

研究报告



pH 值对香蕉枯萎病菌 4 号生理小种生长的影响

李望梅 张立丹 刘芳 冯裕才 樊小林*

华南农业大学资源环境学院 广东 广州 510642

摘要:【背景】香蕉枯萎病菌 4 号生理小种(镰刀菌)是香蕉产业的致命威胁。已有研究表明土壤 pH 值越高,香蕉枯萎病发病率越低,但是现有 pH 值对镰刀菌影响的研究大都是用强酸强碱调节 pH 值, pH 值没有缓冲体系保护,而且尚未检测试验终点时介质的 pH 值。此外,关于 pH 值对香蕉枯萎病菌 4 号生理小种(Foc4)影响的研究尚不系统,难以用于指导生产实践。【目的】为系统地了解土壤酸碱度对 Foc4 生长的影响。【方法】在 pH 3.0–11.0 之间设定 9 个 pH 值梯度,模拟酸性到碱性土壤 pH 值条件,于室内培养条件下系统研究 pH 值对 Foc4 生长、产孢、孢子萌发的影响及其生长过程对环境 pH 值的影响。【结果】弱酸性至中性环境(pH 5.0–7.0)最适宜于香蕉枯萎病菌的生长、产孢和孢子萌发。弱碱性处理(pH 8.0 和 pH 9.0)孢子平均萌发率较弱酸性环境处理(pH 5.0 和 pH 6.0)下降了 73.1%。与 pH 6.0 酸性处理相比, pH 8.0 和 pH 9.0 处理的产孢量分别下降了 52.3%和 68.1%。【结论】香蕉枯萎病菌 Foc4 生长和萌发过程会产酸,但是在缓冲体系液体培养基中,除了 pH 9.0 和 pH 10.0 处理终点培养液 pH 值分别下降了 0.34 和 0.27 个单位外,其它处理起始和终点的 pH 值无差异。说明在缓冲体系液体培养基中的研究结果可以反映环境 pH 值对 Foc4 生长和萌发的影响。在作物可以生长的 pH 值范围内(pH 5.0–9.0),碱性和微碱性条件(pH 8.0–9.0)能明显抑制 Foc4 生长、产孢和孢子萌发。

关键词: 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种, pH, 产孢, 孢子萌发

Effect of pH on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 of banana

LI Wang-Mei ZHANG Li-Dan LIU Fang FENG Yu-Cai FAN Xiao-Lin*

College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

Abstract: [Background] *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc4) has been a life-threatening disease to banana production. Present studies have shown that soil pH is negatively correlated to the onset of banana wilt disease. However, most studies of influence of the pH on growth of Foc4 of banana were

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFD020110); Provincial-level Major Scientific Research Project (2016KZDXM029); National Modern Agricultural Industry Technology System Construction Special (CARS-31-06)

*Corresponding author: Tel: 86-20-85288325; E-mail: xlfan@scau.edu.cn

Received: 22-02-2019; Accepted: 11-07-2019; Published online: 26-08-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD020110); 省级重大科研项目(2016KZDXM029); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-31-06)

*通信作者: Tel: 020-85288325; E-mail: xlfan@scau.edu.cn

收稿日期: 2019-02-22; 接受日期: 2019-07-11; 网络首发日期: 2019-08-26

done under the condition of the pH being adjusted with strong acid and alkali, without tested the terminal pH of the test medium. In fact, the investigation of the pH on Foc4 is not systematic and the results of the study are not practice to guide farmers to remedy the Foc4 disease by modifying the soil pH. **[Objective]** To study the effect of pH on growth, sporulation and spore germination of Foc4 as well as the side effect of growth, sporulation and spore germination of Foc4 on the environmental pH throughly. **[Methods]** Laboratory incubations with 9 pH treatments from pH 3.0 to pH 11.0 were applied in the study. **[Results]** The most suitable condition for growth, sporulation and spore germination of the Foc4 is weak acid to neutral environment, being pH 5.0 to 7.0. The average germination rate of spores in weakly alkaline environment (pH 8.0 and pH 9.0) was decreased by 73.1% compared to that in weakly acidic environment (pH 5.0 and pH 6.0). Compared with the acid treatment under pH 6.0, the sporulation rate under pH 8.0 and pH 9.0 decreased by 52.3% and 68.1%, respectively. **[Conclusion]** The growth and germination of Foc4 is able to secrete acid. However, terminal pH of the liquid medium has been stable when pH buffer system is used in the medium to culture the Foc4, except for treatment of pH 9.0 and pH 10.0. The terminal pH of the treatment of pH 9.0 and pH 10.0 only decreased by 0.34 and 0.27 units respectively. The results indicated that the reliable results of the effect of pH on the Foc4 growth and germination should be under the pH buffer system liquid medium. Within the pH range where the crop can grow (pH 5.0–9.0), alkaline and slightly alkaline conditions (pH 8.0–9.0) are capable to inhibit the growth, sporulation and spore germination of Foc4 significantly.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 of banana, pH, Sporulation, Spore germination

香蕉枯萎病(Banana *Fusarium* wilt disease)是一种真菌性病害, 它是由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc)侵染香蕉维管束而导致的土传病害。全球范围内的主栽品种 *Cavendish* 易被香蕉枯萎病菌 4 号生理小种(Foc4)侵染, 导致香蕉枯萎病在世界范围内的肆虐^[1]。国内外学者从物理化学防治、生物防治和基因工程等方面对香蕉枯萎病防治方法进行了系统的研究^[2-7]。我们所在的研究团队在碱性肥料防治香蕉枯萎病方面也取得了进展^[8-11]。

pH 值是影响病原真菌生长和定殖的重要环境因子^[12-13]。镰刀菌枯萎病的发病率与土壤 pH 值呈现负相关性^[14-15], pH 值对不同类型镰刀菌的影响存在差异性^[16-17]。但是, pH 值对镰刀菌影响的研究大都是用硫酸、盐酸、氢氧化钾和氢氧化钠等强酸强碱溶液调节溶液 pH 值得到的结果^[16-18], 所用溶液不具备缓冲性能。特别是培养液 pH 值呈弱酸或弱碱性时, H^+ 或 OH^- 的浓度低于 10^{-3} mol/L, 培养液不仅缓冲容量很小, 而且其 pH 值很不稳定, 在实际操作时难度较大。其次, 在菌株培养过程中, 由于 Foc4 自身的新陈代谢会改变培养液

环境的 pH 值, 即在镰刀菌的培养过程中试验介质的 pH 值受 Foc4 生长过程产生酸的影响因而 pH 值不会稳定在设定的范围, 从而干扰研究结果的准确性。此外, 现有研究报道中大都未对实验前后培养介质 pH 值的变化进行监测^[19-21]。换言之, 现有研究结果远不足以评价 pH 值对镰刀菌生长和定殖的影响。系统研究 pH 值对 Foc4 生长影响的报道则更少^[18]。本文在不同 pH 值的缓冲体系培养条件下, 监测 Foc4 孢子萌发、生长和产孢过程对培养环境 pH 值的影响, 并在 pH 值相对稳定的培养液中研究 pH 值对 Foc4 萌发、生长及产孢的影响, 为生产实践中通过调节土壤 pH 抑制香蕉枯萎病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

采用单因素 9 水平完全设计, 试验因素 Foc4 培养液的 pH 值, 设 9 个水平, 分别是 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 共 9 个处理, 每个处理 3 个重复, 即每个处理做 3 个培养。为了保障试验过程培养基的 pH 值恒定不变, 筛选出了 3 个 pH 值段的缓冲体系。pH 3.0–4.0 用柠檬

酸-磷酸二氢钾缓冲体系, pH 5.0–9.0 用磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲体系, pH 10.0–11.0 用磷酸氢二钾-氢氧化钾缓冲体系。

1.2 供试材料

1.2.1 供试培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯粉 6.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, 氯霉素 0.1。

PDB 液体培养基(g/L): 马铃薯粉 6.0, 葡萄糖 20.0, 氯霉素 0.1。

Czapek 培养基(g/L): 硝酸钠 2.0, 磷酸氢二钾 1.0, 氯化钾 0.5, 硫酸镁 0.5, 硫酸亚铁 0.01, 蔗糖 20.0。

1.2.2 主要仪器

恒温振荡培养箱, 太仓实验设备厂; 徕卡显微镜, 徕卡显微系统。

1.2.3 菌株和溶液

供试菌株: 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc4), 由华南农业大学植物病理系提供。

Foc4 菌饼的制备: Foc4 接种至 PDA 培养基上, 28 °C 避光培养 5 d。

Foc4 孢子悬液的制备: 在 Foc4 菌落(28 °C, 5 d)边缘用 5 mm 直径打孔器取 5 个菌饼置于 150 mL Czapek 培养基中 28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 菌液用 3 层擦镜纸过滤, 滤液 5 000 r/min 离心 5 min, 去上清后用灭菌水重新悬浮再离心, 如此重复 3 次后用灭菌水悬浮。用血球计数板计数孢子浓度后, 用灭菌水把孢子稀释到 2.5×10^6 CFU/mL。

低浓度缓冲对溶液: 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液, 0.2 mol/L 磷酸氢二钾溶液, 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液, 0.2 mol/L 氢氧化钾溶液。高浓度缓冲对溶液: 0.2 mol/L 的柠檬酸缓冲液, 0.4 mol/L 磷酸氢二钾溶液, 0.4 mol/L 磷酸二氢钾溶液, 0.4 mol/L 氢氧化钾溶液溶液。

缓冲溶液配制: pH 3.0 和 pH 4.0 缓冲液用 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液和 0.2 mol/L 的磷酸二氢钾溶液配制, pH 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 缓冲液用

0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液和 0.2 mol/L 磷酸氢二钾溶液配制, pH 10.0 和 pH 11.0 的缓冲液用 0.2 mol/L 的磷酸氢二钾溶液和 0.2 mol/L 氢氧化钾溶液配制。相应 pH 值的高浓度缓冲液参考上述方法配制。

缓冲培养基的配制: 在 pH 3.0–11.0 的 9 种高浓度缓冲溶液中分别加入等体积两倍浓度的 PDA 培养基, 用 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液和 0.2 mol/L 氢氧化钾溶液分别调节混合液 pH 值至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0, 并记录各处理 30 mL 缓冲培养基的 pH 值调节到设定所需酸碱的量。按照预实验记录的各 pH 处理 30 mL 缓冲培养基需额外加柠檬酸和氢氧化钠的量分别加入 9 种 pH 值的 15 mL 高浓度缓冲溶液中, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。15 mL 两倍浓度的 PDA 培养基 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 趁热混和缓冲液和培养基后倒平板。

用上述的方法得到配制一定体积 9 种 pH 值的缓冲 Czapek 培养基和缓冲 PDB 液体培养基需外加柠檬酸和氢氧化钠的量后, 把需额外加的柠檬酸和氢氧化钠溶液分别按比例加入到相应 pH 值的 9 种高浓度缓冲液中, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。与缓冲液等体积的两倍浓度 Czapek 培养基或 PDB 液体培养基在 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后与相应 pH 值的已灭菌缓冲液混合。即为 pH 3.0–11.0 的 9 个 pH 值梯度的缓冲 Czapek 培养基和缓冲 PDB 液体培养基。

1.3 香蕉枯萎病菌产酸的研究

配制 pH 3.0–11.0 的 9 种 pH 梯度的 PDB 液体培养基 50 mL 分别置于三角瓶, 每个三角瓶接种 2.5×10^6 CFU/mL 孢子悬液 1 mL。在 28 °C、180 r/min 下遮光振荡培养, 测定第 0 天、第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 5 天和第 9 天培养液的 pH 值, 以此测定产酸量。

1.4 pH 值对香蕉枯萎病菌孢子萌发的影响

用低浓度的缓冲对溶液配制 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 等 9 个 pH 值梯度的缓冲溶液进行研究, 即 9 个处理。9 种缓冲

液 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 把 5 mL 缓冲溶液和 200 μ L 浓度为 2.5×10^6 CFU/mL 孢子悬液加入到 10 mL 灭菌离心管中, 每个 pH 值处理重复 3 次, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 下遮光振荡培养 6 h, 4 $^{\circ}$ C 冷藏。用 pH 计测定溶液 pH 值, 用血球计数板计数孢子萌发率, 以 100 个孢子为一个统计单元, 计算孢子的萌发率, 即为一个计数, 每个处理观测 3 个萌发率。当孢子萌发的芽管长度超过孢子直径的一半时, 则判定为孢子已萌发^[22]。

萌发率 = (已萌发的孢子数 \div 计数的孢子总数) \times 100%。

1.5 pH 值对香蕉枯萎病菌生长的影响

制备 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 的缓冲 PDA 培养基, 把 5.0 mm 直径的菌饼(5 d, 28 $^{\circ}$ C, 相对湿度 90%)菌丝朝下接种至培养基中央, 用封口膜封口, 每个处理 5 个重复, 在恒温培养箱(28 $^{\circ}$ C, 相对湿度 90%)避光培养, 第 3 天开始用十字交叉法测量菌落直径。

1.6 pH 值对香蕉枯萎病菌产孢量的影响

配制 pH 3.0–11.0 的缓冲培养基 100 mL 于 250 mL 三角瓶中, 每个三角瓶接入 5 个 5 mm 直径的菌饼(5 d, 28 $^{\circ}$ C), 每个 pH 值处理 3 个重复。在 28 $^{\circ}$ C, 180 r/min 下培养 28 h 后。用 3 层擦镜纸过滤菌液, 滤液 5 000 r/min 离心 5 min, 去上清并测定上清液 pH 值, 孢子用 5 mL 灭菌水重新悬浮泡后冷藏于 4 $^{\circ}$ C, 在血球计数板上计数各处理的孢子总量^[23–24]。

1.7 数据处理与分析

萌发率以百分比表示, 对萌发率进行反正弦转换后再统计, 用 SPSS 17.0 对数据进行处理, 采用 Duncan's 法对数据进行差异显著性多重比较, 图表用 Excel 2010 制作。

2 结果与分析

2.1 香蕉枯萎病菌对液体培养基酸碱度的影响

香蕉枯萎病菌在不同 pH 值的情况下对缓冲培养基 pH 值的影响如图 1 所示, Foc4 的萌发和生长对培养基 pH 值有明显的影

响。随着培养时间的延长, pH 6.0–11.0 处理缓冲培养基的 pH 值都呈现不同程度的酸化, 且原培养基 pH 值越高酸化现象越明显。具体而言, pH 6.0 处理培养基的 pH 值在 9 d 内降低了 0.42 个单位, 碱性处理 pH 8.0、9.0 和 10.0 处理的培养基 pH 值均在培养 1 d 后下降了 0.77、1.29 和 1.30 个 pH 值单位, pH 11.0 处理培养基的 pH 值在 5 d 内下降了 3.61 个 pH 值单位。而酸性(pH 3.0、4.0、5.0)处理培养基的 pH 值在培养期间的变化甚小, 但 pH 值均有轻微上升的趋势。以上结果说明, 在无缓冲的培养条件下, 尤其是在碱性条件, 香蕉枯萎病菌 Foc4 的生长过程会产酸, 且产酸量在 pH 值低于 11.0 的碱性环境中随 pH 值的升高而升高。特别是培养介质 pH 值在 6.0 以上时, 菌株产酸会明显地降低培养基的 pH 值, 因此如果不在培养基中加缓冲对, 那么培养结果将难以说明 pH 值对镰刀菌的影响, 就是试验设定的 pH 值对其的影响。

2.2 缓冲体系培养基 pH 值的变化

为了检验香蕉枯萎病菌孢子萌发过程培养液的缓冲作用, 并判断缓冲液的效果。本文分别对比研究了 9 种不同 pH 值缓冲液在孢子萌发前的原始 pH 值和萌发后的终点 pH 值的差异。研究结果表明(图 2), 9 个 pH 处理孢子萌发前的 pH 值(原始 pH)和孢子萌发后缓冲液 pH 值无统计差异, 且变化幅度仅在 0.03–0.10 个 pH 值单位范围内。其主要原因在于所用溶液为缓冲溶液, 且该缓冲液是经过预备试验确定的可以缓冲试验所涉酸性、中性、碱性 pH 环境的缓冲对, 因此在孢子萌发和生长过程中虽然会产生一定的酸(图 1), 但是缓冲培养基的强大缓冲功能会保持培养液 pH 值相对稳定。由此可见, 本研究选用的 pH 缓冲培养液在研究 Foc4 孢子萌发时, 能在孢子萌发期内稳定培养基的 pH 值, 从而得到 pH 值对 Foc4 孢子萌发率影响的可靠结果。

为了研究上述 3 组缓冲对在香蕉枯萎病菌培养过程中对培养基 pH 值变化的缓冲效果, 分别对比研究了 9 种缓冲培养基 pH 值在摇菌前后的变化

(图3)。酸性到中性处理缓冲培养基的 pH 值在摇菌前后均无显著差异。在 pH 8.0–11.0 的碱性处理中,产孢量最低的 pH 11.0 处理培养基 pH 值在摇菌前后没有显著差异,同时,弱碱性的 pH 8.0 处理培养基 pH 在摇菌前后也无显著变化。虽然 pH 9.0 和 pH 10.0 处理培养基 pH 值分别下降了 0.34 和 0.27 个 pH 值单位,但两个处理仍然处于不同的 pH 值。说明在摇菌过程中香蕉枯萎病菌虽然在碱性介质中会产酸降低环境 pH 值,但各 pH 值处理的缓冲培养基仍然存在 pH 值梯度,缓冲培养基在摇菌过程中能基本维持环境 pH 值的稳定。

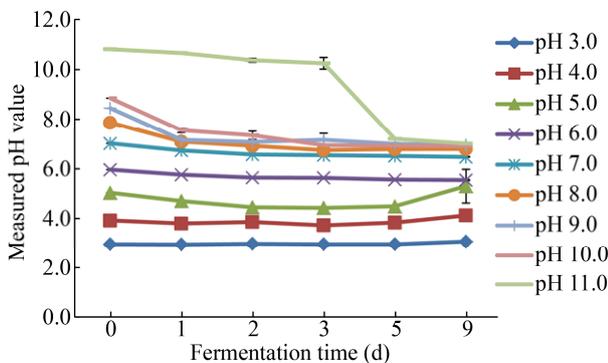


图1 香蕉枯萎病菌对环境 pH 值的调节作用
Figure 1 Effect of germination of *Foc4* on environmental pH

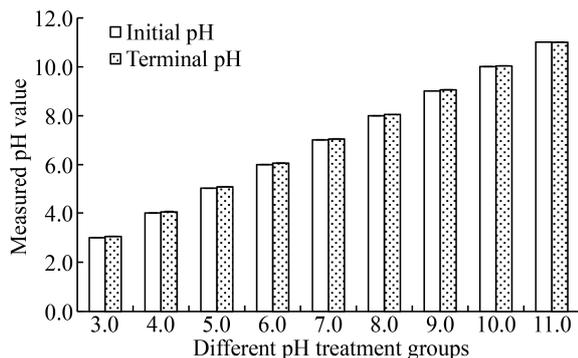


图2 孢子萌发前后缓冲液 pH 值变化
Figure 2 Effect of pH buffer system on the pH of the culture medium before and after spore germination
注:同一 pH 处理柱状图上无*表示原始和终点 pH 值间无差异 ($P>0.05$)。
Note: No * on the histogram indicates that there is no difference between initial and terminal pH of the same pH treatment ($P>0.05$).

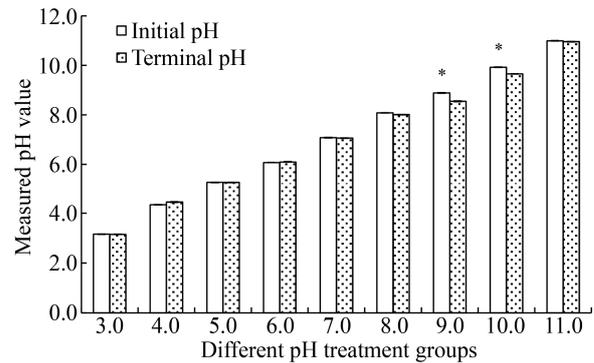


图3 香蕉枯萎病菌产孢前后液体培养基 pH 值的变化
Figure 3 Comparison of initial and terminal pH of liquid medium with pH buffer system before and after sporulation of *Foc4* under the nine pH treatments

注:柱状图上*表示处理内初始 pH 值和终点 pH 值存在差异 ($P<0.05$)。

Note: * On the histogram indicates that there is a difference between initial and terminal pH of the treatment ($P<0.05$).

2.3 缓冲溶液中 pH 值对香蕉枯萎病菌孢子萌发率的影响

pH 值对 *Foc4* 孢子萌发率的影响如图 4 所示,随 pH 值的升高, *Foc4* 孢子萌发率呈现先升高后降低的趋势,其中 pH 值为 7.0 时达到峰值。pH 5.0、6.0 和 7.0 三个处理间 *Foc4* 孢子的萌发率无统计差异,但在供试的 9 个 pH 处理中最高,为 60.0%–64.6%; pH 4.0 处理次之,萌发率为 52.2%; pH 8.0、9.0 和 10.0 碱性环境处理的萌发率相对较低,分别为 21.7%、10.3% 和 11.0%。结果也显示, pH 3.0 和 pH 11.0 两个极端酸、碱条件下,孢子萌发率最低,仅为 1.0%。由以上结果可见,弱酸性至中性环境适宜于孢子萌发。pH 5.0–7.0 的弱酸至中性环境下孢子平均萌发率为 61.7%,分别是 pH 8.0 的 2.8 倍, pH 9.0 和 pH 10.0 的 5.9 倍。弱酸性环境处理(pH 5.0 和 pH 6.0)的平均萌发率达 59.5%,而弱碱性处理(pH 8.0 和 pH 9.0)平均萌发率仅为 16.0%,后者比前者下降了 73.1%。以上结果说明强酸和强碱性环境都能抑制 *Foc4* 萌发,但是这两个极端 pH 下作物无法生长。而在作物可以生长的 pH 值范围内(pH 5.0–9.0),碱性和微碱性条件能明显抑制 *Foc4* 孢子的萌发和生长。

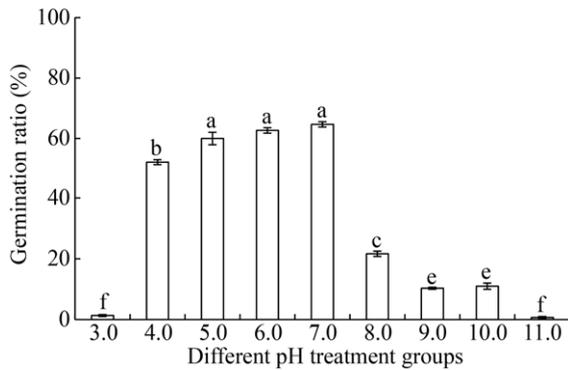


图 4 pH 值对香蕉枯萎病菌孢子萌发的影响

Figure 4 Effect of pH on spore germination of Foc4注: 柱状图上不同小写字母代表处理间差异显著($P<0.05$).Note: Different letters in the figure mean significantly different among the treatments ($P<0.05$).

2.4 缓冲体系培养基中 pH 值对香蕉枯萎病菌菌落直径的影响

Foc4 菌落直径的大小可以反映其生长的速度。由图 5 可知, Foc4 菌落直径随 pH 值的升高呈现先增大后减小的规律, pH 值为 7.0 时, 菌落直径达到峰值, 该结果与 pH 值对 Foc4 孢子萌发影响的结果一致。整体而言, 虽然碱性处理(pH 8.0–11.0) Foc4 的菌落平均直径(3.22 cm)大于酸性处理(pH 3.0–6.0)下 Foc4 的菌落平均直径 2.58 cm, 但弱碱性处理(pH 8.0 和 pH 9.0)菌落平均直径则小于弱酸性处理(pH 5.0 和 pH 6.0)的平均直径。弱酸性处理下, Foc4 菌落平均直径为 3.44 cm, 弱碱性处理下的为 3.19 cm。pH 值对菌落直径的影响, 按菌落直径由大到小依次为 pH 7.0>pH 6.0>pH 5.0>pH 8.0=pH 9.0>pH 10.0>pH 11.0>pH 4.0>pH 3.0。虽然碱性(pH 10.0、pH 11.0)和酸性(pH 3.0、pH 4.0)处理下的 Foc4 菌落小, 生长慢, 但是这 4 个 pH 下作物几乎无法正常完成其生命周期。由此可以肯定, 在作物能够生长的酸碱环境条件下, 弱酸性环境较弱碱性环境更适宜于 Foc4 菌丝生长, 即弱碱环境抑制 Foc4 的生长。

2.5 缓冲体系培养基中 pH 值对香蕉枯萎病菌产孢量的影响

环境酸碱度也明显影响 Foc4 的产孢量。由图 6

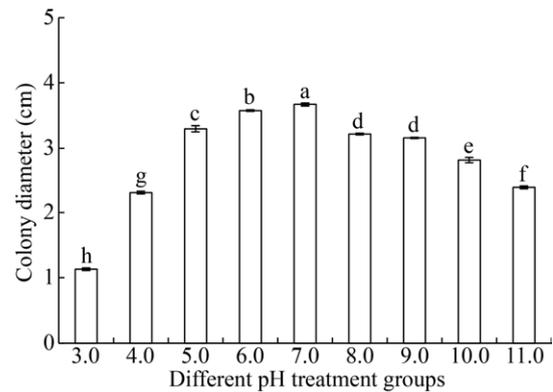


图 5 pH 值对香蕉枯萎病菌生长速率的影响

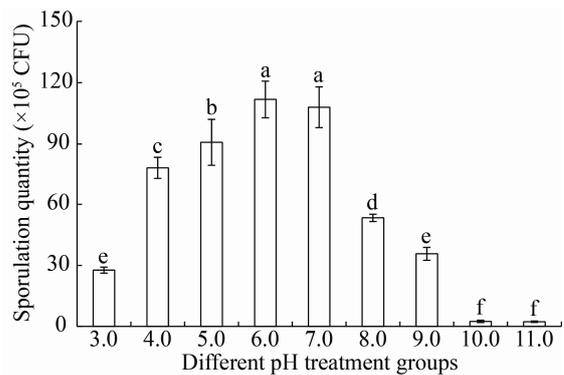
Figure 5 Effect of pH on the growth rate of Foc4注: 柱状图上不同小写字母代表处理间差异显著($P<0.05$).Note: Different letters in the figure mean significantly different among the treatments ($P<0.05$).

图 6 pH 值对香蕉枯萎病菌产孢量的影响

Figure 6 Effect of pH on the sporulation of Foc4注: 柱状图上不同小写字母代表处理间差异显著($P<0.05$).Note: Different letters in the graph mean significantly different ($P<0.05$).

可知, Foc4 产孢量随 pH 值从 3.0 升高至 11.0 呈现出先升后降的规律, 峰值出现在 pH 6.0 和 pH 7.0 处理。酸性处理(pH 3.0–6.0)的平均产孢量为 77.2×10^5 CFU, 碱性处理(pH 8.0–11.0)的平均产孢量为 23.5×10^5 CFU, 与酸性处理相比下降了 69.6%。弱酸性处理(pH 5.0 和 pH 6.0)的 Foc4 平均产孢量为 101.3×10^5 CFU, 弱碱性处理(pH 8.0 和 pH 9.0)的则为 2.4×10^5 CFU, 相比之下弱碱性处理平均产孢量仅为弱酸性处理的 2.4%。结果还表明 pH 6.0 和 pH 7.0 两个处理的产孢量无统计差异, 在 9 个 pH 值处理

中产孢量最高,为 109.9×10^5 CFU;碱性条件 pH 10.0 和 pH 11.0 处理的产孢量最低;酸性条件 pH 4.0、5.0 和 6.0 处理的 Foc4 产孢量均显著高于所有碱性处理的产孢量, pH 3.0 与 pH 9.0 处理的产孢量无统计差异。与酸性处理 pH 6.0 相比, pH 8.0 和 pH 9.0 处理的产孢量分别下降了 52.3% 和 68.1%, pH 10.0 和 pH 11.0 下降了 97.8%。由以上结果可知,酸性至中性(pH 5.0–7.0)环境不仅有利于 Foc4 萌发、生长,而且能明显增加新生孢子数量,而微碱性时能够显著抑制 Foc4 产生新孢子。

3 讨论与结论

研究显示,镰刀菌是一种适宜于生长在中性环境中的病原真菌。蓝江林等研究了 pH 值对 6 株镰刀菌生长的影响,发现最适宜镰刀菌生长的 pH 值范围为 6.0–8.0,最适宜产孢的 pH 值范围为 4.0–8.0^[16]。孔前前等发现苜蓿镰刀菌生长的最适 pH 范围为 7.0–8.0^[25]。师雯等以从小麦、玉米、大米、大麦等作物中分离得到的 12 株不同种类的镰刀菌为研究对象,发现镰刀菌在 pH 3.0–11.0 范围内均能够生长,最适 pH 值范围为 6.0–8.0^[17]。本研究结果与前人研究结果在对镰刀菌有抑制效果的环境 pH 值临界点上存在差异。以上的研究结果均显示初始 pH 值为 8.0 的环境较适宜于香蕉枯萎病菌生长,但本研究中 Foc4 的生长在 pH 值恒定为 8.0 的缓冲体系中较中性和弱酸性条件下受到了显著抑制($P < 0.05$)。我们认为造成以上不同结果的原因有以下 3 点:(1) 香蕉枯萎病菌在碱性环境中会产酸使培养液的 pH 值下降;(2) 由于前人的研究均采用强酸强碱调节培养介质 pH 值,因此介质环境不具备缓冲性能;(3) 前人的研究未监测整个试验过程中介质环境 pH 值的变化,不能确定整个试验过程中镰刀菌所处环境的 pH 值处于设定的 pH 值范围内。镰刀菌在培养过程中会产酸,因此前人所用 pH 8.0 的无缓冲培养液的 pH 值在试验过程中很快下降至中性,导致 pH 8.0 处理的测定结果与 pH 7.0 处理相近,但这种结果只能认为是初始

环境 pH 值对镰刀菌的影响,而不能认为是某个确定的环境 pH 值对镰刀菌的影响。Foc4 的萌发和生长虽和初始 pH 值有关,但是由于前人的培养介质没有缓冲或未彻底缓冲培养过程中 Foc4 新陈代谢产生的酸对介质 pH 值的影响,所以研究结果的参考价值不大。本研究所用溶液和培养基均具有缓冲性能,且对试验终点 pH 值进行了监测,保证香蕉枯萎病菌产生孢子以及孢子萌发的过程中溶液和培养基的 pH 值基本维持在一个设定的范围内,能更好地模拟自然条件下不同酸碱度土壤的强大缓冲性能。

就缓冲对选择和培养基配制而言,Frans 等^[26]选用柠檬酸钠和盐酸缓冲液、磷酸缓冲液和硼酸硼砂缓冲液研究了 pH 值对尖孢镰刀菌生长和产孢的影响,结果表明 pH 4.0–7.0 是尖孢镰刀菌生长的最适 pH 值范围,但最适宜于镰刀菌孢子萌发的 pH 值范围是 pH 5.0–7.0,在 pH 8.0 条件下尖孢镰刀菌的生长和产孢几乎被完全抑制。本文的研究结果与之相似,但我们在预实验缓冲对选择阶段曾采用 0.05 mol/L 硼酸硼砂配制 pH 8.0 和 pH 9.0 的缓冲培养基,结果发现这两个处理的 Foc4 菌丝完全不生长,而在更高 EC 值和 pH 值的磷酸缓冲液培养基上 Foc4 菌丝却能生长,由此我们认为这可能是高浓度的硼元素对 Foc4 造成了毒害,因此筛选了柠檬酸和磷酸缓冲体系。此外,在 pH 3.0 和 pH 4.0 的强酸性条件下琼脂灭菌后不能正常凝固,强碱性培养基在高压蒸汽灭菌过程中会焦糖化。因此我们改进了酸碱性培养基的制备方法,通过缓冲液与培养基分别灭菌后再趁热混合的方法来配制缓冲固体培养基和液体培养基。本文缓冲体系的选择和培养基的配制均保障了试验过程中 pH 值的准确性和差异的单一性,增强了试验结果的可信度。

就培养基 pH 值的变化而言,本文的研究结果显示,随着培养时间的延长,碱性培养基的 pH 值很快下降至中性,而酸性培养基的 pH 值则变化较小。朱育菁等研究却发现黄瓜尖孢镰刀菌和花生

尖孢镰刀菌的培养基 pH 值随着培养时间的延长逐渐上升, 在 pH 8.0–8.5 达到平衡, 且两个菌株间无差异^[27]。这种终点 pH 值的差异可能是所用菌株和培养基种类不同造成的。此外, 仅 pH 9.0 和 pH 10.0 处理培养基的 pH 值在摇菌过程中有显著的下降, 而弱碱的 pH 8.0 处理和强碱性的 pH 值 11.0 处理培养基的 pH 值在摇菌期间则无显著差异(图 3)。以上结果说明在中性和酸性环境不容易促使 Foc4 调控环境酸碱度, 而在 Foc4 能正常生长代谢的碱性环境中, Foc4 的产酸量随 pH 值的升高而升高。即在 Foc4 有能力改变环境酸碱度的碱性范围内, 环境碱度越高, 则越能促使 Foc4 产酸来降低环境 pH 值, 然而土壤具有强大的缓冲性能, 因此碱性土壤环境能对 Foc4 产生持久而稳定的抑制效果。综上所述, pH 8.0 的环境既能对 Foc4 的产孢、孢子萌发和生长产生明显的抑制效果, 又不会像更高的碱度(pH 9.0 和 pH 10.0)一样诱使 Foc4 大量产酸降低微环境的 pH 值。此外, 也有研究结果显示环境 pH 值通过调节镰刀菌的反转录反应来影响镰刀菌的产毒, 例如, 只有在酸性 pH 条件下才能诱导禾谷镰刀菌产生单端孢霉烯毒素^[28], 说明碱性环境也能抑制镰刀菌产毒。

本研究在人为严格控制的环境条件下研究了 pH 值对香蕉枯萎菌生长、产孢、孢子萌发和产酸的影响, 结果表明 Foc4 能在较广的 pH 值范围内生长, 弱酸性至中性环境(pH 5.0–7.0)最适宜于香蕉枯萎病菌的生长、产孢和孢子萌发, 而碱性环境则对香蕉枯萎病菌有明显抑制效果。在植株能正常生长的具有农学意义的弱酸至弱碱 pH 值范围内, 弱碱性环境对 Foc4 有显著抑制效果。而就香蕉生长而言, 在土壤 pH 值为 4.0 的红壤至 pH 值高达 8.5 的海滨滩涂种植的香蕉仍然能正常生长。此外, 碱性环境还能促使 Foc4 代谢产酸改变环境 pH 值。

REFERENCES

- [1] Ploetz RC. Management of *Fusarium* wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4[J]. *Crop Protection*, 2015, 73: 7-15
- [2] Li Z, Deng Z, Chen S, et al. Contrasting physical and biochemical properties of orchard soils suppressive and conducive to *Fusarium* wilt of banana[J]. *Soil Use and Management*, 2018, 34(1): 154-162
- [3] Gómez Expósito R, de Bruijn I, Postma J, et al. Current insights into the role of rhizosphere bacteria in disease suppressive soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2529
- [4] dos Santos JJ, Maranhão LT. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: a review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 210: 104-113
- [5] Shen ZZ, Ruan YZ, Wang BB, et al. Effect of biofertilizer for suppressing *Fusarium* wilt disease of banana as well as enhancing microbial and chemical properties of soil under greenhouse trial[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 93: 111-119
- [6] Matthies C, Erhard HP, Drake HL. Effects of pH on the comparative culturability of fungi and bacteria from acidic and less acidic forest soils[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1997, 37(5): 335-343
- [7] Domínguez J, Negrín MA, Rodríguez CM. Evaluating soil sodium indices in soils of volcanic nature conducive or suppressive to *Fusarium* wilt of banana[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(4): 565-575
- [8] Du ZY, Fan XL. Results of banana *Fusarium* wilt control and banana reproduction in degraded orchard by use of modified lime nitrogen[J]. *Journal of Fruit Science*, 2008, 25(3): 373-377 (in Chinese)
杜志勇, 樊小林. 改性石灰氮防治香蕉枯萎病及其恢复香蕉生产的效果[J]. *果树学报*, 2008, 25(3): 373-377
- [9] Li J, Fan XL, Lin Z. Effect of alkaline fertilizer on diversity of soil microbial communities and occurrence of banana wilt disease[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 24(1): 212-219 (in Chinese)
李进, 樊小林, 蔺中. 碱性肥料对土壤微生物多样性及香蕉枯萎病发生的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(1): 212-219
- [10] Li J, Zhang LD, Liu F, et al. Effects of alkaline fertilizer on occurrence of banana wilt disease and soil microbial community[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2016, 22(2): 429-436 (in Chinese)
李进, 张立丹, 刘芳, 等. 碱性肥料对香蕉枯萎病发生及土壤微生物群落的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2016, 22(2): 429-436
- [11] Fan XL, Li J. Effectiveness of alkaline fertilizer on the control of banana *Fusarium* wilt and regulation of soil acidity in banana orchard[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(4): 938-946 (in Chinese)
樊小林, 李进. 碱性肥料调节香蕉园土壤酸度及防控香蕉枯萎病的效果[J]. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(4): 938-946
- [12] Li TT, Wu QX, Wang Y, et al. Application of proteomics for the investigation of the effect of initial pH on pathogenic mechanisms of *Fusarium proliferatum* on banana fruit[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2327
- [13] Fernandes TR, Segorbe D, Prusky D, et al. How alkalization

- drives fungal pathogenicity[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(11): e1006621
- [14] Fang XL, You MP, Barbetti MJ. Reduced severity and impact of *Fusarium* wilt on strawberry by manipulation of soil pH, soil organic amendments and crop rotation[J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 134(3): 619-629
- [15] Shen ZZ, Ruan YZ, Xue C, et al. Soils naturally suppressive to banana *Fusarium* wilt disease harbor unique bacterial communities[J]. Plant and Soil, 2015, 393(1/2): 21-33
- [16] Lan JL, Xiao RF, Liu B, et al. Growth kinetic model of *Fusarium oxysporum* under different pH[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2012, 20(11): 1532-1538 (in Chinese)
蓝江林, 肖荣凤, 刘波, 等. pH胁迫下尖孢镰刀菌生长动力学模型[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(11): 1532-1538
- [17] Shi W, Han Z, Wu AB, et al. Effect of temperature and pH on the growth and mycotoxins production of various *Fusarium* species[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(18): 117-122 (in Chinese)
师雯, 韩铮, 武爱波, 等. 温度和pH对不同镰刀菌生长及产毒的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(18): 117-122
- [18] Huang YH, Chen QG, Chi YL, et al. Effects of soil physi-chemical factors on growth and infection of banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(2): 30-34 (in Chinese)
黄永辉, 陈琦光, 迟远丽, 等. 土壤理化因素对香蕉枯萎病菌生长和侵染的影响[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(2): 30-34
- [19] Zhang CL, Lu ZF, Wang YQ. The impact of environmental factors to conidium's germination of *Fusarium oxysporum*. Schleber[J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 2008(2): 5-8 (in Chinese)
张彩玲, 陆宗芳, 王永全. 环境因素对尖孢镰刀菌分生孢子萌发的影响[J]. 甘肃农业科技, 2008(2): 5-8
- [20] Qin HC, Yang LY, Li SW, et al. Effect of nutrients in medium on growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing fusarial wilt on banana[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(12): 1852-1857 (in Chinese)
秦涵淳, 杨腊英, 李松伟, 等. 培养基营养成分对香蕉枯萎病尖孢镰刀菌生长的影响[J]. 热带作物学报, 2009, 30(12): 1852-1857
- [21] Peng HX, Sivasithamparam K, Turner DW. 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(10): 1363-1374
- [22] Paul GC, Kent CA, Thomas CR. Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1993, 42(1): 11-23
- [23] Mao C. Functional characterization of *FoMsb2* and *FoHog1* gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan Univeristy, 2014 (in Chinese)
毛超. 香蕉枯萎病菌*FoMsb2*和*FoHog1*基因功能初探[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2014
- [24] Mao C, Chen PY, Dai QD, et al. Biological characteristics of an *Hog1* MAPK homologous gene *FoHog1* knock-out mutant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11): 1267-1278 (in Chinese)
毛超, 陈平亚, 戴青冬, 等. 香蕉枯萎病菌中*Hog1* MAPK同源基因*FoHog1*敲除突变体的生物学特性[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1267-1278
- [25] Kong QQ, Ruan L, Liu DX, et al. Biological characteristics of *Fusarium* causing alfalfa root rot in Hebei Province[J]. Journal of China Agricultural University, 2018, 23(8): 59-76 (in Chinese)
孔前前, 阮柳, 刘东霞, 等. 河北苜蓿镰孢菌根腐病病原生物学特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(8): 59-76
- [26] Frans M, Aerts R, van Laethem S, et al. Environmental effects on growth and sporulation of *Fusarium* spp. causing internal fruit rot in bell pepper[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 149(4): 875-883
- [27] Zhu YJ, Che JM, Xiao RF, et al. Growth characteristics of *Fusarium oxysporum* Schl.[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(8): 373-376 (in Chinese)
朱育菁, 车建美, 肖荣凤, 等. 尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl.)的生长特性[J]. 中国农学通报, 2007, 23(8): 373-376
- [28] Merhej J, Richard-Forget F, Barreau C. The pH regulatory factor *Pac1* regulates *Tri* gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(3): 275-284