5 d 后在光学显微镜下观察菌株的显微特征。

1.2.4 病原菌分子生物学鉴定

纯化的菌株送至擎科生物有限公司进行总 DNA 提取和 ITS 序列的扩展测序，采用真菌通用引物 ITS1（5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'）和 ITS4（5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'）进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL，其中 PCR Mix (2×) 12.5 μL，上游引物和下游引物各 1 μL，DNA 模板 1 μL，ddH₂O 9.5 μL。所得测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 对比分析，并下载同源性相近物种序列，基于 MEGA6 软件构建系统发育树。

1.2.5 病原菌致病性测定

基于柯赫氏法则对病原菌的致病性进行测定。用无菌接种针将健康的桑葚果实刺伤，挑取适量菌丝贴于果实伤口处，室温保湿培养，每隔 2 h 观察并记录果实的发病情况，以不接种菌丝只制造伤口的桑葚果实为对照。待接种的桑葚果实出现症状，通过组织分离法进行再分离、纯化，并与原菌株进行比较。

1.2.6 抑菌活性测定

采用菌丝生长速率测定法^[20-21]测定提取物抑菌活性。用二甲亚砜（DMSO）溶解一定量的醇提取物，使提取物母液质量浓度为 100 mg·mL⁻¹，将母液置于 60 ℃ 恒温箱 30 min，消毒备用。PDA 培养基经高压灭菌后降温至 50 ℃ 以下，在无菌操作台中将母液与 PDA 培养基充分混合，最终使带毒培养基质量浓度为 1 mg·mL⁻¹，混合均匀后倒入无菌培养皿中，固化后制成带毒平板，以同等浓度的 DMSO 为空白对照。在菌落边缘用 6 mm 无菌打孔器打取菌饼，置于带毒平板中央，28 ℃ 恒温培养箱中倒置培养，每个处理 3 个重复；采用十字交叉法测量菌落直径，待对照组的菌落长到培养皿的 90%，即可测量结

果, 计算其抑菌率。计算公式如下: 纯生长量=菌落平均直径-菌饼的直径; 抑菌率/%=[(对照纯生长量-处理纯生长量)/对照纯生长量]×100。

1.2.7 抑菌毒力 EC_{50} 测定

对抑菌活性较好的植物提取物进一步进行毒力测定。用二倍稀释法将植物提取物稀释至 0.25、0.50、1.00、2.00 $mg \cdot mL^{-1}$, 阳性对照药剂为 60% 唑醚·代森联水分散粒剂, 每个处理 3 次重复。采用 1.2.5 的方法进行抑菌活性测定, 不同天数、不同浓度的抑菌率换算成几率值, 以抑菌几率为 Y 轴, 浓度对数为 X 轴, 通过 SPSS 概率分析得到其毒力回归方程和抑制中浓度 EC_{50} 。

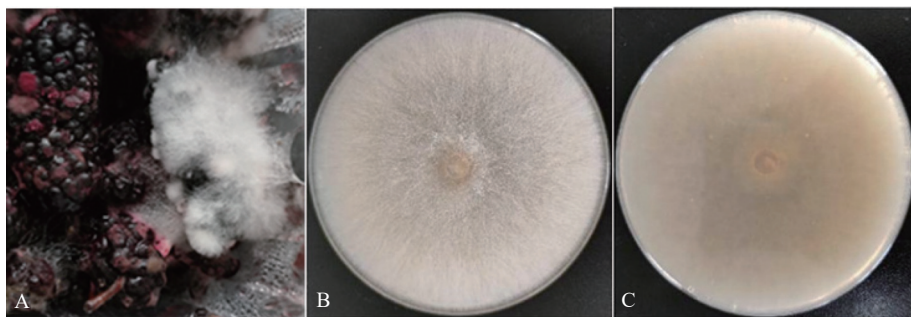
1.2.8 植物提取物对病原菌菌丝形态的影响

挑取活性较好植物提取物 (EC_{50}) 处理的病原菌菌落边缘菌丝体, 制成玻片标本, 置于 40 倍光学显微镜下观察植物提取物对病原菌菌丝的影响, 并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 病害的症状及病原菌分离鉴定

桑葚感染果腐病, 发病初期在果实上出现白色病斑, 果实软化, 随着贮藏时间延长, 病斑逐渐扩大使果实表面覆盖一层白色绒毛状菌丝, 并散发出腐烂的气味, 果实软腐 (图 1A)。



A: 桑葚果腐病症状; B: FM-01 菌落正面; C: FM-01 菌落背面。

A: Symptoms of mulberry rot disease; B: front view of FM-01 colony; C: back view of FM-01 colony.

图 1 病害症状及菌落形态特征

Fig. 1 Disease symptoms and colony morphology

通过组织分离法从腐烂的桑葚果实上分离得到 1 株真菌, 命名为 FM-01。该菌株在 PDA 培养基上呈圆形菌落, 菌落背面无色素产生; 菌丝生长茂盛, 呈棉絮状, 繁密成层, 直立, 菌落初期为白色, 后期转为灰白色 (图 1B~C)。

显微观察发现该菌株菌丝无横隔, 单轴分枝, 无假根及匍匐菌丝; 各分枝顶端着生球形孢子囊, 囊轴直立, 孢囊孢子椭圆形; 接合孢子表面粗糙, 球形 (图 2); 初步将该病原菌鉴定为毛霉属真菌。

进一步通过分子生物学对菌株进行鉴定, 在 GenBank 上进行 BLAST 序列比对发现菌株 FM-01 的基因序列与毛霉属真菌有较高的相似度, 选择相似度高的菌株序列通过 Neighbor-Joining 构建系统发育树 (图 3), 从图中可看出菌株 FM-01 与 *Mucor fragilis* (登录号: MH424493) 属于同一分支, 亲缘关系最近, 结合该菌株的形态特征, 鉴定该病原菌为易脆毛霉 (*Mucor fragilis*)。

2.2 病原菌的致病性测定

根据柯赫氏法则对菌株的致病性进行测定, 接种病原菌 3 d 后, 桑葚果实出现明显的发病症状, 果实表面长出白色菌丝, 形成白色的霉层 (图 4A);

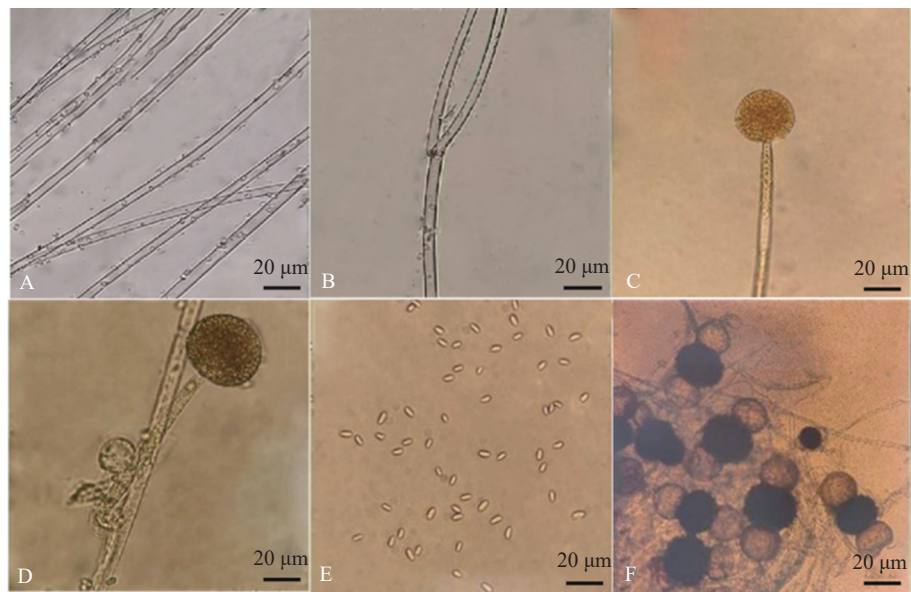
而对照组桑葚果实未发病 (图 4B)。挑取发病果实上的菌丝在 PDA 培养基上培养, 其菌落形态与分离到的菌株一致。

2.3 54 种植物提取物对易脆毛霉 (*M. fragilis*) 的抑菌活性

采用生长速率法测定了表 1 中所列的 54 种植物提取物对易脆毛霉 (*M. fragilis*) 的抑菌活性, 在质量浓度为 1 $mg \cdot mL^{-1}$ 时 40 种植物表现出不同程度的抑菌活性 (表 2), 其中青蒿和天蓝鼠尾草提取物对该菌株菌丝生长抑制效果最好, 抑制率分别为 77.72%、49.06%, 显著高于其他提取物; 其次是茵陈蒿和香青, 抑制率分别为 44.80%、40.22%, 与其他提取物有显著差异; 此外香茶菜、全叶马兰、紫茎泽兰也表现出较好的抑菌活性, 抑制率分别为 38.75%、31.14%、31.14%, 其余植物抑菌率均在 30% 以下, 抑菌活性相对较低。

2.4 高活性植物提取物对易脆毛霉 (*M. fragilis*) 的抑菌毒力

通过 0.25、0.50、1.00、2.00 $mg \cdot mL^{-1}$ 等 4 个浓度测定了天蓝鼠尾草乙醇提取物和青蒿乙醇提取物对易脆毛霉 (*M. fragilis*) 的抑菌作用, 在 0~2.00



A: 菌丝; B: 单轴分枝; C: 孢子囊; D: 孢囊梗; E: 孢囊孢子; F: 接合孢子。
A: Hypha; B: monopodial branching; C: sporangia; D: sporangiophore; E: sporangiospore; F: zygospore.

图 2 菌株在 40 倍光学显微镜下的特征 (10×40)
Fig. 2 Microscopic image of fungus (10×40)

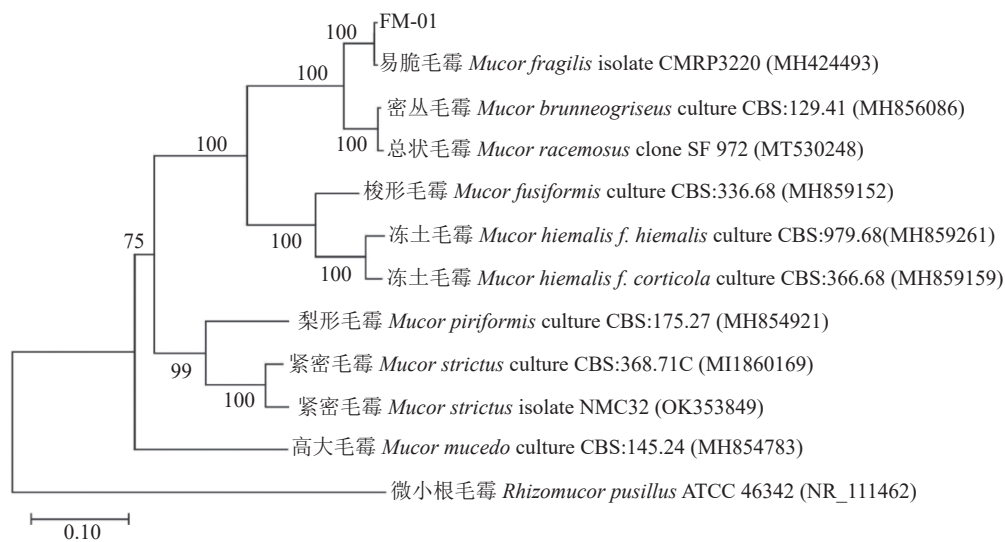
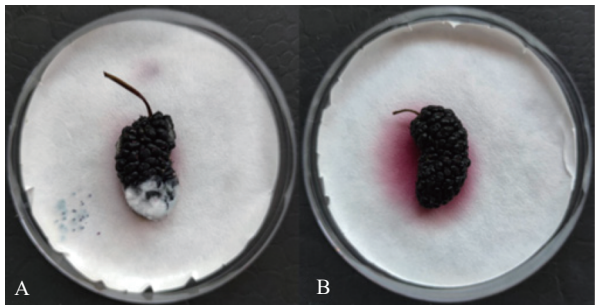


图 3 基于 ITS 基因序列构建的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on IST sequences



A: 接种易脆毛霉菌株; B: 对照。
A: Inoculated with *M. fragilis*; B: control.

图 4 回接验证结果

Fig. 4 Reverse validation of disease-causing pathogen

$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 各提取物的抑菌率随着浓度的增加 (图 5)。

在接种后的第 2~5 天每天分别测定各浓度提取物的抑菌率 (图 6、图 7), 以提取物各浓度对应的抑菌率为依据, 分别拟合出第 2、3、4、5 天两种提取物的毒力方程 (表 3)。其中青蒿乙醇提取物的 EC_{50} 在 $0.063\sim0.113\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 接种后第 2 天的毒力最强; 天蓝鼠尾草乙醇提取物 EC_{50} 在 $0.760\sim1.356\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 接种后第 2 天的毒力最强。

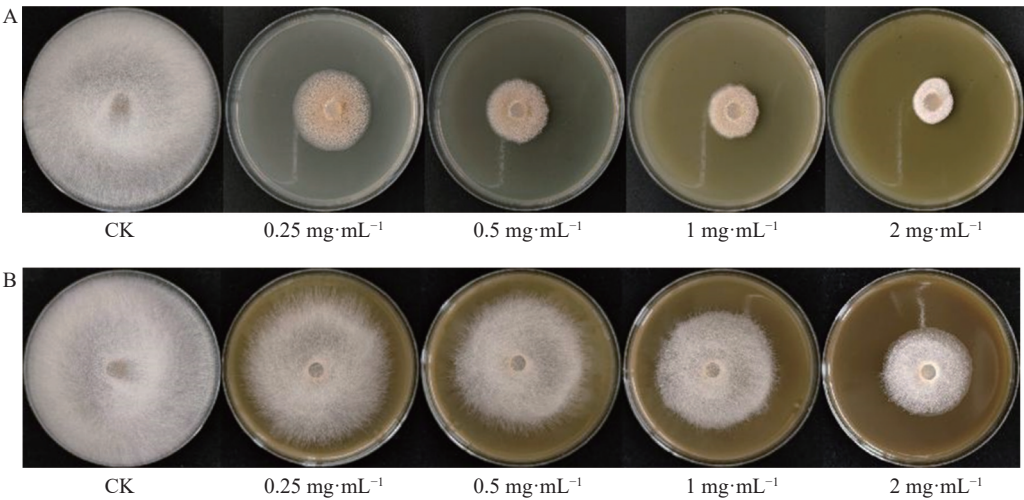
2.5 两种植物提取物对易脆毛霉 (*M. fragilis*) 菌丝形态的影响

通过光学显微镜观察发现, 青蒿乙醇提取物处

表 2 54 种植物乙醇提取物对易脆毛霉的抑菌活性筛选
Table 2 Antifungal activities on *M. fragilis* of 54 plant ethanol extracts

植物 Plants	抑菌率 Inhibition rate/%	植物 Plants	抑菌率 Inhibition rate/%
青蒿 <i>A. caruifolia</i>	77.72±0.01 a	天蓝鼠尾草 <i>S.uliginosa</i>	49.06±0.02 b
茵陈蒿 <i>A.capillaris</i>	44.80±0.02 c	香青 <i>A. sinica</i>	40.22±0.02 d
香茶菜 <i>I. amethystoides</i>	38.75±0.04 d	紫茎泽兰 <i>A.adenophora</i>	31.14±0.01 e
全叶马兰 <i>A. pekinensis</i>	31.14±0.01 e	假臭草 <i>P. clematidea</i>	27.38±0.02 f
天名精 <i>C. abrotanoides</i>	27.71±0.03 f	芳香堆心菊 <i>H.aromaticum</i>	25.95±0.02 f
鱼眼菊 <i>D. benthamii</i>	22.65±0.00 g	牛尾蒿 <i>A. dubia</i>	22.62±0.01 g
黑蒿 <i>A. palustris</i>	22.31±0.01 g	土木香 <i>I. helenium</i>	19.81±0.03 gh
藿香蓟 <i>A.conyzoides</i>	19.81±0.00 gh	微甘菊 <i>M. micrantha</i>	18.86±0.02 he
尼泊尔香青 <i>A. nepalensis</i>	17.88±0.02 hei	牛筋果 <i>H. perforata</i>	16.03±0.02 eij
益母草 <i>L. japonicus</i>	15.24±0.02 ijk	假酸浆 <i>N. physaloides</i>	13.85±0.01 jkl
臭椿 <i>A. altissima</i>	13.33±0.02 jkl	小花鬼针草 <i>B. parviflora</i>	12.49±0.01 klm
罗汉松 <i>P. macrophyllus</i>	12.25±0.01 lm	女娄 <i>C. apiifolia</i>	11.57±0.04 lm
紫红獐牙菜 <i>S. punicea</i>	11.32±0.00 lm	香丝草 <i>E.bonariensis</i>	10.89±0.03 lmn
土牛膝 <i>A. aspera</i>	10.21±0.01 mn	山薄荷 <i>D. moldavica</i>	9.70±0.05 mn
火绒草 <i>L. leontopodioides</i>	8.25±0.03 no	土荆芥 <i>C. ambrosioides</i>	6.67±0.02 op
黄精 <i>P. sibiricum</i>	6.61±0.02 op	金腰箭 <i>S. nodiflora</i>	6.24±0.01 op
粉花月见草 <i>O. rosea</i>	5.80±0.02 op	络石 <i>T. jasminoides</i>	5.09±0.01 pq
银胶菊 <i>P. hysterothorus</i>	4.41±0.01 pqr	墨西哥鼠尾草 <i>S. leucantha</i>	3.78±0.02 qrs
黄花酢浆草 <i>O. pes-caprae</i>	3.61±0.02 qrs	水棘针 <i>A. caerulea</i>	2.66±0.03 rs
革命菜 <i>C. crepidioides</i>	1.78±0.02 rs	千里光 <i>S. scandens</i>	0.95±0.02 s

表中数据为 3 次重复的平均值，平均数±标准差，字母不同者表示差异达显著水平（ $P<0.05$ ）。下同。
Data are presented as mean of 3 repeats±standard deviation; those with different alphabets indicate significant difference at $P<0.05$. Same for below.



A: 青蒿; B: 天蓝鼠尾草。
A: *A. caruifolia*; B: *S. uliginosa*.

图 5 青蒿和天蓝鼠尾草提取物对易脆毛霉的抑制效果
Fig. 5 Antifungal activities on *M. fragilis* of *A. caruifolia* and *S. uliginosa* extracts

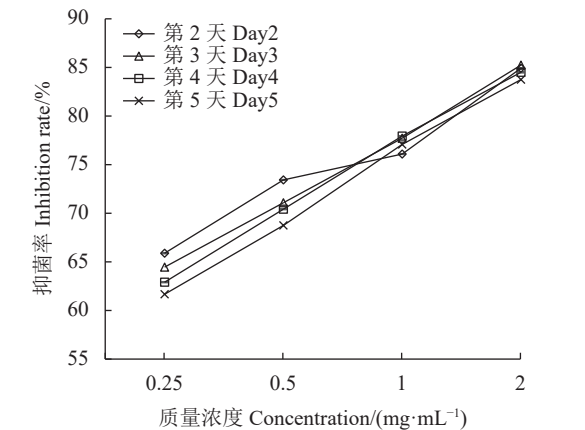


图 6 不同质量浓度青蒿乙醇提取物对易脆毛霉的抑菌效果

Fig. 6 Antifungal activities on *M. fragilis* of *A. carvifolia* ethanol extract in different concentrations

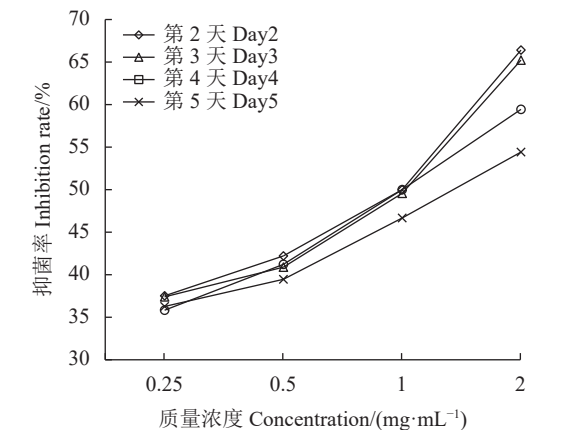


图 7 不同质量浓度天蓝鼠尾草乙醇提取物对易脆毛霉的抑菌效果

Fig. 7 Antifungal activities on *M. fragilis* of *S. uliginosa* ethanol extract in different concentrations

理过的易脆毛霉 (*M. fragilis*) 菌丝与对照组相比, 原本直立光滑的菌丝变得弯曲、变粗且表面不光滑, 多分叉 (图 8), 而天蓝鼠尾草处理过的菌丝无明显变化; 可能由于青蒿提取物中的活性成分影响了桑葚果腐病菌菌丝的生长, 从而起到抑菌作用。

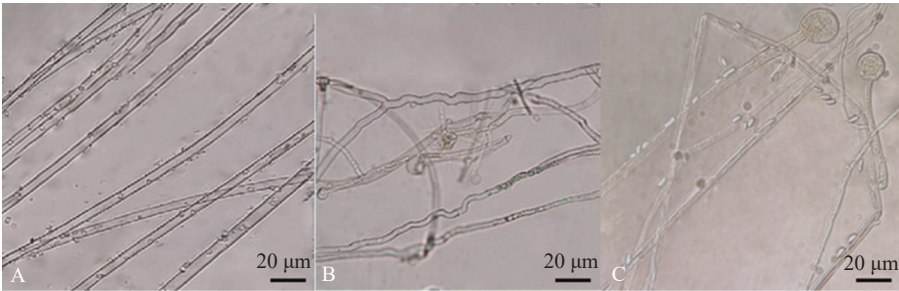
表 3 天蓝鼠尾草、青蒿乙醇提取物对易脆毛霉的抑菌毒力

Table 3 Toxicity on *M. fragilis* of *A. carvifolia* and *S. uliginosa* ethanol extracts

植物 Plants	培养时间 Time/ d	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 R^2	EC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)
青蒿 <i>A. carvifolia</i>	2	$y = 1.11x + 1.31$	0.946	0.063
	3	$y = 1.27x + 1.32$	0.986	0.089
	4	$y = 1.29x + 1.28$	0.997	0.100
	5	$y = 1.30x + 1.22$	0.995	0.113
天蓝鼠尾草 <i>S. benthamiana</i>	2	$y = 1.29x + 0.16$	0.924	0.760
	3	$y = 1.26x + 0.12$	0.919	0.807
	4	$y = 1.08x + 0.02$	0.988	0.952
	5	$y = 0.84x + 0.11$	0.973	1.356

3 讨论与结论

本研究通过组织分离法对桑葚果腐病病原菌进行分离、纯化, 得到 1 株毛霉属 (*Mucor* sp.) 真菌易脆毛霉 (*M. fragilis*), 采用传统真菌形态学及分子生物学分析方法判定该菌为桑葚果腐病的新致病菌, 目前已在采后新疆甜樱桃腐烂^[22]、菜豆腐腐烂^[23]、草莓致腐^[24]上发现该致病菌。毛霉菌属广泛存在于自然界中, 为腐生性真菌, 具有较强的分解蛋白质能力, 引起食物霉变, 是一种条件致病性真菌, 还会使采摘后的果蔬储藏期缩短, 影响果蔬质量, 造成腐烂, 造成严重的危害^[25-26]。目前对其防治主要采用化学杀菌剂, 容易引发药剂残留及病原菌的抗药性等问题。相比化学杀菌剂, 植物提取物具有绿色环保环境兼容性好等优势。本研究通过生长速率法测定 54 种植物提取物的抑菌活性, 发现青蒿和天蓝鼠尾草的乙醇提取物对易脆毛霉 (*M. fragilis*) 表现出较好的抑菌活性, 为利用其开发植物源杀菌剂



A: 对照; B: 青蒿; C: 天蓝鼠尾草。
A: control; B: *A. carvifolia*; C: *S. uliginosa*.

图 8 两种植物提取物对易脆毛霉菌丝形态的影响 (10×40)

Fig. 8 Effect of two plant extracts on *M. fragilis* mycelial morphology (10×40)

提供了依据。

青蒿提取物具有抑菌杀虫、抗疟疾、抗肿瘤等作用^[27]。宁睿等^[28]研究发现,青蒿水提物在质量浓度为 $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对辣椒疫霉病菌 (*Phytophthora capsici*)、蘑菇湿泡病菌 (*Mycogone pemiciosa*) 抑制率达 100%;霍焕燃^[29]研究发现青蒿挥发油在浓度为 $5\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌 (*F. solani*) 等 4 种镰刀菌的抑制率均在 75% 以上;本试验中,青蒿乙醇提取物在 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下对易脆毛霉 (*M. fragilis*) 的抑制率为 77.72%,说明同种植物在不同溶剂、不同浓度对病原菌的抑制活性存在差异性,不同溶剂提取物的活性成分不同。天蓝鼠尾草 (*Salvia uliginosa* Benth) 是唇形科 (Labiatae) 鼠尾草属 (*Salvia*) 的多年生植物,鼠尾草属植物地上部分大多含精油,具有杀菌、抗氧化、抗突变、消炎等作用^[30]。王芳等^[31]研究发现,墨西哥鼠尾草挥发油在质量浓度为 $24\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的抑制率为 72.97%;Císarová 等^[32]研究发现鼠尾草精油可以有效抑制黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和塔宾曲霉 (*Aspergillus tubingensis*) 的生长;鼠尾草属不同种植物对病原真菌均表现出不同的抑制效果。本研究发现青蒿和墨西哥鼠尾草提取物对易脆毛霉 (*M. fragilis*) 的显著抑菌活性进一步丰富了该植物的抗菌谱,鉴于其良好的抑菌活性各提取物中具体抗菌活性成分值得深入研究。青蒿是常见中药材,天蓝鼠尾草是广泛种植的观赏植物,二者均对人畜无害、对环境友好。本研究为利用青蒿和天蓝鼠尾草开发新型植物源杀菌剂提供了抑菌,为桑葚果腐病的绿色防控奠定了基础。

参考文献:

- [1] 决登伟,桑雪莲. 高压均质对桑葚汁中抗氧化成分与抗氧化活性的影响 [J]. 热带作物学报, 2017, 38 (12): 2261-2265.
JUE D W, SANG X L. Effects of high-pressure homogenization treatment on the total antioxidants content and the antioxidant activity of mulberry juice [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(12): 2261-2265. (in Chinese)
- [2] SAENSOUK S, SENAVONGSE R, PAPAYRATA C, et al. Evaluation of color, phytochemical compounds and antioxidant activities of mulberry fruit (*Morus alba* L.) during ripening [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(12): 1146.
- [3] 陈春华,唐炜,殷军艺,等. 桑葚多糖结构特征和生物活性研究进展 [J]. 中国食品学报, 2022, 22 (5): 367-382.
CHEN C H, TANG W, YIN J Y, et al. Research progress on structure characteristics and biological activity of polysaccharide from fructus Mori [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(5): 367-382. (in Chinese)
- [4] 杨舒,黄徐英,屠寒,等. 桑葚花色苷对小鼠的抗疲劳作用 [J]. 食品工艺科技, 2023, 44 (16): 377-385
YANG S, HUANG X Y, TU H, et al. Anti-fatigue effects of mulberry anthocyanins in mice [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(16): 377-385.
- [5] 浦冠勤,黄艳君,毛建萍,等. 中国桑树病害名录 (III) [J]. 中国蚕业, 2012, 33 (4): 12-17.
PU G Q, HUANG Y J, MAO J P, et al. List of mulberry diseases in China(III) [J]. *China Sericulture*, 2012, 33(4): 12-17. (in Chinese)
- [6] 张健. 桑椹防腐技术研究和桑树果用性状关联分析 [D]. 镇江: 江苏科技大学, 2017.
ZHANG J. Study on mulberry fruit preservation techniques and association analysis of fruit traits in mulberry species [D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2017. (in Chinese)
- [7] 周建华,朱志贤,李勇,等. 湖北省桑椹腐烂病原菌鉴定 [J]. 湖北农业科学, 2018, 57 (21): 69-72.
ZHOU J H, ZHU Z X, LI Y, et al. Identification of fruit rot pathogen on mulberry in Hubei Province [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2018, 57(21): 69-72. (in Chinese)
- [8] 聂蓓蓓,梁嘉俊,包立军,等. 桑椹果腐病的病原菌鉴定 [J]. 蚕业科学, 2020, 46 (1): 26-30.
NIE B B, LIANG J J, BAO L J, et al. Identification of pathogen causing mulberry fruit rot disease [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2020, 46(1): 26-30. (in Chinese)
- [9] 王飞,杨瑾,李绍建,等. 丹参根腐病菌拮抗菌株贝莱斯芽胞杆菌 Bv1-4 的筛选及盆栽防效 [J]. 中国生物防治学报, 2023, 39 (6): 1398-1407.
WANG F, YANG J, LI S J, et al. Screening of antagonistic isolate *Bacillus velezensis* Bv1-4 and its control effect against root rot disease on *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2023, 39(6): 1398-1407. (in Chinese)
- [10] 齐永霞,陈方新,丁克坚,等. 安徽省油菜菌核病菌对菌核净的抗性测定 [J]. 农药, 2006, 45 (8): 567-568,570.
QI Y X, CHEN F X, DING K J, et al. Determining dimethachlon resistance of *Sclerotinia sclerotiorum* in Anhui province [J]. *Agrochemicals*, 2006, 45(8): 567-568,570. (in Chinese)
- [11] 李晓华,徐政. 植物源杀菌剂研究进展 [J]. 南方农业, 2018, 12 (13): 40-42,45.
LI X F, XU Z. The research progress on botanical fungicides [J]. *South China Agriculture*, 2018, 12(13): 40-42,45. (in Chinese)
- [12] 杨欣蕊,廖艳凤,赵鹏飞,等. 植物源农药及其开发利用研究进展 [J]. 南方农业, 2022, 16 (11): 33-36.
YANG X R, LIAO Y F, ZHAO P F, et al. Study progress in plant-source pesticides and their development and utilization [J]. *South China Agriculture*, 2022, 16(11): 33-36. (in Chinese)
- [13] 谷少伟,向伟,周兵,等. 麻黄提取物中抑制桑椹肥大性菌核病原菌的活性成分分离鉴定 [J]. 蚕业科学, 2015, 41 (5): 833-838.
GU S W, XIANG W, ZHOU B, et al. Separation and identification of active ingredients with inhibitory activity to the pathogen causing mulberry sorosus hypertrophic sclerote disease from *Ephedra* extract [J]. *Science of Sericulture*, 2015, 41(5): 833-838. (in Chinese)
- [14] 郑泽林. 一株桑椹核盘菌的分离鉴定及其植物源抑菌剂的筛选 [D].

- 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- ZHENG Z L. Isolation and Identification of a Mulberry Sclerotinia sclerotiorum and Screening of Plant-derived Bacteriostatic Agents[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2020.
- [15] 王彩霞, 兰妍彦, 孟衍朴, 等. 87 种植物提取物抑菌活性初步研究 [J]. 植物保护, 2023, 49 (4): 293–301, 308.
- WANG C X, LAN Y Y, MENG Y P, et al. Antifungal activity of extracts from 87 plant species [J]. *Plant Protection*, 2023, 49(4): 293–301, 308. (in Chinese)
- [16] 荀亚峰, 刘爱勤, 孙世伟, 等. 23 种植物提取物对胡椒瘟病原菌的抑制作用 [J]. 植物保护, 2010, 36 (6): 128–131.
- GOU Y F, LIU A Q, SUN S W, et al. Inhibitory effects of 23 plant extracts against *Phytophthora capsici* [J]. *Plant Protection*, 2010, 36(6): 128–131. (in Chinese)
- [17] 朱庆书, 赵文英, 殷其峰. 苍耳子中抑菌成分提取方法的比较 [J]. 青岛科技大学学报 (自然科学版), 2008, 29 (5): 413–414, 418.
- ZHU Q S, ZHAO W Y, YIN Q F. Studies on extraction methods of antibacterial constituents from *Xanthium sibiricum* patr [J]. *Journal of Qingdao University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2008, 29(5): 413–414, 418. (in Chinese)
- [18] 郝梦超, 安超娜, 王乙颖, 等. 金银花黄酮的提取工艺及其药理活性研究进展 [J]. 饮料工艺, 2022, 25 (5): 71–75.
- HAO M C, AN C N, WANG Y Y, et al. Research Prospect on Extraction and Pharmacological Activity of Flavonoids from *Lonicerae Japonica* [J]. *Beverage Industry*, 2022, 25(5): 71–75.
- [19] 尹沙亮, 钟珊, 刘奇志, 等. 草莓丝核菌根腐病原菌鉴定及 7 种杀菌剂的抑菌作用测定 [J]. 植物保护, 2019, 45 (4): 132–136, 148.
- YIN S L, ZHONG S, LIU Q Z, et al. Identification of *Rhizoctonia* species causing root rot of strawberry and inhibition effects of seven fungicides [J]. *Plant Protection*, 2019, 45(4): 132–136, 148. (in Chinese)
- [20] WEI G, ZHAO W, HU A, et al. Identification of a new pathogenic fungi causing sorghum leaf spot disease and its management using natural product and microorganisms [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(6). DOI:10.3390/microorganisms11061431.
- [21] 罗建梅, 张兴怡, 伍建榕, 等. 植物提取物对油茶炭疽菌的抑菌活性筛选 [J]. 中国生物防治学报, 2022, 38 (4): 852–859.
- LUO J M, ZHANG X Y, WU J R, et al. Antifungal Activity of Plant extracts against *Colletotrichum fructicola*, Pathogen of *Camellia oleifera* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38(4): 852–859. (in Chinese)
- [22] 关波, 张璇, 胡玉婵, 等. 新疆石河子地区甜樱桃采后腐烂致病真菌的分离鉴定 [J]. 微生物学通报, 2018, 45 (11): 2480–2487.
- GUAN B, ZHANG X, HU Y C, et al. Isolation and identification of pathogenic fungi in rotten sweet cherry from Shihezi, Xinjiang [J]. *Microbiology China*, 2018, 45(11): 2480–2487. (in Chinese)
- [23] KHAN I H, JAVAID A. *Mucor fragilis* causing rot of Seychelles polebean in Pakistan [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2022, 51(3): 359–362.
- [24] 魏超, 代晓航, 郭灵安, 等. 草莓致腐霉菌的鉴定及其产毒能力研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8 (5): 1721–1726.
- WEI C, DAI X H, GUO L A, et al. Identification and toxin-producing capability of causing-spoilage fungi in strawberry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(5): 1721–1726. (in Chinese)
- [25] 刘德衍, 袁磊, 李国良, 等. 糖尿病合并毛霉菌感染致死法医学鉴定 1 例报告并文献复习 [J]. 青岛大学学报 (医学版), 2022, 58 (5): 775–776.
- LIU D Y, YUAN L, LI G L, et al. Forensic identification of death caused by diabetes mellitus with mucormycosis infection: A case report and literature review [J]. *Journal of Qingdao University (Medical Sciences)*, 2022, 58(5): 775–776. (in Chinese)
- [26] EGIDI E, DELGADO-BAQUERIZO M, PLETT J M, et al. A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2369.
- [27] 肖立皓, 李海波, 黄玉欣, 等. 青蒿的化学成分研究 I [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (5): 1160–1167.
- XIAO L H, LI H B, HUANG Y X, et al. Research on chemical constituents from *Artemisia annua* I [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, 46(5): 1160–1167. (in Chinese)
- [28] 宁睿, 李优琴, 王春梅, 等. 青蒿粗提物的抑菌活性研究 [J]. 江苏农业科学, 2007 (3): 61–63.
- [29] 霍焕燃. 青蒿提取物对四种植物病原镰刀菌的抑菌活性研究 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2021.
- HUO H R. Study on the antifungal activity of *Artemisia annua* extracts against four plant pathogenic *Fusarium* [D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2021.
- [30] 范敏. 三种鼠尾草属植物中二萜的化学成分及生物活性研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2018.
- FAN M. Studies on the diterpenoids constituents and their bioactivities of three species *Salvia* plant [D]. Kunming: Yunnan University, 2018. (in Chinese)
- [31] 王芳, 李晓旭, 高瑾, 等. 墨西哥鼠尾草挥发油的抗菌活性研究 [J]. 西南林业大学学报, 2015, 35 (5): 92–96.
- WANG F, LI X X, GAO J, et al. Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oils from *Salvia leucantha* [J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2015, 35(5): 92–96. (in Chinese)
- [32] ČÍSAŘOVÁ M, TANČINOVÁ D, MEDO J. Antifungal activity of lemon, *Eucalyptus*, thyme, oregano, sage and lavender essential oils against *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* isolated from grapes [J]. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2016, 10(1): 83–88.

(责任编辑: 林海清)