

土壤理化因素对香蕉枯萎病菌生长和侵染的影响

黄永辉^{1,2} 陈琦光² 迟远丽¹ 杨媚² 周而勋²

1. 珠海出入境检验检疫局技术中心, 珠海 519015; 2. 华南农业大学农学院, 广州 510642

摘要 为探明土壤理化因素对香蕉枯萎病菌的影响, 在实验室条件下, 以尖镰孢古巴专化型 4 号生理小种 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, *Foc* 4) 菌株为对象, 模拟不同的土壤类型、温度、含水量和 pH 值等条件, 观察和分析这些因子对 *Foc* 4 生长和侵染的影响。结果表明, *Foc* 4 在土壤中最适条件为: 土壤温度 25 ℃, 含水量达到 30% 和偏酸性条件 (pH 4~5); 在盆栽试验中, *Foc* 4 的最佳侵染条件为: 温度 30 ℃, 偏酸性 (pH 3~5) 的土壤环境。

关键词 香蕉枯萎病菌; 土壤理化因素; 菌丝生长; 侵染

中图分类号 S 436. 67; S 668. 1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)02-0030-05

香蕉枯萎病 (banana fusarium wilt) 是由尖镰孢古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Foc*) 侵染引起的一种世界性的香蕉上的毁灭性病害, 广泛分布于亚洲、非洲、澳大利亚、南太平洋及热带美洲的各香蕉产区, 给香蕉种植国带来了巨大的经济损失^[1]。近年来, 由尖镰孢古巴专化型 4 号生理小种 (*Foc* 4) 引起的香蕉枯萎病已成为我国香蕉产业发展的最大障碍之一, 该病在大部分香蕉种植区的发生和为害尚未得到有效控制^[2], 因此, 对该病害的研究仍然是一项艰巨的任务。近年来很多学者都致力于通过各种途径寻找防治香蕉枯萎病的有效方法, 并引入了国际上先进的技术手段, 例如基因敲除、病原菌与寄主间的蛋白互作等^[3-4]。笔者所在研究团队在香蕉与枯萎病菌互作过程中内源激素含量的变化、香蕉枯萎病菌毒素以及诱抗剂的诱导抗病机制等方面也做了一些研究, 并取得了可喜的研究成果^[5-7]。

前人的研究表明, 土壤理化因素对土传病原菌的生长和病害发生都起着至关重要的作用^[8]。许多作物的镰孢菌枯萎病在土温高时易发生, 土壤含水量的增加也能加重镰孢菌枯萎病的发生。据 Weimer^[9] 报道, 当土壤持水量从 35% 增加到 55% 时, 枯萎病的发病率从 50% 提高到 80%。Amir 和 Alabouvette 用来自阿尔及利亚的 2 种土样进行非

生物特性研究, 发现沙土有利于枯萎病菌的侵染, 而粘土则具有抑制作用^[10]。本研究拟通过在实验室内人为控制土壤温度、含水量、pH 值和土壤质地等环境条件, 以了解这些土壤理化因素对香蕉枯萎病菌生长和侵染的影响, 旨在为生产实践中如何选择香蕉种植地和通过人为改变土壤环境条件等措施来减轻香蕉枯萎病的发生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验用土: 壤土、砂土、粘土, 采自广东省农科院大丰实验基地农田和菜园。

供试菌株: 尖镰孢古巴专化型 [*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder et Hansen] (香蕉枯萎病菌) 4 号生理小种 (*Foc* 4) 菌株 1 个, 分离自香蕉发病植株, 由华南农业大学热带亚热带真菌研究室鉴定和保存^[4]。

供试香蕉苗: 巴西蕉组培苗 (4~5 叶龄), 由广东省农科院作物研究所提供。

1.2 温度对香蕉枯萎病菌生长的影响

将供试土壤 (壤土) 110 ℃ 烘干 6~8 h, 碾碎后过孔径 0.90 mm 的筛。用无菌水调节成 25% 的含水量, 装入培养皿中, 表面压实铺平, 制成厚度为 3~5 mm 的土壤平板, 接上直径 5 mm 的 *Foc* 4 菌

收稿日期: 2015-03-10

基金项目: 国家现代农业 (香蕉) 产业技术体系建设专项 (CARS-32)

黄永辉, 硕士, 农艺师。研究方向: 植物病理学与真菌学。E-mail: hyh_ybzx@163.com

通信作者: 周而勋, 博士, 教授。研究方向: 植物病理学与真菌学。E-mail: exzhou@scau.edu.cn

饼(菌龄7 d,下同)后,密封保湿,分别置于不同温度(10、15、20、25、30和35℃)处理下(在培养箱中进行)。培养7 d后在解剖镜下测量菌落直径,每处理3次重复。

1.3 湿度对香蕉枯萎病菌生长的影响

由于选取的壤土含水量在35%以上时已成粘糊状,土壤的孔隙度和透气性较差。因此,本试验设置的6个含水量处理分别为10%、15%、20%、25%、30%和饱和状态(100%)。将试验用土壤用无菌水调节成以上6个含水量处理,分别装入培养皿中制成平板,接上直径为5 mm的*Foc 4*菌饼,密封保湿,然后置于25℃恒温箱中培养,7 d后在解剖镜下测量菌落直径。每处理3次重复。

1.4 pH值对香蕉枯萎病菌生长的影响

将1 mol/L的HCl和1 mol/L的NaOH加入无菌水中,在预备试验中首先确定大概加入的量,把上述土壤调节成25%的含水量,使土壤的最终pH值分别调至4~9范围内的5个梯度,用数字式酸度计(型号:METTLER TOLEDO FE20)测定配成土壤的实际pH值,然后装入培养皿中制成平板,接上直径5 mm的*Foc 4*菌饼,密封保湿,置于25℃恒温箱中培养,7 d后在解剖镜下测量菌落直径。每处理重复3次。

1.5 土壤质地对香蕉枯萎病菌生长的影响

选取壤土、砂土和粘土3种土壤,分别于110℃烘干6~8 h,碾碎后过孔径0.90 mm的筛。用无菌水调节成25%的含水量,将上述3种土壤装入培养皿中制成平板,接上直径5 mm的*Foc 4*菌饼,密封保湿,然后置于25℃恒温培养箱中培养,7 d后在解剖镜下测量菌落直径。每处理重复3次。

1.6 温度对香蕉枯萎病菌侵染的影响

设置6个温度处理:10、15、20、25、30和35℃,将试验用土壤(壤土)分装进花盆(上口径12 cm,高15 cm)中,每处理10盆,种上香蕉苗,每盆3株,待香蕉苗定植后,分别置于上述6个温度的人工气候箱中培养,用 10^6 个孢子/mL的孢子悬浮液进行灌根接种,每株苗灌根20 mL孢子悬浮液。以后每天统一浇水管理,保持一定湿度,28 d后调查病级,并计算病情指数。

1.7 pH值对香蕉枯萎病菌侵染的影响

用5 mol/L HCl和5 mol/L NaOH分别将试验用土壤(壤土)调至以下pH值(实测值):pH 3.75、pH 5.47、pH 7.18和pH 8.23,这里指的

是土壤初始pH值。将各处理土壤分装进花盆(上口径12 cm,高15 cm)中,每处理10盆,种上香蕉苗,每盆3株,待香蕉苗定植后用 10^6 孢子/mL的孢子悬浮液进行灌根接种,每株灌根20 mL孢子悬浮液。以相同pH值土壤种上香蕉苗同样处理以20 mL灭菌蒸馏水为对照,每天统一浇水管理,28 d后调查病级,并计算病情指数。

1.8 香蕉苗枯萎病分级标准及病情指数计算公式

香蕉苗枯萎病分级标准的制定参考Brake等^[11]和杨秀娟等^[12]的分级方法,病情分为0~4级,各级病情的发病症状描述如下:

0级,无条纹状或黄化叶片,植株外观健康,解剖球茎和假茎组织呈白色,未见变褐;1级,植株下部1~2片叶出现轻微的条纹或黄化症状,或球茎组织变褐面积占球茎纵切面积的1/4以下,假茎组织未见变褐;2级,植株下部大部分叶片出现条纹或黄化症状,或球茎组织变褐面积占球茎纵切面积的1/4~1/2,假茎组织未见变褐;3级,植株大部分或全部叶片表现大范围的条纹或黄化症状,或球茎组织变褐面积占球茎纵切面积的1/2~3/4,假茎组织上部未见变褐,而下部出现浅褐色斑点状或线条状病变,植株出现轻度萎蔫;4级,植株萎蔫、枯死,球茎组织3/4以上至全部变褐或腐烂,假茎组织上下部都出现褐色条状病变,基部萎缩或腐烂,易折断。

病情指数的计算公式:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级病株数} \times \text{相应级数值})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级数值}} \times 100$$

2 结果与分析

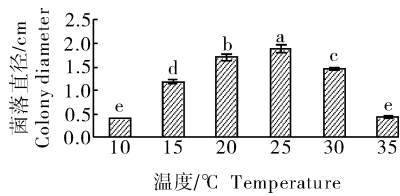
2.1 土壤温度对香蕉枯萎病菌生长的影响

土壤温度对香蕉枯萎病菌菌丝生长的影响较大。从图1中可以看到*Foc 4*在土壤中的最适生长温度为25℃,低温和高温都不利于该病菌的生长。当温度在10℃时,菌丝块周围只有少量菌丝,但不向外延伸;35℃时整个菌丝块干瘪收缩,菌丝完全死亡。温度除了影响菌丝生长的直径外,还与菌丝的粗细和密度有关,25℃时菌丝的密度最大,其次是20℃和15℃,30℃时菌丝生长较稀疏。

2.2 土壤含水量对香蕉枯萎病菌生长的影响

从图2中可以看出,在供试的土壤含水量范围内,*Foc 4*的生长与土壤含水量呈正相关,含水量达到30%时,生长最好;其中土壤含水量在15%和20%时,这2个处理之间差异不显著。另外,当土壤

含水量处于饱和状态(100%)时,病菌几乎不生长。菌丝的密度在一定的土壤含水量范围内也随土壤含水量的增加而增加。



图中不同字母表示处理间 Duncan's 新复极差分析差异显著 ($P<0.05$),下同。Different letters in the graph mean significantly different ($P<0.05$) using Duncan's multiple range test. The same as below.

图 1 土壤温度对香蕉枯萎病菌生长的影响

Fig.1 The effect of soil temperature on the growth of *Foc 4*

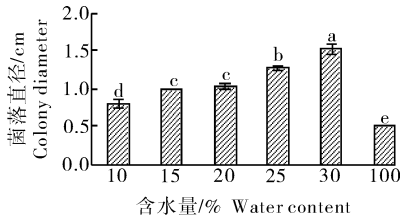


图 2 土壤含水量对香蕉枯萎病菌生长的影响

Fig.2 The effect of water content on the growth of *Foc 4*

2.3 土壤 pH 值对香蕉枯萎病菌生长的影响

香蕉枯萎病菌在土壤中生长的 pH 值范围较广,*Foc 4* 在 pH 值从 4 到 9 的酸碱环境下均能生长。图 3 的结果显示,该病菌更适合在偏酸性环境下生长,pH 值在 4 至 5 时菌丝生长最快,pH 值在 5 至 8 之间生长差异不显著,当 pH 值大于 8.5 时,菌丝的生长受到了抑制。另外,在偏酸条件下,菌丝生长快且菌丝旺盛;偏碱性条件下,菌丝生长慢,而且较稀薄。

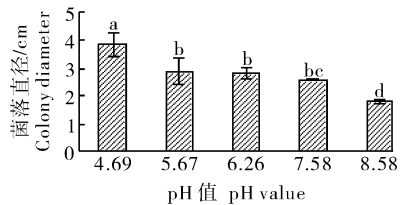


图 3 土壤 pH 值对香蕉枯萎病菌生长的影响

Fig.3 The effect of pH value on the growth of *Foc 4*

2.4 土壤质地对香蕉枯萎病菌生长的影响

本试验选取的 3 种质地的土壤:壤土、砂土和粘土,接种 7 d 后,菌落直径分别为 2.20、1.37、0.83 cm。可见 *Foc 4* 在壤土中生长得最快最好,其次是

砂土,在粘土中几乎不生长。在粘土上只有菌丝块周围和上方可见少量菌丝。这与 3 种质地的土壤的性质密切相关,壤土营养丰富,质地疏松,透气性好,特别有利于病菌的生长;而砂土缺乏营养,但渗水性好;粘土渗水性差,粘度大,制成平板时表面较结实,不透气,并且 pH 值偏碱性,各种因素都不利于枯萎病菌的生长。

2.5 温度对香蕉枯萎病菌侵染香蕉苗的影响

盆栽试验结果表明,温度是影响 *Foc 4* 侵染香蕉苗的主要因素。当温度达到 30 °C 时,最有利于该病菌的侵染,该温度盆栽处理的病情指数高达 73.3,发病率也达到最大值 93.3%;当温度低于 20 °C 时,病情指数均在 10 以下,发病率也不超过 40%;温度在 35 °C 时,侵染也受到抑制,病情指数和发病率均有所降低(图 4)。另外,温度在 10 °C 以下时,会对香蕉苗产生冻害,香蕉苗生长状况较差。

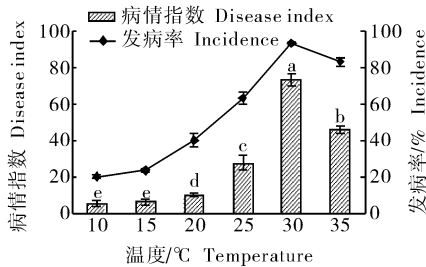


图 4 温度对香蕉枯萎病菌侵染香蕉苗的影响

Fig.4 The effect of temperature on infection of *Foc 4*

2.6 土壤 pH 值对香蕉枯萎病菌侵染香蕉苗的影响

土壤初始 pH 值对 *Foc 4* 侵染香蕉苗也有一定的影响。从图 5 中可看到,在 4 个代表性的 pH 值处理中,偏酸性环境(pH 3~5)最有利于该病菌的侵染,随着 pH 值的升高,病菌的侵染受到抑制,发病率不断降低;但是当 pH 值在中性时(pH 7.18),病情指数异常变大,这可能与香蕉苗的生长状况有关,也可能是由于在 pH 值中性环境下,被侵染的香蕉苗发病较快的原因;碱性条件下发病率虽低,但同时也不利于香蕉苗的生长。

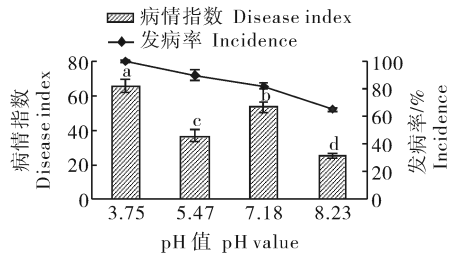


图 5 pH 值对香蕉枯萎病菌侵染香蕉苗的影响

Fig.5 The effect of pH value on infection of *Foc 4*

3 讨论

本研究在实验室人为控制土壤环境因素条件下,探讨了各种土壤理化因素对香蕉枯萎病菌生长和侵染的影响。结果表明:香蕉枯萎病菌在土壤温度 25℃ 左右,含水量达到 30% 时,在偏酸性(pH 4~5)的壤土中生长最好;另外,在温度 30℃ 左右和偏酸性(pH 3~5)的土壤环境中,最有利于香蕉枯萎病菌的侵染。

Cook 等^[13]早在 1983 年就报道了镰孢菌枯萎病菌的最适生长温度为 28℃,在温度 33℃ 以上和 17℃ 以下时,生长受到抑制。另外,Brake 等^[11]研究指出,香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种在植株上表现症状最严重时的温度分别为 20℃ 和 28℃。本研究与这些前人的研究结果基本一致。

土壤含水量影响着植物根系的生长发育,同时也影响土壤微生物的活动^[14]。大多数镰孢菌都是好氧型真菌,更适合在含水量较低的土壤中存活^[15],其活性和存活能力也是在较干燥的土壤环境中更强^[16]。Peng 等^[17]研究报道了土壤含水量(相对含水量)在田间持水量为 20%~80% 之间时对香蕉枯萎病菌厚垣孢子的活性影响不大,但是却严重影响寄主香蕉的生长。因此,病原菌和寄主对土壤水分的这种不同反应很可能在干旱情况下会导致香蕉枯萎病发生概率的增加^[18]。本研究中所用的土壤含水量为绝对含水量,即含水量占土壤干质量的百分比。本研究中香蕉枯萎病菌菌丝的生长与土壤含水量在一定范围内呈正相关,可见菌丝生长与孢子维持活性所需的水分是不一样的,但是在土壤含水量较大甚至饱和的情况下都不利于香蕉枯萎病的发生。

在土壤 pH 值对香蕉枯萎病菌影响的研究上,前人的研究结果存在较大的差异。我国台湾的 Chuang^[19]在研究中发现,香蕉枯萎病菌的厚垣孢子在土壤中萌发与土壤 pH 值(pH 4~8)呈负相关的关系,并且其在碱性(pH 8、9、10)的土壤中比在酸性(pH 2、3、4)的土壤中存活的时间更长。Peng 等^[17]的研究结果则显示:当土壤 pH 为 8 时,土壤中香蕉枯萎病菌厚垣孢子的萌发率和香蕉枯萎病严重度都最高,而当土壤 pH 值达到更高(pH 10)或土壤为酸性(pH 4~6)时,土壤中的厚垣孢子均受到抑制。但是,当 pH 值为 10 时,病害的严重度仍然保持较高。然而也有报道指出,辣椒镰孢菌枯萎病

在 pH 6.4~7.0 时比 pH 7.7~8.3 时的病害症状更为严重^[20]。Sugha 等^[21]也报道了鹰嘴豆镰孢菌枯萎病在 pH 5.2 时发生最为严重,但随着 pH 值的增加病害明显减轻。本研究的结果也与前人的研究结果存在一定的差异,这可能与各自在实验中所使用的镰孢菌专化型、生理小种、土壤类型以及病原菌来源地的环境因素差异都有一定的关系。

本研究取得的这些研究结果,为我们制定有效的香蕉枯萎病的防控措施提供了重要的理论依据。比如在实际生产中,科学地选择香蕉种植地(土壤类型),通过调整种植期来避开香蕉枯萎病的高发期,在病菌容易侵染的季节或时段尽量减少容易造成植物根部受伤的农事操作,以降低病菌侵入的机率;同时也可以通过改变土壤酸碱度来控制病害的发展,比如向土壤中撒施生石灰、多施碱性肥料等措施,都可以收到不错的防病效果。

参 考 文 献

- [1] JONES D R. Diseases of banana, abacá and enset [M]. London: CABI Publishing, 1999: 1-544.
- [2] 谢梅琼, 杨媚, 杨迎青, 等. 香蕉枯萎病菌的风险性分析[J]. 果树学报, 2011, 28(2): 284-289.
- [3] 唐改娟, 曾涛, 林妃, 等. 香蕉枯萎病菌 1 号小种致病相关基因敲除突变体 Δ Focrl-328 的生物学特性研究[C]. 海口: 2011 年海南省微生物学会学术年会, 2011.
- [4] LI X S, BAI T T, LI Y F, et al. Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4-inoculated response to *Fusarium* wilts in the banana root cells[J]. Proteome Science, 2013, 11: 41.
- [5] 唐倩菲, 杨媚, 周而勋, 等. 香蕉受枯萎病菌侵染后内源激素含量的变化[J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(2): 42-44.
- [6] 杨媚, 黄永辉, 舒灿伟, 等. 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种粗毒素特性的研究[J]. 园艺学报, 2012, 39(3): 545-551.
- [7] 黄永辉, 杨媚, 权永兵, 等. 苯并噻二唑对香蕉枯萎病的诱导抗病性[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(3): 36-41.
- [8] ALABOUVETTE C. *Fusarium* wilt suppressive soils from the cha-teaurenard region: review of a 10-year study [J]. Agronomie, 1986, 6(3): 273-284.
- [9] WEIMER J L. Temperature and soil-moisture relations of *Fusarium oxysporum* var. *medicaginis* [J]. Journal of Agricultural Research, 1930, 40(2): 97-103.
- [10] AMIR H, ALABOUVETTE C. Involvement of soil abiotic factors in the mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilts [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1993, 25(2): 157-164.
- [11] BRAKE V M, PEGG K G, IRWIN J A G, et al. The influence of temperature, inoculum level and race of *Fusarium oxysporum* f.

sp. *cubense* on the disease reaction of banana cv. Cavendish [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1995, 46: 673-685.

[12] 杨秀娟, 陈福如, 黄月英, 等. 接种枯萎病菌香蕉苗病症及其组织病理特征[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2006, 35(6): 578-581.

[13] COOK R J, BAKER K F. The nature and practice of biological control of plant pathogens [M]. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society Press, 1983: 539.

[14] 王发园, 刘润进. 环境因子对 AM 真菌多样性的影响[J]. 生物多样性, 2001, 9(2): 301-305.

[15] STOVER R H. The effect of soil moisture on the growth and survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the laboratory [J]. Phytopathology, 1953, 43: 499-504.

[16] COOK R J. Water relations in the biology of *Fusarium* [C]// NELSON P E, TOUSSOUN T A, COOK R J. *Fusarium*: disease, biology, and taxonomy. University Park, PA: Pennsylvania State University Press, 1981: 336-344.

[17] PENG H X, SIVASITHAMPARAM K, TURNER D W. Chlamydospore germination and fusarium wilt of banana plantlets in suppressive and conducive soils are affected by physical and chemical factors [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31: 1363-1374.

[18] PEGG K G, SHIVAS R G, MOOR N Y, et al. Characterization of a unique population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing fusarium wilt in Cavendish bananas at Carnarvon, Western Australia [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1995, 46: 167-178.

[19] CHUANG T Y. Soil suppressive of banana fusarium wilt in Taiwan [J]. Plant Protection Bulletin (Taiwan, ROC), 1991, 33: 133-141.

[20] SARHAN A R T, SHARIF F M. Integrated control of fusarium wilt of pepper [J]. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 1986, 21: 123-126.

[21] SUGHA S K, KAPOOR S K, SINGH B M. Soil characteristics and their relation to fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Tropical Science, 1994, 34: 282-288.

Effects of soil physi-chemical factors on growth and infection of banana fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

HUANG Yonghui^{1,2} CHEN Qiguang² CHI Yuanli¹ YANG Mei² ZHOU Erxun²

1. The Technology Center of Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China;

2. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract In order to verify the effects of soil physi-chemical factors on the banana fusarium wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, *Foc* 4), various soil physi-chemical factors including soil types, temperature, water content and pH value were simulated under laboratory conditions, and the effects on the growth and infection of *Foc* 4 were observed and analyzed. The results showed that the optimal growth conditions for *Foc* 4 were at 25 °C with higher soil moisture of 30% and acidic pH value of 4 to 5 in soil; whereas the optimal infection conditions of *Foc* 4 to banana plantlets were at 30 °C and in the acidic soil environment (pH 3 to 5) in the pot experiments.

Keywords *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; soil physi-chemical factors; mycelial growth; infection

(责任编辑:边书京)