

苯甲酸和肉桂酸促进蚕豆枯萎病发生的生理生化机制

陈玲^{1,2} 赵骞² 董坤³ 杨智仙⁴ 董艳^{2*}

(1. 重庆人文科技学院文学与新闻传播学院, 重庆 401524; 2. 云南农业大学资源与环境学院, 昆明 650201;
3. 云南农业大学食品科技学院, 昆明 650201; 4. 云南大学图书馆, 昆明 650091)

摘要: 为探讨苯甲酸和肉桂酸胁迫促进蚕豆枯萎病发生的生理生化机制, 在接种蚕豆枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fabae* 的条件下, 研究了苯甲酸和肉桂酸4个浓度处理对蚕豆枯萎病发生、植株抗氧化酶活性、膜质过氧化程度及病程相关蛋白的影响。结果表明, 与对照相比, 不同浓度苯甲酸处理下蚕豆枯萎病的病情指数提高了25.0%~362.5%; 蚕豆根系和叶片中过氧化物酶(POD)活性分别降低了15.7%~31.4%和21.3%~38.7%, 过氧化氢酶(CAT)活性分别降低了37.7%~42.8%和28.4%~44.8%, 丙二醛(MDA)含量分别提高了28.9%~42.6%和16.4%~45.0%, 根系几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶活性降低了23.6%~39.4%和17.4%~38.7%。与对照相比, 不同浓度肉桂酸处理下蚕豆枯萎病的病情指数提高了37.5%~350.6%, 蚕豆根系和叶片中POD活性分别降低了17.1%~48.6%和13.4%~36.0%, CAT活性分别降低了15.6%~61.0%和18.5%~57.9%, MDA含量分别提高了24.5%~51.8%和42.0%~94.1%, 根系几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶活性分别降低了29.1%~48.9%和21.3%~40.2%。苯甲酸和肉桂酸浓度高于50 mg/L时显著降低蚕豆抗氧化酶性能, 加剧细胞破损程度, 抑制病程相关蛋白表达, 降低自身生理生化抗性, 有利于病原菌入侵, 促进枯萎病发生, 其中肉桂酸的促进效应大于苯甲酸。

关键词: 苯甲酸; 肉桂酸; 蚕豆枯萎病; 抗氧化酶; 病程相关蛋白

Physiological mechanism of faba bean *Fusarium* wilt promoted by benzoic acid and cinnamic acid

Chen Ling^{1,2} Zhao Qian² Dong Kun³ Yang Zhixian⁴ Dong Yan^{2*}

(1. School of Literature and Journalism & Communication, Chongqing College of Humanities, Science & Technology, Chongqing 401524, China; 2. College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan Province, China; 3. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan Province, China; 4. The Library of Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan Province, China)

Abstract: To clarify the physiological mechanism of faba bean *Fusarium* wilt promoted by benzoic acid and cinnamic acid, four concentrations of benzoic acid and cinnamic acid were set under the condition of the inoculation of faba bean wilt pathogen to investigate the occurrence of *Fusarium* wilt, the activities of antioxidative enzymes, membrane lipid peroxidation and pathogenesis-related protein. The results showed that in comparison with that of control, the disease index of *Fusarium* wilt was increased by 25.0%–362.5% under benzoic acid application at different concentrations, the peroxidase (POD) activity decreased by 15.7%–31.4% in roots and 21.3%–38.7% in leaves, the catalase (CAT) activity decreased

by 37.7%–42.8% in roots and 28.4%–44.8% in leaves, the chitinase and β -1,3-glucanase activities in faba bean roots were decreased by 23.6%–39.4% and 17.4%–38.7%, while increased malondialdehyde (MDA) contents in both roots and leaves significantly by 28.9%–42.6% and 16.4%–45.0%, respectively. Compared to control, disease index of *Fusarium* wilt was increased by 37.5%–350.6% under cinnamic acid application at different concentrations, the POD activity decreased by 17.1%–48.6% in roots and by 13.4%–36.0% in leaves, the CAT activity decreased by 15.6%–61.0% in roots and by 18.5%–57.9% in leaves, the chitinase and β -1,3-glucanase activities in roots were decreased by 29.1%–48.9% and 21.3%–40.2%, while MDA contents increased significantly by 24.5%–51.8% in roots and by 42.0%–94.1% in leaves, respectively. When the concentrations of benzoic acid and cinnamic acid were higher than 50 mg/L, the activities of antioxidant enzymes and pathogenesis-related proteins of faba bean seedling were reduced, the damage degree to the membrane lipid peroxidation was increased and metabolic and physiological function were disordered. Therefore, benzoic acid and cinnamic acid enhance the occurrence *Fusarium* wilt by predisposing the roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fabae* through a direct physiological effect, and cinnamic acid had greater enhance effect than benzoic acid.

Key words: benzoic acid; cinnamic acid; faba bean *Fusarium* wilt; antioxidative enzyme; pathogenesis-related protein

随着现代农业规模化、集约化、单一化的发展,连续种植模式十分普遍,造成作物生长受抑、土传病害高发、产量锐减的连作障碍频繁发生(Huang et al., 2013)。目前,我国是世界上作物土传病害发生最严重的国家,连作障碍已成为制约农业可持续发展的重大问题(蔡祖聪和黄新琦, 2016)。蚕豆 *Vicia faba* 是典型的忌连作物,近年来随着蚕豆生产的不断发展,土地资源短缺、种植习惯和经济利益等原因,蚕豆连作现象较为普遍,由此引发的蚕豆连作障碍问题日益凸显,严重制约了我国的蚕豆生产。国内外学者研究表明,引起连作障碍的原因较多,除土壤养分亏缺、土壤微生物区系恶化和土传病害等重要因素外,化感自毒作用也是不容忽视的,尤其是根系分泌物和残体腐解产生的自毒物质导致的自毒作用,许多作物的连作障碍与此有关(Asaduzzaman & Asao, 2012; Huang et al., 2013; 蔡祖聪和黄新琦, 2016)。

近年来,从果蔬、花卉和中药材等易发生连作障碍的作物根系分泌物和根际土壤中分离出10余种酚酸类化感物质(Chen et al., 2011; Li et al., 2012; Wu et al., 2015)。化感自毒物质胁迫下作物幼苗的株高、根长和根系活力指标均降低,同时体内过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)等抗氧化酶活性下降,膜质过氧化加重,表明自毒物质能抑制作物幼苗生长,破坏作物保护酶系统,降低其生理抗性,有利于病害发生(Tian et al., 2015; 沈玉聪等, 2016)。本课题组在前期田间试验

中发现蚕豆连作后土传枯萎病发病严重、产量降低等现象,董艳等(2016a)从蚕豆连作土壤中检测到7种酚酸,其中苯甲酸和肉桂酸含量较高。进一步研究还发现,肉桂酸胁迫显著降低了蚕豆根际微生物的活性和多样性,改变微生物群落组成,恶化土壤微生态环境而加剧枯萎病的发生(董艳等, 2016b)。但有关苯甲酸和肉桂酸处理对蚕豆植株抗氧化酶和病程相关蛋白活性的影响及其与枯萎病发生的关系尚不清楚。

基于此,本研究通过水培试验,在外源添加不同浓度的苯甲酸和肉桂酸并接种尖孢镰刀菌蚕豆专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fabae* 的条件下,研究苯甲酸和肉桂酸对蚕豆枯萎病发生、根系和叶片的抗氧化酶活性、膜质过氧化程度及病程相关蛋白活性的影响,从生理生化抗性角度探讨苯甲酸和肉桂酸促进蚕豆枯萎病发生的机制,以期揭示蚕豆连作自毒物质的作用机理及其在连作障碍形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试蚕豆及病原菌:蚕豆品种为89-147,购于云南省农业科学院。尖孢镰刀菌蚕豆专化型,由云南农业大学资源与环境学院土壤微生物实验室从蚕豆连作土壤中筛选并保存。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂

20 g、蒸馏水 1 000 mL; Hoagland 营养液: $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g、 KNO_3 0.51 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49 g、 KH_2PO_4 0.14 g、 H_3BO_3 2.86 g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.09 g、Fe-EDTA 2 g、蒸馏水 1 000 mL。

试剂及仪器: 苯甲酸、肉桂酸(分析纯), 国药集团上海有限公司; 几丁质酶试剂盒, 南京建成生物工程研究所; β -1, 3-葡聚糖酶试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 721 型可见光分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; UV5800 紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

尖孢镰刀菌蚕豆专化型在 PDA 平板上于 28℃ 培养箱中恒温培养 7 d 后, 刮取菌丝于无菌水中振荡均匀, 经 2 层纱布过滤后配制成浓度为 1×10^6 CFU/mL 的孢子悬浮液用于接种。

试验于 2015 年在云南农业大学资源与环境学院温室内进行。蚕豆种子于室温下浸种 24 h, 25℃ 下催芽后播于 Hoagland 营养液浸透的无菌石英砂中培养, 待蚕豆幼苗长至 4~6 片真叶时, 选取长势一致的幼苗移入盛有不同浓度苯甲酸、肉桂酸的 2 L 容器中。苯甲酸和肉桂酸处理均设 4 个浓度外源添加, 即 0 mg/L (C_0 , 对照)、50 mg/L (C_1)、100 mg/L (C_2)、200 mg/L (C_3), 每种浓度溶液用量为 1.5 L。共计 8 个处理, 每处理 3 次重复, 共计 24 盆。每盆种植 6 株蚕豆, 24 h 通气泵通气。待处理 2 d 后, 向营养液中添加浓度为 1×10^6 CFU/mL 的尖孢镰刀菌孢子悬浮液 50 mL。

1.2.2 蚕豆枯萎病调查方法

蚕豆接菌 36 d (蚕豆分枝期) 后进行蚕豆枯萎病发病情况和病情指数的调查, 每处理调查 6 株, 发病程度分为 5 级: 0 级: 无症状; 1 级: 茎基部或根的局部(除主根外)稍显病斑或稍变色; 2 级: 茎基部或主侧根有病斑, 但不连片; 3 级: 1/3~1/2 的茎基部或根部出现病斑、变色或腐烂, 侧根明显减少; 4 级: 茎基部被病斑环绕或根系大部分变色腐烂; 5 级: 植株枯萎死亡。计算发病率和病情指数。每处理重复 3 次。发病率 = 发病株数/调查株总数 $\times 100\%$; 病情指数 = $\sum$ (各级病株数 $\times$ 相应级值) / (最高级值 $\times$ 调查总株数) $\times 100$ 。

1.2.3 酶活性及丙二醛含量测定

蚕豆接菌 36 d (蚕豆分枝期) 后采 6 株蚕豆, 选用蚕豆叶片和根系鲜样测定 POD、CAT、几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶活性以及丙二醛(malondialdehyde,

MDA) 含量。每处理重复 3 次。

POD 活性测定: 采用愈创木酚法测定 POD 活性(李合生, 2000)。反应混合液包括 pH 7.8 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 2.9 mL、2% H_2O_2 1 mL、愈创木酚 1 mL, 4 000 r/min 离心 2 min, 得到的上清液即为酶液。最后加入 0.1 mL 酶液以启动反应。以煮沸 5 min 失活的酶液为对照, 反应体系加入测定酶液后, 立即置于 34℃ 水浴中保温 3 min, 测定其在 1 min 内 $\text{OD}_{470\text{nm}}$ 的变化值。以每分钟内 $\Delta 470$ 变化 0.01 为 1 个过 POD 活性单位 ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。

POD 活性测定采用高锰酸钾滴定方法(李合生, 2000)。取 4 个 50 mL 三角瓶并编号, 1、2 号为样品测定, 3、4 号为样品对照(加热煮沸失去活性的酶液为对照), 向 1、2 号瓶中加入酶液 1 mL, 3、4 号加入对照酶液 1 mL 后立即加入 1 mL 10% 的 H_2SO_4 , 各瓶再加入 1 mL 0.1 mol/L H_2O_2 , 同时计时, 置于 30℃ 水浴中保温 10 min, 向 1、2 号瓶中加入 1 mL 10% 的 H_2SO_4 终止酶反应, 用 0.1 mol/L KMnO_4 滴定, 至出现粉红色且 30 s 内不消失为滴定终点, 滴定差为消耗值。1 个 CAT 活性单位以每克鲜重样品 1 min 内分解 H_2O_2 的毫克数表示 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。

MDA 含量测定采用李合生(2000)方法。称取 0.5 g 蚕豆叶片和根系鲜样, 用 5 mL 5% 三氯乙酸研磨, 4 000 r/min 离心 10 min, 取 2 mL 上清液加入 0.67% 硫代巴比妥酸 2 mL, 对照为 5% 的三氯乙酸, 沸水浴 30 min, 迅速冷却, 3 000 r/min 离心 10 min, 分别测定上清液在 600、532、450 nm 下的吸光度值, 计算 MDA 含量。

几丁质酶测定采用几丁质酶试剂盒, 1 个单位几丁质酶活性定义为每克组织每小时分解几丁质产生 1 mg *N*-乙酰氨基葡萄糖的酶量。 β -1, 3-葡聚糖酶活性测定采用 β -1, 3-葡聚糖酶试剂盒, 1 个单位 β -1, 3-葡聚糖酶活性定义为每克组织每小时产生 1 mg 还原糖的酶量。

1.3 数据分析

试验数据通过 Excel 2010 和 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 应用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 苯甲酸和肉桂酸对蚕豆枯萎病发生的影响

不同浓度苯甲酸和肉桂酸处理均显著促进蚕豆枯萎病的发生。与对照相比, 在 50、100 和 200 mg/L 浓度下, 经苯甲酸处理后, 蚕豆枯萎病发病率显著提高 33.3%、50.0%、50.0%, 病情指数显著提高 25.0%、

137.5%、362.5%;经肉桂酸处理后蚕豆枯萎病发病率显著提高 21.7%、46.5%、50.0%,病情指数显著提

高 37.5%、200.0%、350.6%(表 1),尤其以高浓度处理对枯萎病发生的促进作用最大(图 1)。

表 1 不同浓度苯甲酸和肉桂酸对蚕豆枯萎病发生的影响

Table 1 Effects of benzoic acid and cinnamic acid at different concentration on incidence, index of faba bean *Fusarium* wilt

处理 (mg/L) Treatment	苯甲酸 Benzoic acid		肉桂酸 Cinnamic acid	
	发病率 Incidence (%)	病情指数 Disease index	发病率 Incidence (%)	病情指数 Disease index
0	66.67±3.61 c	17.78±2.04 c	66.67±3.61 c	17.78±2.03 c
50	88.89±1.92 b	22.22±3.85 c	81.11±5.09 b	24.44±3.85 c
100	100.00±0.00 a	42.22±1.92 b	97.67±2.52 a	53.33±6.67 b
200	100.00±0.00 a	82.22±3.85 a	100.00±0.00 a	80.11±3.34 a

表中数据为平均数±标准差。同列中不同字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

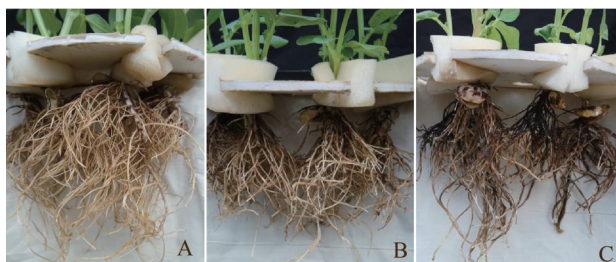


图 1 接种尖孢镰刀菌蚕豆专化型及苯甲酸和肉桂酸处理对蚕豆根系生长的影响

Fig. 1 Effects of benzoic acid and cinnamic acid on faba bean roots growth under inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *fabae*

A、B 和 C 分别为对照、苯甲酸 100 mg/L 处理和肉桂酸 100 mg/L 处理。A, B and C are control treatment, 100 mg/L treatment of benzoic acid and 100 mg/L treatment of cinnamic acid, respectively.

2.2 苯甲酸和肉桂酸对蚕豆植株 POD 活性的影响

苯甲酸和肉桂酸处理后蚕豆根系和叶片中 POD 活性测定结果显示,与对照相比,50 mg/L 苯甲酸处理有增加蚕豆叶片和根系中 POD 活性的趋势,但无显著差异;100 mg/L 和 200 mg/L 苯甲酸处理后蚕豆根系 POD 活性显著降低 15.7% 和 31.4%,叶片 POD 活性显著降低 21.3% 和 38.7%。与对照相比,50、100 和 200 mg/L 肉桂酸处理后蚕豆根系 POD 活性显著降低 17.1%、30.0% 和 48.6%,100 mg/L 和 200 mg/L 肉桂酸处理后叶片 POD 活性显著降低 13.4% 和 36.0%(图 2)。

2.3 苯甲酸和肉桂酸对蚕豆植株 CAT 活性的影响

苯甲酸和肉桂酸处理后蚕豆根系和叶片中 CAT 活性测定结果显示,随苯甲酸和肉桂酸处理浓度升高,蚕豆根系和叶片中 CAT 活性均降低。与对照相比,50 mg/L 苯甲酸处理对蚕豆根系和叶片中 CAT 活性均无显著影响,分别降低 4.5% 和 10.7%;100 mg/L

和 200 mg/L 处理后蚕豆根系 CAT 活性显著降低 37.7% 和 42.8%,蚕豆叶片 CAT 活性显著降低 28.4% 和 44.8%。与对照相比,50 mg/L 肉桂酸处理后蚕豆叶片中 CAT 活性降低 18.5%,但无显著差异,蚕豆根系 CAT 活性显著降低 15.6%,100 mg/L 和 200 mg/L 处理后蚕豆根系 CAT 活性显著降低 40.8% 和 61.0%,蚕豆叶片 CAT 活性显著降低 35.4% 和 57.9%(图 2)。

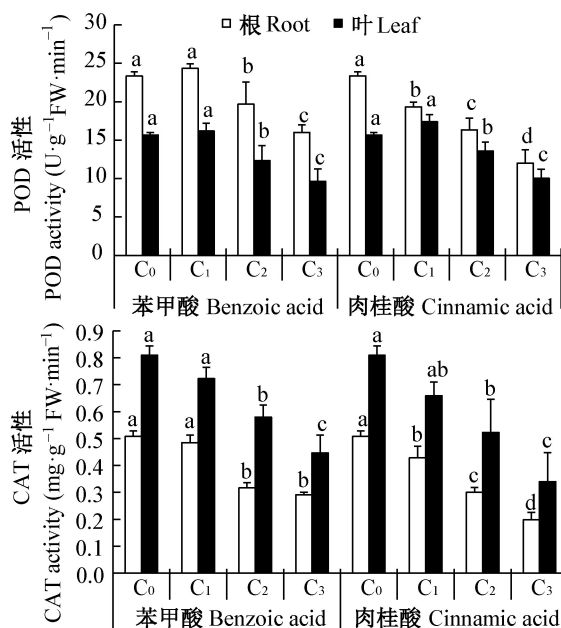


图 2 苯甲酸和肉桂酸对蚕豆根系和叶片中 POD 和 CAT 活性的影响

Fig. 2 Effects of benzoic acid and cinnamic acid at different concentrations on peroxidase and catalase activities in roots and leaves of faba bean

C₀: 0 mg/L; C₁: 50 mg/L; C₂: 100 mg/L; C₃: 200 mg/L。图中数据为平均数±标准差。同色柱上不同字母表示同试剂处理不同浓度间经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the same color bars indicate significant difference among different concentrations in the same treatment at $P<0.05$ level by LSD test.

2.4 苯甲酸和肉桂酸对蚕豆植株MDA含量的影响

苯甲酸和肉桂酸处理后蚕豆根系和叶片中MDA含量测定结果显示,随苯甲酸和肉桂酸处理浓度升高,MDA含量增加,膜质过氧化加重,其中肉桂酸处理对蚕豆膜质过氧化加重的程度比苯甲酸大(图3)。与对照相比,50 mg/L苯甲酸处理对蚕豆根系和叶片的MDA含量无显著影响,100 mg/L和200 mg/L处理后蚕豆根系MDA含量显著提高28.9%和42.6%,蚕豆叶片MDA含量显著提高16.4%和45.0%。与对照相比,50、100和200 mg/L肉桂酸处理后蚕豆根系MDA含量显著提高24.5%、40.5%和51.8%,蚕豆叶片MDA含量显著提高42.0%、68.3%和94.1%(图3)。

2.5 苯甲酸和肉桂酸对蚕豆病程相关蛋白的影响

2.5.1 对蚕豆根系几丁质酶活性的影响

苯甲酸和肉桂酸处理后蚕豆根系几丁质酶活性测定结果显示,随苯甲酸浓度增加几丁质酶活性呈先增加后降低的趋势,随肉桂酸浓度增加其活性呈降低趋势。与对照相比,50 mg/L苯甲酸处理后蚕豆根系中几丁质酶活性提高4.9%,但无显著差异;100 mg/L和200 mg/L处理后蚕豆根系几丁质酶活性显著降低23.6%和39.4%。与对照相比,50 mg/L肉桂酸处

理后蚕豆根系中几丁质酶活性降低,但无显著差异;100 mg/L和200 mg/L处理后几丁质酶活性显著降低29.1%和48.9%(图4)。

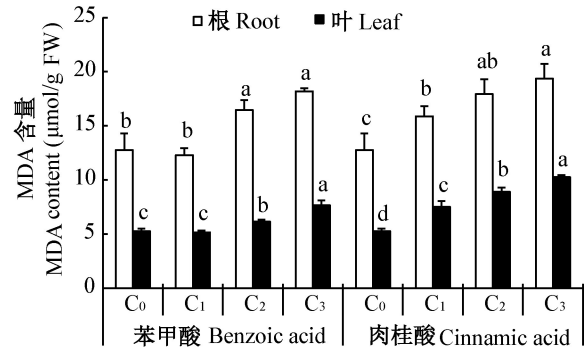


图3 苯甲酸和肉桂酸对蚕豆根系和叶片中MDA含量的影响
Fig. 3 Effects of benzoic acid and cinnamic acid at different concentrations on MDA content in roots and leaves of faba bean

C₀: 0 mg/L; C₁: 50 mg/L; C₂: 100 mg/L; C₃: 200 mg/L。图中数据为平均数±标准差。同色柱上不同字母表示同试剂处理不同浓度间经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the same color bars indicate significant difference among different concentrations in the same treatment at $P<0.05$ level by LSD test.

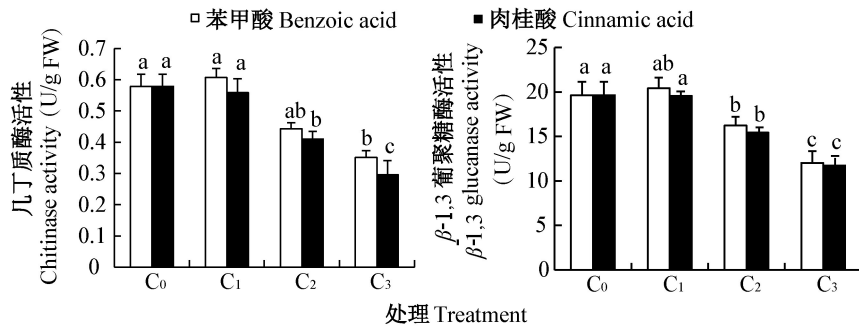


图4 苯甲酸和肉桂酸对蚕豆根系几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶活性的影响

Fig. 4 Effects of benzoic acid and cinnamic acid at different concentrations on chitinase and β-1,3-glucanase activities in roots of faba bean

C₀: 0 mg/L; C₁: 50 mg/L; C₂: 100 mg/L; C₃: 200 mg/L。图中数据为平均数±标准差。同色柱上不同字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same color bar indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

2.5.2 对蚕豆根系β-1,3葡聚糖酶活性的影响

苯甲酸和肉桂酸处理后蚕豆根系β-1,3葡聚糖酶活性测定结果显示,苯甲酸和肉桂酸处理下β-1,3葡聚糖酶活性呈先增加后降低的趋势。与对照相比,50 mg/L苯甲酸处理后蚕豆根系β-1,3葡聚糖酶活性提高4.0%,但无显著差异;100 mg/L和200 mg/L处理后蚕豆根系β-1,3葡聚糖酶活性显著降低17.4%和38.7%。与对照相比,肉桂酸100 mg/L和200 mg/L处理后蚕豆根系β-1,3葡聚糖酶活性显著

降低21.3%和40.2%,50 mg/L处理后无显著影响(图4)。

3 讨论

研究表明,连作化感自毒物质不但使作物生长受抑,而且会加剧病害,尤其是土传病害的暴发流行,如草莓连作自毒物质阿魏酸和香豆酸可显著促进草莓炭疽冠腐病的发生(Tian et al., 2015)。本研究结果表明,苯甲酸和肉桂酸处理显著促进了蚕豆

枯萎病的发生,且促进枯萎病发生的效果随浓度提高而增加。土传病原菌一般由根部伤口侵入或根梢直接侵入,并由导管向上蔓延,引起整株作物发病。在连作条件下,作物通过根系分泌及残体腐解等途径在根际土壤中累积大量的酚酸类自毒物质,抑制根系生长并使其受损,为病菌的侵入创造了有力条件(Huang et al., 2013; Tian et al., 2015)。本研究中,苯甲酸和肉桂酸胁迫下蚕豆根系出现发黑现象,从根系损伤来看,肉桂酸处理对根系的损伤作用大于苯甲酸处理。从枯萎病发生来看,肉桂酸处理对病害的促进作用大于苯甲酸处理,由此反映出根系的损伤程度与枯萎病发生密切相关。齐永志等(2015)在对草莓枯萎病的研究中也发现,草莓连作自毒物质对羟基苯甲酸胁迫可明显加重根系组织受损程度,根系表皮细胞、皮层细胞、中柱鞘细胞、薄壁细胞和导管分子的尖孢镰刀菌感染率均显著提高。由此可见自毒物质胁迫造成植株根系损伤,为病原菌侵染提供了有力条件,从而促进病害发生。因此证明蚕豆自毒物质苯甲酸和肉桂酸是促进枯萎病发生的重要诱因。

SOD、POD 和 CAT 统称活性氧清除剂(Singh et al., 2010),抗氧化酶对活性氧代谢平衡的维持,有利于提高植物对病菌侵染的抵抗力,其活性变化与植株抗病能力呈正相关关系(Yang et al., 2006; Ren et al., 2008; Maya & Matsubara, 2013)。齐永志等(2016)发现,草莓连作自毒物质对羟基苯甲酸外源添加的同时并接种尖孢镰刀菌能显著降低草莓植株 SOD 和 POD 活性,加剧根系膜质过氧化,促进草莓枯萎病的发生。本研究中,在浓度为 50 mg/L 苯甲酸和肉桂酸的处理下,蚕豆叶片和根系的 POD 活性均增强,说明在此浓度胁迫下蚕豆幼苗体内保护系统开启,在一定时期内能及时清除体内自由基,保护蚕豆植株免受伤害;当处理浓度为 100 mg/L 时,保护系统产生的 POD 和 CAT 活性急剧下降,表明自毒物质中等浓度胁迫下,蚕豆根系产生的 $\cdot\text{O}_2^-$ 不能被其自身的抗氧化系统有效清除,尤其是在高浓度的胁迫阶段(200 mg/L 处理), $\cdot\text{O}_2^-$ 及其产物 H_2O_2 产生速率过快,过量的 $\cdot\text{O}_2^-$ 和 H_2O_2 一方面能进一步使酶失活,另一方面能破坏细胞质膜结构,造成根尖细胞膜系统的氧化损伤(产物为 MDA),而损伤的细胞更易受到病原菌侵染,最终促进枯萎病发生。

MDA 是植物细胞膜脂过氧化作用的重要产物,是反映膜质过氧化程度的重要指标,其变化与作物

受病原菌侵染程度呈正相关(Ye et al., 2006)。本研究中,接种尖孢镰刀菌情况下,随苯甲酸、肉桂酸处理浓度增加,蚕豆根系和叶片中 MDA 含量显著提高,表明苯甲酸和肉桂酸处理加剧了蚕豆植株的膜质过氧化程度,造成营养元素泄漏,促进病原菌对蚕豆的侵染而加剧枯萎病发生。这与 Ye et al. (2006)研究的黄瓜连作自毒物质肉桂酸加速膜质过氧化程度,刺激病原菌生长而使其更易侵入黄瓜,最终促进黄瓜枯萎病发生的结论相同。

当寄主作物被病原菌侵染后,自身防御反应启动,病程相关蛋白表达,产生水解真菌细胞壁的重要水解酶即几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶,降解真菌细胞壁而抑制真菌生长,在寄主作物抵御病原真菌侵染的防卫反应中起重要作用,可提高寄主对病原菌的抵抗能力(Xu et al., 2015)。西瓜连作情况下,自毒物质阿魏酸和镰刀菌同时存在于根际环境中,阿魏酸可抑制西瓜根系中的几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性,降低西瓜自身抗病性,有利于镰刀菌侵染而诱导西瓜枯萎病的发生(任丽轩, 2012)。本研究中,接种尖孢镰刀菌条件下,浓度为 50 g/mL 的苯甲酸和肉桂酸处理提高了蚕豆根系的 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性,此时蚕豆根系防御系统开启保护功能;当苯甲酸和肉桂酸处理浓度超过 50 g/mL 时, β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性显著低于对照,此时蚕豆自身保护系统功能逐渐下降,不能抵抗病原菌侵染而加剧枯萎病发生。表明苯甲酸和肉桂酸与枯萎病菌共同胁迫加剧了蚕豆自身防御系统的破坏程度,导致枯萎病严重发生。

蚕豆连作自毒物质苯甲酸和肉桂酸一方面对蚕豆根系细胞膜造成损伤,使细胞内活性氧自由基增加,破坏细胞膜的完整性,从而使土传病原菌更加容易侵入,另一方面抑制蚕豆根系病程相关蛋白表达,降低蚕豆植株生理生化抗性,这可能是连作自毒物质促进蚕豆枯萎病危害的重要原因之一。同时,苯甲酸和肉桂酸的自毒效应有一定差异,肉桂酸对 POD、CAT、几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶活性的抑制程度及其促进 MDA 产生的作用均大于苯甲酸,表明肉桂酸在蚕豆连作障碍形成中的作用强于苯甲酸。

参 考 文 献 (References)

- Asaduzzaman M, Asao T. 2012. Autotoxicity in beans and their allelochemicals. *Scientia Horticulturae*, 134(2): 26–31
Cai ZC, Huang XQ. 2016. Soil-borne pathogens should not be ignored

- by soil science. *Acta Pedologica Sinica*, 53(2): 29–34 (in Chinese) [蔡祖聪, 黄新琦. 2016. 土壤学不应忽视对作物土传病原微生物的研究. *土壤学报*, 53(2): 29–34]
- Chen SL, Zhou BL, Lin SS, Li X, Ye XL. 2011. Accumulation of cinnamic acid and vanillin in eggplant root exudates and the relationship with continuous cropping obstacle. *African Journal of Biotechnology*, 10(14): 2659–2665
- Dong Y, Dong K, Yang ZX, Tang L, Zheng Y. 2016b. Microbial impacts of *Fusarium* wilt promoted by cinnamic acid in the rhizosphere of *Vicia faba*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43(8): 1525–1536 (in Chinese) [董艳, 董坤, 杨智仙, 汤利, 郑毅. 2016b. 肉桂酸加剧蚕豆枯萎病发生的根际微生物效应. *园艺学报*, 43(8): 1525–1536]
- Dong Y, Dong K, Yang ZX, Zheng Y, Tang L. 2016a. Microbial and physiological mechanisms for alleviating *Fusarium* wilt of faba bean in intercropping system. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 27(6): 1984–1992 (in Chinese) [董艳, 董坤, 杨智仙, 郑毅, 汤利. 2016a. 间作减轻蚕豆枯萎病的微生物和生理机制. *应用生态学报*, 27(6): 1984–1992]
- Huang LF, Song LX, Xia XJ, Mao WH, Shi K, Zhou YH, Yu JQ. 2013. Plant-soil feedbacks and soil sickness: from mechanisms to application in agriculture. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 232–242
- Li HS. 2000. Experimental principle and technology for plant physiology and biochemistry. Beijing: High Education Press, pp. 164–167, 260–261 (in Chinese) [李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, pp. 164–167, 260–261]
- Li ZF, Yang YQ, Xie DF, Zhu LF, Zhang ZG, Lin WX. 2012. Identification of autotoxic compounds in fibrous roots of rehmanna (*Rehmannia glutinosa* Libosch.). *PLoS ONE*, 7(1): e28806
- Maya MA, Matsubara YI. 2013. Tolerance to *Fusarium* wilt and anthracnose diseases and changes of antioxidative activity in mycorrhizal cyclamen. *Crop Protection*, 47(5): 41–48
- Qi YZ, Jin JJ, Chang N, Zhang XJ, Yin BZ, Zhen WC. 2016. Improvement effect of 4-hydroxybenzoic acid on occurrence of wilt disease of strawberry. *China Plant Protection*, 36(9): 5–10 (in Chinese) [齐永志, 金京京, 常娜, 张雪娇, 尹宝重, 甄文超. 2016. 对羟基苯甲酸对草莓枯萎病发生的助长作用. *中国植保导刊*, 36(9): 5–10]
- Qi YZ, Su Y, Wang N, Zhen WC. 2015. Observation on histological structure of strawberry roots after inoculating *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* under 4-hydroxybenzoic acid stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 42(10): 1909–1918 (in Chinese) [齐永志, 苏媛, 王宁, 甄文超. 2015. 对羟基苯甲酸胁迫下尖孢镰刀菌侵染草莓根系的组织结构观察. *园艺学报*, 42(10): 1909–1918]
- Ren LX. 2012. Physiological mechanisms for suppressing watermelon wilt disease by intercropped with aerobic rice. Ph. D Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [任丽轩. 2012. 旱作水稻/西瓜间作抑制西瓜枯萎病的生理机制. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Ren LX, Su SM, Yang XM, Xu YC, Huang QW, Shen QR. 2008. Intercropping with aerobic rice suppressed *Fusarium* wilt in watermelon. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3): 834–844
- Shen YC, Zhang HR, Zhang ZL, Gao ZM. 2016. Allelopathic effects of phenolic acids on *Panax notoginseng* seedlings. *Guihaia*, 36(5): 607–614 (in Chinese) [沈玉聪, 张红瑞, 张子龙, 高致明. 2016. 酚酸类物质对三七幼苗的化感影响. *广西植物*, 36(5): 607–614]
- Singh BK, Sharma SR, Singh B. 2010. Antioxidant enzymes in cabbage: variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Scientia Horticulturae*, 124(1): 9–13
- Tian GL, Bi YM, Sun ZJ, Zhang LS. 2015. Phenolic acids in the plow layer soil of strawberry fields and their effects on the occurrence of strawberry anthracnose. *European Journal of Plant Pathology*, 143(3): 581–594
- Wu ZJ, Yang L, Wang RY, Zhang YB, Shang QH, Wang L, Ren Q, Xie ZK. 2015. *In vitro* study of the growth, development and pathogenicity responses of *Fusarium oxysporum* to phthalic acid, an auto-toxin from Lanzhou lily. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 1227–1234
- Xu WH, Liu D, Wu FZ, Liu SW. 2015. Root exudates of wheat are involved in suppression of *Fusarium* wilt in watermelon in watermelon-wheat companion cropping. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1): 209–216
- Yang GQ, Wan FH, Liu WX, Zhang XW. 2006. Physiological effects of allelochemicals from leachates of *Ageratina adenophora* (Spreng.) on rice seedlings. *Allelopathy Journal*, 18(2): 237–246
- Ye SF, Zhou YH, Sun Y, Zou LY, Yu JQ. 2006. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt. *Environmental and Experimental Botany*, 56(3): 255–262

(责任编辑:王 璇)