

桃软腐病的病原菌鉴定与高效防治药剂筛选

蒋政华¹, 王泽新^{2a}, 张慧颖¹, 范乐敏¹, 曾文芳^{3*}, 刘普^{1*}

(¹安徽农业大学园艺学院·安徽省园艺作物育种工程实验室, 合肥 230036; ²华中农业大学园艺林学学院·园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070; ³中国农业科学院郑州果树研究所·国家桃、葡萄改良中心, 郑州 450009)

摘要:【目的】为明确早熟桃软腐病的病原菌种类, 并评价其不同桃品种中的致病力差异; 筛选评价不同药剂对致病菌的毒力和活体接种防效。【方法】根据科赫式法则对病原菌进行分离、鉴定及致病性测定, 采用室内离体接种法测定 5 个桃品种的果实对该病原菌的抗性。采用菌丝生长速率法和孢子萌发法测定 15 种药剂对桃软腐病病菌的毒力, 通过贮藏试验验证药剂对桃软腐病的防效。【结果】分离获得了 27 株形态特征相同的菌株。结合 rDNA-ITS 和 rDNA-LSU 克隆与系统进化树分析明确病原菌为 *Gilbertella persicaria*。室内离体接种 48 h 后, 测量显示中油 19 号和中桃红玉的病斑直径最小。微孔板毒力测定结果表明, 在供试的 15 种药剂中, 吡唑醚菌酯抑制效果最明显, EC_{50} 为 $0.168 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采收贮藏试验结果显示苯醚甲环唑处理抑菌效果最好。【结论】引起桃软腐病的致病菌为 *Gilbertella persicaria*, 且中油 19 号和中桃红玉较抗病。吡唑醚菌酯和苯醚甲环唑对该菌有很好的防效, 在桃软腐病田间防治中具有较大的应用潜力。

关键词: 桃软腐病; *Gilbertella persicaria*; 病原鉴定; 抗病性差异; 微孔板法; 药剂筛选

中图分类号: S662.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)07-1136-11

Identification of the pathogen causing soft rot of peach and screening of highly effective fungicides

JIANG Zhenghua¹, WANG Zexin^{2a}, ZHANG Huiying¹, FAN Lemin¹, ZENG Wenfang^{3*}, LIU Pu^{1*}

(¹College of Horticulture, Anhui Agriculture University/Anhui Horticultural Crop Breeding Engineering Laboratory, Hefei 230036, Anhui, China; ²College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Wuhan 430070, Hubei, China; ³Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Peach & Grape Improvement Center, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: 【Objective】Peaches (*Prunus persica* L.) are known for their palatable flavor and abundant nutrients. However, peaches are perishable and soft rot of peach is a key deterioration factor in the post-harvest storage process. Previous studies showed the species of the genus *Monilinia*, *Penicillium* and *Rhizopus* were the major pathogens causing soft rots and decays in peach. This study aimed to identify the pathogen causing soft rot of peach in Henan province based on molecular and morphological identification, as well as the pathogenicity test. To this end, we performed the screening of highly effective fungicides by inhibitory activity test *in vitro* and relative control efficacy trials on detached peaches. Our work will provide scientific basis for the reasonable prevention and control of soft rot of peach. 【Methods】The soft rot peach fruits collected from Yuanyang county of Henan province were used as samples. After isolation and purification, the isolates were identified by using the methods of morphological characteristic analysis. Morphological parameters, including colony, mycelia, sporangia and conidiophores, were observed under a microscope. The genomic DNA of pathogenic fungi was extracted

收稿日期: 2020-11-05 接受日期: 2021-03-24

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD1000200); 中国农业科学院科技创新工程专项经费(CAAS-ASTIP-2020-ZFRI); 国家级大学生创新创业(202010364084S)

作者简介: 蒋政华, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为果树病害防治。Tel: 15556915162, E-mail: Zionhua_jiang@163.com; a 为共同第一作者。

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0551-65786607, E-mail: puliu@ahau.edu.cn; Tel: 0371-55001909, E-mail: zengwenfang@caas.cn

and identified based on molecular biology (rDNA-ITS and rDNA-LSU). The pathogens were inoculated on peaches, and their pathogenicity was determined and compared among 5 different peach cultivars. The virulence of 15 fungicides was tested by mycelium growth rate method. 【Results】Twenty-seven strains with the similar morphology were isolated in total, producing white mycelia and growing rapidly on PDA. Sporangia were initially white but became brown and then black on 2-day cultures. Sporangio-phores were hyaline to light brown, unbranched and aseptate. The ITS sequence (Accession No. MK301176.1) and the LSU sequence (Accession No. MH858452.1) showed 99% and 98% homology with *Gilbertella persicaria*, respectively. Phylogenetic tree analysis confirmed that the isolates belonged to *G. persicaria* and can be grouped into the same clade as other taxa of Choanephoraceae. Soft lesions were observed at 1 day post-inoculation (dpi), and then the whole fruit was rotted and covered with white mycelia and black sporangia at 2 dpi. Finally, fruits were often juice leaked. Non-wounded-inoculated fruit and wounded control fruit did not show the disease. Re-isolation was performed from symptomatic peaches, and their identities were confirmed using the above-mentioned methods. We also evaluated the genetic variability of resistance to this disease by artificial inoculation. The test of the cultivars studied exhibited a range of susceptibility to *G. persicaria*, the disease indexes of peach cultivars CP10-7 and CN19 were significantly lower than those of CN18, CN13 and CP9 at 2 dpi. In the toxicity test of fungicides, 250 g · L⁻¹ pyraclostrobin EC had the most obvious inhibitory effect, in which the EC₅₀ was 0.618 mg · L⁻¹. The followed fungicides were 60% pyraclostrobin · metiram WG, 10% difenoconazole WG, 95% natamycin TC, 96% lauroyl arginine ethyl hydrochloride TC and 450 g · L⁻¹ prochloraz EW with the EC₅₀ as 4.203 mg · L⁻¹, 9.920 mg · L⁻¹, 12.297 mg · L⁻¹, 13.846 mg · L⁻¹ and 39.978 mg · L⁻¹, respectively. 500 g · L⁻¹ iprodione SC, 400 g · L⁻¹ pyrimethanil SC, 20% imazalil EW and 50% dimethomorph WP showed poor inhibitory effect with EC₅₀ of 133.982 mg · L⁻¹, 140.509 mg · L⁻¹, 266.796 mg · L⁻¹ and 816.936 mg · L⁻¹, respectively. Metalaxyl · hymexazol, 1-MCP, 7-hydroxycoumarin, thiophanate-methyl and streptococcus lactis showed no effect on *G. persicaria*. 【Conclusion】The major pathogenic fungus of soft rot of peach in Henan province was identified as *Gilbertella persicaria*. The peach cultivars CN19 and CP10-7 showed lower susceptibility to *G. persicaria* than CN18, CN13 and CP9. Pyraclostrobin · metiram and pyraclostrobin showed excellent inhibitory activity against *G. persicaria*, making these fungicides become potential candidates for the control of soft rot disease of peach in the field.

Key words: Soft rot disease of peach; *Gilbertella persicaria*; Pathogen identification; Disease resistance difference; Microtiter method; Fungicide screening

桃(*Prunus persica* L.)属蔷薇科(Rosaceae)李属(*Prunus* L.),我国栽培历史悠久,因其具有结果早、效益高、管理容易等特点,栽培面积不断扩大。自1993年我国栽培面积和产量超过意大利和美国成为世界第一产桃大国以来,一直保持至今^[1-2]。桃富含膳食纤维,能促进肠道蠕动,维持胃肠的正常结构与功能,有效预防大肠癌^[3]。但桃属于典型的呼吸跃变型果实,采后代谢十分旺盛,易软化和腐烂,货架期较短,果实采后运输和贮藏十分困难。其中,桃采后果实腐烂是最为突出的问题。桃果实采后病害的主要致病微生物为真菌,一般通过伤口侵入果实,主要的致病真菌为果生链核盘菌(*Monilin-*

ia spp.)^[4]、青霉(*Penicillium* spp.)^[5]、灰霉葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)^[6]和根霉(*Rhizopus* spp.)^[7]等。笔者在本研究中从新鲜的桃上分离出能够迅速引起桃软腐病的病原真菌 *Gilbertella persicaria*,并分析不同桃品种对此病原菌的抗病性差异,以及有针对性地进行防治药剂筛选,对 *G. persicaria* 引起的桃软腐病防控具有重要意义。

目前,桃软腐病原菌根霉(*R. spp.*)研究报道较多,但由 *G. persicaria* 引起的桃软腐病国内仅有一篇报道。*G. persicaria* 能够在桃、杏、苹果、梨、西红柿、木瓜和茄子等多种果蔬上引起腐烂病害^[8-11]。另外, *G. persicaria* 是火龙果果腐病^[12]、软腐病^[13]和腐

烂病^[4]的致病病原。最近从人体粪便中分离到的 *G. persicaria* 证据表明,该病原菌可能在人体肠道环境中生存并繁殖^[5]。目前, *G. persicaria* 药剂筛选相关报道较少,仅 Ginting 等^[6]于 1996 年报道,氯硝铵和异菌脲在室内药剂毒力测定中有不错的效果。对于采后贮藏试验,刘莎莎等^[6]报道 O₂/CO₂ 主动自发气调对于控制 *G. persicaria* 致病性有良好的效果。传统病原鉴定主要采用形态学辅以分子生物学来完成^[7],但 *G. persicaria* 在形态上很容易与 *Mucor* spp. 和 *Rhizopus* spp. 相混淆, Cruz-Lachica 等^[8]报道了一种通过光学显微镜快速鉴定 *G. persicaria* 的方法,通过利用孢囊附属物这些微结构的折射入射光能力,来观察识别鉴定 *G. persicaria*。

笔者发现病原菌 *G. persicaria* 破坏性极强,对桃采后贮藏运输产生极大威胁,目前国内外关于该病原菌对不同桃品种抗病性差异以及防治方法缺乏系统的研究,尚无可靠的方案来防治该病原菌,不利于桃产业的健康持续发展。因此笔者利用形态学和分子生物学的相关手段来鉴定所分离的病原,并通过室内离体接种的方法测定不同桃品种对该病原的抗性差异,采用微孔板法筛选有效防治药剂,为桃产业应对该病原提供指导。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 病原菌的分离与培养 从中国农业科学院郑州果树研究所原阳桃基地采摘自然发病的果实分别装于无菌密封袋中带回实验室,采用组织分离法^[7]进行致病菌分离,以马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基为分离培养基。选取病果病健交界处 3 mm × 3 mm 大小的组织块,在 75% 酒精中消毒 20 s,无菌水中连续漂洗 3 次,用无菌滤纸吸干植物组织块上的水后放置于 PDA 平板上,28 °C 培养 1 d;挑取典型菌落边缘的菌丝到新的 PDA 平板上,28 °C 培养 2 d;然后将纯的单孢子培养物转移到 PDA 斜面上,待长成后用于进一步研究,并于 20% 甘油中-80 °C 长期保存。笔者将从病组织中分离纯化获得菌株分别接种在桃上后,观察果实发病情况,并于接种后的病部重新分离病原,选择代表性菌株进行后续试验。

1.1.2 桃品种及供试药剂 供试桃品种共 6 种:中油 13 号(CN13)、中油 18 号(CN18)、中油 19 号

(CN19)、中桃 9 号(CP9)、中桃红玉(CP10-7)以及中熟桃品种中桃白玉,以上桃品种均采自中国农业科学院郑州果树所原阳桃基地。

供试药剂共 15 种:10% 苯醚甲环唑(difenoconazole)WG,先正达(中国)投资有限公司;400 g·L⁻¹ 啉霉胺(pyrimethanil)SC,拜耳作物科学(中国)有限公司;500 g·L⁻¹ 异菌脲(iprodione)SC,苏州富美实植物保护剂有限公司;60% 唑醚·代森联(pyraclorobin·metiram)WG,巴斯夫(中国)有限公司;20% 抑霉唑(imazalil)EW,一帆生物科技集团有限公司;450 g·L⁻¹ 咪鲜胺(prochloraz)EW,苏州富美实植物保护剂有限公司;50% 烯酰吗啉(dimethomorph)WP,巴斯夫(中国)有限公司;250 g·L⁻¹ 吡唑醚菌酯(pyraclorobin)EC,巴斯夫(中国)有限公司;30% 甲霜·恶霉灵(metalaxyl·hymexazol)AS、70% 甲基硫菌灵(thiophanate-methyl)WP,中农立华(天津)农用化学品有限公司;0.18% 1-甲基环丙烯(1-MCP)PP,龙杏生技制药股份有限公司;95% 纳他霉素(natamycin)TC、96% 月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐(Lauroyl arginine ethyl hydrochloride)TC、98% 7-羟基香豆素(umbelliferone)TC、95% 乳酸链球菌素(nisin)TC,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,其中纳他霉素用甲醇溶解^[9],其余 13 种药剂用无菌水溶解配制成 1×10⁴ mg·L⁻¹ 的母液,用于室内药剂毒力测定。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌形态观察 孢子悬浮液的制备^[20]:将桃软腐病病原菌菌株 TFLB-J 转接在 PDA 平板上,28 °C 黑暗条件下培养 3 d 以上,待产孢后向培养皿中加入 10 mL 无菌水,用无菌曲玻棒轻轻洗下菌落中的孢囊孢子,尽量减少菌丝断裂。经 4 层无菌纱布过滤稀释得到浓度为 3 × 10⁵ 个·mL⁻¹ 孢囊孢子悬浮液。

将分离得到的菌株接种在 PDA 培养基上,25 °C 黑暗培养 2 d 后观察记录菌落的形状、颜色及基质颜色,在光学电子显微镜下观察病原菌孢子的形状,测量孢子大小并拍照。取制备好的孢子悬浮液 100 μL 加入到 96 孔板中,再加入 100 μL 的马铃薯葡萄糖培养基(potato dextrose, PD),密封培养 12 h 后吸取 100 μL 在显微镜下观察萌发中的孢子并拍照记录。

1.2.2 病原菌致病性鉴定 选择大小一致、成熟度

一致、健康无病、无虫伤的桃果,进行果实接种试验。将桃用75%酒精进行表面擦拭消毒,晾干。取在PDA培养基上培养2 d的新鲜菌体,用5 mm打孔器取菌丝块接种于桃果实腰部,每个菌株分别接在3个桃果实上,以不接入菌株的桃为对照组。同时将菌体接种在PDA培养基中作为对照,6次重复。接种后置于恒温恒湿培养箱28℃下诱导发病,每天观察并记录发病情况。待接种后的桃发病后,根据柯赫式法则,将病原菌重新进行分离纯化培养,观察新分离物与接种物是否相同。

1.2.3 病原菌的分子生物学鉴定 病原菌DNA的提取^[21]:选取所分离的代表性菌株TFLB-J菌株进行病原菌的分子生物学鉴定。将菌株接种到PDA平板上进行活化,25℃黑暗培养1 d后,取灭菌后的接种针将菌丝刮下置于无菌离心管中,用2×T5 Direct PCR Kit(Plant)试剂盒(擎科公司)中的裂解液Lysis Buffer A 30 μL在95℃条件下裂解,获得基因组DNA,PCR扩增试剂盒2×TSINGKE Master Mix、扩增引物均购于北京擎科新业生物技术有限公司(南京分公司)。

将3个菌株分别采用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和LROR(5'-ACCCGCTGAACCTAAGC-3')/LR7(5'-TACTACCACCAAGATCT-3')对序列进行扩增。PCR反应体系(20 μL):DNA模板1 μL,上下游引物各1 μL(20 μmol),2×TSINGKE Master Mix 10 μL,ddH₂O 7 μL。ITS扩增程序:94℃预变性3 min,94℃变性30 s,55℃退火30 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3 min,94℃变性30 s,51℃退火30 s,72℃延伸1 min,共30个循环;最后72℃延伸10 min,4℃保存。

用1%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测,PCR产物委托北京擎科新业生物技术有限公司(南京分公司)纯化和测序,测序结果在GenBank中进行BLAST并下载相关序列,用MEGA7.0采用最大似然法构建系统发育树。

1.2.4 病原菌对不同桃品种的致病力测定 取在PDA培养基上培养2 d的新鲜菌体,用5 mm直径打孔器取菌丝块接种,选用5个不同品种桃果实各8个,用灭菌棉吸附75%的酒精对果实表面进行擦洗消毒处理,然后晾干备用;取无菌解剖刀在桃果实

腰部切约5 mm×5 mm的方块,用接种针将菌丝块接种到伤口上;将果实置于无菌环境下保湿培养于24 h和48 h观察发病情况、测病斑直径并记录。

1.2.5 15种药剂对病原菌孢子萌发的毒力测定 采用微孔板法测药剂毒力^[20]:因前期试验发现测试波长越大,孢子悬浮液的OD增加值越明显,故笔者使用酶标仪最大可调波长630 nm作为测试波长。于96孔板中加入100 μL PD后,将用无菌水洗脱、过滤获得的3×10⁵个·mL⁻¹孢子悬浮液,加入到96孔板中,每孔80 μL,再加入经稀释过的药剂20 μL。以等体积加入20 μL无菌水的孢子悬浮液为对照。每处理重复2次,试验重复2次。用封口膜将96孔板密封严实,于酶标仪上630 nm波长下测定吸光度(OD₆₃₀)值(对照0 h吸光度值为OD₀,各处理0 h吸光度值为OD₁)。于28℃黑暗条件下静置培养,于24 h后再测定OD₆₃₀值。

抑制率/%=

$$\frac{(\text{对照OD} - \text{OD}_0) - (\text{药剂处理OD} - \text{OD}_1)}{\text{对照OD} - \text{OD}_0} \times 100.$$

按照上式计算药剂对孢囊孢子萌发的抑制率。计算抑制中浓度(EC₅₀)值。

1.2.6 药剂处理桃采后贮藏效果观察 基于离体药剂筛选,选取代表性药剂进行采后贮藏稳定性试验,为了探究乙烯对贮藏效果产生的影响,试验还设立了乙烯抑制剂1-MCP处理试验。

采后贮藏试验^[22]:选择大小一致、成熟度一致、健康无病、无虫伤的中桃白玉,将桃用75%的酒精表面擦拭消毒晾干;配制一定浓度的两种药剂,选择消毒过的桃(每组24个)分别放入到配制好的药剂中浸泡2 min后取出,按4×6的排列方法放置于无菌保湿培养箱中并在排列好的桃果中间部位放置一个接种病原菌后的桃果,密封培养观察两种药剂处理后的桃采后贮藏效果;将桃按同样的方式排列,在培养箱中加入乙烯抑制剂1-MCP和一定量的水后密封,并每隔一段时间补充1-MCP。以清水处理为对照,每天观察并拍照记录发病情况。

1.3 数据分析和处理

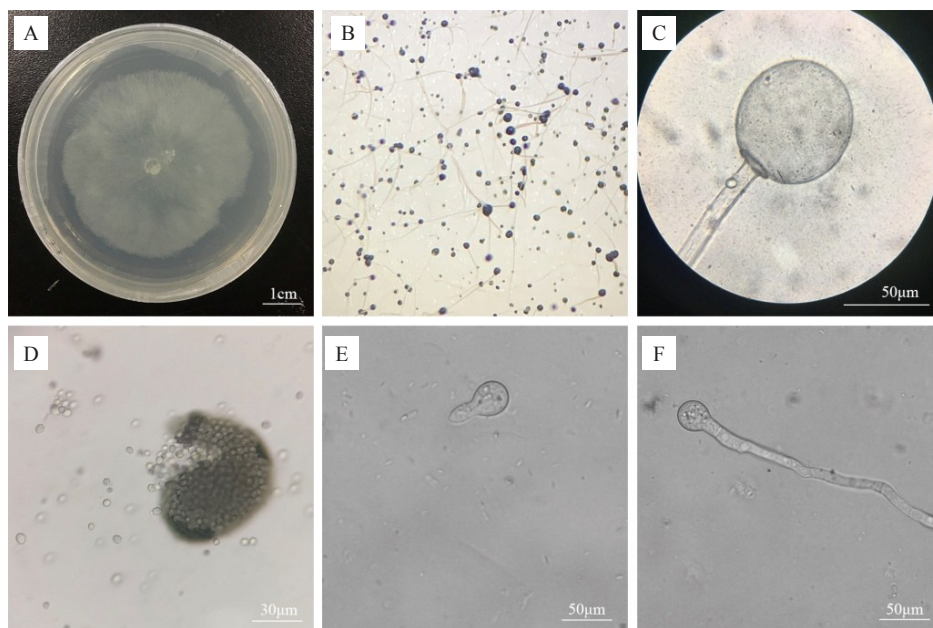
数据采用Excel 2007和SPSS 24.0软件进行作图和统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态观察

从病果样品中分离出27个菌株,分别置于PDA平板上28℃黑暗培养2d后观察孢囊孢子形态、大小、菌落形态和颜色等。经过观察发现27个菌株的形态特征相同均表现为菌落圆形扩展,生长旺盛,气生菌丝发达,无隔膜,无匍匐丝和假根(图1-A、B);孢囊梗浅褐色至灰色,顶端产生1个孢子囊,球形,灰褐色,直径90.00~133.81 μm,平均110.57 μm

(图1-C)。孢囊孢子浅褐色至灰色,短椭球形或球形,球形孢子直径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1-D);孢子萌发时,先在表面形成一个凸起,然后渐渐伸长形成菌丝,再从菌丝上产生分枝(图1-E、F)。在菌落形成后期,由相同的或不同的菌丝所产生的2个同形等大或同形不等大的孢子囊,经过接合形成球形或双锥形的接合孢子。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、



A. PDA 平板上培养的菌落;B. 体式显微镜下菌丝形态;C~D. 孢子囊形态;E~F. 孢囊孢子萌发形态。

A. Mycelium colonies cultured on PDA; B. Hyphae morphology under microscope; C-D. Morphology of sporangium; E-F. Morphology of conidiphores germination.

图1 桃软腐病病原菌的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of the pathogen causing soft rot of peach

笄霉科、笄霉属桃吉尔霉 *Gilbertella persicaria*。由于27个菌株形态特征一致,致病症状相同,致病力无显著差异,因此随机选取1个代表菌株(TFLB-J)进行后续试验。

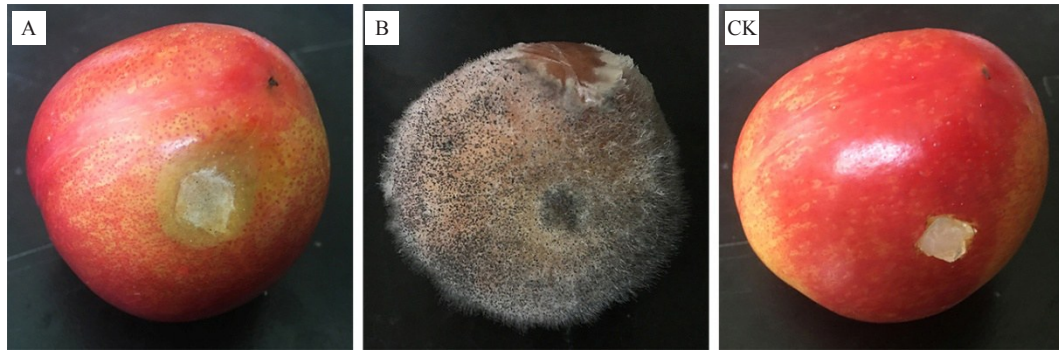
2.2 病原菌致病性鉴定

将菌株TFLB-J重新接种到健康无伤、成熟度一致的桃果实上,果实接种24h后开始发病产生明显的表面特征,发病部位果肉变软(图2-A)。果实接种48h后,病部渗出大量组织液,果肉严重软烂,果实表面遍布菌丝和孢子并散发出刺激性腐臭味(图2-B)。空白对照未发病(图2-CK)。从接种发病的果实重新分离得到致病菌,其分离纯化培养性状与前期接种菌株相同。按照柯赫氏法则,接种的致病

菌与最初从病果上分离的病原菌一致。

2.3 病原菌的分子生物学鉴定

通过ITS和LSU 2对引物以TFLB-J菌株的基因组DNA为模板进行PCR扩增、测序,得到长度分别为628 bp和1417 bp的序列。将测序结果提交至GenBank,结果显示,与NCBI登录号为MK301176.1和MH858452.1等 *G. persicaria* 序列相似度为99%和98%。从GenBank中选取基因序列联合构建系统发育树,经MEGA7.0软件进行系统发育分析,系统发育树每个分支的支持强度都通过了1000次重复的自展检验数值进行评估。结果发现,菌株TFLB-J与 *G. persicaria* 聚为一个进化支,支持率为100%(图3)。依据形态鉴定和系统发育分析,将桃软腐



A. 果实接种 24 h;B. 果实接种 48 h;CK. 果实接种无菌水对照。
A. Peach inoculated with fungus for 24 h;B. Peach inoculated with fungus for 48 h;CK. Water control.

图 2 病原菌致病性鉴定

Fig. 2 Pathogenicity identification of pathogenic fungi

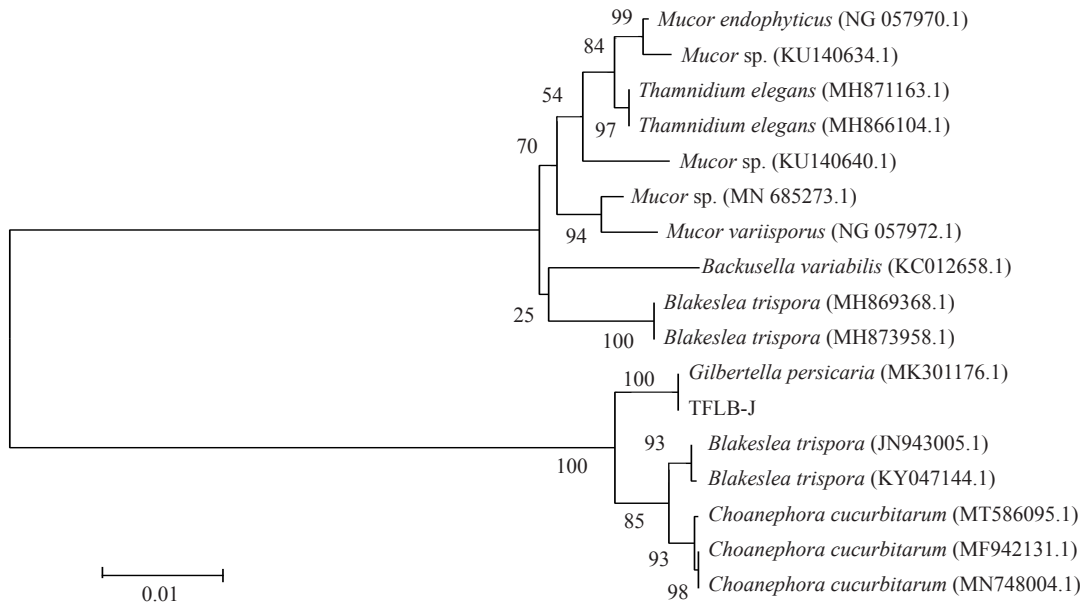


图 3 基于 ITS-LSU 序列构建的系统进化树

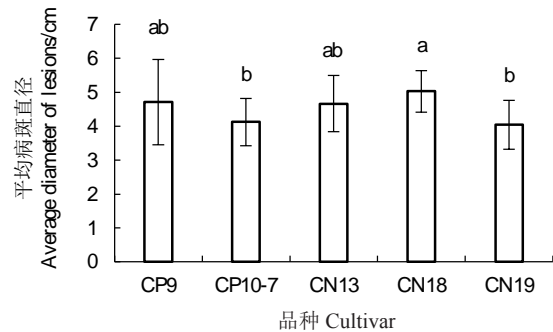
Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS-LSU sequence

病病原菌鉴定为桃吉尔霉 *Gilbertella persicaria*。

2.4 病菌对不同桃品种的致病力

通过室内离体接种法将 *G. persicaria* 接种到 CN13、CN18、CN19、CP9、CP10-7 这 5 个桃品种的果实上,接种 24 h 时接种伤口附近开始出现水渍状腐烂,在接种 48 h 时病斑扩展十分迅速,气生菌丝十分旺盛,腐烂程度加剧并有腐臭味,果实附近渗出组织液。选择 48 h 测量病斑直径作为不同桃品种抗病性差异的参考数值。结果显示,5 个桃品种都发病,但差异显著,其中中油 19 号(CN19)和中桃红玉(CP10-7)的抗病性相对较好,病斑直径分别为 4.04 cm 和 4.13 cm,而中油 18 号抗病性相对较差,病斑直径达到 5.21 cm(图 4、图 5)。

2.5 15 种药剂对病原菌孢子萌发的毒力测定



不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 差异显著。
Different small letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

图 4 病斑平均直径 (2 d) 及显著性差异分析

Fig. 4 Average diameter of lesion (2 d) and significant difference analysis

微孔板法检测供试药剂对 *G. persicaria* 孢子萌发的抑制效果,结果(表 1)显示供试的 15 种药剂中:

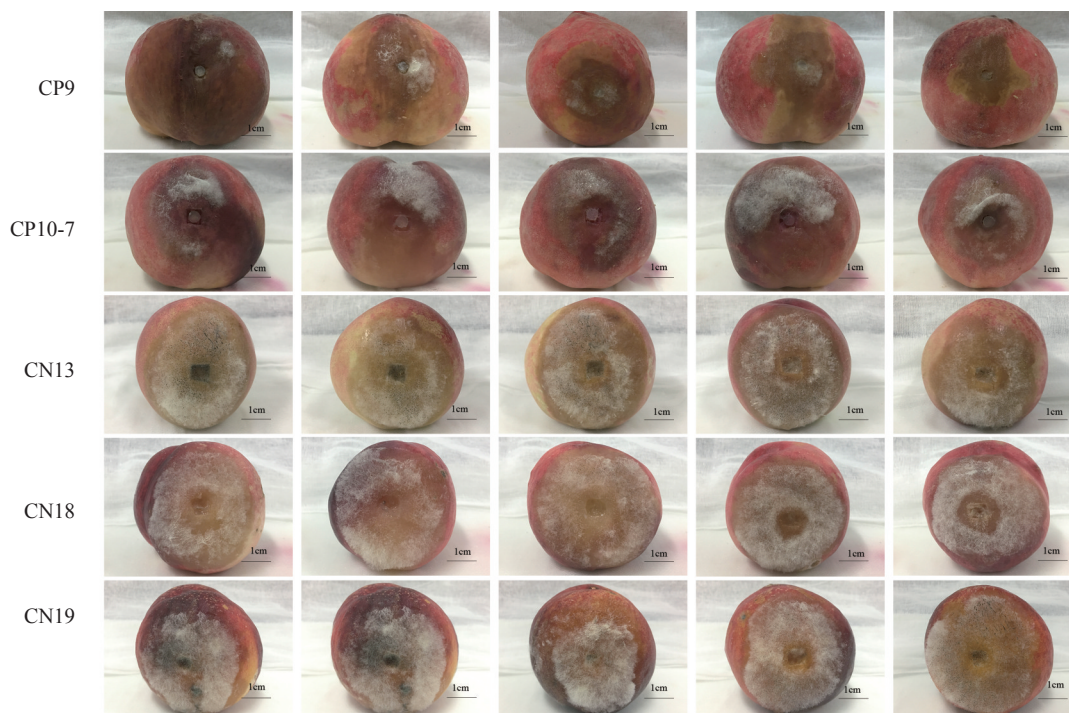


图 5 不同桃品种间的抗病性差异

Fig. 5 The difference of disease resistance among different peach varieties

表 1 15 种药剂对致病菌的毒力

Table 1 Virulence of 15 agents to pathogenic fungi

供试药剂 Fungicide	毒力回归方程 Toxic regression equation	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	相关系数 Correlation coefficient, <i>r</i>
10%苯醚甲环唑 WG 10% difenoconazole WG	$y=1.169x-1.165$	9.920	0.999
400 g·L ⁻¹ 啞霉胺 SC 400 g·L ⁻¹ pyrimethanil SC	$y=1.261x-2.709$	140.509	0.984
500 g·L ⁻¹ 异菌脲 SC 500 g·L ⁻¹ iprodione SC	$y=1.613x-3.431$	133.982	0.997
60%唑醚·代森联 WG 60% pyraclostrobin·metiramWG	$y=0.431x-0.269$	4.203	0.938
20%抑霉唑 EW 20% imazalil EW	$y=3.713x-9.009$	266.796	0.991
450 g·L ⁻¹ 咪鲜胺 EW 450 g·L ⁻¹ prochloraz EW	$y=2.641x-4.230$	39.978	0.942
50%烯酰吗啉 WP 50% dimethomorph WP	$y=1.856x-5.406$	816.936	0.958
250 g·L ⁻¹ 吡唑醚菌酯 EC 250 g·L ⁻¹ pyraclostrobin EC	$y=0.507x+0.392$	0.168	1.000
30%甲霜·恶霉灵 AS 30% metalaxyl·hymexazol AS	-	-	-
70%甲基硫菌灵 WP 70% thiophanate-methyl WP	-	-	-
95%纳他霉素 TC 95% natamycin TC	$y=1.353x-1.474$	12.297	0.969
96%月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐 TC 96% lauroyl arginine ethyl hydrochloride TC	$y=0.374x-0.427$	13.846	0.918
98%7-羟基香豆素 TC 98% umbelliferone TC	-	-	-
95%乳酸链球菌素 TC 95% nisin TC	-	-	-
0.18%1-甲基环丙烯 PP 0.18% 1- methylcyclopropene PP	-	-	-

注：- 未检测到。Note: -undetected.

250 g·L⁻¹吡唑醚菌酯 EC、60%唑醚·代森联 WG、10%苯醚甲环唑 WG、95%纳他霉素 TC、95%月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐 TC、450 g·L⁻¹咪鲜胺对病原菌孢子萌发有显著的抑制效果,EC₅₀分别为0.168、4.203、9.920、12.297、13.846、39.978 mg·L⁻¹。此外,500 g·L⁻¹异菌脲 SC、400 g·L⁻¹啶霉胺 SC、20%抑霉唑 EW、50%烯酰吗啉 WP 也能产生一定的抑制效果,但效果相对较差,EC₅₀分别为133.982、140.509、266.796、816.936 mg·L⁻¹。试验也表明,30%甲霜·恶霉灵 AS、70%甲基硫菌灵 WP、98% 7-羟基香豆素 TC、95%乳酸链球菌素 TC、0.18%1-甲基环丙烯(1-MCP)PP 对该病原菌 *G. persicaria* 基本没有抑制效果。

2.6 药剂处理桃采后贮藏效果观察

在毒力测定效果最好的3种药剂(250 g·L⁻¹吡唑醚菌酯 EC、60%唑醚·代森联 WG、10%苯醚甲环

唑 WG)和较差的4种药剂(500 g·L⁻¹异菌脲 SC、400 g·L⁻¹啶霉胺 SC、20%抑霉唑 EW、50%烯酰吗啉 WP)中,选择代表性的10%苯醚甲环唑 WG 和 20%抑霉唑 EW 以及 1-MCP 进行采后贮藏试验,验证离体筛选的药效稳定性。

在未经药剂处理(CK)贮藏果实中,结果显示接种 *G. persicaria* 的中桃白玉,48 h 时完全发病,病害由中心果实开始向邻近的果实扩散传播,一个接一个,到接种 6 d 时,所有果实全部腐烂并渗出大量组织液,且伴有强烈的腐臭味(图 6)。1-MCP 处理组结果显示,1-MCP 在一定程度上抑制了 *G. persicaria* 在果实之间的传播和扩散,但在后期依然表现出果实腐烂。而两种杀菌剂中,苯醚甲环唑的抑制效果较好,能够有效抑制 *G. persicaria* 的扩散,但抑霉唑效果不好。

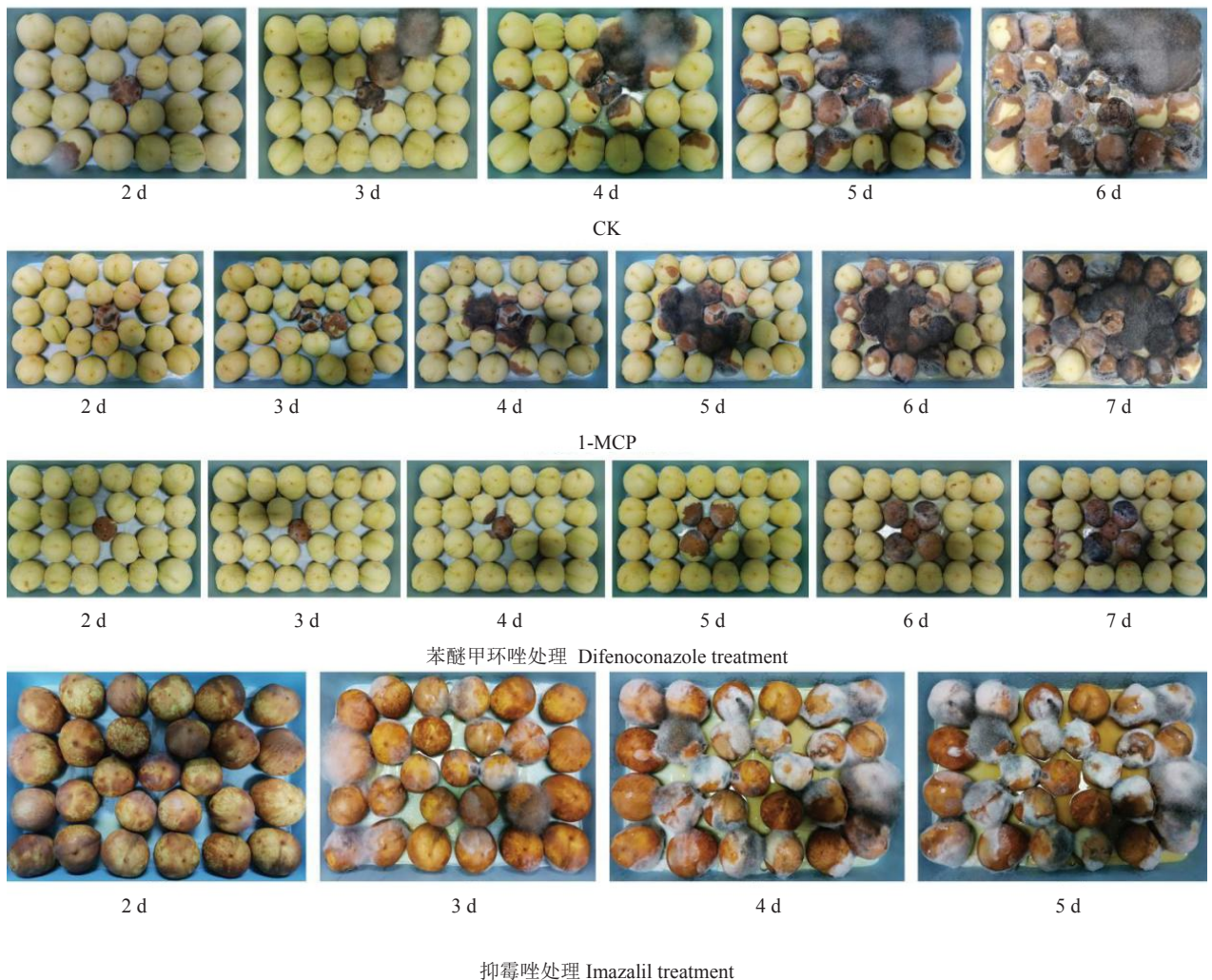


图 6 桃感染 *G. persicaria* 后的贮藏试验
 Fig. 6 Storage tests after peach infection with *G. Persicaria*

3 讨 论

笔者在本研究中通过对桃软腐病病原菌分离纯化和培养、致病性鉴定、形态特征观察和分子生物学鉴定,以及微孔板药剂筛选,最终确定引起桃软腐病的病原菌为 *Gilbertella persicaria*。

此前针对 *G. persicaria* 引起的病害报道较少,主要有云南郭力维等^[12]报道的火龙果采后果腐病,广西林珊宇等^[13]、贵州李国林等^[14]、海南郑樊等^[21]报道的火龙果软腐病。此外,在国外的报道中,有研究认为 *G. persicaria* 是核果类和梨果类果实的主要致病菌^[8],在最近几年的报道中有桃、李、杏、梨、苹果^[8]、西红柿^[9]、木瓜^[10]、茄子^[11]、海南蒲桃^[23]等,在最新的报道中,在人类的一份粪便样本中分离出 *G. persicaria*,并分析称该病原能够在人体肠道中生存并繁殖,且对伏立康唑和伊曲康唑具有抗性^[15]。

本研究由 *G. persicaria* 引起的桃软腐病与已经报道的由匍枝根霉 *R. stolonifer* 引起的软腐病^[24-26]在症状上十分相似,难以区分,但是 *G. persicaria* 在形态上的差异明显不同于 *R. stolonifer*,*R. stolonifer* 具有假根和匍匐菌丝,孢囊梗不分枝和不弯曲,而 *G. persicaria* 不能产生假根和匍匐菌丝且孢囊梗多数1~2个分枝,个别孢囊梗顶端弯曲^[21]。

有相关研究报道^[27]称 *G. persicaria* 需要在寄主的果实上有伤口才能引起感染,当细胞的角质层遭到破坏时,该病原菌的孢子囊孢子能够获得萌发所需要的最佳湿度。因此,在生产上对此病害进行防治时,要采取必要的措施尽量减少伤口的出现,从而达到预防的目的。对于 *G. persicaria* 导致桃软腐病的致病机制,该报道说明在接种6 h后,孢子开始萌发,穿透性的附着体开始形成,通过分泌大量的细胞壁降解酶来穿透宿主细胞,随后通过内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶(纤维素水解酶)的协同作用在宿主细胞中定殖,产生低聚糖和双糖,这些低聚糖和双糖再被葡萄糖苷酶进一步降解为葡萄糖单体。*G. persicaria* 通过这些酶来破坏桃组织的完整性从而获取营养,进而导致严重的桃腐烂病。

G. persicaria 引起的桃软腐病发病极快,48 h便可完成整个感染周期,因此研究不同桃品种的抗性差异也十分重要,在国内外报道中未见有对 *G. persicaria* 进行不同桃品种间的抗病性差异研究。笔者在本研究中对3个油桃品种和2个毛桃品种进行了

抗病性测试。结果表明,不同桃品种间的抗病性差异并不十分明显,其中中油19号(CN19)和中桃红玉(CP10-7)的抗病性相对较好。

G. persicaria 是最近几年国内新分离出来的真菌,并且报道发病的果实大多是火龙果,但对该病害的研究并不深入,仅对该菌进行了病原鉴定以及生物学特性等相关研究。国内外仅见一篇报道对该菌进行药剂筛选,1996年有相关文献报道在进行室内离体药剂防治时,氯硝铵和异菌脲对 *G. persicaria* 有较好的抑制效果,噻霉灵、乙烯菌核利、克菌丹、己唑醇等也有不错的抑制效果^[8]。笔者通过微孔板对 *G. persicaria* 的室内毒力测定,结果表明250 g·L⁻¹吡唑醚菌酯EC对该株致病菌具有明显的抑制效果,60%唑醚·代森联WG、10%苯醚甲环唑WG、95%纳他霉素TC、95%月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐TC、450 g·L⁻¹咪鲜胺EW对其也有较好的抑制效果。实验过程中,30%甲霜·恶霉灵AS、70%甲基硫菌灵WP、98%7-羟基香豆素TC、95%乳酸链球菌素TC对该病原菌 *G. persicaria* 基本没有抑制效果。因此,在防治该病害时可以避免使用这几类药剂。另外,也可以根据季节以及田间的实际情况来对该病害进行防治,*G. persicaria* 达到最高萌发率的温度为22~34 ℃,在冬春季节,可以通过彻底清园和喷施药剂进行防治。其次,该病害防控最重要的时间是采收期间,且该病害更容易侵染新伤口^[8]。所以在果实膨大成熟期以及在采后贮藏期,要重点关注和防治 *G. persicaria*,注意观察病情的发展扩散情况,避免病害大规模传播。

苯醚甲环唑属于三唑类杀菌剂,会阻碍麦角甾醇的合成,引起真菌细胞膜破坏,导致细胞死亡^[28]。已有研究证明苯醚甲环唑能够抑制病原菌菌丝生长与孢子萌发及病斑扩展^[29-31],苯醚甲环唑防治接合菌的相关报道有周锋等^[32]在甘薯软腐病病原匍枝根霉 *R. stolonifer* 上的药剂敏感性测定。苯醚甲环唑在应对 *G. persicaria* 防治效果上已经十分明显,但其抑菌机制仍不清楚,有待后续进一步研究。吡唑醚菌酯在果实中农药残留要求较高,综合考虑在采后贮藏试验中没有选用该药剂。目前,国内外对于 *G. persicaria* 的药剂防治仍是一个空白,当前的研究仅在室内药剂毒力测定上,在田间防治中的效果以及具体的施药模式仍需进一步探索。此外,在贮藏过程中发现1-MCP可以在一定程度上抑制 *G. persi-*

caria 在果实之间的传播和扩散。乙烯作为植物对病原菌感染应答的最早期信号之一,在植物的抗病防卫反应中起着重要的调节作用。最近已有关于病原微生物自身产生乙烯的报道^[33-36],因此乙烯在 *G. persicaria* 与桃互作过程中的功能也是下一步工作的重点。

4 结 论

从中国农业科学院郑州果树研究所原阳桃基地分离出的桃软腐病致病菌为桃吉尔霉 *Gilbertella persicaria*。所选5个桃品种对其抗性差异并不明显,都易感病,但是相对而言中油19号(CN19)和中桃红玉(CP10-7)较抗病。通过离体毒力测定表明,吡唑醚菌酯、唑醚·代森联、苯醚甲环唑对该菌有很好的防治效果,并且通过贮藏试验验证了苯醚甲环唑的防治效果,在桃软腐病田间防治中具有较大的应用潜力。

参考文献 References:

- [1] 俞明亮,王力荣,王志强,彭福田,张帆,叶正文. 新中国果树科学研究70年:桃[J]. 果树学报,2019,36(10):33-41.
YU Mingliang, WANG Lirong, WANG Zhiqiang, PENG Futian, ZHANG Fan, YE Zhengwen. New China fruit tree science research 70 years: peach[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(10): 33-41.
- [2] 牛良,曾文芳,潘磊,孟君仁,鲁振华,崔国朝,王志强. 硬质桃研究现状及展望[J]. 果树学报,2020,37(8):1-13.
NIU Liang, ZENG Wenfang, PAN Lei, MENG Junren, LU Zhenhua, CUI Guochao, WANG Zhiqiang. Research status and prospect of hard peach[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(8): 1-13.
- [3] LIU H, CAO J, JIANG W. Changes in phenolics and antioxidant property of peach fruit during ripening and responses to 1-methylcyclopropene[J]. Postharvest Biology and Technology, 2015, 108: 111-118.
- [4] PAPAVALASILEIOU A, TANOU G, SAMARAS A, SAMIOTAKI M, MOLASSIOTIS A, KARAOGLANIDIS G. Proteomic analysis upon peach fruit infection with *Monilinia fructicola* and *M. laxa* identify responses contributing to brown rot resistance[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 7807.
- [5] JIAO W, LI X, WANG X, CAO J, JIANG W. Chlorogenic acid induces resistance against *Penicillium expansum* in peach fruit by activating the salicylic acid signaling pathway[J]. Food Chemistry, 2018, 260: 274-282.
- [6] SHI Z J, DENG J, WANG F, LIU Y, JIAO J Y, WANG L C, ZHANG J Y. Individual and combined effects of bamboo vinegar and peach gum on postharvest grey mould caused by *Botrytis cinerea* in blueberry[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 155: 86-93.
- [7] ZHANG X, WU F, GU N, YAN X, WANG K, DHANASEK-ARAN S, GU X, ZHAO L, ZHANG H. Postharvest biological control of Rhizopus rot and the mechanisms involved in induced disease resistance of peaches by *Pichia membranefaciens*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 163(1): 111146.
- [8] GINTING C, ZEHR E I, WESTCOTT S W. Inoculum sources and characterization of isolates of *Gilbertella persicaria* from peach fruit in South Carolina[J]. Plant Disease, 1996, 80(10): 1129-1134.
- [9] MEHROTRA M D. Fruit rot of tomato caused by *Gilbertella persicaria*[J]. Sydowia, 1963, 17: 17-19.
- [10] CRUZ-LACHICA I, MARQUEZ-ZEQUERA I, GARCIA-ESTRADA R S, CARILLO-FASIO J A, LEON-FELIX J, ALLENDE-MOLAR R. First report of *Gilbertella persicaria* causing papaya fruit rot[J]. Plant Disease, 2016, 100(1): 227.
- [11] VIEIRA J C B, CAMARA M P S, BEZERRA J D P, MOTTA C M S, MACHADO A R. First report of *Gilbertella persicaria* causing soft rot in eggplant fruit in Brazil[J]. Plant Disease, 2018, 102(6): 1172.
- [12] 郭力维,吴毅歆,何汉兴,毛自朝,何鹏博,何月秋. 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.
GUO Liwei, WU Yixin, HE Hanxing, MAO Zichao, HE Pengbo, HE Yueqiu. Storage rot of dragon fruit caused by *Gilbertella persicaria*(in English)[J]. Journal of Fruit Science, 2014, 31(1): 111-114.
- [13] 林珊宇,贤小勇,韦小妹,韦继光,朱桂宁. 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.
LIN Shanyu, XIAN Xiaoyong, WEI Xiaomei, WEI Jiguang, ZHU Guining. Isolation and identification of main pathogens of postharvest disease of pitaya fruit in Guangxi[J]. South China Fruits, 2018, 47(2): 6-12.
- [14] 李国林,钱其军,孟繁博,陈曦,黄道梅,郑秀艳,林茂. 贵州地区紫红火龙果采后病原菌分离鉴定[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(21): 5647-5652.
LI Guolin, QIAN Qijun, MENG Fanbo, CHEN Xi, HUANG Daomei, ZHENG Xiuyan, LIN Mao. Isolation and identification of pathogen from *Hylocereus undatus* cv. Zihonglong in Guizhou province[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(21): 5647-5652.
- [15] HUËT M A L, WONG L W, GOH C B S, ONG K S, DWIYANTO J, REIDPATH D, LEE S M, RAHMAN S, TAN J B L. First reported case of *Gilbertella persicaria* in human stool: outcome of a community study from Segamat, Johor, Malaysia[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2020, 51(4): 2067-2075.
- [16] 刘莎莎,张玉笑,王亮,员丽苹,陈勇,张新华,郭衍银. 主动自发气调对桃吉尔霉抑制效果的影响[J]. 食品科学,2020,41(5): 186-192.
LIU Shasha, ZHANG Yuxiao, WANG Liang, YUAN Liping, CHEN Yong, ZHANG Xinhua, GUO Yanyin. Effect of active modified atmosphere on the inhibition of *Gilbertella persicaria*[J]. Food Science, 2020, 41(5): 186-192.
- [17] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998: 122-

124.
FANG Zhongda. Research methods of plant pathology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 122-124.
- [18] CRUZ- LACHICA I, MARQUEZ- ZEQUERA I, ALLENDEMOLAR R, SAÑUDO-BARAJAS J A, LEON-FELIX J, GARCIA-ESTRADA R S. Fast technique for the identification of *Gilbertella persicaria* via optical microscopy[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 142: 36-38.
- [19] DUCHATEAU A L L, VAN S W B. Stability study of a nisin/natamycin blend by LC-MS[J]. Food Chemistry, 2018, 266: 240-244.
- [20] 杨晓楠, 王猛, 申瑞平, 刘峰. 微孔板法检测番茄灰霉病菌对杀菌剂的敏感性[J]. 中国农业科学, 2012, 45(15): 3075-3082.
YANG Xiaonan, WANG Meng, SHEN Ruiping, LIU Feng. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to fungicides[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(15): 3075-3082.
- [21] 郑樊, 徐刚, 仇芳, 郑妃庆, 郑丽, 谢昌平. 海南省火龙果软腐病原菌的鉴定及生物学特性[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 137-142.
ZHENG Fan, XU Gang, QIU Fang, ZHENG Feiqing, ZHENG Li, XIE Changping. Identification and biological characteristics of the pathogenic fungus causing the soft rot of *Hylocereus costaricensis* in Hainan, China[J]. Plant Protection, 2019, 45(4): 137-142.
- [22] BAGGIO J S, HAU B, AMORIM L. Spatiotemporal analyses of rhizopus rot progress in peach fruit inoculated with *Rhizopus stolonifer*[J]. Plant Pathology, 2017, 66(9): 1452-1462.
- [23] 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): 1-4.
- [24] ZHOU D, WANG Z, LI M, XING M, XIAN T, TU K. Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in peaches[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 124(1): 166-178.
- [25] 刘晨霞, 乔勇进, 黄宇斐, 王晓. 酸性硫酸钙处理对水蜜桃采后匍枝根霉致病力的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(7): 1377-1385.
LIU Chenxia, QIAO Yongjin, HUANG Yufei, WANG Xiao. Effect of acidic calcium sulfate treatment on pathogenicity of postharvest *Rhizopus stolonifer* in honey peach[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(7): 1377-1385.
- [26] BAGGIO J S, GONCALVES F P, LOURENCO S A, TANAKA F A O, PASCHOLATI S F, AMORIM L. Direct penetration of *Rhizopus stolonifer* into stone fruits causing rhizopus rot[J]. Plant Pathology, 2015, 65(4): 633-642.
- [27] CRUZ- LACHICA I, MARQUEZ- ZEQUERA I, ALLENDEMOLAR R, LEON-FELIX J, SAÑUDO-BARAJAS J A, LEY-LOPEZ N, GARCIA-ESTRADA R S. Infection process of *Gilbertella persicaria* in papaya (*Carica papaya* L.) fruits[J]. Journal of General Plant Pathology, 2018, 84(5): 339-342.
- [28] 高双, 高小宁, 冯浩, 韩青梅, 黄丽丽. 苯醚甲环唑对苹果树腐烂病菌菌丝形态和超微结构的影响[J]. 果树学报, 2017, 34(10): 1323-1329.
- GAO Shuang, GAO Xiaoning, FENG Hao, HAN Qingmei, HUANG Lili. Effects of difenoconazole on the mycelial morphology and ultrastructure of *Valsa mali*[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(10): 1323-1329.
- [29] 沈量, 马雨萱, 傅敏, 洪霓, 王国平. 中国南方主要梨产区果生炭疽菌对苯醚甲环唑的敏感性[J]. 农药学报, 2020, 22(1): 54-59.
SHEN Liang, MA Yuxuan, FU Min, HONG Ni, WANG Guoping. Sensitivity of difenoconazole to *Colletotrichum fructicola* at major pear cultivation areas in South China [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2020, 22(1): 54-59.
- [30] 朱春晖, 罗香文, 张战泓, 罗源华, 刘勇. 啞菌酯与苯醚甲环唑混用防治西瓜炭疽病、枯萎病及对西瓜品质的改善[J]. 植物保护学报, 2006, 33(4): 407-411.
ZHU Chunhui, LUO Xiangwen, ZHANG Zhanhong, LUO Yuanhua, LIU Yong. The efficacy of the mixture of azoxystrobin and difenoconazole on the control of both watermelon-anthracnose and watermelon *Fusarium* wilt and the improvement of watermelon qualities[J]. Acta Phytopythologica Sinica, 2006, 33(4): 407-411.
- [31] 胡茂林, 黄晓冬, 罗来鑫, 李健强. 苯醚甲环唑与烯肟菌胺复配防治稻曲病[J]. 植物保护, 2018, 44(3): 230-234.
HU Maolin, HUANG Xiaodong, LUO Laixin, LI Jianqiang. Control effect of difenoconazole, SYP-1620 and their mixture on rice false smut disease[J]. Plant Protection, 2018, 44(3): 230-234.
- [32] 周锋, 郭镇华, 郭子灏, 马亚辉, 李帅, 闫廷璐, 谭立国, 孙笑笑, 陆宁海. 甘薯软腐病病原的RDNA-ITS分子鉴定及其对11种杀菌剂的敏感性测定[J]. 中国植保导刊, 2020, 40(2): 22-25.
ZHOU Feng, GUO Zhenhua, GUO Zihao, MA Yahui, LI Shuai, YAN Tinglu, TAN Ligu, SUN Xiaoxiao, LU Ninghai. Molecular identification of sweet potato soft rot pathogen by rDNA-ITS and its sensitivity to 11 fungicides[J]. China Plant Protection, 2020, 40(2): 22-25.
- [33] ZHU P, XU Z, CUI Z, ZHANG Z, XU L. Ethylene production by *Alternaria alternata* and its association with virulence on inoculated grape berries[J]. Phytoparasitica, 2017, 45(3): 273-279.
- [34] VRECKO K, STORGA D, BIRKMAYER J G D, REINHARD, LONG P G. Ethylene production by *Botrytis cinerea*[J]. Postharvest Biology Technol, 1997, 11(2): 85-91.
- [35] CRISTESCU S M, MARTINIS D D, HEKKERT S T L, TE L H S, PARKER D H, HARREN F J M. Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5342-5350.
- [36] MASRIA M I, ELAD Y, SHARON C A, BARAKATA R. Ethylene production by *Sclerotinia sclerotiorum* and influence of exogenously applied hormone and its inhibitor 1-aminoethoxyvinyl-1-glycine on white mold[J]. Crop Protection, 2006, 25(4): 356-361.