

香蕉种资源对相似穿孔线虫的抗性鉴定

符美英, 符尚娇, 芮凯, 陈绵才* (海南省农业科学院植物保护研究所, 海南省植物病虫害防控重点实验室, 海南海口 571100)

摘要 [目的]初步筛选出抗相似穿孔线虫的香蕉品种。[方法]通过在温室中采用盆栽接种方法,分别测定了13个香蕉种资源对相似穿孔线虫种群1和种群2的抗病性。[结果]接种种群1的处理中,云南粉蕉属高抗品种,皇帝蕉(AA)属抗病品种,有7个品种表现中抗;接种种群2的处理中,没有高抗或抗病品种,有9个香蕉品种表现中抗,巴西蕉(AAA)为高感品种。[结论]试验结果为寻找抗相似穿孔线虫的香蕉品种或基因奠定了基础。

关键词 香蕉种资源;相似穿孔线虫;抗性鉴定

中图分类号 S436.68⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)20-166-02

Resistant Identification of Banana Germplasm Resource against *Radopholus similis*

FU Mei-ying, FU Shang-jiao, RUI Kai, CHEN Mian-cai* (Institute of Plant Protection, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Hainan Key Laboratory for Control of Plant Diseases and Insect Pests, Haikou, Hainan 571100)

Abstract [Objective] The aim was to screen out banana germplasm resources with resistance to *Radopholus similis*. [Method] The resistance of 13 banana germplasm resources against *Radopholus similis* population 1 and population 2 were identified in greenhouse through pot inoculated method. [Result] The results show that 1, 1 and 7 varieties of 13 tested varieties were of high resistance, resistance and middle resistance to the process of population 1. Nine varieties of 13 tested varieties were middle resistance, and Musa AAA Giant Cavendish cv. Baxi was high susceptibility, and not found high resistance and resistance varieties to the process of population 2. [Conclusion] The results lay the basis for find banana varieties or gene with resistance to *Radopholus similis*.

Key words Banana germplasm resource; *Radopholus similis*; Resistant identification

相似穿孔线虫是1891年由Cobb在斐济香蕉根部发现的,并证实该线虫是香蕉的致病病原物,其经济重要性直到20世纪50~60年代才真正引起人们的重视,目前该线虫已广泛分布于世界各香蕉产区,并成为影响香蕉种植业最严重的病因之一。相似穿孔线虫是一种毁灭性的迁移性内寄生植物病原线虫,由于其危害严重性和经济重要性,是我国禁止进境的一类植物检疫性有害生物,也是国际上公认的极为重要的检疫性植物线虫,许多国家和地区将其列为危险性有害生物^[1]。相似穿孔线虫分布广,寄主范围非常广泛,尤其以热带经济作物如香蕉、胡椒、甘蔗、姜类、茄类和薯类作物以及红掌、孔雀竹芋等多种观赏植物极易被害^[2],对农作物的危害严重。近年来,随着我国大量进口花卉等繁殖材料,我国出入境检验检疫机构多次从入境观赏植物上截获相似穿孔线虫^[3]。

香蕉是一种世界第二大种植面积的热带水果,也是部分地区人们的主要粮食作物。随着农业的产业化发展,香蕉在海南省的种植面积越来越大,据调查显示,相似穿孔线虫已经传入大田为害香蕉,严重威胁海南的香蕉产业发展。依照国外相似穿孔线虫造成的损失计算,如果相似穿孔线虫扩散到大田引起大面积危害,则海南地区每年造成的经济损失将达亿元以上。香蕉被相似穿孔线虫感染后,根表面产生红褐色略凹陷的病斑,病根可见皮层红褐色病斑,随着病害的发展,根组织变黑腐烂。香蕉地上部表面表现为生产缓慢、叶片小、枯黄、坐果少、果实小^[4]。由于根系被破坏,固着能力

弱,香蕉株易摇摆或倒伏,香蕉相似穿孔线虫病通常称为香蕉穿孔根腐病、黑头病或衰退病^[5]。目前对相似穿孔线虫病尚没有很好的防治方法。选用抗病品种防治相似穿孔线虫是一种最科学有效的方法,可避免大量化学药剂使用所引起的人畜安全和环境污染等问题。为此,笔者对13个香蕉种资源进行了抗性鉴定,以期寻找抗相似穿孔线虫的香蕉品种或基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 供试的2个相似穿孔线虫种群的原寄主分别是孔雀竹芋(种群1)和巴西蕉(种群2),由海南省农业科学院植物保护研究所提供。供试香蕉种资源有13份,分别是巴西蕉(AAA)、粉蕉(ABB)、皇帝蕉(AA)、徐闻巴西蕉、青杆巴西蕉、长果巴西蕉、三亚粉蕉、云南粉蕉、尖峰岭大蕉、尖峰岭矮蕉、蒲兆中把香蕉(AAA)、泰国蕉、九架岭野蕉等,均由中国热带作物科学院品种资源研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 线虫培养 供试相似穿孔线虫经形态学鉴定后,用0.4%硫酸链霉素消毒液消毒2h,再用灭菌水漂洗3次,然后把消毒好的相似穿孔线虫接到有愈伤组织的胡萝卜片上,25℃下黑暗培养60d进行大量繁殖。

1.2.2 香蕉苗预处理 13个供试香蕉种资源组培袋装苗,在沙床上培育30d左右,待香蕉苗长出3~4张叶子时移栽到装有基质的1.2L塑料花盆中,所用土壤基质为沙土-有机土(2:1,m/m),并经过121℃、2h的高温灭菌处理,培养于大棚中隔离的水泥槽中,移栽7d后供试。

1.2.3 接种线虫 从培养线虫的胡萝卜愈伤组织中分离相似穿孔线虫,制备成浓度为100条/ml的线虫悬浮液。接种前先给香蕉苗浇水以湿润盆中的土,3h后用玻璃棒在香蕉苗的周围打5个孔,然后把线虫悬浮液分别从小孔处加入,

基金项目 公益性行业(农业)科研专项(201403075,201103018);国家自然科学基金项目(31260424)。

作者简介 符美英(1982-),女,海南海口人,助理研究员,从事植物线虫研究。*通讯作者,研究员,从事植物保护研究。

收稿日期 2015-05-19

每盆香蕉接种 500 头虫,覆盖好土。接种 3 d 内不浇水,以免线虫被水冲走。每个供试相似穿孔线虫种群接种 1 个供试香蕉品种为 1 个处理,每个处理 3 次重复,并设不接种线虫的香蕉为对照。

1.2.4 线虫病害调查。接线虫 90 d 后,对相似穿孔线虫病进行调查,检查香蕉根上的病斑,并进行病级分级。相似穿孔线虫病病级分级标准:0 级,根系无病斑;1 级,病斑面积占根系面积的 25%;3 级,病斑面积占根系面积的 50%;5 级,病斑面积占根系面积的 75%;7 级,病斑面积占根系面积的 75% 以上^[6]。相似穿孔线虫病病情指数 = Σ (各级病株数 × 相应级数值) × 100 / (调查总株数 × 7)。

1.2.4.1 根内线虫调查。植物根中线虫的分离采用过筛法。将整株根洗净后剪成 1 cm 左右的小段,放在搅拌机中加适量水搅碎,将碎根悬浮液通过孔径为 0.147 和 0.026 mm 的组合筛,用自来水反复适度冲洗,最后用洗瓶将孔径为 0.026 mm 筛网上的线虫冲洗到小烧杯中并定容至 20 ml。用移液管吸取 1 ml 线虫悬浮液放入培养皿中,在体视显微镜下计算虫量,根据洗液总体积得出洗液内总虫量(N_1)。将筛网内的搅碎植株根渣再用贝曼漏斗法分离其中的线虫,并计算虫量(N_2)。 N_1 与 N_2 之和即为植株根部总虫量。

1.2.4.2 土壤中线虫调查。将每一重复盆中土壤分别混匀后,各取 200 ml,采用贝曼漏斗法分离其中的线虫,对分离所得线虫进行计数,然后根据每盆总的土壤体积计算每盆土壤中的线虫总数。用贝曼漏斗分离 24 h 后,用培养皿接漏斗下端的水(含线虫)2 ml,体视显微镜下计数线虫数。每个重复的线虫总数为根内线虫总数加上土壤中线虫总数。

1.2.5 抗性评价。抗性评价标准参考王仁刚等^[7]的抗性评价标准:病情指数等于 0 为高抗(HR);病情指数小于 10 为抗(R);病情指数在 10 ~ 25 为中抗(MR);病情指数在 25 ~ 50 为低抗(LR);病情指数在 50 ~ 75 为感(S);病情指数在 75 ~ 100 为高感(HS)。

2 结果与分析

2.1 相似穿孔线虫为害香蕉症状 相似穿孔线虫为害香蕉时,主要是侵害香蕉根部,穿刺皮层,引起根部外表出现暗红色的条状病斑,毗邻的坏死斑融合,形成红褐色至黑色的条状病斑,根部皮层组织有凸起的总裂缝,将受害的根部纵切,可见皮层红褐色的病斑,随着病害的发展,根系生长衰弱,最终导致根部变黑腐烂。线虫虽不侵入根的中柱,但可穿通根皮层,形成空腔,并聚集在韧皮部、形成层内取食、发育繁殖,使根部死亡^[4]。

2.2 病害调查

2.2.1 线虫调查。通过对接种 90 d 后的香蕉根和根际土壤中的线虫进行分离检测,接种相似穿孔线虫种群 1 中,除云南粉蕉未分离到线虫外,其他 12 个香蕉品种中均分离到线虫,特别是巴西蕉(AAA)分离到的线虫为 912 头, R_f 值为 1.824。13 个香蕉品种中均能分离到相似穿孔线虫种群 2,特别是巴西蕉(AAA)分离到的线虫为 3 941 头, R_f 值高达 7.882。根据 Kaplan 寄主测试标准^[8],供试 13 个香蕉品种

中,相似穿孔线虫种群 1 对云南粉蕉和皇帝蕉(AA)不存在致病性,对巴西蕉(AAA)和泰国蕉存在中等致病性,对其他 9 个香蕉品种存在弱致病性。相似穿孔线虫种群 2 对云南粉蕉和蒲兆中把香蕉不存在致病性,对巴西蕉的 R_f 值高达 7.882,存在强致病性,对泰国蕉存在中等致病性,对其他 10 个香蕉品种均存在弱致病性(表 1)。

表 1 相似穿孔线虫对 13 份香蕉种质资源的致病性

香蕉品种	种群 1(原寄主:孔雀竹芋)		种群 2(原寄主:巴西蕉)	
	总虫数//头	R_f 值	总虫数//头	R_f 值
巴西蕉(AAA)	912	1.824	3 941	7.882
粉蕉(ABB)	62	0.124	113	0.226
皇帝蕉(AA)	2	0.004	34	0.068
徐闻巴西蕉	338	0.676	213	0.426
青杆巴西蕉	316	0.632	279	0.558
长果巴西蕉	125	0.250	331	0.662
三亚粉蕉	76	0.152	87	0.174
云南粉蕉	0	0	15	0.030
尖峰岭大蕉	189	0.378	97	0.194
尖峰岭矮蕉	26	0.052	30	0.060
蒲兆中把香蕉	110	0.220	14	0.028
泰国蕉	577	1.154	781	1.562
九架岭野蕉	156	0.312	67	0.134

注: R_f 表示最终分离虫数/接种虫数, R_f 值大于 0.05 时表示存在致病性。

2.2.2 根部病情调查。接虫 90 d 后,将整棵香蕉拔出,调查根部病斑,计算病情指数,分析抗病情况。结果表明,接种相似穿孔线虫种群 1 的香蕉病情指数最低的是云南粉蕉,病情指数为 0,抗病情况为高抗;其次是皇帝蕉(AA)的病情指数为 4.76,抗病情况为抗病;显示低抗的有徐闻巴西蕉、青杆巴西蕉和泰国蕉;病情指数最高的是巴西蕉(AAA),为 52.38,抗病情况为感病;而其余的 7 个香蕉品种均为中抗品种。接种相似穿孔线虫种群 2 的香蕉,病情指数最高的是巴西蕉(AAA),病情指数高达 80.95,抗病情况为高感;青杆巴西蕉、长果巴西蕉和泰国蕉为低抗品种,其余的 9 个香蕉品种均属于中抗品种(表 2)。

表 2 2 个相似穿孔线虫种群接种 13 个香蕉品种的致病性

香蕉品种	种群 1(原寄主:孔雀竹芋)		种群 2(原寄主:巴西蕉)	
	病情指数	抗病情况	病情指数	抗病情况
巴西蕉(AAA)	52.38	S	80.95	HS
粉蕉(ABB)	14.29	MR	23.81	MR
皇帝蕉(AA)	4.76	R	14.29	MR
徐闻巴西蕉	33.33	LR	23.81	MR
青杆巴西蕉	33.33	LR	33.33	LR
长果巴西蕉	23.81	MR	33.33	LR
三亚粉蕉	14.29	MR	14.29	MR
云南粉蕉	0	HR	14.29	MR
尖峰岭大蕉	23.81	MR	23.81	MR
尖峰岭矮蕉	14.29	MR	14.29	MR
蒲兆中把香蕉	23.81	MR	14.29	MR
泰国蕉	42.86	LR	42.86	LR
九架岭野蕉	23.81	MR	14.29	MR

破坏率为60%；拮抗菌的破坏率达50%以上。24 h后, BL-36、BL-33的冻滴率均为10%，破坏率为90%；BL-36、BL-33等3个拮抗菌对冰核蛋白的破坏率随着时间的延长而提高。BL-31、BL-35破坏冰核蛋白能力均随着时间的延长而有所下降。综上所述, BL-36在5和24 h的破坏能力都是最好的。

3 结论与讨论

针对诱发枇杷霜冻害的冰核细菌,从枇杷根际土壤分离到55个拮抗菌,说明自然界普遍存在着INA细菌拮抗菌。根据增殖速度快、抑菌带宽且清晰程度高的拮抗菌株筛选要求,选出BL-36、BL-33、BL-27等9个强拮抗菌菌株。对INA细菌杀菌能力测定发现处理5和24 h后, BL-36的杀菌能力较好且稳定;用VaLi法测定破坏冰核蛋白能力发现BL-36在5和24 h破坏冰核活性能力都是最好, BL-33次之。拮抗菌BL-36在争夺生存空间和营养、杀灭冰核活性细菌、降低冰核蛋白数量3个方面综合效果最佳。

拮抗菌对INA细菌主要通过争夺生存空间和营养来抑制冰核细菌的数量,相应降低冰蛋白的数量来达到抑菌防御霜冻的目的,由于生防菌增殖和扩展要有一个过程,因此在实际生产中,应与药剂复配使用,才能更好地防除冰核细菌,减轻枇杷霜冻害。

参考文献

- [1] 翁志辉. 浅析福建省枇杷幼果的冻害情况及预防与补救措施[J]. 福建农业科技, 2005(1): 16-18.
- [2] 孙福在, 韦建福. 我国冰核活性细菌的优势种类调查与研究[J]. 生态学报, 1996, 16(6): 618-623.
- [3] 孙福在, 何礼远. 冰核细菌与植物霜冻研究概况[J]. 植物保护, 1989, 15

(4): 41-43.

- [4] LINDOW S E, HIRANO S S, BARCHET W R, et al. Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury[J]. Plant Physiology, 1982, 70: 1090-1093.
- [5] 王慧, 彭建平, 方树民, 等. 枇杷幼果中定值的冰核细菌与冻害关系[J]. 植物保护, 2008, 34(2): 43-46.
- [6] 朱红, 孙福在, 何礼远. 诱发农作物霜冻害的冰核细菌冰核活性研究[C]//首届全国中青所植物学术讨论会优秀论文集. 北京: 中国科学技术出版社, 1991: 191-197.
- [7] MAKI LR, GALYON E L, CHANG CHIEN M. Ice nucleation induced by pseudomonas syringae[J]. Appl Microbiol, 1974, 28(3): 456-460.
- [8] LINDOW S E, AMY D C, UPPER C D. Erwinia herbicola: A bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn[J]. Phytopathology, 1978, 68: 523-527.
- [9] BURKE M J, LINDOW S E. Surface properties and size for the ice nucleation site in ice nucleation active bacteria: Theoretical considerations[J]. Cryobiology, 1990, 27: 80-84.
- [10] BIGG E K. The supercooling of water[J]. Proc Soc, 1953, 66: 686-694.
- [11] 高桥幸吉. 冰核活性细菌的研究现状与实用化[J]. 冷冻(日), 1987, 62: 883-890.
- [12] 孙福在, 朱红, 何礼远. 影响冰核菌成冰核活性的因素研究[J]. 中国农业科学, 1991, 24(3): 57-64.
- [13] 孙福在, 朱红, 何礼远. 药剂防治玉米霜冻的初步研究[J]. 黑龙江农业科学, 1991(3): 24-29.
- [14] 刘耕春, 王万立, 郝永娟, 等. 冰核细菌防治技术初步研究[J]. 天津轻工业学院学报, 2000(12): 47-51.
- [15] 岳思君, 王文举. 冰核细菌研究进展及其在防霜技术中的应用[J]. 农业科学研究, 2005, 26(2): 66-70.
- [16] 孙福在, 赵廷昌. 几种生防菌防治植物细菌性病害和霜冻的效果测定[J]. 中国微生态学杂志, 1998, 10(S1): 17-21.
- [17] LINDOW S E. Erwinia herbicola: A bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn[J]. Phytopathology, 1978, 68: 523-527.
- [18] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 46.
- [19] 孙福在, 赵廷昌, 牟丰盛, 等. 生防菌和药剂除冰核细菌防御玉米霜冻研究[J]. 自然灾害学报, 2003, 12(4): 115-119.

(上接第167页)

3 结论与讨论

选来自不同原始寄主的2个相似穿孔线虫种群对13个香蕉种资源进行抗性鉴定。结果表明, 接种相似穿孔线虫种群1时, 云南粉蕉表现出高抗; 有7个香蕉品种均为中抗; 而巴西蕉(AAA)表现为感病。这与相似穿孔线虫种群1对云南粉蕉不存在致病性, 对巴西蕉(AAA)存在中等致病性基本相符。接种相似穿孔线虫种群2时, 13个香蕉品种中没有高抗品种, 有9个香蕉品种均属于中抗品种; 巴西蕉(AAA)表现为高感。这与相似穿孔线虫种群2对巴西蕉(AAA)存在强致病力一致。由此可见, 不同香蕉品种对同一相似穿孔线虫种群表现出的抗性差异很大, 而对来源不同的2个相似穿孔线虫种群, 同一香蕉品种表现出的抗性也存在差异。

到目前为止, 国内还没有相似穿孔线虫病害的分级评价标准, 该研究是参考农药田间药效试验准则(一)中的“杀线虫剂防治根部线虫病”, 同时在抗感性判断上也没有一个统一的标准。鉴于目前国内香蕉品种对相似穿孔线虫抗性鉴定还没有统一的方法, 该研究通过试验证明相似穿孔线虫对香蕉的致病性可以作为香蕉抗感性的一个指标, 结合香蕉根部病斑的病情指数决定抗感性更准确。至于制定致病性的

分级和抗感性的分级标准, 还有待于研究和借鉴国外相关方法。

香蕉对相似穿孔线虫的抗性品种的筛选国内还没有报道。该研究的目的是通过相似穿孔线虫对香蕉种资源的致病性和病害表现出的病情指数以找到抗性表现较好的品种或抗源。由于收集的香蕉种资源数量有限, 所以试验筛选出的抗病品种很少。

参考文献

- [1] 陈淳, 谢辉, 蔚应俊, 等. 香蕉穿孔线虫培养技术及其种群繁殖力研究[J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(1): 61-64.
- [2] 全国农业技术推广服务中心. 植物检疫性有害生物图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 31-33.
- [3] 周国梁, 陈晨, 戚龙君, 等. 相似穿孔线虫的分类鉴定及其研究进展[J]. 植物检疫, 2005(6): 366-369.
- [4] MARIN D H, SUTTON T B, BARKER K. Dissemination of banana in latin america and the caribbean and its relationship to the occurrence of *Radopholus similis*[J]. Plant Disease, 1998, 82(9): 964-974.
- [5] 彭德良, 谢丙炎. 外来入侵生物香蕉相似穿孔线虫及其发生分布[J]. 植物保护, 2004, 30(5): 83-87.
- [6] 农业部农药检定所. GB/T17980. 38—2000, 农药, 田间药效试验准则(一)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 156-160.
- [7] 王仁刚, 李莉, 杨春元, 等. 贵州烤烟品种资源对根结线虫的抗性鉴定[J]. 贵州农业科学, 2007, 35(6): 57-59.
- [8] 蔚应俊, 谢辉, 斐艳艳, 等. 传入中国的香蕉穿孔线虫部分种群致病型测定[J]. 中国线虫学研究, 2008(2): 116-122.