

谢奎忠,邱慧珍,胡新元,等.连作马铃薯根系分泌物鉴定及其对尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)的作用[J].中国沙漠,2021,41(3):7-15.

连作马铃薯根系分泌物鉴定及其对尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)的作用

谢奎忠^{1,2},邱慧珍¹,胡新元²,罗爱花²

(1.甘肃农业大学 资源与环境学院/甘肃省干旱生境作物学重点实验室,甘肃 兰州 730070; 2.甘肃省农业科学院 马铃薯研究所,甘肃 兰州 730070)

摘要:为了揭示马铃薯连作化感物质与枯萎病之间的关系,通过水培和田间长期定位试验相结合方法,收集不同连作年限马铃薯根系分泌物,采用GC-TOF-MS进行分离鉴定。结果表明:在检测到的马铃薯根系分泌的48种物质中有机酸占30种。比较轮作、连作5年和连作10年马铃薯根系分泌物中有机酸的相对含量,发现苹果酸和棕榈酸的差异比较大。马铃薯连作条件下根系分泌物能显著增强尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)的发育并加重枯萎病发生。通过外源添加法研究苹果酸和棕榈酸对尖孢镰孢菌的化感作用,苹果酸和棕榈酸浓度分别在0.10—0.50 mmol·L⁻¹和0.05—0.10 mmol·L⁻¹对尖孢镰孢菌生长起到显著的促进作用。盆栽试验表明,浓度0.05—0.50 mmol·L⁻¹苹果酸和棕榈酸对马铃薯枯萎病有显著的促进作用。这说明苹果酸和棕榈酸是马铃薯根系分泌的化感自毒物质,对尖孢镰孢菌生长起促进作用是连作马铃薯枯萎病发病主要原因。

关键词:马铃薯;根系分泌物;苹果酸;棕榈酸;化感效应;尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*);枯萎病

文章编号:1000-694X(2021)03-007-09

DOI:10.7522/j.issn.1000-694X.2021.00001

中图分类号:Q945.79

文献标志码:A

0 引言

马铃薯不耐连作,但是栽培马铃薯高收益与集约化导致甘肃等马铃薯主产区连作现象日趋严重,已经成为影响马铃薯种植和产业进一步发展的主要限制因素^[1-3]。枯萎病的发生和自毒物质是作物连作障碍产生的主要原因^[4]。我们在甘肃省马铃薯主产区定西市的前期研究发现,连作使马铃薯抗病性减弱,土传枯萎病加剧,发病率高达80%以上,减产严重^[5]。尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)是马铃薯发生枯萎病的主要病原菌^[1,6]。尖孢镰孢菌可以在土壤中存活5—6年,一般致病率10%—30%,严重的达80%,成为当前最难防治的土传病害^[7-8]。植物根系分泌物中的有机酸在土壤中积累过多,直接或间接地影响植物病原菌生长,诱导病原菌孢子萌发^[9]。番茄根系分泌物能促进尖孢镰孢菌致病菌

株Fol007的分生孢子萌发^[10]。西瓜感病品种的根系分泌物在低浓度下就能有效促进尖孢镰孢菌的生长^[11]。寄主根部很近或接触的病原菌吸收到根表细胞分泌的碳等营养物质(主要是小分子有机酸)后就能萌发出芽管或菌丝进而感染形成土传病害^[12-13]。我们对甘肃定西旱地连作马铃薯根系分泌物中的有机酸进行系统的分离鉴定,研究旱地连作马铃薯根系分泌物中差异有机酸对马铃薯尖孢镰孢菌的化感效应,以期揭示马铃薯连作引起枯萎病发病机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

尖孢镰孢菌(GenBank accession number: MK764912)分离自甘肃定西马铃薯枯萎病发病根

收稿日期:2020-10-26;改回日期:2021-01-04

资助项目:国家自然科学基金项目(31860354);公益性行业(农业)科研专项(201503001-7);甘肃省农业科学院重点研发计划项目(2019GAAS16)

作者简介:谢奎忠(1979—),男,甘肃甘谷人,副研究员,主要从事马铃薯连作障碍和枯萎病研究。E-mail: xiekz79@163.com

通信作者:邱慧珍(E-mail: hzqiu@gsau.edu.cn)

系^[14]。马铃薯品种为陇薯 7 号脱毒微型薯。

苹果酸和棕榈酸标准品都购自上海安谱实验科技股份有限公司,纯度分别为 99.09% 和 99.00%。

1.2 试验方法

1.2.1 马铃薯根系分泌物的收集

1.2.1.1 水培法马铃薯根系分泌物的收集

蛭石在自来水中浸泡 12 h 后用蒸馏水洗 3 次,再用蒸汽灭菌。将直径 16 cm、高 15 cm 塑料花盆用蒸馏水清洗 3 次,装入灭菌蛭石。陇薯 7 号脱毒微型薯用 1% 次氯酸钠溶液表面消毒 5 min,在无菌蒸馏水中漂洗 5 次后种植于装入灭菌蛭石花盆中,然后将花盆放置于人工气候箱中,微型薯直接在清洁过的蛭石中生长发芽。发芽后马铃薯幼苗保持在 25 ± 2 °C 和 65% 相对湿度约 30 d^[15],每 8 d 补充 Hoagland 营养液 250 mL^[16],每 4 d 浇蒸馏水 200 mL。30 d 后马铃薯进入现蕾期,把马铃薯幼苗从花盆中掏出来,用自来水冲洗掉根系附着的蛭石。每 5 株马铃薯幼苗放入装有 2 L 超纯水的大烧杯中,全部根系置于水面下,放入人工气候箱(光照 16 h, 25 ± 2 °C)培养 24 h。整个试验共 15 株马铃薯。培养完成后,把每组 2 L 的根系分泌物用一个 100 mL Amberlite XAD-4 大孔吸附树脂柱过滤,树脂使用之前按照说明书先预处理^[17]。然后把吸附树脂使用 1 500 mL 色谱级甲醇反复洗脱,最后把洗脱液在 35 °C 下用旋蒸仪减压蒸发至 100 mL, -80 °C 下保存备用。

1.2.1.2 大田连作马铃薯根系分泌物的收集

参照张文明等^[18]收集方法并且略作改进,在甘肃定西长期连作定位试验田选择轮作、连作 5 年和连作 10 年的 3 个处理,每处理 3 个小区,现蕾期每个小区分别挖取马铃薯植株 5 株,每个处理共 15 株,把马铃薯根系表面黏附土壤反复抖动干净后,在现场用 500 mL 色谱级甲醇反复洗涤根系,把收集的根系分泌物 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,然后在 35 °C 用旋蒸仪浓缩到 100 mL,保存于 -80 °C 冰箱内备用。

1.2.2 根系分泌物衍生化

取样本 1 mL 于 1.5 mL 离心管中,在真空浓缩器中干燥提取物,向干燥后的代谢物加入 60 μL 甲氧胺盐试剂(甲氧胺盐酸盐,溶于吡啶 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),轻轻混匀后,放入烘箱中 80 °C 下孵育 30 min,向每

个样品中加入 80 μL BSTFA(双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺,含有 1% TMCS(氯三甲基硅烷),v/v),将混合物 70 °C 下孵育 1.5 h;冷却至室温,向混合的样本中加入 5 μL FAMES(饱和脂肪酸甲酯,溶于氯仿),随机顺序上机检测。

1.2.3 GC-TOF-MS 分析

Agilent 7890B 气相色谱-飞行时间质谱(PEG-ASUS HT, LECO, 美国)联用仪配有 Agilent DB-5MS 毛细管柱($30\text{ m}\times 250\text{ }\mu\text{m}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$, J & W Scientific, Folsom, 美国),以无分流模式注入 1 μL 等份样品。氦气作为载气,前入口吹扫流量为 $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,通过塔的气体流量为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。初始温度保持在 50 °C 下 1 min,然后以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升高到 310 °C,然后在 310 °C 下保持 8 min。注入、传输线和离子源温度分别为 280、280、250 °C。在电子碰撞模式下能量为 -70 eV。在溶剂延迟 6.25 min 后,以每秒 12.5 光谱的速率在 50—500 $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$ 范围内以全扫描模式获得质谱数据。

1.2.4 GC-TOF-MS 分析数据处理

使用 ChromaTOF 软件(V 4.3x, LECO)对质谱数据进行了峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分、峰对齐等分析^[19]。对物质定性工作中,使用了 LECO-Fiehn Rtx5 数据库,包括质谱匹配及保留时间指数匹配。最后,将 QC 样本中检出率 50% 以下或 RSD > 30% 的峰去除^[20]。

1.2.5 连作马铃薯根系分泌物收集液对尖孢镰孢菌菌丝生长的影响试验

先用细菌过滤器把收集的连作马铃薯根系分泌物过滤后,在超净工作台上取 250 μL 涂布在 PDA 平板上,等待 5 min,让根系分泌物入渗到培养基中;对照加等量的甲醇。共 4 个处理:对照、轮作、连作 5 年和连作 10 年,每个处理重复 5 次。用直径为 0.5 cm 的打孔器在尖孢镰孢菌菌落边缘打下菌饼,接种到上述培养皿中心位置,每皿接种 1 个菌饼,在培养箱(25 °C)培养,分别在培养 3、5、7 d 测定菌落直径,并在 7 d 后刮取菌丝,测定鲜质量,计算化感效应指数(RI)^[21]。

1.2.6 苹果酸和棕榈酸对尖孢镰孢菌菌丝生长的影响试验

分别用苹果酸和棕榈酸配置浓度为 0.05、0.1、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲醇溶液,在超净工作台上取 250 μL 配置液涂布在 PDA 平板培养基上,等待 5 min,让溶

液充分入渗到培养基中;对照加等量的甲醇。用打孔器取菌落边缘长势一致的菌丝,接入到经酚酸处理的PDA培养基中。在培养箱(25℃)培养,分别在培养3、5、7 d测定菌落直径。每个处理5个重复,以未加苹果酸和棕榈酸的处理作为对照。

1.2.7 盆栽试验

1.2.7.1 连作马铃薯根系分泌物对马铃薯枯萎病的影响试验

以没有种植过茄科作物的土壤为基质,将马铃薯脱毒原种播种于育苗钵中,幼苗生长至10 cm高,选取株高和长势一致的马铃薯苗进行处理。将收集到的连作马铃薯根系分泌物用细菌过滤器过滤后,每7 d加入25 mL根系分泌物原液,共添加4次。接种尖孢镰孢菌时,取长至满皿的菌种加无菌水制成浓度为 $1.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 悬液,接种在距马铃薯苗3 cm处用刀切断根系,深度切到盆底,苗子左右各一刀;把尖孢镰孢菌的悬浮液浇灌马铃薯切开的根系,每盆浇灌悬液25 mL。设只接种枯萎菌而不加根系分泌物原液处理为对照,10次重复。接种尖孢镰孢菌后15、30 d调查植株发病级别和病情指数。

1.2.7.2 苹果酸和棕榈酸对马铃薯枯萎病的影响试验

盆栽实验育苗和尖孢镰孢菌的接种方法和1.2.7.1相同。苹果酸和棕榈酸处理浓度为0.05、0.1、0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,每7 d加入25 mL酚酸溶液,共添加4次。设只接种枯萎菌而不加苹果酸和棕榈酸处理为对照(CK),10次重复。接菌后进行正常的田间管理。接种尖孢镰孢菌15、30 d调查植株病情指数。

1.3 统计分析

应用IBM SPSS Statistics 19.0进行方差分析(ANOVA);平均数比较应用Duncan多重比较法,显著水平为5%。

2 结果与分析

2.1 马铃薯根系分泌物的GC-TOF-MS分析

2.1.1 水培法条件下马铃薯根系分泌物的GC-TOF-MS分析

水培马铃薯根系分泌物总离子质谱图如图1,通过GC-TOF-MS质谱数据库纯化合物的比对,按照相似度大于850、峰面积大于50 000,得到水培马

铃薯根系分泌的主要化合物有48种(表1),其中小分子有机酸占有30种,占总分泌物的62.5%。

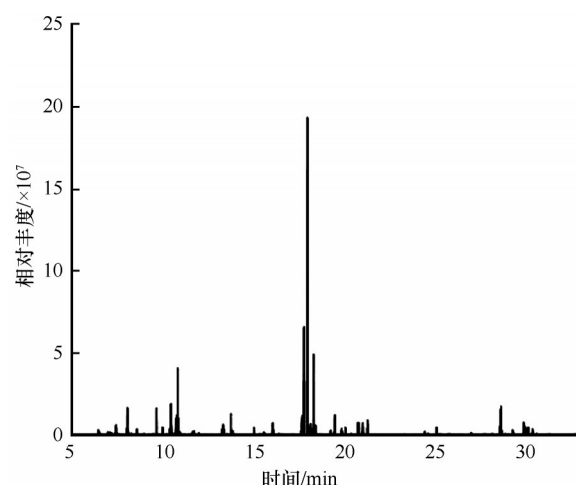


图1 水培马铃薯根系分泌物总离子质谱图

Fig.1 GC-TOF-MS total ion mass chromatogram of root exudates from hydroponic potato

2.1.2 大田条件下连作马铃薯根系分泌物的GC-TOF-MS分析

轮作、连作5年和连作10年的马铃薯根系分泌物总离子质谱图见图2。通过GC-TOF-MS质谱数据库纯化合物的比对,按照相似度大于850、峰面积大于50 000,得到马铃薯根系分泌的主要化合物有52个(表2)。主要是有机酸类化合物,其中包含了马铃薯水培试验检测出的马铃薯全部根系分泌的48种化合物,其中大田试验多检测出4种化合物有可能来自土壤之中。

从图2看出,轮作、连作5年和10年的马铃薯分泌物的总离子质谱图基本相似,出峰时间接近,但峰的高度和面积不一样,差异比较大,说明不同连作年限的马铃薯根系分泌物种类基本相同,因为出峰时间相同;峰的高低和面积表示根系分泌物的相对含量不一样。表2表明,轮作、连作5年和10年3个处理马铃薯分泌的糖类物质中无水葡萄糖的相对丰度变化比较大。轮作、连作5年和10年无水葡萄糖相对丰度分别为12.64%、16.51%、21.53%。不同连作年限马铃薯根系分泌的酚酸物质中苹果酸和棕榈酸相对丰度变化最大,轮作、连作5年和10年苹果酸的相对丰度分别为3.52%、5.10%和7.76%;轮作、连作5年和10年棕榈酸的相对丰度分别为2.95%、4.00%和6.56%。其次变化差异大的还有富马酸、柠檬酸、乙醇酸、缬氨酸、焦谷

表1 水培马铃薯根系分泌物中生物活性物质GC-TOF-MS鉴定

Table 1 Compounds in root exudates of hydroponic potato identified by GC-TOF-MS analysis

峰	停留时间/min	化合物	相对丰度/%	峰	停留时间/min	化合物	相对丰度/%
1	7.31	丙酮酸	0.04	25	15.86	阿拉伯糖醇	0.05
2	7.46	乳酸	1.23	26	15.99	岩藻糖	0.08
3	7.68	乙醇酸	0.06	27	17.00	莽草酸	0.02
4	8.07	丙氨酸	3.28	28	17.10	柠檬酸	0.08
5	8.66	3-羟丙酸	0.01	29	17.51	右旋奎宁酸	0.01
6	9.05	NG-甲基-L-精氨酸	0.05	30	17.75	果糖	13.06
7	9.67	缬氨酸	3.22	31	17.79	甘露糖	0.08
8	10.39	乙醇胺	0.76	32	17.92	无水葡萄糖	38.38
9	10.76	异亮氨酸	2.32	33	18.11	半乳糖	1.32
10	10.84	脯氨酸	8.07	34	18.23	甘露醇	0.02
11	10.94	甘氨酸	0.36	35	18.26	山梨醇	9.73
12	11.04	丁二酸	0.15	36	18.37	L-酪氨酸	1.17
13	11.23	甘油酸	0.01	37	19.22	棕榈油酸	0.03
14	11.36	尿嘧啶	0.03	38	19.43	棕榈酸	2.43
15	11.54	富马酸	0.06	39	19.80	肌醇	0.77
16	11.65	丝氨酸	0.44	40	20.94	亚油酸	0.60
17	11.99	别苏氨酸	0.28	41	20.94	L-色氨酸	1.45
18	13.31	苹果酸	1.27	42	20.99	反油酸	0.03
19	13.75	焦谷氨酸	2.52	43	21.22	硬脂酸	1.76
20	13.85	4-氨基丁酸	0.46	44	24.32	蔗糖	0.02
21	15.01	苯丙氨酸	0.21	45	24.40	二十二酸	0.01
22	15.29	五碳醛糖	0.12	46	24.82	纤维二糖	0.05
23	15.37	核糖	0.13	47	25.11	海藻糖	0.06
24	15.49	天冬酰胺	0.09	48	25.64	龙胆二糖	0.04

氨酸、棕榈油酸、亚油酸等,但是变化幅度都小于苹果酸和棕榈酸。

2.2 苹果酸和棕榈酸的确定

总离子谱图通过计算机检索和GC-TOF-MS质谱数据库纯化合物的比对进行物质鉴定,是依据物质的相似度进行比对的,为了准确验证关键化合物的存在,应该再用标准品来进行验证。通过苹果酸和棕榈酸2种标准物质离子质谱图可以看出(图3),13.31、19.43 min出的两个峰分别为苹果酸和棕榈酸。在相同时间所出两个峰被计算机检索系统确定为苹果酸和棕榈酸,由此肯定马铃薯根系确实分泌苹果酸和棕榈酸。

2.3 连作马铃薯根系分泌物收集液对马铃薯尖孢镰孢菌菌丝生长的影响

由表3可以看出,轮作马铃薯根系分泌物收集液能促进尖孢镰孢菌菌丝的生长,但是与对照相比差异不显著。与对照相比,连作5年马铃薯根分泌物收集液显著地促进了尖孢镰孢菌菌丝生长,培养3、5、7 d促进生长率7.88%—9.26%;连作10年马铃薯根系分泌物收集液更加显著地促进尖孢镰孢菌菌丝的生长,培养3、5、7 d促进生长率11.24%—13.16%。与对照相比,马铃薯根系分泌物的收集液都显著增加了尖孢镰孢菌的菌丝鲜质量,连作10年的提高菌丝最大,其次连作5年,差异都达到显著水平。

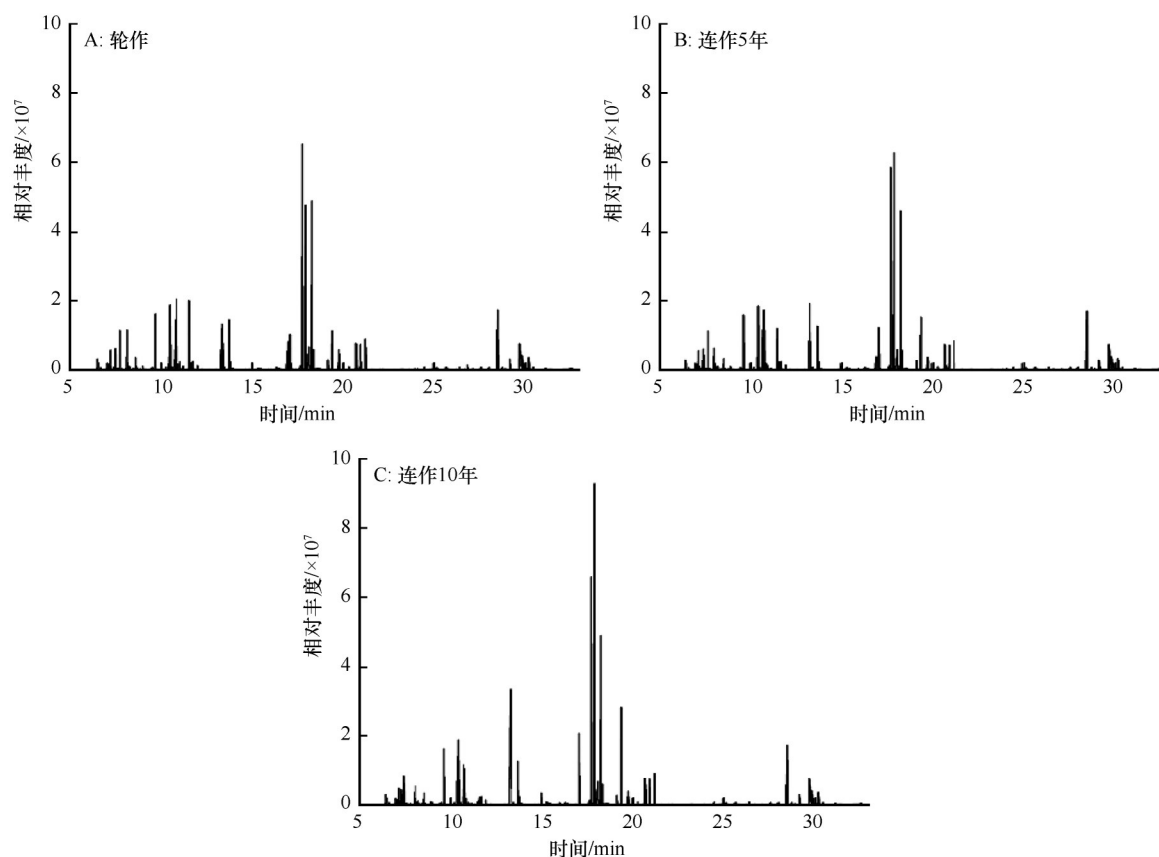


图2 马铃薯根系分泌物总离子质谱图

Fig.2 GC-TOF-MS total ion mass chromatogram of root exudates from potato

2.4 苹果酸和棕榈酸对马铃薯尖孢镰孢菌菌丝生长的影响

从表4可以看出,与不加苹果酸的对照相比,加苹果酸能促进尖孢镰孢菌菌丝的生长, RI 均为正值,但是当苹果酸浓度 $0\text{--}0.10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对尖孢镰孢菌菌丝的生长影响不显著;当浓度 $0.10\text{--}0.50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,苹果酸对尖孢镰孢菌起到显著的促进作用,这说明苹果酸在低浓度对尖孢镰孢菌的促进作用不明显,而在高浓度表现出较强的促进作用。

与不加棕榈酸的对照相比,当棕榈酸的浓度 $0\text{--}0.10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, RI 均为正值,表明棕榈酸对尖孢镰孢菌生长有促进作用,当棕榈酸浓度 $0.05\text{--}0.10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,棕榈酸对尖孢镰孢菌生长起到了显著的促进作用,但是棕榈酸浓度 $0.10\text{--}0.50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,明显抑制尖孢镰孢菌生长,其中在 $0.50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下培养到第5、7天时, RI 表现为负值。这说明棕榈酸对尖孢镰孢菌生长在低浓度时是促进作用,高浓度时表现出明显抑制的化感作用。

2.5 连作马铃薯根系分泌物收集液对马铃薯枯萎病病情指数的影响

由表5可知,马铃薯根系分泌物收集液对马铃薯枯萎病发病级别和病情指数都有促进作用。与对照相比,连作5年的马铃薯根系分泌物收集液显著地提高了马铃薯枯萎病的发病级别,连作10年的差异更加显著;但是轮作马铃薯根系分泌物收集液有提高枯萎病发病级别的趋势,差异却不显著。与对照相比,第15天轮作的病情指数增加2.5,继续生长到第30天病情指数增加5。连作5年的病情指数第5天增加8.5,继续生长到第30天病情指数增加12.5。连作10年的病情指数第5天增加20,继续生长到第30天病情指数增加27.5。这说明连作10年和5年马铃薯根系分泌物收集液能显著提高马铃薯枯萎病的发病级别和病情指数。

2.6 苹果酸和棕榈酸对马铃薯枯萎病病情指数的影响

由表6可以看出,苹果酸和棕榈酸都能促进马铃薯枯萎病发病级别和病情指数增大。苹果酸和

表2 大田试验连作马铃薯根系分泌物中生物活性物质GC-TOF-MS鉴定

Table 2 Compounds in root exudates of continuous cropping potato in field identified by GC-TOF-MS analysis

峰	停留 时间 /min	化合物	相对丰度/%			峰	停留 时间 /min	化合物	相对丰度/%		
			轮作	连作 5年	连作 10年				轮作	连作 5年	连作 10年
1	7.2	2-羟基吡啶	1.50	1.51	1.12	27	15.99	岩藻糖	0.08	0.11	0.15
2	7.31	丙酮酸	0.02	0.05	0.52	28	17.00	莽草酸	2.13	1.14	0.03
3	7.46	乳酸	1.61	1.63	1.91	29	17.10	柠檬酸	2.69	3.22	4.75
4	7.68	乙醇酸	2.98	2.18	0.08	30	17.51	右旋奎宁酸	0.01	0.02	0.03
5	8.07	丙氨酸	1.68	1.70	1.28	31	17.75	果糖	17.40	16.22	15.23
6	8.66	3-羟丙酸	0.28	0.01	0.02	32	17.79	甘露糖	0.07	0.11	0.13
7	9.05	NG-甲基-L-精氨酸	0.04	0.07	0.08	33	17.92	无水葡萄糖	12.64	16.51	21.53
8	9.67	缬氨酸	4.26	4.06	3.76	34	18.11	半乳糖	1.73	1.75	1.55
9	10.39	乙醇胺	0.98	1.00	3.22	35	18.23	甘露醇	0.01	0.02	0.03
10	10.76	异亮氨酸	3.06	3.07	2.71	36	18.26	山梨醇	12.96	12.87	11.35
11	10.84	脯氨酸	5.42	5.40	2.45	37	18.37	L-酪氨酸	1.53	1.55	1.38
12	10.94	甘氨酸	0.45	0.48	0.44	38	19.22	棕榈油酸	0.01	0.04	0.05
13	11.04	丁二酸	0.17	0.20	0.19	39	19.43	棕榈酸	2.95	4.00	6.56
14	11.23	甘油酸	0.28	0.01	0.02	40	19.67	N-乙酰-D-甘露糖胺	0.01	0.04	0.05
15	11.36	尿嘧啶	0.02	0.04	0.06	41	19.8	肌醇	1.00	1.02	0.91
16	11.54	富马酸	5.31	3.16	0.24	42	20.94	亚油酸	0.77	0.80	0.88
17	11.65	丝氨酸	0.56	0.58	0.63	43	20.94	L-色氨酸	1.91	1.92	1.70
18	11.99	别苏氨酸	0.34	0.37	0.34	44	20.99	反油酸	0.01	0.04	0.05
19	13.31	苹果酸	3.52	5.10	7.76	45	21.22	硬脂酸	2.32	2.26	2.07
20	13.75	焦谷氨酸	3.87	3.57	2.96	46	24.32	蔗糖	0.01	0.02	0.03
21	13.85	4-氨基丁酸	0.58	0.61	0.55	47	24.4	二十二酸	0.02	0.01	0.02
22	15.01	苯丙氨酸	0.25	0.27	0.28	48	24.82	纤维二糖	0.03	0.06	0.07
23	15.29	五碳醛糖	0.13	0.16	0.15	49	25.11	海藻糖	0.04	0.07	0.08
24	15.37	核糖	0.14	0.17	0.16	50	25.64	龙胆二糖	0.02	0.05	0.06
25	15.49	天冬酰胺	0.09	0.12	0.12	51	26.41	肌醇半乳糖苷二水合物	0.20	0.22	0.21
26	15.86	阿拉伯糖醇	0.04	0.07	0.07	52	27.66	绿原酸	0.02	0.02	0.03

棕榈酸浓度0—0.05 mmol·L⁻¹时对枯萎病的发病级别有提高作用,但是差异不显著。当2种酚酸浓度0.05—0.50 mmol·L⁻¹时,对枯萎病的发病级别显著提高,浓度越高差异越大。病情指数随着2种酚酸浓度的增大而提高,浓度越高提高的幅度越大。这说明2种酚酸对马铃薯枯萎病有显著的促进作用。

3 讨论

小分子有机酸是植物生命活动的重要次生代谢产物,植物利用发达的根系分泌到土壤中去,为土壤中病原菌生长、活动、繁殖提供碳源,也为病原菌与寄主相互信息交流桥梁^[22]。植物根系分泌的大部分有机酸具有化感效应,土壤中植物根系分泌

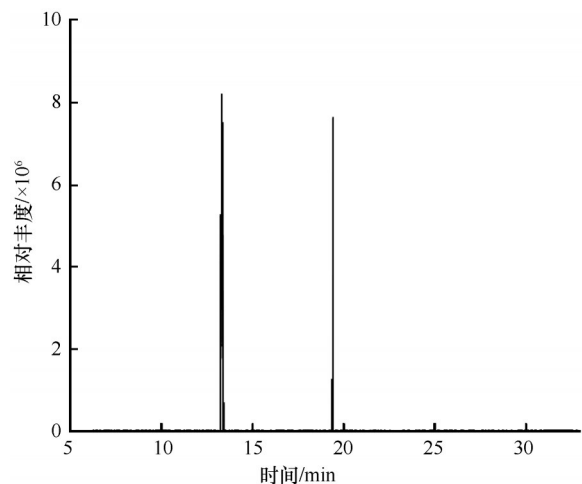


图3 标准物质苹果酸和棕榈酸离子质谱图

Fig.3 Ion mass chromatogram of standard substance of Malic acid and palmitic acid

和代谢产物不断累积,达到一定的量并且影响植物

种子萌发、生长、病原菌活动和微生物群落结构变化,进而发生自毒作用^[8,23]。自毒物质的研究集中在中药材、甜瓜、黄瓜、茄科作物茄子和番茄等作物上,引起自毒作用的有机酸主要有阿魏酸、苯甲酸、丁香酸、香草酸、香豆酸、水杨酸、肉桂酸、邻苯二甲酸和对羟基苯甲酸等,这些有机酸抑制植物生长发育外还对土壤中微生物,尤其是病原菌生长具有促进化感效应,导致连作过程中土传病害发生和加剧^[8,24]。有关在茄科作物马铃薯自毒作用的研究成为近年来关注焦点,课题前期研究表明,在甘肃景泰灌区连作马铃薯的自毒物质邻苯二甲酸二丁酯和棕榈酸能促进立枯丝核菌生长和繁殖^[18,25]。近年来随着甘肃中部连作马铃薯枯萎病加剧^[5],本试验对甘肃定西旱地连作马铃薯根系分泌物进行鉴定,首次发现苹果酸也对马铃薯具有自毒作用,能促进

表 3 连作马铃薯根系分泌物对尖孢镰孢菌菌丝生长的影响

Table 3 Effect of root exudates on mycelium growth of *Fusarium oxysporum schlecht*

处理	培养时间/d						菌丝鲜质量 /g
	3		5		7		
	菌落直径/mm	化感指数 <i>RI</i>	菌落直径/mm	化感指数 <i>RI</i>	菌落直径/mm	化感指数 <i>RI</i>	
对照	32.02 ^c	—	49.09 ^c	—	63.08 ^c	—	0.0096 ^d
轮作	33.61 ^b	0.047 ^c	50.72 ^b	0.032 ^c	65.89 ^b	0.043 ^c	0.0183 ^c
连作 5 年	34.58 ^{ab}	0.074 ^b	52.96 ^{ab}	0.073 ^b	68.92 ^{ab}	0.085 ^b	0.0362 ^b
连作 10 年	35.62 ^a	0.101 ^a	54.93 ^a	0.106 ^a	71.38 ^a	0.116 ^a	0.0568 ^a

不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

表 4 苹果酸和棕榈酸对尖孢镰孢菌菌丝生长的影响

Table 4 Effect of Malic acid and Palmitic acid on mycelium growth of *Fusarium oxysporum schlecht*

有机酸	浓度 /(mmol·L ⁻¹)	培养时间/d						菌丝鲜 质量/g
		3		5		7		
		菌落直径/mm	化感指数 <i>RI</i>	菌落直径/mm	化感指数 <i>RI</i>	菌落直径/mm	化感指数 <i>RI</i>	
苹果酸	0.00	32.08 ^b	—	50.34 ^b	—	65.04 ^b	—	0.0102 ^c
	0.05	33.98 ^{ab}	0.056 ^b	52.30 ^b	0.037 ^c	66.32 ^{ab}	0.019 ^b	0.0239 ^b
	0.10	34.67 ^{ab}	0.075 ^b	54.58 ^{ab}	0.078 ^b	67.82 ^{ab}	0.041 ^a	0.0389 ^b
	0.50	35.88 ^a	0.106 ^a	57.12 ^a	0.119 ^a	68.72 ^a	0.054 ^a	0.0767 ^a
棕榈酸	0.00	32.08 ^{bc}	—	50.34 ^b	—	65.04 ^{bc}	—	0.0102 ^c
	0.05	33.25 ^{ab}	0.035 ^b	52.72 ^{ab}	0.045 ^b	66.96 ^{ab}	0.029 ^b	0.0223 ^b
	0.10	34.12 ^a	0.060 ^a	53.62 ^a	0.061 ^a	67.24 ^a	0.033 ^a	0.0448 ^a
	0.50	32.37 ^c	0.009 ^c	50.22 ^b	-0.002 ^c	64.78 ^c	-0.004 ^c	0.0237 ^b

不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

表 5 连作马铃薯根系分泌物对马铃薯枯萎病发病级别和病情指数的影响

处理	15 d		30 d	
	发病级别	病情指数	发病级别	病情指数
对照	1.10 ^c	27.50	1.20 ^c	30.00
轮作	1.20 ^{bc}	30.00	1.40 ^{bc}	35.00
连作 5 年	1.40 ^b	35.00	1.70 ^b	42.50
连作 10 年	1.90 ^a	47.50	2.30 ^a	57.50

不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

表 6 尖孢镰孢菌侵染后马铃薯枯萎病发病级别和病情指数

有机酸	浓度/ (mmol·L ⁻¹)	15 d		30 d	
		发病 级别	病情 指数	发病 级别	病情 指数
苹果酸	0.00	1.10 ^c	27.50	1.40 ^c	35.00
	0.05	1.30 ^{bc}	32.50	1.60 ^c	40.00
	0.10	1.50 ^{bc}	37.50	2.00 ^b	50.00
	0.50	2.00 ^a	50.00	2.50 ^a	62.50
棕榈酸	0.00	1.10 ^c	27.50	1.40 ^c	35.00
	0.05	1.20 ^c	30.00	1.50 ^c	37.50
	0.10	1.60 ^b	40.00	1.90 ^b	47.50
	0.50	1.90 ^a	47.50	2.40 ^a	60.00

不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

尖孢镰孢菌生长发育,提高枯萎病的病情指数;课题组在前期景泰灌区连作马铃薯中发现自毒物质棕榈酸只对立枯丝核菌具有化感促进作用^[18,25],在本试验中明确发现棕榈酸在低浓度时也对尖孢镰孢菌生长具有促进作用,同样能提高马铃薯枯萎病的病情指数。

马铃薯根系分泌物中有机酸的鉴定对于控制土传病害、克服马铃薯连作障碍具有重要的理论意义^[18,25]。本研究色谱图中的其余未知峰和根系分泌物的有机酸与土壤微生物的关系等还需要进一步的深入研究。

4 结论

马铃薯主产区甘肃定西连作重病田马铃薯枯

萎病发病率高达到 80%,连作马铃薯根系分泌物的 48 种物质中有机酸占 30 种。通过比较轮作、连作 5 年和连作 10 年处理有机酸的相对含量,发现苹果酸和棕榈酸的差异比较大。

马铃薯连作条件下根系分泌物能显著增强尖孢镰孢菌的发育并加重枯萎病病情指数。通过外源添加法研究苹果酸和棕榈酸对尖孢镰孢菌的化感作用,苹果酸 0.10—0.50 mmol·L⁻¹ 浓度对尖孢镰孢菌生长起到显著的促进作用;棕榈酸浓度 0.05—0.10 mmol·L⁻¹ 对尖孢镰孢菌生长起到了显著的促进作用。盆栽试验表明,苹果酸和棕榈酸在浓度 0.05—0.50 mmol·L⁻¹ 内对马铃薯枯萎病有显著的促进作用。

苹果酸和棕榈酸是马铃薯根系分泌的化感自毒物质,对尖孢镰孢菌生长起促进作用是连作马铃薯枯萎病发病率高的主要原因。

参考文献:

[1] 牛秀群,李金花,张俊莲,等.甘肃省干旱灌区连作马铃薯根际土壤中镰刀菌的变化[J].草业学报,2011,20(4):236-243.

[2] 沈宝云,刘星,王蒂,等.甘肃省中部沿黄灌区连作对马铃薯植株生理生态特性的影响[J].中国生态农业学报,2013,21(4):689-699.

[3] 谢奎忠,陆立银,罗爱花.不同栽培措施对连作马铃薯土壤真菌、真菌性病害和产量的影响[J].中国蔬菜,2013(2):70-75.

[4] 庄敬华,杨长城,高增贵,等.连作对甜瓜化感作用的模拟试验[J].植物保护,2008,34(5):137-139.

[5] 谢奎忠,陆立银,罗爱花,等.长期连作对马铃薯土传病害和产量的影响[J].中国种业,2018(2):65-67.

[6] 安小敏,胡俊,武建华,等.马铃薯枯萎病病原菌研究概述[J].中国马铃薯,2017,31(5):302-306.

[7] 程莹,白寿发,庄敬华,等.甜瓜残茬腐解物对镰孢枯萎病的助长作用[J].中国农学通报,2011,27(8):217-221.

[8] 杨瑞秀,高增贵,姚远,等.甜瓜根系分泌物中酚酸物质对尖孢镰孢菌的化感效应[J].应用生态学报,2014,25(8):2355-2360.

[9] Lara-Nunez A, Romero-Romero T, Ventura J L, et al. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxi-dative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill[J]. Plant, Cell and Environment, 2006, 29:2009-2016.

[10] Siegrid S, Roswitha M, Horst V. Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains [J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 122(3):395-401.

[11] Wu H S, Liu D Y, Linga N, et al. Influence of root exudates of watermelon on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. Soil Science Society of America Journal, 2009, 73(4): 1150-1156.

[12] Mol L, Riessen H W V. Effect of plant roots on the germination

- of microsclerotia of *Verticillium dahliae* use of root observation boxes to assess differences among crops[J]. European Journal of Plant Pathology, 1995, 101(6): 673–678.
- [13] Pantelides L S, Tjamos S E, Striglis L A, et al. Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using real time QPCR analysis and biomarker transformation[J]. Biological Control, 2009, 50(1): 30–36.
- [14] Xie K Z, Yue Y, Qiu H Z, et al. Complete mitochondrial genome sequence of potato pathogenic fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. KGSJ26F3[J]. Mitochondrial DNA Part B Resources, 2020, 5(3): 2408–2409.
- [15] 陈维林, 马莹, 龚德勇, 等. 烤烟托盘浅水密播育苗及其配套移栽技术研究[J]. 农业现代化研究, 2014(5): 9–13.
- [16] Asrar Z, Mozafari H, Rezanejad F, et al. Calcium and L-histidine effects on ascorbate glutathione cycle components under nickel-induced oxidative stress in tomato plants[J]. Biologia Plantarum, 2014, 58(4): 709–716.
- [17] Li A, Zhang Q, Chen J, et al. Adsorption of phenolic compounds on Amberlite XAD-4 and its acetylated derivative MX-4[J]. Reactive and Functional Polymers, 2001, 49(3): 225–233.
- [18] 张文明, 邱慧珍, 张春红, 等. 不同连作年限马铃薯根系分泌物的成分鉴定及其生物效应[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(12): 1811–1818.
- [19] Kind T, Wohlgemuth G, Lee D Y, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(24): 10038–10048.
- [20] Dunn W B, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. Nat Protoc, 2011, 6(7): 1060–1083.
- [21] Williamson G B, Richardson D. Bioassays for allelopathy: measuring treatment responses with independent controls[J]. Journal of Chemical Ecology, 1988, 14(1): 181–187.
- [22] Blum U. Relationships between phenolic acid concentrations, transpiration, water utilization, leaf area expansion, and uptake of phenolic acid: nutrient culture studies[J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 31: 1907–1932.
- [23] Bais H P, Weir T L, Perry L G, et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms[J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57: 233–266.
- [24] 李敏, 闫兴富, 马丽, 等. 酚酸类化感自毒物质对枸杞种子萌发的抑制作用[J]. 生态学报, 2020, 40(6): 2072–2079.
- [25] 张文明, 邱慧珍, 张春红, 等. 马铃薯根系分泌物成分鉴别及其对立枯丝核菌的影响[J]. 应用生态学报, 2015, 26(3): 859–866.

Identification of root exudates from continuous cropping potato in dry land and their allelopathy to *Fusarium oxysporum*

Xie Kuizhong^{1,2}, Qiu Huizhen¹, Hu Xinyuan², Luo Aihua²

(1. College of Resources and Environmental Sciences / Gansu Provincial Key Lab. of Aridland Crop Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Potato Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to reveal the relationship between *Fusarium wilt* and allelochemicals of potato continuous cropping. The root exudates of continuous cropping potato were collected by hydroponics and long-term field experiments. The results showed that 30 kinds of organic acids were detected in 48 compounds secreted by potato roots. Comparing the relative organic acids contents of rotation, 5 years continuous cropping and 10 years continuous cropping, it was found that there was significant difference between malic acid and palmitic acid. The allelopathic effects of malic acid and palmitic acid on *Fusarium oxysporum* were studied by exogenous addition method. The results showed that malic acid and palmitic acid promoted the growth of *F. oxysporum* in the concentration range of 0.10–0.50 and 0.05–0.10 mmol·L⁻¹, respectively. The results from the pot experiment showed that malic acid and palmitic acid could significantly promote potato *Fusarium wilt* in the concentration range of 0.05–0.50 mmol·L⁻¹. The results showed that malic acid and palmitic acid were allelochemicals secreted by potato roots, and the promoting effect of malic acid and palmitic acid on *F. oxysporum* was the main cause of potato *Fusarium wilt*.

Key words: potato; root exudates; malic acid; palmitic acid; allelopathy; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium wilt*