

伴生小麦对西瓜生长及 枯萎病抗性调控研究

徐伟慧 王芳 编著



中国质检出版社
中国标准出版社

伴生小麦对西瓜生长及 枯萎病抗性调控研究

徐伟慧 王芳 编著

中国质检出版社
中国标准出版社

北 京

图书在版编目(CIP)数据

伴生小麦对西瓜生长及枯萎病抗性调控研究/徐伟慧, 王芳编著. —北京:中国质检出版社, 2017. 8

ISBN 978-7-5026-4442-0

I. ①伴… II. ①徐… ②王… III. ①小麦—作用—西瓜—套作—枯萎病—防治—研究 IV. ①S436.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 140836 号

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)

北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

北京京华虎彩印刷有限公司印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/32 印张 9.625 字数 251 千字

2017 年 8 月第一版 2017 年 8 月第一次印刷

*

定价: 39.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68510107

前 言

西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] 是最忌连作的作物之一,通常轮作年限为 5~6 年。近年来设施西瓜栽培面积不断扩大,连作栽培不可避免,因此常发生植株生育迟缓、生长势下降、品质变劣、土传病原菌数量和种类大幅增加、枯萎病大量发生等连作障碍现象(李月林, 2013)。对此,国内外学者开展了诸如选用抗重茬品种(郭军等, 2009)、施用有机肥(李双喜等, 2012)、嫁接栽培(郭军等, 2009)、施用生防菌株(Ling et al., 2011)、土壤消毒灭菌(卞松民, 2011)等一系列研究,取得了一定成效,但尚未能从根本上解决问题。

近年来,利用作物化感作用原理合理安排间、轮、套作缓解连作障碍问题已成为研究热点之一(Zhou et al., 2011; 于高波, 2011)。有研究表明,大麦一大豆一高粱轮作可抑制大豆枯萎病的发生,其发病率及病情指数分别降低 36% 和 20%(Fininsa, 2002);葱蒜类蔬菜与黄瓜间轮套作可以改善土壤微生物组成,降低黄瓜发病率,缓解黄瓜连作障碍,提高经济效益(吴凤芝, 2008);Schoeny 等(2010)研究还发现豌豆与谷物间作可减少豌豆褐斑病的发生;一些植物根系分泌物可以抑制其他物种病原菌的生长,从而促进其他植物的生

长(Yu, 1999; Park et al., 2004; Pavlou, 2005)。姜、大蒜、黑胡椒的化感物质能抑制镰刀菌的生长(Ankita, 2012);合理种植伴生植物,探索新的栽培措施,是减轻病害的有效手段(阎飞, 2001)。小麦与黄瓜伴生或分蘖洋葱与黄瓜套作均能促进黄瓜生长,提高黄瓜产量,减轻病害的发生(杨阳, 2011; 王东凯 等, 2012)。伴生植物是指经过特殊挑选的具有某种相生相克性状的植物,其本身不以收获为目的(孙文浩, 1992)。

在黑龙江省自然科学基金(C2015048)、黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541859)和齐齐哈尔大学青年教师科研启动支持计划项目(2014k—Z14)的资助下,本书收集了黑龙江、山东等地不同的小麦种质资源,进行了不同小麦品种对西瓜枯萎病菌化感作用的研究,筛选出了抑制西瓜尖孢镰刀菌生长和促进西瓜根系生长的小麦品种,进一步发现小麦与西瓜伴生,可以显著提高西瓜的生长势,降低西瓜枯萎病的发病率。因此,本书以小麦和西瓜为试材,采用 qRT-PCR 技术研究伴生小麦对西瓜根系 *expansin* 基因表达的影响;运用 PCR-DGGE、qPCR、Miseq 测序技术,研究伴生小麦对西瓜根际微生物群落影响;利用 qRT-PCR 等技术,研究抗病相关基因表达、次生代谢物质和病程相关蛋白的影响,为小麦与西瓜伴生栽培模式的应用及其相关研究提供理论依据和技术支撑。

本书共分为 6 章,第 1 章、第 3 章、第 4 章由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院王芳老师撰写,约 8 万字;第 2 章、第 5 章、第 6 章、附录由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院

徐伟慧老师撰写,约 17 万字。全书由吴凤芝教授审稿。

本书是近几年有关研究工作的总结,并在多年科研的基础上,对小麦与西瓜伴生缓解西瓜枯萎病的研究进行了系统归纳和总结,为该领域研究提供了新的研究思路与研究模式,可作为在读研究生、科研工作者和农技推广人员的理论和应用指导,从而解决农业生产中的实际问题。书中介绍了小麦根系分泌物、小麦伴生对西瓜根系 *expansin* 表达、木质素和茉莉酸合成途径相关基因表达的影响,阐释了小麦伴生后西瓜根际微生物群落的变化情况等,对于理论本身和实际应用均有较高的学术价值。由于时间和精力有限,还有许多研究工作需要今后不断补充和完善。

本书参考和引用了大量国内外文献,吸收了同行们的辛勤劳动成果,从中得到了很大的教益与启发,在此谨向各位学者表示衷心的感谢!

由于水平有限,书中不足之处在所难免,恳请广大读者批评指正!

编著者

2017 年 5 月

目 录

第 1 章 国内外研究的动态和趋势	1
1.1 西瓜枯萎病及防治方法研究进展	1
1.1.1 西瓜抗枯萎病的机理	2
1.1.2 西瓜枯萎病防治方法研究进展	4
1.2 间作或伴生防治病害机制研究进展	7
1.2.1 根系分泌物影响病原菌的生长和繁殖	7
1.2.2 间作作物或伴生作物引起主栽作物根际土壤中 微生物多样性增加	8
1.2.3 间作或伴生影响主栽作物对矿质营养和水分的 吸收利用	9
1.2.4 间作对主栽作物病害起到物理屏障作用	10
1.2.5 间作改变小气候,中断病原菌发病条件	10
1.2.6 根系构型变化和根系相互作用	11
1.3 植物抗病能力提高机制研究进展	12
1.3.1 诱导抗性	12
1.3.2 抗性基因表达	12
1.3.3 生理生化机制	13
1.4 细胞生长与 <i>expansin</i> 基因表达	16
参考文献	19

第2章 不同小麦品种对西瓜的化感潜力评价	32
2.1 引言	32
2.2 材料与方法	33
2.2.1 试验材料、仪器与药品	33
2.2.2 试验设计	34
2.2.3 试验方法	34
2.2.4 数据分析	36
2.3 结果与分析	36
2.3.1 不同小麦根系分泌物对西瓜种子萌发的影响	36
2.3.2 不同小麦根系分泌物对西瓜枯萎病菌菌丝生长的 影响	44
2.4 讨论	46
2.4.1 小麦根系分泌物对西瓜的化感效应	46
2.4.2 不同品种小麦根系分泌物的化感效应	47
2.4.3 小麦根系分泌物的抑菌效应	47
2.5 小结	48
参考文献	49

第3章 伴生小麦及根系分泌物对西瓜根系生长和根系 <i>expansin</i> 基因表达的影响	51
3.1 引言	51
3.2 材料与方法	52
3.2.1 试验材料、仪器与药品	52
3.2.2 试验设计	54
3.2.3 试验方法	56
3.2.4 数据分析	60
3.3 结果与分析	60

3.3.1	伴生小麦对西瓜幼苗根系形态学特征的影响	60
3.3.2	小麦根系分泌物对西瓜根系形态学特征的影响	63
3.3.3	分泌物抑制剂处理后小麦根系分泌物对西瓜幼苗根系形态学特征的影响	66
3.3.4	伴生小麦或小麦根系分泌物对西瓜幼苗根系 <i>expansin</i> 基因表达的影响	68
3.4	讨论	71
3.4.1	伴生小麦对西瓜幼苗根系形态学的影响	71
3.4.2	小麦根系分泌物对西瓜根系形态的影响	72
3.4.3	伴生小麦或小麦根系分泌物对西瓜幼苗根系 <i>expansin</i> 基因表达的影响	73
3.5	小结	74
	参考文献	74

第4章 伴生小麦对西瓜根区土壤生态环境的影响 77

4.1	引言	77
4.2	材料与方法	78
4.2.1	试验材料、仪器与药品	78
4.2.2	试验设计	79
4.2.3	试验方法	80
4.2.4	数据处理	89
4.3	结果与分析	90
4.3.1	伴生小麦对西瓜根区土壤酶活的影响	90
4.3.2	伴生小麦对西瓜根区土壤微生物区系的影响	91
4.3.3	伴生小麦对西瓜根区土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响	92

4.3.4	西瓜根区土壤酶、微生物生物量碳、氮、磷、 可培养微生物的相关性	94
4.3.5	小麦伴生对西瓜根区土壤细菌群落结构的 影响	94
4.3.6	小麦伴生对西瓜根区土壤真菌群落结构的 影响	96
4.3.7	小麦伴生对西瓜根区土壤西瓜专化型尖孢 镰刀菌群落大小影响	98
4.3.8	伴生小麦对西瓜根区土壤细菌多样性的影响	98
4.3.9	伴生小麦对西瓜根区土壤真菌多样性的影响 ...	102
4.4	讨论	108
4.4.1	伴生小麦对西瓜根区土壤酶活的影响	108
4.4.2	伴生小麦对西瓜根区土壤微生物区系的影响 ...	108
4.4.3	伴生小麦对西瓜根区土壤微生物生物量碳、氮、 磷的影响	109
4.4.4	西瓜根区土壤酶、微生物生物量碳、氮、磷、 可培养微生物的相关性	109
4.4.5	小麦伴生对西瓜根区土壤细菌和真菌群落结构的 影响	110
4.4.6	小麦伴生对西瓜根区土壤细菌和真菌多样性的 影响	110
4.5	小结	112
	参考文献	112

第5章 伴生小麦西瓜根系酚类物质代谢和病程相关

	蛋白对西瓜尖孢镰刀菌的响应	116
5.1	引言	116

5.2 材料与amp;方法	117
5.2.1 试验材料、仪器与药品	117
5.2.2 试验设计	118
5.2.3 试验方法	119
5.2.4 数据分析	126
5.3 结果与分析	126
5.3.1 伴生小麦对西瓜枯萎病发病率的影响	126
5.3.2 伴生小麦西瓜根系丙二醛含量对西瓜尖孢镰刀菌 的响应	127
5.3.3 伴生小麦西瓜根系 POD 活性对西瓜尖孢镰刀菌 的响应	127
5.3.4 伴生小麦西瓜根系 PAL 活性对西瓜尖孢镰刀菌 的响应	128
5.3.5 伴生小麦西瓜根系 PPO 活性对西瓜尖孢镰刀菌 的响应	129
5.3.6 伴生小麦西瓜根系类黄酮含量对西瓜尖孢镰刀菌 的响应	129
5.3.7 伴生小麦西瓜根系总酚含量对西瓜尖孢镰刀菌 的响应	130
5.3.8 伴生小麦西瓜根系木质素含量对西瓜尖孢镰刀菌 的响应	131
5.3.9 伴生小麦西瓜根系几丁质酶活性对西瓜尖孢镰刀菌 的响应	132
5.3.10 伴生小麦西瓜根系 β -1,3-葡聚糖酶活性对 西瓜尖孢镰刀菌的响应	133
5.4 讨论	134

5.5 小结	137
参考文献	137
第6章 伴生小麦西瓜根系抗病基因表达对西瓜尖孢镰刀菌的响应	141
6.1 引言	141
6.2 材料与方法	142
6.2.1 试验材料、仪器与药品	142
6.2.2 试验设计	143
6.2.3 试验方法	144
6.2.4 数据分析	147
6.3 结果与分析	147
6.3.1 西瓜根系茉莉酸合成途径基因表达量的变化 ...	147
6.3.2 西瓜根系莽草酸-苯丙素-木质素合成途径基因表达量的变化	150
6.4 讨论	154
6.4.1 西瓜根系茉莉酸合成途径基因表达量的变化 ...	154
6.4.2 西瓜根系莽草酸-苯丙素-木质素合成途径基因表达量的变化	155
6.5 小结	156
参考文献	156
附录1 伴生小麦对西瓜生长及枯萎病抗性调控的可能机制	158
附录2 研究成果	159

第 1 章 国内外研究的动态和趋势

1.1 西瓜枯萎病及防治方法研究进展

西瓜枯萎病的病原菌是尖孢镰刀菌西瓜专化型 [*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (E. F. Smith) Snyder & Hansen], 为好氧性微生物(朱育菁等, 2004), Lin 等(2010)应用 Fon-1/Fon-2 引物结合 PCR 分析的分子方法, 可以快速地鉴定尖孢镰刀菌西瓜专化型。

尖孢镰刀菌西瓜专化型存在小种分化现象, 目前被公认的有 4 个生理小种, 分别为生理小种 0、生理小种 1、生理小种 2 和生理小种 3(寇清荷等, 2012)。生理小种 0 可以使一些感病品种发病; 生理小种 1 比生理小种 0 更具有毒性, 它能使抗生理小种 0 的一些西瓜品种感病; 生理小种 2 几乎可以侵染所有的西瓜品种, 但 PI296431-FR 品种除外; 生理小种 3 能够引起 PI296431-FR 品种枯萎, 维管束褐变(Zhou et al., 2010)。

西瓜尖孢镰刀菌的生理小种不断分化, 但目前对于西瓜枯萎病菌生理小种的划分尚无统一的标准, 为提高试验的准确性及研究结果的可比性, 国内外学者对生理小种的鉴定技术开展了大量的研究。耿丽华等(2010)采用 Black Diamond、Charleston Gray、Calhoun Gray 和 PI296431-FR 作为一套鉴别寄主, 以各个生理小种的标准菌株作为对照菌株, 建立了一套西瓜枯萎病菌生理小种鉴定技术体系, 采用该体系可以准确鉴定和区分出尖孢镰刀菌西瓜专化型生理小种 0、1 和 2。使用鉴别寄主鉴定西瓜枯萎病菌生理小种要受到寄



主种子品质、气候和栽培条件等因素影响,容易导致鉴定结果偏差较大。随着分子生物学技术的发展,AFLP、RAPD、ISSR 等分子标记技术已被应用于西瓜尖孢镰刀菌生理小种的鉴定。段会军等(2007)通过对河北省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定与 AFLP 分析表明,西瓜枯萎病菌的 AFLP 类群与以鉴别寄主划分的生理小种之间具有一定相关性。段会军等(2008)利用 RAPD、ISSR 和 AFLP 分子标记技术对 50 个西瓜枯萎病菌菌株进行了遗传多样性分析,研究表明,3 种分子标记方法的平均遗传相似系数基本一致,AFLP 所揭示的多态性水平和实验的可重复性高于 RAPD 和 ISSR。

1.1.1 西瓜抗枯萎病的机理

1.1.1.1 西瓜抗性遗传规律

张国良和崔广海(1999)选育出 2 份抗病材料 88-57 和 88-44,发现 88-57 的抗性遗传特性是单基因控制的显性遗传,而 88-44 不是简单的显隐性关系,而属于多基因控制的数量性状遗传。于天祥等(2004)认为,西瓜对枯萎病生理小种 1 号的抗性是受单个主效基因控制的显性遗传,而对生理小种 2 号的抗性是由隐性多基因控制,符合“加性—显性”模型,以加性效应为主,感病对抗病表现为显性。邹小花等(2011)采用植物数量性状主基因+多基因混合遗传模型,探讨 PI296341-FR 对西瓜枯萎病菌生理小种 2 的抗性遗传规律,结果表明,PI296341-FR 对西瓜枯萎病菌生理小种 2 的抗性遗传由主基因和微效基因共同控制,微效基因加性效应与显性效应的绝对值均高于主基因。

1.1.1.2 结构抗性

Lü 等(2011)用绿色荧光蛋白标记的枯萎病菌生理小种 1 接种抗西瓜枯萎病的野生种质 PI296341-FR,发现接种 12h 后病原菌黏

附在根表面;3 d 后孢子侵染到根表皮,形成了渗透区;接种 5 d 后根表覆盖了浓密的菌丝体;7~8 d 后菌丝大量繁殖,渗透到皮层,因此结构抗性是抗病机制的重要方面。Chang 等(2008)认为西瓜对枯萎病的抗性与木质素加厚程度有关,抗性品种通过加强维管束组织薄壁细胞中的多糖、纤维素和胼胝质抵抗病原菌。富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGP)可能与病原菌相互作用并把病原菌固定在细胞中,从而阻止病菌的入侵或扩散(宋凤鸣等,1992)。许勇等(2000b)分析了枯萎病病原菌侵染西瓜后幼苗叶片和根茎部组织中 HRGP 含量的变化,结果表明,接种后 4 d 抗病品种的根茎组织中木质素含量大幅度增加,接种后 6 d 抗病品种的根茎部 HRGP 的含量达到最高峰。因此,推断 HRGP 大量积累导致细胞壁强度提升和根茎部的木质化是西瓜枯萎病结构抗病的重要内在机制。

1.1.1.3 化学抗性

西瓜枯萎病化学抗性研究主要集中在代谢酶、氨基酸、基因表达等方面。徐敬华等(2004)发现 PAL 活性与枯萎病抗性呈正相关。一些代谢酶也与西瓜枯萎病抗性相关,如几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶、苯丙氨酸解氨酶和一些保护性酶(Chang et al., 2008; 许勇等, 2000b; 王建明等, 2002)。张显和王鸣(2001)发现抗坏血酸过氧化物酶活性与西瓜枯萎病抗性呈极显著相关。王浩波和王鸣(1994)对不同抗性西瓜品种进行苗期抗枯萎病鉴定,发现种子和出土后子叶内的硬脂酸相对含量与品种的枯萎率呈显著或极显著正相关关系。谢大森和陈家旺(1997)研究发现抗病品种的丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、精氨酸含量较高,感病品种的亮氨酸、蛋氨酸和络氨酸含量较高。Lü 等(2011)用微阵列技术研究了西瓜野生种质 PI296341-FR 感染生理小种 1 后的转录组图谱,发现病程相关蛋白基因、转录因子、信号/调控基因、木质素基因和细胞壁修饰基因被显著诱导表达。



1.1.2 西瓜枯萎病防治方法研究进展

1.1.2.1 抗病育种

最早开展西瓜抗枯萎病育种工作的是美国,1902 年 Orten 利用回交法把枸橼西瓜(citron)的抗性转育到感病品种上育成第一个抗病品种 Conqueror,此后,Porter、Anderus、Crall 利用选择和杂交育种法育成许多优良品种,如 Calhoun Gray、Jubilee、Crimson Sweet、Summit、Smokylee 等抗病品种。近年来,国内在抗西瓜枯萎病育种方面也取得了很大的进步,培育出了抗病早冠龙、郑杂 2 号、西农 8 号、丰抗 8 号、旭龙等抗病品种。

近年来,分子标记技术在西瓜抗枯萎病育种研究方面取得了一定的进展。许勇等(1999)运用 RAPD 技术,发现了与西瓜枯萎病菌生理小种 1 抗性基因连锁的 RAPD 标记 OPP01/700。许勇等(2000a)将 OPP01/700 进行克隆、测序,Southern 杂交证明此标记为 1 个单拷贝,并转化为 SCAR 标记,初步建立了西瓜抗枯萎病育种分子标记辅助选择技术系统。2001 年,Hawkins(2001)采用 RAPD 标记绘出了西瓜抗枯萎病的连锁图谱,筛选出了与生理小种 1 抗性相关的 3 个 RAPD 标记和与生理小种 2 抗性相关的 4 个 RAPD 标记。许勇等(2009)通过对抗枯萎病材料 PI296341-FR 的 9 个时间点(人工接种后 4、8、12h,1、2、3、5、8 和 11d)的根系组织抑制消减杂交(SSH)文库进行测序,获得了 3895 条 EST 序列,28.3%的序列与防卫反应、信号传导和环境互作有关。吕桂云等(2010)利用 SSH 技术构建西瓜与枯萎病菌非亲和互作的 cDNA 文库,采用表达序列标签(EST)技术,随机挑取克隆测序及进行生物信息学分析,发现在西瓜与枯萎病互作的 SSH-cDNA 文库中,与抗病防御相关的基因约占 36.3%,这些基因的发现为在分子水平上研究西瓜与枯萎病的互作机制奠定了基础。外源 DNA 导入法是一种简便实用的分子育种方

法。利用总 DNA 导入的方式,已获得了很多抗枯萎病的株系(肖光辉,1999;王浩波等,2002)。王果萍等(2003)利用花粉管通道法把几丁质酶基因导入西瓜,从 35 个单系材料中筛选出抗枯萎病的 S2-8、S2-20、S2-37 等 3 个单系。随着分子技术的发展及西瓜全基因组测序和高密度图谱构建工作的进行,定向培育抗西瓜枯萎病品种将成为可能。

1.1.2.2 农业措施

实行轮作倒茬,及时拔除病株,加强栽培管理是防治西瓜枯萎病重要的农业措施。此外,以色列等国在高温休闲季节,将地面覆盖薄膜,利用太阳能加热土壤,杀灭病菌。Ioannou 等(2000)报道,氮肥熏蒸可提高日光暴晒的效果,日光暴晒配施硫酸铵或者磷酸二氢铵(含氮 $180\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$),防治效果更佳。酸性土壤利于枯萎病的发生,而且过酸的土壤,钙含量下降,发病率增高,可施用石灰改变土壤酸性,降低枯萎病发生率。研究还发现增施 CO_2 能显著降低西瓜幼苗枯萎病的发病率和病情指数(单国雷,2007)。

1.1.2.3 嫁接防治

西瓜嫁接栽培是防治西瓜枯萎病的有效方法之一。利用对尖孢镰刀菌西瓜专化型具有免疫能力的瓠瓜、葫芦、南瓜、冬瓜、蒲瓜和野生西瓜等作砧木进行嫁接,能明显降低西瓜枯萎病的发病率和病情指数(徐敬华等,2004)。

1.1.2.4 化学防治

目前,药剂防治仍是生产上控制西瓜枯萎病的重要方法。用溴甲烷、氯化苦进行土壤熏蒸,能杀灭土壤中的病菌,但同时也杀灭了土壤中的其他有益生物,且造成大气污染。Fugro 等(2002)在播种前 25 d 用聚乙烯塑料薄膜覆盖地面,利用太阳能加热,结合 0.1% 的