

研究报告

猕猴桃软腐病菌鉴定及诱导产孢方法

宋金黄, 张丽华, 谭红, 樊荣*

贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025

宋金黄, 张丽华, 谭红, 樊荣. 猕猴桃软腐病菌鉴定及诱导产孢方法[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3145-3155.

SONG Jinhua, ZHANG Lihua, TAN Hong, FAN Rong. Identification of the pathogen causing kiwifruit soft rot and the conditions for inducing sporulation[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3145-3155.

摘要:【背景】猕猴桃软腐病是一种贮藏期真菌病害, 造成猕猴桃果实凹陷变软, 腐烂酸臭, 严重影响猕猴桃的商品价值和经济价值。引起该病害的病原菌种类较多, 病菌特性复杂, 产孢方法不明, 导致对该病害发生机制理解不清, 不能制定科学有效的防治措施。【目的】明确引起猕猴桃软腐病的病原菌并摸清该菌的适宜产孢条件。【方法】对猕猴桃软腐病样进行组织分离和纯化, 结合形态学和分子生物学特征进行病原菌种类鉴定; 测定不同培养基[马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)、燕麦琼脂(oatmeal agar, OA)、马铃薯蔗糖琼脂(potato saccharose agar, PSA)]、不同光照时长(24 h 光照、24 h 黑暗、12 h 光暗交替)和不同波长的光(365 nm 黑光灯、254 nm 紫外灯)对病菌产孢的影响, 并检测不同条件下病菌产生的分生孢子器数量及分生孢子浓度、大小和萌发率。【结果】通过组织分离纯化和柯赫氏法则测定, 获得了 1 株病原菌, 其引起的病害特征与猕猴桃软腐病症状相同。经形态学特征与 ITS-TUB-EF 多基因序列分析将该病原菌鉴定为葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)。该菌株在 PDA 培养基和 24 h 光照下产生的分生孢子器数量最多(平均每皿可产生 130 个分生孢子器), 分生孢子浓度最高(可达 2.5×10^5 个/mL), 而分生孢子大小和萌发率在各处理间无显著差异。【结论】葡萄座腔菌是引起贵州省猕猴桃主产区软腐病的主要致病菌, PDA 培养基和 24 h 光照培养条件是诱导该菌产孢的最适方法。本结果为猕猴桃软腐病发生机制研究奠定了基础。

关键词: 猕猴桃软腐病; 葡萄座腔菌; 分生孢子; 产孢条件

资助项目: 国家自然科学基金(32260658); 贵州省自然科学基金(黔科合基础-ZK[2022]一般 048)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260658) and the Guizhou Provincial Natural Science Foundation ([2022]048).

*Corresponding author. E-mail: rfan@gzu.edu.cn

Received: 2024-10-20; Accepted: 2025-01-07; Published online: 2025-01-27

Identification of the pathogen causing kiwifruit soft rot and the conditions for inducing sporulation

SONG Jinhuang, ZHANG Lihua, TAN Hong, FAN Rong*

College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: [Background] Kiwifruit soft rot, a fungal disease mainly occurred in the storage period, can cause sunken, softening, rotten fruits with an acidic odour, seriously affecting the commodity and economic values of kiwifruit. Many pathogens are casual agents of this disease, with unknown sporulation conditions and complex pathogenic characteristics, which lead to unclear pathogenesis of this disease, inhibiting the development of prevention and control measures. [Objective] To identify the pathogen causing kiwifruit soft rot and find out the suitable sporulation conditions. [Methods] The tissue of kiwifruit soft rot was cultured for strain isolation, and the isolate was identified based on morphological and molecular biological characteristics. The effects of different media (potato dextrose agar (PDA), oatmeal agar (OA), and potato saccharose agar (PSA), different light duration (24 h light, 24 h dark, and 12 h light/12 h dark alternation), and light of different wavelengths (365 nm black light and 254 nm ultraviolet light) on the sporulation of the pathogen were measured. The number of pycnidia and the concentration, size, and germination rate of conidia were measured under different conditions. [Results] A pathogen was obtained by tissue culture and confirmed according to Koch's postulates. The symptoms caused by this pathogen were the same as those of kiwifruit soft rot in the field. The pathogen was identified as *Botryosphaeria dothidea* by morphological characterization and ITS-TUB-EF multigene sequence analysis. When being cultured in the PDA medium with 24 h light, the strain produced the highest number of pycnidia (130 pycnidia per dish) and the highest conidial concentration (2.5×10^5 conidia/mL). There was no significant difference in the size or germination rate of conidia among different treatments. [Conclusion] *B. dothidea* is the main pathogen causing soft rot in the kiwifruit production areas in Guizhou Province. The PDA medium and 24 h light are the best conditions to induce the sporulation of this pathogen. The results in this study lay a foundation for the research on the pathogenesis of kiwifruit soft rot.

Keywords: kiwifruit soft rot; *Botryosphaeria dothidea*; conidia; sporulation condition

猕猴桃(*Actinidia chinensis*)富含多种维生素和矿物质,深受消费者喜欢,是世界上具有重要经济价值的水果作物^[1-2]。猕猴桃软腐病是发生在猕猴桃果实贮藏期的一种真菌病害,会造成猕猴桃果实凹陷变软,腐烂酸臭,严重影响猕猴桃的商品价值和经济价值^[3-4]。引起该病害的病原菌种类较多,包括葡萄座腔菌

(*Botryosphaeria dothidea*)、拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp.)、链格孢菌(*Alternaria alternata*)、可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)、小新壳梭孢菌(*Neofusicoccum parvum*)等,其中葡萄座腔菌(*B. dothidea*)是优势病原菌^[5-6]。葡萄座腔菌是世界范围内木本植物重要的病原菌,可侵染多种果树和林业树种,引起果实腐烂、枝干溃疡、

粗皮、干腐、瘤状突起等症状,严重制约了高经济价值果树和林木业的发展^[7-9]。已有研究表明,分生孢子是葡萄座腔菌的主要初侵染源之一,在病害循环中发挥着重要作用^[10]。然而,由于该菌在常规培养条件下不易产孢,这严重阻碍了对其致病机制的深入研究。目前,葡萄座腔菌的诱导产孢方法主要在苹果轮纹病上有过报道,包括改变培养条件、刮除菌丝和放置健康植物组织等^[11-12],但不同寄主来源的葡萄座腔菌生物学特性存在差异,并且植物组织具有季节性,无法时刻满足室内试验的大量需求。因此本研究通过形态学特征和系统发育分析明确了引起猕猴桃软腐病的病原菌为葡萄座腔菌,并通过设置不同培养基[马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar),燕麦琼脂(oatmeal agar),马铃薯蔗糖琼脂(potato saccharose agar)]、不同光照时长(24 h 光照、24 h 黑暗、12 h 光暗交替)和不同波长的光(365 nm 黑光灯、254 nm 紫外灯)进行室内处理,研究其对猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌产孢的影响,以期筛选出葡萄座腔菌诱导产孢的最适培养条件,为猕猴桃软腐病菌致病机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品

供试猕猴桃于2023年9月采自贵州省六盘水市水城区红阳猕猴桃生产基地,由贵州大学农学院农产品质量安全实验室常温存放至自然发病。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、燕麦琼脂(oatmeal agar, OA)培养基、马铃薯蔗糖琼脂(potato saccharose agar, PSA)培养基参考张定法^[12]的配方配制。

1.3 主要试剂和仪器

EZNA[®] HP Fungal DNA Kit, Omega 公司; 2×Rapid Taq Plus Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

日光灯(15 W)、黑光灯(365 nm)、紫外灯(254 nm), 贵州卓一生物科技有限公司; 超净工作台, 青岛海尔生物医疗股份有限公司; 生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; PCR 仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

1.4 病原菌的分离与鉴定

通过组织分离法对病原菌进行分离培养, 取果实病健交界处 0.5 cm×0.5 cm 组织, 置于 75%酒精表面消毒 50 s, 无菌水漂洗 3 次, 吸干水分, 转移至 PDA 培养基于 25 °C 培养箱培养, 待组织长出菌丝后, 通过牙签挑取菌落边缘菌丝进行纯化培养, 直至菌落形态稳定, 获得分离株 JY-1。选取健康的红阳猕猴桃果实, 用 75%酒精擦拭消毒后, 无菌水冲洗 3 次, 晾干备用。用无菌接种针轻刺果实表皮 5 次, 刺伤深度 1–2 mm, 使用 5 mm 的打孔器在培养 3 d 的菌株 JY-1 上获取菌饼, 将菌丝面紧贴果实伤口, 以无菌 PDA 培养基为对照。随后用无菌脱脂棉保湿后于 25 °C 光照培养箱进行 16 h:8 h 光暗培养, 观察发病情况。待发病后对病部进行病菌再分离和鉴定^[13]。

采用 EZNA[®] HP Fungal DNA Kit 提取基因组 DNA, 分别用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGG TGAACCTGCGC-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3')、EF1-728 (5'-CATCGAGAA GTTCGAGAAGG-3')和 EF1-986 (5'-TACTTGAA GGAACCCTTACC-3')、Bt2a (5'-CGGTAACAA CTGGGCCAAGG-3')和 Bt2b (5'-CCTGGTACT GCTGGTACTCAG-3')对病原菌 ITS 区域、 β -tubulin (TUB)和 EF-1 α (EF)基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 2×Rapid Taq Plus Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。扩增产物经 1%琼脂凝胶电泳检测后送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对后, 将 3 个基因片段串联, 最

后形成 1 个多序列匹配排列阵。基于 MEGA 7.0 工具采用邻接法构建系统发育树, bootstrap 值设计为 1 000^[14]。

1.5 诱导产孢的方法

1.5.1 不同培养基诱导产孢

将供试菌株分别接种于 PDA、OA 和 PSA 培养基上, 置于 28 °C 恒温培养箱中黑暗培养, 待菌落生长面积至 9 cm 培养皿的 2/3 时, 刮掉菌丝, 继续置于恒温培养箱中。15 d 后观察产孢情况, 并记录在不同培养基上产生分生孢子器的数量, 每个处理 3 次重复。

1.5.2 不同光照时长诱导产孢

将供试菌株接种在 PDA 培养基上, 28 °C 黑暗条件下进行培养, 待菌落生长面积至 9 cm 培养皿的 2/3 时, 刮掉菌丝。将其分别置于 24 h 光照、24 h 黑暗、12 h 光暗交替的 28 °C 恒温培养箱中培养, 光照由 15 W 的日光灯产生。15 d 后观察产孢情况, 并记录该病原菌在不同光照时长下产生分生孢子器的数量, 每个处理 3 次重复。

1.5.3 不同波长的光诱导产孢

将供试菌株接种在 PDA 培养基上, 28 °C 黑暗条件下进行培养, 待菌落生长面积至 9 cm 培养皿的 2/3 时, 刮掉菌丝。将其分别在 365 nm 黑光灯照射 2 d、254 nm 紫外灯照射 10 min 后, 置于 28 °C 恒温培养箱中全光照培养。15 d 后观察产孢情况, 并记录该病原菌在不同波长的光照射时产生分生孢子器的数量, 每个处理 3 次重复。

1.5.4 分生孢子的产量、大小和萌发率的测定

在各诱导产孢处理中随机取 20 个分生孢子器放入 1.5 mL 的离心管中, 然后加入 1 mL 的无菌水, 将分生孢子器捣碎, 用 100 目尼龙纱布过滤得到孢子悬浮液。取 20 μ L 悬浮液滴在血球计数板上计数, 在显微镜下观察孢子形态并测量大小, 后将孢子悬浮液置于 28 °C 培养箱中培养 12 h 观察分生孢子并计算萌发率。

$$\text{分生孢子萌发率(\%)} = \frac{\text{分生孢子萌发总数}}{\text{分生孢子总数}} \times 100。$$

1.6 数据处理

数据采用 Microsoft Excel 2018 与 SPSS 26.0 进行整理与统计分析, 通过单因素方差分析和邓肯检验($P < 0.05$)比较显著性。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与鉴定结果

猕猴桃软腐病自然发病果实上的病斑呈黄褐色、水渍状、圆形或椭圆形(图 1A)。从病斑上分离得到了形态一致的菌株, 命名为 JY-1, 将 JY-1 菌饼接种至健康猕猴桃果实后产生的病斑与自然发病的症状一致(图 1B)。该菌株在 PDA 培养基上培养 5 d 后菌落呈灰褐色, 气生菌丝茂盛, 呈绒毛状, 垂直于培养基生长(图 1C); 刮去菌丝后在 24 h 光照培养 15 d, 产生分生孢子器(图 1D), 内有大量分生孢子(图 1E), 其分生孢子呈椭圆形, 无色透明, 近棒状(图 1F)。分别将菌株 JY-1 的 ITS、TUB 和 EF 基因序列进行 BLAST 比对, 结果显示该菌株与葡萄座腔菌相似性较高, 将上述序列提交至 GenBank, 分别获得了登录号 MZ317525、MZ363819 和 MZ368755。ITS-TUB-EF 多基因系统发育树结果表明, 菌株 JY-1 与已知的葡萄座腔菌菌株 BOO046、CBS110302 和 L9E2、N14 处于同一分支(图 2), 结合形态学特征和分子生物学特征, 将引致贵州猕猴桃软腐病的菌株 JY-1 鉴定为葡萄座腔菌。

2.2 不同培养基对葡萄座腔菌产孢的影响

通过 3 种培养基对葡萄座腔菌诱导产孢, 发现葡萄座腔菌在 3 种培养基上均能产生分生孢子器(图 3)。在 PDA 培养基上产生的分生孢子器最多, 平均每皿可达 58 个分生孢子器; 其次是在 OA 培养基, 平均每皿 40 个分生孢子器; PSA 培养基上产生的最少, 平均每皿 39 个分生孢子器(图 4A)。在 3 种培养基上产生的分生孢子大小、浓度及萌发率差异不显著(图 4B、4C, 表 1)。结果表明葡萄座腔菌在 PDA 培养基上产



图 1 猕猴桃软腐病症状与病原菌形态学特征 A: 自然发病的猕猴桃; B: 健康猕猴桃果实接种 JY-1 菌饼 5 d 后出现的病斑; C: 菌株 JY-1 在 PDA 培养基生长 5 d 的菌落形态; D: 菌株 JY-1 在 24 h 光照培养 15 d 产生的分生孢子器; E: 菌株 JY-1 的分生孢子器含大量分生孢子; F: 菌株 JY-1 的分生孢子。Figure 1 Disease symptoms of kiwifruit soft rot and characterization of pathogens. A: Naturally occurred soft rot kiwifruit; B: The lesions formed on kiwifruit after 5 d of inoculation with strain JY-1 mycelial plug; C: The colony morphology of strain JY-1 growing on PDA medium for 5 d was observed; D: Strain JY-1 produced pycnidia after 15 d of 24 h light culture; E: Conidia in the pycnidia of strain JY-1; F: Conidia of the strain JY-1. Bar=50 μ m.

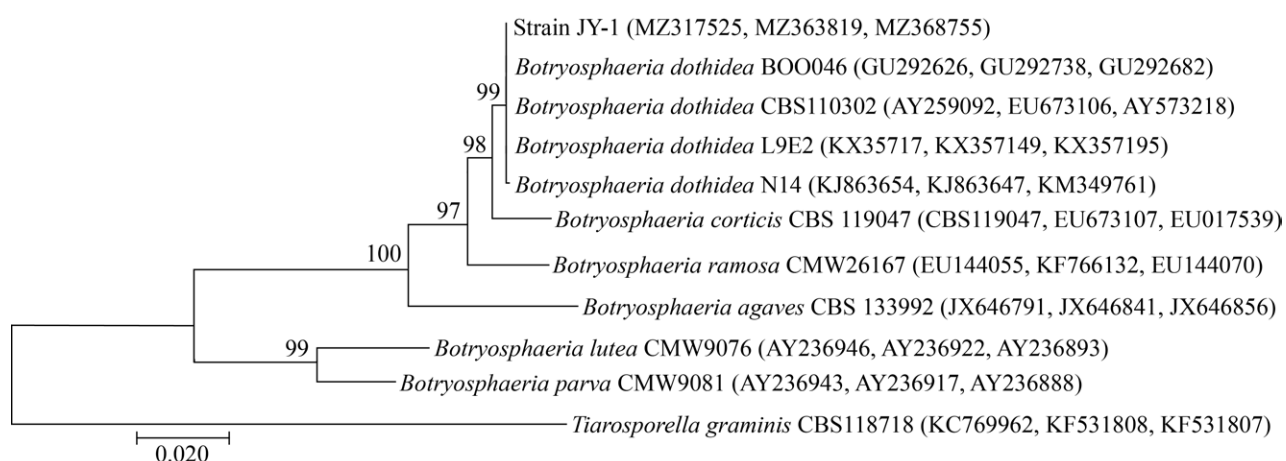


图 2 基于 ITS-TUB-EF 序列构建的菌株 JY-1 的系统发育树 括号内分别表示菌株 ITS、TUB 和 EF 基因的 GenBank 登录号; 节点处标注 bootstrap 支持度值 $\geq 50\%$; 标尺 0.020 代表序列的进化差异。Figure 2 The phylogenetic tree of strain JY-1 was constructed based on ITS-TUB-EF sequence. The GenBank sequence numbers of ITS, TUB and EF genes of the strains were indicated in parentheses; Bootstrap support value $\geq 50\%$ was marked at the nodes; The scale 0.020 represented the evolutionary difference of the sequences.

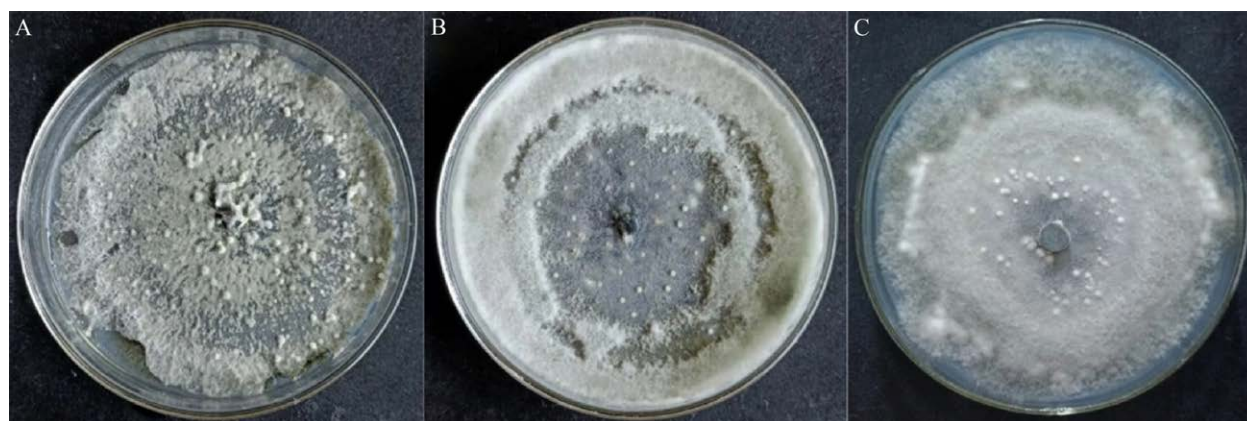


图3 不同培养基诱导葡萄座腔菌的产孢(15 d) A: 马铃薯葡萄糖琼脂; B: 燕麦琼脂; C: 马铃薯蔗糖琼脂。

Figure 3 Different media induced sporulation of *Botryosphaeria dothidea* (15 d). A: PDA; B: OA; C: PSA.

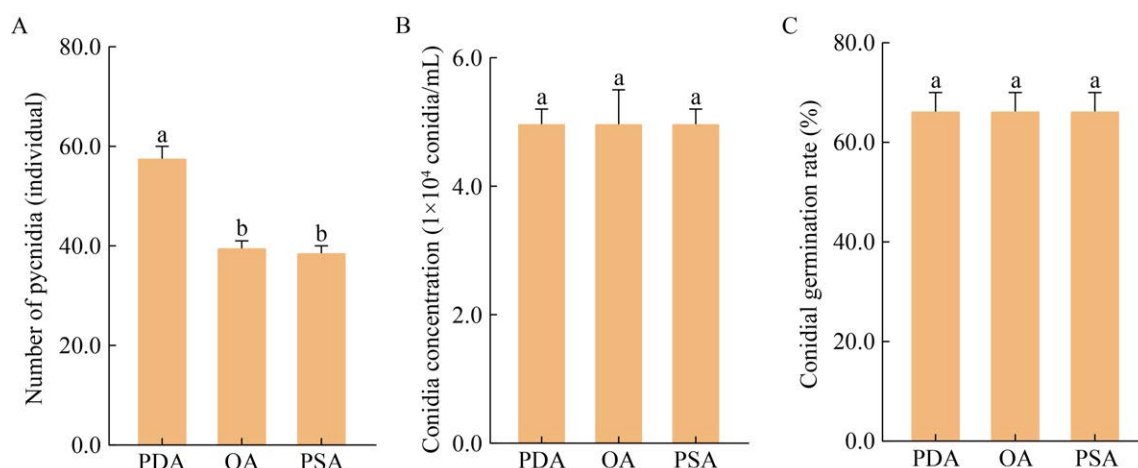


图4 不同培养基对葡萄座腔菌分生孢子器数量(A)、分生孢子浓度(B)和萌发率(C)的影响 不同小写字母表示差异显著。

Figure 4 Effects of different media on the number (A), concentration (B) and germination rate (C) of conidia of *Botryosphaeria dothidea*. Different lowercase letters represent significant differences.

生分生孢子器的数量最多, 后续试验将以 PDA 为基础营养培养基。

2.3 不同光照时长对葡萄座腔菌产孢的影响

葡萄座腔菌在 3 种光照条件上均能产生分生孢子器(图 5), 但是在 3 种光照条件产生的分生孢子器的数量有所差异。在 24 h 光照条件下产生的最多, 平均每皿 130 个分生孢子器, 在

24 h 黑暗条件下产生的最少, 平均每皿 58 个分生孢子器(图 6A)。在 24 h 光照、24 h 黑暗、12 h 光暗交替 3 种不同光照时长产生的分生孢子浓度存在差异分别为 2.5×10^5 、 0.5×10^5 、 1.5×10^5 个/mL (图 6B), 其分生孢子大小及萌发率差异不显著 (图 6C, 表 2)。结果表明葡萄座腔菌在 24 h 光照条件下产生分生孢子器的数量最多、分生孢子的浓度最高。

表 1 不同培养基对葡萄座腔菌分生孢子大小的影响

Table 1 Effects of different media on the size of conidia of *Botryosphaeria dothidea*

不同培养基 Different medium	分生孢子大小 Conidia size (μm)	
	长 Length	宽 Width
PDA	25.539±2.230a	7.157±1.424a
OA	25.369±0.453a	6.683±1.135a
PSA	24.571±1.857a	6.004±1.125a

表中数据为平均值±标准差，不同小写字母表示不同培养基对分生孢子大小的影响差异显著。

The data in the table are mean±SD. Different lowercase letters indicate that the effect of different media on conidial size is significantly different.

2.4 不同波长的光对葡萄座腔菌产孢的影响

365 nm 黑光灯、254 nm 紫外灯均能诱导葡萄座腔菌产生分生孢子器(图 7)，在紫外灯照射下平均每皿有 91 个分生孢子器，黑光灯照射下平均每皿有 69 个分生孢子器(图 8A)。在黑光灯、紫外灯照射下 2 种不同波长的光产生的分生孢子浓度存在差异，分别为 0.5×10^5 个/mL、 1×10^5 个/mL (图 8B)，其分生孢子大小及萌发率差异不显著(图 8C，表 3)。结果表明，相较于黑光灯照射，葡萄座腔菌在紫外灯照射下产生分生孢子器的数量最多、分生孢子的浓度最高。



图 5 不同光照时长诱导葡萄座腔菌的产孢(15 d) A: 24 h 光照; B: 24 h 黑暗; C: 12 h 光暗交替。
Figure 5 Sporulation of *Botryosphaeria dothidea* induced by different light durations (15 d). A: 24 h light; B: 24 h dark; C: 12 h light/12 h dark alternation.

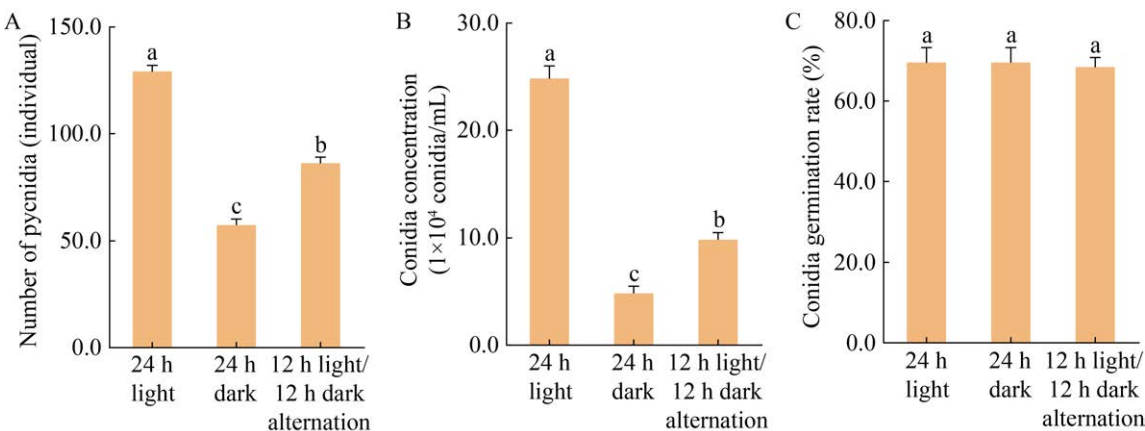


图 6 不同光照时长对葡萄座腔菌分生孢子器数量(A)、分生孢子浓度(B)和萌发率(C)的影响 不同小写字母表示差异显著。

Figure 6 Effects of different light durations on the number (A), concentration (B) and germination rate (C) of conidia of *Botryosphaeria dothidea*. Different lowercase letters represent significant differences.

表 2 不同光照时长对葡萄座腔菌分生孢子大小的影响

Table 2 Effects of different light durations on the size of conidia of *Botryosphaeria dothidea*

不同光照时长 Different light duration	分生孢子大小 Conidia size (μm)	
	长 Length	宽 Width
24 h 光照 24 h light	26.562±0.820a	6.620±0.568a
24 h 黑暗 24 h dark	25.410±2.574a	6.004±1.254a
12 h 光暗交替 12 h light/12 h dark alternation	24.563±2.383a	6.231±1.120a

表中数据为平均值±标准差, 不同小写字母表示不同光照时长对分生孢子大小的影响差异显著。

The data in the table are mean±SD. Different lowercase letters indicate that the effect of different light durations on conidial size is significantly different.

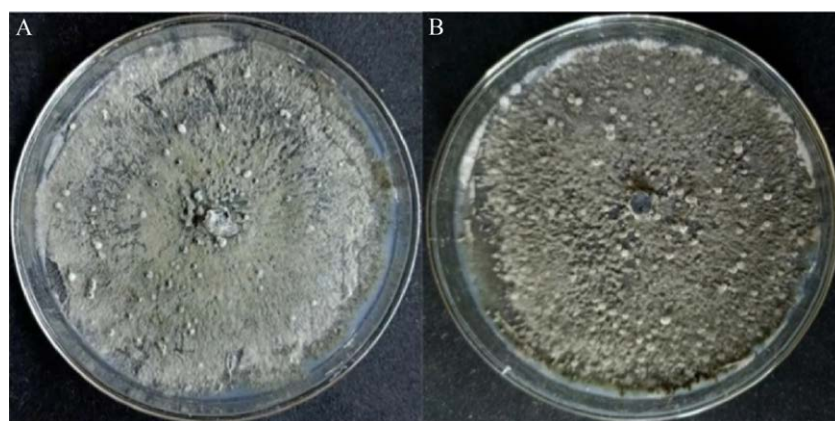


图 7 不同波长的光诱导葡萄座腔菌产孢(15 d) A: 365 nm 黑光灯; B: 254 nm 紫外灯。

Figure 7 Sporulation of *Botryosphaeria dothidea* induced by different wavelengths of light (15 d). A: 365 nm black light; B: 254 nm ultraviolet light.

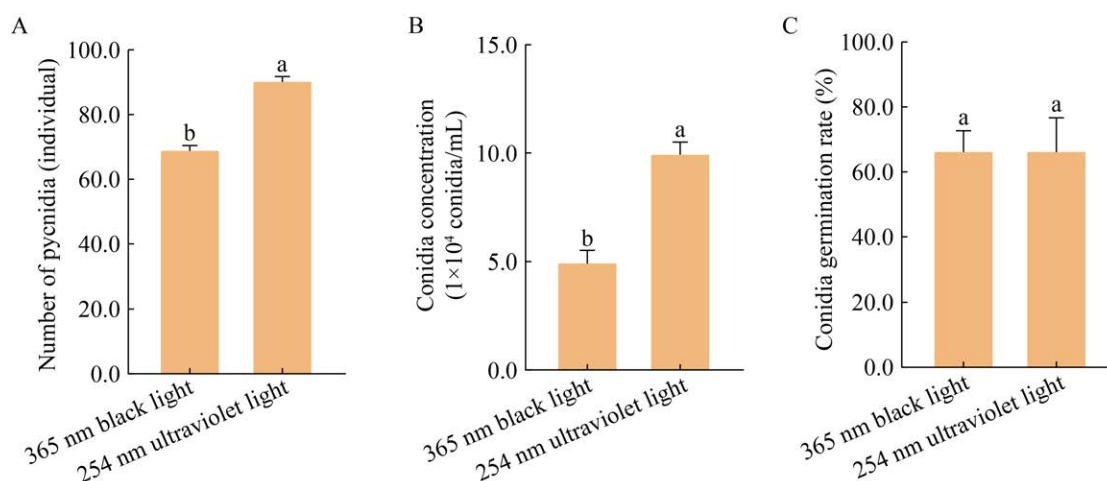


图 8 不同波长的光对葡萄座腔菌分生孢子器数量(A)、分生孢子浓度(B)和萌发率(C)的影响 不同小写字母表示差异显著。

Figure 8 Effects of different wavelengths of light on the number (A), concentration (B) and germination rate (C) of conidia of *Botryosphaeria dothidea*. Different lowercase letters represent significant differences $P<0.05$.

表 3 不同波长的光对葡萄座腔菌分生孢子大小的影响

Table 3 Effects of different wavelengths of light on the size of conidia of *Botryosphaeria dothidea*

不同波长的光 Different wave length	分生孢子大小 Conidia size (μm)	
	长 Length	宽 Width
365 nm 黑光灯 254 nm black light	26.239±1.541a	6.112±0.814a
254 nm 紫外灯 254 nm ultraviolet light	26.248±0.434a	6.231±1.120a

表中数据为平均值±标准差,不同小写字母表示不同波长的光对分生孢子大小的影响差异显著。

The data in the table are mean±SD. Different lowercase letters indicate that the effect of different wavelengths of light on conidial size is significantly different.

3 讨论

软腐病是导致猕猴桃采后腐烂变质的重要病害之一,目前在国内外猕猴桃主产区均有发生,造成了巨大的经济损失^[15]。为明确引起猕猴桃软腐病的病原菌种类,以制定安全有效的防控措施,本研究通过组织分离和柯赫氏法则测定,获得了一株病原菌 JY-1,其引起的病害特征与自然发病的猕猴桃软腐病症状相同。经过形态学特征和 ITS-TUB-EF 多基因序列分析,将该病原菌鉴定为葡萄座腔菌(*B. dothidea*)。为摸清该菌的产孢最适条件,以便获得大量分生孢子用于后续的遗传转化和致病机制研究,本文还测定了不同培养基、不同光照时长、不同波长的光对猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌诱导产孢的影响,明确了 PDA 培养基和 24 h 光照培养是猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌最适产孢条件。

引起猕猴桃软腐病的病原菌种类较为复杂,主要包括葡萄座腔菌(*B. dothidea*)、青霉菌(*Penicillium* sp.)、链格孢菌(*A. alternata*)、可可毛色二孢菌(*L. theobromae*)、小新壳梭孢菌(*N. parvum*)等^[5]。传统的研究中,对猕猴桃软腐病病原菌的鉴定主要基于病原菌形态学特征和单基因分子系统学分析结果,然而,仅依靠单基因序列对病原菌进行系统发育分析是不准确的,会导致病原菌分类错误^[16-17]。为提高病原

菌鉴定的准确性,需将病菌菌落特征、产孢特点以及多基因分子系统学进行综合分析^[18]。本研究基于 3 个基因的序列特点,构建了包含 ITS 区域、 β -tubulin (*TUB*)和 *EF-1 α* (*EF*)基因的系统发育树,结合形态学特征,最终将菌株 JY-1 鉴定为葡萄座腔菌(*B. dothidea*)。Li 等^[18]对中国 11 个猕猴桃主产区的软腐病分析发现,葡萄座腔菌是引起猕猴桃软腐病的主要致病菌,其平均发病率约 23.7%。因此,对猕猴桃软腐病的有效防控离不开对葡萄座腔菌生物学特性和侵染机制的深入研究。

分生孢子是葡萄座腔菌的主要接种体,作为猕猴桃软腐病次年发生的初侵染源之一,对病害的发生、发展与传播起着至关重要的作用^[10,18]。然而,葡萄座腔菌在常规培养上不易产生分生孢子,这严重阻碍了对该菌致病机理的研究^[19-20]。鉴于此,本研究通过室内试验,测定不同培养基(PDA, OA, PSA)、不同光照时长(24 h 光照、24 h 黑暗、12 h 光暗交替)和不同波长的光(365 nm 黑光灯、254 nm 紫外灯)明确室内诱导猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌大量产孢的方法。结果表明,PDA 培养基是猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌诱导产孢的最适培养基。这与张定法等^[12]对苹果轮纹病菌葡萄座腔菌分生孢子器产生条件和王谦等^[20]对引起茶叶叶部病害病原菌葡萄座腔菌诱导产孢的研究结果不同,他们均发现 OA 培养基是葡萄座腔菌产孢的最适培养基,反而在 PDA 培养基和 PSA 培养基上产孢较少。这可能是由于猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌从富含多糖物质的猕猴桃果实中分离,而不是从植物枝干或叶片中分离得到;并且葡萄糖是呼吸作用中的直接供能物质,更利于猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌的吸收利用。因此,PDA 培养基更能模拟猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌的自然生长环境,有助于该菌产孢。

在确定 PDA 作为基础营养培养基后,本研究进一步探讨了不同光照条件(24 h 光照、24 h 黑暗、12 h 光暗交替)和不同波长的光(365 nm

黑光灯、254 nm 紫外灯)对猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌产孢的诱导效果。结果发现, 尽管不同波长的光也能诱导猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌产孢, 但该菌在 24 h 光照条件下产生分生孢子器数量最多, 分生孢子浓度最高。这与前人所报道的光照对分生孢子器和分生孢子形成影响极大, 完全光照下更能促进分生孢子器和分生孢子产生的结果^[21]一致。但是, 张定法等^[12]和刘媛媛等^[21]研究发现 12 h 光暗交替最有利于苹果轮纹病菌葡萄座腔菌分生孢子器的产生, 这可能是由于苹果轮纹病主要是枝干病害, 12 h 光暗交替模拟了自然界中的日夜更替, 这种条件更适于从枝干中分离到的苹果轮纹病菌葡萄座腔菌的产孢。不同波长的光也能诱导猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌产孢, 这与张倩等^[22]对甜樱桃流胶病的致病菌葡萄座腔菌和冷伟锋等^[23]对苹果轮纹病菌葡萄座腔菌的研究结果一致。

由此可见, 不同寄主来源的葡萄座腔菌的生物学特性存在差异, 诱导产孢方法也不尽相同。这可能是因为菌株在与寄主长期协同进化过程中不断受到来自寄主的选择压力, 因而形成了不同的生物学特性。因此, 对葡萄座腔菌进行诱导产孢时, 应考虑菌株的寄主来源, 参考同寄主菌株诱导产孢条件。

4 结论

本研究通过形态学特征及 ITS-TUB-EF 多基因序列分析, 鉴定出贵州省猕猴桃软腐病的病原菌为葡萄座腔菌(*B. dothidea*); 明确了 PDA 培养基和 24 h 光照培养是诱导猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌产孢的最适条件。研究结果有助于深入理解葡萄座腔菌的生物学特性, 为后续深入研究猕猴桃软腐病的发生机制提供了科学依据。

作者贡献声明

宋金黄: 完成主体实验、数据分析及论文撰写; 张丽华: 参与实验数据收集; 谭红: 参与实验数据收集; 樊荣: 负责论文框架设计、

实验和论文写作指导、参与全文的审阅和修改、把关数据和结论的准确性。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 杜奎, 王丽华, 张茜, 谢玥, 李利军, 庄启国, 李峤虹, 李明章, 王永志. 中华猕猴桃与软枣猕猴桃种间杂交亲本的筛选[J]. 资源开发与市场, 2022, 38(6): 739-744.
DU K, WANG LH, ZHANG Q, XIE Y, LI LJ, ZHUANG QG, LI QH, LI MZ, WANG YZ. Parent screening of interspecific hybridization between *Actinidia chinensis* and *A. arguta*[J]. Resource Development & Market, 2022, 38(6): 739-744 (in Chinese).
- [2] 姜正旺, 钟彩虹. 试论猕猴桃科普与果实品质提升的重要性[J]. 中国果树, 2020(1): 1-8.
JIANG ZW, ZHONG CH. A comprehensive understanding with the importance of popular science knowledge to the kiwifruit quality improvement[J]. China Fruits, 2020(1): 1-8 (in Chinese).
- [3] 封露, 陈凡可, 林杨, 程家森, 谢甲涛, 付艳苹. 我国主产区猕猴桃采后腐烂病原多样性研究[J]. 植物病理学报, 2022, 52(1): 1-8.
FENG L, CHEN FK, LIN Y, CHENG JS, XIE JT, FU YP. Pathogen diversity of postharvest diseases of kiwifruit at major cultivation areas in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2022, 52(1): 1-8 (in Chinese).
- [4] 肖刘华, 康乃慧, 李树成, 郑致远, 罗绕绕, 陈金印, 陈明, 向妙莲. 茉莉酸甲酯对猕猴桃果实抗葡萄座腔菌过程中能量代谢和膜脂代谢的影响[J]. 中国农业科学, 2024, 57(7): 1377-1393.
XIAO LH, KANG NH, LI SC, ZHENG ZY, LUO RR, CHEN JY, CHEN M, XIANG ML. Effect of methyl jasmonate on energy metabolism and membrane lipid metabolism during resistance to *Botryosphaeria dothidea* in kiwifruit[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2024, 57(7): 1377-1393 (in Chinese).
- [5] 吴文能, 张起, 雷霁卿, 黄亚欣, 陈晨蕴, 王瑞, 曹森. ‘贵长’猕猴桃软腐病病原菌分离鉴定及抑菌药剂筛选[J]. 北方园艺, 2018(16): 47-54.
WU WN, ZHANG Q, LEI JQ, HUANG YX, CHEN CW, WANG R, CAO S. Identification and pharmaceutical screening of kiwifruit soft rot disease on ‘Guichang’ gooseberry[J]. Northern Horticulture, 2018(16): 47-54 (in Chinese).
- [6] REN YL, WANG T, TANG J, JIANG YJ, HUANG YX, ZHANG CP, PENG J, WANG J, WANG SS, WANG J. Identification of the pathogens and laboratory bioactivity determination of the rot disease of kiwifruit (*Actinidia* spp.)[J]. Journal of Chemistry, 2022, 2022(1): 2293297.
- [7] SLIPPERS B, WINGFIELD MJ. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact[J]. Fungal Biology

- Reviews, 2007, 21(2/3): 90-106.
- [8] LIU HX, LI XD, ZHU XP, LIU AX. First report of pomegranate stem scab caused by *Botryosphaeria dothidea* in China[J]. Plant Pathology, 2009, 58(2): 400.
- [9] MARSBERG A, KEMLER M, JAMI F, NAGEL JH, POSTMA-SMIDT A, NAIDOO S, WINGFIELD MJ, CROUS PW, SPATAFORA JW, HESSE CN, ROBBERTSE B, SLIPPERS B. *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health[J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(4): 477-488.
- [10] SONG JH, SHU YY, ZHENG YF, ZHAO ZB, LONG YH, FAN R. Construction and infection characteristics of a GFP-labelled *Botryosphaeria dothidea* causing kiwifruit soft rot disease[J]. Plant Pathology, 2025, 74(3): 746-757.
- [11] 王英, 师校欣, 杜国强. 苹果轮纹病病菌分生孢子离体人工诱导技术研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(1): 194-197.
WANG Y, SHI XX, DU GQ. Studied on techniques of conidiophores inducing culture *in vitro* in apple ring spot[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(1): 194-197 (in Chinese).
- [12] 张定法, 刘起丽, 张建新, 朱冬丽, 秦伊晓. 苹果轮纹病菌分生孢子器产生条件研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(6): 214-216.
ZHANG DF, LIU QL, ZHANG JX, ZHU DL, QIN YX. Study on the conditions of pycnidium production of *Physalospora piricola*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2008, 17(6): 214-216 (in Chinese).
- [13] 瞿光凡, 王瑞, 马超, 雷霖卿, 巴良杰, 曹森, 牟婷婷, 龙芳. ‘东红’猕猴桃软腐病病原菌的分离鉴定及褪黑素对其控制效果[J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 170-177.
QU GF, WANG R, MA C, LEI JQ, BA LJ, CAO S, MI TT, LONG F. Isolation and identification of the pathogens of ‘east red’ kiwifruit soft rot and its control effect by melatonin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 170-177 (in Chinese).
- [14] 王小洁, 李士谣, 李亚巍, 何容, 朱立武, 刘普. 猕猴桃软腐病病原菌的分离鉴定及其防治药剂筛选[J]. 植物保护学报, 2017, 44(5): 826-832.
WANG XJ, LI SY, LI YW, HE R, ZHU LW, LIU P. Pathogen identification of kiwifruit soft rot and fungicide screening for control of the disease[J]. Journal of Plant Protection, 2017, 44(5): 826-832 (in Chinese).
- [15] 左盼盼, 付苏, 彭丽桃, 范刚, 杨书珍, 李杰. 猕猴桃采后软腐病病原菌鉴定及香芹酚对其控制效果[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(6): 15-22.
ZUO PP, FU S, PENG LT, FAN G, YANG SZ, LI J. Identification of soft rot pathogens in postharvest kiwifruit and its control effect by carvacrol[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(6): 15-22 (in Chinese).
- [16] 李黎, 陈美艳, 张鹏, 韩飞, 刘小莉, 钟彩虹. 猕猴桃软腐病的病原菌鉴定[J]. 植物保护学报, 2016, 43(3): 527-528.
LI L, CHEN MY, ZHANG P, HAN F, LIU XL, ZHONG CH. Identification of the pathogen causing fruit soft rot on kiwifruit[J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(3): 527-528 (in Chinese).
- [17] ZHOU Y, GONG GS, CUI YL, ZHANG DX, CHANG XL, HU RP, LIU N, SUN XF. Identification of *Botryosphaeriaceae* species causing kiwifruit rot in Sichuan Province, China[J]. Plant Disease, 2015, 99(5): 699-708.
- [18] LI L, PAN H, CHEN MY, ZHANG SJ, ZHONG CH. Isolation and identification of pathogenic fungi causing postharvest fruit rot of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in China[J]. Journal of Phytopathology, 2017, 165(11/12): 782-790.
- [19] 李诚, 蒋军喜, 冷建华, 李帮明, 余强, 涂贵庆. 猕猴桃枝枯病病原菌鉴定[J]. 北方园艺, 2013(24): 130-133.
LI C, JIANG JX, LENG JH, LI BM, YU Q, TU GQ. Identification of the pathogen causing shoot blight of kiwifruit[J]. Northern Horticulture, 2013(24): 130-133 (in Chinese).
- [20] 王谦, 尹舒蕾, 尹慧存, 占欣如, 苗方愉, 赵丹. 茶树病害病原菌 *Botryosphaeria dothidea* 生物学特性研究[J]. 农业技术与装备, 2024(3): 186-188.
WANG Q, YIN SL, YIN HC, ZHAN XR, MIAO FY, ZHAO D. Tea plant disease-causing bacteria study on the biological characteristics of *Botryosphaeria dothidea*[J]. Agricultural Technology & Equipment, 2024(3): 186-188 (in Chinese).
- [21] 刘媛媛, 牟洪香, 庞久帅, 李会平. 诱导苹果轮纹病菌大量产生分生孢子器的方法[J]. 植物保护学报, 2019, 46(4): 935-936.
LIU YY, MU HX, PANG JS, LI HP. The methods for inducing a large number of pycnidia of *Botryosphaeria dothidea*[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(4): 935-936 (in Chinese).
- [22] 张倩, 李阳, 杨埔, 张嘉慧, 马志辉, 张丽珍. 甜樱桃葡萄座腔菌的生物学特性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 101-106.
ZHANG Q, LI Y, YANG P, ZHANG JH, MA ZH, ZHANG LZ. Biological characteristics of *Botryosphaeria dothidea* from sweet cherry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(10): 101-106 (in Chinese).
- [23] 冷伟锋, 李保华, 国立耘, 董娟华, 王彩霞, 李桂舫, 董向丽. 苹果轮纹病菌诱导产孢方法[J]. 植物病理学报, 2009, 39(5): 88-91.
LENG WF, LI BH, GUO LY, DONG JH, WANG CX, LI GF, DONG XL. Method to promote sporulation of *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(5): 88-91 (in Chinese).