

丛枝菌根真菌

对黄瓜苗期枯萎病的防效机制研究

CONGZHIJUNGENZHENJUN

DUHUANGGUAMIAOQIKUWEIBINGDEFANGXIAOJIZHIYANJIU

王倡宪 著

丛枝菌根真菌

对黄瓜苗期枯萎病的防效机制研究

王倡宪 著

图书在版编目(CIP)数据

丛枝菌根真菌对黄瓜苗期枯萎病的防效机制研究 / 王倡宪著.
—哈尔滨:黑龙江大学出版社, 2007. 11
(黑龙江大学学术文库)
ISBN 978-7-81129-029-5

I. 丛… II. 王… III. 丛枝菌属—作用—黄瓜—枯萎病—
防治—研究 IV. S436.421.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 180091 号

责任编辑 赵丽华
封面设计 王 刚

丛枝菌根真菌对黄瓜苗期枯萎病的防效机制研究

Congzhi Jungen Zhenjun Dui Huanggua Miaoqi Kuweibing De Fangxiao Jizhi Yanjiu
王倡宪 著

出版发行 黑龙江大学出版社
地 址 哈尔滨市南岗区学府路 74 号 邮编 150080
电 话 0451-86608666
经 销 新华书店
印 刷 哈尔滨海天印刷设计有限公司
版 次 2007 年 11 月 第 1 版
印 次 2007 年 11 月 第 1 次印刷
开 本 880×1230 毫米 1/32
印 张 4
字 数 96 千
书 号 ISBN 978-7-81129-029-5/S·1

定 价 15.10 元

凡购买黑龙江大学出版社图书,如有质量问题请与本社发行部联系调换
版权所有 侵权必究

丛枝菌根真菌是一类广泛分布于农田生态系统中的真菌类型,该类真菌可以和包括黄瓜在内的约80%的植物根系形成互惠共生体——菌根。菌根共生体的形成对于贫磷土壤上寄主营养水平的改善、各种生物和非生物逆境下寄主抗性的提高都发挥着重要作用。本书结合黄瓜生产中的育苗和移苗环节,就丛枝菌根真菌对黄瓜苗期枯萎病的防效及其抗性机制进行了初步研究。

本书可作为农林、师范等高等院校植物保护专业本科生、研究生和教师,以及植物保护相关领域的科研院所的科研人员从事科研与教学的参考用书。

王倡宪，女，1974年9月生，内蒙古包头人，现任教于黑龙江大学农学院。1998年于内蒙古民族大学获得农学学士学位。2004年于中国农业大学攻读博士学位获得农学博士学位，主要从事植物营养学方面的研究工作。目前主持黑龙江省教育厅科学技术研究项目——园艺作物生物菌剂资源的开发研究，曾在国际学术期刊及国内期刊上发表高水平论文数篇。

前 言

设施蔬菜生产是我国农业生产的重要组成部分,也是城乡的一大支柱产业,而且随着蔬菜工厂化育苗技术的发展,设施蔬菜的栽培面积有逐年增加的趋势。毋庸置疑,设施蔬菜生产不仅具有较高的增产增收效益,同时,还对缓解淡季蔬菜供应紧张的状况起着重要作用。但是设施条件下特殊的生态环境加剧了病虫害的滋生与积累,由土壤生物病原菌和植物寄生性线虫引发的蔬菜病虫害一直是限制蔬菜产量的直接原因。

黄瓜作为我国设施栽培中的主要蔬菜种类之一,极易感病。由半知菌亚门镰刀菌属尖孢镰刀菌引发的黄瓜枯萎病已成为限制黄瓜产量的主要障碍之一。目前,黄瓜枯萎病的防治措施主要有嫁接、选育抗病品种、轮作及使用农药。其中,嫁接方法因技术本身的难度和苗木成活率较低而在生产上受到一定限制,选育抗病品种则需要较长的周期,另外,轮作措施的实施在很大程度上受市场经济利益的调控。因此,现阶段黄瓜枯萎病的防治主要依靠化学农药和杀菌剂。高浓度农药的频繁使用引发的地下水污染、农产品质量下降、农药残毒对人类健康的危害及各种害虫天敌的灭绝使农业生产面临着新的困境。

丛枝菌根真菌是广泛分布于各种类型土壤中的一类特殊微生物,它可以和地球上约 90% 维管植物的根系形成互惠共生体——菌根。菌根共生体建成后,真菌借助其外生菌丝在土壤中形成庞大的菌丝网络,帮助寄主从贫磷土壤中吸收营养,如 P、Zn 和 Cu 等在土壤中移动性较差的矿质养分,改善寄主的营养水平。从这个意义上来说,丛枝菌根真菌是农业生产中的一种新型生物肥料;另外,丛枝菌根真菌对于由疫霉菌属、腐霉菌属、丝核菌属、核盘菌属、

轮枝菌属等病原真菌以及线虫引发的植物根腐病、维管束病害也表现出了良好的防效。

目前,我国在丛枝菌根真菌抗病方面的研究主要集中于灭菌和盆栽条件下丛枝菌根真菌对苗期植株病害的防效,而对于抗性机制的研究极少。因此,作者探索性地将农业生态系统中丰富的丛枝菌根真菌资源引入设施黄瓜生产中,就丛枝菌根真菌对黄瓜枯萎病的防效及其防效机制进行了初步研究,以全面了解丛枝菌根真菌的生防潜力,为丛枝菌根真菌资源在设施蔬菜生产中的推广与应用奠定必要的理论基础。

本书由黑龙江大学专项资金资助出版,感谢我的导师李晓林教授和冯固教授的悉心指导与教诲。由于作者水平有限,书中难免有不妥之处,希望广大读者批评指正。

作 者

2007 年 10 月

目 录

1 丛枝菌根真菌与植物病虫害	1
1.1 连作障碍与植物病虫害	1
1.2 设施黄瓜栽培病虫害及其防治	3
1.3 丛枝菌根真菌与园艺作物病虫害	6
1.4 丛枝菌根真菌提高植物抗(耐)病性的机理	16
2 丛枝菌根真菌对黄瓜的生长效应及 对枯萎病的防效	34
2.1 育苗环节丛枝菌根真菌对黄瓜的生长效应	35
2.2 移苗后丛枝菌根真菌对黄瓜的生长效应	43
2.3 丛枝菌根真菌对黄瓜苗期枯萎病的防效	54
3 不同磷浓度条件下丛枝菌根真菌的抗病效应	63
3.1 丛枝菌根真菌在不同磷浓度下的促生 及抗病效应	64
3.2 丛枝菌根真菌对不同磷浓度下病株叶片中 多酚氧化酶和过氧化物酶活性的影响	67
4 丛枝菌根真菌与尖孢镰刀菌黄瓜专化型 对植株生长及生理生化代谢的影响	73

4.1 丛枝菌根真菌与尖孢镰刀菌黄瓜专化型	
对植株根系生理代谢的影响	74
4.2 丛枝菌根真菌与尖孢镰刀菌黄瓜专化型对植株过氧化物	
酶和多酚氧化酶活性及次生代谢的影响	83
4.3 丛枝菌根真菌与尖孢镰刀菌黄瓜专化型	
对植株根系防御酶体系诱导的影响	93
参考文献	104
附录 I 缩略词	118
附录 II 本书研究技术路线	119
后记	121

1 丛枝菌根真菌与植物病虫害

1.1 连作障碍与植物病虫害

连作障碍,即在同一土壤中连续栽培同种或同科的作物时,用正常的栽培措施进行管理也会发生长势变弱、产量和品质下降的现象。作物连作现象在世界各地普遍存在,在亚洲,日本、中国和印度作物连作面积较大,其中又以谷类作物和蔬菜连作最为严重,部分林木再植问题也较为突出;在大洋洲(以澳大利亚为主)、美洲和欧洲,主要以谷类作物和牧草的连作障碍较为严重。连作障碍是一个古老而又现实的问题,在我国尤以可控环境条件下的连作障碍最为突出。毋庸置疑,可控环境条件下,通过人为调控特殊的生态环境可延长蔬菜的生产季节,提高蔬菜产量,不仅具有较高的增产增收效益,同时,还对缓解淡季蔬菜的紧张供应具有重要意义。尤其是在目前的市场经济环境下,受经济利益的驱动,可控设施条件主要用于栽培经济效益相对较高的作物种类。但是由于可控条件下特殊的生态环境,加之高集约化的生产程度,高复种指数,肥料施用不合理,反季节栽培等特点,使得其在利用到一定年限后,土壤的理化及生物学性状均发生了很大变化,各种病原大量滋生、积累,导致植物病害发生频繁,连作障碍加剧,这在一定程度上不利于可控环境条件下栽培设施的可持续利用和农业的可持续发展。连作障碍是一种复杂的现象,引起连作障碍的主要因素包括土传病虫害、土壤理化性质的恶化及植物的自毒作用^[1]。其中,

土壤生物病原菌和植物寄生性线虫是引发连作障碍的直接原因^[2]。吴凤芝等^[3]研究了保护地条件下分别连作3年和18年黄瓜后土壤中真菌区系变化情况,结果表明,连作18年的土壤其表层和耕层中的核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)等病原菌都明显积累。赵凤艳等^[4]通过对大棚菜地土壤理化性状进行分析认为,土壤长期连作造成了土壤盐分积累、养分比例失调、土壤通透性差等不利于植物及土壤中各种生物生长发育的“逆境”,这是导致土壤性质恶化的主要原因。在这种条件下,土壤中的真菌数量和种类会相应地减少,而部分土生病原菌的数量因植物病害的连年加重也会相对积累。

能够引发植物病害的病原种类很多,根据其性质可以分为生物因素和非生物因素两大类。由生物因素导致的病害称为侵染性病害,而非生物因素导致的病害称为非侵染性病害,也称为生理病害。此外,生物性病原中还包括植物自身由于先天发育不全,或带有某种异常的遗传因子,而显示出的遗传性病变或生理性病变,它与外界环境因素无关,也无外来生物参与,这类遗传性病害也属于生物因素的非侵染性病害。

生物性病原均为具有生活力的生物,主要包括动物界的线虫(nematode)、植物界的寄生性植物(parasitic plant)、真菌界的真菌(fungi)、原核生物界的细菌(bacteria)和植原体(phytoplasma),还有非细胞型生物,如病毒(virus)和类病毒(viroid)等,它们都被称为病原生物或病原物(pathogen)。病原物的生活依附于植物,这种习性即为病原物的寄生习性。因此,病原物也被称为寄生物(parasite),它所依附的植物称为寄主植物,简称寄主(host)。

而非侵染性病害主要是由外界不良环境条件引发的,如极端的温度、湿度,不适宜的光照条件、不良的营养条件及化学毒害等。

可控环境条件下,约有80%以上的病害是由真菌引起的,真菌引起的病害不但种类多,而且危害性也大。而土壤的次生盐渍化

常常会导致植物的非侵染性病害,即在设施栽培的特殊生态环境条件下,由于肥料施用不合理,加之较为封闭的设施结构,缺乏雨水淋溶,致使盐分在土壤表层积累。久而久之,导致土壤板结,土壤理化性状恶化,植物对水分和养分的吸收受阻,根系发育不良,易引发盐害及病害;同时,一些植物通过地上部淋溶、根系分泌和植株残茬等途径释放一些对同茬或下茬植物生长发育有抑制作用的物质,由此而产生植物的自毒作用。

总之,由病原菌的逐年滋生、积累、蔓延而引发的侵染性病害及土壤的次生盐渍化所造成的非侵染性病害是可控环境条件下因植物连作而产生的两个亟待解决的问题。

1.2 设施黄瓜栽培病虫害及其防治

黄瓜是设施栽培中的主要蔬菜种类之一,它在我国蔬菜的周年供应中占有重要地位,尤其是在北方的冬春季节。据统计^[5],截至2002年底,我国黄瓜的栽培面积已达 $1.253 \times 10^6 \text{ hm}^2$,比1980年扩大了3倍,占全国蔬菜种植面积的10%左右,其中以日光温室为代表的保护地栽培占蔬菜种植面积的42%左右,黄瓜栽培面积已占到保护地蔬菜栽培面积的80%以上。因此,保护地条件下黄瓜的连作障碍也变得越来越严重。梁银丽等^[6]研究了不同连作年限的土壤对黄瓜植株的光合速率、生长特性和产量的影响,结果表明:黄瓜连作4年以后开始表现出明显的生理障碍,即植株光合速率、株高、叶片数量和产量明显下降,这说明黄瓜极不耐连作。同时,黄瓜也是保护地生产中极易感病的蔬菜品种之一。据不完全统计,黄瓜栽培中有50余种病害^[7],常年发生并造成较严重损失的危害有10余种,如霜霉病、疫病、疽病、白粉病、黑心病和细菌性角斑病等。黄瓜枯萎病是保护地黄瓜自根栽培的毁灭性病害。该病的常年发病率一般为10%~30%,严重时可达80%~90%,甚至

使黄瓜绝收。

黄瓜枯萎病又叫蔓割病,是由半知菌亚门镰刀菌属的尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)引发的土传病害。该专化型致病菌为土壤习居菌,它能以厚垣孢子的形式在土壤中或病残体中存活5~6年。侵染及致病机制为:分生孢子在植株幼根表面萌发,产生菌丝,菌丝通过根部伤口和侧根分枝处的裂缝和茎基部裂口处侵入;病原菌侵入后,在薄壁细胞间生长扩展,然后进入维管束,不断生长的菌丝逐渐堵塞导管,同时病原菌分泌果胶酶和纤维素酶刺激相邻细胞产生胶状物加速了导管的堵塞,从而导致植株体内养分和水分的运输受阻,最终表现为植株萎蔫;同时,侵入细胞后的病原菌能分泌镰刀菌毒素,使植株的正常生长代谢受到干扰,主要表现为氧化酶体系异常活跃,毒性较强的醌类物质大量积累,致使细胞中毒死亡,植株导管褐变。黄瓜枯萎病在黄瓜的整个生育期均可发病,但以结瓜期最为严重。苗期病害症状表现为:茎基部缢缩变褐色,子叶萎蔫,最后幼苗枯死,剖开病株茎部,可见导管变褐。成株期病害表现为:植株下部叶片首先褪绿变黄,逐渐向上发展,中午高温时叶片萎蔫,早晚温度低时又逐渐恢复正常,如此持续几天后,萎蔫越来越严重,最后不再恢复,整个植株枯死。自1925年首次报道在美国佛罗里达州发现黄瓜枯萎病以来,在我国各地都有不同程度地发生,目前它已成为影响黄瓜生产的主要障碍。

另外,黄瓜对根结线虫也极为敏感。线虫主要通过黄瓜的根部进行侵染,侵染后在侧根上可以看到串珠状的瘤状物,起初为黄白色,表面光滑,后期变为褐色,根部肿大粗糙变形。其致病机理为:根结线虫的侵入使根组织正常的分化、生理代谢及水分和养料的运输受阻,导致植株长势变弱,表现为植株叶片瘦小皱缩,开花延迟甚至不开花,果少而小,干旱时易萎蔫枯死,同时根结线虫侵染造成的伤口有利于其他病原的侵入,这种复合侵染会使病害加

重。根结线虫自 1855 年被报道以来,目前世界上已有 70 多个种,其中为害黄瓜的主要有南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、花生根结线虫(*Meloidogyne arenaria*)、北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*)和爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanic*),我国北方保护地以南方根结线虫为主。

现阶段,黄瓜病害的防治主要还是依赖于化学农药和杀菌剂。据统计,一般每公顷需使用农药 100 ~ 150 kg,高者可达 300 kg 以上^[8]。不可否认,肥料和农药历来是农业丰产的重要保证,化肥和农药的诞生使农业生产水平发生了飞跃。然而,随之而来的土壤板结、地下水污染、农产品质量下降、农药残毒对人类健康的危害及各种害虫天敌的灭绝使农业生产面临着新的困境,这些世界各国普遍关注的焦点问题带动了有机农业的兴起与发展。

有机农业是以生物学、生态学为理论指导,以可持续发展为目标,实现经济、社会和生态环境三大功能的完美结合。它是一种在生产中不使用化学合成肥料、农药、除草剂、生长调节剂以及转基因技术的农业生产体系,与常规农业的根本区别在于土壤培肥和病虫害防治技术的不同。其中,病虫害防治要求生产者从作物病虫害的生态系统出发,综合应用各种农业的、生物的和物理的防治措施,创造能够抑制病虫害滋生,而有利于各类害虫自然天敌繁衍的生态环境,保证农业生态系统的平衡和生物多样性,同时,尽可能地减少各类病虫害所造成的损失。

随着国内外有机农业的迅速发展和人类对“绿色食品”的渴望,绿色食品生产过程中化学肥料、化学农药和其他化学物质的用量必将受到一定的限制^[9]。由此,因地制宜地采取无公害防治策略,经济、安全、有效地防治黄瓜病害,确保其优质高产,实现黄瓜的可持续栽培是十分必要的。而生物防治恰恰是对生物资源的精准管理,并将其定向于植物病原菌防治,该技术可在减少化学制品投入的同时兼顾农业的可持续发展。因此,充分开发和利用某些

生物或生物代谢产物作为生物肥料和生物农药应用于农业生产将是 21 世纪农业的第一选择^[10]。

1.3 丛枝菌根真菌与园艺作物病虫害

农业生产中,可用于生物防治的生防菌种类繁多,应用较为广泛的有真菌、细菌、放线菌和病毒等。生物防治的原理主要有拮抗作用、竞争作用、重寄生作用、捕食作用、交互保护作用及植物诱导抗病性等。目前研究较多的具有生防作用的真菌主要有木霉菌、毛壳菌、酵母菌、淡紫拟青霉菌、厚壁孢子轮枝菌及菌根真菌;细菌主要有芽孢杆菌、假单胞杆菌等植物促生菌、放射性土壤农杆菌和巴氏杆菌等;放线菌主要有链霉菌及其变种;病毒主要有病毒的弱毒株系、病原菌的无致病力突变株。

丛枝菌根真菌 (Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF, 后文简称“AM 真菌”)因其普遍存在于自然及农业陆地生态系统中而极具应用前景^[11]。除十字花科、黍科、石竹科、荨麻科、莎草科、灯心草科和蓼科中的全部或部分植物外,AM 真菌几乎可以和陆地生态系统中所有的植物形成互惠共生体——丛枝菌根,它是迄今为止所了解的可以和植物形成共生联合体中最为普遍的一种。

严格来讲,植物并没有真正意义上的根系而只有“菌根”,它是土壤居群中具有植物根系和微生物特性的活跃的、有生命的成员之一^[12]。在一个发育完善的菌根共生体中,可以辨别出属于真菌的两个不同组成部分——内生菌丝和外生菌丝。其中,内生菌丝侵入植物的根皮层,进而与皮层细胞发生密切联系,而外生菌丝则在土壤中不断发展,形成庞大的菌丝网络,它相当于在植物根系与土壤间建立的一座桥梁,可以帮助植物从土壤中吸收营养(如磷、锌、铜)、与根际微生物群落及土壤中各组成成分发生相互作用。正是由于 AM 真菌的这些特性,加之其分布的广泛性,为将 AM 真

菌作为一种生防菌应用于农业生产实践提供了可能。结合传统农业对化肥和杀虫剂的高度依赖和农业生产成本的高投入特点,高效低投入的生态农业可通过开发和利用丰富的 AM 真菌资源来实现^[13]。

AM 真菌对植物真菌病害作用的研究始于 20 世纪 60 年代,由 Gerdemann 和他的学生率先开始在贫磷土壤上研究 AM 真菌的外生菌丝对植物养分吸收的作用^[14],研究发现,AM 真菌对植物生长表现出良好的促生效应。由此,各国科研工作者开始探索 AM 真菌对植物病虫害的防效。在早期研究中,AM 真菌对根串珠霉(*Thielaviopsis basicola*)、根结线虫等病虫害所表现出的明显抗性激发了研究者们极大的兴趣。至今,它依然是世界各国菌根研究爱好者所热衷的研究方向之一。

AM 真菌在提高植物抗病性上所表现出的积极作用由 Safir^[15]首次发现,研究中接种摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)能降低由洋葱粉色根腐病菌(*Pyrenochaeta terrestris*)引起的洋葱根系红腐病的发病率。随后,各国学者就 AM 真菌对植物病虫害的防效,对不同的病原菌种类及种类繁多的园艺作物展开了极为广泛与深入的研究。综合已发表的有关 AM 真菌与植物病害关系的文献资料,大多数研究结果表明,AM 真菌可减轻由疫霉菌属(*Phytophthora*)、丝囊霉属(*Aphanomyces*)、腐霉属(*Pythium*)、丝核菌属(*Rhizoctonia*)、核盘菌属(*Sclerotium*)及轮枝菌属(*Verticillium*)等土传病原真菌引起的植物根腐病、维管束病害^[16-17]及由根结线虫(nematode),如南方根结线虫(*Meloidogyne*)、根腐线虫(*Pratylenchus*)、穿孔线虫(*Rotylenchulus*)等对根系造成的损伤^[18-19]。

但是 AM 真菌的生防效应很难一概而论,因为它受诸多因素的影响,其中包括 AM 真菌的菌株、病原菌的毒力及其侵染潜力、寄主、生长基质及外界环境条件等几个重要的影响因素。Habte 等^[20]的研究表明,在 AM 真菌对寄主侵染水平相同的条件下,AM

真菌对寄主因病原侵入而造成损伤的减轻程度取决于共生体中 AM 真菌菌株种类。由此可见,合理利用 AM 真菌资源的一个前提是对一些可保护特定寄主免受目标病原侵害的 AM 真菌基因型进行分离与鉴定。同样,寄主的基因型不同,其对 AM 真菌的生长促进作用及生防作用所表现出的反应也会有一定差异,这说明,寄主的基因型在寄主 - AM 真菌 - 病原菌三者组成的联合体中起到了重要的支柱作用,它关系到病原及互惠共生体中 AM 真菌的特性。Mark 等^[21]的研究证实,不同的 AM 真菌与病原间的相互作用会因寄主的基因型而发生变化。

总之,AM 真菌对植物抗(耐)病性的诱导效果与病原菌侵入前菌根共生体的建成状况密切相关。Cordier 等^[22]在研究菌根化番茄对晚疫病抗性时发现,只有在菌根共生体发育完善的条件下,AM 真菌才显示出较显著的防效;Slezacek 等^[23]的研究结果同样表明,AM 真菌 *G. mosseae* 与植物根系形成良好的共生体后可抵抗由根腐丝囊霉(*Aphanomyces euteiches*)所导致的根腐病害。由此可见,AM 真菌可通过建成功能完善的共生体来防御病原对植物的伤害。然而也有研究表明,AM 真菌对根结线虫的防效与菌根侵染率无关^[18,20]。Calvet 等^[24]在进行柏树砧木的微繁试验中发现,AM 真菌和寄生线虫占据植物根皮层的相同位点,并且在丛枝及泡囊的附近同时有线虫虫卵及成虫的存在。但从长期效果来看,AM 真菌可抑制根结线虫在寄主根中的繁殖,而 AM 真菌对根系的侵染却不受影响^[25-26]。下面将对国内外有关 AM 真菌与植物真菌病害及根结线虫病害的研究进行详细介绍。

1.3.1 丛枝菌根真菌与园艺作物真菌病害

设施环境条件下,园艺作物真菌病害发生频繁且危害严重,而 AM 真菌可以和包括黄瓜在内的大多数园艺作物形成互惠共生体,联合体的形成为减缓由习居土传病原菌引发的根茎部病害提供了