

# 丛枝菌根真菌诱导草莓枯萎病抗性机理研究

赵 菊 莲

(陇东学院,甘肃 庆阳 745000)

**摘 要:**以“丰香”草莓为试材,以前人筛选出的具有较好诱导抗病性效果的摩西球囊霉(*Glomus mosseae*)为供试菌根真菌,通过盆栽方法,研究了接种菌根真菌后,草莓根系木质素和羟脯氨酸糖蛋白(HRGP)含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等保护性酶的活性以及电导率的变化,以期探讨菌根真菌诱导草莓枯萎病抗性机理。结果表明:接种菌根真菌,可有效提高草莓感枯萎病植株的木质素和 HRGP 含量,SOD、POD 和 CAT 等保护性酶的活性大幅上升,并有效降低了其电导率。

**关键词:**菌根真菌;草莓;枯萎病;诱导抗性机理

**中图分类号:**S 436.68<sup>+</sup>4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)17-0115-03

草莓(*Fragaria ananassa* Duch)属蔷薇科草莓属多年生草本果树,在世界小浆果生产中草莓产量居于首位。目前,由于耕地数量限制,以及广泛采用设施栽培,草莓产区连作面积不断上升,草莓连作障碍越发严重,并已成为限制草莓生产可持续发展的关键问题。由尖镰孢草莓专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)侵染引起的枯萎病是草莓连作障碍的重要表现<sup>[1-2]</sup>。通过对甘肃省草莓产区的调查发现,第2年连作地块草莓枯萎病发病率高达90%,减产10%~15%,第3年发病率可达100%,减产20%~25%,第4年减产40%以上,甚至绝收。

菌根(Mycorrhizae)是自然界中一种普遍存在的植物与微生物共生现象<sup>[1]</sup>。它是土壤中的菌根真菌(Mycorrhizae fungus)与高等植物根系形成的一种有益共生体。菌根的存在可以提高植物抵御不良环境的能力,促进植物生长,尤其是在提高植物抗病性方面有着突出作用<sup>[3]</sup>。泡囊-丛枝菌根真菌(Vesicular arbuscular mycorrhiza,简称 VAM 真菌)是最常见的一种内生菌根真菌,其真菌菌丝体可侵入植物细胞组织内部,在根系皮层细胞产生真菌的构造,因其细胞内菌丝体成泡囊状和丛枝状而得名<sup>[2]</sup>。关于菌根提高植物抗病性的原因,一般认为由以下几个方面:改善植物体内养分状况、改变植物根系状态、与病原菌竞争侵染位点、影响植物根际微生物、积累病程相关蛋白、激发保护性酶系统和积累次生代谢物质等方面<sup>[4]</sup>。为深入了解菌根真菌诱导

草莓对枯萎病的抗性的机理,该研究结合前人的研究成果,通过盆栽方式对菌根真菌诱导草莓枯萎病的抗病性机理进行了研究,旨在为通过生物防治的方法缓解草莓连作障碍提供新的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试草莓“丰香”(Totonka)为陇东学院自繁的盆栽草莓苗。供菌根真菌为摩西球囊霉(*Glomus mosseae*,简称:G. m)由北京市农林科学院植物营养与资源研究所提供。供试的病原菌为草莓枯萎病菌,即镰孢草莓专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*,简称 FO)由陇东学院病理实验室提供。

### 1.2 试验方法

选取长势一致的草莓苗定植于经 KMnO<sub>4</sub> 消毒营养钵(6 cm×515 cm×1 000 cm),内装有经过高压灭菌基质,基质为体积比 1:1 的珍珠岩和蛭石,装至营养钵高度的 4/5。缓苗 15 d 后选取生长状况整齐一致的草莓植株,在每钵内混入 30 mL VAM 菌剂。接种 VAM 真菌后,定时随机取苗,用酸性品红染色法检测草莓根系 VAM 真菌的侵染率,当侵染率均达到 90%以上时即可接种病原菌。采用灌根法,每株草莓苗接种 5 mL 浓度为 3×10<sup>6</sup> 个孢子/mL 的草莓枯萎病菌孢子悬浮液。不接种的草莓枯萎病菌处理的则接 5 mL 的无菌水。当草莓根系尖孢镰刀菌侵染率达到 90%时<sup>[5]</sup>(记为试验开始第 1 天),每隔 5 d 取样 1 次,测定各项指标。

试验设 2 个处理:接种菌根真菌又接种病原菌的处理 G. m+FO,只接种病原菌的处理 FO,以自然生长的植株为对照 CK。每处理 3 次重复,每个重复 30 钵。

**作者简介:**赵菊莲(1970-),女,甘肃宁县人,本科,副教授,现主要从事园艺专业的教学与科研工作。

**收稿日期:**2013-04-08

### 1.3 项目测定

木质素含量的测定采用 Klason 法<sup>[6]</sup>;羟脯氨酸糖蛋白含量(HRGP)的测定参照 Kivirikko 等的方法<sup>[7]</sup>;丛枝着生率的测定和泡囊参照 Kivirikko 的方法<sup>[8]</sup>;过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定<sup>[8]</sup>;超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)比色法测定<sup>[9]</sup>;过氧化氢酶(CAT)活性采用紫外分光光度法测定<sup>[9]</sup>;相对电导率测定采用 DDS-11A 电导仪法<sup>[10]</sup>。

### 1.4 数据分析

用 DPS 7.05(Data processing system)统计软件中的新复极差法分析处理间的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 VAM 真菌对草莓根系木质素含量的影响

木质素含量是根系细胞壁结构性变化的重要衡量指标,木质素含量增多,表明根系细胞壁加厚,发生木质化作用,形成阻挡病原物侵入的机械屏障。由图 1 可知,相比 CK 处理而言,FO 处理的木质素含量有所下降,整体水平要比对照略低,说明接种病原菌后对于草莓根系细胞壁的发育造成了一定的影响。而接种 VAM 真菌的处理,其木质素含量从第 10 天开始出现了明显的上升,并显著高于 CK 处理和 FO 处理。至第 25 天,接种 VAM 真菌的处理其木质素含量已经高达 149.52 mg/g,分别是 CK 处理和 FO 处理的 1.5 倍和 1.6 倍。

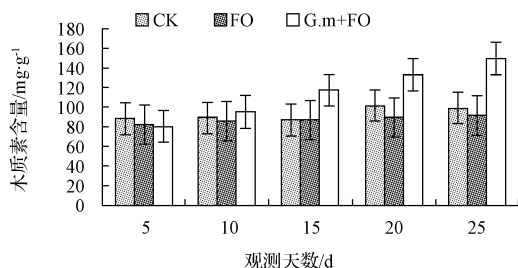


图 1 VAM 真菌对草莓根系木质素含量的影响

### 2.2 VAM 真菌对草莓根系 HRGP 含量的影响

羟脯氨酸糖蛋白(HRGP)是植物细胞壁的主要结构蛋白,与木质素的形成密切相关,当植物受病原菌感染或细胞壁受损时,HRGP 会在植物体内大量积累以修复细胞壁的结构,进而增强抗病性。由图 2 可知,自然

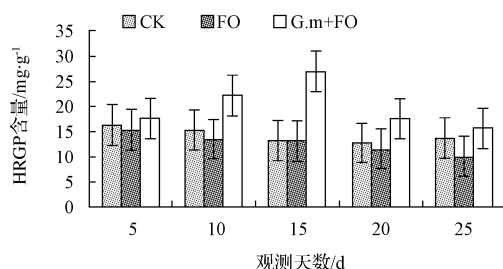


图 2 VAM 真菌对草莓根系 HRGP 含量的影响

生长的草莓,其根系 HRGP 含量基本稳定。接种病原真菌后,草莓根系 HRGP 含量开始出现下降的趋势,并且随着病原菌侵入时间的延长,逐渐下降。至第 25 天,FO 处理的 HRGP 含量仅有 10.08 mg/g;而接种 VAM 真菌的处理,其 HRGP 含量从第 5 天开始出现了明显的上升,至第 15 天达到峰值,为 26.98 mg/g,分别是 CK 处理和 FO 处理的 2.0 倍和 2.1 倍。

### 2.3 VAM 真菌对草莓根系保护酶活性的影响

植物体在受到病原菌入侵后,普遍引发膜脂过氧化,产生大量的超氧自由基。保护性酶类包括 SOD、POD、CAT 等,可以清除超氧自由基,保护细胞。另外,POD 还可以催化细胞壁富含羟基脯氨酸的糖蛋白发生交联作用而使细胞壁得以加强,直接阻挡病原菌的侵入。由表 1 可知,自然生长状态下的植株,其体内的 SOD、POD、CAT 等酶活性一般都是相对稳定的,而一旦有病原菌入侵后,其活性就开始出现不同程度的变化。其中,SOD、POD 和 CAT 活性在第 5 天达到峰值,随后均快速下降。接种 VAM 真菌后,草莓根系 SOD、POD、CAT 等酶活性都从试验第 10 天开始出现大幅上升,其中 SOD 活性在第 15 天达到峰值,CAT 活性在第 10 天达到峰值,随后均出现一定程度的下降,但是最终其活性仍然显著高于 CK 处理和 FO 处理。

表 1 VAM 真菌对草莓根系保护酶活性的影响

观测指标	处理	不同观测天数下草莓根系保护酶活性/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$				
		5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
SOD 活性	CK	29.47b	22.47b	21.27b	27.39b	20.14b
	FO	35.14a	20.27b	18.17ab	15.27c	14.08c
	G. m+FO	30.17b	34.58a	40.22a	38.05a	30.47a
POD 活性	CK	231.24a	214.22b	213.22b	228.74b	209.47b
	FO	239.47a	203.84b	187.49c	166.71c	140.22c
	G. m+FO	234.87a	254.18a	358.79a	332.45a	298.79a
CAT 活性	CK	200.14a	197.42c	195.24b	195.78b	199.47b
	FO	211.35a	285.26b	149.36c	124.98c	89.74c
	G. m+FO	218.47a	300.27a	284.01a	255.78a	269.74a

注:表中数据是 3 次重复的平均值,同列数据后有相同字母表示在  $P=0.05$  水平差异不显著。下同。

### 2.4 VAM 真菌对草莓根系电导率的影响

电导率是反应细胞膜脂质过氧化的重要指标,电导率提高表明细胞膜被破坏,能影响细胞膜的结构,干扰正常的生理代谢。由表 2 可知,自然生长的草莓根系电导率比较低,而且维持在一个相对稳定的水平。接种病原菌后,草莓根系的电导率快速提高,并随时间的延长持续增加。至试验第 25 天,电导率已经达到 90.90%。接种 VAM 真菌可明显缓解病原菌侵染带来的电导率提

表 2 VAM 真菌对草莓根系电导率的影响

处理	不同观测天数下草莓根系的电导率/%				
	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
CK	37.26c	37.75c	43.36c	40.52c	37.73c
FO	69.45a	70.01a	84.66a	89.36a	90.90a
G. m+FO	48.99b	51.90b	59.69b	58.87b	61.53b

高。虽然 G. m+FO 处理的电导率仍然高于 CK 处理,但却显著低于 FO 处理。

### 3 结论与讨论

菌根作为土壤中一类能与宿主植物根系建立的互惠共生体,能参与植物多种生理生化的代谢过程,对植物有着多方面的作用,尤其是在诱导植物提高抗病性方面起到了非常积极的作用,对此前人进行过很多相关的研究<sup>[11-14]</sup>。但关于 VAM 真菌提高植物抗病性的具体机制还缺乏系统的认识。一般认为,在与病原菌相互作用过程中,宿主细胞壁木质化是抗病反应的特征之一。刘润进等<sup>[10]</sup>研究表明,菌根真菌能通过一定的代谢过程增强植物木质化作用,使细胞壁加厚,而形成阻挡病原物侵入的机械屏障。Cordier 等<sup>[11]</sup>采用分根方法研究菌根化番茄在受到寄生疫霉攻击的抗性反应时发现,在接种 AM 真菌分室的根系,含有丛枝菌的细胞对病原菌表现出明显的抗性。该研究表明,接种 VAM 真菌可以明显提高草莓根系木质素和 HRGP 含量,加厚了细胞壁,提高了根系对病原菌入侵的抵御能力。

植物在受到病毒或其它病原物的侵染时,其体内独有的抗性防御系统会被启动。VAM 真菌对寄主体内防御体系的提前诱导可在一定程度上抵抗病原的再次入侵。前人的研究也表明,接种菌根真菌可以明显提高植物保护酶活性,而保护性酶活性提高,可以有效清除因病原菌入侵基所形成的氧化逆境,防止不良环境对细胞造成更严重的氧化损伤<sup>[4,13,15]</sup>。该研究表明,接种 VAM 真菌后,草莓根系 SOD、POD、CAT 等酶活性都从试验第 10 天开始出现大幅上升。表明 VAM 真菌诱发了保护性酶的产生,这对于清除因病原菌入侵,细胞产生的自由基,保护细胞免受损伤具有重要意义。接种 VAM 真菌可有效降低植物在逆境条件下的电导率,这在邹琦<sup>[9]</sup>的研究中得到了证明。扈金丽<sup>[15]</sup>的研究表明,接种 *Glomus mosseae* 可降低连作草莓根系电导率,提高其抗病性;顾向阳等<sup>[16]</sup>的研究表明,接种 VAM 真菌可使棉花

根系细胞膜透性降低,根系分泌物减少。该研究表明,接种 VAM 真菌可显著降低感枯萎病草莓植株根系的电导率,提高其抵御膜脂过氧化的能力。

### 参考文献

- [1] 杨焕青,王开运,范昆,等. 草莓枯萎病菌的生物学特性及 7 种杀菌剂对其抑制作用[J]. 植物保护学报,2008,35(2):169-174.
- [2] 贾冬梅. 大棚草莓的主要病害及防治[J]. 河北果树,2000,34(1):38-39.
- [3] 毛爱军. VA 菌根诱导植物抗病性研究概述[J]. 长江蔬菜,2005,28(2):15-17.
- [4] 黄京华,骆世明,曾任森. 丛枝菌根菌诱导植物抗病的内在机制[J]. 应用生态学报,2003,14(5):819-822.
- [5] 盛萍萍,刘润进,李敏. 丛枝菌根观察与侵染率测定方法的比较[J]. 菌物学报,2011,30(4):519-525.
- [6] 陈为健,程贤魁,陈跃先,等. 硫酸法测定花生壳中木质素的含量[J]. 闽江学院学报,2002,29(6):72-76.
- [7] Kivirikko K I. Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine[J]. Anal Biochem,1976,19(11):249-253.
- [8] Yin B Z, Wang Y N, Zhen W C, et al. The effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) on the protection system in leaves of strawberry under drought stress[J]. Frontiers of Agriculture in China,2010,4(2):165-169.
- [9] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1995:94-99.
- [10] 刘润进,沈崇尧,裴维蕃. VAM 真菌与黄萎病菌存在侵染中的竞争作用[J]. 土壤学报,1994,31(增刊):224-229.
- [11] Cordier C, Pozo M J, Barea J M, et al. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus molecular[J]. Plant-Microbe Interactions,1998,11(10):1017-1028.
- [12] 尹宝重,刘雪静,高峰,等. 不同 AM 真菌对草莓生长及生理的影响[J]. 中国农学通报,2009,25(16):173-176.
- [13] 李敏,王维华,刘润进. AM 真菌和镰刀菌对西瓜根系膜脂过氧化作用和膜透性的影响[J]. 植物病理学报,2003,33(3):229-232.
- [14] 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害[J]. 植物生理学通讯,1991,45(2):5-10.
- [15] 扈金丽. 基于土壤微生态调控的草莓连作障碍的研究[D]. 保定:河北农业大学,2011:26.
- [16] 顾向阳,胡正嘉. VA 菌根真菌 *Glomus mosseae* 对棉花根区微生物量和生物量的影响[J]. 生态学杂志,1994,13(2):7-11.

## Study on Mechanism of Strawberry Fusarium Wilt Resistance Induced by Arbuscular Mycorrhizae Fungus

ZHAO Ju-lian

(Longdong University, Qingyang, Gansu 745000)

**Abstract:** Taking strawberry 'Totonka' as material, *Glomus mosseae* which had better inducing effect of disease resistance as mycorrhizae fungus, the changes of lignin content, HRGP content, SOD, POD, CAT activities and electric conductivity in the root of strawberry after isolated arbuscular mycorrhizae fungus were studied with pot experiment, in order to investigate the mechanism of strawberry fusarium wilt resistance induced by arbuscular mycorrhizae fungus. The results showed that the fungus could effectively improved content of lignin, HRGP content and activities of SOD, POD and CAT, meanwhile, electric conductivity effectively decreased.

**Key words:** arbuscular mycorrhizae fungus; strawberry; fusarium wilt; induced resistance mechanism