

文章编号: 1674-7054(2014)03-0239-05

4种葱科植物粗提液对香蕉枯萎病菌的抑制效果

穆雷^{1,2}, 国俊红², 何华敏², 赵惠^{1,2}, 谢俊^{1,2}, 韦双双^{1,2},
夏幽泉^{1,2}, 吴繁花^{1,2}, 阮云泽^{1,2}, 汤华^{1,2,3}

((1. 海南大学 热带生物资源可持续利用国家重点实验室培育基地 海南 海口 570228; 2. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 3. 海南大学 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室 海南 海口 570228))

摘要: 分别采取高温灭菌和滤菌器过滤2种方式,对韭菜、大蒜、大葱、洋葱等4种葱科植物的组织粗提液进行除菌,并用其进行香蕉枯萎病原菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)的拮抗实验。结果表明:滤菌器过滤处理组比高温灭菌处理组对香蕉枯萎病菌的抑制效果更显著;在滤菌器除菌组中,韭菜的抑菌效果最佳,其次为大蒜和大葱,与对照相比都达到了差异极显著水平,但洋葱粗提液的抑菌效果不明显。

关键词: 香蕉枯萎病;尖孢镰刀菌古巴专化型;葱科植物;植物粗提液;抑菌效果

中图分类号: S 436.68

文献标志码: A

香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC)引起的土传性真菌病害。香蕉枯萎病已成为全世界具有毁灭性的植物病害之一,严重影响了香蕉产业的可持续发展^[1]。香蕉枯萎病可通过病株残体、耕作工具、带菌土壤、以及病区灌溉水、雨水等近距离传播蔓延,还可通过带病菌的吸芽、土壤及二级苗远距离传播,很难预防和控制^[2]。香蕉枯萎病一旦发生就无法控制,种植抗病品种或者防止新的种植区感病是很多香蕉种植农户的选择。香蕉主栽品种多为三倍体,无法进行有性杂交,使得香蕉常规育种工作很难开展,在生产中采用适当的栽培措施也十分重要。在生产实践中,发现利用韭菜轮作和间作能有效防控香蕉枯萎病,其发病率可下降至5%以下,甚至更低^[3]。韭菜中分泌的多种次生代谢物质具有抑制香蕉枯萎病菌菌丝生长和孢子萌发的作用^[4]。韭菜属于葱科(Alliaceae)植物,能产生特殊的次生代谢物质抑制香蕉枯萎病菌生长,葱科的其他植物是否也有类似功效,尚不清楚。笔者提取了4种葱科植物的粗提液,进行香蕉枯萎病菌的拮抗实验,旨在研究这些粗提液对香蕉枯萎病菌的抑制效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料 香蕉枯萎病原菌为尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 4号生理小种,由本实验室前期分离并保存^[5]。新鲜的韭菜(*Allium tuberosum*)、大蒜(*Allium sativum*)、大葱(*Allium fistulosum*)、洋葱(*Allium cepa*)等从市场购买获得。

1.2 病原菌的活化 采用PDA培养基^[6]培养病原菌。培养基经121℃高压蒸气灭菌20 min后,在超净工作台上倒平板,每个培养皿约12 mL,待其冷却凝固后进行接种。病原菌接种于平板中央,用封口膜封

收稿日期: 2014-04-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31360364);教育部热带作物新品种选育工程中心与作物学重点学科联合资助项目(lhxm-2012-2);海南省重大科技项目(ZDZX2013023);“中央财政支持中西部高校提升综合实力专项”子课题

作者简介: 穆雷(1986-),男,海南大学农学院2011级硕士研究生, E-mail: allenallenml@163.com

通信作者: 汤华(1974-),男,教授,博士,研究方向:植物遗传育种与分子生物学, E-mail: thtiger@163.com

住培养皿,标注接种日期,28℃恒温培养箱中培养3~4 d,让菌丝充分生长。

1.3 植物粗提液的制备 分别称取5 g新鲜的韭菜、大蒜、大葱、洋葱样品放入研钵中,加2 mL的无菌水研磨,研磨匀浆后加适量无菌水混匀,经4层医用纱布过滤后,将粗提液倒入50 mL的离心管中,加无菌水定容至30 mL。

1.4 平板拮抗实验

1.4.1 植物粗提液的高温灭菌实验组 分别取每种植物的粗提液25 mL加入到100 mL的PDA培养基中,在121℃条件下高压蒸气灭菌20 min,倒平板,待其冷却凝固后,接种已活化的病原菌,每种粗提液和无菌水(对照组CK)做5个重复。

1.4.2 植物粗提液的滤菌实验组 每种植物取5 mL粗提液,在4℃,13 000 r·min⁻¹条件下离心30 min,取上清经滤菌器过滤备用。将正常PDA培养基倒入培养皿,待其冷却凝固后,在距平板中心1.25 cm处左、右各打1个直径5 mm的孔,两孔边缘的最短距离2 cm,小孔中加入经滤菌器过滤的50 μL粗提液或无菌水(对照组CK),然后在平板中心位置接种已活化的病原菌,重复5次。接种后用封口膜封住培养皿,并标注接种日期,放入28℃恒温培养箱中培养。

1.5 观察记录与数据分析 接种后,每隔24 h观察和记载菌落生长情况,测量菌落直径,拍摄照片。获得的数据采用Excell软件进行整理和分析,并用SAS软件进行方差分析和差异显著性测验。

2 结果与分析

2.1 粗提液高温灭菌后对菌落生长的影响 提取韭菜、大蒜、大葱和洋葱等植物的粗提液,按照比例配制成培养基,高温灭菌后,接种尖孢镰刀菌古巴专化型4号小种,每24 h观察1次,测量菌落直径,连续观察6 d。大部分菌落在第6天时已长满整个培养皿,因此,取前5 d的数据来评价植物粗提液对香蕉枯萎病菌的拮抗效果。从图1可见,不同的实验处理存在不同程度的差异。

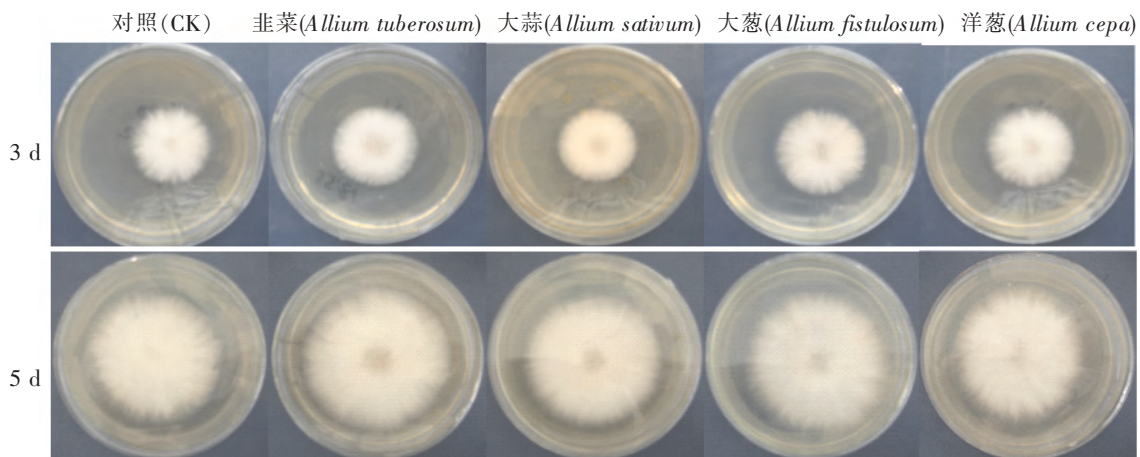


图1 不同植物粗提液高温灭菌处理的菌落生长情况

Fig. 1 Fungi growing on the medium at the presence of plant crude extracts disinfected by high temperature

从图2可以看出,粗提液经高温灭菌处理后,添加到培养基中,与对照相比,韭菜粗提液的抑菌效果不显著;添加大葱和洋葱粗提液的培养基中,菌落的生长不仅没有受到抑制,反而比对照长得更好,可能是因为添加的粗提液,提供了更丰富的营养,有利于菌落生长;添加大蒜粗提液的培养基中,菌落生长受到一定程度的抑制,菌落的生长速度比其他4种处理的慢,与对照相比,差异显著。结合统计分析的结果,笔者推测:经过高温灭菌,韭菜、大葱和洋葱的粗提液中,已经没有抑菌的活性成分,而大蒜粗提液经过灭菌处理后,仍然存在具有抑菌作用的活性成分。

2.2 滤菌处理植物粗提液后的菌落生长情况 提取韭菜、大蒜、大葱和洋葱等植物的粗提液,通过滤菌

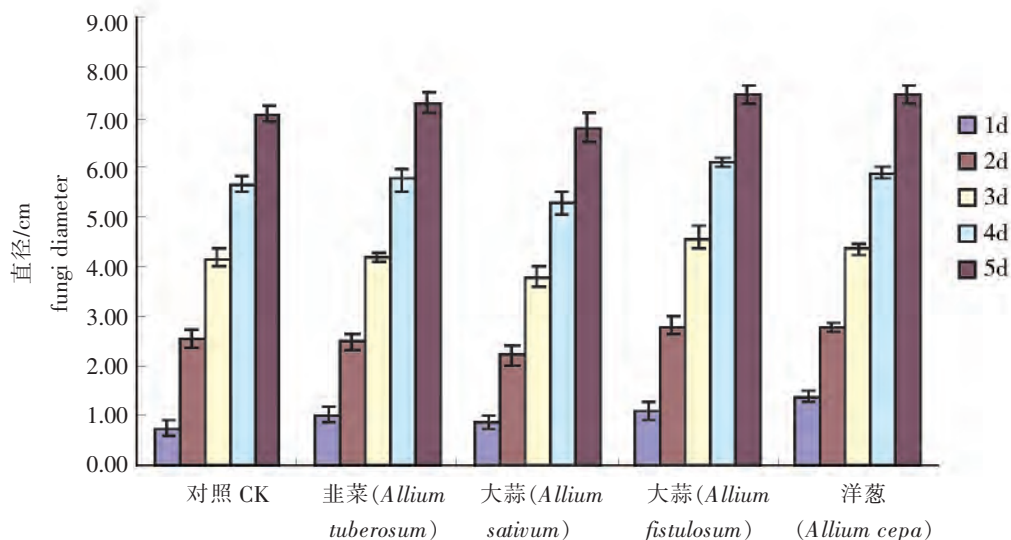


图2 不同植物粗提液高温灭菌处理后的菌落生长动态变化

Histogram of fungal growth on the medium added with plant crude extracts disinfected by high temperature

器处理除菌后, 添加到培养皿中, 接种尖孢镰刀菌古巴专化型4号小种, 每24 h观察1次, 测量菌落直径, 连续观察6 d。取前5 d的数据来评价植物粗提液对香蕉枯萎病菌的拮抗效果。从图3可知, 不同实验处理间的差异明显, 其中韭菜、大蒜、大葱的抑菌效果明显。

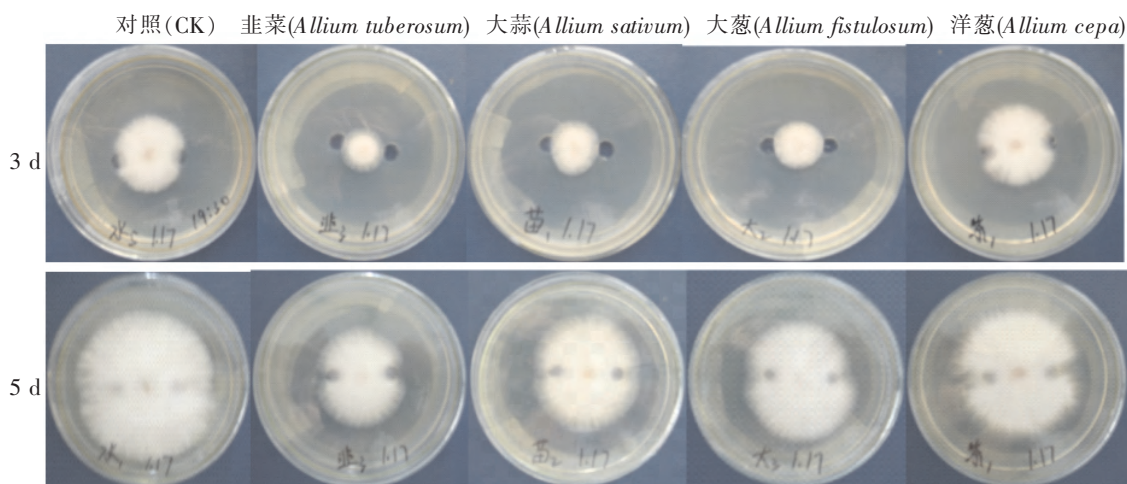


图3 不同植物粗提液滤菌处理的菌落生长情况

Fig. 3 Fungi growing on the medium added with plant crude extracts disinfected by bacteria-proof filter

从图4可见, 与对照相比, 洋葱粗提液的抑菌效果不显著; 添加韭菜、大蒜和大葱粗提液的培养基中, 菌落的生长都受到了明显的抑制, 与对照相比, 差异显著, 其中韭菜的效果最好; 在菌落生长期间, 滤菌器处理的不同植物组织液中韭菜对香蕉枯萎病菌落抑制作用最显著, 大蒜和大葱次之, 洋葱无明显抑制作用。综合实验结果, 笔者认为: 滤菌器除菌处理, 没有破坏粗提液中的抑菌活性成分, 韭菜、大蒜和大葱的粗提液中, 存在有效的抑菌活性成分, 而洋葱中可能不含有对尖孢镰刀菌古巴专化型4号小种产生明显抑制作用的有效成分。

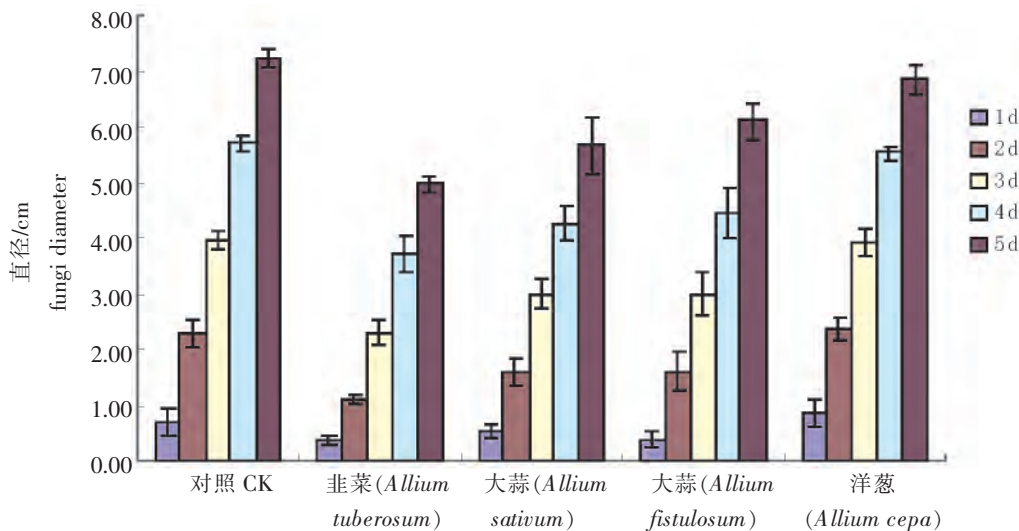


图4 不同植物粗提液滤菌处理后的菌落生长动态变化

Fig. 4 Histogram of fungal growth on the medium added with plant crude extracts disinfected by bacteria-proof filter

3 讨论

葱科植物含有多种抑菌的活性成分^[3-4]。笔者选择葱科的韭菜、大蒜、大葱、洋葱等进行研究,提取其粗提液,进行抑菌拮抗实验。为了进行培养基的培养实验,必须对粗提液进行除菌处理,本研究设计了2种方法—高温灭菌和滤菌器除菌。实验结果表明,采用滤菌器除菌,对抑菌活性成分没有破坏作用,韭菜、大蒜和大葱中都含有对尖孢镰刀菌古巴专化型4号小种有抑制作用的活性成分,而经过高温灭菌处理后,韭菜和大葱中的活性成分基本丧失,可能是由于高温导致有效成分的挥发或者分解。由此可见,在研究植物提取液的抑菌实验中,采用滤菌器滤菌,对活性成分没有破坏作用,是最佳的除菌处理方法。

生物防治相比于抗病品种的选育,具有省时、简单、资金花费少等优点;与化学防治相比,又具有绿色环保的优势。香蕉枯萎病的生物防治是当前的研究热点^[7]。通过种植对香蕉枯萎病菌有抑制作用的作物品种,既是一种生物防治措施,也是一种重要的栽培管理措施^[3]。本研究结果对香蕉生产种植过程中的香蕉枯萎病防控技术的选择,提供了一个理论参考。在香蕉园中间作或者套作韭菜已有成功的实践经验和理论支持,本研究结果表明,大蒜、大葱也可以作为候选对象。韭菜中对香蕉枯萎病菌有抑制作用的是2-甲基-2-戊烯醛(2-methyl-2-pentenal)和二甲基三硫醚(dimethyl trisulfide)等活性成分^[4]。大蒜和大葱中的能抑制香蕉枯萎病菌的有效成分及其作用浓度,目前尚不清楚,还有待深入研究。

参考文献:

- [1] DE ASCENSAO A R, DUBERY I A. Panama Disease. Cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race four [J]. Phytopathology, 2000, 90(10): 1173-1180.
- [2] 严定平, 柳晓磊, 汤华. 香蕉枯萎病及其抗病育种研究进展 [J]. 海南大学学报(自然科学版), 2008(3): 290-295.
- [3] HUANG Y H, WANG R C, LI C H, et al. Control of Fusarium wilt in banana with Chinese leek [J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 134(1): 87-95.
- [4] ZHANG H, MALLIK A, ZENG R S. Control of panama disease of banana by rotating and intercropping with Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler): Role of plant volatiles [J]. J. Chem. Ecol., 2013, 39(2): 243-252.
- [5] 谢俊, 张旭一, 陈银华, 等. 香蕉枯萎病菌的分离鉴定与形态学研究 [J]. 热带生物学报, 2010(4): 337-341.
- [6] 方中达. 植物研究方法 [M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 110-155.
- [7] LIAN J, WANG Z F, CAO L X, et al. Artificial inoculation of banana tissue culture plantlets with indigenous endophytes originally derived from native banana plants [J]. Biological Control, 2009, 51(3): 427-434.

Antagonistic Effects of Crude Extracts from Four Alliaceae Plants on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

MU Lei^{1,2}, GUO Junhong^{1,2}, HE Huamin^{1,2}, ZHAO Hui^{1,2}, XIE Jun^{1,2},
WEI Shuangshuang^{1,2}, XIA Youquan^{1,2}, WU Fanhua^{1,2}, RUAN Yunze^{1,2}, TANG Hua^{1,2,3}

(1. National Key Laboratory Incubation Base of Sustainable Utilization of Tropical Bio-resources, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China; 2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory for Protection, Development and Utilization of Tropical Crops Germplasm Resources, Haikou 570228, China)

Abstract: Four Alliaceae plants including Chinese chives (*Allium tuberosum*), garlic (*Allium sativum*), green Chinese onion (*Allium fistulosum*), and onion (*Allium cepa*) were selected and extracted for antagonistic experiments to observe the antagonistic activities of their crude extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4). These crude extracts were isolated and sterilized by using the high temperature and the bacteria-proof filter methods, respectively. The crude extracts sterilized by the bacteria-proof filter method were found to have obviously higher inhibition of the Foc TR4 than those by the high temperature method. The crude extract from Chinese chives showed the best inhibitory effect on the Foc TR4, followed by those from garlic and green Chinese onion, and they all showed inhibitory effect on the Foc TR4 at a very significant level as against the control. However, the crude extract from onion showed no significant inhibitory effect on the Foc TR4.

Key words: banana fusarium wilt; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; Alliaceae plants; plant crude extracts; inhibitory effect