

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2026.01.005

广东香水柠檬果实白皮病病原鉴定

林接英, 崔一平, 黄峰, 凌金锋, 宋晓兵

广东省农业科学院植物保护研究所/农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室/
广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640

摘要: 为明确广东省香水柠檬果实白皮病的病原, 采用常规组织分离法, 对患有白皮病的香水柠檬果实进行分离鉴定。基于 ITS、LSU 和 TUB2 基因序列联合构建的系统发育分析结果显示, 分离自柠檬果实上的 NM005 菌株与 *Didymella americana* 聚在一个进化支上, 在最大似然法系统发育树进化支上支持率为 82%, 在贝叶斯系统发育树进化支上支持率为 88%。同时, 根据柯赫氏法则对分离菌株 NM005 进行致病性测定, 结果显示, 该菌株可以使健康果实发病, 且症状与大田症状相似。从接种后发病的果实上再次分离得到的菌株与接种菌的形态特征一致, 说明原分离菌为引起柠檬果实白皮病的病原菌。经形态学及分子生物学鉴定, 确定分离菌株为 *Didymella americana*。该发现为香水柠檬果实白皮病的田间防治提供了理论依据。

关键词: 香水柠檬, 白皮病, 病原菌,

Didymella americana, 致病性测定

中图分类号: S476.1

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2026)01-0051-06

Identification of the Pathogen Causing White Scaled Blotch of *Citrus × limon* Fruit in Guangdong

LIN Jieying, CUI Yiping, HUANG Feng,
LING Jinfeng, SONG Xiaobing

Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/

Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China/

Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ Guangdong Provincial Key Laboratory of

High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China

Abstract: To determine the types of pathogenic fungus of causing suspected white peel disease

收稿日期: 2025-09-12

基金项目: 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目(2024CXTD10), 广州市农村科技特派员项目(2024E04J0667)。

作者简介: 林接英, 硕士, 主要从事柑橘病害防治研究。

通信作者: 宋晓兵, 研究员。

on the fruits of the *Citrus × limon* in Guangdong Province, isolated and identification the diseased fruits were collected by using the conventional tissue isolation method. Based on the phylogenetic analysis jointly constructed from the *ITS*, *LSU* and *TUB2* gene sequences, the results showed that the NM005 strain isolated from *Citrus × limon* fruits clustered with *Didymella americana* on an evolutionary branch, with a support rate of 82% on the maximum likelihood phylogenetic tree and 88% on the MrBayes phylogenetic tree. At the same time, the pathogenicity of the isolates was determined according to Koch's rule, and the result showed that this strain could cause diseases in healthy fruits, and the symptoms were similar to those in the field. The strains re-isolated from the inoculated diseased fruits were consistent with the morphological characteristics of the inoculated fungi, indicating that the original isolated fungus were the pathogenic fungi causing white peel disease on *Citrus × limon* fruits. Through morphological and molecular biological identification, the isolated strain was identified to be *Didymella americana*. The results of this study provide a theoretical basis for the field control of white peel disease on *Citrus × limon* fruits and ensures the healthy development of the perfume lemon industry.

Key words: *Citrus × limon*, white peel disease, pathogen fungus, *Didymella americana*, pathogenicity identification

香水柠檬(*Citrus × limon* ‘Rosso’)是一种重要的经济作物,属芸香科柑橘属常绿小乔木,果实长圆形,无核,在我国台湾、广东、云南等地均有种植。因其具有香气独特、营养价值高,且完全没有酸涩味道,故被称为“香水柠檬”^[1-2]。

近年来,随着香水柠檬的种植面积不断扩大,病虫害问题日益严重。作为一种重要的经济作物,其果实品质直接影响产业发展。近年来,一种在香水柠檬果实上出现的病害暴发成灾,表现为果实表面出现灰白色且粗糙的痂皮状病斑,逐渐扩大直至布满果面,导致果实外观和品质严重下降,口感和营养价值也受到影响,严重影响了果实的商品价值。加之引发该病害的病原菌未得到明确鉴定,导致病害防控缺乏针对性。本研究旨在明确引起该病害的病原菌,以便采取有效的防治措施,为后续病害防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试培养基

马铃薯琼脂培养基(PDA)为广东环凯微生物科技有限公司产品;燕麦琼脂(OA)为上海保藏微生物有限公司产品;麦芽浸粉琼脂培养基(MEA)为青岛高科技工业园海博生物技术有限公司产品。

1.2 样品采集及病原菌的分离与纯化

柠檬果实采自广东省农业科学院植物保护研究所大丰试验基地,从香水柠檬果树上采集具有典型病害症状的果实,观察并记录病害症状及特征。

采用常规组织分离法分离,取患病果实表皮,切成小块,消毒晾干后移至PDA平板上,于25℃恒温培养^[3]。5d后,采用顶端菌丝法对其进行纯化。待菌落长出后,切取边缘菌丝移至新的PDA平板上培养1~2d后,再次切取边缘菌丝至新的PDA培养基,重复以上操作,直至获得单一菌株,分别于4℃和-80℃条件下保存备用。

1.3 病原菌形态学鉴定

将纯化后的病原菌分别接种至PDA、OA和MEA培养基上,置于27℃培养箱中培养5~10d,观察并记录菌落特征及颜色^[4]。待OA平板上的菌落培养至表面长出黑色物质,挑取少量黑色

物质至载玻片上, 盖上盖玻片, 置于光学显微镜上观察其显微形态。

1.4 病原菌分子鉴定

将纯化菌接种至 PDA 培养基, 于 27 °C 培养箱中培养 4 d, 采用 SteadyPure 植物组 DNA 提取试剂盒(艾科瑞生物公司产品)提取菌株基因组 DNA, 以提取的 DNA 为模板, 使用 ITS (ITS1/ITS4)、LSU(LSU-LR0R/LSU-LR7)、TUB2(*Bt2a/Bt2b*)3 对引物对该 DNA 进行 PCR 扩增^[5]。

1.5 系统发育树的构建

参考 Luo 等^[5]的系统发育树, 从 NCBI 下载相关序列, 而后在 MAFFT 网站(<https://mafft.cbrc.jp/>)进行序列比对, 采用 BioEdit 软件进行序列剪切, 以 *Epicoccum camelliae*(CGM-CC 3.18343)作为外群, 在 CIPRES 网站(<http://www.phylo.org/>)采用两种方法构建系统发育树^[5-6], 即基于 RAxML-HPC2 on XSEDE (v8.2.8)的最大似然法(Maximum Likelihood, ML)和基于 MrBayes on XSEDE(v3.2.7a)的贝叶斯推断法(Bayesian Inference, BI)。

1.6 致病性测定

采用离体刺伤接种法和离体无伤接种法进行致病性测定。将备用菌株置于 PDA 平板上培养 3~5 d, 用直径 6 mm 的打孔器打出菌饼备用。

离体刺伤接种法: 使用无菌牙签在健康的柠檬果实表面以五点法方式打孔, 造成伤口, 将菌饼的菌丝面贴于伤口处; 离体无伤接种法: 将菌饼的菌丝面贴于健康的柠檬果实表面。以接种无菌的 PDA 作为对照, 每个处理接种 3 个果实。接种后的果实放置保鲜盒中, 于 25 °C 温室中保湿培养, 观察并记录发病情况。根据柯赫氏法则, 对发病的柠檬果实进行再分离培养, 观察分离得到的菌株与接种菌株的形态是否一致。

2 结果与分析

2.1 香水柠檬果实白皮病症状及致病性测定

染病果实表皮颜色异常、质地粗糙。初期出现半透明的不规则病斑, 而后病斑逐渐扩大, 颜色逐渐加深, 变成灰白色, 果面呈现出具有粗糙感的痂皮症状, 后期从边缘开始出现棕色或浅褐色痂皮, 严重影响果实外观和品质(图 1a~1b)。

接种病原菌的果实在接种 7 d 后呈现出染病症状, 果实接种部位初期出现白色半透明的光滑病斑, 而后病斑扩大, 颜色变成灰白色, 质地逐渐粗糙, 呈现与田间相似的发病症状(图 1c~1d)。



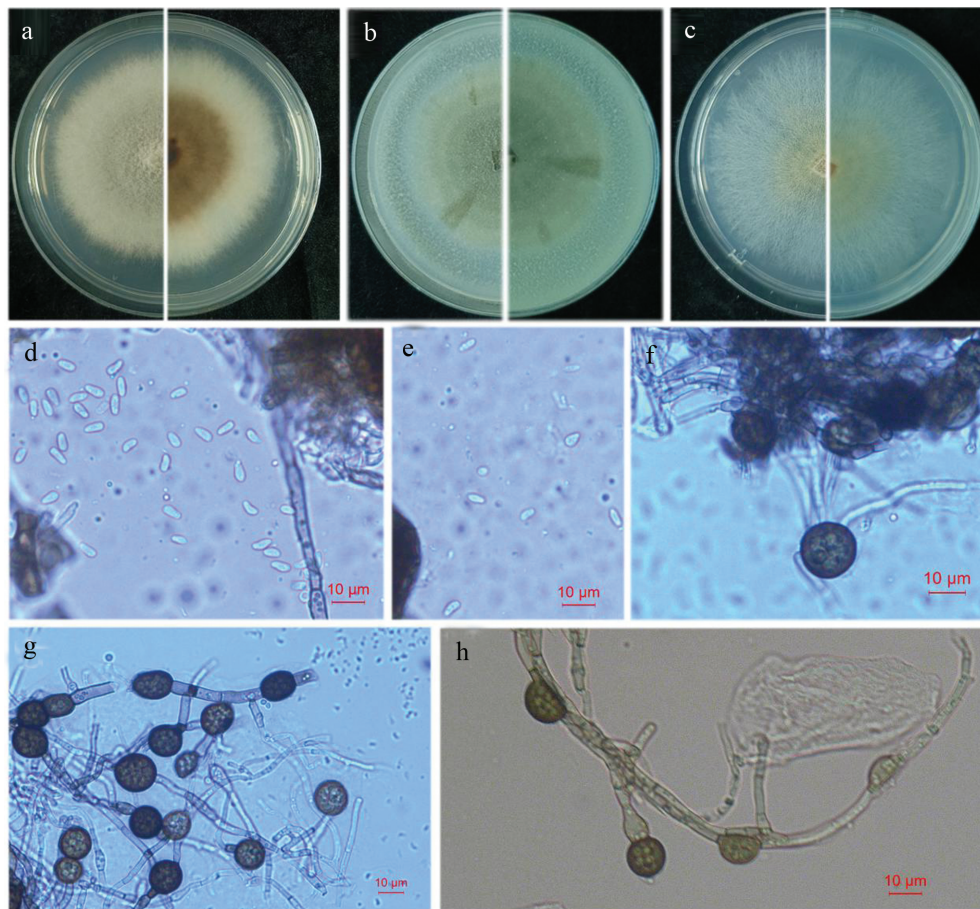
a~b: 田间症状; c~d: 接种 NM005 的果实发病症状

图 1 香水柠檬白皮病大田症状及接种 NM005 菌株的果实发病症状

2.2 香水柠檬果实白皮病病原菌的培养性状及显微形态

在 PDA 培养基上 NM005 菌株, 菌落呈圆形(图 2a), 正面最初为白色, 而后菌落逐渐变成

灰白色,且菌丝浓密。背面形似两个同心圆,边缘规则,呈灰白色,中间呈棕褐色;在OA培养基上菌落呈轮纹状(图2b),由外向内颜色由灰白色逐渐变成褐色,部分位置后期变成黑色;在MEA培养基上,菌落呈轮纹状(图2c),菌丝稀疏,菌落颜色由外向内由白色变成淡黄色。在OA培养基上培养7d,菌落长出黑色硬质点状物质和黑色菌丝。挑取黑色硬质点状物质至显微镜下观察,可看到分生孢子,分生孢子呈椭圆形或橄榄球形,无色,大小为 $1.79\ \mu\text{m}\times 4.37\ \mu\text{m}$ 至 $3.55\ \mu\text{m}\times 6.72\ \mu\text{m}$ ($n=35$)(图2d~2e);挑取黑色菌丝至显微镜下观察,可看到厚垣孢子,厚垣孢子散生、间生或顶生,多为单个圆形,黑色或褐色,直径为 $10.60\sim 16.35\ \mu\text{m}$ ($n=35$),少量椭圆形或梨形,偶有两个或两个以上粘连的情况(图2f~2h)。



a. PDA 培养基菌落形态(左:正面,右:反面); b. OA 培养基菌落形态(左:正面,右:反面);
c. MEA 培养基菌落形态(左:正面,右:反面); d~e: 分生孢子; f~h: 厚垣孢子; 比例尺为 1000:1

图2 NM005 菌株的形态特征

2.3 香水柠檬果实白皮病病原菌的分子鉴定

使用 *ITS* (引物 *ITS1/ITS4*)、*LSU* (引物 *LSU-LR0R/LSU-LR7*)、*TUB2* (引物 *Bt2a/Bt2b*) 3 对引物对 NM005 菌株的 DNA 进行 PCR 扩增,利用 NCBI 上下载的菌株序列(表 1)与 NM005 菌株序列,基于 *ITS*、*LSU* 和 *TUB2* 基因序列以最大似然法构建系统发育树,结果显示, NM005 菌株与 *Didymella americana* 聚在一支,其亲缘关系最近,支持率为 82%。基于贝叶斯法构建的系统发育树同样表明, NM005 菌株与 *D. americana* 聚在同一分支,支持率为 88%,因此,将 NM005 鉴定为 *D. americana* (图 3)。

柑橘与香水柠檬同属芸香科柑橘属,柑橘果面白癞病的研究对香水柠檬果实白皮病的研究具有一定的参考价值^[11]。柠檬果实白皮病与柑橘果面白癞病存在相似之处,两者均为果面病害,都会出现灰白色病斑;其不同在于,香水柠檬果实白皮病病原菌为 *Didymella americana*,柑橘白癞病病原菌为 *Zasmidium fructicola*,二者为不同的真菌类群。在症状上柠檬果实白皮病发病初期为半透明的不规则病斑,随后出现灰白色粗糙的痂皮症状,后期病斑边缘有棕色或浅褐色痂皮出现;柑橘白癞病初期果面产生黑色油腻状霉斑,并伴随细线状开裂,而后病斑变为灰白色或灰褐色,最后病斑呈灰白色痂皮状、银屑状或牛皮藓状,边缘具黑褐色油墨状霉层^[11]。通过对比这两种病害,有助于深入了解香水柠檬果实白皮病的发生机制,为病害防治提供新思路。

香水柠檬果实白皮病的病原菌被鉴定为 *D. americana*,其侵染机制和致病过程需进一步深入研究。此外,不同病原菌引起的病害需要根据病原菌的特性和病害发生特点来制定相应的防治方案,因此,针对该病原菌的特效防治药剂筛选也是今后研究的重点方向之一。

4 结论

本研究首次明确引起广东省香水柠檬果实白皮病的病原菌为 *Didymella americana*。该结果丰富了 *Didymella* 属真菌的寄主范围,为香水柠檬病害防治提供了理论依据,有助于减轻病害对香水柠檬产业的危害,提升香水柠檬的产量和品质。在未来的研究中,可进一步深入探讨该病原菌的生物学特性、致病机制及其与寄主互作的机制,并研发相关防治技术,为香水柠檬产业的可持续发展提供更有力的支持。

参考文献:

- [1] 张树伟. 香水柠檬无籽成因和相关基因的分离与鉴定 [D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- [2] 郝艳丽, 周旋, 霍明洋, 等. 香水柠檬果皮绿色素提取工艺及其稳定性研究 [J]. 食品研究与开发, 2019, 40(1): 91-98.
- [3] HU G H, ZHENG Y Y, LIU C, et al. First Report of *Didymella americana* Causing Corn Stalk Rot in China [J]. Plant Disease, 2021, 105(4): 1220.
- [4] GORNY A M, KIKKERT J R, SHIVAS R G, et al. First Report of *Didymella americana* on Baby Lima Bean (*Phaseolus Lunatus*) [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2016, 38(3): 389-394.
- [5] LUO X X, HU Y F, XIA J W, et al. Morphological and Phylogenetic Analyses Reveal Three New Species of *Didymella* (Didymellaceae, Pleosporales) from Jiangxi, China [J]. Journal of Fungi, 2024, 10(1): 75.
- [6] 林接英, 吴浩芳, 麦章龙, 等. 澳洲石斛疫病原菌的鉴定及其杀菌剂毒力测定 [J]. 热带作物学报, 2024, 45(3): 614-621.
- [7] 张亚鑫, 肖婉, 张峥, 等. 稻田稗属杂草致病菌的分离与鉴定 [J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(6): 1276-1287.
- [8] SUN W M, FENG L N, WEN X L, et al. First Report of Leaf Spot Caused by *Didymella americana* on Cassia Nomame in China [J]. Plant Disease, 2022, 106(4): 1304.
- [9] 刘佳奇. 高寒草地披碱草亚隔孢壳科叶斑病的病原鉴定及杀菌剂筛选 [D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [10] 杨远桥. 贵州省果树主要真菌性病害真菌鉴定及系统学分析 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2023.
- [11] 郑放, 李磊, 刘瑶丹, 等. 柑橘果面白癞病病原鉴定 [J]. 植物病理学报, 2024, 54(3): 674-678.