

饶雪琴, 唐瑞, 李华平. 香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种在‘巴西蕉’植株及根际土壤中的时空分布 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(4): 563-569.
RAO Xueqin, TANG Rui, LI Huaping. Spatiotemporal distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4 in Brazilian plant and rhizosphere soil[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(4): 563-569.

香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种在‘巴西蕉’植株及根际土壤中的时空分布

饶雪琴[†], 唐瑞[†], 李华平[✉]

(广东省微生物信号与病害防治重点实验室/华南农业大学植物保护学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】香蕉 *Musa* spp. 是我国重要的经济作物之一, 由尖孢镰刀菌古巴专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) 引起的香蕉枯萎病蔓延快、根治难, 严重阻碍了我国香蕉产业发展。由于 Foc 菌量和空间分布与其侵染和致病作用直接相关, 探索 Foc 在‘巴西蕉’ *Musa acuminata* L. AAA group, cv. Brazilian 植株和土壤中的时空分布具有重要意义。【方法】采用伤根接种法对‘巴西蕉’苗分别接种香蕉枯萎病菌 1 号生理小种 (Foc1) 和 4 号生理小种 (Foc4), 通过实时荧光定量 PCR 技术检测接种后不同时间、不同香蕉组织及根际土壤中的菌量, 分析了香蕉枯萎病菌在植株和土壤中的时空分布。【结果】温室中接种 Foc 后 2~21 d 内, ‘巴西蕉’根部和球茎中 Foc1 和 Foc4 菌量随时间延长而逐渐增加, 但 Foc4 菌量始终大于 Foc1; 在‘巴西蕉’球茎中, Foc1 和 Foc4 分别在接种后 21 和 14 d 菌量达到最大。田间接种 Foc 后 30 d, 离‘巴西蕉’植株地面半径 (r) 5 cm、地下深度 25~30 cm 土壤中的 Foc1 和 Foc4 菌量最大; 而 r 为 15 和 30 cm 时, 地下深度 10~15 cm 土壤中的 Foc 菌量大于 0~5 和 25~30 cm 的菌量; 在相同 r 和地下深度的‘巴西蕉’根际土壤中, 一般 Foc4 菌量大于 Foc1。【结论】Foc1 和 Foc4 菌量在‘巴西蕉’植株和根际土壤中具有明显不同的时空分布, 同一空间中 Foc4 菌量大于 Foc1 菌量, 研究结果可为香蕉枯萎病的发生流行、预测预报和防控提供一定的理论指导。

关键词: 巴西蕉; 香蕉枯萎病; 尖孢镰刀菌古巴专化型; 根际土壤; 时空分布; 实时荧光定量 PCR
中图分类号: S436.68 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2023)04-0563-07

Spatiotemporal distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4 in Brazilian plant and rhizosphere soil

RAO Xueqin[†], TANG Rui[†], LI Huaping[✉]

(Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control/College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】Banana (*Musa* spp.) is one of the important economic crops in China. However, banana fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) seriously devastates the development of banana industry in China due to the rapid spread and difficult control of this disease. It is important to explore the spatial and temporal distribution of Foc in Brazilian (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Brazilian) plant and rhizosphere soil, which are directly related to infection and pathogenicity of Foc. 【Method】Brazilian seedlings were inoculated with race 1 (Foc1) or race 4 (Foc4) by wounding roots in greenhouse, the amount and

收稿日期: 2022-10-20 网络首发时间: 2023-03-30 09:25:45

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230329.1609.004.html>

作者简介: 饶雪琴, 副教授, 博士, 主要从事分子植物病理学研究, E-mail: raoxq@hotmail.com; 唐瑞, 硕士研究生, 主要从事植物病原菌分子生物学研究, E-mail: 1095535421@qq.com; [†]表示同等贡献; 通信作者: 李华平, 教授, 博士, 主要从事分子植物病理学研究, E-mail: huaping@scau.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD1001800); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-31)

spatial distribution of Foc in different tissues at different times and in different rhizosphere soil of banana seedlings were analyzed using real-time quantitative PCR. 【Result】 From 2 to 21 days after inoculation, the contents of Foc1 and Foc4 in Brazilian roots and rhizomes increased with time, and the contents of Foc4 were significantly higher than those of Foc1. The contents of Foc1 and Foc4 in Brazilian rhizomes reached the highest at 21 and 14 days after inoculation, respectively. In the field, Foc1 and Foc4 were the most abundant in soil at the ground radius (r) of 5 cm from Brazilian plant and the depth of 25 to 30 cm under the ground at 30 days after inoculation. When the r values were 15 and 30 cm, the contents of Foc in soil at the depth of 10~15 cm were higher than those of 0~5 cm and 25~30 cm. In Brazilian rhizosphere soil at the same r value and soil depth, the contents of Foc4 were higher than those of Foc1 in most cases. 【Conclusion】 Foc1 and Foc4 have a significantly different spatial and temporal distribution in Brazilian plant and rhizosphere soil, and the content of Foc4 is higher than that of Foc1 in the same space, which provides a theoretical guidance for the epidemic, prediction and prevention and control of banana fusarium wilt.

Key words: Brazilian; Fusarium wilt of banana; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; Rhizosphere soil; Temporal and spatial distribution; Real-time quantitative PCR

香蕉 *Musa* spp. 是我国重要的经济作物, 由尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc) 引起的香蕉枯萎病不断扩散蔓延, 使我国香蕉产业发展严重受阻。根据 Foc 在不同香蕉品种上的致病性差异, 将其分为 Foc1、Foc2 和 Foc4 等 3 个不同生理小种^[1]。按照病害发生的地理区域等因素, 进一步将 Foc4 分为热带 4 号小种 (Tropical race 4, TR4) 和亚热带 4 号小种 (Subtropical race 4, STR4)^[2]; Foc1 分布于世界各地, 侵染范围较广^[3], 而 TR4 为目前世界各地香蕉中蔓延最广、危害最重的香蕉枯萎病菌^[2]。我国自 1996 年在广东番禺大面积发现香蕉枯萎病以来, 随后在海南、福建、广西和云南等地相继发现 Foc4 引起的香蕉枯萎病^[4]。目前为害我国香蕉的枯萎病菌主要是 Foc1 和 Foc4 生理小种^[5-6], 其中, Foc4 多数为 TR4^[7], 该菌在热带亚热带地区均有较强致病力, 严重威胁我国香蕉产业^[5]。研究 Foc 侵染香蕉最常用的方法是利用激光共聚焦扫描显微镜观察荧光蛋白标记的 Foc^[8-9]。Li 等^[8]采用绿色荧光蛋白标记 Foc TR4 和 Foc1, 然后分别接种巴西蕉, 发现两者侵入方式不同, Foc TR4 从表皮细胞间或者伤口侵入, 而 Foc1 只能通过伤口侵染。Xiao 等^[10]发现绿色荧光蛋白标记的 Foc4 先侵入巴西蕉幼根表皮, 随后侵入球茎和假茎, Foc 菌丝在假茎中最多、球茎中最少。Dong 等^[11]发现接种 Foc 后 7 d, 在巴西蕉假茎和叶鞘中均能检测到标记的 Foc4, 但检测不到标记的 Foc1; 接种后 15~30 d, 在叶片中能检测到 Foc4; 在巴西蕉根和球茎中 Foc4 菌量高于 Foc1。刘磊等^[12]通过平板菌落计数法发现, Foc 在香蕉植

株内的分布因样地发病程度和植株部位不同差异显著, 球茎中的 Foc 明显高于其他部位。这些学者利用不同的方法研究香蕉枯萎病菌侵染过程, 为香蕉枯萎病菌致病和病害流行提供了参考。香蕉枯萎病萎蔫症状主要是由于维管束堵塞造成营养和水分运输受阻^[8]。Foc 侵染过程反映了香蕉体内 Foc 的变化, 而 Foc 分布与其侵染和致病性直接相关。由于香蕉枯萎病是一种菌量依赖性病害^[13], 土壤中病菌含量是决定香蕉植株能否发病以及病害严重程度的影响因素。目前鲜见枯萎病菌在病株土壤中空间分布的相关报道, 探究香蕉枯萎病菌在寄主体内和根际土壤中的分布是研究香蕉枯萎病菌致病机制和病害流行的重要基础。本研究对香蕉植株内及根际土壤中 Foc 含量及分布进行分析, 旨在为香蕉枯萎病菌的侵染和致病机理研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为对 Foc1 抗病、对 Foc4 感病的 ‘巴西蕉’ *Musa acuminata* L. AAA group, cv. Brazilian。Foc 均为华南农业大学植物病毒实验室保存, Foc4 菌株为 TR4 XJZ2(VCG 01216), Foc1 菌株为 Foc1 FJZ3(VCG 01221)。温室试验取 “五叶期” 盆栽幼苗置于防虫网室中, 大田种植于华南农业大学教学科研基地。

1.2 样品总 DNA 抽提和引物合成

香蕉枯萎病菌总 DNA、土壤总 DNA 以及香蕉总 DNA 提取分别采用 MAGEN 生物公司的真菌

DNA、土壤总 DNA 以及广谱性植物 DNA 抽提试剂盒, 具体方法参考说明书。利用核酸蛋白分析仪测定 DNA 浓度及 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值。

根据 GenBank 中香蕉枯萎病菌序列, 利用

Primer 3 分别设计 Foc PCR 和实时荧光定量 PCR 引物, 引物由上海生物工程有限公司合成, 具体见表 1。本研究中引用的引物以及设计的引物经试验证明, 对相应 Foc 生理小种都有特异性^[4, 14-15]。

表 1 本研究引物信息
Table 1 The primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	鉴定小种 Race	片段长度/bp Fragment length	来源 Source
FOC1	CAGGGGATGTATGAGGAGGCT	4	242	[14]
FOC2	GTGACAGCGTCGTCTAGTTCC			
Foc1-F	GTCGGATGTTGTGATGTCGG	1	208	本研究 This study
Foc1-R	AAGGCTGGTGAAGGAGTTGT			
W1805F	GTTGAGTCTCGATAAACAGCAAT	1	354	[4]
W1805R	GACGAGGGGAGATATGGTC			
RPS2-R	TAGCGTCATCATTGGCTGGGA	内参基因	122	[15]
RPS2-S	TAGGGATTCCGACGATTTGTTT	Reference gene		

1.3 实时荧光定量 PCR 方法

提取 Foc 侵染的‘巴西蕉’根部 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增。电泳后, 将目的片段切胶回收, 连接至 pMD18-T 载体上。经 PCR 和酶切, 鉴定为阳性的重组质粒送生工测序, 选取相似性大于 90% 的作为阳性重组质粒, 分析其浓度, 计算拷贝数。以 10 倍梯度稀释的质粒 DNA 作为绝对定量标准品。标准曲线由系列稀释的量化目标 DNA 和 C_t 值生成。实时荧光定量 PCR 进行 3 次生物学和技术重复。

1.4 香蕉枯萎病菌接种液的制备和接种

将-80℃保存的 Foc1 和 Foc4 菌种接种在 PDA 固体培养基上, 28℃恒温培养箱中培养 1 周。将无菌水洗脱的孢子添加至 YPD 液体培养基中恒温振荡培养, Foc1 和 Foc4 培养温度分别为 28 和 26℃。培养 3 d 后, 将培养液离心, 孢子沉淀用无菌水洗 2 次, 调整孢子浓度备用。

香蕉枯萎病菌温室接种采用伤根接种法^[11], 接种后的香蕉置于 25~32℃温室内存养。Foc 孢子浓度为 $1\times10^5\text{ mL}^{-1}$, 无菌水作空白对照, 每个处理 15 株幼苗。大田种植的健康‘巴西蕉’株高 1 m 左右接种, 在每株植株半径为 0.5 m 内用取土器伤根后, 浇灌 $1.5\times10^6\text{ mL}^{-1}$ 的 Foc 接种液 1 L。Foc1 和 Foc4 各接种 5 株。

1.5 香蕉枯萎病调查和样品收集

对接种后香蕉发病情况进行调查, 计算病情指数, 枯萎病分级标准参考 Brake 等^[16]。对接种 Foc1 和 Foc4 的盆栽幼苗分别于接种后 2、4、6、8、10、14、21 d 采集根、球茎、球茎以上 3~4 cm 处假

茎和刚展开的第 1 叶进行 Foc 检测。接种后 30 d, 对大田种植的‘巴西蕉’植株不同部位进行 PCR 检测, 采集病株不同方位(东、南、西、北)、离植株不同地面半径(r 分别为 5、15、30 cm)处不同深度(h 分别为 0~5、10~15、25~30 cm)的土样进行混合, 共获得 9 组土壤样品, -20℃保存, 试验重复 3 次。

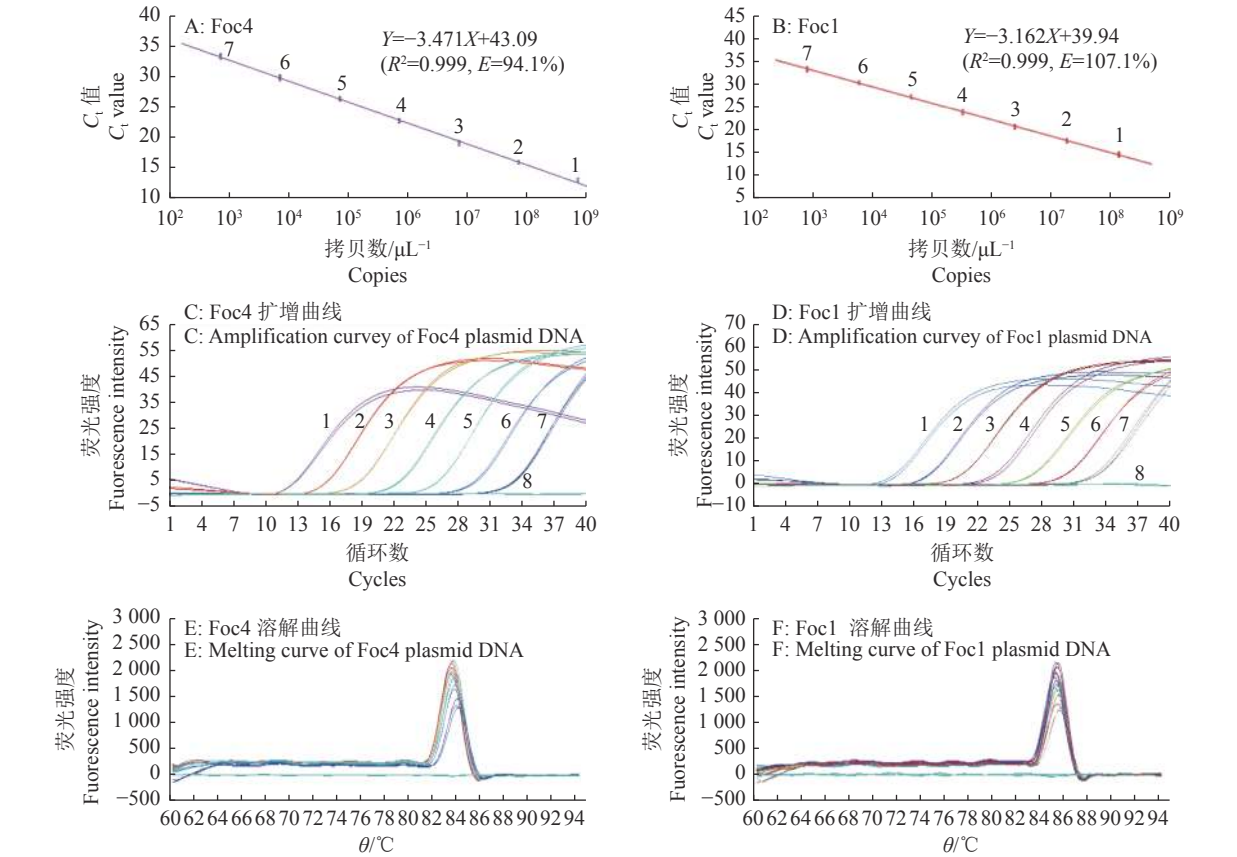
1.6 ‘巴西蕉’植株和根际土壤中 Foc1 和 Foc4 菌量及统计分析

分别提取接种 Foc1 和 Foc4 的‘巴西蕉’植株不同部位和不同土壤 DNA 作为定量模板, 进行实时荧光定量 PCR 扩增。通过计算确定不同样品中 Foc1 和 Foc4 菌量。试验数据均用平均值±标准差表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件 (IBM company, Armonk, America) 进行方差分析, 采用 Duncan’s 法检验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 实时荧光定量 PCR 方法的建立

分别以制备的重组质粒标准品为模板, 建立 Foc1 和 Foc4 实时荧光定量 PCR。结果(图 1)表明, Foc1 和 Foc4 质粒标准品拷贝数分别为 $1.05\times10^8\sim1.05\times10^2$ 和 $7.09\times10^8\sim7.09\times10^2\text{ }\mu\text{L}^{-1}$; 所建立的 2 种标准曲线的决定系数 (R^2) 均为 0.999, C_t 值与拷贝数线性关系良好, 扩增效率 (E) 分别为 107.1% 和 94.1%, 达到了实时荧光定量 PCR 标准曲线的要求 ($R^2 > 0.98$, $90\% < E < 120\%$)(图 1A 和图 1B)。Foc1 和 Foc4 的扩增曲线光滑平稳, 间隔均匀, 分为扩增期、线性增长期和平稳期(图 1C 和图 1D)。溶



A 和 B 为标准曲线，分别由拷贝数为 $7.09 \times 10^8 \mu\text{L}^{-1}$ Foc4 和 $1.05 \times 10^8 \mu\text{L}^{-1}$ Foc1 的质粒 DNA 标准品经 10 倍梯度稀释构建；C 和 D 为扩增曲线，1~7 分别是由拷贝数为 $7.09 \times 10^8 \mu\text{L}^{-1}$ Foc4 和 $1.05 \times 10^8 \mu\text{L}^{-1}$ Foc1 的质粒 DNA 标准品经 10 倍梯度稀释而构建，8 是清水对照

A and B were standard curves, which were built with a 10-fold serial dilution of Foc4 plasmid DNA of $7.09 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and Foc1 plasmid DNA of $1.05 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectively; C and D were amplification curve, 1~17 were developed with a 10-fold serial dilution of Foc4 plasmid DNA of $7.09 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and Foc1 plasmid DNA of $1.05 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectively; 8 was sterile water as the control

图 1 Foc1 和 Foc4 质粒 DNA 标准品实时荧光定量 PCR

Fig. 1 Real-time quantitative PCR of Foc1 and Foc4 plasmid DNA standards

解曲线峰单一(图 1E 和图 1F)，说明 Foc1 和 Foc4 扩增具有特异性。因此，本研究成功建立了 Foc1 和 Foc4 的实时荧光定量 PCR 检测方法。

2.2 ‘巴西蕉’接种 Foc1 和 Foc4 的症状

Foc1 伤根接种 ‘巴西蕉’ 8 d 后，球茎开始变褐，且随时间增加褐变逐渐加重；在接种后 21 d，‘巴西蕉’ 叶片保持绿色，说明 Foc1 侵染前期只影响根部和球茎，不影响地上部。而接种 Foc4 后 6 d，球茎变褐，并且随着时间的增加褐变越来越严重。在接种后 21 d，地上部叶片开始变黄。说明 Foc4 对 ‘巴西蕉’ 致病性比 Foc1 强。

2.3 Foc1 和 Foc4 在 ‘巴西蕉’ 根部及球茎中的菌量变化

分别提取 Foc1 和 Foc4 接种的 ‘巴西蕉’ 根、球茎、假茎、叶组织总 DNA 进行 PCR 检测，结果表明，接种后 21 d，只在根和球茎中检测到 Foc，而假茎和叶片中未检测到。接种 Foc 后 2 d，在 ‘巴西蕉’ 根部采用实时荧光定量 PCR 可以检测到 Foc1 和 Foc4，拷贝数分别为 $(1.62 \times 10^3 \pm$

$2.97 \times 10^2)$ 和 $(9.65 \times 10^3 \pm 4.68 \times 10^2) \mu\text{L}^{-1}$ ；接种后 21 d，根部 Foc1 和 Foc4 拷贝数分别为 $(5.26 \times 10^4 \pm 8.37 \times 10^2)$ 和 $(1.48 \times 10^7 \pm 9.78 \times 10^5) \mu\text{L}^{-1}$ (图 2A)，Foc 值达到最大。表明在接种后 2~21 d，Foc1 和 Foc4 在 ‘巴西蕉’ 根部不断增加，且 Foc4 菌量明显高于 Foc1。

接种后 2 d，采用实时荧光定量 PCR 检测 ‘巴西蕉’ 球茎中 Foc，结果显示，球茎中能检测到 Foc4，几乎检测不到 Foc1；Foc1 的 C_t 值为 35.01 ± 0.15 ，超出了 PCR 的检测范围 (15~35)；Foc4 的 C_t 值为 30.54 ± 0.14 、拷贝数为 $(41.10 \pm 4.00) \times 10^2 \mu\text{L}^{-1}$ 。接种后 6 d，Foc 在球茎中迅速增加，Foc1 和 Foc4 的 C_t 值分别为 26.27 ± 0.08 和 24.43 ± 0.07 ，拷贝数分别为 $(211.0 \pm 6.21) \times 10^2$ 和 $(234.00 \pm 1.31) \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ 。接种后 21 d，Foc1 和 Foc4 的 C_t 值分别为 23.74 ± 0.16 和 20.38 ± 0.20 ，拷贝数分别为 $(168.00 \pm 3.90) \times 10^3$ 和 $(350.00 \pm 9.79) \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ (图 2B)。表明在接种 Foc 后 6~21 d 内，Foc 积累减缓，21 d 时积累量达到最大，且 Foc4 菌

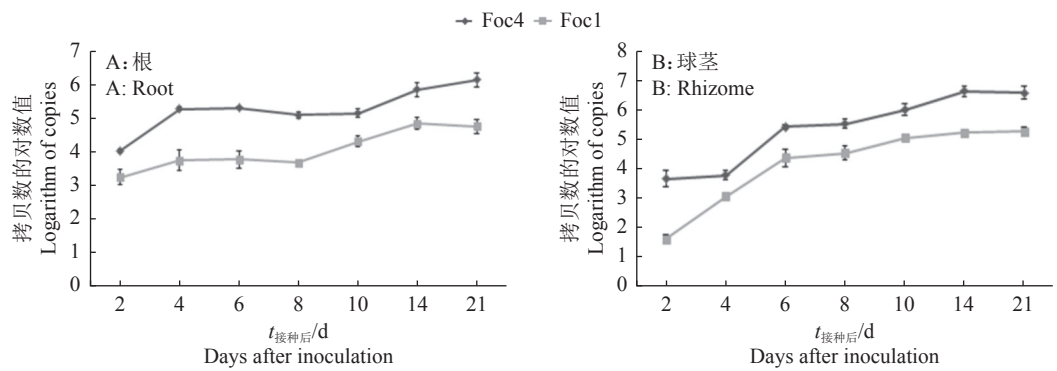


图 2 Foc1 和 Foc4 侵染 ‘巴西蕉’ 后根部和球茎的菌量变化

Fig. 2 The Foc quantity in roots and rhizomes of *Musa acuminata* cv. Brazilian seedlings infected by Foc1 and Foc4

量均高于 Foc1。

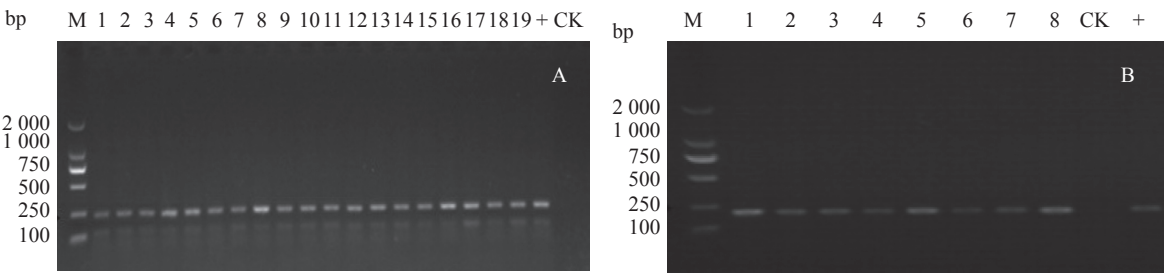
随后, 对 ‘巴西蕉’ 不同部位 Foc 进行了比较, 发现接种后 2 和 4 d, 球茎中 Foc 菌量低于根部 Foc。接种后 6 d, 球茎中 Foc 菌量开始高于根部。

2.4 大田 ‘巴西蕉’ 及根际土壤中的 Foc1 和 Foc4 分析

大田中 ‘巴西蕉’ 接种 Foc1 和 Foc4 后 30 d, 球茎变褐, 接种 Foc4 的球茎比接种 Foc1 的球茎变

褐更明显。分别取接种 Foc1 和 Foc4 的 ‘巴西蕉’ 周围土壤抽提总 DNA, 并以提取的土壤 DNA ($D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 约 1.8, DNA 约为 20 ng) 为模板进行 PCR, 结果 (图 3) 显示, PCR 扩增目的条带清晰, 与预期大小一致。

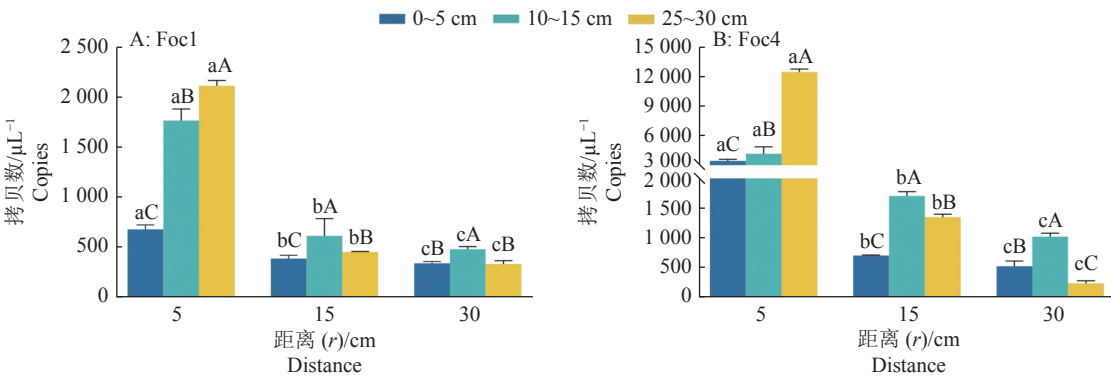
为研究 Foc 在根际土壤中分布, 取接种 Foc1 后 30 d 的 ‘巴西蕉’ 根际土壤样品进行分析, 结果 (图 4A) 显示, 在距离 ‘巴西蕉’ 植株地面



M: DNA 标准 DL2000; 1~19: 土壤样品; +: 阳性对照; CK: 清水对照
M: DNA Marker DL2000; 1-19: Soil samples; +: Positive control; CK: Water control

图 3 接种 Foc4(A) 和 Foc1(B) 后 ‘巴西蕉’ 根际土壤 DNA 的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of DNA in rhizosphere soil of *Musa acuminata* cv. Brazilian after inoculation with Foc4 (A) and Foc1 (B)



不同颜色代表不同的土壤深度; 相同颜色的柱子上小写字母不同表示相同土壤深度下接种的 ‘巴西蕉’ 不同距离 (r) 处 Foc 拷贝数差异显著, 相同 r 的不同颜色柱上大写字母不同表示相同 r 的不同土壤深度处 Foc 拷贝数差异显著 ($P < 0.05$, Duncan’s 法)

The different color indicated the different depth of rhizosphere soil. The different lowercase letter on the same color column indicated that there was significant difference of Foc copies in the same depth of rhizosphere soil at the different distance from inoculated Brazilians, while the different capital letter on the different color column at the same r showed that there was significant difference of Foc copies in the different depth of rhizosphere soil at the same r ($P < 0.05$, Duncan’s method)

图 4 Foc1 和 Foc4 接种 ‘巴西蕉’ 后在土壤中的分布

Fig. 4 Distribution of Foc1 and Foc4 in rhizosphere soil after inoculating on *Musa acuminata* cv. Brazilian

半径(r)5 cm、土壤深度 25~30 cm 处 Foc1 菌量最高,拷贝数为 $(2\,115.91\pm54.47)\,\mu\text{L}^{-1}$;而 r 分别为 15 和 30 cm 时,在土壤深度 10~15 cm 处 Foc1 菌量最高,拷贝数分别为 (604.31 ± 174.86) 和 $(471.23\pm24.31)\,\mu\text{L}^{-1}$ 。当 r 分别为 5、15 和 30 cm 时,在土壤深度为 0~5 cm 处 Foc1 菌量均最低,拷贝数分别为 (670.23 ± 44.83) 、 (377.33 ± 32.98) 和 $(328.23\pm17.83)\,\mu\text{L}^{-1}$,表明在‘巴西蕉’根际空间分布中,与‘巴西蕉’植株距离越近,土壤中 Foc1 菌量越大;相同地面距离时,以土壤深度为 10~15 或 25~30 cm 的土壤中 Foc1 菌量最大。

对接种后 30 d 的‘巴西蕉’根际土壤中 Foc4 分析结果(图 4B)表明,在 r 为 5 cm 且土壤深度 25~30 cm 处土壤中 Foc4 菌量最大,拷贝数为 $(12\,506.79\pm289.58)\,\mu\text{L}^{-1}$;在 r 为 30 cm 且土壤深度 25~30 cm 处土壤中 Foc4 菌量最小,拷贝数为 $(220.39\pm41.11)\,\mu\text{L}^{-1}$ 。Foc4 在‘巴西蕉’根际空间分布规律与 Foc1 基本相同,但是在相同 r 和土壤深度时,除 r 为 30 cm 且土壤深度 25~30 cm 外,其他土壤中 Foc4 菌量均高于 Foc1。

3 讨论与结论

3.1 香蕉枯萎病菌侵染‘巴西蕉’过程中 Foc 菌量变化

香蕉枯萎病菌生理小种 Foc1 和 Foc4 对不同香蕉致病性差异是当前研究热点之一,对致病性不同的 Foc1 和 Foc4 开展空间分布研究,可以为香蕉枯萎病的流行、预测预报以及病害防控提供科学依据。目前,利用激光共聚焦显微镜研究香蕉枯萎病菌侵染过程大多数在室内进行,该方法不能准确计算病菌含量,且鲜见大田香蕉枯萎病菌含量的研究报道。实时荧光定量 PCR 不用标记菌株,操作相对简单,广泛应用于病毒^[17]、细菌^[18]等定量分析。本研究采用实时荧光定量 PCR 定量分析了香蕉植株不同部位 Foc1 和 Foc4 菌量,与激光共聚焦显微镜观察结果相比^[3,8-9],能够准确地掌握 Foc 侵染量,可以为香蕉枯萎病的预测提供科学依据。

在研究 Foc 侵染过程中,不同的研究者结果不同。本研究结果表明,在接种 Foc 后 2 d,‘巴西蕉’球茎中 Foc 菌量远低于根部,这与 Li 等^[8]研究结果一致。Li 等^[8]观察到 Foc4 可以侵入‘巴西蕉’球茎,而 Foc1 在接种后 2 个月都不能侵入‘巴西蕉’球茎。本研究中,接种后 6 d 的‘巴西蕉’球茎中均能检测到 Foc1 和 Foc4,说明接种后 6 d, Foc1 和 Foc4 已侵入‘巴西蕉’球茎。Xiao 等^[10]

发现接种后 10 d 时 Foc4 侵入‘巴西蕉’球茎,17 d 时已从球茎扩展到假茎,且假茎、根部和球茎 Foc4 菌量依次减少。本研究接种后 21 d 发现, Foc 在球茎中最多,根部次之,假茎和叶片几乎没有。这与 Dong 等^[11]研究结果一致,即在侵染前期,香蕉球茎 Foc 菌量高于其他部位。Foc1 和 Foc4 侵染‘巴西蕉’根部后,菌量不断增加,在不同时间和空间内 Foc4 菌量均高于 Foc1,说明在‘巴西蕉’中 Foc1 和 Foc4 在侵染速度、定殖后的繁殖能力以及扩展能力方面差异明显。在侵染前期, Foc4 能从‘巴西蕉’根部扩展至球茎、假茎中,而 Foc1 仅能从根部扩展至球茎^[11];这可能与 Foc1 和 Foc4 对‘巴西蕉’的致病力不同有关,或者与‘巴西蕉’对 Foc1 和 Foc4 的抗病性差异有关。有研究表明,由于 Foc1 和 Foc4 的致病力不同,导致侵染过程中与‘巴西蕉’抗病性相关的多种酶活性不同^[15],并且 Foc 致病相关基因的表达也不同^[3],这些差异最终决定了 Foc1 和 Foc4 能否从球茎向上扩展至地上部而引起香蕉系统性病害。

3.2 香蕉枯萎病菌在根际土壤中的分布

香蕉根系由初生根、二级和三级次生根组成,初生根可能有几米长,二级和三级次生根只有几厘米至 1 m 长,且主要分布在土壤表层^[19-20],土壤中的少量病原菌可能使香蕉植株发生严重病害^[20]。本研究发现,在 r 为 5 cm、土壤深度 25~30 cm 时,无论是致病性强的 Foc4 还是致病性弱的 Foc1 菌量均比其他土壤层高。Foc 在土壤中的这种分布可能与‘巴西蕉’根系生长特性有关,即在 r 为 5 cm 且土壤深度 25~30 cm 处是‘巴西蕉’二级和三级次生根最多的地方, Foc 菌量最多,此处 Foc 菌量与香蕉枯萎病发生流行密切相关。在根际土壤中, Foc1 菌量一般低于 Foc4,这可能与 Foc4 强致病力有关。

土壤中 Foc 分布影响香蕉枯萎病的发生,在一定范围内,随土壤中菌量增加香蕉枯萎病发生加重,当超过某一范围,香蕉枯萎病发生达到饱和而不再加重^[20]。本研究也发现香蕉植株根际土壤中 Foc 菌量与香蕉枯萎病严重度呈正相关^[21],这符合香蕉枯萎病的发生规律,说明影响香蕉枯萎病发生的病菌主要是根际土壤中的 Foc。

香蕉枯萎病菌的侵染过程包括 Foc 接触香蕉根部、侵入根表皮后建立寄生关系^[3],并不断繁殖扩展的过程;其侵染过程不但体现了 Foc 与香蕉的相互作用,而且与香蕉枯萎病的发生发展密切相关^[22]。本研究表明, Foc1 比 Foc4 在‘巴西蕉’植株中扩张慢、定殖量低, Foc1 和 Foc4 通常在香蕉根

际土壤中含量高, 同一空间中的 Foc4 菌量明显高于 Foc1。‘巴西蕉’ 是我国现阶段主要栽培品种之一, 对不同香蕉枯萎病菌在 ‘巴西蕉’ 植株及根际土壤中的空间分布研究为 Foc1 和 Foc4 致病机理的研究及科学制定综合防控策略提供了理论依据。

参考文献:

[1] GARCIA R O, RIVERA-VARGAS L I, PLOETZ R, et al. Characterization of *Fusarium* spp. isolates recovered from bananas (*Musa* spp.) affected by Fusarium wilt in Puerto Rico[J]. *European Journal Plant Pathology*, 2018, 152(3): 599-611.

[2] PLOETZ R C. Fusarium wilt of banana[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(12): 1512-1521.

[3] GUO L, YANG L, LIANG C, et al. Differential colonization patterns of bananas (*Musa* spp.) by physiological race 1 and race 4 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Journal of Pathology*, 2015, 163(10): 807-817.

[4] 李敏慧, 余雄涛, 王鸿飞, 等. 香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种的快速检测与鉴定[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(19): 3971-3979.

[5] 李华平, 李云锋, 聂燕芳. 香蕉枯萎病的发生及防控研究现状[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 128-136.

[6] QIN S, JI C, LI Y, et al. Comparative transcriptomic analysis of race 1 and race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* induced with different carbon sources[J]. *Genes Genomes Genetics*, 2017, 7(7): 2125-2138.

[7] LI M, SHI J, XIE X, et al. Identification and application of a unique genetic locus in diagnosis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4[J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2013, 35(4): 482-493.

[8] LI C, YANG J, LI W, et al. Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish[J]. *Plant Disease*, 2017, 101(12): 2073-2078.

[9] WARMAN N M, AITKEN E A B. The movement of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (sub-tropical race 4) in susceptible cultivars of banana[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1748.

[10] XIAO R F, ZHU Y J, LI Y D, et al. Studies on vascular infection of *Fusarium oxysprum* f. sp. *cubense* race 4 in banana by field survey and green fluorescent protein[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2013, 2(1): 44-51.

[11] DONG H, FAN H, LEI Z, et al. Histological and gene expression analyses in banana reveals the pathogenic differences between races 1 and 4 of banana fusarium wilt pathogen[J]. *Phytopathology*, 2019, 109(6): 1029-1042.

[12] 刘磊, 梁昌聪, 曾迪, 等. 香蕉枯萎病田间分布型及病原菌在植株上的分布[J]. *生态学报*, 2015, 35(14): 4742-4753.

[13] HECK D W, DITA M, PONTE E M D, et al. Incidence, spatial pattern and temporal progress of Fusarium wilt of bananas[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(8): 646.

[14] LIN Y, CHANG J, LIU E, et al. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 123(3): 353-365.

[15] FAN H, DONG H, XU C, et al. Pectin methylesterases contribute the pathogenic differences between races 1 and 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 13140.

[16] BRAKE V M, PEGG K G, IRWIN A G. 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(3): 673-685.

[17] PITMAN T L, VU S, TIAN T, et al. Genome and phylogenetic analysis of cucumber green mottle mosaic virus global isolates and validation of a highly sensitive RT-qPCR assay[J]. *Plant Disease*, 2022, 106(6): 1713-1722.

[18] 冯寒霜, 薛媚, 卢会奇, 等. 组氨酸激酶基因 *envZ* 调控禽致病性大肠埃希菌生物被膜的机制研究[J]. *华南农业大学学报*, 2021, 42(1): 26-33.

[19] TURNER D W, FORTESCUE J A, THOMAS D S. Environmental physiology of the bananas (*Musa* spp.) [J]. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2007, 19(4): 463-484.

[20] PEGG K G, COATES L M, O'NEILL W T, et al. The epidemiology of Fusarium wilt of banana[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1395.

[21] LÜ G, GUO S, ZHANG H, et al. Colonization of Fusarium wilt-resistant and susceptible watermelon roots by a green-fluorescent-protein-tagged isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. *Journal of Phytopathology*, 2014, 162: 228-237.

[22] DITA M, BARQUERO M, HECK D, et al. Fusarium wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1468.

【责任编辑 周志红】