

海南省火龙果软腐病病原菌的鉴定及生物学特性

郑 樊, 徐 刚, 仇 芳, 郑妃庆, 郑 丽, 谢昌平*

(海南大学热带农林学院, 热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要 红皮深红肉火龙果软腐病主要发生在花瓣、鳞片和果实。采用组织分离法分离病原菌, 通过琼脂平板稀释纯化、致病性测定、形态学和分子生物学方法将病原鉴定为桃吉尔霉 *Gilbertella persicaria*。生物学测定结果表明: 该病原菌在 15~37℃ 范围内均能生长, 低于 10℃ 不能生长, 最适温度 32℃; 最适 pH 5.0~6.0; 连续光照更有利于菌丝生长。

关键词 红皮深红肉火龙果; 软腐病; 病原鉴定; 桃吉尔霉; 生物学特性

中图分类号: S 436.67 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2018347

Identification and biological characteristics of the pathogenic fungus causing the soft rot of *Hylocereus costaricensis* in Hainan, China

ZHENG Fan, XU Gang, QIU Fang, ZHENG Feiqing, ZHENG Li, XIE Changping

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University; Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Haikou 570228, China)

Abstract The soft rot mainly occurs on the petal, scale and fruit of *Hylocereus costaricensis*. Through pathogen isolation, agar dilution and purification, pathogenicity test, morphological and molecular methods, the pathogen was identified as *Gilbertella persicaria*. The studies on biological characteristics showed that the temperature range for mycelium growth was from 15℃ to 37℃ with an optimum temperature of 32℃, and the hyphae could not grow under 10℃; the optimum pH was 5.0–6.0, and continuous illumination facilitated hyphal growth.

Key words *Hylocereus costaricensis*; soft rot disease; pathogen identification; *Gilbertella persicaria*; biological characteristics

火龙果 *Hylocereus* spp. 又名红龙果、情人果和仙蜜果等, 因外表肉质鳞片似龙鳞而得名, 原产于墨西哥南部及中美洲诸国的太平洋沿岸地区, 现在我国海南、福建、广东、广西、贵州和云南等省(自治区)均有种植。大部分火龙果属于仙人掌科, 量天尺属 *Hylocereus* (Berger) Britton et Rose, 其他则属于蛇鞭柱属 *Selenicereus* Britton et Rose^[1]。火龙果主要有三种商业种类: 红皮白肉火龙果 *Hylocereus undatus*、红皮红肉火龙果 *H. polyrhizus* 和红皮深红肉火龙果 *H. costaricensis*^[2]。火龙果集水果、蔬菜、花卉于一体, 营养丰富, 深受消费者青睐, 具有广阔的发展前景。

目前, 国内外记载的火龙果病害有由 *Enterobacter cloacae*^[3]、*Fusarium oxysporum* 和 *F. dimerum*^[4]、*Erwinia* sp.^[5] 引起的软腐病, 由 *F. oxysporum*^[5] 引起

的枯萎病, 由 *Paenibacillus polymyxa*^[6]、*Bipolaris cactivora*^[7]、*F. semitectum*、*F. oxysporum* 和 *F. moniliforme*^[8] 引起的茎腐病, *Rhizopus stolonifer*^[9] 引起的根霉病, 由 *Botryodiplodia theobromae*^[8] 引起的焦腐病, 由 *Bipolaris cactivora*、*Scytalidium dimidiatum*^[8]、*Fusarium* spp.^[10]、*Gilbertella persicaria*^[11–12] 和 *F. dimerum*^[13] 引起的果腐病, 由 *Neoscytalidium dimidiatum*^[14–15] 引起的溃疡病或褐斑病, 由 *Colletotrichum gloeosporioides*、*C. truncatum*^[16] 和 *C. capsici*^[8] 引起的炭疽病, *Bipolaris cactivora*^[17] 引起的黑斑病, 由 *Phoma* sp.、*Diplodia* sp.、*Ascochyta* sp.^[18] 引起的茎枯病, *Cactus virus X*^[19] 引起的病毒病, 由 *Septogloeum* sp.^[20] 引起的茎斑病以及由 *Scytalidium dimidiatum*^[21]、*Bipolaris cactivora*^[22]、*F. lateritium*、

收稿日期: 2018-08-06

修订日期: 2018-09-07

基金项目: 海南大学热带农林学院学生学术科技创新支持项目

* 通信作者 E-mail: xiechangping009@163.com

Aspergillus niger 和 *A. flavus*^[23] 引起的腐烂病等。

2016 年,笔者在海南省昌江县的火龙果种植基地发现一种危害红皮深红肉火龙果花瓣、鳞片和果实的软腐病,发病部位初期产生水渍状的病斑,病部覆盖一层灰白色的霉层,严重时病斑扩大至全部花瓣、鳞片和果实,造成病部呈软腐状,严重影响其产量,而且在果实贮藏过程中该病引起成熟果实的大量腐烂变质。本研究通过对红皮深红肉火龙果软腐病的病原菌进行分离培养、纯化、致病性测定、病原鉴定和生物学特性的研究,旨在弄清病原分类地位,掌握该病发病规律,从而为该病害的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

感病的红皮深红肉火龙果于 2017 年 4 月采自海南省昌江县某火龙果种植基地。

1.2 症状描述

按常规方法对田间发病典型部位出现的症状进行描述,并拍摄病害的症状。

1.3 菌株的分离及纯化

采用常规组织分离法^[24]对病原菌进行分离,采用琼脂平板稀释纯化法^[25]进行纯化,并将纯化菌株转入试管斜面于 4℃ 保存。

1.4 致病性测定

将保存的菌株于 PDA 培养基上 25℃ 培养 2 d。采用刺伤接种法,在每个果实上刺伤 4 个点,在刺伤点上接种菌丝块,以接种无菌 PDA 培养基为对照,试验重复 3 次,用灭菌脱脂棉蘸取无菌水进行保湿,24 h 后移去脱脂棉,在常温 25℃ 下,观察发病情况。若接种果实发病则取发病部位再分离,完成柯赫氏法则验证。

1.5 病原菌鉴定

1.5.1 形态学鉴定

将病原菌接种于 PDA 培养基上,25℃ 全光照下培养 2~3 d,观察、记录菌株的菌落形状和颜色、病原菌孢子的形状,测量孢子大小,并拍照。

1.5.2 病原菌 DNA 的提取及分子生物学鉴定

将供试病原菌接种于 PDA 上,25℃ 全光照下培养 2~3 d,用无菌药匙刮取菌丝体置于 1.5 mL 无菌离心管中,按照 Fungal DNA Kit 真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(OMEGA BIO-TEK)说明,提取基因组

DNA。PCR 扩增试剂盒 2×*Es Taq* Master Mix、扩增引物购自生工生物工程股份有限公司。

分别采用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAAC-CTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGAT-ATGC-3')和 LROR(5'-ACCCGCTGAACTTAA-GC-3')/LR7(5'-TACTACCACCAAGATCT-3')对序列进行扩增。PCR 反应体系(50 μL):DNA 模板 2 μL,上下游引物各 2 μL(10 μmol/L),2×*Es Taq* Master Mix 25 μL,ddH₂O 19 μL。ITS 扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。LSU 扩增程序为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,51℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1.5 min,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。

用 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测。PCR 产物委托华大基因(深圳)股份有限公司纯化和测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST,并下载相关序列,用 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建系统发育树。

1.6 病原菌生物学特性

1.6.1 温度对病原菌菌丝生长的影响

将直径为 5.0 mm 的菌饼接种于 PDA 培养基平板中央,分别置于 15、20、25、28、30、32、35、37 和 40℃ 共 9 个不同温度的培养箱中黑暗培养。每处理重复 3 次。48 h 后用十字交叉法测量菌落直径。

1.6.2 pH 对病原菌菌丝生长的影响

PDA 培养基灭菌以后,无菌条件下用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 溶液调节 PDA 培养基的 pH,将直径为 5.0 mm 的菌饼分别置于 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 的 PDA 培养基平板上,于 32℃ 恒温培养箱中培养。每处理重复 3 次。48 h 后用十字交叉法测量菌落直径。

1.6.3 光照对病原菌菌丝生长的影响

将直径为 5.0 mm 的菌饼接种于 PDA 培养基平板中央,分别置于连续光照、L//D=12 h//12 h、连续黑暗的 32℃ 恒温培养箱中培养。每处理重复 3 次。48 h 后用十字交叉法测量菌落直径。

2 结果与分析

2.1 症状描述

病害主要危害花瓣、鳞片和果实。田间发病花瓣首先凋萎,初期产生水渍状淡褐色病斑,病斑迅速

扩展,造成整个花冠呈软腐状。病害继续从花瓣扩展到鳞片,引起鳞片的软腐,最终导致整个花冠和鳞片的软腐(图 1a~b)。幼果发病引起果肉变为暗褐色软腐状(图 1c)。果实成熟后病果上出现水渍状病斑,病斑迅速扩大,1~2 d 病斑扩大至全果实,果实呈软腐状。受危害的花瓣、鳞片和果实后期均产生大量的白色至灰褐色霉层和黑褐色的球形孢子囊(图 1d~f)。病害多发生在开花期,发病率为 15%。发病率与花剪除及时与否有关,花剪除及时,可降低

发病率。贮藏期发病多是由采摘造成的机械损伤或溃疡病造成的伤口侵染引起。

2.2 病原菌的致病性测定

对健康的红皮深红肉火龙果果实进行接种,以无菌的 PDA 为对照,5 d 后针刺伤接种的果实全部发病,接种产生的症状与田间发病的症状相同(图 1g~h),而对照果实不发病(图 1i)。对发病组织进行再分离,可得到与原分离株相同的病原菌,符合柯赫氏法则,证明接种菌为火龙果软腐病的致病菌。



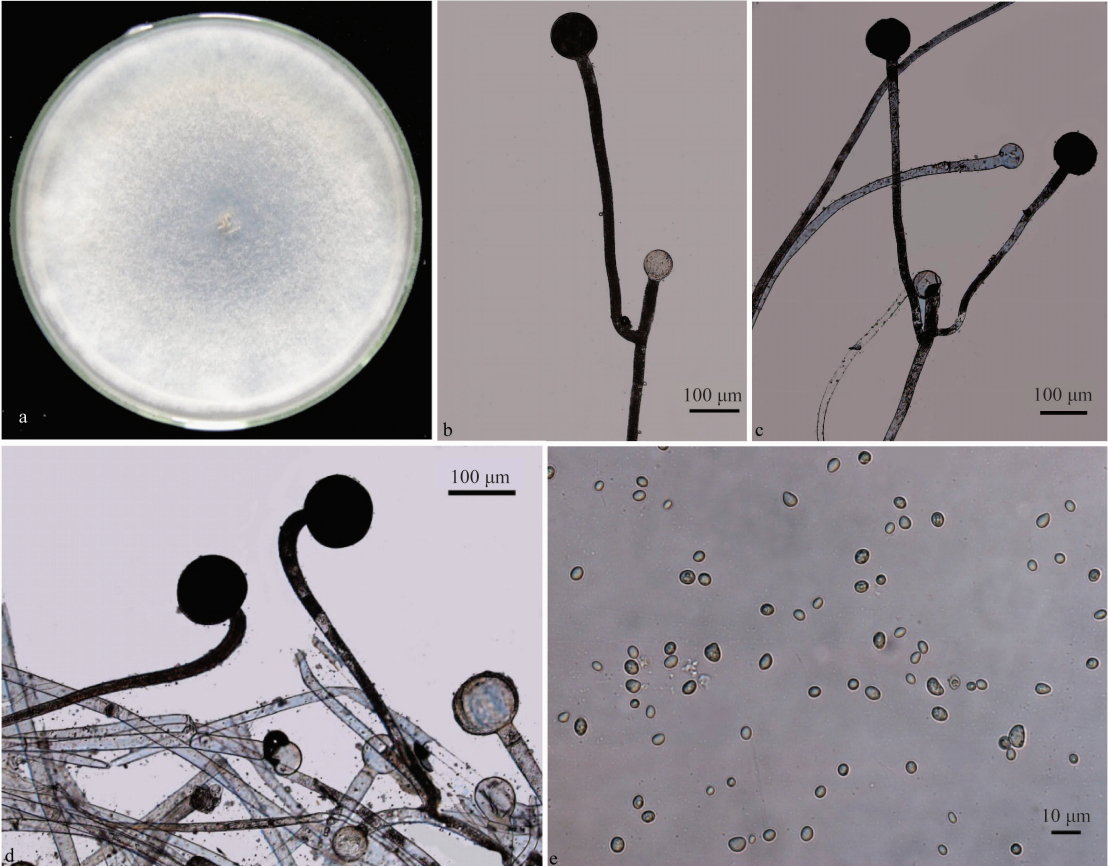
图 1 红皮深红肉火龙果软腐病症状

Fig. 1 Symptoms of soft rot on *Hylocereus costaricensis*

2.3 病原菌的培养性状及形态

在 PDA 上菌落圆形扩展,菌丝浓密(图 2a),气生菌丝发达,无隔膜。孢囊梗暗褐色至浅褐色;多数直立,少数弯曲;1~2 个分枝,多数为 1 个分枝。顶端产生 1 个孢子囊,球形,黑褐色,直径 90.00~133.81 μm ,平均 110.57 μm 。无假根和匍匐菌丝。囊轴球形,无色,直径为 47.30~73.04 μm ,平均

65.12 μm (图 2b~d)。孢囊孢子浅褐色至褐色,短椭圆形或球形,球形孢囊孢子直径 6.38~10.03 μm ,平均 8.21 μm ,短椭圆形孢囊孢子大小为(6.01~11.25) μm ×(5.28~9.42) μm ,平均 8.61 μm ×7.65 μm (图 2e)。根据病原菌的培养特性和形态特征,初步鉴定为接合菌门、接合菌纲、毛霉目、吉尔霉属、桃吉尔霉 *Gilbertella persicaria*。



a: PDA 上菌落形态(2 d); b~c: 分叉直立孢囊梗; d: 弯曲孢囊梗; e: 孢囊孢子
a: Colony on PDA (2 d); b~c: Branched, erect sporangiophores; d: Curved sporangiophores; e: Sporangiospores

图 2 火龙果软腐病菌的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the pathogen causing soft rot of *Hylocereus costaricensis*

2.4 火龙果软腐病病原系统发育分析

通过 ITS 和 LSU 2 对引物对菌株进行 PCR 扩增、测序,得到长度分别为 611 bp 和 1 075 bp 的序列(GenBank 登录号分别为:MH568797 和 MH578264)。将得到的序列在 GenBank 中进行比对,并对 2 个基因序列联合构建系统发育树,经 MEGA 6.0 软件进行系统发育分析,系统发育树的各个分支的支持强度通过 1 000 次重复的自展检验数值进行评估。结果发现,菌株 HLGRF 与 *Gilbertella persicaria* 聚为一个进化支(图 3),支持率为 100%。依据形态鉴定和系统发育分析,将火龙果软腐病病原菌鉴定为

桃吉尔霉 *G. persicaria*。

2.5 病原菌的生物学特性

2.5.1 温度对病原菌菌丝生长的影响

病原菌对温度的适应范围很广,在 15~37℃ 范围内均能生长。在 10~32℃ 范围内随温度的升高,菌落直径随之增大;在 32~40℃ 范围内,菌丝生长随温度升高呈下降趋势;菌丝生长的最适温度为 32℃,2 d 后菌落直径达 79.0 mm,极显著高于其他温度下的菌落直径。温度低于 10℃ 或高于 40℃,菌丝不能生长(图 4)。

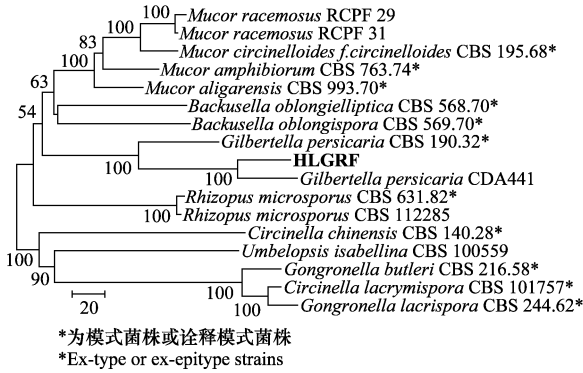
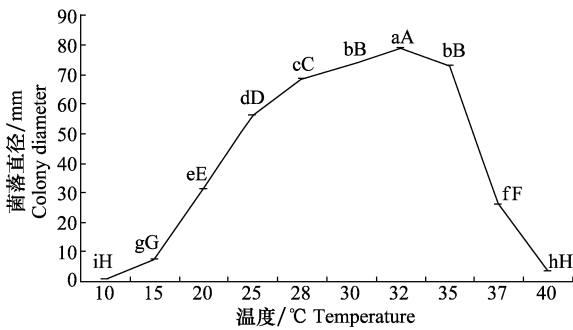


图 3 基于 ITS-LSU 序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the ITS and LSU sequences



图中不同大、小写字母分别表示在0.01和0.05水平下差异达显著水平。下同
Different capital and lowercase letters indicate significant difference at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same below

图 4 温度对桃吉尔霉菌丝生长的影响

Fig. 4 Effects of temperature on mycelial growth of *Gilbertella persicaria*

2.5.2 pH 对病原菌菌丝生长的影响

病原菌菌丝在 pH 3.0~11.0 均能生长。在 pH 为 3.0~5.0 时,菌丝生长速率逐渐增快,在 pH 5.0~6.0 时,菌丝边缘齐整,气生菌丝发达,菌落大小差异不显著,pH 为 5.0 时菌落最大,直径为 67.8 mm 最适 pH 为 5.0。在 pH 为 5.0~11.0 范围内,随着 pH 升高,菌丝生长速率逐渐下降(图 5)。

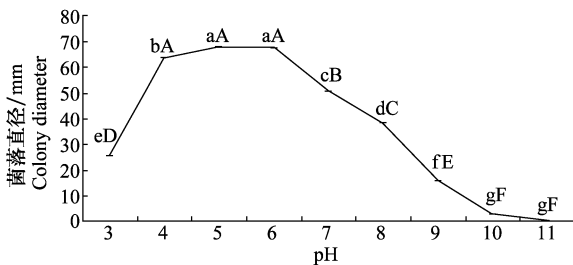


图 5 pH 对桃吉尔霉菌丝生长的影响

Fig. 5 Effects of pH on the mycelial growth of *Gilbertella persicaria*

2.5.3 光照对病原菌菌丝生长的影响

病原菌在不同光照条件下均可生长,在不同条件下,菌落直径存在显著差异,在连续光照条件下菌落扩展最快,直径为 79.5 mm,其次是光暗交替条件,连续光照条件最有利于菌丝生长(图 6)。

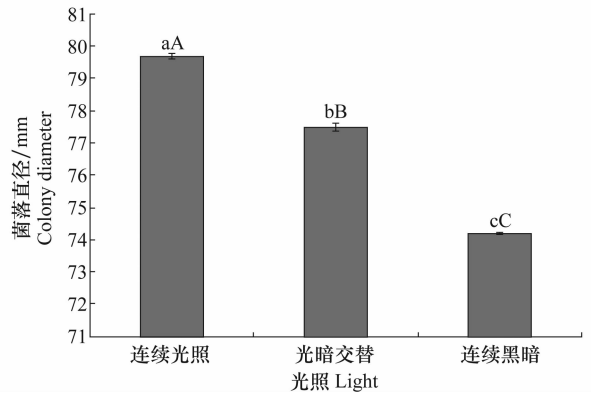


图 6 光照对桃吉尔霉菌丝生长的影响

Fig. 6 Effects of light on mycelial growth of *Gilbertella persicaria*

3 结论与讨论

通过病害田间症状观察、致病性测定、病原菌形态学及分子生物学鉴定,将引起海南红皮深红肉火龙果软腐病病原确定为桃吉尔霉 *G. persicaria*。火龙果的腐烂病害大部分由镰孢属引起^[26],对桃吉尔霉引起的腐烂病害报道较少,有云南郭力维等^[11]报道的火龙果果腐病,广西林珊宇等^[27]报道的火龙果软腐病,而目前海南对桃吉尔霉属引起的软腐病并未见报道。该病菌在国外报道还可侵染海南蒲桃^[28]、桃^[29]、茄子^[30]、番木瓜^[31]和番茄^[32]等,甚至可侵染虾^[33]。

本研究由桃吉尔霉引起的红皮深红肉火龙果软腐病与已经报道的匍枝根霉 *Rhizopus stolonifer* 引起的软腐病^[34]在症状上难以区别,但是病原菌形态明显不同于匍枝根霉,匍枝根霉能产生假根和匍匐菌丝,孢囊梗不分枝和不弯曲,而桃吉尔霉不能产生假根和匍匐菌丝,孢囊梗多数 1~2 个分枝,个别孢囊梗顶端弯曲。

本文较为系统地研究了温度、pH 和光照对病原菌生长的影响,结果表明,该病原菌最适生长温度为 32℃,而据郭力维等^[11]报道,该菌的最适温度为 30℃,本研究材料来自田间发病果实,郭力维等的材料来自市场上的火龙果,并且郭力维等没有设置 32℃ 的温度;连续光照更有利于菌丝生长;最适 pH

为 5.0~6.0。桃吉尔霉为一种弱寄生菌,病原菌只能通过伤口侵入,因此,在采收、贮运过程中应减少机械损伤;根据生物学特性,该菌在 10℃ 下不生长,贮存温度应低于 10℃。同时,该病原菌常在土壤中有有机质或果园周围腐败植物病残体上或火龙果腐败的花瓣上存活,因此,该病害的防治措施主要是搞好田间卫生工作,及时清理植物病残体,同时,在火龙果开花后 3~4 d 应及时剪除腐败的花瓣,以减少病原菌的侵染来源。本研究明确了桃吉尔霉菌丝生长最适条件,为掌握病害发生发展规律,从而防治红皮深红肉火龙果软腐病奠定了基础。

参考文献

- [1] 黎舒. 火龙果不同品系种植物学形态和生物学特性研究[D]. 南宁:广西大学,2014.
- [2] 李升锋,刘学铭,舒娜,等. 火龙果的开发与利用[J]. 食品工业科技,2003,24(7):88-90.
- [3] 林武镇,廖富荣,陈细红,等. 火龙果细菌性软腐病菌的分离与鉴定[J]. 植物病理学报,2015,45(2):220-224.
- [4] 崔志婧,王奕文,于岳,等. 上海市进口火龙果软腐病害分析[J]. 微生物学通报,2011,38(10):1499-1506.
- [5] 袁诚林,张伟锋,袁红旭,等. 粤西地区火龙果病虫害调查初报及防治措施[J]. 中国南方果树,2004,33(2):49-50.
- [6] ZHANG Rongyi, ZHAO Xueshi, TAN Qiongzhi, et al. First report of bacterial stem rot disease caused by *Paenibacillus polymyxa* on *Hylocereus undulatus* in China [J]. Plant Disease, 2017, 101(6): 1031.
- [7] 梁秋玲,韦健,李孝云,等. 火龙果茎腐病病原鉴定及室内药剂毒力测定[J]. 中国南方果树,2011,40(1):9-12.
- [8] 郑伟,蔡永强,戴良英. 火龙果病虫害的研究进展[J]. 贵州农业科学,2007,35(6):139-142.
- [9] 李敏,胡美姣,高兆银,等. 海南火龙果采后病害调查及防治技术研究[J]. 中国热带农业,2012,49(6):42-44.
- [10] MA Tengfei, YANG Bo, YU Yue, et al. Market disease pathogens detection of imported fruits in Shanghai [J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(9): 1087-1096.
- [11] 郭力维,吴毅毅,何汉兴,等. 云南省火龙果采后果腐病研究(英文)[J]. 果树学报,2014,31(1):111-114.
- [12] GUO L W, WU Y X, MAO Z C, et al. Storage rot of dragon fruit caused by *Gilbertella persicaria* [J]. Plant Disease, 2012, 96(12): 1826.
- [13] 朱迎迎,高兆银,李敏,等. 火龙果镰刀菌果腐病病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 热带作物学报,2016,37(1):164-171.
- [14] 张荣,刘爱媛,白成艳,等. 火龙果溃疡病的症状观察和病原菌鉴定[J]. 果树学报,2013,40(5):854-856.
- [15] LAN G B, HE Z F, XI P G, et al. First report of brown spot disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, Chinese mainland [J]. Plant Disease, 2012, 96(11): 1702-1703.
- [16] 朱迎迎,李敏,高兆银,等. 火龙果炭疽病病原菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 南方农业学报,2016,47(1):59-66.
- [17] 李敏,胡美姣,薛丁榕,等. 火龙果黑斑病菌 [*Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn] 生物学特性研究[J]. 热带作物学报,2013,34(9):1770-1775.
- [18] 郑伟,蔡永强,王彬,等. 不同杀菌剂对火龙果茎枯病菌的室内毒力测定[J]. 贵州农业科学,2009(8):98-100.
- [19] LIOU M R, HUNG C L, LIOU R F. First report of *Cactus virus X* on *Hylocereus undatus* (Cactaceae) in Taiwan [J]. Plant Disease, 2007, 85(2): 229.
- [20] BOTÍN A J V, ISLAS J S S, SORIANO E C, et al. A new stem spot disease of pitahaya [*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose] caused by *Fusicoccum*-like anamorph of *Botryosphaeria dothidea* (Moug. : Fr.) Ces. and De Not. in Mexico [J]. Revista Mexicana de Fitopatología, 2004, 22(1):140-142.
- [21] 李敏,胡美姣,高兆银,等. 一种火龙果腐烂病病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 热带作物学报,2012,33(11):2044-2048.
- [22] 刘月廉,周娟,赵志慧,等. 广东省火龙果腐烂病病原鉴定[J]. 华中农业大学学报,2011,30(5):585-588.
- [23] 卢琨. 火龙果采后的保鲜贮运技术[J]. 世界热带农业信息,2006(7):24-25.
- [24] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:122-124.
- [25] 谢昌平,李博勋,文衍堂,等. 龙血树根腐病病原菌的鉴定[J]. 植物保护,2015,41(1):129-132.
- [26] 崔志婧,王奕文,于岳,等. 上海市进口火龙果软腐病害分析[J]. 微生物学通报,2011,38(10):1499-1506.
- [27] 林珊宇,贤小勇,韦小妹,等. 广西火龙果采后病害主要病原菌分离与鉴定[J]. 中国南方果树,2018,47(2):6-12.
- [28] PINHO D B, PEREIRA O L, SOARES D J. First report of *Gilbertella persicaria* as the cause of soft rot of fruit of *Syzygium cumini* [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2014, 9(1):143.
- [29] MEHROTRA M D. Fruit rot of peach by *Gilbertella persicaria* var. *indica* from India [J]. Mycopathologia et Mycologia Applicata, 1966, 29(1/2): 151-154.
- [30] VIEIRA J C B, CAMARA M P S, BEZERRA J D P, et al. First report of *Gilbertella persicaria* causing soft rot in eggplant fruit in Brazil [J]. Plant Disease, 2018, 102(6): 1172.
- [31] CRUZLACHICA I, MARQUEZZEQUERA I, GARCIAESTRADA R S, et al. First report of *Gilbertella persicaria* causing papaya fruit rot [J]. Plant Disease, 2016, 100(1): 227.
- [32] MEHROTRA M D. Fruit rot of tomato caused by *Gilbertella persicaria* var. *indica* [J]. Mycopathologia et Mycologia Applicata, 1963, 17: 17-19.
- [33] KARTHIKEYAN V, GOPALAKRISHNAN A. A novel report of phytopathogenic fungi *Gilbertella persicaria*, infection on *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 2014, 430: 224-229.
- [34] 胡美姣,李敏,高兆银,等. 热带亚热带水果采后病害及防治[M]. 北京:中国农业出版社,2010:182.