

广东香蕉枯萎病菌生理小种的鉴定

李敏慧, 习平根, 姜子德, 戚佩坤

(华南农业大学植物病理学系, 广东广州 510642)

摘要: 以4~5片叶的组培香蕉苗和粉蕉苗为材料, 采用伤根浸菌液的接种法对分离自番禺、中山、肇庆、珠海、顺德等地的香蕉枯萎病菌株进行了致病性测定, 同时观察了各菌株在Komada改良培养基上菌落形态特征。结果表明在广东的确存在香蕉枯萎病菌1号和4号2个小种, 认为致病性测定结合Komada改良培养基上菌落形态特征是鉴定香蕉枯萎病菌生理小种的简单、快速而又可靠的方法。

关键词: 香蕉枯萎病; 尖孢镰刀菌古巴专化型; 致病性测定; 菌落形状; 小种鉴定

中图分类号: S436.8 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2007)02-0038-04

Race Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense,

the Causal Agent of Banana Fusarium Wilt in Guangdong Province

LI Min-hui, XI Ping-gen, JIANG Zi-de, QI Pei-kun

(Department of Plant Pathology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Banana Fusarium wilt, a kind of soilborne vascular disease infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (E. F. Sm.) Snyd. & Hans. is threatening the banana and Fenjiao production in Guangdong Province, China. Based on the pathogenicity test on 4-5-leaf tissue-cultured banana plantlets and colony morphology on modified Komada medium, the isolates from the regions of Panyu, Zhongshan, Zhaoqing, Zhuhai and Shunde were identified as *F. oxysporum* f. sp. cubense race 1 and race 4 respectively. It was proved that the pathogenicity test combined with colony morphology on modified Komada medium was a simple, fast and reliable method for identifying races of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.

Key words: banana Fusarium wilt; *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense; pathogenicity test; colony morphology; identification of race

香蕉作为岭南四大佳果之一,在广东省栽培面积较大,2005年的种植面积为12.8万hm²,产量达330万t,产值约60亿元人民币,是我国最大的香蕉主产省。近几年香蕉枯萎病在珠江三角洲部分地区主栽香蕉品系上的发生和危害,使广东的香蕉生产受到了极大的威胁。该病由尖孢镰刀菌古巴专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (E. F. Sm.) Snyd. & Hans. 引起,发展迅速,防治困难,死亡率极高,是香蕉栽培生产上的毁灭性真菌病害。病园的发病率为10%~40%,严重的达90%以上^[1]。目前,报

道的香蕉枯萎病菌有4个生理小种^[2-4]。广东于20世纪70年代初就发现了香蕉枯萎病菌,但只为害粉蕉,被鉴定为1号生理小种;20多年未见香蕉被害,直到1996年在番禺万顷沙镇发现香蕉品种巴西蕉和广东2号出现枯萎现象,而且蔓延速度较快^[5]。尽管多名学者认为广东香蕉枯萎病菌存在1号和4号2个生理小种^[6-9],但鲜见完整的鉴定方法研究报道。本文以来源于澳大利亚的1号和4号生理小种作对照、通过致病性测定并结合Komada改良培养基上的菌落特征,对分别来自广东的5个香蕉主产区枯萎

收稿日期:2006-06-09

作者简介:李敏慧(1973—),女,博士;通讯作者:姜子德(1962—),男,教授,E-mail:zdjiang@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30571207);广东省自然科学基金(E05202480);广东省科技计划项目(2003C20503);广东省农业厅科技项目(粤农函[2006]229号)

病菌株所属生理小种进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 标本的采集及症状观察

2003年8月—2004年8月,多次赴广东番禺、中山、肇庆、增城、顺德等地采集枯萎病病害标本,剖开病株假茎观察维管束病变情况,描述症状及拍照。

1.2 病原菌的分离

从病株假茎病健交界处切取小块组织,采用常规组织分离法进行分离^[10],25℃下于PDA培养2~3d,待长出菌落后,挑菌落边缘菌丝培养,单孢分离后保存备用。菌株来源及编号见表1。

表1 供试香蕉枯萎病菌菌株

Tab.1 Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* used in the study

编号 ¹⁾ no.	寄主 host	采集时间 collection time	采样地点 isolate source
XJZ1	香蕉	2003-08	肇庆
XJZ2	香蕉	2003-07	番禺
XJZ7	香蕉	2004-08	珠海
FJZ1	粉蕉	2003-07	中山
FJZ2	粉蕉	2003-07	番禺
FJZ3	粉蕉	2003-09	顺德
BW1	粉蕉		澳大利亚
BW4	香蕉		澳大利亚
CW	黄瓜	2003-05	广州
MW	棉花		真菌室自存

1) BW1、BW4 为澳大利亚 Suzy Bentley 博士惠赠(周而勋教授转赠),分别为1号和4号生理小种;GW和MW分别为黄瓜枯萎病菌和棉花枯萎病菌

1.3 致病性测定

选4~5叶期的健康组培香蕉苗(巴西蕉AAA)和粉蕉苗(ABB),采用伤根浸菌液法进行接种,即将组培苗自苗床拔出,用自来水冲洗干净,再分别浸在配制好的各分离菌株孢子悬浮液($1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)中,以清水做对照,浸泡30min后移栽到盛有灭菌细砂的营养杯,置于温室(25~32℃),15d后观察结果。每个菌株接种香蕉苗和粉蕉苗各30株。

为确定一个合适的接种孢子含量,以菌株XJZ2和香蕉苗为材料,观察了不同孢子含量(1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)接种15d后的发病情况。同时在固定孢子含量($1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)的前提下,分别浸泡不同的时间(1、10、20、30、40min),15d后观察发病情况,以确定最佳的浸苗时间。

1.4 Komada 改良培养基上的培养

依据 Sun^[11]的方法:稍加修改配制 Komada 基本培养基 [K_2HPO_4 1g、KCl 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.5g、FeNaEDTA 0.01g、天冬素(L-asparagine) 2g、半乳糖 10g、琼脂粉 16g、去离子水定容至 900mL],高压灭菌后,900mL基本培养基与 100mL的盐溶液($w = 75\%$ WP PCNB 0.9g、Oxgall 0.45g、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、硫酸链霉素 0.3g,用 $\varphi = 10\%$ 磷酸调pH至 3.8 ± 0.2)混合;倒平板,接种待鉴定菌株,25℃、日光灯相距约30cm照射下培养10d后观察结果。

2 结果

2.1 病害症状

植株感病早期无明显外部症状,染病一段时间后,叶片自下而上相继发病,从叶缘向中脉逐渐黄化、变褐干枯,并随近叶鞘处叶柄的折曲而下垂;部分病株假茎基部开裂;横切发病植株的假茎部,可见褐色或红棕色斑点状坏死病变;纵剖病株假茎,其维管束组织变为褐色或黑色,根系也呈黑褐色坏死。

2.2 致病性测定

对不同含量孢子悬浮液所接种的30株组培香蕉苗的检查结果(图1a)表明,均有病株出现,但症状的轻重有差别,发病轻的香蕉苗叶片无黄化现象,但纵剖假茎可见褐色至红褐色的坏死斑点;而发病重的香蕉苗叶片出现黄化现象,纵剖假茎褐色至红褐色的坏死明显,严重时整个假茎全部变褐色;接种后15d的观察结果表明,发病率随接种孢子含量增大而增高。虽然当孢子含量为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 时比 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的发病率高,但是增幅很小,鉴于15d的观察期限内,接种孢子含量为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 时就能够保证高的发病率和出现明显的症状,故各菌株的致病性测定均采用此含量。

一定的孢子含量下,不同浸苗时间的接种结果(图1b)表明,浸苗1、10、20min所造成的发病率基本没有差别,但延长浸泡时间至30min甚至40min时,发病率达到最高。因此为保证在固定的观察期限内,出现明显的发病症状,选用浸泡30min为最佳的浸泡时间。

10个供试菌株分别以孢子含量为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$

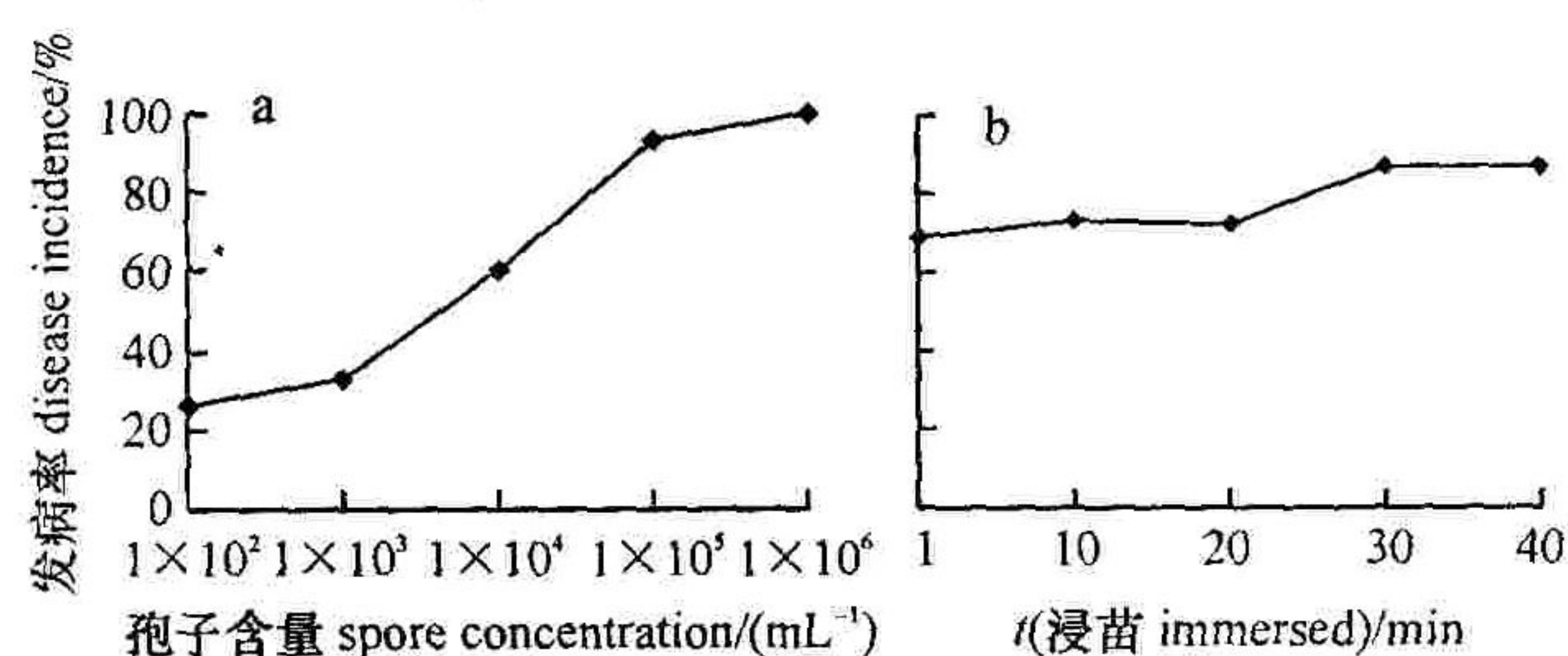


图1 不同接种孢子含量和不同浸苗时间的发病率

Fig.1 Disease incidence of different inoculated spore concentration, different immersed time

的悬浮液接种香蕉苗和粉蕉苗,结果(表2)表明,菌株 XJZ1、XJZ2、XJZ7、FJZ2 与来自澳大利亚的4号小种 BW4 既对香蕉(巴西蕉)致病又对粉蕉致病,而菌株 FJZ1、FJZ3 与来自澳大利亚的1号小种 BW1 则只对粉蕉致病,来自棉花和黄瓜的菌株 MW 和 GM 及清水处理不发病(表2)。根据 Stove^[2, 12-13] 的研究,按照不同的鉴别寄主的发病情况,菌株 XJZ1、XJZ2、XJZ7、FJZ2 拟鉴定为香蕉枯萎病菌4号小种,而菌株 FJZ1、FJZ3 拟鉴定为1号小种。

表2 不同菌株接种后15 d的发病率

Tab. 2 Disease incidence of different isolates after 15 d inoculation

菌株编号 no. of isolate	接种粉蕉发病率 disease incidence of Fenjiao (ABB)/%	接种香蕉发病率 disease incidence of banana (AAA)/%
XJZ1	100	100
XJZ2	100	100
XJZ7	87	100
FJZ1	87	0
FJZ2	100	100
FJZ3	100	0
BW1	94	0
BW4	87	94
CW	0	0
MW	0	0

2.3 Komada 改良培养基对香蕉枯萎病菌生理小种的鉴别

5个同时侵染香蕉苗和粉蕉苗的菌株,即 XJZ1、XJZ2、XJZ7、FJZ2 和 BW4,在 Komada 改良培养基上出现不同程度的裂齿状(lacinated)菌落形态特征,来自澳大利亚的4号生理小种菌落边缘的裂齿状不及其他几个菌株明显。而只侵染粉蕉苗的菌株 FJZ1、FJZ3 和 BW1 以及黄瓜枯萎病菌 GW、棉花枯萎病菌 MW 则没有这种特殊的菌落形态出现。依台湾 Sun 等^[11] 的研究并结合本试验的致病性测定结果,菌株 XJZ1、XJZ2、XJZ7、FJZ2 鉴定为4号生理小种,菌株 FJZ1、FJZ3 为1号生理小种。由此可知,菌株在 Komada 改良培养基上的菌落是否出现裂齿状特征是快速鉴别香蕉枯萎病菌1号生理小种和4号生理小种的一个简单、实用且准确的方法。

3 讨论与结论

香蕉枯萎病菌(FOC)是由一个复杂的病原菌群组成,国内外也已报道了多种鉴别 FOC 的方法,包括通过研究菌丝的融合现象所划分的营养体亲合群^[14]、挥发性物质的产生与否^[13, 15]、染色体电

泳^[16]、随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 分析^[6, 9, 17-18]、限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 分析^[19]、核基因和线粒体基因宗谱分析^[20] 等方法,但是最有效、最直接鉴定香蕉枯萎病菌生理小种的方法还是将分离菌制成孢子悬浮液对鉴别寄主进行致病性测定试验^[2, 12-13]。

至今,已经报道了多种致病性测定的方法^[22-24],在总结前人经验的基础上,本研究提出了自己的测定体系。即选用4~5片叶的香蕉和粉蕉组培苗,自基质拔出时轻微伤根,后浸于合适的孢子含量($1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)下,30 min 后栽种到装有灭菌细沙的营养杯中,25~32℃下15 d 就可以观察到明显的发病症状。致病性测定结果表明,在固定的观察期限内,接种孢子含量是一个影响较大的因素。鉴于15 d 的观察期限,本研究认为最合适的接种孢子含量为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,该含量虽比 Sun 等^[22] 报道的含量($3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)高3倍,但是观察发病的时间缩短了2周。浸苗时间对观察症状的影响不大,这与 Mohamed 等^[23] 的研究结果一致,但本研究的浸苗时间较其2 h 缩短了很多。

由于致病性测定结果受接种植株的健康状况、接种菌的孢子含量、接种菌本身的遗传变异情况以及外界环境条件等因素的影响^[12],为了进一步确定鉴定结果的准确性,参照 Sun 等^[11] 的研究,本研究做了不同菌株在 Komada 改良培养基上的菌落形态特征的观察。结果表明,凡是被鉴定为4号生理小种的菌株都呈现不同程度的裂齿状菌落特征,而被鉴定为1号生理小种的菌株和其他专化型的菌株则无此特征。尽管试验中观察到菌落的裂齿状不论是本地的菌株还是来自澳大利亚的标准4号小种菌株都不及 Su 等^[25] 在台湾菌株上观察到的明显,这一结果与 Su 等^[25] 研究中国台湾与澳大利亚4号小种菌株的结果一致。据此,对4号生理小种的鉴定而言,将致病性测定结果与分离菌在 Komada 改良培养基上的菌落特征相结合可保证鉴定的准确性。

广东省香蕉枯萎病菌确实已存在4号生理小种,虽目前仍为局部分布,但其传播扩散较快,应引起各个香蕉产区的高度重视。该小种自1967年在我国台湾发现后,在短短的10年时间内,几乎摧毁了台湾的香蕉产业^[26],使台湾香蕉栽培面积自高峰时期的50 000 hm^2 锐减到20世纪90年代的6 000 hm^2 左右^[27]。如今广东香蕉产业因4号生理小种的危害正面临着严峻的考验,在生产实践中快速且准确地对枯萎病菌进行鉴定以便及早制定和采取相应的病害管理措施尤为重要。本文以不同产区分离菌和已知小种为材料、用致病性测定与 Komada 改良培养基上

菌落特征观察相结合的研究结果,可为广东省香蕉枯萎病疫区的划分提供依据;其鉴定技术体系也可直接用于香蕉枯萎病菌生理小种的鉴定实践中。

参考文献:

- [1] 林兰稳,奚伟鹏,黄赛花. 香蕉镰刀菌枯萎病防治药剂的筛选[J]. 生态环境,2003,12(2): 182-183.
- [2] STOVER R H, WAITE B H. Studies on *Fusarium* wilt of bananas; V. Pathogenicity and distribution of *Fusarium oxysporum* f. *cubense* races 1 and 2[J]. Can J Bot, 1960, 38: 51-61.
- [3] WAITE B H. Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 3[J]. Trop Agric Trin, 1963, 40 (4): 299-305.
- [4] SU Hong-ji, CHUANG T Y, KONG W S. Physiological race of fusarial wilt fungus attacking Cavendish banana of Taiwan[J]. Taiwan Banana Res Inst, Special Pub, 1977, (2): 21.
- [5] 戚佩坤. 广东果树真菌病害志[M]. 北京:中国农业出版社,2000:24-37.
- [6] 刘景梅,陈霞,王璧生,等. 香蕉枯萎病菌生理小种鉴定及其 SCAR 标记[J]. 植物病理学报,2006,36(1): 28-34.
- [7] 黄秉智,许林兵,杨护,等. 香蕉种质资源枯萎病抗性田间评价初报[J]. 广东农业科学,2005(6):9-10.
- [8] 陈厚彬,冯奇瑞,徐春香,等. 抗枯萎病香蕉种质筛选[J]. 华南农业大学学报,2006,27(1):9-12.
- [9] 漆艳香,谢艺贤,张欣蒲,等. 海南省香蕉枯萎菌生理小种的 RAPD 分析[J]. 菌物学报,2005,24(3):394-399.
- [10] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998:122-125.
- [11] SUN E J, SU H J, KO W H. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 from soil or host tissue by cultural characters[J]. Phytopathology, 1978, 68: 1672-1673.
- [12] STOVER R H, BUDDENHAGEN I W. Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity [J]. Fruits, 1986, 41(3): 175-191.
- [13] STOVER R H. Studies of *Fusarium* wilt of banana; VIII. Differentiation of clones by cultural interactions and volatile substances[J]. Can J Bot, 1962, 40: 1467-1471.
- [14] BRAKE V M, PEGG K G, IRWIN J A G, et al. Vegetative compatibility groups within Australian populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the cause of *Fusarium* wilt of bananas[J]. Aust J Agric Res, 1990,41: 863-870.
- [15] MOORE N Y, HARGREAVES P A, PEGG K G, et al. Characterization of strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* by production of volatiles[J]. Aust J Bot, 1991, 39: 161-166.
- [16] BOEHM E W A, PLOETZ R C, KISTLER H C. Statistical analysis of electrophoretic karyotype variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1993, 7: 196-207.
- [17] BENTLEY S, PEGG K G, DALE J L. Genetic variation among a analysed by RAPD-PCR fingerprinting[J]. Mycol Res, 1995,99: 1378-1384.
- [18] BENTLEY S, PEGG K G, MOORE R D, et al. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting[J]. Phytopathology, 1998,88(12): 1283-1293.
- [19] KOENIG R L, PLOETZ R C, KISTLER H C. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages[J]. Phytopathology, 1997,87(9): 915-923.
- [20] O' DONNELL K, KISTLER H C, CIGELNIK E, et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998,95(5): 2044-2049.
- [21] STOVE R H. Studies on *Fusarium* wilt of bananas: IV. Clonal differentiation among wild type isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. Can J Bot, 1959, 37: 245-255.
- [22] SUN En-jiang, SU Hong-ji. Rapid method for determining differential pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using banana plantlets [J]. Trop Agric (Trinidad), 1984, 61(1): 7-8.
- [23] MOHAMED A A, MAK C, LIEW K W, et al. Early evaluation of banana plants at nursery stage for *Fusarium* wilt tolerance [C] // MOLINA A B, NIK MASDEK N H, LIEW K W. Banana *Fusarium* wilt management towards sustainable cultivation: Proceedings of the international workshop on the banana *Fusarium* wilt disease. Los Banos: INIBAP-ASPNET, 2001: 174-185.
- [24] 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]. Aust J Agric Res, 1995,46:673-685.
- [25] SU Hong-ji, HWANG Shin-chuan, KO Wen-hsiung. Fusarial wilt of Cavendish banana in Taiwan [J]. Plant Disease, 1986, 70(9): 814-818.
- [26] 孙守恭. 台湾果树病害[M]. 台北:世维出版社,1996: 12-19.
- [27] HWANG Shin-chuan. Recent development on *Fusarium* R & D in Taiwan [C] //MOLINA A B, ROA V N. Advancing Banana and Plantain R & D in Asia and the Pacific: Proceedings of the 9th INIBAP-ASPNET Regional Advisory Committee meeting. Los Banos: INIBAP-ASPNET, 1999: 84-91.

【责任编辑 周志红】