

# 广东省火龙果腐烂病病原鉴定

刘月廉<sup>1,2</sup> 周娟<sup>1</sup> 赵志慧<sup>1</sup> 习平根<sup>1</sup> 姜子德<sup>1</sup>

1. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642; 2. 广东海洋大学农学院, 湛江 524088

**摘要** 通过对来自广东省湛江市的发病火龙果果实的病原进行分离、致病性测定及形态学观察, 将引起广东省火龙果腐烂病的病原鉴定为仙人掌平脐蠕孢 *Bipolaris cactivora*, 该种真菌为中国大陆新记录种。该病原菌的鉴定, 对控制中国大陆火龙果腐烂病的发生和扩散有重要的理论指导意义。

**关键词** 火龙果; 腐烂病; 病原鉴定; 仙人掌平脐蠕孢; 形态学观察

**中图分类号** S 432. 63. 1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0585-04

火龙果 (*Hylocereus undatus*) 是深受人们喜爱的热带水果之一, 20 世纪 90 年代初由我国台湾省引进试种, 90 年代中后期陆续在广东、广西、贵州、福建等省区种植<sup>[1-3]</sup>。近年来, 随着火龙果在我国的种植面积不断扩大, 其病害问题日益突出, 一些对生产造成严重威胁的病害相继发生, 如炭疽病 (*Colletotrichum* sp.)、枯萎病 (*Fusarium oxysporium*)、黑斑病 (*Alternaria* sp.) 和枯斑病 (*Nectriella*) 等<sup>[1,4-5]</sup>。2009 年 5 月, 在广东省湛江市的一个火龙果贮藏库调查发现, 10 d 内有近 20% 的火龙果果实出现腐烂, 随着贮藏期的延长, 病情逐渐加重, 且该病主要为(危)害存放在常温贮藏库的火龙果果实。该病发生初期在果皮表面出现褪色斑点, 扩大后病斑呈圆形或近圆形、褐色, 中央凹陷且长出暗灰色的霉状物, 后期病斑扩展迅速, 直至整个果实呈湿状腐烂, 并流出黄褐色液体。前期研究<sup>[3-5]</sup>证实, 广东省火龙果腐烂病的症状及霉状物的显微形态均不同于我国大陆其他省份在火龙果上的研究报告, 而与日本和我国台湾等地报道的腐烂病症状描述及病原菌形态相似<sup>[6-7]</sup>。

鉴于该病的危害性, 笔者对广东省火龙果腐烂病的病原种类进行了鉴定, 为制定科学有效的病害防治措施提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病原菌分离和纯化

分别于 2009 年 5 月 18 日、6 月 5 日和 6 月 20

日从广东省湛江市火龙果栽培基地果实贮藏库采回病果, 从病征明显的病部挑取分生孢子, 用无菌水配制孢子悬浮液, 稀释后涂于 PDA 平板上培养, 纯化后获得单孢菌株<sup>[8]</sup>。

### 1.2 致病性测定

参考 Satoshi 等<sup>[7]</sup>的方法对健康果实和茎秆进行接种, 首先用 75% 的乙醇对健康成熟的火龙果茎秆和果实进行表面消毒, 然后在果皮或茎秆表皮注射接种 100  $\mu$ L 浓度为  $1 \times 10^6$  /mL 的孢子悬浮液, 对照果实和茎秆注射等量无菌水, 重复 3 次, 每次重复火龙果果实 3 个、茎秆 3 段, 于 28~35  $^{\circ}$ C 下保湿培养。第 3~5 天观察发病情况, 并对发病组织进行再分离。

### 1.3 病原菌鉴定

1) 形态学观察。将供试菌株接于 PDA 平板上, 28  $^{\circ}$ C 恒温培养 5~7 d, 观察菌落特征、产孢结构和分生孢子等形态; 同时将孢子悬浮液滴于载玻片上, 28  $^{\circ}$ C 下保湿培养 12 h, 显微镜下观察其孢子萌发方式。依据文献<sup>[6-7,9]</sup>鉴定其病原菌的种类。

2) 病原菌的 rDNA-ITS 序列分析。供试菌株基因组 DNA 提取参考吕锐玲等<sup>[10]</sup>的方法。用于 ITS 序列扩增的引物为通用引物 ITS1 (5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3')<sup>[11]</sup>, PCR 反应体系 (25  $\mu$ L) 包括: 10  $\times$  PCR Buffer (含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L、dNTP (2.5 mmol/L) 1  $\mu$ L、模板 DNA (约 30 ng)

收稿日期: 2010-08-22

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目 (E05202480)

刘月廉, 博士研究生, 副教授。研究方向: 植物病原真菌。E-mail: mushwoman@126.com

通讯作者: 姜子德, 教授。研究方向: 植物病原真菌。E-mail: zdjiang@scau.edu.cn

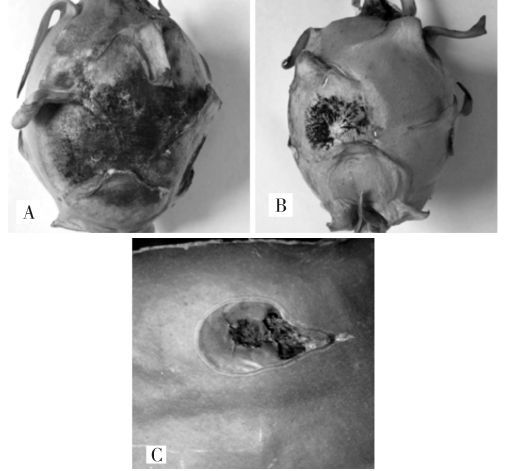
1  $\mu\text{L}$ 、引物 ITS1(5  $\mu\text{mol/L}$ )和 ITS4(5  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min,94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物经纯化、回收后,送华大生物工程技术有限公司进行测序。将获得的序列在 NCBI 上进行 Blast 比对,并选取同源性较高和形态相近菌株序列用 MEGA V4.0 中的邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,并用 bootstrap 对系统发育树进行检验,1 000 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离及致病性测定

对 3 次采集的病果进行分离,分离结果一致,菌落暗褐色,仅个别菌株菌落后期掺杂有白色菌丝。选其中 2 个菌落颜色一致的代表性菌株 DBH-1 和 DBH-4 对火龙果果实和茎进行接种,发病率均为 100%。在果实上,接种 2 d,接种处开始褪色,形成褐色小病斑,3 d 病斑上出现淡色菌丝,4 d 开始形成暗灰色霉层,5 d 后病斑扩大成圆形、近圆形,与自然发病症状一致(图 1-A,B)。在茎上,接种 3 d 于接种处开始褪色,5 d 可形成明显褐色的病斑(图 1-C),

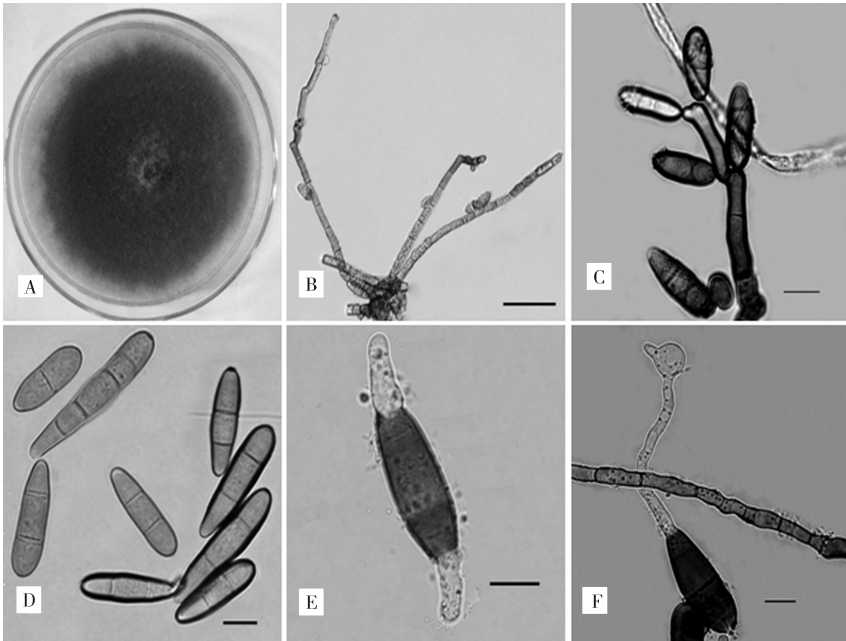
切开茎部可见其茎肉组织也变褐。从果和茎病斑上均可再分离得到与原接种菌株菌落及形态特征相同的菌株;对照果实和茎均未发病,且未分离到病原菌,表明菌株 DBH-1 和 DBH-4 均为火龙果腐烂病的致病菌。



A:自然发病病果 Naturally diseased fruit; B:DBH-4 接种 5 d 的发病果实 Rot fruit after inoculation with DBH-4 for five days; C:DBH-4 接种 5 d 的发病茎组织 Rot stem after inoculation with DBH-4 for five days.

图 1 火龙果腐烂病症状

Fig.1 Symptoms of *H. undatus* fruit and stem



A:在 PDA 上生长 5 d 的菌落形态 Colony of five days; B:分生孢子梗 Conidiophores; C:分生孢子着生于屈膝状分生孢子梗上 Conidial growing from nodulose conidiophore; D:分生孢子 Conidial; E:两端萌发的分生孢子 Conidial germination in both ends; F:分生孢子萌发产生附着胞(标尺=10  $\mu\text{m}$ ) Conidial germination with appressorium (bar = 10  $\mu\text{m}$ ).

图 2 火龙果腐烂病菌的形态特征

Fig.2 Morphology of *B. cactivora* strain DBH-1 and DBH-4

### 2.2 病原菌的形态学鉴定

菌株 DBH-1 和 DBH-4 形态表现一致, PDA 上 28 °C 培养 5 d, 菌落直径达 50~70 mm; 菌落平展, 绒毛状, 菌丝繁茂, 产孢量大, 暗褐色, 边缘灰白色, 表面气生菌丝浅灰色; 分生孢子梗簇生或丛生, 少数单生, 近顶部常见分枝, 弯曲, 屈膝状, 表面平滑, 褐色, 顶部色浅, 产孢痕明显, 大小 (15.5~70.4)  $\mu\text{m} \times (3.5 \sim 5.5) \mu\text{m}$ ; 分生孢子褐色至暗褐色, 倒

棍棒状或椭圆形, 直, 少数稍弯曲, 基部较宽, 向顶部逐渐变细, 细胞颜色一致, 表面光滑, 1~4 个假隔膜, 脐部较明显, 大小 (13.5~43.2)  $\mu\text{m} \times (4.5 \sim 7.2) \mu\text{m}$ , 两端萌发且产生附着胞(图 2)。

参照王智立等<sup>[6]</sup>和 Satoshid 等<sup>[7]</sup>的描述特征并进行比较(表 1), 将广东省湛江市发现的火龙果腐烂病原鉴定为 *Bipolaris activora*。

表 1 菌株 DBH-1 和 DBH-4 与已报道菌株的形态特征比较

Table 1 Comparison of the morphological characters of strains DBH-1 and DBH-4 in this study with other three reported strains

菌株 Strains	分生孢子 Conidia			菌核 Microsclerotia	种类 Species	来源 Source
	横隔数 Septa	形状 Shape	大小/ $\mu\text{m}$ Size			
DBH-1	2~4	倒棍棒状, 椭圆形	(13.5~43.2) $\times$	未观察到 Not observed	<i>B. activora</i>	本研究 This study
DBH-4		Obclavate, ellipsoidal	(4.5~7.2)			
PBW-1	2~4	椭圆形, 纺锤形, 棍棒状	(35.3~45.5) $\times$	球形至亚球形 Subglobose to globose 98~165 $\mu\text{m}$	<i>B. activora</i>	[7]
		Ellipsoidal, fusiform, clavate	(8.5~10.9)			
DC-06	2~4	纺锤形, 倒棍棒状	(15~64) $\times$	未描述 Not described	<i>B. activora</i>	[6]
DC-07		Fusiform, obclavate	(6~14)			

### 2.3 病原菌 rDNA ITS 序列分析

菌株 DBH-1 和 DBH-4 的 ITS 序列均为 596 bp, 碱基排列也没有差异。将 DBH-4 序列提交到 NCBI GenBank, 得到序列号为 GU390882。将 2 个菌株的 ITS 序列在 NCBI 上进行 Blast 比对, 结果表明与 *B. portulacae* (AY004779) 的同源性最高, 可达到 95%; 其次为 *B. indica* (AF081449), 同源性为 94%, 但数据库中未能搜索到有关 *B. activora* 的序列。进一步采用 MEGA V4.0 软件的邻近相邻法, 以 *B. sorokiniana* 为外群, 选择形态及 ITS 序列相近的 9 个种与之构建系统发育树。在采用 NJ 法构建的 ITS(596 bp) 系统发育树上, 本研究的菌株形成 1 个单系群(自举值为 100%), 虽与 *B. indica*、*B. portulacae* 形成姐妹群(自举值为 100%)(图 3),

但与该 2 菌 ITS 序列碱基差异较大, 分别为 13 和 16 个, 均达到种间区分水平。

## 3 讨论

本研究通过病原分离、致病性测定以及形态学鉴定等方法, 将广东省湛江市发生的火龙果腐烂病原鉴定为仙人掌平脐蠕孢 *B. activora*, 并首次向 GenBank 提交 *B. activora* 菌株的 ITS 序列, 为今后平脐蠕孢属真菌的分类鉴定提供了重要的参考数据。*B. activora* 早在 1931 年由 Petrak 从发病仙人掌中分离并命名, 称其为仙人掌长蠕孢 *Helminthosporium activorum* Petrak<sup>[12]</sup>, 1971 年 Ellis 将其组合到德氏霉属 (*Drechslera*) 中<sup>[13]</sup>。1983 年 Alcorn 认为本种菌分生孢子脐部平截、略突出, 芽管从分生孢子两端萌发, 符合平脐蠕孢属 *Bipolaris* 特征, 故将本种菌重新组合为 *B. activora* (Petrak) Alcorn<sup>[14]</sup>, 该观点得到了后来研究者的认同<sup>[6-7]</sup>。目前世界上已报道的 *Bipolaris* 合格种约 73 个<sup>[15]</sup>, 其中中国大陆记载了 33 种<sup>[16]</sup>。在形态学上, 本菌与 *B. australiensis* 最为相似, 但后者的孢子为圆柱形或椭圆形, 较为粗短, 大小为 (21.5~28.5)  $\mu\text{m} \times (7.2 \sim 11.5) \mu\text{m}$ <sup>[17]</sup>; 在 GenBank 已有的 ITS 序列上, 本种菌与 *B. portulacae* 和 *B. indica* 同源性最高, 但形态差异较大, 其中 *B. portulacae* 孢子假隔膜数在 5 个以上, 而 *B. indica* 分生孢子宽度则大于 11  $\mu\text{m}$ <sup>[18-19]</sup>。除 *B. activora* 外, 迄今还未见有其他

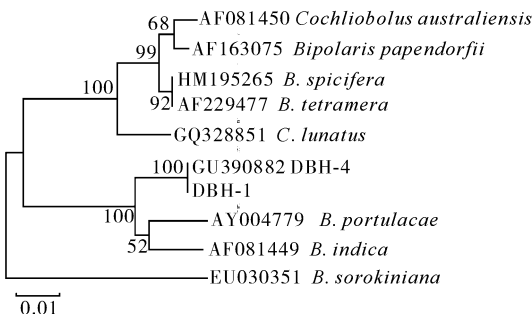


图 3 NJ 法构建 ITS 序列同源菌株及形态相近菌株的分子系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS sequences of homogenous strains and morphologically similar strains by the neighbor-joining method

平脐蠕孢属真菌侵染仙人掌科植物的报道。

2009 年调查结果表明,在夏季数天内该病可使贮藏库火龙果果实腐烂率达到 20%。另有报道,在高温高湿条件下,其病原菌在 2~4 d 内能侵染整棵仙人掌使之腐烂<sup>[9]</sup>;在火龙果上,该病原菌不仅可致幼果和成熟果发病,还可导致火龙果的幼苗<sup>[7]</sup>和成熟茎发病(本研究数据),随菌量的不断积累,该病大发生和流行的可能性较大。火龙果果实腐烂病在我国大陆虽属首次发现,但对农业生产具有潜在的危险性,因此,植物检疫部门应予以高度重视,以防范该病的发生和蔓延。

### 参 考 文 献

- [1] 袁诚林,张伟锋,袁红旭. 粤西地区火龙果病害调查初报及防治措施[J]. 中国南方果树, 2004, 33(2): 49-50.
- [2] 郑良永,钟宁. 雷州半岛火龙果高效栽培技术[J]. 广东农业科学, 2006(3): 76-78.
- [3] 蔡永强,向青云,陈家龙,等. 火龙果的营养成分分析[J]. 经济林研究, 2008, 26(4): 53-56.
- [4] 王德凤,韦茜,杨汝,等. 贵州罗甸火龙果病害的初步鉴定[J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(3): 267-270.
- [5] 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.
- [6] 王智立,林正忠. 火龙果果腐及仙人掌茎腐病[J]. 植物病理学会刊, 2005, 14(4): 269-274.
- [7] SATOSHI T, NAO M, KANAMI N. Fruit rot of strawberry pear (pitaya) caused by *Bipolaris cactivora* [J]. J Gen Plant Pathol, 2007, 73: 374-376.
- [8] 方中达. 植病研究法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 184-189.
- [9] DUTBIN R D, DAVIS L H, BAKER K F. A *Helminthosporium* stem rot of Cacti [J]. Phytopathology, 1955, 45: 509-512.
- [10] 吕锐玲,谢甲涛,付艳萍,等. 草莓褐斑病的病原鉴定及其生物学特性观察[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(4): 427-430.
- [11] WHITE T, BRUNS S, LEE J, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. San Diego, USA: Academic Press, 1990: 315-322.
- [12] PETRAK F. Beitrage zur kenntnis einiger pilzkrankheiten der kaktee[J]. Gartenbauwissenschaft, 1931, 5: 226-249.
- [13] ELLIS M B. Dematiaceous hyphomycetes[M]. Kew, England: Commonw Mycol Inst, 1971: 413.
- [14] ALCORN J L. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum* [J]. Mycotaxon, 1983, 17: 1-86.
- [15] KIRK P M, CANNON P F, MINTER D W, et al. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi [M]. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008: 92.
- [16] 张天宇,孙广宇. 中国真菌志, 第 30 卷: 蠕形分生孢子真菌 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 33-109.
- [17] TSUDA M, UEYAMA A. *Pseudocochliobolus australiensis*, the ascigerous state of *Bipolaris australiensis* [J]. Mycologia, 1981, 73: 88-96.
- [18] RAI J N, WADHWANI K, TEQARI J P. *Bipolaris indica* spec. nov. [J]. Sydowia, 1969, 23(6): 8-10.
- [19] ALCORN J L. Combinations and synonymy in *Bipolaris* and *Curvularia*, and a new species of *Exserohilum* [J]. Mycotaxon, 1991, 41(2): 329-343.

## Identification of pathogen causing fruit rot of *Hylocereus undatus* in Guangdong Province

LIU Yue-lian<sup>1,2</sup> ZHOU Juan<sup>1</sup> ZHAO Zhi-hui<sup>1</sup> XI Ping-gen<sup>1</sup> JIANG Zi-de<sup>1</sup>

1. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;  
2. Agricultural College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

**Abstract** In the summer of 2009, fruit rot of *Hylocereus undatus* occurred heavily in storehouses in Zhanjiang district of Guangdong Province. The pathogen causing the disease was identified as *Bipolaris cactivora* based on systematic analysis including isolation, pathogenicity test and morphological observation. To our best knowledge, it is the first report of *B. cactivora* infecting *H. undatus* in China mainland.

**Key words** *Hylocereus undatus*; fruit rot; pathogen identification; *Bipolaris cactivora*; morphological observation

(责任编辑:陆文昌)