园　艺　学　报　2012，39（3）：545 – 551　　http: // www. ahs. ac. cn
Acta Horticulturae Sinica　　E-mail: yuanyixuebao@126.com

香蕉枯萎病菌 4 号生理小种粗毒素特性的研究

杨　媚，黄永辉*，舒灿伟，李瑜婷，周而勋**

（华南农业大学资源环境学院，广州 510642）

摘　要：对香蕉枯萎病病菌粗毒素进行高温高压（121 ℃，0.103 MPa）、不同 pH 值、紫外线照射以及甲醇沉淀处理后，测定其致病活性的变化，以明确其基本理化性质。结果表明：该毒素具有很强的热稳定性，经高温高压处理 20 min 后仍然保持强的致病活性；偏酸（pH 3 ~ 6）或偏碱（pH 8 ~ 10）条件均会降低毒素的致病活性；紫外线照射对该毒素的毒性具有削弱作用；经甲醇沉淀处理后，上清液具有致病活性，而沉淀不具有致病活性：说明该毒素属于极性较高的一类小分子非蛋白物质。香蕉枯萎病菌粗毒素对不同种类作物种子的萌发和胚芽生长都有不同程度的抑制作用，是一种非寄主专化性毒素。

关键词：香蕉枯萎病菌；毒素；理化性质；致病活性；寄主专化性

中图分类号：S 436.67；S 668.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0513-353X（2012）03-0545-07

Studies on the Characteristics of Crude Toxin Produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4

YANG Mei，HUANG Yong-hui*，SHU Can-wei，LI Yu-ting，and ZHOU Er-xun**

（*College of Natural Resources and Environment*，*South China Agricultural University*，*Guangzhou* 510642，*China*）

Abstract：Banana fusarium wilt was caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4（*Foc* 4）. The changes of pathogenic activity of *Foc* 4 crude toxin after the treatments of autoclave，different pH values，ultraviolet irradiation and methanol precipitation were determined so as to understand the basic physicochemical properties of the toxin. The results showed that the toxin had a strong thermal stability，and still had a strong pathogenic activity after autoclave for 20 min；The pathogenic activity of the toxin would be reduced under both acidic（pH 3 – 6）and alkaline（pH 8 – 10）conditions；The supernatant rather than precipitation had the pathogenic activity after methanol precipitation treatment；The ultraviolet radiation could reduce the toxicity of the toxin. The above mentioned findings suggested that the toxin belongs to a small molecule，non-protein compound with higher polarity. Furthermore，effects of the toxin on seed germination and plantule growth of different plant species were determined so as to understand the host specificity of the toxin，and the results indicated that the toxin had different inhibitions on the seed germination and plantule growth of different plant species，indicating that the toxin was a non-host specific toxin.

Key words：*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*；toxin；physicochemical property；pathogenic activity；host specificity

收稿日期：2011 – 11 – 28；**修回日期**：2012 – 02 – 21

基金项目：国家现代农业（香蕉）产业技术体系建设专项（nycytx-33-06；CARS-32）

* 并列第一作者；

** 通信作者 Author for correspondence（E-mail：exzhou@scau.edu.cn；Tel：020-38297832）

由尖孢镰刀菌古巴专化型（*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*）引起的香蕉枯萎病是一种世界范围发生的毁灭性病害（Jones，1999；谢梅琼 等，2011）。

多年来，香蕉抗枯萎病品种选育、寄主与病原菌互作等方面取得了一些进展（Bhagwat & Duncan，1998；Matsumoto et al.，1995；唐倩菲 等，2006a，2006b），但该病在大部分香蕉种植区的发生和危害尚未得到有效的控制（谢梅琼 等，2011）。

兀旭辉等（2004）对香蕉枯萎病菌 1 号小种和 4 号小种粗毒素的特性进行了初步研究，证明镰刀菌酸是香蕉枯萎病菌粗毒素中的主要致枯萎物质，但除了镰刀菌酸外，粗毒素中可能还含有其它致病物质。作者在已系统优化的香蕉枯萎病菌产毒条件（黄永辉 等，2011）基础上，开展香蕉枯萎病菌 4 号生理小种粗毒素的理化性质和寄主专化性的研究，旨在为香蕉枯萎病菌致病机制的研究和加快抗病育种的进程提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株为香蕉枯萎病菌［*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*（E. F. Smith）Snyder et Hansen］4 号生理小种菌株，分离自香蕉（*Musa* AAA Cavendish）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。本试验于 2008—2009 年在华南农业大学热带亚热带真菌研究室的实验室和温室内进行。

选用由广东省农业科学院作物研究所提供的巴西蕉组培苗（沙床苗）作为生测植物。

选用不同科、属的作物种子作为毒素寄主专化性的测试对象：十字花科（Brassicaceae）：大白菜（*Brassica pekinensis*）、萝卜（*Raphanus sativus*）；茄科（Solanaceae）：辣椒（*Capsicum frutescens*）、番茄（*Lycopersicon esculentum*）、茄子（*Solanum melongena*）；豆科（Leguminosae）：大豆（*Glycine max*）；葫芦科（Cucurbitaceae）：黄瓜（*Cucumis sativus*）；禾本科（Gramineae）：玉米（*Zea mays*）、水稻（*Oryza sativa*）。种子均购买自广东省农业科学院作物研究所。

1.2 香蕉枯萎病病菌培养滤液的制备

参照香蕉枯萎病病菌最优产毒条件（黄永辉 等，2011）培养病菌：以初始 pH 8 的 Richard 为培养基，每 300 mL 培养液接 5 块菌丝块，在温度 28 ℃、持续光照、转速为 140 $r \cdot min^{-1}$ 摇床上振荡培养 12 d。培养结束后用 4 层灭菌纱布及双层滤纸过滤培养液，滤过液经 8 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min，收集上清液即得培养滤液，经检测无菌后备用。以不接菌的灭菌 Richard 培养基和灭菌水为对照。

1.3 香蕉枯萎病病菌培养滤液致病活性的测定

1.3.1 活体植株（香蕉苗）浸根法

参考董金皋和朱晞（1992）及张广民等（1995）的方法，将 40 mL 待测培养滤液加入 50 mL 离心管内，每管放入香蕉苗 3 株，每处理重复 3 次（管），设置不接菌的灭菌 Richard 培养液和灭菌水两种对照，置于 28 ℃恒温箱培养，逐日观察、记录香蕉苗的萎蔫状况。萎蔫程度分为 0 ~ 4 级（李瑜婷，2009），计算病情指数。

病情指数 = ∑（各级萎蔫株数 × 各级数）/（调查总株数 × 最高级数）× 100。

1.3.2 离体叶片针刺接种法

参考董金皋等（1993）的方法，在瓷盘内事先铺一层浸有灭菌水的纱布，并铺上干净的玻片，

取香蕉苗同一叶位的叶片，平铺于瓷盘内的玻片上（叶背朝上），用微量进样器针头刺破叶片下表皮，不刺穿叶片。取香蕉枯萎病病菌培养滤液 10 μL 接种于针刺点上，每片叶接种 5～6 个点，每处理 3 片叶，以不接菌的灭菌 Richard 培养液和灭菌水为对照，置于恒温光照培养箱 28 ℃保湿培养，3 d 后观察发病情况。

1.4　香蕉枯萎病病菌粗毒素的提取及致病活性测定

将制备的香蕉枯萎病病菌培养滤液于 50 ℃旋转蒸发，浓缩至原体积的 1/10，加入等体积乙酸乙酯于分液漏斗中充分振荡，静置 10 min，分别收集水相和有机相，水相溶液再用乙酸乙酯重复萃取 2 次。水相、有机相分别在 50 ℃下旋转蒸发除去有机溶剂及水分，得到两份黄色粘稠物质，分别测定其致病活性，具有致病活性者即为粗毒素。使用时，将粗毒素用灭菌水稀释至培养滤液的原体积（300 mL）。

1.5　香蕉枯萎病病菌粗毒素的基本理化性质测定

1.5.1　高温高压处理

将粗毒素经高温高压（121 ℃，0.103 MPa）处理 20 min，用浸根法进行生物测定。设未经高温高压处理的粗毒素为对照。

1.5.2　pH 值调整

将粗毒素的水溶液用不同 pH 值缓冲液分别调 pH 值至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 后，用浸根法进行生物测定。以不调 pH 值的粗毒素水溶液和不添加粗毒素的同 pH 值缓冲液为对照。

1.5.3　紫外线照射

用紫外线（Philips TUV G8 T5 8W 紫外灯管 2 支，40 mL 粗毒素溶液装在直径 12 cm 的玻璃培养皿内，液层深度约 0.4 cm，液面与光源发生器的距离为 40 cm，紫外线强度为 36 $\mu W \cdot cm^{-2}$）对粗毒素溶液分别照射 5、10、15、20、25 和 30 min 后，用浸根法进行生物测定，以不照紫外光的粗毒素为对照。

1.5.4　甲醇对香蕉枯萎病菌培养滤液沉淀处理

向培养滤液中加入 2 倍体积的甲醇，于 20 ℃，10 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 20 min，得到沉淀部分与上清部分，将沉淀部分用蒸馏水稀释至培养滤液原体积，上清部分于 45 ℃下旋转蒸发去除甲醇，再用蒸馏水稀释至培养滤液原体积，分别用浸根法及离体叶片针刺法检测这两部分的致病活性。设空白培养基和灭菌水为对照。

于上述各处理 48、96 和 144 h 后调查病情指数。

1.6　香蕉枯萎病病菌粗毒素的寄主专化性测定

选取大小、饱满度一致的供试植物种子，用 3% H_2O_2 浸泡 20 min，处理后用灭菌水冲洗 2～3 次，然后再分别用灭菌水、空白培养基及粗毒素液浸种 3～6 h（依种子种类而定），取粗毒素液 5 mL，倒入铺有双层滤纸的灭菌培养皿中，将种子平稳摆放于润湿的滤纸上，每皿 5～15 粒不等（依种子大小而定）。

以加入相同体积的灭菌水处理作为对照，测定毒素对种子萌发及胚芽生长的影响（胚芽长度超过种子长轴长度的一半时计为萌发，度量时从胚芽与种子的连接处到胚芽尖端的长度为胚芽长度）。

萌发抑制率（%）=（对照萌发率－处理萌发率）/对照萌发率 ×100；

生长抑制率（%）=（对照胚芽长度－处理胚芽长度）/对照胚芽长度 ×100。

2 结果与分析

2.1 香蕉枯萎病病菌粗毒素的确定

致病活性测定发现，从有机相获得的黄色粘稠物质对香蕉苗具有强致病活性，而水相物质不具备致病活性。因此认为从有机相获得的黄色粘稠物质为粗毒素。

2.2 香蕉枯萎病病菌粗毒素的基本理化性质

2.2.1 对高温高压的耐性

试验结果（图 1）表明，粗毒素经高温高压处理后对香蕉幼苗各时间段的病情指数均稍高于对照。

在处理香蕉苗 144 h 后，高温高压处理毒素的病情指数达到 79.33，对照为 68.21。

该结果表明，就毒素的致病性而言，经高温高压处理的毒素活性不会受影响。

可以推断，毒素的致病活性物质在本试验中的高温高压和处理时间内比较稳定。

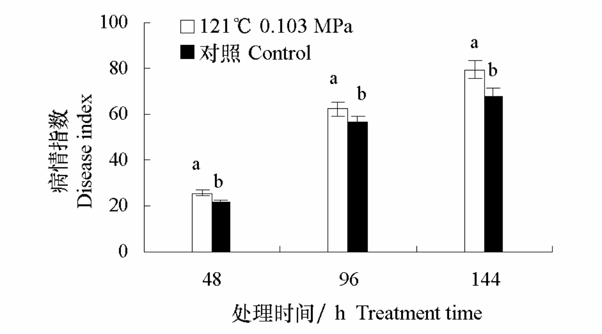

图 1 高温高压处理对毒素致病活性的影响

Fig. 1 Effect of autoclave treatment on the pathogenic activity of the toxin

P = 0.05.

2.2.2 对酸碱的耐性

试验结果（图 2）表明，粗毒素水溶液的 pH 值对粗毒素的活性有一定影响。在 pH 值 7 时（对照）粗毒素的致病活性最高，处理 48、96 和 144 h 时香蕉苗的病情指数均处在高峰范围。偏酸（pH 3～6）或偏碱（pH 8～10）在一定程度上都会降低毒素的致病活性。

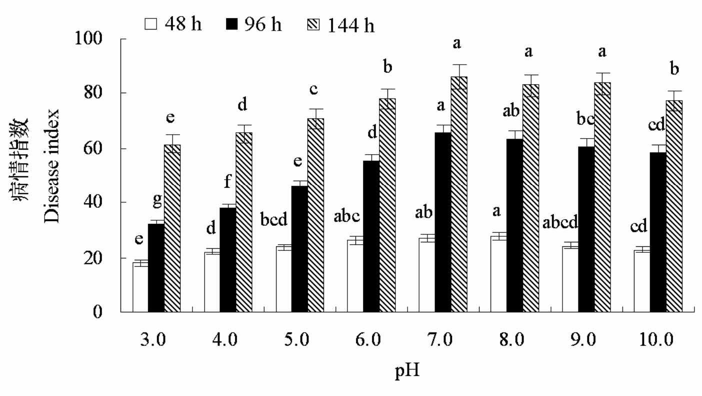

图 2 不同 pH 值对毒素致病活性的影响

相同系列数据具有不同字母者表示差异显著（*P* = 0.05）。

Fig. 2 Effects of different pH values on the pathogenic activity of the toxin

Data with different letters in the same series are significantly different（*P* = 0.05）.

2.2.3 对紫外线的耐性

试验结果（图 3）表明，紫外线照射对粗毒素的活性具有较大的影响。紫外线照射 5、10 和 15 min 的病情指数多数与不照射对照差异不显著。照射 20 min 后，粗毒素的致病活性急剧减弱，表现为病情指数急剧下降，照射 20、25 和 30 min 的病情指数基本没有变化。

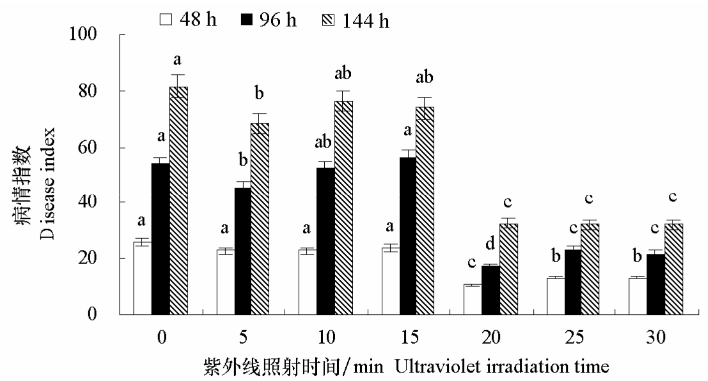

图 3　不同时间紫外线照射对毒素致病活性的影响

Fig. 3　Effects of different ultraviolet irradiation times on the pathogenic activity of the toxin

$P = 0.05$.

2.2.4　甲醇处理毒素培养滤液的致病活性

香蕉苗浸根法试验结果表明，甲醇处理毒素培养液的沉淀部分基本没有毒性，上清液部分保持了毒素液的毒性，致病活性与毒素液相比无明显差异（图 4）。离体叶片针刺接种结果（图 5）表明，

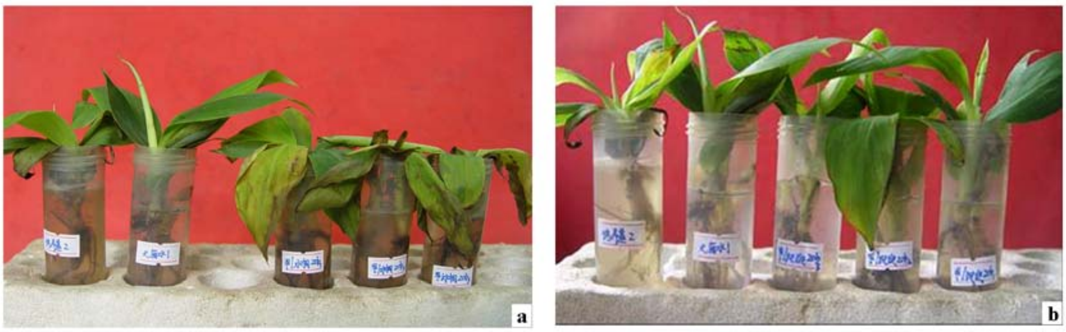

图 4　培养滤液上清液（a）及沉淀（b）部分对香蕉苗的毒性

a. 从左往右分别为空白培养基、无菌水和上清液的 3 个重复；b. 从左往右分别为空白培养基、无菌水和沉淀的 3 个重复。

Fig. 4　The toxicity of the supernatant（a）and precipitation（b）of culture filtrate on banana plantlets

a. From left to right，the treatments are blank medium，sterile water and the three replications of supernatant；

b. From left to right，the treatments are blank medium，sterile water and the three replications of precipitation.

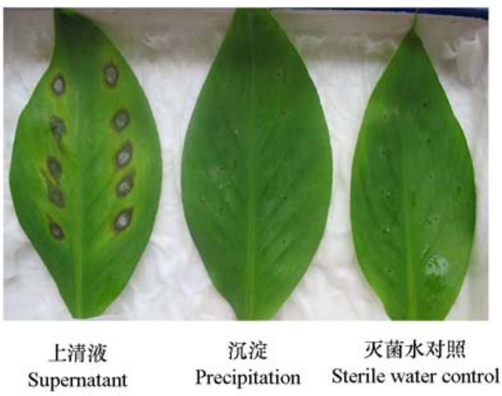

图 5　培养滤液上清液及沉淀部分对香蕉苗叶片的毒性

Fig. 5　The toxicity of the supernatant and precipitation of culture filtrate on leaves of banana plantlet

接种甲醇处理上清液部分的叶片，针刺周围呈深褐色水渍状病斑，并呈现扩展现象，由于叶脉的限制，病斑呈现不规则状，病斑周围的叶脉变褐。说明毒素可能从叶脉的维管束进行传导；接种沉淀部分没有明显的病斑，只是接种点处轻微变褐，与灭菌水对照无差异。

2.3 香蕉枯萎病病菌粗毒素的寄主专化性

香蕉枯萎病病菌粗毒素对 9 种非寄主植物种子的萌发也具有抑制作用，对茄科作物种子的影响尤为明显，抑制率分别为：辣椒 71.11%，番茄 68.26%，茄子 63.03%；对水稻种子的抑制作用最小，为 15.87%（表 1）。经香蕉枯萎病菌粗毒素处理后，各种作物种子的胚芽生长均受到抑制。粗毒素对辣椒胚芽的生长抑制作用最明显，抑制率达到 67.89%，其次是番茄 67.53%，对水稻胚芽生长的抑制作用最小，仅为 11.16 %（表 1）。

表 1 香蕉枯萎病病菌粗毒素对不同作物种子萌发和胚芽生长的影响

Table 1 Effects of the toxin on seed germination and plantule growth among different crops

作物 Crop	萌发抑制率/ % Germination inhibition rate	生长抑制率/ % Growth inhibition rate
萝卜 Radish	35.29 ± 5.89 e	36.60 ± 7.42 e
大白菜 Cabbage	54.85 ± 5.00 bc	57.08 ± 1.20 bc
茄子 Eggplant	63.03 ± 5.60 ab	60.19 ± 2.87 b
辣椒 Pepper	71.11 ± 7.70 a	67.89 ± 1.85 a
番茄 Tomato	68.26 ± 2.75 a	67.53 ± 2.08 a
水稻 Rice	15.87 ± 3.61 f	11.16 ± 4.26 f
玉米 Maize	67.86 ± 9.45 a	52.63 ± 5.40 cd
黄瓜 Cucumber	39.46 ± 6.83 de	59.54 ± 2.69 b
大豆 Soybean	48.15 ± 6.42 cd	49.27 ± 0.77 d

注：同列数据具有不同字母者表示差异显著（$P = 0.05$）。

Note：Data with different letters in the same column are significantly different（$P = 0.05$）.

3 讨论

植物病原真菌产生的毒素是一类对寄主植物有毒害作用的代谢产物，是病原真菌与寄主植物互作中的重要致病因子。毒素能够破坏寄主植物叶片的细胞膜、线粒体、叶绿体等超微结构，并对寄主植物的光合作用、核酸代谢、蛋白质合成等生理生化反应造成严重影响，从而导致寄主生理失调、细胞死亡以至植株萎蔫枯死等（韩珊 等，2008）。因此，加强对香蕉枯萎病菌毒素理化性质的研究，对阐明该毒素的作用机理具有重要意义。本研究中对高温高压、酸碱度以及紫外线照射等理化因素对香蕉枯萎病菌粗毒素致病活性的影响进行了研究，明确了这些理化因素对该毒素致病活性的影响，为后续研究打下了基础。本研究中用甲醇处理毒素培养滤液的试验目的是为了沉淀大分子物质，结果表明粗毒素液中的大分子物质与毒素的致病活性无关，可以认为毒素中的致病活性物质是非大分子的物质。综上所述，香蕉枯萎病菌可能属于一类低分子量的非蛋白化合物，这一结论与房保海（2003）对烟草低头黑病菌毒素特性的相关研究结果一致。研究结果进一步证实了该毒素的致病活性物质可能是已普遍认同的镰刀菌酸（Matsumoto et al.，1995；兀旭辉 等，2004）。除此之外，是否还含有其它小分子物质，有待进一步研究。本研究对香蕉枯萎病菌毒素理化性质的阐明，为该毒素钝化（解毒）剂的研发，并用于香蕉枯萎病的防治奠定了基础。

对寄主专化性测定的结果则表明：该毒素对不同种类的作物种子的萌发及胚芽的生长均有一定的抑制作用，说明香蕉枯萎病菌毒素是一种非寄主专化性毒素。许文耀等（2004）用香蕉假茎细胞对不同生理小种枯萎病病菌粗毒素的病理反应试验也证实了香蕉枯萎病病菌粗毒素对香蕉品种没有选择毒性。但是由于本研究供试作物的种类较少，还不足以说明该毒素的敏感作物范围，因此这方面的研究还有待进一步深入探讨。

References

Bhagwat B，Duncan E J. 1998. Mutation breeding of banana cv. Highgate （*Musa* spp. AAA group）for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens. Scientia Horticulturae，73 (1)：11 – 22.

Dong Jin-gao，Shi You-yan，Kang Shao-lan，Huang Wu-fang. 1993. Extraction of Ht-toxin produced by *Helminthosporium turcicum* and its pathogenic activity. Microbiology，20 (2)：73 – 77. (in Chinese)

董金皋，史有艳，康绍兰，黄梧芳. 1993. 玉米大斑病 Ht – 毒素的萃取及其致病活性. 微生物学通报，20 (2)：73 – 77.

Dong Jin-gao，Zhu Xi. 1992. Research status of mycotoxin bioassay Ⅰ. Bioassays on plant and tissue organ levels. Journal of Agricultural University of Hebei，15 (4)：99 – 103. (in Chinese)

董金皋，朱　晞. 1992. 真菌毒素生物测定方法研究概况Ⅰ. 植株和组织器官水平的生物测定. 河北农业大学学报，15 (4)：99 – 103.

Fang Bao-hai. 2003. Studies on *Colletotrichum capsici* f. *nicotianae* toxin and its functional characteristic[M. D. Dissertation]. Tai'an：Shandong Agricultural University：1 – 71. (in Chinese)

房保海. 2003. 烟草低头黑病菌毒素及其作用特性研究[硕士论文]. 泰安：山东农业大学：1 – 71.

Han Shan，Zhu Tian-hui，Li Fang-lian. 2008. Advances in researches on mechanism of plant pathogenic mycotoxins. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology，29 (6)：26 – 30. (in Chinese)

韩　珊，朱天辉，李芳莲. 2008. 植物病原真菌毒素作用机理研究进展. 四川林业科技，29 (6)：26 – 30.

Huang Yong-hui，Li Yu-ting，Fan Jia-ping，Yang Mei，Zhou Er-xun. 2011. The optimization of the toxin-producing conditions for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. Journal of Huazhong Agricultural University，30 (5)：594–598. (in Chinese)

黄永辉，李瑜婷，范家平，杨　媚，周而勋. 2011. 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种产毒条件的优化. 华中农业大学学报，30 (5)：594 – 598.

Jones D R. 1999. Diseases of banana，abacá and enset. London：CABI Publishing.

Li Yu-ting. 2009. Studies on the toxin of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and its antidotes[M. D. Dissertation]. Guangzhou：South China Agricultural University. (in Chinese)

李瑜婷. 2009. 香蕉枯萎病菌毒素及其解毒剂的研究[硕士论文]. 广州：华南农业大学.

Matsumoto K，Barbosa M L，Souza L A C，Teixeira J B. 1995. Race 1 fusarium wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. Euphytica，84：67 – 71.

Tang Qian-fei，Yang Mei，Zhou Er-xun，Ao Shi-en，Jiang Zi-de，Chen Hou-bin. 2006a. Endogenous hormone change in banana infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Journal of South China Agricultural University，27 (2)：42 – 44. (in Chinese)

唐倩菲，杨　媚，周而勋，敖世恩，姜子德，陈厚彬. 2006a. 香蕉受枯萎病菌侵染后内源激素含量的变化. 华南农业大学学报，27 (2)：42 – 44.

Tang Qian-fei，Yang Mei，Zhou Er-xun，Ao Shi-en，Jiang Zi-de，Chen Hou-bin. 2006b. Changes of phenol compound contents in banana infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Journal of South China Agricultural University，27 (3)：55 – 57. (in Chinese)

唐倩菲，杨　媚，周而勋，敖世恩，姜子德，陈厚彬. 2006b. 香蕉受枯萎病菌侵染后酚类物质含量的变化. 华南农业大学学报，27 (3)：55 – 57.

Wu Xu-hui，Xu Wen-yao，Lin Cheng-hui. 2004. A preliminary study of the characters of the crude toxin produced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*// Peng You-liang. Proceedings of the 2004 annual meeting of Chinese society for plant pathology. Beijing：China Agricultural Science & Technology Press. (in Chinese)

兀旭辉，许文耀，林成辉. 2004. 香蕉枯萎病菌毒素特性的初步研究//彭友良. 中国植物病理学会 2004 年学术年会论文集. 北京：中国农业科学技术出版社.

Xie Mei-qiong，Yang Mei，Yang Ying-qing，Jiang Zi-de，Zhou Er-xun. 2011. Risk analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*，the causal agent of banana fusarium wilt. Journal of Fruit Science，28 (2)：284 – 289. (in Chinese)

谢梅琼，杨　媚，杨迎青，姜子德，周而勋. 2011. 香蕉枯萎病菌的风险性分析. 果树学报，28 (2)：284 – 289.

Xu Wen-yao，Wu Xu-hui，Yang Jing-hui，Yang Kun. 2004. The pathogenic reaction of banana pesudostem cells to different races of vascular wilt fungus and their crude toxins. Acta Phytopathologica Sinica，34 (5)：425 – 430. (in Chinese)

许文耀，兀旭辉，杨静惠，杨　琨. 2004. 香蕉假茎细胞对枯萎病菌不同小种及其粗毒素的病理反应. 植物病理学报，34 (5)：425 – 430.

Zhang Guang-min，Wang Zhi-fa，Liu Yan-rong，Zhang Xiu-guo，Jiang Jin-ming. 1995. Study on selectivity toxicity to tobacco of cultural filtrates from pathogen of tobacco black death. Journal of Shandong Agricultural University，26 (2)：131 – 136. (in Chinese)

张广民，王智发，刘延荣，张修国，姜金明. 1995. 烟草低头黑病菌培养滤液对烟草毒性及作用特性的研究. 山东农业大学学报，26 (2)：131 – 136.