

海南省植物疫霉菌种类鉴定、发生分布及快速检测技术的建立

郝天照^{1,2} 陆圣诞² 曹诗曼^{1,2} 周志明^{1,2} 刘晓珍^{1,2} 李智婷² 王之欣²
张馨予^{1,2} 杨成东^{1,2} 冯婉珍^{1,2} 梁启福^{1,2} 陈庆河^{1,2*}

(1. 海南大学南繁学院(三亚南繁研究院), 三亚 572025; 2. 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: 为明确海南省近年来植物疫病的发生、疫霉菌的种类及其分布情况, 于2020—2025年在海南省(除三沙市以外)的3个地级市、5个县级市、4个县、6个少数民族自治县共159个地点, 对热带作物、热带果树、蔬菜等开展疫病的发生情况调查, 采集具有疫病典型的根腐症状、根颈腐症状和果腐症状的病样进行病原菌分离纯化, 采用形态学特征、分子生物学鉴定和致病性验证相结合的方法对病原菌进行鉴定。结果显示: 植物疫病在海南省所有调查市县均有发生, 危害严重且普遍; 采集表现典型植物疫病症状的样本1103份, 分离获得821株疫霉菌, 共鉴定出8个疫霉菌种, 分别为棕榈疫霉 *Phytophthora palmivora*、辣椒疫霉 *P. capsici*、烟草疫霉 *P. nicotianae*、芋疫霉 *P. colocasiae*、樟疫霉 *P. cinnamomi*、致病疫霉 *P. infestans*、大豆疫霉 *P. sojae*、豇豆疫霉 *P. vignae*。棕榈疫霉、辣椒疫霉与烟草疫霉的寄主较广泛, 是当前海南省热带作物的优势疫霉菌, 分布广泛且发生严重。芋疫霉的寄主单一, 仅侵染芋 *Colocasia esculenta*, 但在海南省各调查市县均有发生。致病疫霉、大豆疫霉与豇豆疫霉的寄主单一, 在部分市县发生严重。此外, 针对上述8种主要植物疫霉菌建立了快速鉴定的PCR检测技术, 可用于海南省植物疫霉菌所致病害的监测与防控。

关键词: 疫霉菌; 形态特征; 聚类分析; 分布; 分子检测

Distribution, identification and rapid detection of *Phytophthora* spp. in Hainan Province

Hao Tianzhao^{1,2} Lu Shengdan² Cao Shiman^{1,2} Zhou Zhiming^{1,2} Liu Xiaozhen^{1,2} Li Zhiting²
Wang Zhixin² Zhang Xinyu^{1,2} Yang Chengdong^{1,2} Feng Wanzhen^{1,2} Liang Qifu^{1,2} Chen Qinghe^{1,2*}

(1. School of Breeding and Multiplication (Sanya Institute of Breeding and Multiplication), Hainan University, Sanya 572025, Hainan Province, China; 2. Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education; School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, Hainan Province, China)

Abstract: To clarify the occurrence of plant *Phytophthora* diseases, as well as the species and geographical distribution of *Phytophthora* pathogens in Hainan Province, a random sampling survey was conducted from 2020 to 2025 across 159 locations. These locations span three prefecture-level cities, five county-level cities, four counties, and six ethnic minority autonomous counties throughout Hainan (excluding Sansha City). The investigation focused on diseases of tropical crops, tropical fruit trees, and vegetables caused by *Phytophthora* spp. Samples exhibiting typical symptoms such as root rot, stem collar rot, and fruit rot were collected, followed by isolation and purification of the pathogens. Patho-

gens were identified using an approach combining morphological characteristics, molecular biological techniques, and pathogenicity assays. The results revealed that plant *Phytophthora* diseases occurred in all surveyed regions across Hainan, exhibiting widespread and severe damage. From the 1 103 samples with characteristic disease symptoms, 821 *Phytophthora* strains were isolated. A total of eight *Phytophthora* species were identified: *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. nicotianae*, *P. colocasiae*, *P. cinnamomi*, *P. infestans*, *P. sojae*, and *P. vignae*. Among the identified species, *P. palmivora*, *P. capsici*, and *P. nicotianae* exhibited broad host ranges and are currently the dominant *Phytophthora* species infecting tropical crops in Hainan, being widely distributed and causing severe damage across Hainan. *Phytophthora colocasiae*, which exclusively infects taro, also exhibited island-wide distribution. *Phytophthora infestans*, *P. sojae*, and *P. vignae* were host-specific and caused severe damage in certain cities and counties. Furthermore, PCR-based detection techniques were established for the rapid identification of these eight *Phytophthora* species, providing a technical basis for the monitoring and control of plant *Phytophthora* diseases in Hainan.

Key words: *Phytophthora* species; morphological identification; phylogenetic analysis; distribution; molecular detection

疫霉菌隶属藻物界卵菌门卵菌纲腐霉目腐霉科疫霉属 *Phytophthora*, 寄主广泛, 有“植物毁灭者”之称, 其所引发的疫病具有特征性症状: 病部初期出现暗绿色至棕褐色水渍状病斑, 高湿环境下病部可见白色菌丝体或蓬松的白色霉层; 叶部感病后常于叶尖叶缘湿润处形成暗绿色半透明软腐的病斑, 果实感病后则表现褐色水渍状湿腐斑, 木本植物根茎受害后树势变差, 半边或整体枯死, 造成巨大的经济损失, 是影响农业生产和林业生态环境安全的重要因素 (Kamoun et al., 2015; Xu, 2022)。海南省地处热带地区, 受季风气候的影响, 终年高温、高湿、多雨, 因此该地区由疫霉菌属卵菌侵染造成的植物疫病发生严重且普遍, 已成为危害热带经济作物、热带果蔬、林木、草本植物、灌木的一大类重要病害 (贺春萍等, 2002; 唐庆华等, 2011)。因此, 探明当前海南省植物疫病发生情况, 明确病原菌疫霉菌的种类与分布, 并建立疫霉菌的快速分子检测技术, 对减轻海南省植物疫病的危害和制订防控措施均具有重要意义。

从20世纪80年代开始, 就有学者在海南省对橡胶树 *Hevea brasiliensis*、剑麻 *Agave sisalana*、菠萝 *Ananas comosus*、胡椒 *Piper nigrum* 等多种热带作物上的疫病进行调查, 发现多种植物病害都与疫霉菌有关, 并鉴定了相关疫霉菌的种类 (张开明等, 1990; 1991; Zhang et al., 1994)。在21世纪初, 有学者进一步对海南省植物疫病进行了调查, 最终分离鉴定出9个疫霉菌种, 其中以烟草疫霉菌 *P. nicotianae* 和辣椒疫霉菌 *P. capsici* 发生频率较高 (贺春萍等, 2002); Zeng

et al. (2009) 在海南省也进行了疫霉菌种类的调查, 并最终分离鉴定出14个疫霉菌种, 包括辣椒疫霉菌、烟草疫霉菌、柑橘褐腐疫霉菌 *P. citrophthora* 等, 其中烟草疫霉菌发生最严重, 其次是辣椒疫霉菌和柑橘褐腐疫霉菌, 几乎每个调查的市县都有分布, 芋疫霉菌 *P. colocasiae* 也遍布海南省各市县, 但其只侵染芋 *Colocasia esculenta* 叶片, 而致病疫霉菌 *P. infestans* 和莎草疫霉菌 *P. cyperi* 仅在儋州市的番茄 *Solanum lycopersicum* 和纤毛马唐 *Digitaria fibrosa* 上被分离到。近些年来, 谢昌平等 (2012) 首次将恶疫霉菌 *P. cactorum* 确定为引起龙眼基腐病的主要病原菌; 桑利伟等 (2014) 将引起可可黑果病的病原菌鉴定为柑橘褐腐疫霉菌; 郑金龙等 (2011) 将引起剑麻斑马纹病的病原菌鉴定为烟草疫霉菌; 而引起木薯根腐病和番木瓜疫病等病害的病原菌则被鉴定为棕榈疫霉菌 *P. palmivora* (唐庆华等, 2011; 卢昕等, 2014; 罗霓等, 2015)。然而目前对海南省植物疫病与疫霉菌种类及分布的系统研究尚未有报道。

植物疫病的早期快速分子检测诊断对于病害精准防控至关重要。传统的检测方法周期长、灵敏度低, 难以满足现代植物检疫和田间监测的需求。PCR技术是疫霉菌分子检测的基础, 即通过设计种特异性引物实现对病原菌的准确鉴定, 该技术因其快速、高特异性与灵敏度的优势, 已成为疫霉菌快速诊断的强有力工具, 是构建作物疫病早期监测技术体系的核心。王立安等 (2004) 建立了基于核糖体转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列的大豆疫霉菌 *P. sojae* PCR分子检测技术, 利用该方法可从

土壤及大豆 *Glycine max* 发病组织中检测出大豆疫霉卵孢子; 兰成忠等(2019)建立了芋疫霉的多重PCR检测技术,并提高了检测灵敏度。但这些研究开发的疫霉菌分子检测靶标位点无法准确区分近缘种,同时这些位点在种内又存在一定变异,可能导致检测特异性和灵敏性不足。

海南省地处热带,常年高温、高湿、多雨,是植物疫病重发区。近年来由疫霉菌引起的植物疫病危害程度不断加重,对热带作物造成的产量损失为20%~30%,重发时高达60%以上,严重时甚至绝产,成为制约热带作物安全生产及林业生态安全的主要因素之一。然而,近20年来,关于作物疫病的发生调查及其病原鉴定的报道都是单一事件,针对海南省热带作物疫病仍缺乏系统全面的研究,对该省植物疫病的发生、疫霉菌的种类及分布等尚不明确。本研究自2020年7月以来,通过系统调查海南省18个市县的主要植物疫病发生和危害情况,采集具典型疫病症状病样进行病原菌的分离纯化,通过形态学特征、多基因聚类分析及致病性系统鉴定,明确海南省植物疫霉菌的主要种类及分布特征,并建立主要植物疫霉菌快速鉴定的分子检测技术,以期对海南省植物疫病的早期预警与综合防控提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:2020年7月—2025年3月,在海南省(除三沙市以外)的3个地级市(海口市、三亚市、儋州市)、5个县级市(文昌市、琼海市、万宁市、东方市、五指山市)、4个县(定安县、屯昌县、澄迈县、临高县)、6个少数民族自治县(陵水黎族自治县(简称陵水县)、乐东黎族自治县(简称乐东县)、昌江黎族自治县(简称昌江县)、白沙黎族自治县(简称白沙县)、保亭黎族苗族自治县(简称保亭县)、琼中黎族苗族自治县(简称琼中县))的159个地点,采集具有水渍状病斑、典型疫霉菌侵染症状的热带作物、果树、蔬菜、花卉等的叶片、茎干、根部和果实样品1103份,将采集样本装入自封袋,标记样品信息,放入装有冰袋的保温箱中带回实验室供试。

供试病原菌:卵菌包括棕榈疫霉、大豆疫霉、樟疫霉 *P. cinnamomi*、辣椒疫霉、烟草疫霉、芋疫霉、致病疫霉、豇豆疫霉 *P. vignae*、荔枝霜疫霉 *P. lichii*、隐地疫霉 *P. cryptogea*、柑橘褐腐疫霉、掘氏疫霉 *P. drechsleri*、恶疫霉、寄生疫霉 *P. parasitica*、西瓜疫

霉 *P. melonis* 和瓜果腐霉 *Pythium aphanidermatum*; 真菌包括胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、茄镰孢菌 *Fusarium solani*、禾谷镰孢菌 *F. graminearum*、尖镰孢菌 *F. oxysporum*、交链格孢菌 *Alternaria alternata*、黄瓜织球壳菌 *Plectosphaerella cucumerina*、立枯丝核菌 *Rizoctonia solani*。所有菌种由海南大学南繁学院热带作物卵菌病害实验室保存并提供。

供试植物和营养土:番茄、大豆、豇豆 *Vigna unguiculata*、辣椒 *Capsicum annuum*、芋、富贵竹 *Draacaena sanderiana*、油梨 *Persea americana* 和菠萝幼苗由海南大学热带农林学院提供,均移栽至装有营养土的花盆中,每盆分别保留健壮幼苗3、3、6、3、1、1、1和1株,待生长15 d至3个月后用于致病性测定;供试营养土购自山东绿珠农业科技发展有限公司,主要成分有草炭、蛭石和珍珠岩等材料。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基成分为去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g,蒸馏水定容至1 L;10% V8液体培养基成分为V8蔬菜汁100 mL,蒸馏水定容至1 L,pH调至7.2;10% V8固体培养基是在1 L的10% V8液体培养基中加入20 g琼脂粉;10% V8选择性培养基是在10% V8固体培养基中加入200 ng/mL咪鲜胺、100 ng/mL噁霉灵、100 ng/mL甲基硫菌灵、100 ng/mL利福平、100 ng/mL氨基青霉素。

试剂和仪器:0.5×TBE、2×CTAB提取液、琼脂糖凝胶及D2000分子量标准,天根生化科技(北京)有限公司;2×PCR预混试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯。BA310-T生物显微镜,麦克奥迪实业集团有限公司;ETC811普通PCR仪,北京东胜创新生物科技有限公司;DYY-6C电泳仪,北京六一生物科技有限公司;Tanon 3500凝胶成像系统,上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 海南省植物疫病的田间调查

2020年7月—2025年3月,在海南省(除三沙市以外)的3个地级市、5个县级市、4个县、6个少数民族自治县的159个地点进行植物疫病的田间调查,每个地点调查3~5个田块,每个田块按五点取样法进行调查,根据作物不同,每个田块调查面积约500~3 000 m²,调查植物包括热带作物、果树、蔬菜、花卉、林木等。详细记录这些植物疫病分布、危害情况及寄主植物。

1.2.2 海南省植物疫病病原菌的形态学鉴定

采用组织分离法进行病原菌的分离(郑小波, 1997)。用自流水将采集的1103份病株样本表面的泥沙冲洗干净,选取具有典型疑似症状的病样,用无菌剪刀剪下病健交界部位,置于75%酒精中浸泡消毒,重复3次,每次60s;随后转移至ddH₂O中清洗,重复3次,每次30s。用无菌剪刀将样品组织剪成5mm×5mm大小,晾干表面水分,并接至新鲜的10%V8选择性培养基平板上,25℃黑暗培养,待菌落长出后,挑取菌丝进行纯化。将纯化后的菌株转移至10%V8固体培养基上,于25℃黑暗培养5~7d,观察菌落形态,同时在生物显微镜下观察孢子囊形状、孢子囊层出方式、孢子囊脱落情况、乳突有无情况、厚垣孢子形状、菌丝膨大体性状、卵孢子产生情况、雄器着生位置等形态结构特征,结合疫霉菌检索表和相关分类参考文献(郑小波, 1997; Kroon et al., 2012; Abad et al., 2023)对分离的疫霉菌进行形态学鉴定。另外,根据单株菌株是否能够独立完成有性生殖确定其为同宗配合还是异宗配合,若可以则为同宗配合,否则为异宗配合。

1.2.3 海南省植物疫病病原菌的分子生物学鉴定

鉴于1.2.2分离纯化获得8类病原菌,每类从中随机选择1株代表菌株进行分子生物学鉴定。将各代表菌株置于10%V8固体培养基上于25℃黑暗培养5~7d,刮取菌丝并将其冻干,采用CTAB法提取各菌株的基因组DNA(陈庆河等, 2009)。选用通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(Cooke et al., 2000)、Ypt1F(5'-CGACCATTGGCGTGGACTTT-3')/Ypt1R(5'-ACGTTCTCGCAGGCGTATCT-3')(Schena et al., 2008)、TUBUF2(5'-CGGTAACAACCTGGGCCAAGG-3')/TUBUR1(5'-CCTGGTACTGCTGGTACTCAG-3')(Kroon et al., 2004)、ELONGF1(5'-TCACGATCGACATTGCCCTG-3')/ELONGR1(5'-ACGGCTCGAGGATGACCATG-3')(Kroon et al., 2004)分别扩增代表菌株的ITS序列、Ras相关蛋白基因Ypt1序列、β微管蛋白(β-tubulin)基因序列及转录延伸因子(transcription elongation factor 1 alpha, EF-1α)基因序列,本研究中所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。50μL PCR反应体系:2×Taq PCR Master Mix II 25μL、10μmol/L上下游引物各1.25μL、100ng/μL DNA模板2.5μL、ddH₂O 20μL。扩增条件:94℃预变性5min;94℃变性1min,58℃退火30s,72℃延伸1min,

共35个循环;72℃再延伸10min,4℃保温。用1%琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳,取扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序序列拼接完成后,在NCBI数据库进行比对,选择并下载相似度较高的相关序列,按照ITS-Ypt1-β-tubulin-EF-1α顺序进行多基因序列串联,采用MEGA 6.0软件以邻接法构建多基因联合系统发育树,经自展值Bootstrap循环验证1000次。

1.2.4 海南省植物疫病病原菌的致病性验证

将1.2.3所选各代表菌株接种至10%V8固体培养基上于25℃黑暗培养5d,置于4℃低温下诱导孢子囊释放游动孢子,参照陆圣诞等(2025)方法制备游动孢子悬浮液,调整浓度为10⁸个/mL供试。叶部类病害采用喷雾接种法进行致病性验证,将制备的各菌株的10⁸个/mL游动孢子悬浮液喷雾接种于供试植物富贵竹(接种棕榈疫霉)、番茄(分别接种致病疫霉与辣椒疫霉)、芋(接种芋疫霉)的叶片或茎梗上,每盆喷施30mL,以各供试植物喷雾等量无菌水的处理作为空白对照。根腐类病害采用灌根接种法进行致病性验证,将供试植物大豆(接种大豆疫霉)、豇豆(接种豇豆疫霉)、油梨(接种樟疫霉)、菠萝(接种烟草疫霉)根部营养土刨开露出根系,每盆灌入10⁸个/mL游动孢子悬浮液50mL,随后覆盖营养土,以各供试植物灌入等量无菌水的处理作为空白对照。每个处理重复3盆。将接种后的植株移至25℃人工气候培养箱中保湿培养,观察病害发生症状情况。待接种植株发病后,采集植株上发病叶片或茎干进行病原菌的再分离,并与原接种病原菌进行性状比对,完成柯赫式法则验证。

1.2.5 海南省植物疫病病原菌快速分子检测技术的建立

从GenBank下载目标菌及近缘种全基因组序列分析预测特异序列片段,在NCBI和FungiDB网站验证其特异性后,用Primer 5.0软件(<http://primer-explorer.jp/e/>)设计特异性单重PCR引物;另外选择目标菌的保守基因,从GenBank下载目标菌和近缘种的该保守基因序列,用DNAMAN软件进行多重序列比对和同源性分析,通过目标菌的种间差异筛选保守序列并设计合成特异性引物(表1)。通过设计的特异性引物从1.2.3所选代表菌株的基因组DNA中扩增上述筛选出的检测靶标,以8种近缘种荔枝霜疫霉、隐地疫霉、柑橘褐腐疫霉、掘氏疫霉、恶疫霉、寄生疫霉、西瓜疫霉和瓜果腐霉,以及7种病原真菌胶胞炭疽菌、茄镰孢菌、禾谷镰孢菌、尖镰孢菌、交链格孢菌、黄瓜织球壳菌、立枯丝核菌作为阳

性对照,基因组DNA的制备方法同1.2.3;以清水处理作为阴性对照。20 μL PCR反应体系:2 \times Taq PCR Master Mix II 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各0.5 μL 、100 ng/ μL DNA模版1 μL 、ddH₂O 8 μL 。PCR扩增

程序同1.2.3,仅退火温度不同(表1)。将扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳验证引物的特异性。试验重复3次。

表1 PCR检测引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR detection

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增长度 Length/bp	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$	疫霉菌种 <i>Phytophthora</i> species	检测靶标 Detection target	引物来源 Reference
Pp7	F: GGGTACAAACGAAATCGGCG R: TGCCTCGTGATCATTTGGGTC	297	58	棕榈疫霉 <i>P. palmivora</i>	NCKW01006925	自行设计 Self-designed
PINF1/ PINF2	F: CGGTTGGTTTTTCGGACCGA R: CATTTCCTCAATGGATCGACC	324	68	致病疫霉 <i>P. infestans</i>	ITS	陈庆河等, 2009 Chen et al., 2009
A125	F: GTAGCGAGTGTATCCATC R: CTACTATCACACCCTCAAG	243	54	辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	JADEVP010000017.1	自行设计 Self-designed
LN807	F: CTGTTTGGTCAGGTGGAG R: TAGCAACGTCGCTGTAAG	214	57	烟草疫霉 <i>P. nicotiana</i>	KI669617.1	自行设计 Self-designed
SoF/ SoR	F: CACTTGTGGCTCTGTAG R: GCAGCTTCTCTAGGTAG	1 310	58	大豆疫霉 <i>P. sojae</i>	PHYSODRAFT_299276	Li et al., 2024
Pv8	F: CGTCACGGACCAGGAGT R: TACCAGCAACACTGAGAT	84	58	豇豆疫霉 <i>P. vignae</i>	Ypt1	自行设计 Self-designed
YL2	F: AGGTAGGCAGATGGAGTATT R: ATCAGCCATGTGGAATGAAT	485	58	樟疫霉 <i>P. cinnamomi</i>	JAFJYM010000001.1	自行设计 Self-designed
MG560	F: CTGACTTGGTGGTATTCTC R: GTCACGAACCTATCAATCTC	305	55	芋疫霉 <i>P. colocasiae</i>	Ypt1	自行设计 Self-designed

2 结果与分析

2.1 海南省植物疫病的发生情况及田间症状

在海南省(除三沙市以外)的3个地级市、5个县级市、10个县均发现有作物疫病发生。发生疫病的植株地上部分以及地下部分如根、茎基、块茎、种子和土壤中的肉质果实等,会发生幼苗猝倒、根腐和地下茎、块茎、球茎的腐烂(图1-A~B),叶片、幼茎和果实等具水渍状病斑,既可导致叶片、嫩枝和植株枯死,也可引起果实腐烂(图1-C~L)。有些疫霉菌只能侵染一种或两种寄主植物,而另外一些疫霉菌可以在不同类型的多种寄主植物上产生相同或不同的症状,一年生植物和树木的幼苗可能在疫霉菌侵染几天、几周或几个月内就会死亡。在某些情况下,疫霉菌也引起茄子 *Solanum melongena*、辣椒 *Capsicum annuum*、葫芦 *Lagenaria sicerari*、番茄、草莓 *Fragaria*×*ananassa* 等瓜果部分或完全腐烂(图1-I);疫霉菌侵染较老植物的根部后显症较慢,老树表现出叶片稀疏、较短、凹陷、变黄,枝条和小嫩枝出现梢枯,病斑会环绕树干、大树枝或根,引起植株或树木生长缓慢,果实数量变少、个头变小,最后整株死亡

(图1-B~C)。

2.2 疫霉菌的形态学鉴定

从采集的1 103份病样中共分离出821株疫霉菌,根据其形态特征可划分为8类,初步将其分别鉴定为棕榈疫霉、辣椒疫霉、烟草疫霉、豇豆疫霉、大豆疫霉、樟疫霉、致病疫霉及芋疫霉。

2.2.1 棕榈疫霉

共涉及163株分离菌株,其菌落特征及形态结构均相似,选择编号BT-1的分离菌株作为代表菌株进行形态学观察(图2-A)。该菌株的菌落呈玫瑰花瓣状,从中心向四周扩展,边缘略微不整齐,整体较蓬松,棉絮状,气生菌丝茂盛(图2-A-a1)。显微镜下可见细长的无隔菌丝,无色透明,直径约6.55 μm ,未观察到菌丝膨大体,孢囊梗常见简单合轴分枝,分叉处菌丝基部略微缢缩,老熟菌丝偶尔可见有隔(图2-A-a2);孢子囊呈倒梨形、卵圆形、长卵形、杵果形至长椭圆形等,顶生或间生,大小平均为51.24 μm ×29.62 μm ,常见单乳突,乳突明显,直径约4.14 μm ;孢子囊易脱落,脱落后具短柄,长约3.79 μm (图2-A-a3);脱落的孢子囊从排孢孔释放出大量游动孢子,排孢孔直径约3.79 μm (图2-A-a4);

厚垣孢子大量产生,呈球形,顶生或间生,直径约37.74 μm (图2-A-a5)。异宗配合,未配对的情况下

无卵孢子和藏卵器产生。



A: 榴蓮根腐病; B: 油梨根腐病; C: 橡胶樹季風性落葉病; D: 辣椒疫病; E: 大豆疫霉根腐病; F: 豇豆根腐病; G: 菠蘿心腐病; H: 番茄晚疫病; I: 茄子疫病; J: 芋疫病; K: 富貴竹疫病; L: 香草蘭疫病。A: Durian root rot; B: avocado root rot; C: rubber tree *Phytophthora* leaf fall disease; D: pepper *Phytophthora* blight; E: soybean *Phytophthora* root rot; F: cowpea root rot; G: pineapple heart rot; H: tomato late blight; I: eggplant *Phytophthora* disease; J: taro leaf spot; K: water bamboo leaf blight; L: vanilla *Phytophthora* blight.

图1 海南省植物疫病的田间症状

Fig. 1 Symptoms of plant disease caused by *Phytophthora* spp. in the field in Hainan Province

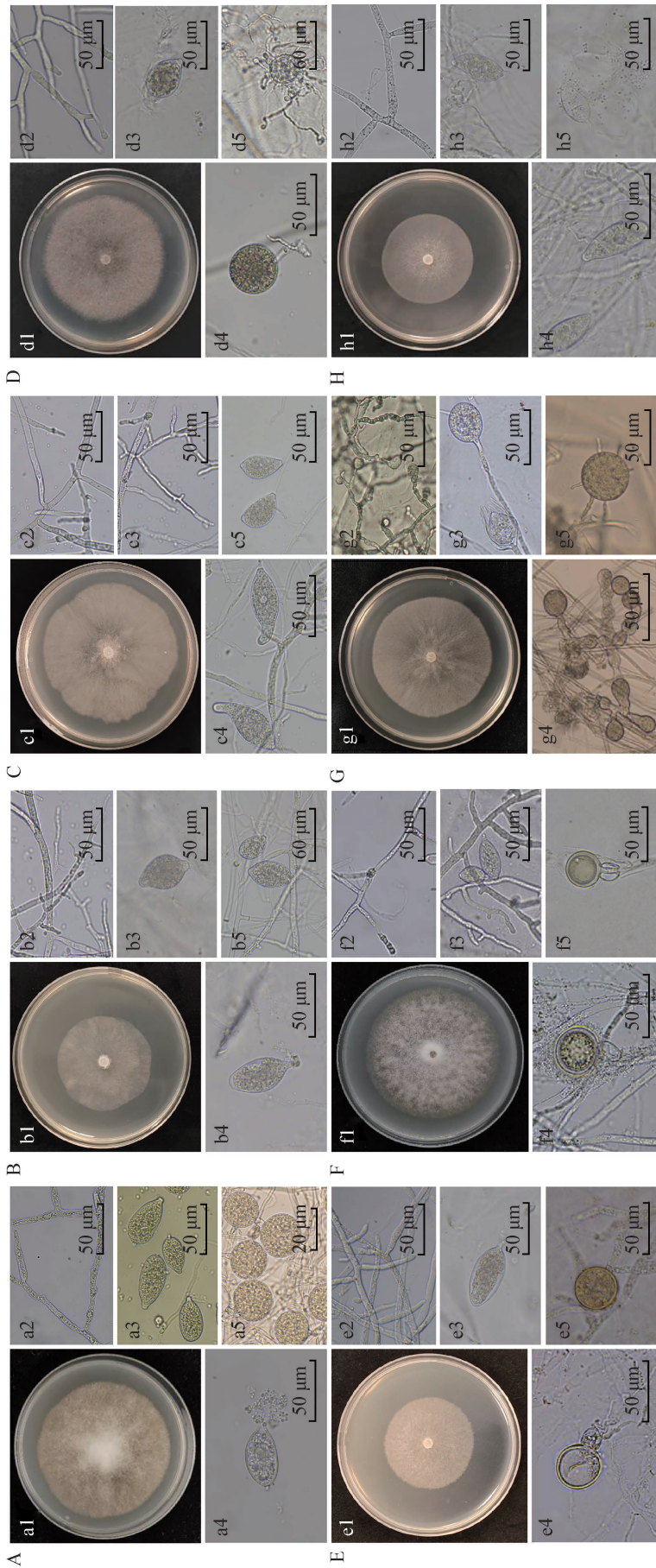
2.2.2 致病疫霉

共涉及13株分离菌株,其菌落特征及形态结构均相似,选择编号Pi15的分离菌株作为代表菌株进行形态学观察(图2-B)。该菌株的菌落形成缓慢,呈花瓣状向外扩展,边缘整齐,气生菌丝较旺盛(图2-B-b1);菌丝无隔,直径约5.33 μm ,在寄主上孢囊梗通常表现为复合分枝(图2-B-b2);孢子囊呈椭圆形至卵圆形,大小约为37.10 μm ×22.05 μm ,具有半乳突,脱落后具短柄(图2-B-b3~b5);异宗配合,单株培养时不产生卵孢子。

2.2.3 辣椒疫霉

共涉及87株分离菌株,其菌落特征及形态结构

均相似,选择编号Pc63的分离菌株作为代表菌株进行形态学观察(图2-C)。该菌株的菌落呈花瓣状,条形放射状向四周生长,边缘不整齐,表面气生菌丝一般旺盛(图2-C-c1)。显微镜下可见菌丝透明、无隔,直径约4.59 μm (图2-C-c2~c3);孢囊梗简单合轴分枝或不规则分枝(图2-C-c4);孢子囊形状差异较大,呈近球形、长椭圆形、倒梨形、卵圆形等,孢子囊大小平均约38.28 μm ×23.53 μm ,乳突明显,乳突平均直径为3.31 μm ,孢子囊脱落后有一段很长的孢囊柄,平均长度可达96.49 μm ,是辣椒疫霉的一大特点(图2C-c5);异宗配合,单株培养时不产生卵孢子和藏卵器。



A~H: 分别为棕榈疫霉、致病疫霉、辣椒疫霉、烟草疫霉、豇豆疫霉、大豆疫霉、芋疫霉和芋疫霉、樟疫霉和芋疫霉、a1~h1: 菌落形态; a2~b2、c2~c3、d2~f2、h2: 无隔菌丝; a3: 孢子囊; a4: 游动孢子从孢孔释放; a5: 圆形的厚垣孢子; b3: 具半乳突的孢子囊; b4~b5: 孢子囊脱落具短柄; c4~c5: 孢子囊形态多样, 具明显乳突; d3: 孢子囊乳突明显; d4: 厚垣孢子; d5: 休止孢萌发; e2: 无隔透明的菌丝体; e3: 孢子囊橄榄球形, 无乳突, 内层出; e4: 藏卵器、雄器与卵孢子; e5: 厚垣孢子; f3: 孢子囊无乳突, 不脱落; f4~f5: 卵孢子、藏卵器和围生雄器; g2: 珊瑚状菌丝; g3: 孢子囊内层出; g4: 球形或不规则形菌丝膨大体; h3~h4: 长卵形、柠檬形半乳突孢子囊; h5: 孢子囊释放游动孢子。A-H: *P. palmivora*, *P. infestans*, *P. capsici*, *P. nicotianae*, *P. sojae*, *P. vignae*, *P. cinnamomi*, and *P. colocasiae*; a1~h1: colony morphology; a2~b2, c2~c3, d2~f2, h2: non-septate hyphae; a3: sporangia; a4: zoospores released from sporulation pores; a5: globose chlamydo-spores; b3: sporangia with semi-papillary; b4~b5: sporangia falling with short stalk; c4~c5: sporangia with obvious mastoid; d3: sporangia with obvious mastoid; d4: chlamydo-spore; d5: resting spore germination; e2: transparent non-septate hyphae; e3: sporangium rugby-shaped, no mastoid, inner layer out; e4: ovipositor, oospore, lateral male; e5, g5: chlamydo-spores; f3: sporangia without papillae, not falling off; f4~f5: oospores, ovipositor and peripapillary male; g2: coralline hyphae; g3: sporangium inner layer emerges; g4: spherical or irregular hyphal swelling; h3~h4: long ovate, lemon-shaped sporangia, semi-mastoid; h5: sporangia release zoospores.

图2 海南省植物疫霉菌的形态特征
Fig. 2 Morphological characteristics of *Phytophthora* spp. in Hainan Province

2.2.4 烟草疫霉

共涉及113株分离菌株,其菌落特征及形态结构均相似,选择编号Pn50的分离菌株作为代表菌株进行形态学观察(图2-D)。该菌株菌落边缘整齐,菌丝生长速度快且蓬松,气生菌丝旺盛(图2-D-d1);菌丝粗壮、无隔,在分叉处基部稍缢缩,直径平均为6.10 μm (图2-D-d2);孢囊梗简单合轴分枝或者不规则分枝;孢子囊多呈卵圆形至近球形,大小平均为47.46 μm ×41.74 μm ,具明显乳突,乳突直径为5.18 μm ,孢子囊有脱落性,脱落后具短柄,柄长约3.33 μm (图2-D-d3);游动孢子自排孢孔释放,排孢孔宽约7.19 μm ;厚垣孢子球形,顶生或间生,直径平均为37.74 μm ,壁厚3.54~4.58 μm (图2-D-d4);异宗配合,在无性阶段孢子囊释放游动孢子,游动孢子变成休止孢并产生芽管从而发育成新的菌丝体,或孢子囊脱落后不释放,直接萌发为芽管(图2-D-d5)。

2.2.5 大豆疫霉

共涉及153株分离菌株,其菌落特征及形态结构均相似,选择编号Ps1024的分离菌株作为代表菌株进行形态学观察(图2-E)。该菌株的菌落边缘整齐,生长速度较慢,菌丝致密紧实,呈白色絮状向外生长(图2-E-e1);菌丝粗壮,直径平均为5.27 μm ,透明无隔,偶尔可见有隔菌丝,分枝处多呈直角或近直角,基部稍缢缩(图2-E-e2);常在分枝处形成结节状或不规则形菌丝膨大体,一般为串生;菌丝块在无菌水中光照培养可产生孢子囊,大小平均为47.90 μm ×76.80 μm ,多为橄榄球形,顶生,无乳突,不脱落,内层出(图2-E-e3);同宗配合,单株培养可产生大量卵孢子,卵孢子呈球形,具光滑的厚壁,直径平均为35.62 μm ,藏卵器壁大多光滑,平均直径为38.54 μm ,具柄,雄器侧生,偶有围生(图2-E-e4);厚垣孢子不常见,球形,满器(图2-E-e5)。

2.2.6 豇豆疫霉

共涉及107株分离菌株,其菌落特征及形态结构均相似,选择编号Pv39的分离菌株作为代表菌株进行形态学观察(图2-F)。该菌株的菌落边缘整齐,菌丝生长缓慢,紧实致密,呈白色棉絮状,与大豆疫霉菌落形态相似(图2-F-f1)。菌丝透明无隔,直径约4.37 μm ,培养数天后偶见有隔菌丝(图2-F-f2);孢子囊多为长卵圆形、椭圆形、长椭圆形等,形状与大小变化较大,平均为(21.15~42.58) μm ×(10.50~20.56) μm ,无乳突或不明显,不脱落,内层出(图2-F-f3);同宗配合,单株培养可产生大量卵孢子,卵孢子外壁光滑,直径平均为32.19 μm ,藏卵器外壁光滑且带柄,平均直径为28.40 μm ,雄器近球形,围生

(图2-F-f4~f5)。

2.2.7 樟疫霉

共涉及56株分离菌株,其菌落特征及形态结构均相似,选择编号Pci97的分离菌株作为代表菌株进行形态学观察(图2-G)。该菌株的菌落呈星形放射状向四周扩展,菌丝紧实,气生菌丝中等旺盛(图2-G-g1);菌丝为无色透明的无隔菌丝,刚硬,呈珊瑚状,平均直径约5.90 μm ,常见球形或不规则形菌丝膨大体,多聚集成簇(图2-G-g2);孢子囊顶生,呈长椭圆形至卵圆形,大小为64.85 μm ×36.50 μm ,无乳突,不脱落,内层出(图2-G-g3);厚垣孢子球形,较常见,间生或顶生,直径平均为42.30 μm (图2-G-g4~g5);异宗配合,单株培养时不产生卵孢子。

2.2.8 芋疫霉

共涉及129株分离菌株,其菌落特征及形态结构均相似,选择编号Py7的分离菌株作为代表菌株进行形态学观察(图2-H)。该菌株的菌落边缘整齐,呈放射状向外扩展,菌丝生长较慢,紧实致密,气生菌丝一般旺盛(图2-H-h1)。菌丝透明无色,无隔,简单合轴分枝,在分枝处基部稍缢缩(图2-H-h2);孢子囊形态多变,常见椭圆形、杵果形、长柠檬形等,大小为52.45 μm ×25.65 μm ,具半乳突,乳突厚度为3.14~3.59 μm (图2-H-h3~h4),有脱落性,脱落后具中等长度的孢囊柄,长度平均为12.38 μm (图2-H-h5);异宗配合,单株培养时不产生卵孢子。

2.3 疫霉菌的分子生物学鉴定

代表菌株BT-1、Pi15、Pc63、Pn50、Ps1024、Pv39、Pci97、Py7的ITS、*Ypt1*、 *β -tubulin*和*EF-1a*基因序列与GenBank中的相关序列相似性极高,相似性分别为98.6%~100.0%、98.3%~100.0%、99.2%~100.0%和98.5%~100.0%。多基因联合系统发育树显示,菌株BT-1与棕榈疫霉菌株CPHST BL 106、Pi15与致病疫霉菌株CPHST BL 19、Pc63与辣椒疫霉菌株01-03、Pn50与烟草疫霉菌株P6303、Ps1024与大豆疫霉菌株CPHST BL 56G、Pv39与豇豆疫霉菌株CPHST BL 30、Pci97与樟疫霉菌株CPHST BL 12、Py7与芋疫霉菌株CPHST BL 173均各自聚为一个分支,自举值均为100(图3~4)。结合形态学特征,最终将分离获得的821株疫霉菌鉴定为8个种,其中以菌株BT-1为代表的鉴定为棕榈疫霉*P. palmivora*,以菌株Pi15为代表的鉴定为致病疫霉*P. infestans*,以菌株Pc63为代表的鉴定为辣椒疫霉*P. capsici*,以菌株Pn50为代表的鉴定为烟草疫霉*P. nicotianae*,以菌株Ps1024为代表的鉴定为大豆疫霉*P. sojae*,以菌株Pv39为代表的鉴定为豇豆疫霉*P. vignae*,以菌株

Pci97 为代表的鉴定为樟疫霉 *P. cinnamomi*, 以菌株 Py7 为代表的鉴定为芋疫霉 *P. colocasiae*。

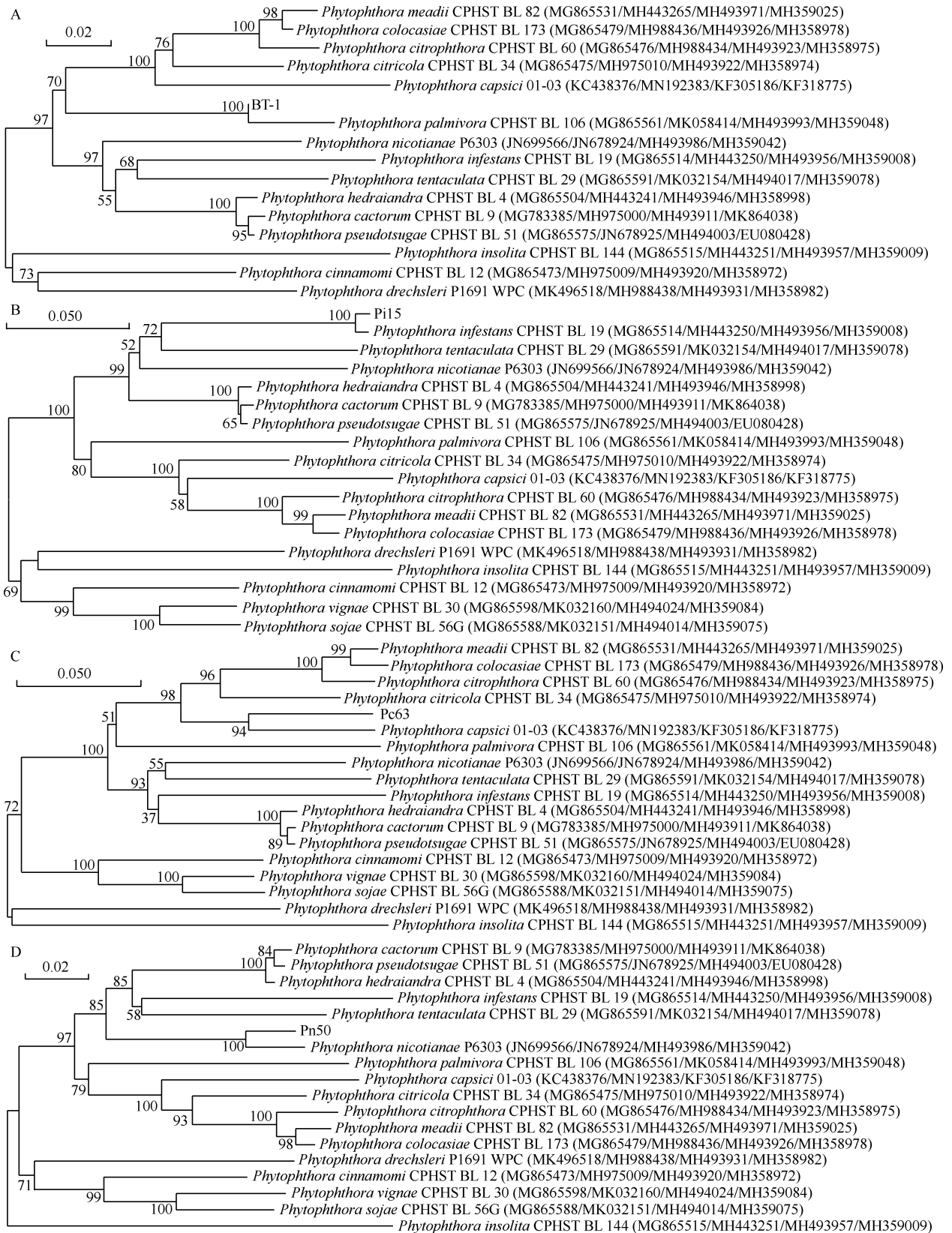


图3 基于ITS-*Ypt1-β-tubulin-EF-1a* 串联序列以邻接法构建海南省植物疫霉菌BT-1、Pi15、Pc63、Pn50及近缘种的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Phytophthora* BT-1, Pi15, Pc63, Pn50 in Hainan Province based on ITS-*Ypt1-β-tubulin-EF-1a* sequences by neighbor joining method

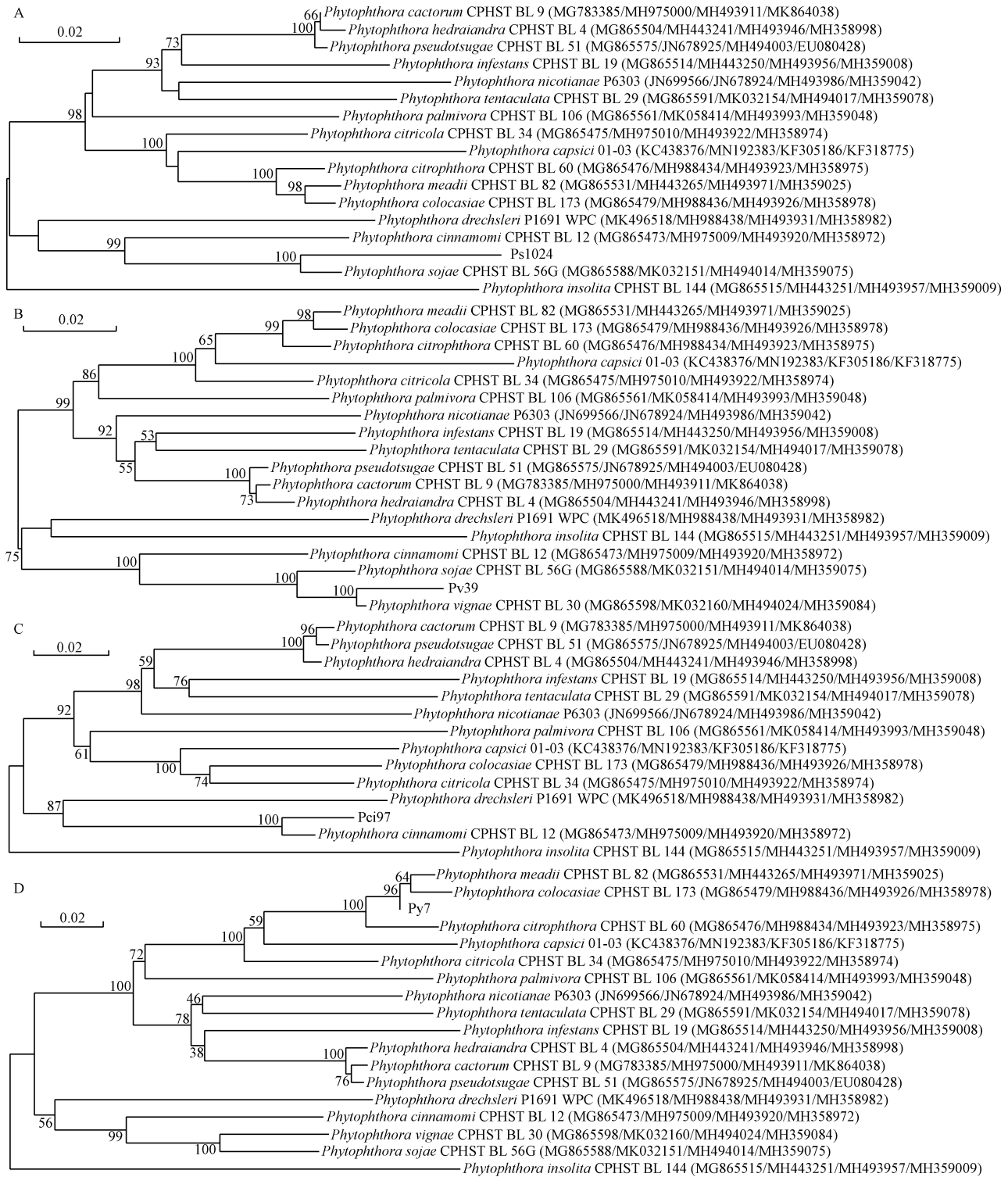


图4 基于ITS-*Ypt1*- β -tubulin-*EF-1a*串联序列以邻接法构建海南省植物疫霉菌Ps1024、Pv39、Pci97、Py7及近缘种的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Phytophthora* Ps1024, Pv39, Pci97, Py7 in Hainan Province based on ITS-*Ypt1*- β -tubulin-*EF-1a* sequences by neighbor joining method

2.4 疫霉菌的致病性验证

在供试植物接种后3~15 d后,各供试植株均出现了明显的疫病典型症状,与田间发病症状类似,而

空白对照植物均未发病(图5)。供试富贵竹接种棕桐疫霉后,叶片出现黄化,叶尖、叶缘坏死干枯,部分叶片卷曲萎蔫,植株整体长势衰弱(图5-A);供试番

茄接种致病疫霉后,叶片产生暗绿色水浸状病斑,并逐渐向主茎蔓延,使茎基部变细,呈水渍状缢缩,植株萎蔫下垂,呈现晚疫病典型的症状(图 5-B);供试大豆接种大豆疫霉后,植株萎蔫倒伏,叶片卷曲干枯,根茎部变褐缢缩,植株整体萎蔫皱缩,接近死亡状态(图 5-C);供试菠萝接种烟草疫霉后,叶片基部出现褐色坏死斑,局部组织腐烂变质,病斑向叶片延伸(图 5-D);供试豇豆接种豇豆疫霉后,基部变褐缢缩,植株萎蔫倒伏,叶片大量脱落,枝条干瘪,生长停滞(图 5-E);供试番茄接种辣椒疫霉后,叶片发黄、

萎蔫、皱缩,部分叶片出现腐烂,植株矮小,长势严重衰退(图 5-F);供试油梨接种樟疫霉后,叶片萎蔫皱缩,植株长势衰弱,株型矮小,无生命活力(图 5-G);供试芋接种芋疫霉后,叶片出现黄褐色失绿圆形病斑,扩展后呈不规则褐色斑块,病斑区域组织坏死(图 5-H)。对上述接种后的发病叶片或根茎组织进行病原菌再次分离,所得分离物的培养性状、形态特征与原接种菌株一致,说明这些代表菌株对原寄主均具有致病性,确为其致病菌。



A: 富贵竹接种水或棕榈疫霉; B: 番茄接种水或致病疫霉; C: 大豆接种水或大豆疫霉; D: 菠萝接种水或烟草疫霉; E: 豇豆接种水或豇豆疫霉; F: 番茄接种水或辣椒疫霉; G: 油梨接种水或樟疫霉; H: 芋接种水或芋疫霉。A: Water bamboo inoculated with water and *P. palmivora*; B: tomato inoculated with water and *P. infestans*; C: soybean inoculated with water and *P. sojae*; D: pineapple inoculated with water and *P. nicotianae*; E: cowpea inoculated with water and *P. vignae*; F: tomato inoculated with water and *P. capsici*; G: avocado inoculated with water and *P. cinnamomi*; H: taro inoculated with water and *P. colocasiae*.

图 5 不同植物在室内接种植物疫霉菌后的发病症状

Fig. 5 Symptoms of different plants inoculated with *Phytophthora* spp. *in vitro*

2.5 海南省疫霉菌种类的发生分布

棕榈疫霉寄主范围广泛,包括橡胶树、榴莲 *Durio zibethinus*、木薯 *Manihot esculenta*、菠萝、番木瓜 *Carica papaya*、富贵竹等林木、果蔬、花卉等植物,引起橡胶树割面条溃疡病、橡胶树季风性落叶病、榴莲根腐病、木薯根腐病、番木瓜疫病、富贵竹疫病等;棕榈疫霉除了在海南省昌江县和屯昌县未分

离到外,在其他 16 个市县的植物上均有发生;棕榈疫霉引起的榴莲根腐病在三亚市、乐东县和保亭县的榴莲园均有发生(表 2),这是国内首次发现该病害的田间流行。

辣椒疫霉寄主范围也很广泛,包括辣椒、胡椒、番木瓜、黄瓜 *Cucumis sativus*、西瓜 *Citrullus lanatus*、茄子及番茄等作物,引起辣椒疫病、胡椒瘟病、

番木瓜疫病及葫芦科、茄果类蔬菜的疫病、果腐病等;辣椒疫霉也是除了在海南省昌江县和屯昌县未分离到外,在其他16个市县均有分布(表2)。

烟草疫霉寄主包括烟草 *Nicotiana tabacum*、剑麻、菠萝、香草兰 *Vanilla planifolia*、茄子、豇豆等多种作物,引起烟草黑胫病、剑麻斑马纹病、菠萝心腐病、香草兰疫病、茄子疫病和豇豆根腐病等;烟草疫霉在海南省多个市县的植物上分离获得,包括海口、三亚、临高、文昌、琼海、儋州、万宁等市县均有分布(表2)。

樟疫霉是从海南省儋州市的油梨病样上分离获得,可引起油梨根腐病;芋疫霉寄主较单一,仅侵染

天南星科芋属 *Colocasia* 的芋和野芋 *C. antiquorum* 引起芋疫病,但是在海南省分布非常广泛,在所调查的18个市县均有分布,危害海南省的芋叶片和球茎;致病疫霉寄主也较单一,在海南省发现仅侵染茄科作物的番茄,引起番茄和圣女果番茄的晚疫病,致病疫霉在海口、文昌、陵水等市县均有分布;大豆疫霉的寄主单一,目前在海南省仅从大豆或鲜食大豆(毛豆)上分离获得,引起大豆疫霉根腐病,在海南省的乐东县、三亚市、海口市、儋州市均有分布;豇豆疫霉的寄主单一,仅侵染豇豆引起根腐病,豇豆疫霉在海南省种植豇豆地区分布广泛,在海口、澄迈、乐东、三亚、儋州、陵水等市县均有分布(表2)。

表2 海南省植物疫霉菌的种类及分布

Table 2 Distribution of *Phytophthora* species in Hainan Province

疫霉种 <i>Phytophthora</i> species	病害 Disease	寄主 Host	分布地点 Locality
棕榈疫霉 <i>P. palmivora</i>	橡胶树季节性落叶病 Rubber tree leaf fall disease	橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	儋州、琼中、白沙、澄迈、琼海、文昌、昌江、临高 Danzhou, Qiongzong, Baisha, Chengmai, Qionghai, Wenchang, Changjiang, Lingao
	橡胶树剖面条溃疡病 Rubber tree strip-shaped canker	橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	儋州、琼中、白沙、澄迈、琼海、文昌、昌江、临高 Danzhou, Qiongzong, Baisha, Chengmai, Qionghai, Wenchang, Changjiang, Lingao
	富贵竹疫病 Water bamboo leaf blight	富贵竹 <i>Dracaena sanderiana</i>	海口 Haikou
	榴莲根腐病 Durian root rot	榴莲 <i>Durio zibethinus</i>	保亭、乐东、三亚 Baoting, Ledong, Sanya
	番木瓜疫病 Papaya <i>Phytophthora</i> blight	番木瓜 <i>Carica papaya</i>	海口、澄迈、定安、儋州、乐东、陵水 Haikou, Chengmai, Ding'an, Danzhou, Ledong, Lingshui
	木薯根腐病 Cassava root rot	木薯 <i>Manihot esculenta</i>	儋州 Danzhou
	菠萝疫病 Pineapple <i>Phytophthora</i> blight	菠萝 <i>Ananas comosus</i>	琼海、陵水、临高 Qionghai, Lingshui, Lingao
辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	辣椒疫病 Pepper <i>Phytophthora</i> blight	辣椒 <i>Capsicum annum</i>	海口、澄迈、文昌、定安、儋州、白沙、琼中、琼海、五指山、 东方、乐东、保亭、陵水、三亚、万宁 Haikou, Chengmai, Wenchang, Ding'an, Danzhou, Baisha, Qiongzong, Qionghai, Wuzhishan, Dongfang, Ledong, Baoting, Lingshui, Sanya, Wanning
	胡椒瘟病 Black pepper foot rot	胡椒 <i>Piper nigrum</i>	文昌、万宁、定安、琼海 Wenchang, Wanning, Ding'an, Qionghai
	番木瓜疫病 Papaya <i>Phytophthora</i> blight	番木瓜 <i>Carica papaya</i>	海口、澄迈、儋州、东方、乐东、陵水 Haikou, Chengmai, Danzhou, Dongfang, Ledong, Lingshui
	西瓜疫病 Watermelon <i>Phytophthora</i> blight	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	东方、乐东、昌江 Dongfang, Ledong, Changjiang
	茄子疫病 Eggplant <i>Phytophthora</i> rot	茄子 <i>Solanum melongena</i>	海口、文昌、定安、五指山、东方、乐东、三亚 Haikou, Wenchang, Ding'an, Wuzhishan, Dongfang, Ledong, Sanya
	番茄晚疫病 Tomato late blight	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	海口、文昌、陵水 Haikou, Wenchang, Lingshui
烟草疫霉 <i>P. nicotianae</i>	烟草黑胫病 Tobacco black shank	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	儋州 Danzhou

续表 2 Continued

疫霉菌种 <i>Phytophthora</i> species	病害 Disease	寄主 Host	分布地点 Locality
	香草兰疫病 <i>Vanilla Phytophthora</i> blight	香草兰 <i>Vanilla planifolia</i>	万宁、兴隆 Wanning, Xinglong
	茄子疫病 <i>Eggplant Phytophthora</i> disease	茄子 <i>Solanum melongena</i>	儋州、崖城、三亚、海口、文昌 Danzhou, Yacheng, Sanya, Haikou, Wenchang
	豇豆根腐病 Cowpea root rot	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	三亚 Sanya
	菠萝心腐病 <i>Pineapple heart rot</i>	菠萝 <i>Ananas comosus</i>	琼海、临高 Qionghai, Lingao
	剑麻斑马纹病 <i>Sisal zebra disease</i>	剑麻 <i>Agave sisalana</i>	儋州、临高 Danzhou, Lingao
豇豆疫霉 <i>P. vignae</i>	豇豆根腐病 Cowpea root rot	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	澄迈、儋州、海口、乐东、陵水、三亚 Chengmai, Danzhou, Haikou, Ledong, Lingshui, Sanya
大豆疫霉 <i>P. sojiae</i>	大豆疫霉根腐病 <i>Soybean Phytophthora</i> root rot	大豆 <i>Glycine max</i>	儋州、乐东、三亚 Danzhou, Ledong, Sanya
樟疫霉 <i>P. cinnamomi</i>	油梨根腐病 Avocado root rot	油梨 <i>Persea americana</i>	儋州 Danzhou
致病疫霉 <i>P. infestans</i>	番茄晚疫病 Tomato late blight	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	海口、文昌、陵水 Haikou, Wenchang, Lingshui
芋疫霉 <i>P. colocasiae</i>	芋疫病 Taro leaf spot	芋 <i>Colocasia esculenta</i>	海南省全省分布 All over the Hainan Province
		野芋 <i>Colocasia antiquorum</i>	海南省全省分布 All over the Hainan Province

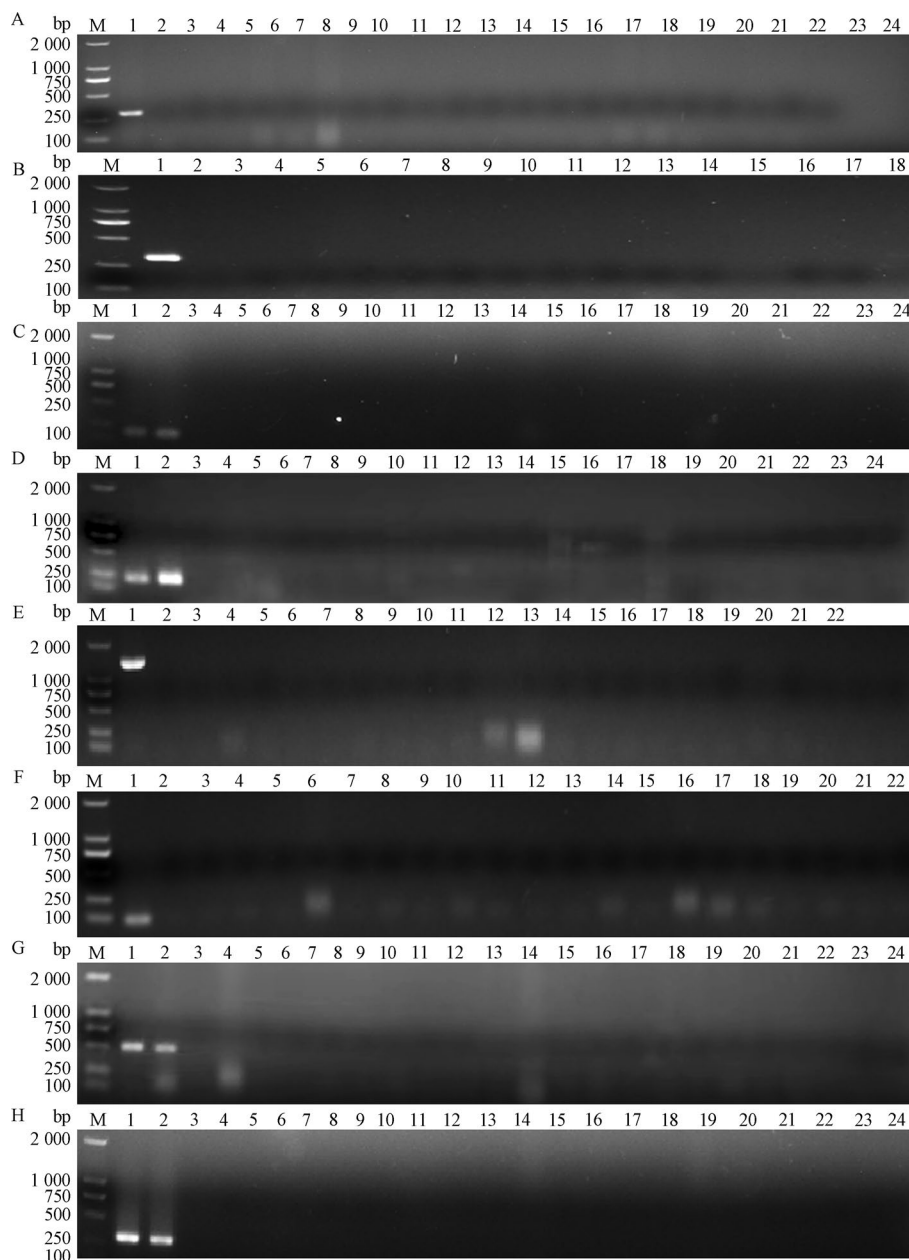
2.6 疫霉菌快速分子检测技术的建立

基于设计的 8 个疫霉菌的特异性引物, 优化并建立其相应 PCR 反应体系进行 8 个疫霉菌的检测, 电泳结果显示, 设计的特异引物能扩增出目标菌株相应的目的条带, 而其他疫霉菌近缘种、病原真菌及阴性对照均未出现扩增条带(图 6)。表明本研究设计的引物特异性高, 建立的 PCR 反应体系可靠, 可对海南省主要植物疫霉菌种类进行快速检测和种间鉴定。

3 讨论

卵菌纲疫霉菌属卵菌是一类在全球范围内广泛分布并造成严重危害的病原菌, 该属病原菌多为致病菌, 可侵染植物导致其叶片、根茎和果实等组织腐烂, 给农业生产带来了严重的经济损失。而海南省的气候为植物疫病发生提供了适宜条件, 造成多种植物疫霉菌在海南省内大范围发生和传播。其中, 6 种疫霉菌在全球均具有重要经济性, 包括致病疫霉、栎树疫霉 *P. ramorum*、大豆疫霉、辣椒疫霉、樟疫霉、烟草疫霉, 被列入全球最重要的 10 种病原卵菌中(Kamoun et al., 2015)。

关于海南省植物疫霉菌种类的调查研究, 不同研究团队分别鉴定出了 9 个(贺春萍等, 2002)和 14 个(Zeng et al., 2009)疫霉菌。本研究在海南省(除三沙市以外)共 159 个地点进行了调查和采样, 采用传统形态学特征、分子生物学鉴定和致病性验证相结合的方法共鉴定出 8 个疫霉菌。与前人调查结果相比, 本研究未发现柑橘生疫霉 *P. citricola*、柑橘褐腐疫霉、隐地疫霉、桂氏疫霉 *P. katsurae*、缺雄疫霉 *P. insolita*、密色疫霉 *P. meadii* 及橡胶疫霉 *P. heveae* 这 7 种, 但新增了大豆疫霉和豇豆疫霉。其中, 大豆疫霉和豇豆疫霉是首次发现在海南省有发生和分布, 二者所致病害在田间的危害严重, 常引起大片植株死亡和缺苗, 显著影响产量; 同时, 首次于我国在田间调查中发现榴莲根腐病, 并将其病原菌鉴定为棕榈疫霉。前人在海南省鉴定到的柑橘生疫霉、柑橘褐腐疫霉、橡胶疫霉、桂氏疫霉及缺雄疫霉等种均是从土壤或水体中分离获得(贺春萍等, 2002; Zeng et al., 2009), 本研究所得疫霉菌均是从寄主植株上分离获得, 且具有较强的致病性, 这可能是造成与前人所鉴定的海南省疫霉菌种类不一致的主要原因。



M: DNA 分子量标准; A: 棕榈疫霉 PCR 检测, 1 为棕榈疫霉, 2~23 为其他疫霉菌近缘种及真菌, 24 为阴性对照; B: 致病疫霉 PCR 检测, 1 为致病疫霉, 2~17 为其他疫霉菌近缘种及真菌, 18 为阴性对照; C: 辣椒疫霉 PCR 检测, 1~2 为辣椒疫霉, 3~23 为其他疫霉菌近缘种及真菌, 24 为阴性对照; D: 烟草疫霉 PCR 检测, 1~2 为烟草疫霉, 3~23 为其他疫霉菌近缘种及真菌, 24 为阴性对照; E: 大豆疫霉 PCR 检测, 1 为大豆疫霉, 2~21 为其他疫霉菌近缘种及真菌, 22 为阴性对照; F: 豇豆疫霉 PCR 检测, 1 为豇豆疫霉, 2~21 为其他疫霉菌近缘种及真菌, 22 为阴性对照; G: 樟疫霉 PCR 检测, 1~2 为樟疫霉, 3~23 为其他疫霉菌近缘种及真菌, 24 为阴性对照; H: 芋疫霉 PCR 检测, 1~2 为芋疫霉, 3~23 为其他疫霉菌近缘种及真菌, 24 为阴性对照。M: DL2000 DNA marker; A: PCR detection of *P. palmivora*. 1 is *P. palmivora*, 2~23 are closely related oomycetes or fungal species, 24 is negative control; B: PCR detection of *P. infestans*, 1 is *P. infestans*, 2~17 are closely related oomycetes or fungal species, 18 is negative control; C: PCR detection of *P. capsici*, 1~2 are *P. capsici*, 3~23 are closely related oomycetes or fungal species, 24 is negative control; D: PCR detection of *P. nicotianae*, 1~2 are *P. nicotianae*, 3~23 are closely related oomycetes or fungal species, 24 is negative control; E: PCR detection of *P. sojae*, 1 is *P. sojae*, 2~21 are closely related oomycetes or fungal species, 22 is negative control; F: PCR detection of *P. vignae*, 1 is *P. vignae*, 2~21 are closely related oomycetes or fungal species, 22 is negative control; G: PCR detection of *P. cinnamomi*, 1~2 are *P. cinnamomi*, 3~23 are closely related oomycetes or fungal species, 24 is negative control; H: PCR detection of *P. colocasiae*, 1~2 are *P. colocasiae*, 3~23 are closely related oomycetes or fungal species, 24 is negative control.

图6 海南省植物疫霉菌的PCR检测

Fig. 6 PCR detection of *Phytophthora* species in Hainan Province

本研究发现植物疫病在所调查的海南省各市县均有分布,导致橡胶树割面条溃疡病、橡胶树季风性落叶病、富贵竹叶疫病、榴莲根腐病、番木瓜疫病、木薯根腐病、辣椒根腐病、胡椒瘟病、菠萝心腐病、番茄晚疫病、香草兰疫病、茄子果腐病、大豆根腐病、辣椒苗期根腐病、豇豆根腐病、四季豆根腐病、油梨根腐病、芋疫病等多种疫病的发生和流行。芋疫病在海南省各调查市县均有发生;辣椒根腐病从出苗到结果期均可发病,橡胶树割面条溃疡病与季风性落叶病在海南省普遍发生,导致橡胶严重减产;大豆根腐病主要分布在三亚市和乐东县,分布范围较窄,但田间发生频繁,病程发展速度快,导致植株大面积死亡,危害严重;此次调查发现榴莲根腐病在乐东县和保亭县频发。本次调查的橡胶树割面条溃疡、辣椒根腐、胡椒瘟病、茄子果腐病、菠萝心腐病及芋疫病的病原菌,与贺春萍等(2002)调查结果基本一致。而豇豆根腐病和大豆根腐病是此次调查新发现的病害,且田间危害最严重。然而,此前报道的西番莲茎基腐病(詹儒林等,2003)、可可黑果病(桑利伟等,2014)、柑橘茎基腐病(贺春萍等,2002)及龙眼基腐病(谢昌平等,2012)等本研究均未发现。究其原因可能是农业耕作方式及作物品种等的改变导致作物疫病发生了改变,或者是采集调查地点覆盖度不够。

关于疫霉菌的分子检测技术研究较多,一般从ITS(王立安等,2004)、*Ypt1*(王荣波等,2022)、 *β -tubulin*(曹继芬等,2016)、*EF-1 α* (Llorente et al.,2010)、*HSP90*(刘跃庭等,2015)等基因区域寻找保守序列来设计特异性引物,通过PCR技术实现快速检测。本研究对分离鉴定到的8个疫霉菌种分别设计和筛选了特异性引物,并建立了PCR快速检测体系,可以在短时间内的快速检测和种间鉴定。近年来,除了常用的PCR、巢式PCR、多重PCR、实时荧光定量PCR等技术外,不断有新的技术涌现,如环介导等温扩增技术、重组酶聚合酶扩增技术以及恒温扩增结合CRISPR/Cas12a基因编辑的检测技术等(Khan et al.,2017;Li et al.,2024),后续可考虑针对这些疫霉菌种开发更快捷、经济且可靠的分子检测技术。

本研究在作物根腐病调查中发现,疫霉菌根腐病与镰孢菌根腐病混合发生现象普遍,柑橘 *Citrus reticulata*、草莓、芦荟 *Aloe vera*、哈密瓜 *Cucumis melo*、百香果 *Passiflora edulis*、可可 *Theobroma cacao*、番石榴 *Psidium guajava*、龙眼 *Dimocarpus longan*、金钱树 *Zamioculcas zamiifolia*、三角梅 *Bougainvillea spectabilis*、菊花 *Chrysanthemum*×*morifo-*

lium、槟榔 *Areca catechu*、油棕 *Elaeis guineensis* 等热带作物、果蔬及林木花卉均出现枯萎病症状,但采集的样本进行病原菌分离后经显微观察鉴定均为镰孢菌属真菌 *Fusarium* spp.,并未分离出疫霉菌属或腐霉菌属 *Pythium* 病原卵菌。本研究调查范围仅限于海南省,虽然采集了大量病害样本,但是采集地点覆盖度不够,尚有许多植物疫病样本未采集到,可能存在其他未发现的植物疫霉菌,尤其是林业相关树种的疫病样本采集偏少,目前仍有部分标本还在分离鉴定中。因此,今后应进一步加大采样数量及范围,并进行长期监测,逐步明确海南省植物疫病发生情况及分布,为该类药物防控提供参考依据。

参 考 文 献 (References)

- Abad ZG, Burgess TI, Bourret T, Bensch K, Cacciola SO, Scanu B, Mathew R, Kasiborski B, Srivastava S, Kageyama K, et al. 2023. *Phytophthora*: taxonomic and phylogenetic revision of the genus. *Studies in Mycology*, 106: 259–348
- Cao JF, Hu YX, Wang XZ, Xu FH, Yang MY, Zhao ZJ. 2016. Molecular detection of tobacco black root rot pathogen based on β -tubulin gene. *Chinese Tobacco Science*, 37(6): 60–65 (in Chinese) [曹继芬, 户艳霞, 王新中, 徐发华, 杨明英, 赵志坚. 2016. 基于微管蛋白基因的烟草根黑腐病菌分子检测. *中国烟草科学*, 37(6): 60–65]
- Chen QH, Li BJ, Lan CZ, Zhao J, Qiu RZ, Weng QY. 2009. Development and application of duplex PCR assay for detection of *Phytophthora infestans* and *Ralstonia solanacearum*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39(6): 578–583 (in Chinese) [陈庆河, 李本金, 兰成忠, 赵健, 邱荣洲, 翁启勇. 2009. 双重PCR检测马铃薯晚疫病菌和青枯病菌方法的建立及应用. *植物病理学报*, 39(6): 578–583]
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30(1): 17–32
- He CP, Zeng HC, Zheng FC, Li R. 2002. Identification of *Phytophthora* species in Hainan plants. *Guangxi Plant Protection*, 15(2): 6–7 (in Chinese) [贺春萍, 曾会才, 郑服丛, 李锐. 2002. 海南植物疫霉菌种类鉴定. *广西植保*, 15(2): 6–7]
- Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, et al. 2015. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4): 413–434
- Khan M, Li BJ, Jiang Y, Weng QY, Chen QH. 2017. Evaluation of different PCR-based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the *Ypt1* gene. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1920
- Kroon LPNM, Bakker FT, van den Bosch GBM, Bonants PJM, Flier WG. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics*

- and Biology, 41(8): 766–782
- Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock AWAM, Govers F. 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology*, 102(4): 348–364
- Lan CZ, Lu XS, Yao JA, Ding XL, Jiang JX. 2019. Nested-PCR detection of taro leaf blight pathogen *Phytophthora colocasiae*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 34(1): 76–82 (in Chinese) [兰成忠, 卢学松, 姚锦爱, 丁雪玲, 蒋军喜. 2019. 芋疫霉菌的巢式PCR检测. 福建农业学报, 34(1): 76–82]
- Li ZT, Feng WZ, Zhu ZB, Lu SD, Lin MZ, Dong JL, Wang ZX, Liu FX, Chen QH. 2024. Cas-OPRAD: a one-pot RPA/PCR CRISPR/Cas12 assay for on-site *Phytophthora* root rot detection. *Frontiers in Microbiology*, 15: 1390422
- Liu YT, Zhu LH, Li PJ, Liao F, Ren XY, Li GR. 2015. Triplex-PCR molecular detection of two quarantine fungal diseases of *Prunus* spp., *Phytophthora syringae* and *P. cambivora*. *Journal of Plant Protection*, 42(4): 571–577 (in Chinese) [刘跃庭, 朱林慧, 李培江, 廖芳, 任学毅, 李关荣. 2015. 李属植物检疫性丁香疫霉和栗黑水疫霉的三重PCR分子检测. 植物保护学报, 42(4): 571–577]
- Llorente B, Bravo-Almonacid F, Cvitanich C, Orłowska E, Torres HN, Flawiá MM, Alonso GD. 2010. A quantitative real-time PCR method for in planta monitoring of *Phytophthora infestans* growth. *Letters in Applied Microbiology*, 51(6): 603–610
- Lu SD, Liu XZ, Zhou ZM, Huang JQ, Li DD, Tang H, Chen QH. 2025. First report of durian root rot caused by *Phytophthora palmivora* in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 55(3): 522–526 (in Chinese) [陆圣诞, 刘晓珍, 周志明, 黄家权, 李东栋, 汤华, 陈庆河. 2025. 棕榈疫霉引起榴莲根腐病在中国的首次报道. 植物病理学报, 55(3): 522–526]
- Lu X, Li CP, Pei YL, Guo H, Shi T, Huang GX. 2014. Preliminary identification of a pathogen causing *Phytophthora* root rot disease of cassava and its biological characteristics. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 34(8): 59–62, 85 (in Chinese) [卢昕, 李超萍, 裴月令, 郭涵, 时涛, 黄贵修. 2014. 木薯疫霉根腐病原初步鉴定及其生物学特性测定. 热带农业科学, 34(8): 59–62, 85]
- Luo N, Wang C, He F, Guo LJ, Fan HY, He S. 2015. Identification and ITS sequence analysis of pathogen of Papaya *Phytophthora* blight in Hainan. *South China Fruits*, 44(6): 6–9 (in Chinese) [罗霓, 王超, 何凡, 郭利军, 范鸿雁, 何舒. 2015. 海南番木瓜疫病病原菌鉴定与ITS序列分析. 中国南方果树, 44(6): 6–9]
- Sang LW, Liu AQ, Sun SW, Gao SF, Gou YF, Tan LH. 2014. Pathogen identification and occurrence of cacao black pod in Hainan Province. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 35(8): 1586–1591 (in Chinese) [桑利伟, 刘爱勤, 孙世伟, 高圣风, 苟亚峰, 谭乐和. 2014. 海南省可可黑果病病原鉴定及其发生规律. 热带作物学报, 35(8): 1586–1591]
- Schena L, Duncan JM, Cooke DEL. 2008. Development and application of a PCR-based ‘molecular tool box’ for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology*, 57(1): 64–75
- Tang QH, Song WW, Zhu H, Niu XQ, Yu FY, Han CW, Wu DY, Qin WQ. 2011. Research advance in distribution, diseases and control of *Phytophthora* species in tropical regions in China. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 23(8): 100–103 (in Chinese) [唐庆华, 宋薇薇, 朱辉, 牛晓庆, 余凤玉, 韩超文, 吴多扬, 覃伟权. 2011. 我国热区疫霉种的分布、疫病及其防治研究进展. 江西农业学报, 23(8): 100–103]
- Wang LA, Zhang WL, Wang YC, Wang LH, Zheng XB. 2004. Molecular detection of *Phytophthora sojae* using ITS-based PCR assay. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 27(3): 38–41 (in Chinese) [王立安, 张文利, 王源超, 王良华, 郑小波. 2004. 大豆疫霉的ITS分子检测. 南京农业大学学报, 27(3): 38–41]
- Wang RB, Chen SZ, Zhao YM, Li BJ, Liu PQ, Chen QH. 2022. Development of a recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick assay for rapid detection of the taro leaf blight pathogen *Phytophthora colocasiae*. *Journal of Plant Protection*, 49(6): 1654–1662 (in Chinese) [王荣波, 陈姝樽, 赵玉梅, 李本金, 刘裴清, 陈庆河. 2022. 芋疫霉重组聚合酶扩增结合侧流层析试纸条快速检测方法的建立及应用. 植物保护学报, 49(6): 1654–1662]
- Xie CP, He CP, Wen YT. 2012. Symptoms of longan base rot and identification of pathogen. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 32(1): 50–53 (in Chinese) [谢昌平, 贺春萍, 文衍堂. 2012. 龙眼基腐病的症状及病原鉴定. 热带农业科学, 32(1): 50–53]
- Xu JP. 2022. Origins and spread of plant fungal and oomycete disease outbreaks. *Journal of Plant Protection*, 49(1): 283–297
- Zeng HC, Ho HH, Zheng FC. 2009. A survey of *Phytophthora* species on Hainan Island of South China. *Journal of Phytopathology*, 157(1): 33–39
- Zhan RL, Zheng FC, Ho H. 2003. Isolation and identification of stalk butt rot of passion fruit in Hainan. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 24(4): 39–42 (in Chinese) [詹儒林, 郑服丛, Ho HH. 2003. 海南西番莲茎腐病病原的分离与鉴定. 热带作物学报, 24(4): 39–42]
- Zhang KM, Li YD, Zheng FC, Huang QC. 1990. *Phytophthora* species on rubber trees in China. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 11(2): 85–97 (in Chinese) [张开明, 黎乙东, 郑服丛, 黄庆春. 1990. 中国橡胶树疫霉种的研究. 热带作物学报, 11(2): 85–97]
- Zhang KM, Zheng FC, Li YD, Ann PJ, Ko WH. 1994. Isolates of *Phytophthora colocasiae* from Hainan Island in China: evidence suggesting an Asian origin of this species. *Mycologia*, 86(1): 108–112
- Zhang KM, Zheng FC, Li YD, Chen JP, Liu QF. 1991. Pepper *Phytophthora* and their mating patterns in China. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 12(2): 69–76 (in Chinese) [张开明, 郑服丛, 黎乙东, 陈锦平, 刘清芬. 1991. 中国胡椒疫霉种及交配型的研究. 热带作物学报, 12(2): 69–76]
- Zheng JL, Gao JM, Zhang SQ, Chen HL, Liu QL, Yi KX. 2011. Pathogen identification of zebra disease of sisal. *Journal of Northeast Agricultural University*, 42(12): 59–64 (in Chinese) [郑金龙, 高建明, 张世清, 陈河龙, 刘巧莲, 易克贤. 2011. 剑麻斑马纹病病原鉴定. 东北农业大学学报, 42(12): 59–64]
- Zheng XB. 1997. *Phytophthora* and its research technology. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [郑小波. 1997. 疫霉菌及其研究技术. 北京: 中国农业出版社]