

DOI: 10.11766/trxb202001070007

李淑君, 王兵爽, 王媛, 张舒桓, 张夕雯, 张晓晖, 徐国华, 任丽轩. 丛枝菌根育苗缓解西瓜枯萎病的机制[J]. 土壤学报, 2021, 58 (3): 744–754.

LI Shujun, WANG Bingshuang, WANG Yuan, ZHANG Shuhuan, ZHANG Xiwen, ZHANG Xiaohui, XU Guohua, REN Lixuan. Mechanism of Inoculation of Watermelon Seedlings with Arbuscular Mycorrhizae Alleviating *Fusarium* wilt Disease[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58 (3): 744–754.

丛枝菌根育苗缓解西瓜枯萎病的机制*

李淑君, 王兵爽, 王媛, 张舒桓, 张夕雯, 张晓晖, 徐国华, 任丽轩

(南京农业大学资源与环境科学学院/农业部长江中下游植物营养与肥料重点实验室/江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心, 南京 210095)

摘 要: 西瓜易受尖孢镰刀菌侵害发生枯萎病。植物形成丛枝菌根 (AM) 可有效促进养分吸收和病害防控。在田间直接接种丛枝菌根菌时, 侵染效率和生态效应多数会受到限制。采用育苗期接种丛枝菌根菌 (*Rhizophagus intraradices*, R.i) 培养菌根苗, 成苗后移栽入盆钵, 研究西瓜丛枝菌根苗在抗西瓜枯萎病中的作用及其机制。将西瓜丛枝菌根苗移栽入大田, 研究丛枝菌根西瓜苗在田间防控西瓜枯萎病及改善磷营养的效果。结果表明, 苗期形成的丛枝菌根苗, 在移栽后上调几丁质酶编码基因 *CIPR4*、*ClPR5* 在根系的表达量, 上调 β -1, 3-葡聚糖酶编码基因 *CIGlu3* 和苯丙氨酸解氨酶编码基因 *CIPAL4*、*CIPAL11* 在根系的表达量; 西瓜丛枝菌根育苗提高了根际土壤酸性磷酸酶活性, 提高土壤有效磷含量, 改善磷营养, 提高西瓜植株抗枯萎病的能力。同时丛枝菌根育苗提高了西瓜根际土壤中的丛枝菌根菌孢子数, 降低了根际土壤中病原菌数量, 降低西瓜枯萎病发病率及病情指数。因此, 丛枝菌根育苗上调了西瓜植株抗性相关酶基因表达, 提高西瓜抗病性; 同时提高了根际酸性磷酸酶活性而改善了磷营养, 提高植株抗病能力, 降低枯萎病发病率和发病指数。

关键词: 丛枝菌根育苗; 西瓜; 枯萎病; 抗病相关酶; 酸性磷酸酶

中图分类号: Q945.12 **文献标志码:** A

Mechanism of Inoculation of Watermelon Seedlings with Arbuscular Mycorrhizae Alleviating *Fusarium* Wilt Disease

LI Shujun, WANG Bingshuang, WANG Yuan, ZHANG Shuhuan, ZHANG Xiwen, ZHANG Xiaohui, XU Guohua, REN Lixuan

(College of Resources and Environmental Sciences/Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilization in Low-Middle Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture/Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

* 国家重点研发计划项目 (2016YFD0200106)、江苏高校品牌专业建设工程 (PPZY2015A061)、国家自然科学基金委员会与美国国家自然科学基金会“食品、能源、水”系统关联合作研究项目 (41961124005) 资助 Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0200106), the Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institution of China (No. PPZY2015A061) and INFEWS: US-China: Collaborative Research (No. 41961124005)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lxren@njau.edu.cn

作者简介: 李淑君 (1995—), 山东省济南市人, 硕士研究生, 主要从事植物根际有机养分利用的研究。E-mail: 2017103110@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-01-07; 收到修改稿日期: 2020-04-19; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2020-07-29

Abstract: 【Objective】 Watermelon is susceptible to infection of *Fusarium oxysporum*, which causes it to wilt. Colonization of Arbuscular mycorrhizae (AM) on roots of the plants can not only effectively promote plant nutrient uptake, but also help prevent diseases. However, direct inoculation of arbuscular mycorrhizae in the field may in most cases affect its infection efficiency and ecological effects. 【Method】 In this study, *Rhizophagus intraradices* (R.i), was inoculated directly to watermelon seedlings in nursery to culture arbuscular mycorrhizae inoculated watermelon seedlings, some of which were then transplanted into pots for observation of how the inoculation helped the seedling to resist wilt disease and for analysis of its mechanism. Meanwhile activities of wilt-resistance related enzymes and their encoded gene expression were determined for analysis of mechanism of AM helping the seedlings resist wilt disease. Besides, some of the inoculated seedlings were transplanted into fields for exploration of effect of the inoculation helping the plants resist wilt disease and improve P nutrition in the field. 【Result】 Results show that watermelon seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizae in nursery maintained their mycorrhizal colonization after transplanting, and even up-regulated the expression of chitinase-encoding genes of *CIPR4* and *CIPR5* and the expression of β -1,3 glucanase gene *ClGlu3* and Phenylalanine ammonia-lyase encoding gene *CIPAL4* and *CIPAL11* in their root systems. Chitinase activity in rhizosphere of the watermelons increased significantly, but β -1,3 glucanase and phenylalanine ammonia-lyase activities were unchanged. Meanwhile, the inoculation significantly reduced the number of pathogens in watermelon rhizosphere soil, increased the number of arbuscular mycorrhizal spores, and improved the watermelon root system environment, thus reducing wilt incidence of the plants by 22.22%, and disease index by 23.15%, and consequently increasing the disease controlling effect up to 36.23%. Moreover, the inoculation enhanced the activity of acid phosphatase in the rhizosphere soil, thus increasing the availability of phosphorus in the soils, optimizing phosphorus nutrition of the soil and eventually improving disease resistance of the crop. 【Conclusion】 When watermelon wilt disease occurs, colonization of AM fungi can increase activities of the disease resistance-related enzymes by increasing the expression of *ClPR4*, *ClPR5*, *ClGlu3* and *ClPAL4* in the watermelon root system, thereby improving disease resistance of the watermelon; inoculation of seedlings with arbuscular mycorrhizae can improve microbial environment of the plant root, and promote hydrolysis of insoluble phosphorus by stimulating the activity of acid phosphatase in the rhizosphere soil, thus increasing the content of available phosphorus in the soil and promoting absorption of the nutrient by watermelon, and eventually improving disease resistance of the crop, reducing the incidence index of watermelon wilt. It is, therefore, concluded that inoculation of the seedlings of watermelon with arbuscular mycorrhizae can effectively prevent occurrence of *Fusarium* wilt.

Key words: Inoculation of seedlings with nursery arbuscular mycorrhizae; Watermelon; *Fusarium* wilt disease; Disease resistance-related enzyme; Acid phosphatase

西瓜是世界广泛栽培的水果，我国西瓜种植面积和产量分别占世界的 52.7%和 67.0%^[1]。江苏省种植面积在 2016 年达到 19.28 万 hm^2 ，为经营者带来了极大的经济效益^[2]。近年来，西瓜种植面积不断扩大，受耕地面积减少的限制，常出现重茬栽培，容易受连作障碍影响，加重作物的病虫害。西瓜连作病害主要是尖孢镰刀菌西瓜专化型造成的枯萎病^[3]，西瓜枯萎病严重时造成西瓜大量减产^[4]。生物防治是可持续农业防控枯萎病的重要方法^[5]，利用具有拮抗作用的微生物来减少甚至遏制病原菌的数量，以降低枯萎病的发病率。丛枝菌根真菌（AMF）是生态环境中分布广泛的一种有益内生真菌，能与 80%以上的陆生植物建立共生关系^[6]，增强植物抗旱

性^[7]，促进磷素吸收，有效缓解由连作障碍引起的病虫害，提高宿主植物的抗病性。

西瓜连作枯萎病的发生与西瓜植株抗病性和根际病原菌数量密切相关^[8]。在连作土壤中，西瓜形成丛枝菌根后，无论是嫁接苗还是自根苗，均能显著提高根系中几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶、苯丙氨酸解氨酶（Phenylalanine ammonia-lyase, PAL）、过氧化氢酶（Catalase, CAT）以及过氧化物酶（Peroxidase, POD）的活性，提高对逆境的反应能力^[9]。

田间直接接种丛枝菌根菌对抑制西瓜枯萎病有一定的效果，其作用机制是改善了西瓜氮、磷、硼、锌等矿质营养，提高抗病性^[10]，主要是促进了西瓜对土壤中矿质态磷素的吸收^[11]。由于土壤中的磷营

养和微生物环境复杂,田间直接接种丛枝菌根菌对菌根定殖存在风险,本研究设想在西瓜育苗期间接种丛枝菌根菌,形成丛枝菌根苗,研究丛枝菌根苗在移栽后生理功能的发挥及其机制。丛枝菌根育苗的方法在树木和其他作物上已经成功应用^[12-13]。作者所在研究组已经证实丛枝菌根育苗能提高西瓜根系防御性酶活性^[14],本研究将进一步证实这些防御性酶在转录水平上是否有表达量的变化。此外,根外菌丝分泌的酸性磷酸酶在提高根际土壤酸性磷酸酶活性、促进有机磷水解、提高根际有效磷含量也起着重要作用^[15]。丛枝菌根化培育的西瓜苗在移栽后是否能继续保持或提高西瓜根际土壤酸性磷酸酶活性,以提高根系水解和利用土壤中有机磷的能力,从而提高西瓜抗病能力,尚未可知。本研究将采用丛枝菌根育苗的方法,探讨西瓜根系在苗床形成丛枝菌根,移栽后是否在转录水平上提高西瓜防御性酶编码基因表达量,提高西瓜抗病能力;而且在大田中是否可以保持侵染率,并从提高根际有机磷利用能力方面提高抗病能力。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

西瓜品种为早佳-8424 (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai cv. Zaojia-8424)。

根内根抱囊霉 (*Rhizophagus intraradices*, R.i) 菌种由北京市农林科学院植物营养与资源研究所提供,采用土壤和河沙基质,种植玉米和三叶草扩繁,产生孢子、菌丝体、土壤和河沙的混合接种剂。

西瓜专化型尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, FON, 由本实验室从发病西瓜植株上筛选并保存)^[16]。病原菌 FON 为马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato dextrose agar, PDA) 活化的西瓜专化型尖孢镰刀菌,接入马铃薯葡萄糖肉汤培养基 (Potato dextrose broth, PDB) 溶液,在 28℃ 220 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 7 d,用血球计数板计数,尖孢镰刀菌孢子数为 10⁷ CFU·mL⁻¹。用尖孢镰刀菌选择性培养基^[17]筛选菌株。

西瓜育苗基质为作物秸秆、稻壳、木屑、菇渣等有机固体废弃物的混合物,发酵后混合蛭石和珍珠岩无机物料。基质由淮安柴米河农业科技发展有限公司惠赠。

1.2 试验设计

1.2.1 土培盆栽试验 盆栽试验设置在南京农业大学资源与环境科学学院温室。共设置 4 个处理: (1) -AMF-FON: 非丛枝菌根育苗,不接种 FON (对照); (2) +AMF-FON: 丛枝菌根育苗,不接种 FON; (3) -AMF+FON: 非丛枝菌根育苗,接种 FON; (4) +AMF+FON: 丛枝菌根育苗,接种 FON。重复 3 次。土壤采自南京农业大学牌楼试验基地,经 γ -射线辐照灭菌。土壤基本理化性状为: 碱解氮 55.8 mg·kg⁻¹, 有效磷 4.2 mg·kg⁻¹, 速效钾 132mg·kg⁻¹, pH 7.8。试验中西瓜苗在 50 孔的育苗盘培育,用西瓜专用育苗基质,丛枝菌根化育苗的处理在育苗盘中接种丛枝菌根菌菌种,非菌根苗接种等量的灭菌丛枝菌根菌菌种和菌种滤液。育苗 20 d 时,移栽至装有无菌低磷土的钵中,每钵移栽 5 株。移栽后采用灌根法接种 FON 孢子悬浮液,分别在移栽后第 5 天、第 10 天、第 15 天接种 FON,每株浇灌 5 mL。移栽 20 天后,处理 3(-AMF+FON) 的西瓜苗出现枯萎病症状,收获。收获时,小心将西瓜植株完整取出,抖去与根系分离的土壤,收集根际土壤待测枯萎病病原菌数量,取植株洗净,待测生物量、酶活性、基因表达量。

钵中土壤施肥量为: N (Ca (NO₃)₂·4H₂O) 1.68 g·kg⁻¹, P (KH₂PO₄) 0.68 g·kg⁻¹, K (K₂SO₄) 0.24 g·kg⁻¹, Mg (MgSO₄·7H₂O) 0.51 g·kg⁻¹, Fe (FeSO₄·7H₂O) 0.025 g·kg⁻¹, Zn (ZnSO₄·7H₂O) 0.022 g·kg⁻¹。

1.2.2 大田试验 大田试验研究丛枝菌根育苗对西瓜根系利用有机磷及抗枯萎病的影响。试验设置在江苏省句容市 (119°17'E, 31°95'N), 土壤基本理化性状为碱解氮 72.68 mg·kg⁻¹, 有效磷 14.09 mg·kg⁻¹, 速效钾 55 mg·kg⁻¹, pH 4.24。试验设置两个处理: 非丛枝菌根育苗 (-AMF) 和丛枝菌根育苗 (+AMF)。每个处理 4 个重复。将接种物以每钵 5 000 接种势单位分别置于营养钵内,对照则加入等量的灭菌接种物,并与钵中土壤混匀后播种。待西瓜幼苗长至两片真叶时移栽入大田,小区面积 120 m²,每 666.7 m² 定植 650 株,试验期间除草、灌水等管理正常,西瓜成熟时收获。收获时,按照五点法采集西瓜、土壤样品,每小区采集 5 个植株样品,采集时将西瓜根系从土壤中挖出,用抖土法收集西瓜根际土壤待测,将每株西瓜所有果实称重计产。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primers used for PCR amplification

基因	编号	引物方向	引物序列
Gene	IWGI no.	Primer direction	Primer sequence (5'-3')
<i>CIPR4</i>	<i>Cla004921</i>	正向引物 Forward primer	TCCTCCTCTCTATCGGCGGC
		反向引物 Reverse primer	GCCGAGCTAGTTCGTCCCAC
<i>CIPR5</i>	<i>Cla004920</i>	正向引物 Forward primer	TGCGCCTTCTTGAGCAACCA
		反向引物 Reverse primer	ATTGCCGAGTGGTCGTGAGC
<i>CIPR6</i>	<i>Cla018709</i>	正向引物 Forward primer	GCGCAGCAGCGGATTCTGACTTA
		反向引物 Reverse primer	TCAATATTGGTCATCAACCGGCC
<i>ClGlu1</i>	<i>Cla009588</i>	正向引物 Forward primer	GCGGGGGGACGGCTACTTCAATCGATAA
		反向引物 Reverse primer	TCAATTGAAATTGACGGGAAATTTAGGCT
<i>ClGlu2</i>	<i>Cla006320</i>	正向引物 Forward primer	CCGCTTCAGGAGTTTGTGGAGA
		反向引物 Reverse primer	TCAAAAAGTTTCCCGTATTTCGGC
<i>ClGlu3</i>	<i>Cla016465</i>	正向引物 Forward primer	TGGGAAGGATGGAAGGGATTGT
		反向引物 Reverse primer	TCAATGACTAAACCACCAATGTT
<i>CIPAL4</i>	<i>Cla018298</i>	正向引物 Forward primer	GCCGAAAAGAAGTAGAAAATGCAAGAC
		反向引物 Reverse primer	CTAGCAAATGGGGATTGGAGCACCAT
<i>CIPAL8</i>	<i>Cla018302</i>	正向引物 Forward primer	TTGGCATAACGAGAGTGGAAAAG
		反向引物 Reverse primer	CTAACATATGGGAATTGGAGCT
<i>CIPAL11</i>	<i>Cla012780</i>	正向引物 Forward primer	CCGAAGGAGGTTGAAAATGTAAG
		反向引物 Reverse primer	TTAGCAAATAGGGATTGGTGCTC

1.3 样品采集与测定

1.3.1 植株生物量及磷吸收量 盆栽试验收获后，采集植株地上部和地下部的鲜样，105℃杀青，70℃烘至恒重，测定干物质质量。称取烘干样0.1000 g，采用硫酸-过氧化氢消煮，取消煮液采用钼锑抗比色法测定全磷含量^[12]，计算磷吸收量。

1.3.2 抗性相关基因表达量 从葫芦科基因组网站 (<http://cucurbitgenomics.org>) 查得西瓜基因组抗性相关酶几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶和 PAL 酶基因序列，并设计引物 (表 1)^[18]。RNA 提取和 cDNA 合成及实时荧光定量 (RT-qPCR) 分析参照文献^[19]。

1.3.3 西瓜根系酶活性 分别用几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶、苯丙氨酸解氨酶试剂盒 (苏州科铭生物技术有限公司) 进行测定。

1.3.4 土壤酸性磷酸酶活性 采用磷酸苯二钠法测定^[12]，于 660 nm 波长处比色。

1.3.5 土壤有效磷含量 采用钼锑抗比色法测定^[12]。

1.3.6 菌根侵染率 采用曲利苯蓝染色法^[14]。菌

根侵染率/%=Σ (0%×根段数+10%×根段数+20%×根段数+.....+100%×根段数) /总根段数。

1.3.7 枯萎病调查方法及枯萎病分级标准 0 级：健康植株，无发病症状；1 级：叶片或茎蔓由下而上萎蔫，萎蔫面积占全株的 1/4 或 1/4 以下；2 级：叶片或茎蔓由下而上萎蔫，萎蔫面积占全株的 1/4~1/2，茎蔓上有琥珀色胶状物；3 级：叶片或茎蔓由下而上萎蔫，萎蔫面积占全株的 1/2 以上，茎蔓上有琥珀色胶状物；节间变短，下部病茎表面产生白色或粉红色霉层，阻碍发育；4 级：整株枯萎死亡。

病情指数/%=Σ (级数×该级数发病株数) / (总调查数×最高级数) ×100

发病率/%=发病株数/总调查数×100

防治效果/%=(对照的病情指数-接种 AM 真菌的病情指数) /对照的病情指数×100

1.3.8 土壤中西瓜枯萎病原菌数量和 AM 真菌孢子数 用选择培养基稀释分离法测定土壤中枯萎病原菌数量^[19]。采用湿筛倾注-蔗糖离心法, 体视镜 (OLYMPUS MVX10, 南京奥利科学仪器有限公司, 南京) 下计数 AM 真菌孢子数^[18]。

1.4 数据处理

用 Microsoft Excel 2013 对数据进行统计与图表处理, 采用 SPSS 17.0 单因素方差分析 (One-way ANOVA) 的图基 (Tukey) 方法进行不同处理的差异显著性检验, 显著性水平为 $P \leq 0.05$ 。

2 结果

2.1 丛枝菌根育苗对西瓜枯萎病发病率的影响

表 2 表明丛枝菌根育苗可有效抑制西瓜枯萎病。在接种 FON 处理下, 与非丛枝菌根育苗处理相比, 丛枝菌根育苗的西瓜植株发病率降低了 22.22%, 病情指数降低了 23.15%, 防治效果达到 36.23%。接种 FON 的西瓜根际土壤中发现了大量的尖孢镰刀菌, 丛枝菌根育苗显著降低西瓜根际土壤病原菌数量。

表 2 丛枝菌根育苗对西瓜枯萎病的影响

Table 2 Effects of inoculation of arbuscular mycorrhizae at the seedling stage on Fusarium wilt of watermelon

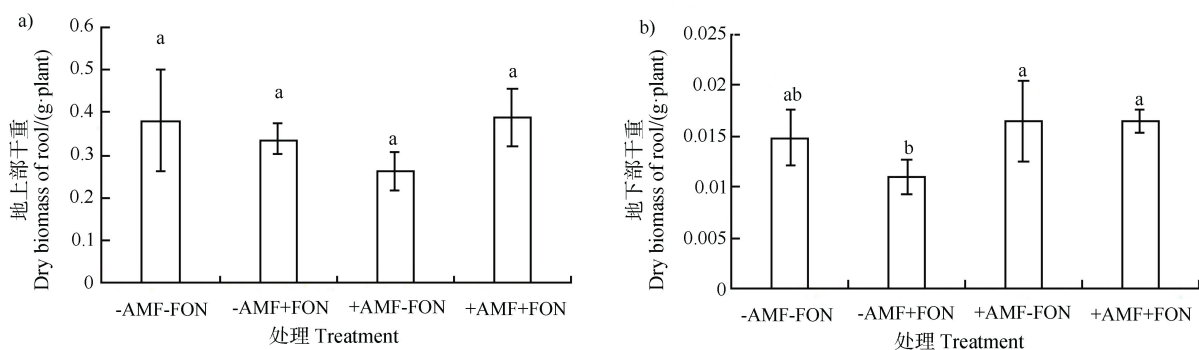
处理 Treatment	发病率 Incidence of disease / %	病情指数 Disease index / %	防治效果 Control effect / %	尖孢镰刀菌数 Fusarium oxysporum number / ($10^3 \cdot g^{-1}$)
-AMF-FON	—	—	—	—
-AMF+FON	77.78	63.89	—	40.67
+AMF-FON	—	—	—	—
+AMF+FON	55.56*	40.74*	36.23	12.67*

注: -AMF-FON 表示非丛枝菌根育苗, 不接种 FON (对照); AMF-FON 表示丛枝菌根育苗, 不接种 FON; -AMF+FON 表示非丛枝菌根育苗, 接种 FON; +AMF+FON 表示丛枝菌根育苗, 接种 FON。—表示未检出, *表示有显著性差异 ($P \leq 0.05$)。下同。Note: -AMF-FON means non-arbuscular mycorrhizal seedlings without FON (control); AMF-FON means arbuscular mycorrhizal seedlings without FON; -AMF+FON means non-arbuscular mycorrhiza seedlings, inoculated FON; +AMF+FON means arbuscular mycorrhizal seedlings, inoculated with FON. — means not detected, and * means significant difference at $P \leq 0.05$. The same below.

2.2 丛枝菌根育苗对西瓜植株生物量积累和菌根侵染率的影响

如图 1 所示, 接种 FON 处理时, 丛枝菌根育苗

的西瓜地下部干物质质量显著高于非丛枝菌根育苗处理, 表 3 表明西瓜根际接种 FON 对西瓜根系菌根侵染率无影响。



注: 同一部位不同字母表示处理间有显著性差异 ($P \leq 0.05$), 误差线表示标准差。下同。Note: Different letters in the same part mean significant differences at $P \leq 0.05$; Error bar stands for standard deviation. The same below.

图 1 丛枝菌根育苗对西瓜生物量的影响

Fig. 1 Effects of inoculation of arbuscular mycorrhizae at the seedling stage on biomass of watermelon

表 3 西瓜根系菌根侵染率

Table 3 Arbuscular mycorrhizal colonization rate of watermelon root

处理 Treatment	F/%	M/%	m/%	A/%	a/%
-AMF-FON	—	—	—	—	—
-AMF+FON	—	—	—	—	—
+AMF-FON	57.55	14.4	18.78	1.59	17.99
+AMF+FON	56.67	6.2	10.94	0.94	15.16

注：F 表示根系菌根侵染率；M 表示根系菌根侵染密度；m 表示侵染根段菌根侵染密度；A 表示根系丛枝丰富度；a 表示侵染根段丛枝丰富度。Note: F: root mycorrhiza infection rate; M: root mycorrhiza infection density; m: mycorrhiza infection density of the infested root; A: abundance of arbuscular mycorrhiza in the root; a: abundance of arbuscular mycorrhiza in the infected root.

2.3 丛枝菌根育苗对西瓜基因表达量的影响

CIPR4、*CIPR5* 和 *CIPR6* 是西瓜中编码几丁质酶基因，如图 2a) 所示，与对照处理相比，丛枝菌根育苗接种 FON 时，显著提高西瓜根系和叶片 *CIPR4* 表达量；图 2b) 所示，丛枝菌根育苗接种 FON 时，西瓜根系 *CIPR5* 表达量显著提高，为非丛枝菌根苗不接种 FON 处理的 2 倍；丛枝菌根育苗同时接种 FON 处理时，西瓜根系和叶片 *CIPR5* 表达量较其他处理显著提高。图 2c) 表明丛枝菌根育苗接种 FON 处理时，西瓜叶片 *CIPR6* 表达量显著高于其他处理。

CIGlu1、*CIGlu2* 和 *CIGlu3* 是西瓜中编码 β -1, 3-葡聚糖酶的基因。图 3a) 表明接种 FON 处理时西瓜根系 *CIGlu1* 表达量显著高于对照，丛枝菌根育苗接种 FON 处理时，西瓜根系 *CIGlu1* 表达量显著高于对照，相对表达量提高了 38 倍；丛枝菌根育苗接种 FON 处理时，西瓜叶片 *CIGlu1* 表达量显著高于其他处理。图 3c) 表明丛枝菌根育苗接种 FON 处理时，西瓜叶片 *CIGlu3* 表达量显著高于其他处理，

分别为丛枝菌根育苗不接种 FON、单接种 FON 和对照处理的 1.4 倍、1.3 倍、71 倍；丛枝菌根育苗不接种 FON 或单接种 FON 时，西瓜根系 *CIGlu3* 表达量均显著高于对照，且丛枝菌根育苗接种 FON 处理时，根系 *CIGlu3* 表达量显著高于其他处理。

CIPAL4、*CIPAL8* 和 *CIPAL11* 是西瓜中编码苯丙氨酸解氨酶的基因。图 4a) 表明接种 FON 处理时，根系 *CIPAL4* 表达量显著提高；丛枝菌根育苗接种 FON 处理时，西瓜根系及叶片 *CIPAL4* 表达量显著高于其他处理。图 4b) 表明，丛枝菌根育苗接种 FON 处理时，西瓜叶片 *CIPAL8* 相对表达量较其他处理显著提高。图 4c) 表明，丛枝菌根育苗接种 FON 处理时，西瓜根系 *CIPAL11* 表达量显著高于其他处理。

2.4 丛枝菌根育苗对西瓜植株抗性相关酶活性的影响

如图 5a) 所示，与对照相比，接种 AM 菌提高了西瓜根系几丁质酶活性。图 5b) 所示，在西瓜根际接种 FON 时，丛枝菌根育苗可提高西瓜叶片 β -1, 3 葡聚糖酶活性，较非丛枝菌根育苗处理提高 27.3%。

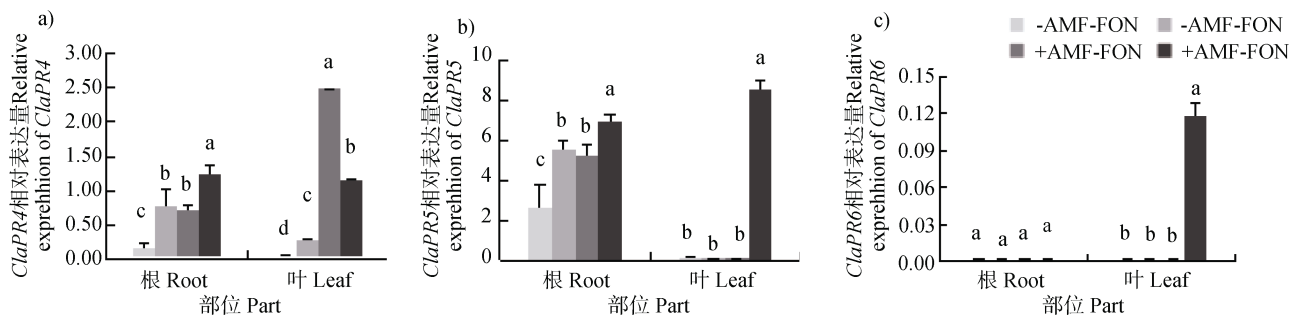


图 2 丛枝菌根育苗对西瓜叶片、根系几丁质酶编码基因表达量的影响

Fig. 2 Effects of inoculation of arbuscular mycorrhiza at the seedling stage on chitinase gene expression in leaves and roots of the watermelon

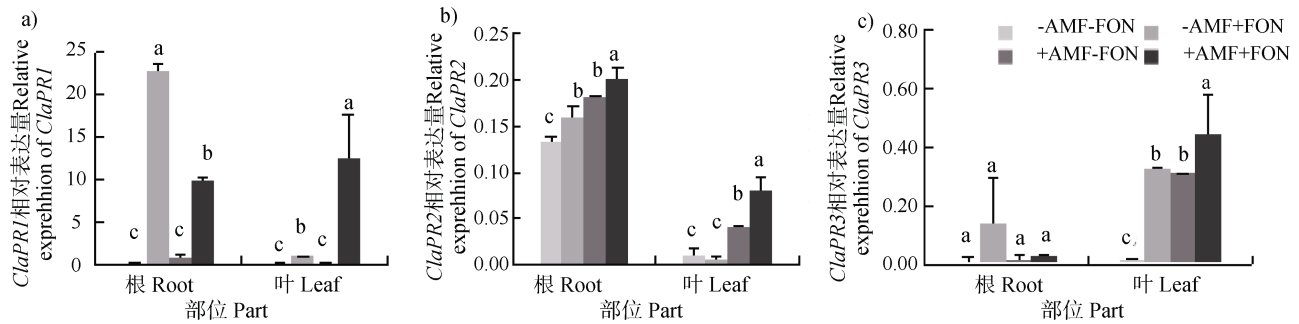


图3 丛枝菌根育苗对西瓜叶片、根系 β -1, 3 葡聚糖酶编码基因表达量的影响

Fig. 3 Effect of inoculation of arbuscular mycorrhiza at the seedling stage on β -1, 3-GA gene expression in leaves and roots of the watermelon

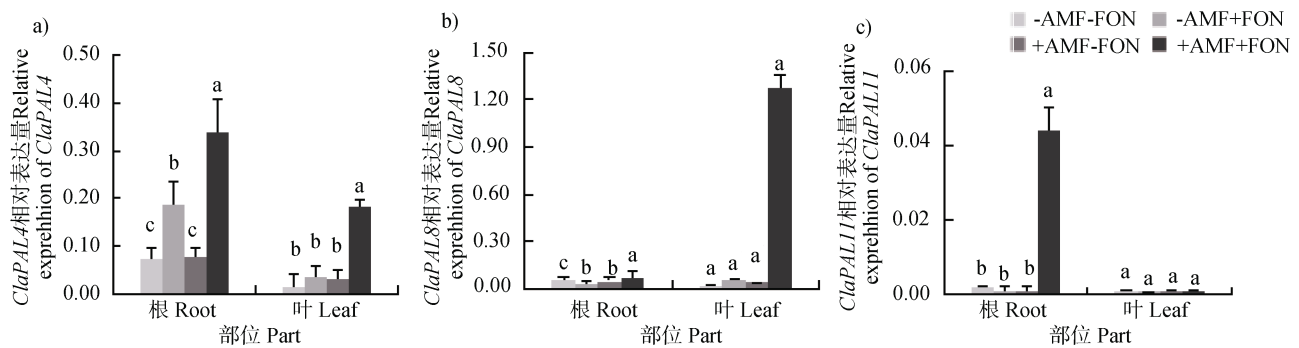


图4 丛枝菌根育苗对西瓜叶片、根系 PAL 酶编码基因表达量的影响

Fig. 4 Effect of inoculation of arbuscular mycorrhiza at the seedling stage on PAL gene expression in leaves and roots of the watermelon

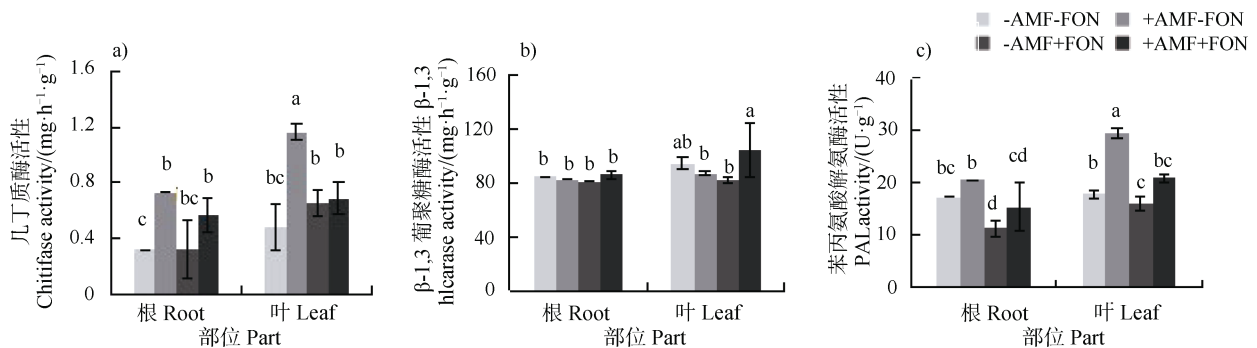


图5 接种丛枝菌根真菌 (AMF) 和尖孢镰刀菌 (FON) 对西瓜叶片、根系抗性相关酶活性的影响

Fig. 5 Effects of inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and *Fusarium oxysporum* (FON) on activities of wilt-resistance related enzymes

图5c)所示,丛枝菌根育苗接种FON、丛枝菌根育苗不接种FON以及单接种FON处理时,西瓜叶片苯丙氨酸解氨酶活性均显著高于对照处理,其中丛枝菌根育苗不接种FON处理时苯丙氨酸解氨酶活性为对照处理的1.3倍。

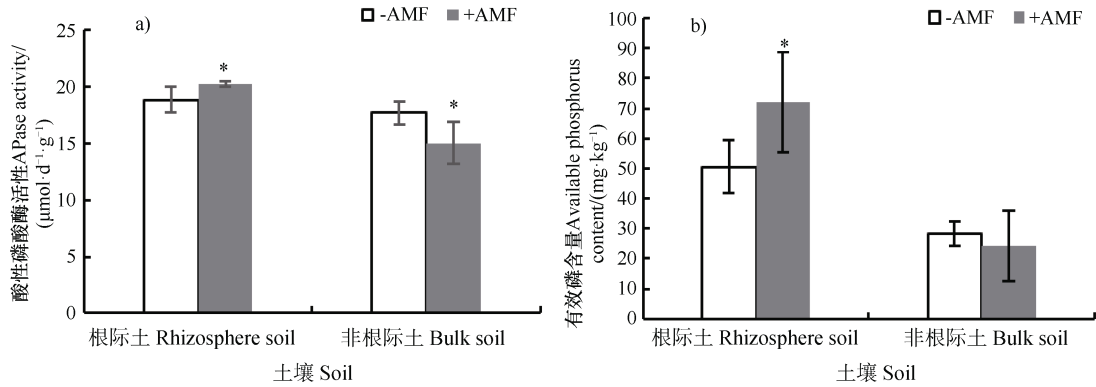
2.5 丛枝菌根育苗对西瓜根际土壤酸性磷酸酶活性的影响

如图6所示,大田试验表明,与非丛枝菌根育苗处理相比,丛枝菌根育苗显著提高了西瓜根际土

壤酸性磷酸酶活性,与非丛枝菌根育苗相比,提高了7.3%(图6a)),并显著提高西瓜根际土壤有效磷含量。

2.6 丛枝菌根育苗对西瓜发病率的影响

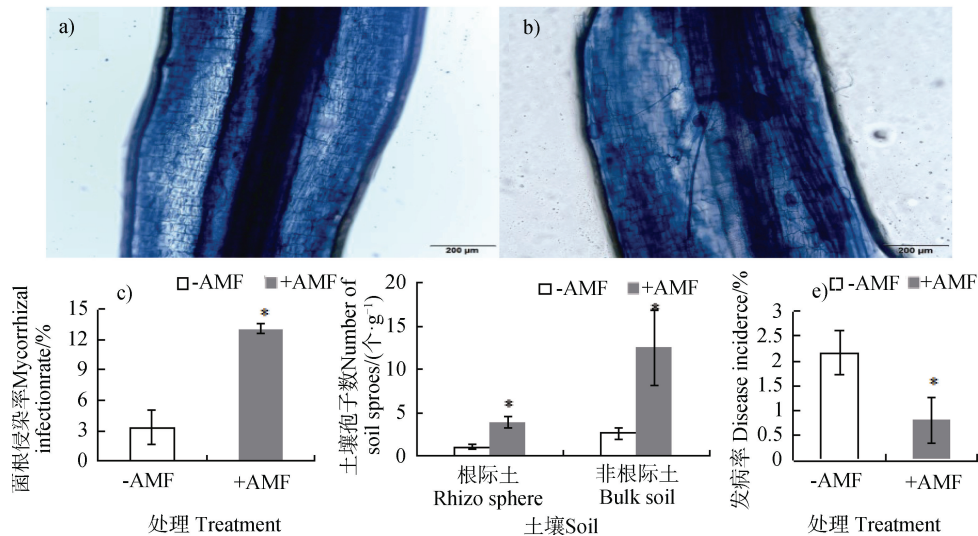
如图7所示,丛枝菌根育苗显著提高西瓜根系菌根侵染状况(图7a)、图7b)、图7c)),并且丛枝菌根育苗显著提高根际土壤及非根际土壤孢子数(图7d)),改善西瓜根系环境,显著降低了西瓜发病率(图7e))。



注：星号表示有显著性差异 ($P \leq 0.05$)。Note: * indicates significant differences at $P \leq 0.05$.

图 6 丛枝菌根育苗对土壤酸性磷酸酶活性和土壤有效磷含量的影响

Fig. 6 Effect of inoculation of arbuscular mycorrhiza at the seedling stage on APase activity and phosphorus availability in soil



注：a). 非丛枝菌根育苗根系，b). 丛枝菌根育苗根系。星号表示有显著性差异 ($P \leq 0.05$)。Note: a). control (roots of seedlings not inoculated), b). Roots of arbuscular mycorrhiza inoculated seedlings. * indicates significant differences at $P \leq 0.05$.

图 7 丛枝菌根育苗对西瓜根系菌根感染率、土壤孢子数及西瓜发病率的影响

Fig. 7 Effects of inoculation of arbuscular mycorrhizal at the seedling stage on mycorrhizal infection rate, number of spores in soil and wilt incidence of the watermelon crop

2.7 丛枝菌根育苗对成熟期西瓜生物量及磷吸收量的影响

如表 4 所示，大田试验表明，丛枝菌根育苗处理下，西瓜地上部干物质质量显著高于非丛枝菌根育苗处理；丛枝菌根育苗显著降低西瓜根、茎、叶、瓜皮的磷吸收量；丛枝菌根育苗处显著提高西瓜单瓜生物量。

3 讨论

植物形成丛枝菌根提高抗生物胁迫和非生物

胁迫的能力。丛枝菌根植物提高抗逆能力的可能机制有：

3.1 提高植物抗性相关酶活性

几丁质和葡聚糖是真菌细胞壁的主要成分，几丁质酶和 β -1, 3 葡聚糖酶通过降解菌丝细胞壁，破坏菌丝端部生长而使其顶端细胞壁变薄，导致病原体死亡而降低病害发生^[20]。苯丙氨酸解氨酶催化 L-苯丙氨酸脱氨生成反式肉桂酸，进一步合成植保素、木质素和酚类等抗病性次生代谢物^[21]。叶片是 PAL 酶活性高效表达的部位，PAL 酶活性表达呈周期性

表 4 丛枝菌根育苗下成熟期西瓜生物量及磷吸收量

Table 4 Effects of inoculation of arbuscular mycorrhizal at the seedling stage on growth and phosphorus absorption of watermelon

处理 Treatment	地上部干物质量	地下部干物质量	磷吸收量				单瓜生物量 Biomass per melon/kg
	Dry biomass of shoot / (g·plant ⁻¹)	Dry biomass of root / (g·plant ⁻¹)	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	瓜皮 Rind	
-AMF	17.05±1.68	3.28±0.41	5.95±0.59	157.9±21.84	518.7±98.63	2.27±0.02	4.57±0.86
+AMF	23.65±2.14*	3.34±0.06	4.78±0.34*	91.39±4.83*	229.3±7.43*	1.73±0.05*	6.30±0.72*

注: *表示处理间有显著性差异 ($P \leq 0.05$)。Note: * indicates significant difference between treatments at $P \leq 0.05$.

变化, PAL 酶活性与枯萎病抗性呈正相关^[22]。本研究结果进一步证实, 西瓜在苗期形成丛枝菌根, 诱导表达的抗性相关酶基因, 在移栽大田后表达量仍处于上调的水平, 具有较高的抗枯萎病能力。主要有根系几丁质酶编码基因 *CIPR4*、*CIPR5* 上调 (图 2a), 图 2b)), 根系 β -1, 3 葡聚糖酶编码的 *ClGlu1* 基因上调 (图 3a)), 以及编码 PAL 酶的 *CIPAL4* 基因在西瓜叶片及根系中的表达量均上调 (图 4a))。而且通过对菌根豌豆根系中病原菌 *Aphanomyces euteiches* 的肽酶活性和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性的关系研究, 证实了真菌提高植物的抗病性并不是减少了病原菌的生物量, 而是抑制了病原菌酶的活性^[23]。本研究进一步证实, 培育丛枝菌根苗, 西瓜移栽后能够保持抗病性, 显著降低西瓜枯萎病发病率及病情指数 (表 2)。西瓜在发生枯萎病害时, 组织内的相关抗病基因表达量提高, AM 真菌的定殖也上调西瓜根系 *ClPR4*、*ClPR5*、*ClGlu3* 和 *ClPAL4* 的表达量, 提高西瓜的抗病性。

3.2 促进植物矿质养分吸收, 提高植物抗病性

AM 真菌与植物根系共生可产生互惠互利的生态效应, 其根外菌丝可增强对土壤养分和水分的吸收, 尤其是有效提高了植物组织中的磷含量, 提高植物抗逆性。植物磷营养的改善对植物的抗逆能力有显著的提高效果^[24-25], 丛枝菌根通过菌丝体促进根系对水分和土壤矿质养分的吸收^[26], 提高植物抗逆能力。酸性磷酸酶催化有机磷水解, 产生植物可吸收的无机磷。植物根系酸性磷酸酶基因表达量上调, 提高根系分泌酸性磷酸酶活性, 进而增强根际土壤酸性磷酸酶活性, 从而提高植物利用有机磷的能力^[27]。本研究进一步证实, 丛枝菌根化育苗显著提高根际土壤酸性磷酸酶活性 (图 6a)), 水解根际有机磷, 提高根际土壤中磷的有效性, 也提高了根

际土壤中有效磷含量 (图 6b))。因此, 培育丛枝菌根西瓜苗, 在移栽后仍可有效提高西瓜根际土壤酸性磷酸酶活性, 增强根系利用有机磷的能力, 改善西瓜磷营养, 从而提高西瓜抗枯萎病的能力。

3.3 其他可能机制

(1) 抑制根际环境中的病原菌数量。番茄形成丛枝菌根, 显著降低根际土壤中番茄专化型尖孢镰刀菌数量, 有效防控番茄枯萎病^[28]。(2) 调控植物根际微生物区系结构。丛枝菌根育苗提高了西瓜根际土壤的孢子数 (图 7e)), 改善了根际微生物环境。

4 结 论

西瓜在发生枯萎病害时, AM 真菌的定殖通过上调西瓜根系 *ClPR4*、*ClPR5*、*ClGlu3* 和 *ClPAL4* 的表达量, 提高抗病相关酶活性, 从而提高西瓜的抗病性; 丛枝菌根育苗能够改善根际微生物环境, 并通过提高根际土壤酸性磷酸酶活性促进难溶磷的水解, 提高土壤有效磷含量, 从而促进西瓜对养分的吸收, 提高西瓜抗病能力, 降低西瓜枯萎病发病指数, 有效防控枯萎病。

参考文献 (References)

- [1] Zhang L, Yang Y T, Wen C C, et al. China's watermelon market situation and its prospect [J]. Agricultural Outlook, 2015, 11 (6): 21—24. [张琳, 杨艳涛, 文长存, 等. 中国西瓜市场分析 with 展望 [J]. 农业展望, 2015, 11 (6): 21—24.]
- [2] You C, Sun X X. Status and development suggestions of watermelon and melon industry in Jiangsu Province [J]. China Cucurbits and Vegetables, 2017, 30 (7): 35—37. [尤春, 孙兴祥. 江苏省西瓜甜瓜产业现状与发展建议 [J]. 中国瓜菜, 2017, 30 (7): 35—37.]
- [3] Cao Y, Song X C, Guo D J, et al. Prevention and control of watermelon *Fusarium* wilt by dazomet fumigation

- combined with bio-organic fertilizer [J]. *Soils*, 2018, 50 (1): 93—100. [曹云, 宋修超, 郭德杰, 等. 棉隆熏蒸与微生物有机肥联用对西瓜枯萎病的防控研究[J]. 土壤, 2018, 50 (1): 93—100.]
- [4] Keinath A P, Coolong T W, Lanier J D, et al. Managing *Fusarium* wilt of watermelon with delayed transplanting and cultivar resistance [J]. *Plant Disease*, 2019, 103 (1): 44—50.
- [5] Yang Z, Dai C C, Wang X X, et al. Advance in research on rhizosphere microbial mechanisms of crop soil-borne fungal diseases [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (1): 12—22. [杨珍, 戴传超, 王兴祥, 等. 作物土传真菌病害发生的根际微生物机制研究进展[J]. 土壤学报, 2019, 56 (1): 12—22.]
- [6] Zhou Y, Li X, Gao Y, et al. Plant endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi alter plant competition [J]. *Functional Ecology*, 2018, 32 (5): 1168—1179.
- [7] Chitarra W, Pagliarani C, Maserti B, et al. Insights on the impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on tomato tolerance to water stress [J]. *Plant Physiology*, 2016, 171: 1009—1023
- [8] Yu X M, Zheng F C. Progress on study of the Watermelon Wilt and the anti-*Fusarium* wilt breeding [J]. *Life Science Research*, 2006, 10 (S3): 90—94. [余贤美, 郑服丛. 西瓜枯萎病及抗性育种研究进展[J]. 生命科学研究, 2006, 10 (S3): 90—94.]
- [9] Chen K, Sun J Q, Liu R J, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on the seedling growth of grafted watermelon and the defensive enzyme activities in the seedling roots [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24 (1): 135—141. [陈可, 孙吉庆, 刘润进, 等. 丛枝菌根真菌对西瓜嫁接苗生长和根系防御性酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24 (1): 135—141.]
- [10] Duan L, Liu H B, Li X H, et al. Multiple phytohormones and phytoalexins are involved in disease resistance to *Magnaporthe oryzae* invaded from roots in rice [J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 152 (3): 486—500.
- [11] Hou S W, Hu J L, Wu F Y, et al. The function and potential application of disease suppression by arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24 (5): 941—951. [侯劭炜, 胡君利, 吴福勇, 等. 丛枝菌根真菌的抑病功能及其应用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24 (5): 941—951.]
- [12] Wang Y, Ding G J. Influence of ectomycorrhiza on nutrient absorption of *Pinus massoniana* seedlings under water stress [J]. *Forest Research*, 2013, 26 (2): 227—233. [王艺, 丁贵杰. 水分胁迫下外生菌根对马尾松幼苗养分吸收的影响[J]. 林业科学研究, 2013, 26 (2): 227—233.]
- [13] Wang Y J, An W, Luo Q, et al. Research on enlargement reproducing of AMF microbial inoculum and growing seedling technology of wolfberry with mycorrhization [J]. *Northern Horticulture*, 2014 (5): 139—143. [王亚军, 安巍, 罗青, 等. 丛枝菌根真菌菌剂扩繁及菌根化枸杞育苗技术研究[J]. 北方园艺, 2014 (5): 139—143.]
- [14] Li C, He C X, Yan Y, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation at different stage on yield and nutrient quality of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in plastic tunnel [J]. *China Vegetables*, 2014 (8): 21—24. [李聪, 贺超兴, 闫妍, 等. 不同时期接种 AM 真菌对大棚黄瓜产量及品质的影响[J]. 中国蔬菜, 2014 (8): 21—24.]
- [15] Xiao L. Investigation of the effect of arbuscular mycorrhizal on nutrients absorption and disease resistance of watermelon [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. [肖靓. 丛枝菌根育苗提高西瓜养分吸收和抗病能力的效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.]
- [16] Veresoglou S D, Shaw L J, Sen R. *Glomus intraradices* and *Gigaspora margarita* arbuscular mycorrhizal associations differentially affect nitrogen and potassium nutrition of *Plantago lanceolata* in a low fertility dune soil [J]. *Plant and Soil*, 2011, 340 (1/2): 481—490.
- [17] Hao W Y, Ren L X, Ran W, et al. Allelopathic effects of root exudates from watermelon and rice plants on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum* [J]. *Plant and Soil*, 2010, 336 (1/2): 485—497.
- [18] Dong C J, Shang Q M. Genome-wide characterization of phenylalanine *Ammonia*-lyase gene family in watermelon (*Citrullus lanatus*) [J]. *Planta*, 2013, 238 (1): 35—49.
- [19] Ren L X, Huo H W, Zhang F, et al. The components of rice and watermelon root exudates and their effects on pathogenic fungus and watermelon defense [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, 11 (6): e1187357. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1187357>.
- [20] Wang X Y, Ding T T, Li Y Z, et al. Effects of an arbuscular mycorrhizal fungus and a *Rhizobium* species on *Medicago sativa* wilt and *Fusarium oxysporum* root rot [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28 (8): 139—149. [王晓瑜, 丁婷婷, 李彦忠, 等. AM 真菌与根瘤菌对紫花苜蓿镰刀菌萎蔫和根腐病的影响[J]. 草业学报, 2019, 28 (8): 139—149.]
- [21] Xie K Z, Liu J Q, Ren L, et al. Advances in phenylalanine metabolism and its enzyme genes in sweet potato [J]. *Botanical Research*, 2019, 8 (4): 355—365. [谢开珍, 刘佳琪, 任磊, 等. 甘薯苯丙烷类代谢及其酶基因研究进展[J]. 植物学研究, 2019, 8 (4): 355—365.]
- [22] Li Y, Zhang X H, Yu K, et al. Physiological mechanism of different varieties and potassium application amounts on cotton resistance to *Verticillium* wilt [J]. *Cotton Science*, 2019, 31 (1): 40—53. [李岩, 张希鹤, 郁凯, 等. 不同棉花品种及施钾量对黄萎病抗性生理机制的影响[J]. 棉花学报, 2019, 31 (1): 40—53.]

- [23] Kjølner R, Rosendahl S. Enzymatic activity of the mycelium compared with oospore development during infection of pea roots by *Aphanomyces euteiches*[J]. *Phytopathology*, 1998, 88 (9): 992—996.
- [24] Xiang D B, Guo K, Lei T, et al. Effects of phosphorus and potassium on stem characteristics and lodging resistance of relay cropping soybean[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2010, 32 (3): 395—402. [向达兵, 郭凯, 雷婷, 等. 磷钾营养对套作大豆茎秆形态和抗倒性的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2010, 32 (3): 395—402.]
- [25] Wang D M, Zhou J H, Zhu X L, et al. Effects of P, Ca, and Zn on growth, protective enzyme and osmoregulating matter of tobacco[J]. *Soils*, 2000, 32 (1): 34—37, 46. [汪邓民, 周冀衡, 朱显灵, 等. 磷钙锌对烟草生长、抗逆性保护酶及渗透物的影响[J]. *土壤*, 2000, 32 (1): 34—37, 46.]
- [26] Li S P, Chen P Z, Liu H F, et al. Mechanism and ecological effects of arbuscular mycorrhizal fungi on improving salt tolerance of plants in coastal saline-alkaline land[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2019, 28 (2): 411—418. [李少朋, 陈岫圳, 刘惠芬, 等. 丛枝菌根提高滨海盐碱地植物耐盐性的作用机制及其生态效应[J]. *生态环境学报*, 2019, 28 (2): 411—418.]
- [27] Wang B S, Li S J, Zhang S H, et al. Responses of acid phosphatase secreted by watermelon roots to organic manure nutrition[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (2): 454—465. [王兵爽, 李淑君, 张舒桓, 等. 西瓜根系分泌酸性磷酸酶对有机肥营养的响应[J]. *土壤学报*, 2019, 56 (2): 454—465.]
- [28] Ren L X, Lou Y S, Sakamoto K, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal colonization on microbial community in rhizosphere soil and Fusarium Wilt disease in tomato[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2010, 41 (11): 1399—1410.

(责任编辑: 陈荣府)