

摩西管柄囊霉与连作大豆根腐病原菌尖孢镰刀菌的相互关系研究

接伟光¹, 于文杰², 蔡柏岩²

(1. 黑龙江东方学院 食品与环境工程学部, 黑龙江 哈尔滨 150066; 2. 黑龙江大学 生命科学学院/黑龙江省普通高等学校微生物重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 以黑农44(高脂肪品种)大豆品种作为试验材料,以不同方式在连作大豆根际土壤中接种摩西管柄囊霉(*Funneliformis mosseae*)和大豆根腐病原菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。采用传统形态学方法检测*Fu. mosseae*和*F. oxysporum*侵染大豆植株根系情况。利用实时荧光定量PCR技术分析*Fu. mosseae*和*F. oxysporum*DNA含量变化。结果表明:*Fu. mosseae*和*F. oxysporum*均能侵染大豆植株根系,但接种*Fu. mosseae*的大豆植株根系及根际土壤样品中*F. oxysporum*DNA含量显著降低,表明*Fu. mosseae*对*F. oxysporum*具有强烈的抑制作用。本研究为进一步研究AM真菌克服大豆连作障碍提供了理论依据。

关键词: 大豆; 摩西管柄囊霉; 尖孢镰刀菌; 连作

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0637

Research on the Relationship Between *Funneliformis mosseae* and the Root Rot Pathogen *Fusarium Oxysporum* in the Continuous Cropping of Soybean

JIE Wei-guang¹, YU Wen-jie², CAI Bai-yan²

(1. Department of Food and Environment Engineering, East University of Heilongjiang, Harbin 150086, China; 2. Key Laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: In this study, Heilong 44 (a high-fat cultivar) soybean cultivar was selected as materials. *Funneliformis mosseae* and the root rot pathogen *Fusarium oxysporum* were inoculated into the soybean continuous cropping soil in different treatments. The colonisation rates of *Fu. mosseae* and disease incidences of *F. oxysporum* were analyzed statistically, respectively. Quantitative PCR was applied to analyze the DNA content of *Fu. mosseae* and *F. oxysporum*. The results showed that both *Fu. mosseae* and *F. oxysporum* could infect the soybean roots. However, the DNA content of *F. oxysporum* clearly decreased in soybean root and rhizosphere soil samples after the inoculation with *Fu. mosseae*. It might indicate inhibitive effects of *Fu. mosseae* over *F. oxysporum*. It provides theoretical evidence on the AM fungi to overcome the obstacles of soybean continuous cropping.

Keywords: Soybean; *Funneliformis mosseae*; *Fusarium oxysporum*; Continuous cropping

大豆根腐病致病菌主要为尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、粉红粘帚菌、半裸镰刀菌、疫霉菌以及腐霉菌等,其中尖孢镰刀菌是黑龙江省大豆根腐病的主要致病菌^[1-2]。连作可加剧大豆根腐病等土传病害的发生,一方面,连作种植环境在一定程度上抑制了土壤中部分有益微生物的活性,致使致病菌大量繁殖,进而改变了土壤中原有的微生物区系^[3]。另一方面,连作土壤的温湿度、作物的根系分泌物以及植株残茬腐解物在一定程度上也为致病菌的生长繁殖提供了必要条件^[4-5]。

丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal,AM)真菌是自然界中普遍存在的一种寡营养活体微生物,它是根际土壤的主要成分之一^[6]。AM真菌能够显著提高寄主植物对营养元素的吸收,促进植株生长,增强植物的抗病性、抗干旱、盐碱以及重金属等逆境

能力^[7-9]。同时,AM真菌在维持生态系统多样性以及微生态系统稳定性等方面也具有重要的作用^[10-11]。目前,有关AM真菌的接种效应已在多种作物的研究中得到证实,如接种根内球囊霉(*Glomus intraradices*)能够促进根系中胼胝质的沉积,使黄瓜免受炭疽菌(*Colletotrichum orbiculare*)的毒害作用^[12];接种摩西球囊霉后草莓地上部分和根系中草莓枯萎病病害发生率显著下降^[13]。作物长期连作,能够造成作物根际土壤微生物菌群结构发生变化、次级代谢产物富集以及根际土壤性质发生变化,导致作物病害发病等级逐年上升^[4]。而将AM真菌接种于连作大豆土壤中,研究其与大豆根腐病原菌之间的关系却鲜有报道。因此,本研究对AM真菌与大豆根腐病原菌之间关系进行研究,探索连作大豆田优势AM真菌与黑龙江省连作大豆田根腐病

收稿日期: 2016-01-26

基金项目: 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划(1254G049)。

第一作者简介: 接伟光(1981-),男,博士,副教授,主要从事微生物生态学研究。E-mail: jieweiguang2007@126.com。

通讯作者: 蔡柏岩(1968-),男,博士,教授,主要从事生态学研究。E-mail: caibaiyan@126.com。

的主要致病菌之间的关系。

本研究选用黑龙江省种植面积较大且具有代表性的大豆品种黑农44作为试验材料,在连作大豆根际土壤中采用不同方式接种课题组成员从连作大豆根际土壤中筛选扩繁获得的摩西管柄囊霉(*Funneliformis mosseae*) (中国普通微生物菌种保藏管理中心 No. 3013)和黑龙江省大豆根腐病的主要致病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。通过传统形态学方法分别在大豆根腐病发病高峰的苗期和分枝期检测 *Fu. mosseae* 和 *F. oxysporum* 对大豆植株根系的侵染情况。同时,利用实时荧光定量PCR技术分析大豆植株根系以及根际土壤中 *Fu. mosseae* 和 *F. oxysporum* DNA含量变化,进而表明 *Fu. mosseae* 和 *F. oxysporum* 的相互关系,同时为解决连作大豆根腐病减产问题提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验选用黑龙江省种植面积较大的大豆品种黑农44(高脂肪品种,蛋白质含量平均为36.06%,脂肪含量平均为23.01%;记为HN44)作为试验材料。

1.2 供试菌剂

摩西管柄囊霉(*Funneliformis mosseae*)菌剂由本课题组成员从连作大豆根际土壤中筛选扩繁获得。*Fu. mosseae*菌剂使用前经三叶草扩繁,基质为河沙。菌根菌剂使用前去除植物地上部分,将根系剪碎,与基质混匀,风干后使用。菌根菌剂包括 *Fu. mosseae*孢子、菌丝、侵染根段以及基质,每克菌剂含有20~30个孢子。

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)由黑龙江大学微生物重点实验室提供。将 *F. oxysporum*接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA Medium) 28℃培养3~4d,加入无菌生理盐水,刮下孢子,充分振荡混匀,用无菌脱脂棉过滤,稀释制成 1×10^7 cfu·mL⁻¹的孢子悬浮液。取1 mL孢子悬液加入100 mL PDA培养基中,混匀后倒平皿,28℃恒温培养7d,即得含 *F. oxysporum*的琼脂平板。将高粱粒煮沸5 min,滤干,取100 g加入250 mL的三角瓶中,121℃灭菌20 min后,接种直径7 mm已活化7d的 *F. oxysporum*菌块10~12块。28℃暗培养10d,且每天将其充分摇匀1次,粉碎即得 *F. oxysporum*菌剂。

1.3 试验设计

试验采用盆栽,将2 kg的连作大豆根际土壤分别与45 g *Fu. mosseae*菌剂和45 g *F. oxysporum*菌剂

充分混匀后,装盆,作为对照。另将45 g *Fu. mosseae*菌剂和45 g *F. oxysporum*菌剂共同接种于2 kg连作大豆根际土壤中作为试验组。各处理均播种HN44,每盆8粒,最后保苗3株。每组处理9个重复。管理同生产田,生育期正常浇水,在大豆根腐病发病高峰的苗期和分枝期取样。

1.4 样品采集及DNA的提取

分别在不同处理条件下种植HN44品种,分别在30 d(苗期)和60 d(分枝期)取样。去除土壤表层杂物,用打孔器在根际土壤中随机打孔采集大豆植株根系及根际土壤。每个处理随机选取3盆,将同种处理的大豆根系和土壤分别混匀组成一个混合样品。

根样DNA的提取方法参照龙良鲲等^[14]采用的方法,土样DNA的提取采用Omega基因组DNA提取系列E. Z. N. A.® Soil DNA Kit。

1.5 *Fu. mosseae*和*F. oxysporum*对大豆植株根系的侵染情况

分别从各根系样品中随机选取50条须根根段进行染色、制片、镜检,观察各根段的AM真菌侵染情况,并统计各组根样的AM真菌侵染率^[15],3次重复。

随机选取不同处理各根系样品,观察各根系 *F. oxysporum*发病情况,并统计根系发病率,3次重复。

1.6 实时荧光定量PCR

利用NCBI数据库的核酸序列搜索程序(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez)获得 *Fu. mosseae*和 *F. oxysporum*的18S rDNA区域序列。使用Advanced BLAST 2.0分别对 *Fu. mosseae*和 *F. oxysporum* 18S rDNA序列进行比对,采用Primer Express 1.0(PE Applied Biosystems, Foster, CA, USA)对相似性最低的序列设计引物和TaqMan™荧光探针(表1)。探针用FAM(6-羧基荧光素)进行标记,以TAMRA(6-羧基四甲基罗丹明)作为猝灭剂。

表1 引物和探针序列

引物 Primer/探针 Probe	序列 Sequence
18S rDNA-F	5'-CCGAGTGC GGTCCTTT-3'
18S rDNA-R	5'-CGAAGCAACAGGTTACAATAGACA-3'
<i>Fu. mosseae</i> -F	5'-TTCGCGGGATGGGATCT-3'
<i>Fu. mosseae</i> -R	5'-TTTATGACATTCAAAACCGATGTTG-3'
<i>Fu. mosseae</i> -PROBE	5'-TTGCTGACTTTTTTCGTACGGT-3'
<i>F. oxysporum</i> -F	5'-GCCCCGCCCACTATTCT-3'
<i>F. oxysporum</i> -R	5'-TGTGCTTGAGGGTTGAAATGAC-3'
<i>F. oxysporum</i> -PROBE	5'-CGGGCATGCCTGTT-3'

分别扩增 *Fu. mosseae* 和 *F. oxysporum* 的 18S rDNA 序列,PCR 反应体系为 50 μL : 10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+}) 5 μL , 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 4 μL , 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 18S rDNA-F 5 μL , 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 18S rDNA-R 5 μL , 5U *Taq* 聚合酶 0.2 μL , 模板 DNA 2 μL , 加无菌双蒸水至 50 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 54 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。将扩增产物克隆至 PCR 2.1 载体(Invitrogen, USA)后稀释至 10^8 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 作为 qPCR 模板。

Fu. mosseae 的 qPCR 反应体系为 25 μL : 1 \times buffer 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 *Fu. mosseae*-F 和 *Fu. mosseae*-R, 400 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TaqMan 探针 *Fu. mosseae*-PROBE (FAM-labelled), 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 模板 DNA 2 μL , 无菌双蒸水作为空白对照。反应条件为: 52 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 40 个循环。*F. oxysporum* 的 qPCR 反应体系中除所用引物为 *F. oxysporum*-F 和 *F. oxysporum*-R, 探针为 *F. oxysporum*-PROBE, 反应条件中退火温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 外, 其他均与 *Fu. mosseae* 的 qPCR 反应体系和条件相同。反应使用 ABI Prism 7000(PE Applied Biosystems, Foster, CA, USA) 序列检测器进行。使用 ABI 软件基于绝对定量的方法计算循环阈值 (cycle threshold, Ct) 并对其进行分析。以高于初始 PCR 循环标准偏差 10 倍的浓度作为阈值的荧光强度, 高于阈值的荧光值为阳性, PCR 循环中荧光值超出阈值被定义为 Ct。每个样品 3 次重复, 并以 DNase 和 RNase 处理的无菌双蒸水作对照。取每次 qPCR 扩增产物各 5 μL , 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 数据分析

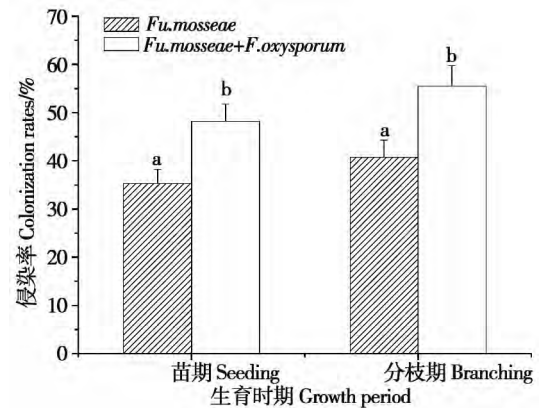
应用 SPSS 17.0 软件采用独立样本 *t* 检验的方法分别对不同处理间大豆植株根系及根际土壤 *Fu. mosseae* DNA 含量和 *F. oxysporum* DNA 含量结果进行差异显著性分析, 95% 的置信区间。

2 结果与分析

2.1 接种 *F. oxysporum* 对 *Fu. mosseae* 侵染率的影响

从大豆根腐病发病高峰的苗期和分枝期 *Fu. mosseae* 侵染率(图 1)可知, 同一处理下分枝期 *Fu. mosseae* 侵染率均高于苗期 *Fu. mosseae* 侵染率, 且接种 *F. oxysporum* 后 *Fu. mosseae* 侵染率均明显高于未接种 *F. oxysporum* 的对照组 *Fu. mosseae* 侵染率, 表明接种 *F. oxysporum* 有益于促进 *Fu. mosseae* 对大豆植株根系的侵染, 因此同时接种

两种菌剂后 *Fu. mosseae* 侵染率均显著增加。



不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below.

图 1 接种 *F. oxysporum* 对 *Fu. mosseae* 侵染率的影响

Fig. 1 The effect of inoculation with *F. oxysporum* on the colonization rate of *Fu. mosseae*.

2.2 接种 *Fu. mosseae* 对 *F. oxysporum* 发病率的 影响

大豆根腐病发病高峰的苗期和分枝期 *F. oxysporum* 发病率如图 2, 单独接种 *F. oxysporum* 的对照组 *F. oxysporum* 发病率均显著高于同时接种 *F. oxysporum* 和 *Fu. mosseae* 的试验组 *F. oxysporum* 发病率, 尤其是大豆根腐病发病高峰的分枝期单独接种 *F. oxysporum* 的对照组中 *F. oxysporum* 发病率高达 83.3%, 而接种 *Fu. mosseae* 后 *F. oxysporum* 发病率显著降低, 仅为 20.7%, 表明接种 *Fu. mosseae* 有助于抑制大豆根腐病的发生。

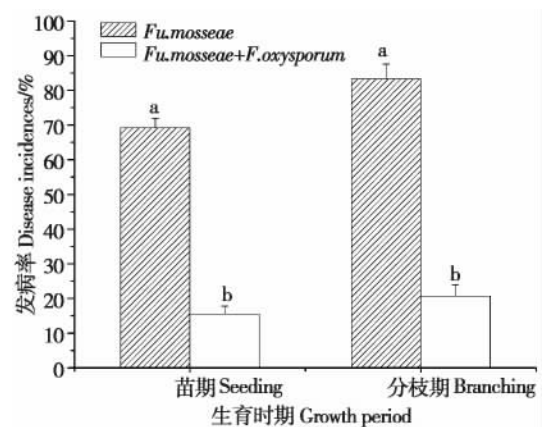


图 2 接种 *Fu. mosseae* 对 *F. oxysporum* 发病率的影响

Fig. 2 The effect of inoculation with *Fu. mosseae* on the disease incidence of *F. oxysporum*.

2.3 不同处理间 *Fu. mosseae* DNA 含量定量分析

由表 2 可知, 接种 *F. oxysporum* 处理后根系样品中 *Fu. mosseae* DNA 含量均值与接种前均值比较

P 值均 < 0.01 , 差异极显著。接种 *F. oxysporum* 后苗期和分枝期大豆植株根系样品中 *Fu. mosseae* DNA 含量均显著增加, 表明接种 *F. oxysporum* 能够促进

Fu. mosseae 对大豆植株根系的侵染。此结果与上述接种 *F. oxysporum* 对 *Fu. mosseae* 侵染率的影响研究结果一致。

表2 不同处理间根系样品 *Fu. mosseae* DNA 含量 t 检验结果

Table 2 t -test results of the DNA content of *Fu. mosseae* in root samples under different treatments

生育时期 Development	R1 /copies·ng ⁻¹ -DNA	FR /copies·ng ⁻¹ -DNA	t	P
苗期 Seedling stage	$1.02 \times 10^2 \pm 28.3$	$1.37 \times 10^3 \pm 2.96 \times 10^2$	-5.06	0.004
分枝期 Branching stage	$1.16 \times 10^3 \pm 3.70 \times 10^2$	$1.82 \times 10^4 \pm 4.58 \times 10^3$	-6.42	0.003

R1 表示接种 *Fu. mosseae* 的根系样品; FR 表示接种 *Fu. mosseae* 与 *F. oxysporum* 的根系样品; 所有数值均为 3 次重复的平均值。

R1 represents root samples inoculated with *Fu. mosseae*; FR represents root samples inoculated with both *Fu. mosseae* and *F. oxysporum*; all values are the mean of three replicates. Numbers followed by '±' are the standard errors (SEs).

从不同处理间大豆根际土壤样品 *Fu. mosseae* DNA 含量 t 检验结果分析(表3)可知, 接种 *F. oxysporum* 后根际土壤样品中 *Fu. mosseae* DNA 含量均值与接种前均值比较 P 值均 < 0.01 , 差异极显著。由表3可知, 大豆根际土壤中接种 *F. oxysporum*

后苗期和分枝期根际土壤中 *Fu. mosseae* DNA 含量均显著增加, 这进一步表明接种 *F. oxysporum* 能够有效地促进 *Fu. mosseae* 的活性, 进而有利于 *Fu. mosseae* 对大豆植株根系的侵染。

表3 不同处理间根际土壤样品 *Fu. mosseae* DNA 含量 t 检验结果

Table 3 t -test results of the DNA content of *Fu. mosseae* in rhizosphere soil samples under different treatments

生育时期 Growth stage	S1 /copies·ng ⁻¹ -DNA	FS /copies·ng ⁻¹ -DNA	t	P
苗期 Seedling stage	$1.23 \times 10^2 \pm 35.6$	$1.18 \times 10^3 \pm 3.17 \times 10^2$	-4.81	0.009
分枝期 Branching stage	$1.15 \times 10^3 \pm 5.04 \times 10^2$	$1.62 \times 10^4 \pm 4.31 \times 10^3$	-6.01	0.004

S1 表示接种 *Fu. mosseae* 的根际土壤样品; FS 表示接种 *Fu. mosseae* 与 *F. oxysporum* 的根际土壤样品; 所有数值均为 3 次重复的平均值。

S1 represents soil samples inoculated with *Fu. mosseae*; FS represents soil samples inoculated with both *Fu. mosseae* and *F. oxysporum*; all values are the mean of three replicates. Numbers followed by '±' are the standard errors (SEs).

2.4 不同处理间 *F. oxysporum* DNA 含量定量分析

接种 *Fu. mosseae* 后大豆植株根系样品中 *F. oxysporum* DNA 含量均值与接种前均值比较 P 值均 < 0.01 (表4), 差异极显著。由表4可知, 接种 *Fu. mosseae* 后苗期和分枝期大豆植株根系样品中

F. oxysporum DNA 含量均显著降低, 表明 *Fu. mosseae* 能够在一定程度上抑制 *F. oxysporum* 对大豆植株根系的侵染, 从而降低 *F. oxysporum* 的发病率。此结果与上述接种 *Fu. mosseae* 对 *F. oxysporum* 发病率的影响研究结果一致。

表4 不同处理间根系样品 *F. oxysporum* DNA 含量 t 检验结果

Table 4 t -test results of the DNA content of *F. oxysporum* in root samples under different treatments

生育时期 Growth stage	R2 /copies·ng ⁻¹ -DNA	FR /copies·ng ⁻¹ -DNA	t	P
苗期 Seedling stage	$1.16 \times 10^4 \pm 2.96 \times 10^3$	66.13 ± 6.44	6.75	0.003
分枝期 Branching stage	$1.48 \times 10^5 \pm 2.02 \times 10^4$	1186.67 ± 104.08	12.54	0.000

R2 表示接种 *F. oxysporum* 的根系样品; FR 表示接种 *Fu. mosseae* 与 *F. oxysporum* 的根系样品; 所有数值均为 3 次重复的平均值。

R1 represents root samples inoculated with *Fu. mosseae*; FR represents root samples inoculated with both *Fu. mosseae* and *F. oxysporum*; all values are the mean of three replicates. Numbers followed by '±' are the standard errors (SEs).

由表5可知, 接种 *Fu. mosseae* 处理后无论是苗期还是分枝期根际土壤样品中 *F. oxysporum* DNA 含量均值与接种前均值比较 P 值亦均 < 0.01 , 差异极显著。可见, 接种 *Fu. mosseae* 后根际土壤样品中

F. oxysporum DNA 含量均显著降低, 表明 *Fu. mosseae* 对 *F. oxysporum* 具有较强的抑制作用, 从而在一定程度上降低了 *F. oxysporum* 的发病率。

表 5 不同处理间根际土壤样品 *F. oxysporum* DNA 含量 *t* 检验结果Table 5 *t*-test results of the DNA content of *F. oxysporum* in rhizosphere soil samples under different treatments

生育时期 Growth stage	S2	FS	<i>t</i>	<i>P</i>
	/copies·ng ⁻¹ -DNA	/copies·ng ⁻¹ -DNA		
苗期 Seedling stage	1.16 × 10 ⁴ ± 2.96 × 10 ³	66.13 ± 6.44	6.75	0.003
分枝期 Branching stage	1.48 × 10 ⁵ ± 2.02 × 10 ⁴	1186.67 ± 104.08	12.54	0.000

S2 表示接种 *Fu. mosseae* 的根际土壤样品; FS 表示接种 *Fu. mosseae* 与 *F. oxysporum* 的根际土壤样品; 所有数值均为 3 次重复的平均值。

S2 represents soil samples inoculated with *Fu. mosseae*; FS represents soil samples inoculated with both *Fu. mosseae* and *F. oxysporum*; all values are the mean of three replicates. Numbers followed by '±' are the standard errors (SEs).

3 结论与讨论

本试验采用盆栽的方式研究 *Fu. mosseae* 与 *F. oxysporum* 的关系, 在盆栽条件下对菌剂的用量控制较容易且更精确、可靠。此外, 光照和水分的供应对盆栽来说不是限制因素, 能更加准确地分析 *Fu. mosseae* 与 *F. oxysporum* 的关系。若在大田中进行试验, 易受土壤营养成分、土壤微生物、土壤酶活性等影响试验结果。

大豆根腐病是一种极其普遍的土传病害, 传统方法采用化学试剂进行防治, 会产生很多副作用。伴着绿色农业的感召, 生物防治成为人们研究和关注的热点。研究表明, AM 真菌菌剂作为一种新兴的生物肥料, 能够有效地促进植株抵抗病害^[16]。随着微生物学与分子生态学在植物生理学上应用领域的推广, 大豆根腐病的研究也逐步深入到分子水平。

本研究采用传统形态学与现代分子生物学相结合的方法对 *Fu. mosseae* 和 *F. oxysporum* 的关系进行深入分析。结果表明, 接种 *F. oxysporum* 后 *Fu. mosseae* 侵染率均显著提高, 说明接种 *F. oxysporum* 有益于促进 *Fu. mosseae* 对大豆植株根系的侵染。相反, 由图 2 可知, 接种 *Fu. mosseae* 有助于抑制大豆根腐病的发生。此外, 本文通过实时荧光定量 PCR 技术, 从分子水平上分析 *Fu. mosseae* 和 *F. oxysporum* 的相互关系, 结果更精准。实时荧光定量 PCR 分析结果同样表明接种 *F. oxysporum* 有利于 *Fu. mosseae* 对大豆植株根系的侵染, 且 *Fu. mosseae* 对 *F. oxysporum* 有强烈的抑制作用。这一作用产生的原因可能是由于 *Fu. mosseae* 占据 *F. oxysporum* 生态位或 *F. oxysporum* 诱导 *Fu. mosseae* 产生次生代谢产物, 增强宿主植物的抗病性, 改善宿主植物的生长环境所致^[17-18]。虽然, 大豆根腐病原菌 *F. oxysporum* 和优势 AM 真菌 *Fu. mosseae* 均能成功侵染各品种大豆植株根系并在其根际土壤中定殖, 但 *Fu. mosseae* 在一定程度上对 *F. oxysporum* 具有强烈的抑制作用, 可有效地抑制 *F. oxysporum*

侵染大豆植株根系并抑制其在根际土壤中定殖, 可在一定程度上缓解或抑制大豆根腐病的发生。这一研究结果与 Borowicz 等^[19] 的报道 AM 真菌可以帮助宿主植物有效抑制病原菌的结论一致。本研究通过侵染率分析与实时荧光定量 PCR 相结合的方法均表明, *Fu. mosseae* 能够在一定程度上抑制 *F. oxysporum* 对大豆植株根系的侵染及其在根际土壤中的定殖。

实时荧光定量 PCR 技术是目前敏感性高、准确性高、特异性强、检测速度快、重复性好、自动化程度高的定量检测 DNA 的方法^[20-21]。然而, 实时荧光定量 PCR 技术也有一定的缺点: 如技术操作复杂、且需要特殊的热循环仪和试剂, 会增加一定的检测成本以及不能很好的现场应用等问题。因此, 需要在以后的科研中侧重发掘新的荧光探针和染料, 进一步提高分析灵敏度及试验重复性的同时, 注重样品制备简单化、程序化和机械化来实现低成本高效率的高新目标。本试验建立的应用实时荧光定量 PCR 检测 *Fu. mosseae* 和 *F. oxysporum* DNA 含量的方法可以与生物芯片技术、多重 PCR 技术、高通量测序等技术相结合, 形成一套完整的分子生物学方法, 则可使功能微生物与致病菌的检测迈向灵敏度更高、特异性更强的发展阶梯, 为植物病原菌的防治提供技术支持, 以减少其对植物的危害, 促进农业的稳定可持续发展。

参考文献

- [1] 陈宗泽, 殷勤燕, 戴秉丽, 等. 连作大豆土壤病原菌的分离及其致病性的研究[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(2): 36-39. (Chen Z Z, Yin Q Y, Dai B L, et al. Study on isolation and pathogenicity of soil pathogen in continuous cropping systems of soybean[J]. Journal of Jilin Agricultural Science, 1999, 24(2): 36-39.)
- [2] Zhang L, Khabbaz S E, Wang A, et al. Detection and characterization of broad-spectrum anti-pathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of *Fusarium* crown and root rot disease of tomato[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(3): 685-703.
- [3] 孙霞, 陈新燕, 柴仲平, 等. 不同土壤管理措施下南疆果园土

- 壤微生物及酶活性特征[J]. 草业科学, 2012, 29(7): 1023-1027. (Sun X, Chen X Y, Chai Z P, et al. Features of the soil microorganism and its enzyme activities of orchard under different management measures in southern Xinjiang[J]. Pratacultural Science, 2012, 29(7): 1023-1027.)
- [4] Ding X L, Zhang B, Zhang X D, et al. Effects of tillage and crop rotation on soil microbial residues in a rainfed agroecosystem of northeast China[J]. Soil & Tillage Research, 2011, 114(1): 43-49.
- [5] 薛超, 黄启为, 凌宁, 等. 连作土壤微生物区系分析、调控及高通量研究方法[J]. 土壤学报, 2011, 48(3): 612-618. (Xue C, Huang Q W, Ling N, et al. Analysis, regulation and high-throughput sequencing of soil microflora in mono-cropping system[J]. Acta Pedologica Sinica, 2011, 48(3): 612-618.)
- [6] Pellegrino E, Bedini S. Enhancing ecosystem services in sustainable agriculture: Biofertilization and biofortification of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2014, 68: 429-439.
- [7] Gomez-Bellot M J, Ortuno M F, Nortes P A, et al. Protective effects of *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* on soil and *Viburnum tinus* plants irrigated with treated wastewater under field conditions[J]. Mycorrhiza, 2014, 25(5): 1-11.
- [8] Ei-Faiz A, Duponnois R, Winterton P, et al. Effect of different amendments on growing of *Canna indica* L. inoculated with AMF on mining substrate[J]. International Journal of Phytoremediation, 2015, 17(5): 503-513.
- [9] Ortiz N, Armada E, Duque E, et al. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains[J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 174: 87-96.
- [10] Zhang F G, Zhu Z, Yang X M, et al. *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere[J]. Applied Soil Ecology, 2013, 72: 41-48.
- [11] Huang Y M, Srivastava A K, Zou Y N, et al. Mycorrhizal-induced calmodulin mediated changes in antioxidant enzymes and growth response of drought-stressed trifoliate orange[J]. Frontiers Microbiology, 2014, 5: 682.
- [12] Lee C S, Lee Y J, Jeun Y C. Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*[J]. The Plant Pathology, 2005, 21(3): 237-243.
- [13] Li Y H, Yanagi A, Miyawaki Y, et al. Disease tolerance and changes in antioxidative abilities in mycorrhizal strawberry plants[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2010, 79(2): 174-178.
- [14] 龙良鲲, 羊宋贞, 姚青, 等. AM 真菌 DNA 的提取与 PCR-DGGE 分析[J]. 菌物学报, 2005(4): 564-569. (Long L K, Yang S Z, Yao Q, et al. DNA extraction from arbuscular mycorrhizal fungi and analysis by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Mycosystema, 2005(4): 564-569.)
- [15] Mcgonigle T P, Millers M H, Evans D G. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi[J]. New Phytologist, 1990, 115: 495-501.
- [16] Oyekanmi E O, Coyne D L, Fagade O E, et al. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations[J]. Crop Protection, 2007, 26: 1006-1012.
- [17] Ozgonen H, Erkilic A. Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper[J]. Crop Protection, 2007, 26: 1682-1688.
- [18] Veresoglou S D, Rillig M C. Suppression of fungal and nematode plant pathogens through arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Biology Letters, 2012, 8: 214-217.
- [19] Borowicz V A. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations[J]. Ecology, 2001, 82: 3057-3068.
- [20] Pathak E, El-Borai F E, Campos-Herrera R, et al. Use of real-time PCR to discriminate parasitic and saprophagous behaviour by nematophagous fungi[J]. Fungal Biology, 2012, 116: 563-573.
- [21] Park K T, Allen A J, Davis W C. Development of a novel DNA extraction method for identification and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from tissue samples by real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 99: 58-65.